

# UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE Pharmacie

ANNÉE 2015-2016

THÈSE N°

## **Le fractionnement par couplage flux-force en flux hydrodynamique**

Etude de l'application de la technique de fractionnement par couplage flux-force  
en fibre creuse

THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance du mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées d'Innovation  
Pharmaceutique et Recherche

présentée et soutenue publiquement

le 03 mai 2016

par

**Marc Marcel Stéphane MONGY**

né(e) le 1<sup>er</sup> août 1987, à DUNKERQUE

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Philippe CARDOT.....Président

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX.....Juge

M. le Docteur Thierry CHIANEA.....Juge

M. le Docteur Franck BONNIER.....Juge



# UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE Pharmacie

ANNÉE 2015-2016

THÈSE N°

## **Le fractionnement par couplage flux-force en flux hydrodynamique**

Etude de l'application de la technique de fractionnement par couplage flux-force  
en fibre creuse

THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance du mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées d'Innovation  
Pharmaceutique et Recherche

présentée et soutenue publiquement

le 03 mai 2016

par

**Marc Marcel Stéphane MONGY**

né(e) le 1<sup>er</sup> août 1987, à DUNKERQUE

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Philippe CARDOT.....Président

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX .....Juge

M. le Docteur Thierry CHIANEA.....Juge

M. le Docteur Franck BONNIER.....Juge

**A Monsieur le Professeur Philippe Cardot, mon directeur de thèse**

Je vous suis reconnaissant de m'avoir accueilli dans votre laboratoire pendant mon internat, et de m'avoir proposé ce sujet, qui m'aura permis de prendre contact avec la recherche. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements et mon plus profond respect.

**A Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux**

Je te suis extrêmement reconnaissant pour le temps que tu m'as consacré, tes conseils et ton soutien m'ont été d'une aide précieuse pour garder la tête froide et le moral, et au final, à mener à terme ce travail. Collaborer avec toi fut un réel plaisir et c'est un honneur de te compter parmi les membres de ce jury.

**A Monsieur le Docteur Thierry Chianea**

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Biochimie, et de m'avoir soutenu pendant ces années difficiles.

**A Monsieur le Docteur Franck Bonnier**

Même si on ne s'est jamais vus jusque-là, je vous remercie d'avoir accepté de lire ce travail et vous prie de trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

**A l'équipe du Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Limoges**

Au professeur Pierre Marquet, et à toute l'équipe du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie pour leur accueil chaleureux et leur sympathie,

A Laurence Malamas, Vincent Morichon, Eric, Loïc, Joël, ~~Éoline~~, pour toutes les choses qu'ils m'ont apprises, et leur soutien,

A Jean-Michel Gaulier et Christian Moesch, pour leur sympathie et leur patience,

Au professeur Gérard Lachâtre, à qui je souhaite une bonne retraite,

A Jean-Baptiste Woillard, pour m'avoir initié aux joies de .R et des estimateurs Bayesiens (t'auras essayé, au moins, mais sans les bases, malheureusement...), et pour sa bonne humeur perpétuelle, presque insolente.

### **A l'équipe de la Pharmacie Centrale du CHU de Limoges**

A la docteure Voa Ratzimbasafy, et à toute l'équipe de la Pharmacie du CHU de Limoges, à Sonia, Mylène et les autres, que je remercie pour leur sympathie et à qui je souhaite une bonne continuation.

### **A l'équipe du Laboratoire de Biochimie du CHU de Limoges**

Au professeur Franck Sturtz, et à toute l'équipe du laboratoire de Biochimie du CHU de Limoges, à Yasser Baaj, à Marie-Agnès Costa, à Claire et à Florence pour leur soutien et leur disponibilité.

A Yannick Tholance, qui m'aura accompagné et soutenu jusqu'au bout, j'espère que le climat de Saint-Etienne te plait.

### **A l'équipe du Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie**

A Serge Battu, je te souhaite une bonne continuation pour ce que tu fais en ce moment, et je te remercie quand-même de m'avoir soutenu (ou supporté?) pendant tout ce temps.

A Dominique Clédat, Isabelle Basly et Claude Calliste, à Tayssir Ibrahim et Nicolas Vedrenne, pour leur soutien moral.

A Ansoiri Bamoudou, pour son aide sur le cétuximab, et aux autres étudiants de M1 passés au labo, pour leur soutien moral.

## **A l'équipe du Laboratoire d'Immunologie**

Au professeur Marie-Odile Jauberteau, au docteur Fabrice Lalloué, à Thomas Naves, à Sandra Pinet, pour leur aide et leur soutien moral.

## **A mes co-internes**

A Justine Rougeot, Vincent Lebreton, Jennifer Friedl, Marie Mouls, Lionel Ramin et tous les autres que j'ai connus à l'internat pour les bons moments qu'on a passés ensemble.

**Aux équipes administratives du CHU de Limoges et de la Faculté de Pharmacie de Limoges, pour leur sympathie et leur disponibilité.**

**A l'équipe de la Pharmacie du Centre Hospitalier d'Armentières (en tant que FFI, car quand il n'y en a plus, y'en a encore...)**

Aux Docteurs Christian Bonenfant et Nathalie Guénault, pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont offert,

A Maxime Mutombo et Camille Devos, pour leurs conseils avisés et leur sympathie,

A Jean-Nicolas "Jinnette" Chatelet et Justin Courtin, mes co-internes, pour leur amitié.

A toute l'équipe des préparateurs pour les bons moments passés autour de la Tassimo.

## **A ma famille**

A mes ~~pires déménageurs du monde~~ chers parents, qui auront tout fait pour me soutenir jusque-là, à Alice, ma chère soeur, qui aura tout fait pour me supporter jusque-là, à François, qui est un peu le grand-frère que je n'aurai jamais eu.

A Mamie, qui pense toujours à ses petits enfants.

A Anne-Marie et Jean-Bernard, qui m'ont vu grandir et qui ont toujours été présents.

A Odette et Pierre, merci pour votre gentillesse inégalable et vos petites attentions à chaque retour au pays. Avec vous, notre famille de cœur s'est élargie.

A Pascale, ma chère marraine, qui pense toujours à moi au nouvel-an.

A Lauranne, pour son soutien moral, et les bons moments passés.

A Olivier, pour m'avoir donné l'envie de suivre des études de pharmacie.

### **A tous les autres**

A tout le personnel de l'auto-école Gourserol pour leur sympathie, et plus particulièrement à Jérôme et Alain, pour leur infinie patience et leur amitié, et pour m'avoir permis de décrocher ce foutu papier rose qui me pourrissait la vie depuis si longtemps déjà.

Au professeur Eric Lemonnier.

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1<sup>er</sup> VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

**PROFESSEURS** :

<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MAMBU</b> Lengo	PHARMACOGNOSIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOSTATISTIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES** :

<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
<b>PICARD</b> Nicolas	PHARMACOLOGIE

**ROGEZ** Sylvie

BACTERIOLOGIE ET  
VIROLOGIE

**SAINT-MARCOUX** Franck

TOXICOLOGIE

**MAITRES DE CONFERENCES :**

**BASLY** Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE ET  
BROMATOLOGIE

**BEAUBRUN-GIRY** Karine

PHARMACOTECHNIE

**BILLET** Fabrice

PHYSIOLOGIE

**CALLISTE** Claude

BIOPHYSIQUE,  
BIOMATHEMATIQUES ET  
INFORMATIQUE

**CLEDAT** Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE ET  
BROMATOLOGIE

**COMBY** Francis

CHIMIE ORGANIQUE ET  
THERAPEUTIQUE

**COURTIOUX** Bertrand

PHARMACOLOGIE,  
PARASITOLOGIE

**DELEBASSEE** Sylvie

MICROBIOLOGIE-  
PARASITOLOGIE-  
IMMUNOLOGIE

**DEMIOT** Claire-Elise

PHARMACOLOGIE

**FAGNERE** Catherine

CHIMIE ORGANIQUE ET  
THERAPEUTIQUE

**FROISSARD** Didier

BOTANIQUE ET  
CRYPTOGAMIE

**GRIMAUD** Gaëlle

CHIMIE ANALYTIQUE ET  
CONTROLE DU  
MEDICAMENT

**JAMBUT** Anne-Catherine

CHIMIE ORGANIQUE ET  
THERAPEUTIQUE

<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MERCIER</b> Aurélien	PARASITOLOGIE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE- PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
<b>PASCAUD</b> Patricia	PHARMACIE GALENIQUE - BIOMATERIAUX CERAMIQUES
<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

**PROFESSEUR DE LYCEE PROFESSIONNEL :**

<b>ROUMIEUX</b> Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

**ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :**

<b>CHEMIN</b> Guillaume (01.09.2015 au 31.08.2016)	BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET
--	------------------------------

CLINIQUE,  
CANCEROLOGIE

**FABRE** Gabin (01.10.2015 au 31.08.2016)

CHIMIE PHYSIQUE -  
PHYSIQUE

**PROFESSEURS EMERITES :**

**BUXERAUD** Jacques

**DREYFUSS** Gilles

**LOUDART** Nicole

## Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

# Table des matières

Remerciements.....	9
Introduction.....	14
1.Le fractionnement par couplage flux-force à flux hydrodynamique.....	16
1.1.Théories et principes de base.....	16
1.1.1.Mode d'élution normal (Brownien).....	16
1.1.1.1.Description.....	16
1.1.1.2.Théorie de la rétention en mode Brownien.....	24
1.1.1.3.Relation entre coefficient de diffusion et masse moléculaire.....	29
1.1.1.4.Effet de la forme de la particule sur les résultats obtenus.....	31
1.1.1.5.Résolution et sélectivité.....	35
1.1.1.6.Théorie des plateaux, de l'élargissement des pics, de la dispersion des particules et du non-équilibre.....	36
1.1.1.7.Processus de relaxation – Notion de relaxation primaire.....	40
1.1.1.8.Théories de l'optimisation de la FFF.....	44
1.1.1.9.La FFF programmée - Notion de relaxation secondaire.....	45
1.1.1.9.1.Programmation de la vitesse longitudinale.....	46
1.1.1.9.2.Programmation de champ.....	47
1.1.2.Mode d'élution stérique/hyperlayer.....	52
1.1.2.1.Description.....	52
1.1.2.2.Seuil d'inversion stérique.....	59
1.2.Les différentes techniques mettant en jeu un flux hydrodynamique.....	60
1.2.1.Le fractionnement par couplage flux-force à flux symétrique (SF4).....	60
1.2.1.1.Profils de vitesses.....	61
1.2.1.2.Relaxation.....	63
1.2.2.Le fractionnement par couplage flux-force à flux asymétrique (AF4).....	66
1.2.2.1.Relaxation.....	67
1.2.2.2.Détermination du temps de volume mort ( $t_0$ ).....	71
1.2.2.3.Problématiques liées à la vitesse et à la conception des canaux.....	73
1.2.2.4.Détermination des temps de rétention ( $t_r$ ) théoriques.....	79
1.2.2.5.Programmation de champ et de vitesse.....	80
1.2.3.Le fractionnement par couplage flux-force en fibre creuse.....	82
1.2.3.1.Théories.....	83
1.2.3.2.Profils de vitesse à l'intérieur de la fibre creuse.....	85
1.2.3.3.Plateaux théoriques et temps de rétention.....	88

1.2.3.4.Focalisation/Relaxation.....	89
1.2.3.5.Temps de focalisation nécessaire.....	92
1.2.3.6.Détermination du temps de volume mort ( $t_0$ ) et du volume mort de la fibre.	93
1.2.3.6.1.Temps de rétention théorique.....	94
1.2.3.6.2.Programmation de champ radial et de vitesse.....	94
2.Problèmes pratiques liés à l'application des techniques de FFF hydrodynamique.	95
2.1.Définition d'un colloïde.....	95
2.2.Les interactions mises en jeu dans les hydrocolloïdes.....	96
2.2.1.Les forces de Van der Waals.....	96
2.2.1.1.Forces de Keesom.....	96
2.2.1.2.Forces de Debye.....	97
2.2.1.3.Forces de London.....	99
2.2.1.4.Bilan des interactions de Van der Waals.....	101
2.2.2.Les forces électrostatiques.....	106
2.2.3.La théorie DLVO.....	110
2.3.Influence de ces interactions sur l'emploi des techniques de fractionnement par couplage flux-force.....	112
2.3.1.Interactions particule-membrane.....	112
2.3.1.1.Description des membranes et frittés.....	112
2.3.1.2.Effet du champ latéral.....	118
2.3.1.3.Effets liés au liquide porteur.....	118
2.3.1.3.1. pH du liquide porteur.....	118
2.3.1.3.2. Composition du liquide porteur.....	118
2.3.1.4.Effets liés à la membrane.....	119
2.3.1.4.1. Rugosité et imperfections de surface.....	119
2.3.1.4.2. Composition chimique de la membrane et fonctionnalisation des groupements libres de la surface de la membrane.....	120
2.3.1.4.3. Etat d'ionisation.....	120
2.3.1.5.Un détournement un peu original de la FFF.....	121
2.3.2.Interactions particule-particule.....	121
3.Mise en place expérimentale.....	128
3.1.Anticorps issus d'un réactif de biochimie.....	128
3.1.1.Matériels et méthodes.....	128
3.1.1.1.Matériel de chromatographie liquide haute performance, connectique, procédures d'utilisation.....	128
3.1.1.2.Chambre de séparation.....	130
3.1.1.3.Echantillons.....	132

3.1.1.4.Procédures.....	132
3.1.1.5.Résultats et discussions.....	135
3.2.Cas d'un anticorps à visée thérapeutique : le Cétuximab.....	139
3.2.1.Matériel et méthodes.....	140
3.2.1.1.Matériel de chromatographie liquide haute performance, connectique, procédures d'utilisation.....	140
3.2.1.2.Chambre de séparation.....	142
3.2.1.3.Echantillon.....	142
3.2.2.Résultats et discussion.....	142
3.3.Essais sur billes de latex.....	149
3.3.1.Matériel et méthodes.....	149
3.3.1.1.Matériel de chromatographie liquide haute performance, connectique, procédures d'utilisation.....	149
3.3.1.2.Chambre de séparation.....	151
3.3.1.3.Echantillons.....	151
3.3.2.Résultats et discussion.....	152
Conclusion.....	155
Bibliographie.....	158

## Introduction

Le traitement des pathologies les plus lourdes s'appuie essentiellement aujourd'hui sur les biothérapeutiques. Les biothérapeutiques comprennent à la fois l'utilisation de substances biologiques telles que les anticorps, les facteurs de croissance ou d'autres dérivés protéiques ((1), (2)). Toutefois, ex-vivo, les protéines ont une forte tendance à se dégrader ((3), (4), (5)). Cette dégradation peut se traduire notamment par la formation d'agrégats ((6)), ou par une fragmentation, ce qui se traduit par une altération de l'effet souhaité, ainsi qu'une immunogénécité accrue.

Dans ce contexte, la purification de macromolécules est devenue un enjeu économique majeur. Cet enjeu économique repose en particulier sur l'emploi de techniques séparatives, telles que l'ultracentrifugation analytique, ou les techniques chromatographiques comme la chromatographie d'exclusion stérique.

L'ultracentrifugation analytique est actuellement la technique de référence, et offre une fourchette de séparation allant de la centaine de Daltons jusqu'à plusieurs centaines de millions de Daltons ((7), (8)) ( $1 \text{ Dalton} = 1 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Elle permet en outre de mesurer un certain nombre de paramètres tels que la masse moléculaire et le coefficient de diffusion.

La chromatographie d'exclusion stérique, est l'une des techniques les plus couramment utilisées aujourd'hui en raison de sa relative facilité d'utilisation, et a donné lieu à un développement technologique soutenu (notamment après la première introduction commerciale d'insuline recombinante en 1982) ((9)). Toutefois, son principe de fonctionnement recèle un certain nombre de limitations, telles que l'interaction des solutés avec la phase stationnaire et le stress de cisaillement sur les macromolécules ((6)).

Depuis quelques années, une nouvelle famille de méthodes de séparation émerge, regroupées sous le terme de fractionnement par couplage flux-force ((10)). Ces techniques séparatives en phase liquide utilisent l'appareillage de base de la chromatographie liquide (pompes et systèmes de détection), mais s'appuient sur les mécanismes de convection-diffusion des espèces à séparer dans un canal capillaire

de géométrie adaptée, soumis à l'action d'un champ externe perpendiculaire. On y dénote un certain nombre de sous-techniques que l'on peut classer soit en fonction du mode de séparation, soit en fonction du champ externe. Aujourd'hui, pour l'analyse des macromolécules comme les protéines, les techniques de fractionnement par couplage flux-force à champ hydrodynamique sont en plein développement ((11)).

Cet exposé traitera dans un premier temps de la description des différentes techniques en flux hydrodynamiques (symétrique, asymétrique et en fibre creuse). Dans un second chapitre, nous explorerons une partie des problèmes liés à l'élaboration de ces techniques. Puis dans un troisième chapitre, nous envisagerons la mise en œuvre de ces méthodes sur le plan expérimental (anticorps à usage thérapeutique). Puis nous présenterons quelques résultats dans le cadre d'une exploration des propriétés de la technique en fibre creuse à des fins de contrôle de qualité des anticorps. Des essais sur billes de latex seront également présentés.

# **1. Le fractionnement par couplage flux-force à flux hydrodynamique**

Le fractionnement par couplage flux-force est une technique visant à séparer des particules de petite taille (allant de l'échelle du nanomètre jusqu'à l'échelle du micron), par l'application d'un flux laminaire de liquide sur la longueur d'un canal, associé à une force latérale qui peut être de natures diverses : gravitationnelle (par sédimentation ou par centrifugation), thermique, ou hydrodynamique, pour ne citer que les plus répandues.

Dans cette première partie, les différents principes mis en jeu en FFF hydrodynamique seront abordés, en soulignant les spécificités de chaque sous-technique, enfin, la technique de fractionnement en fibre creuse sera décrite, en fonction de ses particularités.

## **1.1. Théories et principes de base**

### **1.1.1. Mode d'élution normal (Brownien)**

#### **1.1.1.1. Description**

Dans ce mode d'élution, les forces de diffusion browniennes sont les plus importantes. On part du principe que plus le coefficient de diffusion d'une particule est élevé, plus celle-ci est de petite taille et sera sujette à son mouvement brownien propre. Le champ appliqué a pour effet de diriger les particules vers la paroi d'accumulation, ce phénomène est appelé l'effet de convection. Cet effet est contré par la diffusion brownienne, comme le montre la figure 1.

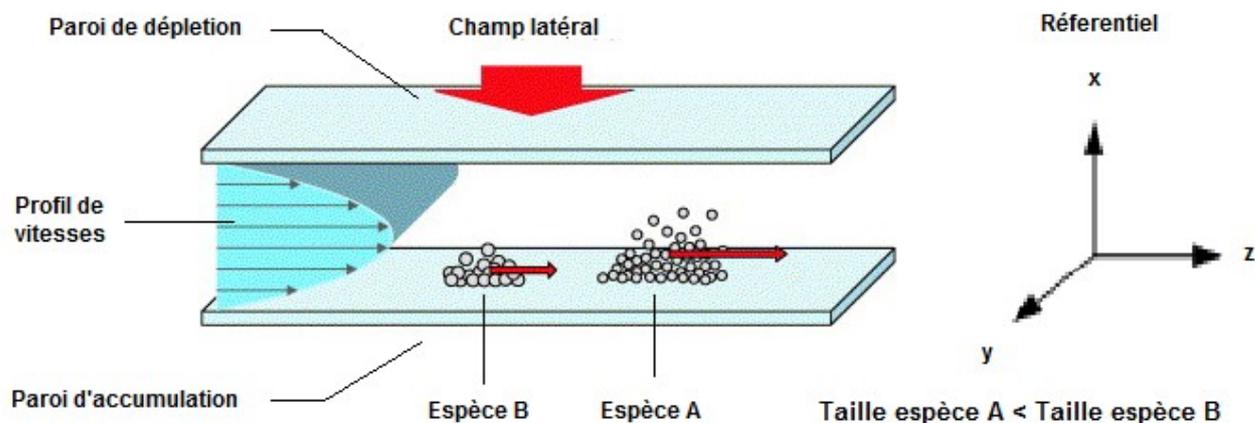


Figure 1: Représentation du mode d'éluion normal dans un canal de FFF

La résultante des 2 effets (convection et diffusion) permet la formation d'un profil de concentration transversal des particules dans l'épaisseur du canal, notée « w ». En l'absence de flux longitudinal, le flux tangentiel ( $J(x)$ ) sur chaque particule présente dans le canal, entraîné par le champ est résumé par l'équation suivante ((12), (13)) :

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

$J(x)$ : Vitesse des particules dans l'épaisseur du canal ( $\text{cm.mol.s}^{-1}.\text{L}^{-1}$ ) (résultante de l'effet du flux tangentiel et de l'effet de la diffusion brownienne)

$x$ : Distance par rapport à la paroi d'accumulation (cm)

$U(x)$ : Vitesse du flux tangentiel appliqué à la distance  $x$  ( $\text{cm.s}^{-1}$ )

$C(x)$ : Concentration des particules à la distance  $x$

$D(x)$ : Coefficient de diffusion Brownien (correspondant à un couple particule-fluide) des particules situées à la distance  $x$  ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Loi de Fick)

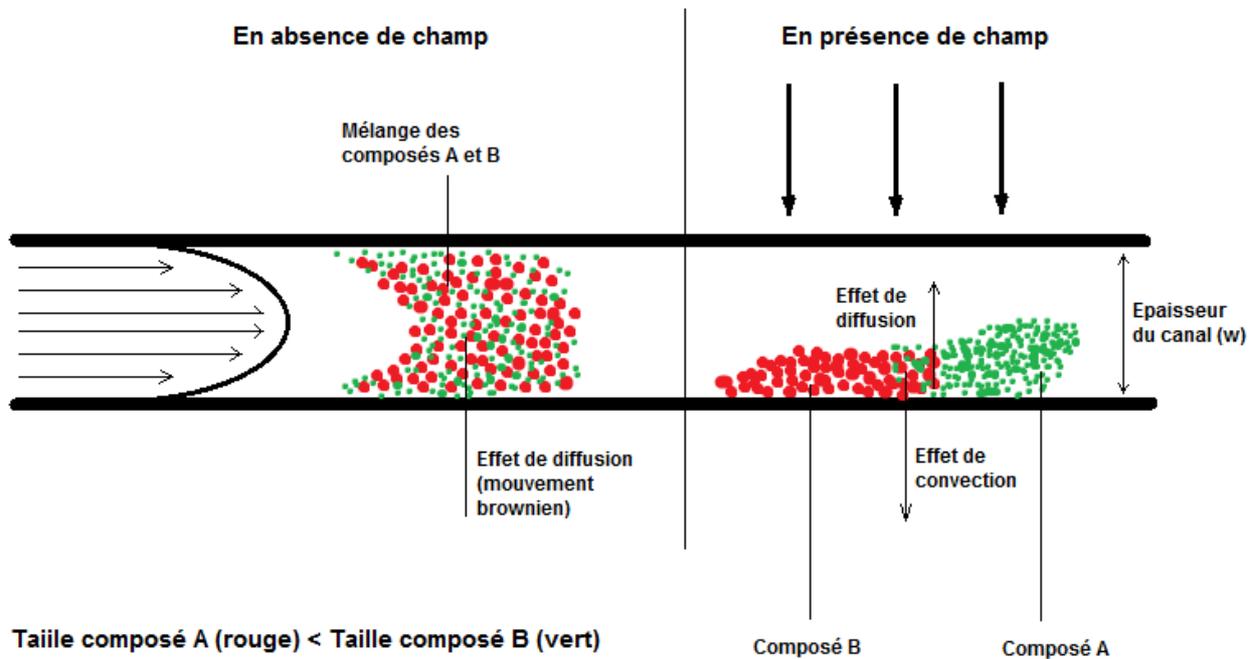


Figure 2: Mélange de 2 types de composés macromoléculaires circulant au sein d'un canal de FFF, sans l'influence du champ latéral et avec l'influence du champ latéral.

Le coefficient de diffusion Brownien d'une particule s'exprime en fonction de ses caractéristiques et de celles du fluide considéré à travers la Formule d'Einstein :

$$D = \left( \frac{R}{6 \times \pi \times N_A} \right) \times \left( \frac{T}{\eta \times r_H} \right) = \left( \frac{k}{6 \times \pi} \right) \times \left( \frac{T}{\eta \times r_H} \right) \quad (2)$$

$$D = \frac{kT}{6 \pi \eta r_H} = \frac{kT}{3 \pi \eta d_H} = \frac{kT}{f} \quad (3)$$

D: Coefficient de diffusion Brownien ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

R: Constante des gaz parfaits ( $8,3144621 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )

$\pi$ : Constante Pi (3,1415.....)

$N_A$ : Constante d'Avogadro ( $6,0221412927 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )

T: Température (en degrés Kelvin)

$\eta$ : Viscosité du fluide (en Pa.s)

$r_H$ : Rayon hydrodynamique de la particule (en m)

$d_H$ : Diamètre hydrodynamique de la particule (en m)

k: Constante de Boltzmann ( $1,3806488 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ )

f : Coefficient de friction (ici, pour une particule supposée sphérique)

La force appliquée par le champ est donnée par la loi de Stokes ((14)) :

$$|F| = 3\pi\eta d_H |U| = f \cdot |U| \quad \Leftrightarrow \quad |U| = \frac{|F|}{f} = \frac{|F| \cdot D}{k \cdot T} \quad (4)$$

A l'équilibre, la résultante  $J(x)$  est nulle et l'équation (1) se simplifie. On obtiendra ainsi ((13)):

$$U(x) \times C(x) = D(x) \times \left( \frac{dC(x)}{dx} \right) \quad (5)$$

En transformant l'équation (4), on peut exprimer  $C(x)/C_0$  par :

$$\left(\frac{C(x)}{C_0}\right) = e^{\left(\frac{x \times U}{D}\right)} \Leftrightarrow C(x) = C_0 \cdot e^{\left(\frac{x \times U}{D}\right)} \quad (6)$$

$C_0$ : Concentration des particules sur la paroi d'accumulation

Au vu des sens des vecteurs de vitesses correspondant respectivement à  $x$  (mouvement Brownien) et à  $U$  (champ latéral appliqué),  $x$  correspond à une grandeur positive et  $U$  correspond à une grandeur négative (il est alors noté en valeur absolue). On peut donc réécrire l'équation de cette façon:

$$C(x) = C_0 \cdot e^{-x|U|/D} \quad (7)$$

A partir de là, on peut dégager 2 paramètres capitaux en FFF.

Le premier paramètre est le paramètre de rétention  $\lambda$ , correspondant à:

$$\lambda = \frac{D}{|U| \cdot w} = \frac{kT}{|F| \cdot w} \quad (8)$$

Il s'agit d'un paramètre essentiel, car il permet d'établir la relation entre le profil de concentrations à l'intérieur du canal et le paramètre discriminant  $X$  de l'analyte concerné à travers l'expression de  $|F|$  ((13)) correspondant à la technique employée (dans le cas de la FFF hydrodynamique, il s'agit du diamètre hydrodynamique «  $d_H$  » ((13)). De plus, il a une signification physique : il définit la distance entre la paroi d'accumulation et le centre de gravité du nuage de particules de l'analyte concerné par rapport à l'épaisseur du canal ((15)).

En transformant l'équation (7), on obtient ainsi l'équation suivante :

$$C(x) = C_0 \cdot e^{-x/\lambda \cdot w} \quad (9)$$

En poursuivant la transformation de l'équation obtenue, on obtient :

$$\begin{aligned}
 C(x) = C_0 \cdot e^{-x/\lambda \cdot w} &\Leftrightarrow \ln\left(\frac{C(x)}{C_0}\right) = \frac{-x}{\lambda \cdot w} \Leftrightarrow \frac{x}{w} = -\lambda \cdot \ln\left(\frac{C(x)}{C_0}\right) \\
 &\Rightarrow s = -\lambda \cdot \ln\left(\frac{C(x)}{C_0}\right)
 \end{aligned} \quad (10)$$

Le paramètre  $x/w$  correspondant alors à une coordonnée réduite notée « s ». Cette relation est matérialisée par la courbe suivante :

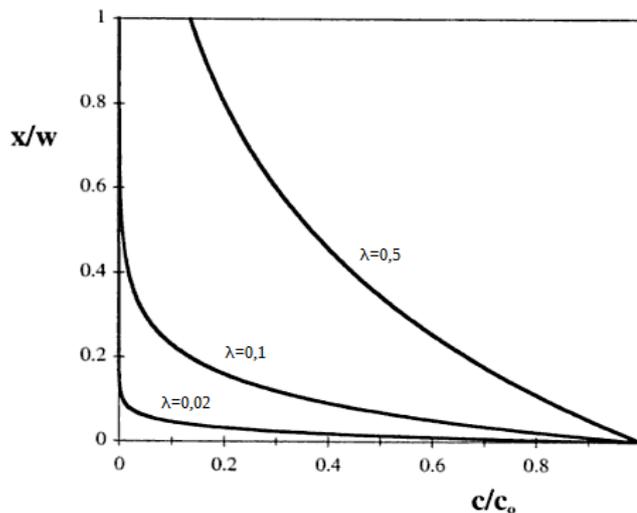


Figure 3: Expression de l'équation (10) pour différentes valeurs de  $\lambda$  ((13))

Le second paramètre, que l'on appellera " $\ell$ ", correspond à une valeur de longueur appelée la constante d'espace de la distribution exponentielle transverse des concentrations d'un analyte donné ((13)). Une démonstration plus complète de

cette formule a été théorisée par Krantz ((16)). Il est aussi possible d'exprimer  $\ell$  en fonction de la force appliquée  $F$  ((10)) :

$$\ell = \frac{D}{|U|} = \frac{kT}{|F|} \quad (11)$$

On peut ainsi transformer les équations (8) et (9) :

$$\lambda = \frac{D}{|U| \cdot w} = \frac{kT}{|F| \cdot w} = \frac{\ell}{w} \quad (12)$$

$$C(x) = C_0 \cdot e^{-x/\lambda \cdot w} = C_0 \cdot e^{-x/\ell} \quad (13)$$

Bien que l'analyte soit (pour des raisons évidentes) obligatoirement compris dans l'épaisseur  $w$  du canal, il peut arriver que  $\ell$  soit supérieur à  $w$ , et par conséquent, que  $\lambda$  soit supérieur à 1. Dans ce cas, le champ n'a plus d'influence sur l'analyte et celui-ci est alors dispersé uniformément dans la lumière du canal ((13)).

Dans la littérature,  $\ell$  est abusivement assimilée à l'épaisseur moyenne du nuage de particules pour un soluté donné, ce qui n'est pas tout à fait vrai. La véritable notation de l'épaisseur moyenne du nuage de particules pour un soluté donné est «  $x_{cg}$  » (ou «  $\ell_e$  », selon les publications ((15))). Cette valeur est obtenue par la résolution de l'intégrale suivante ((15)) :

$$x_{cg} = \frac{\int_0^w x \cdot C(x) dx}{\int_0^w C(x) dx} \quad (14)$$

La position «  $x_{cg}$  » correspond ainsi à la position du centre de gravité du nuage de particules du soluté concerné (d'où l'indice « cg », signifiant « center of gravity »), ce qui signifie que la moitié de la concentration en particules de soluté concerné se situe sous ce point, et que l'autre moitié se situe au-dessus. Ainsi, cette valeur correspond au premier moment (ou mode) du nuage de particules de soluté donné.

La valeur de coordonnée réduite «  $s_{cg}$  » (notée aussi «  $\lambda_e$  », selon les publications ((15))) correspondante est ((13), (15)) :

$$s_{cg} = \frac{x_{cg}}{w} = \lambda - \frac{e^{-1/\lambda}}{1 - e^{-1/\lambda}} \quad (15)$$

Les valeurs limites de  $s_{cg}$  pour des valeurs extrêmes de  $\lambda$  correspondent ainsi à :

$$\begin{aligned} \lim_{\lambda \rightarrow 0} s_{cg} = \lambda &\Rightarrow x_{cg} = \ell \\ \lim_{\lambda \rightarrow \infty} s_{cg} = \frac{1}{2} &\Rightarrow x_{cg} = \frac{w}{2} \end{aligned} \quad (16)$$

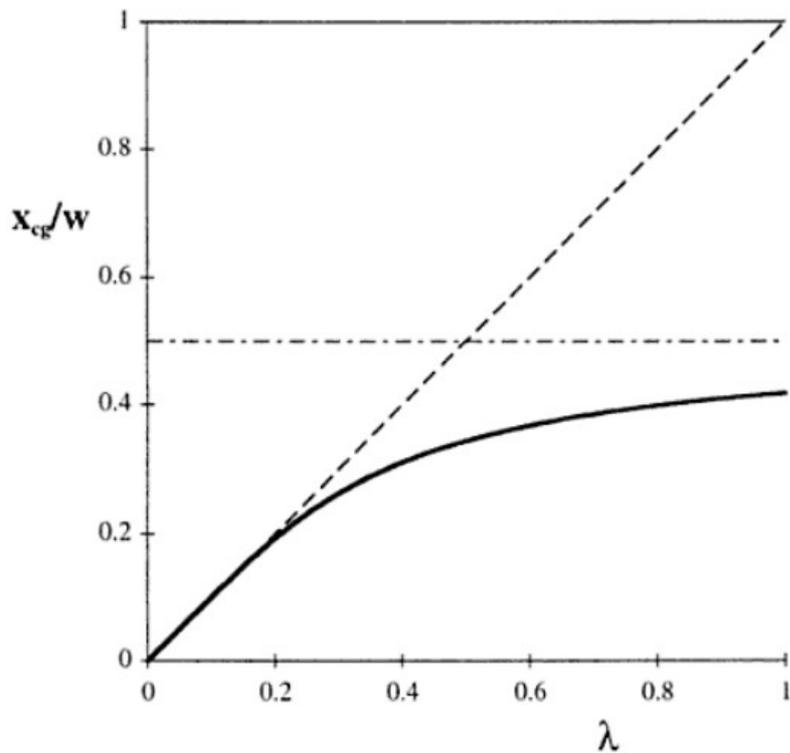


Figure 4: Expression de l'équation (15) pour différentes valeurs de  $\lambda$  ((13))

En clair, plus  $\lambda$  sera proche de 0 (la valeur maximale admise de  $\lambda$  étant égale à 0,2 (correspondant à 3,4 % d'erreur sur  $s_{cg}$  (figure 4)), plus le nuage de particules de soluté sera comprimé contre la paroi d'accumulation (et sera par conséquent retenu par le champ latéral), et plus  $\ell$  sera proche de  $x_{cg}$  (vérifiant ainsi l'approximation du premier moment employée couramment dans la littérature).

### 1.1.1.2. Théorie de la rétention en mode Brownien

De façon analogue à la chromatographie, la rétention des analytes est définie par leur facteur de rétention ("retention ratio" en anglais), défini par les expressions suivantes:

$$R = \frac{V}{\langle v_z \rangle} = \frac{t_0}{t_r} = \frac{V_0}{V_r} \quad (17)$$

$V$ : Vitesse moyenne de migration de l'espèce dans le canal de séparation (distance/temps)

$\langle v_z \rangle$ : Vitesse longitudinale moyenne du liquide vecteur dans le canal de séparation (distance/temps)

$t_0$ : Temps d'élution moyen de particules théoriques n'interagissant pas avec le champ tangentiel et se déplaçant par conséquent à la même vitesse que la vitesse moyenne du liquide vecteur (par analogie avec la chromatographie liquide, cela correspondrait au temps de rétention du pic de volume mort)

$t_r$ : Temps d'élution moyen d'une suspension de particules d'un analyte

$V_0$ : Volume d'élution moyen de particules théoriques n'interagissant pas avec le champ tangentiel et se déplaçant par conséquent à la même vitesse que la vitesse moyenne du liquide vecteur (par analogie avec la chromatographie liquide, cela correspondrait au pic de volume mort)

$V_r$ : Volume d'élution moyen d'une suspension de particules d'un analyte

D'après Giddings et al. ((17)), la résolution des équations de Stokes correspondant à un écoulement laminaire dans un canal de FFF de section rectangulaire est la suivante:

$$v(x) = 6 \langle v_z \rangle \left[ \left( \frac{x}{w} \right) - \left( \frac{x}{w} \right)^2 \right] \quad (18)$$

$v(x)$ : Vitesse du flux longitudinal en un coordonnée "x" de la section du canal

$\langle v_z \rangle$ : Vitesse longitudinale moyenne du liquide vecteur dans le canal de séparation

$w$ : Epaisseur du canal

En supposant l'homogénéité de la distribution de vitesse et l'état d'équilibre de la distribution des différents analytes à l'intérieur du canal, et en imaginant la section d'un canal de séparation de FFF et en prenant chaque élément correspondant à un même analyte, on obtiendrait l'équation suivante:

$$V = \frac{\sum (c_i \cdot v_i)}{\sum c_i} \quad (19)$$

V: Vitesse moyenne de l'analyte à travers la section de canal

$c_i$ : Concentration des éléments de l'analyte dans une zone virtuelle (notée "i") de la section du canal

$v_i$ : Vitesse longitudinale du liquide porteur dans une zone virtuelle (notée "i") de la section du canal

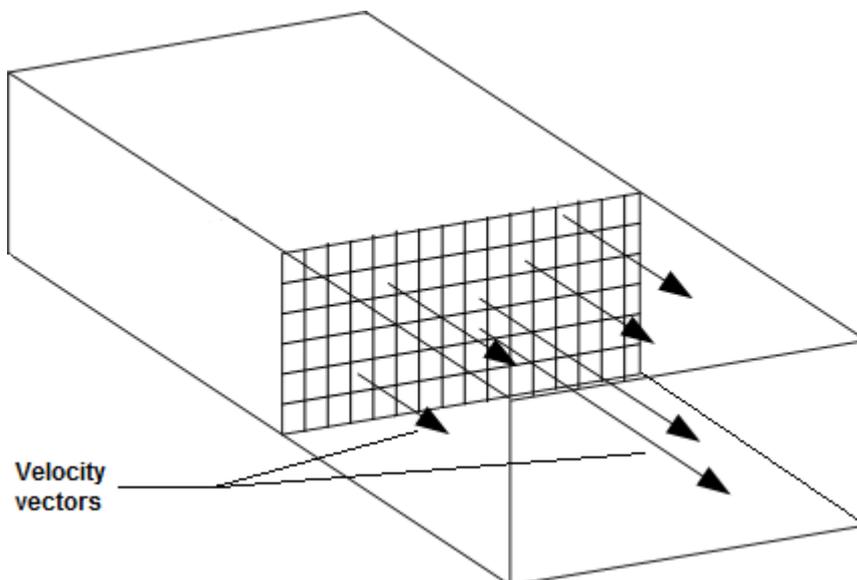


Figure 5: Exemple de représentation des zones virtuelles et des vecteurs de vitesse associés, sur la surface de la lumière d'un canal rectangulaire.

En intégrant cette équation, on obtient:

$$V = \frac{\int c v dA}{\int c dA} \quad (20)$$

A: Aire de la section du canal rectangulaire ( $A = b.w$ ; où  $b$  est la largeur du canal, et  $w$  est l'épaisseur du canal)

En tenant compte de la répartition (suivant une loi exponentielle) à l'équilibre des particules dans l'épaisseur du canal, on obtient:

$$V = \frac{6 \langle v \rangle \int_0^w \exp\left(\frac{-x}{\ell}\right) \left(\frac{x}{w} - \frac{x^2}{w^2}\right) dx}{\int_0^w \exp\left(\frac{-x}{\ell}\right) dx} \quad (21)$$

En appliquant cette équation au ratio de rétention  $R = V/\langle v \rangle$ , on obtient:

$$R = \frac{\left(\frac{6}{w} \int_0^w \exp\left(\frac{-x}{\ell}\right) x dx\right) - \left(\frac{6}{w^2} \int_0^w \exp\left(\frac{-x}{\ell}\right) x^2 dx\right)}{\left(\int_0^w \exp\left(\frac{-x}{\ell}\right) dx\right)} \quad (22)$$

En intégrant chacun des termes et en tenant compte du fait que  $\lambda = \ell/w$ , on obtient la formule:

$$R = 6\lambda \left( \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right) \quad (23)$$

Cette équation est l'équation fondamentale caractérisant la rétention du mode d'éluion Brownien. On remarque que quand  $\lambda$  tend vers 0 (et donc que la demi-épaisseur  $\ell$  du nuage de particules de l'analyte concerné tend vers 0, et que par conséquent, le coefficient de diffusion  $D$  reste suffisamment élevé afin de pouvoir former un nuage de particules, sans l'être exagérément au point de ne plus être influencé par le champ tangentiel), on observe que le paramètre  $\left( \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right)$  tend vers 1, et que le ratio de rétention est exprimé par une relation linéaire avec  $\lambda$ :

$$R = 6\lambda = \frac{6\ell}{w} = \frac{6kT}{|F|} \quad (24)$$

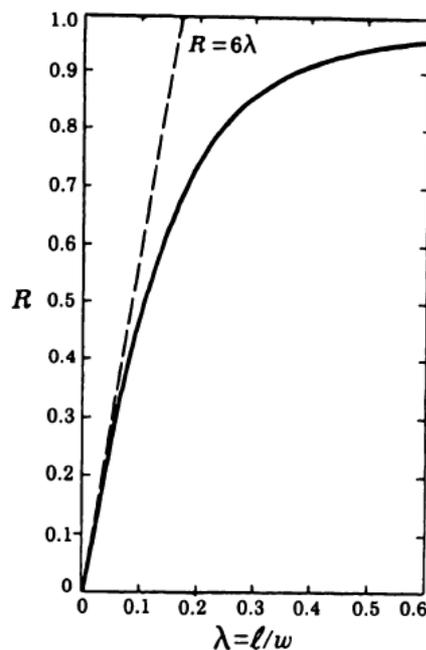


Figure 6: Variation du ratio de rétention en fonction de la valeur  $\lambda$ , selon l'équation (23) (trait plein), et selon l'équation linéaire approchée (24) (hachures) ((17))

Dans la plupart des cas, on considère que  $R=6\lambda$ .

On peut dégager à partir de  $R$  un autre paramètre important, qui est le niveau de rétention,  $R_L$  ((18)) (également appelé coefficient de rétention «  $k_R$  » ((13))). Ce paramètre a l'avantage d'être plus intuitif et simple d'utilisation que  $R$ .

$$R_L = \frac{t_r}{t_0} \quad (25)$$

### 1.1.1.3. Relation entre coefficient de diffusion et masse moléculaire

Avant toute chose, il convient de revenir à l'équation (3), qui correspond à l'équation d'Einstein-Smoluchowski :

$$D = \frac{kT}{f} \quad (26)$$

Il a été démontré que le paramètre  $f$  (il s'agit pour rappel du coefficient de friction d'une particule dans un milieu donné, il est également noté «  $\xi$  » selon les sources ((19))) dépend de la forme de la particule ((19))

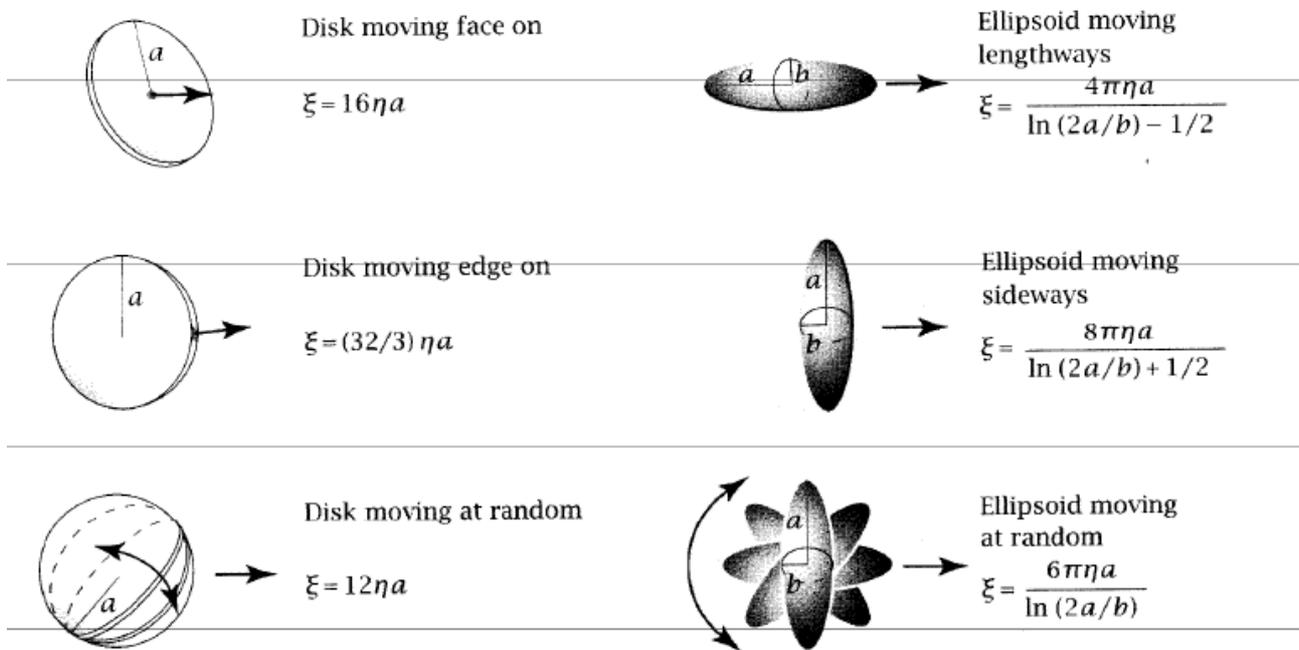


Figure 7: Formules des coefficients de friction corrigés en fonction de la forme ((19))

Obtenir de telles approximations (y compris l'équation de Stokes pour les particules sphériques) nécessite toutefois la résolution d'équations complexes ((20)).

Pour simplifier la situation, il est admis que le coefficient de diffusion d'une particule est relié à la masse moléculaire de cette particule selon une loi de puissance ((19), (21), (22)) :

$$D = A \cdot (M_w)^B \quad (27)$$

Les paramètres A et B sont reliés notamment aux conditions expérimentales et à la forme de la particule. En pratique, des techniques de calcul informatique sont nécessaires pour les obtenir.

L'adjonction d'un champ latéral compliquera la donne, comme il sera vu plus loin.

#### **1.1.1.4. Effet de la forme de la particule sur les résultats obtenus**

Plusieurs publications montrent aujourd'hui l'impact de la forme des particules sur les résultats obtenus en FFF ((23), (24), (25), (18)). C'est pour cette raison que le diamètre des particules, calculé par les formules courantes utilisées en FFF ou mesuré par les systèmes de détection approprié (système à dispersion de lumière tel que MALS ou DLS) est un diamètre dit « hydrodynamique » : il s'agit du diamètre qu'une particule aurait dans le milieu concerné si celle-ci était sphérique ((23)). Ainsi, il a été démontré que l'élution de particules en forme de bâtonnets (nano-rods) ou en forme de disque nécessitait l'application de facteurs correctifs ((13)). Notamment, lorsque la longueur du bâtonnet ou le diamètre du disque (assimilables à une dimension caractéristique de la particule) atteignait une longueur proche du micromètre, l'effet du champ finissait par compromettre la rotation libre des particules (effet stérique spécifique), qui du même coup, s'alignaient parallèlement au champ ((25), (13)). Ce cas de figure n'est toutefois qu'un exemple relativement simple.

Le cas des particules non-sphériques implique de prendre en compte, selon Gadjos et Brenner ((24), (26)), l'aire totale de la surface de la sphère occupée par la rotation de la particule si elle n'avait pas de restriction (notée  $A_s$ ), et l'aire de la fraction de la surface de cette sphère réellement couverte par la rotation de la particule (notée  $A(x)$ ), selon le ratio d'angle solide suivant (noté  $\alpha(x)$ ) :

$$\frac{A(x)}{A_s} = \alpha(x) \quad (28)$$

La prise en compte de ce ratio dans les calculs de concentrations se fera de la façon suivante ((26)) :

$$C(x) = C_0 \cdot e^{-x/\ell} \cdot \frac{A(x)}{A_s} = C_0 \cdot e^{-x/\ell} \cdot \alpha(x) \quad (29)$$

où le rapport  $\alpha(x)$  sera déterminé par la géométrie de la particule.

L'effet aura un impact sur le ratio de rétention de la façon suivante ((26)) :

$$R = \left[ w \cdot \int_0^a C_0 \cdot e^{-x/\ell} \cdot \frac{A(x)}{A_s} \cdot v(x) dx + w \cdot \int_a^w C_0 \cdot e^{-x/\ell} \cdot v(x) dx \right] \times \left[ \int_0^a C_0 \cdot e^{-x/\ell} \cdot \frac{A(x)}{A_s} dx + \int_a^w C_0 \cdot e^{-x/\ell} dx \right] \times \int_0^w v(x) dx \quad (30)$$

Après intégration, l'expression obtenue donnera R en fonction de a et  $\ell$  et reflétera l'altération de R en fonction de la géométrie de la particule.

Ainsi, pour une particule en forme de bâtonnet, on obtiendra les expressions suivantes :

$$\frac{A(x)}{A_s} = \frac{4 \pi \cdot \sin(\theta)}{4 \pi} = \frac{x}{a} \quad (31)$$

a : Demi-longueur du bâtonnet

$\theta$  : Angle formé par le bâtonnet avec la paroi d'accumulation

$$C(x) = C_0 \cdot e^{-x/\ell} \cdot \frac{x}{a} \quad (32)$$

C(x): Concentration des particules à la distance x

$C_0$  : Concentration des particules à la paroi d'accumulation

$a$  : Demi-longueur du bâtonnet

$\ell$  : Approximation de la valeur de l'épaisseur du nuage de particules

$$R = \frac{6\ell}{w} \cdot \left[ 2 - \frac{a/\ell}{(e^{x/\ell} - 1)} \right] \quad (33)$$

$R$  : Ratio de rétention

$w$  : Epaisseur du canal de séparation

$a$  : Demi-longueur du bâtonnet

$\ell$  : Approximation de la valeur de l'épaisseur du nuage de particules

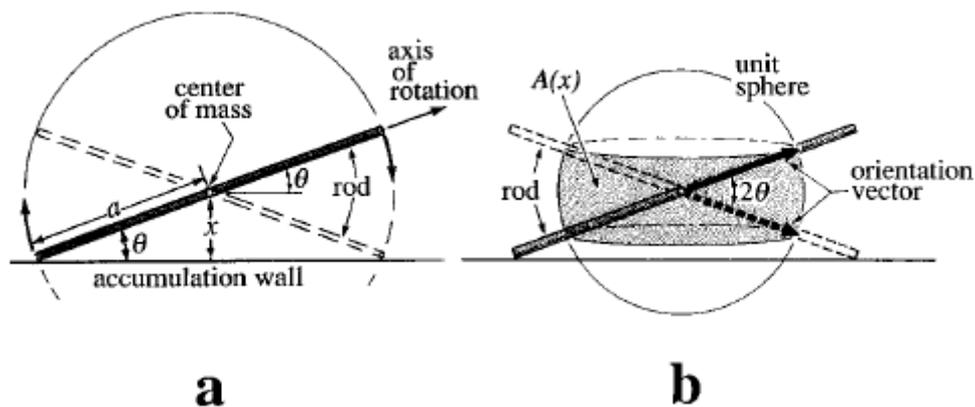


Figure 8: Aperçu du comportement d'une particule en forme de bâtonnet (nano-rod) en FFF ((25))

De même, pour une particule en forme de disque, on obtiendra les expressions suivantes :

$$\frac{A(x)}{A_s} = \frac{4\pi \cdot (1 - \cos(\theta))}{4\pi} = \left[ 1 - \sqrt{1 - \left(\frac{x}{a}\right)^2} \right] \quad (34)$$

a : Rayon du disque

$\theta$  : Angle formé par le disque avec la paroi d'accumulation

$$C(x) = C_0 \cdot e^{-x/l} \cdot \left[ 1 - \sqrt{1 - \left(\frac{x}{a}\right)^2} \right] \quad (35)$$

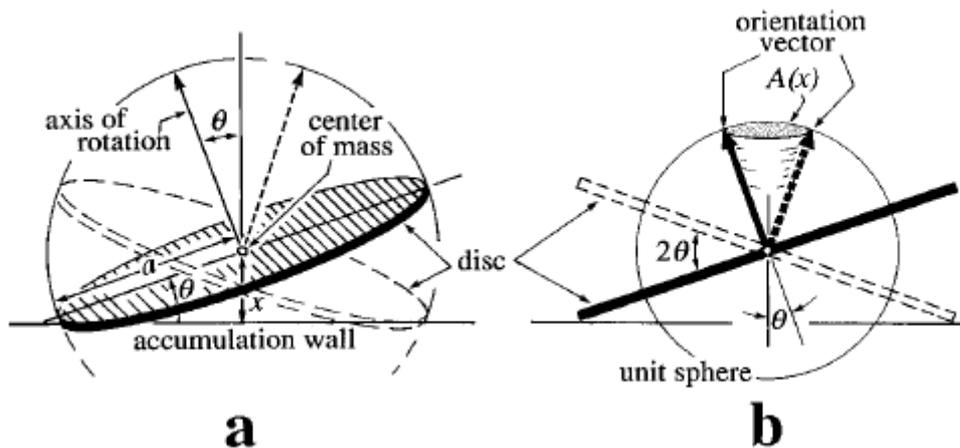


Figure 9: Aperçu du comportement d'une particule en forme de disque en FFF ((25))

Cet effet, en perturbant de fait les temps de rétention, implique que la FFF hydrodynamique (et plus généralement les techniques de FFF) ont la possibilité de discriminer les particules selon leur forme. Cela pose toutefois plusieurs questions, notamment sur les qualités intrinsèques des particules susceptibles de servir à l'étalonnage de l'appareillage, et sur les moyens de détection à utiliser pour confirmer cette discrimination de forme ((6)).

### 1.1.1.5. Résolution et sélectivité

La sélectivité sur le diamètre entre 2 particules est donnée par l'équation suivante ((27), (28)) :

$$S_d = \frac{d \ln(t_r)}{d \ln(d_H)} \quad (36)$$

La résolution entre 2 pics est définie en FFF par l'équation suivante ((29), (27), (30)) :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times S_d \times \frac{\delta d_H}{\bar{d}_H} \quad (37)$$

$N$  : Nombre de plateaux moyen entre les 2 pics

$S_d$  : Sélectivité entre les 2 pics (basée sur le diamètre)

$\delta d_H$  : Différence de diamètre hydrodynamique entre les particules associées aux 2 pics

$\bar{d}_H$  : Moyenne des diamètres hydrodynamiques des particules associées aux 2 pics

Une autre équation existe ((31)) :

$$R_s = \frac{1}{4} \times \frac{\Delta R}{\bar{R}} \times \left( \frac{L}{\bar{H}} \right)^{(1/2)} = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\Delta R}{\bar{R}} \quad (38)$$

$\Delta R$  : Différence entre les ratios de rétention des composés correspondant à chacun des 2 pics

$\bar{R}$  : Moyenne des ratios de rétention des composés correspondant à chacun des 2 pics

L : Longueur du canal de séparation

$\bar{H}$  : Moyenne des hauteurs équivalentes à un plateau théorique de chacun des 2 pics

N : Nombre de plateaux moyen entre les 2 pics

Le pouvoir de séparation, en FFF, est déterminé à partir du pouvoir de fractionnement (noté  $F_d$ ), qui correspond à l'équation suivante ((27), (32)) :

$$F_d = \frac{R_s}{\delta d_H / \bar{d}_H} \quad (39)$$

$R_s$  : Résolution entre 2 pics

$\delta d_H$  : Différence de diamètre hydrodynamique entre les particules associées aux 2 pics

$\bar{d}_H$  : Moyenne des diamètres hydrodynamiques des particules associées aux 2 pics

$F_d$  correspond à la résolution spécifique entre 2 particules dont le diamètre hydrodynamique varie selon la grandeur relative  $\delta d_H / \bar{d}_H$  ((15)). Par conséquent, il tendra vers 0 à l'approche du point d'inversion stérique ((15)).

#### **1.1.1.6. Théorie des plateaux, de l'élargissement des pics, de la dispersion des particules et du non-équilibre**

En fractionnement par couplage flux-force, lors de l'impact consécutif du champ latéral avec le profil parabolique de l'écoulement longitudinal, les particules sont continuellement partitionnées entre les divers états de vitesses longitudinales. Les changements de concentrations localisées qui en résultent au temps « t »

bouleversent continuellement l'état d'équilibre obtenu au temps « t-1 » ((17)). Cet effet est appelé « non-équilibre ». Ce phénomène de transfert entre bandes de vitesses différentes est la base de l'élargissement des bandes ((15)).

La dispersion des pics obtenus en sortie de colonne est définie par le nombre de plateaux théoriques du canal de séparation (et son évolution).

Dans toutes les techniques chromatographiques, le nombre de plateaux théoriques (N) correspond à l'équation suivante :

$$N = \frac{L}{H} \quad (40)$$

La définition de la hauteur équivalente à un plateau théorique (H), valable dans toutes les techniques chromatographiques (techniques de FFF comprises) correspond à l'équation suivante :

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (41)$$

$\sigma^2$  : Variance du pic

L : Longueur du canal de séparation

En FFF, elle correspond à l'équation suivante ((33), (34)) :

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{2D}{R\langle\bar{v}\rangle} + \frac{\psi(\lambda) \cdot \ell^2 R \langle\bar{v}\rangle}{D} + \sum H_i = H_c + H_{end} + H_r \quad (42)$$

Le premier terme de l'équation ( $H_c$ ) correspond à la diffusion longitudinale d'un analyte.

D : Coefficient de diffusion hydrodynamique

R : Ratio de rétention

$\langle \bar{v} \rangle$  : Vitesse longitudinale moyenne du liquide porteur

Le second terme de l'équation ( $H_{\text{end}}$ ) correspond aux plateaux théoriques issus du processus de non-équilibre. Il peut être réécrit sous 2 formes ((35)) :

$$H = \frac{\psi \cdot \ell^2 \cdot V}{D} = \frac{\chi \cdot w^2 \cdot \langle \bar{v} \rangle}{D} \quad (43)$$

$\chi$  et  $\psi$  sont des coefficients dont la démonstration mathématique a été effectuée par Giddings et al. ((35)), et sont en général utilisés sous des formes approchées,  $\chi_a$  et  $\psi_a$  :

$$\chi_a = 24 \lambda^3 \left( \frac{1 - 10\lambda + 28\lambda^2}{1 - 2\lambda} \right) \simeq 24 \lambda^3 \quad \text{pour } \lambda \ll 1 \quad (44)$$

$$\psi_a = \frac{4(1 - 10\lambda + 28\lambda^2)}{(1 - 2\lambda)^2} \simeq 4 \quad \text{pour } \lambda \ll 1 \quad (45)$$

Le troisième terme ( $\Sigma H_i$ , ou  $H_r$ ) correspond aux plateaux théoriques générés par des effets parasites résiduels. En général, ils sont considérés comme négligeables ((33)).

Ainsi, en réécrivant l'équation de la hauteur d'un plateau théorique à partir de l'équation (17), on obtient ((33), (36), (37)) :

$$H = \frac{2D}{V} + \frac{4 \cdot \ell^2 V}{D} = \frac{B}{V} + CV \quad (46)$$

B : Paramètre de diffusion longitudinale

C : Coefficient de non-équilibre

Ainsi, plus la rétention d'un composé est élevée (R bas,  $\lambda$  bas,  $\ell$  basse, V basse), plus la contribution de l'effet de non-équilibre sera basse, jusqu'à atteindre une valeur nulle. De fait, la hauteur équivalente à un plateau théorique diminuera vers une valeur finie ne dépendant plus que de la diffusion longitudinale (dépendante de D et de V).

Dans les techniques de FFF, en raison du profil parabolique des vitesses du liquide dans le canal, les solutés les plus retenus sont associés à un élargissement de leurs pics de rétention. Cet effet d'élargissement de bandes est proportionnel à l'effet de non-équilibre ((35)). En outre, cela se traduit par un effet de dilution (plus de volume de liquide nécessaire pour éluer les solutés les plus retenus). De façon idéale, un soluté élué sortira sous la forme d'une gaussienne d'écart-type «  $\sigma$  ». La concentration «  $\bar{c}$  » d'une masse « m » de soluté présente à l'intérieur d'un pic correspond à ((31), (36)) :

$$\bar{c} = \frac{m}{4 \sigma \dot{V}_{out}} \quad (47)$$

$\dot{V}_{out}$  : Débit de sortie longitudinal du canal de séparation

En transformant l'équation, on obtient ((31), (36)) :

$$\bar{c} = \frac{m}{4V_r} \times \left( \frac{L}{H} \right)^{(1/2)} = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{m}{V_r} \quad (48)$$

Il a été noté plus haut que plus l'élution avance, plus la hauteur équivalente à un plateau théorique évoluera vers une valeur fixe (N n'augmentera plus), et, d'autre part, plus le volume de rétention augmentera ((38)). Ces deux effets entraînent une dilution progressive des solutés les plus retenus.

A partir de là, il a été envisagé des tentatives pour optimiser la séparation des analytes.

#### **1.1.1.7. Processus de relaxation – Notion de relaxation primaire**

En pratique, une élution en conditions de simple circulation du liquide à travers le canal de séparation donnera de mauvais résultats, tout d'abord pour une raison assez simple attendant au volume mort du canal de séparation ((39)). Ce volume se situe en général dans une fourchette de 200 à 1000 µL. L'injection d'un échantillon en FFF, comme dans toutes les techniques de chromatographie liquide, met en jeu le remplissage d'une boucle d'un volume déterminé fixée sur une valve de type Rhéodyne (qui se trouve alors en position dite de remplissage), dont la rotation en position d'injection permettra l'injection du contenu de la boucle à l'intérieur de la colonne chromatographique, ou, dans le cas présent, du canal de séparation. Ces boucles ont en général un volume compris entre 10 µL et 100 µL. Dans les cas extrêmes, une injection de 100 µL (le volume en lui-même ne suffit pas, la quantité de soluté est à prendre en compte) suffit à occuper une portion considérable de ce canal (sans compter les volumes morts liés aux capillaires de connexion, qui devront être les plus réduits possibles), ce qui, dans les pires scénarios, peut conduire à une occupation complète du canal depuis son point d'entrée jusqu'à son point de sortie. Dans tous les cas, si une élution était effectuée aussitôt après l'injection, une

proportion non négligeable de l'échantillon se trouverait à l'entrée du canal et à la sortie du canal. Une séparation dans ces conditions conduirait de fait inévitablement à une séparation insuffisante et à un élargissement très important des pics obtenus au détecteur.

Une théorie issue de la chromatographie illustre bien ce phénomène, selon laquelle le temps nécessaire à la génération d'un plateau théorique ( $t_p$ ) est théorisé par le modèle suivant ((40), (33)) :

$$t_p = \frac{4\ell^2}{D} \quad (49)$$

Si un nombre particulier de plateaux est à atteindre, il faudra ajuster ce temps en fonction :

$$t = N \cdot t_p = \frac{4N\ell^2}{D} \quad (50)$$

Ce temps est supérieur à la durée d'un run de FFF, d'où l'intérêt d'immobiliser ou neutraliser le flux longitudinal, en ne conservant que le champ latéral, afin d'agir sur l'épaisseur  $\ell$  du nuage de particules et d'accélérer la vitesse de génération du nombre de plateaux théoriques. Ce temps d'immobilisation du champ longitudinal est appelé temps de relaxation ( $t_{rel}$ ) (Note : Ce temps est souvent noté «  $\tau$  » dans la littérature mais peut alors être abusivement confondu avec le temps de décroissance du champ en programmation de flux, noté de la même manière).

Ainsi, dans des conditions de simple circulation du liquide sur la longueur du canal de séparation, il est en réalité quasi impossible d'obtenir des nuages de particules distincts ((41)). De fait, le nombre de plateaux obtenu lors de la circulation

des analytes à l'intérieur du canal de séparation sera très limité. En réalité, l'état d'équilibre n'est obtenu qu'après un certain temps ((40), (42), (43)), dans lequel les épaisseurs «  $\ell$  » des nuages de particules des divers analytes devront atteindre leur hauteur minimale, afin de générer des plateaux théoriques supplémentaires ((40), (33)).

Le temps de relaxation, noté «  $t_{rel}$  », correspond au temps moyen de trajet, sous l'influence du champ latéral, des particules jusqu'au centre de gravité de quasi-équilibre, noté «  $x_{eq}$  ». La théorie détaillant l'obtention de ce temps a été élaborée par Hovingh et al. ((43)). Il est obtenu par l'équation suivante ((15), (43), (40), (29), (44)) :

$$t_{rel} = \frac{w^2 \lambda}{D} \left( \frac{1}{2} - \lambda + \frac{1}{e^{1/\lambda} - 1} \right) \approx \frac{w^2 \cdot \lambda}{D} = \frac{w}{U} = \frac{\ell \cdot w}{D} \quad (51)$$

Après un temps de relaxation déterminé, le nuage de particules atteint une certaine longueur à l'intérieur du canal, notée  $h_0$  ((29)).

$$h_0 = \langle v_z \rangle t_{rel} \quad (52)$$

$\langle v_z \rangle$  correspond à la vitesse longitudinale moyenne du liquide porteur en un point  $z$  déterminé de la longueur du canal. Dans le cas le plus simple (canal de FFF symétrique rectangulaire), elle est constante sur toute la longueur du canal ((36)) et correspond à :

$$\langle v_z \rangle = \frac{\dot{V}_{out}}{b \times w} = \langle \bar{v} \rangle \quad (53)$$

$V_{out}$  : Débit de sortie longitudinal du canal de séparation

$b$  : Largeur du canal

w : Epaisseur du canal

$\langle \bar{v} \rangle$  : Vitesse moyenne du liquide porteur (mesurée en sortie de canal)

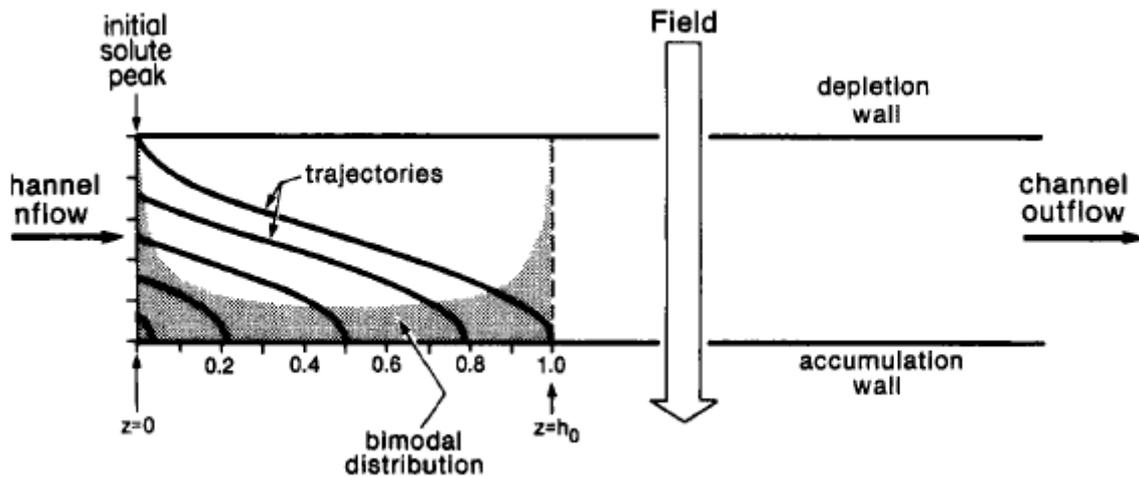


Figure 10: Vue de côté d'un canal de FFF, avec les profils de trajectoire des particules lors de la relaxation. La zone grisée représente la distribution du nuage de particules après relaxation ((29)).

La contribution de la relaxation à la modification de la hauteur des plateaux théoriques est théorisée par l'équation suivante ((43)) :

$$H_{rel} = \frac{17}{140} \times \frac{n \cdot h_0^2}{L} \quad (54)$$

n : Valeur correspondant au nombre de processus de relaxation. Est égal à 1 dans les techniques de FFF en flux hydrodynamique.

Après la relaxation, le nuage de particules partira du point « z » de la longueur du canal où la relaxation s'est effectuée. Ce point à tout intérêt à être le plus proche possible de l'entrée du canal de séparation. L'écart entre le point « 0 » et le point « z » du canal de séparation devra être pris en compte lors des mesures du temps

de volume mort (qui deviendra alors «  $t_z$  ») et le temps de rétention en fin de manipulation.

En pratique, selon la technique employée, il existe plusieurs moyens d'obtenir cet effet.

#### 1.1.1.8. Théories de l'optimisation de la FFF

L'idée de base était d'ajuster la vitesse d'élution afin d'obtenir la plus petite hauteur équivalente à un plateau théorique.

Une séparation est optimale à partir du moment où la hauteur d'un plateau théorique atteint une valeur minimale ( $H_{min}$ ), et où la vitesse d'un analyte monodisperse ( $V$ ) ((33)) atteint une valeur maximale ( $V_{opt}$ )

En dérivant l'expression, on obtient :

$$V_{opt} = \sqrt{B/C} = \frac{D}{\ell \sqrt{2}} \quad (55)$$

$$H_{min} = 2\sqrt{BC} = \ell \sqrt{32} \quad (56)$$

$\ell$  n'est toutefois pas une grandeur mesurable, il est toutefois possible de la convertir en données mesurables (telles que  $R$  et  $w$ ) grâce à l'équation (24). On obtient alors l'équation suivante, montrant que la hauteur minimale d'un plateau théorique diminue rapidement pour des épaisseurs de canal extrêmement faibles (l'épaisseur du canal a donc tout intérêt à être la plus faible possible) et pour les composés les plus retenus ( $R$  faible) :

$$H_{min} = \frac{\sqrt{32}}{6} \times R_w = 0,94 \cdot R_w \quad (57)$$

Pour la vitesse optimale du nuage d'analyte concerné, on obtient l'équation suivante, qui montre qu'elle devra être élevée pour les analytes les plus retenus, et basse pour les analytes les moins retenus :

$$V_{opt} = \frac{6D}{R_w \sqrt{2}} = \frac{\sqrt{18} \cdot D}{R_w} \quad (58)$$

En pratique, la vitesse optimale moyenne du liquide porteur serait ((33)) :

$$\langle \bar{v}_{opt} \rangle = \frac{U}{R \sqrt{2}} \quad (59)$$

#### 1.1.1.9. La FFF programmée - Notion de relaxation secondaire

A partir de là, l'idée de programmer la vitesse longitudinale du liquide porteur et l'intensité de la force du champ ont été abordées. L'idée n'est pas nouvelle et a été appliquée aux techniques de FFF thermiques et de sédimentation.

La loi universelle de programmation de ces paramètres au cours du temps correspond à l'équation suivante ((15)) :

$$L = \int_0^{t_r} V dt = \int_0^{t_r} R \langle \bar{v} \rangle dt \quad (60)$$

L : Longueur du système

$t_r$  : Temps de rétention d'un analyte

R : Ratio de rétention d'un composé

V : Vitesse longitudinale moyenne d'un composé

$\langle \bar{v} \rangle$  : Vitesse longitudinale moyenne du liquide porteur

#### 1.1.1.9.1. Programmation de la vitesse longitudinale

L'une des premières approches était d'augmenter la vitesse longitudinale sur la durée en maintenant le champ tangentiel constant afin de pouvoir couvrir les vitesses optimales d'élution de chaque analyte ((38), (33)).

La théorie générale de la programmation de la vitesse correspond à l'équation universelle de programmation modifiée de cette façon :

$$\frac{L}{R} = \int_0^{t_r} \langle \bar{v} \rangle dt \Leftrightarrow \frac{L \cdot V_r}{V_0} = \int_0^{t_r} \langle \bar{v} \rangle dt \quad (61)$$

Ainsi, d'après Giddings et al. ((38)), la dépendance de la hauteur équivalente à un plateau théorique moyenne en fonction du temps de rétention donnera l'équation suivante :

$$\bar{H} = \frac{A \int_0^{t_r} \langle \bar{v} \rangle^2 dt}{(V_0/L)^y \cdot \left( \int_0^{t_r} \langle \bar{v} \rangle dt \right)^{(y+1)}} \quad (62)$$

A : Constante

y : Exposant variant entre 2 et 2,67

Toutefois, le fait de varier la vitesse a un effet difficilement appréciable d'un type d'équipement à l'autre ((38)).

#### 1.1.1.9.2. Programmation de champ

Une autre approche consiste à diminuer la force du champ latéral sur la durée afin de permettre aux analytes les plus ralentis de passer progressivement à des couloirs de vitesses longitudinales supérieures et ainsi d'être élués plus rapidement ((31), (12), (45)). L'idée a été imaginée dès 1966, dès la naissance des techniques de FFF ((46)), et développée dans les FFF thermique ((47), (48)) et de sédimentation ((49), (32)), puis en FFF symétrique ((31)).

La théorie générale de la programmation du champ correspond à l'équation universelle de programmation modifiée de cette façon :

$$\frac{L}{\langle \bar{v} \rangle} = \int_0^{t_r} R dt \Leftrightarrow t_0 = \int_0^{t_r} R dt \quad (63)$$

Quand le champ décroît durant l'éluion (en gardant une vitesse longitudinale moyenne constante), le ratio de rétention change en raison de la dépendance de  $\lambda$  à

la force du champ (voir équation (8)). Cet effet correspond à la relaxation secondaire ((15)).

On obtient ainsi la relation suivante ((15), (43)) :

$$\lambda = \lambda_0 \times \left( \frac{\dot{V}_{c0}}{\dot{V}_c} \right) \quad (64)$$

$\lambda_0$  : Valeur de  $\lambda$  au réglage de débit tangentiel initial

$V_{c0}$  : Débit tangentiel initial

$\lambda$  : Nouvelle valeur de  $\lambda$  obtenue après passage du débit tangentiel à la nouvelle valeur  $V_c$

La décroissance du champ peut être faite de plusieurs manières :

- Step-Wise

Dans cette situation, le champ tangentiel est diminué par paliers, en maintenant la vitesse longitudinale constante ((50)).

- Linéaire

Dans cette situation, le champ (ici, le débit tangentiel) est maintenu constant à une certaine valeur ( $V_{c(0)}$ ) sur une certaine période notée  $t_1$ , puis est réduit de façon linéaire en fonction du temps jusqu'à une valeur nulle, sur un intervalle de temps  $t_p$ . L'équation de base caractérisant ce mode de décroissance est ((15), (31)) :

$$\dot{V}_{c(t)} = \dot{V}_{c(0)} \left( \frac{t_p - (t - t_1)}{t_p} \right) \quad (65)$$

$V_{c(t)}$  : Débit tangentiel au temps « t »

$V_{c(0)}$  : Débit tangentiel de départ

$t_1$  : Période de maintien du débit tangentiel initial  $V_{c(0)}$

$t_p$  : Période de réduction linéaire du débit tangentiel

Le temps de rétention sera ainsi modifié en conséquence (l'équation est valable si le mode stérique est négligeable) :

$$t_r = t_1 + t_p (1 - \exp(-(t_{r0} - t_1)/t_p)) \quad (66)$$

$t_{r0}$  : Temps de rétention du composé en l'absence de modification du débit tangentiel initial

$t_r$  : Temps de rétention du composé après décroissance du débit tangentiel initial

Le champ tangentiel étant modifié, le coefficient de diffusion l'est également ((31)) :

$$D = \frac{\dot{V}_{c(0)} \cdot w^2}{6 \cdot \dot{V}_{out}} \left( t_1 + t_p \cdot \ln \left( \frac{t_p}{t_1 + t_p - t} \right) \right)^{(-1)} \quad (67)$$

### - Parabolique

Ce mode de décroissance est censé être plus progressif que le mode linéaire. Il est surtout utilisé en FFF par sédimentation ((15), (32)). L'équation de base caractérisant ce mode de décroissance est :

$$S_t = S_0 \left( \frac{t_p - (t - t_1)}{t_p} \right)^2 \quad (68)$$

$S_t$  : Force du champ latéral au temps « t »

$S_0$  : Force du champ latéral de départ

$t_1$  : Période de maintien du champ latéral initial  $S_0$

$t_p$  : Période de réduction linéaire du champ latéral

Jusqu'ici, il n'a pas été utilisé pour les techniques en flux hydrodynamique. Il est cité ici pour mémoire.

### - Exponentielle

Dans cette situation, le champ (ici, le débit tangentiel) est maintenu constant à une certaine valeur ( $V_{c(0)}$ ) sur une certaine période notée  $t_1$ , puis est réduit de façon exponentielle en fonction du temps selon une constante de temps notée «  $\tau$  » ((15), (31), (51), (52)). L'équation de base caractérisant ce mode de décroissance est ((15), (31)) :

$$\dot{V}_{c(t)} = \dot{V}_{c(0)} \cdot \exp\left(-\frac{(t-t_1)}{\tau}\right) \quad (69)$$

$V_{c(t)}$  : Débit tangentiel au temps « t »

$V_{c(0)}$  : Débit tangentiel de départ

$t_1$  : Période de maintien du débit tangentiel initial  $V_{c(0)}$

$\tau$  : Constante de temps

Le temps de rétention correspondra alors à :

$$t_r = t_1 + \tau \cdot \ln \left( \frac{1}{2\lambda_0} (1 - B^{(1/2)}) \right) \quad (70)$$

où B correspond à :

$$B = 1 - \frac{2(t_0 - 6t_r \cdot \alpha)}{3\tau} + 4\lambda_0 \left( \frac{t_1}{\tau} - 1 \right) + 4\lambda_0^2 \left( 1 - \left( \frac{2t_1}{\tau} \right) \right) \quad (71)$$

Toutefois, en mode Brownien, la valeur  $\alpha$  (correspondant à la taille d'une particule isolée) est négligeable. De même,  $\lambda_0$  est très inférieure à 1. Pour simplifier encore le problème, on pourra même prendre une valeur  $t_1$  égale à  $\tau$ . On obtiendra donc pour B :

$$B \approx 1 - \frac{2t_0}{3\tau} \quad (72)$$

Le coefficient de diffusion des particules sera également modifié ((31)) :

$$D = \frac{\dot{V}_{c(0)} \cdot W^2}{6 \cdot \dot{V}_{out}} \cdot (t_1 + \tau (e^{(t_r - t_0)/\tau} - 1))^{(-1)} \quad (73)$$

### - Décroissance par puissance

L'idée derrière cette forme de décroissance était de maintenir un pouvoir de fractionnement constant pour les particules de grand diamètre ((15)). Toutefois, ce

mode de décroissance est amené à connaître de plus en plus d'applications. L'équation de base caractérisant ce mode de décroissance est :

$$\dot{V}_{c(t)} = \dot{V}_{c(0)} \left( \frac{t_1 - t_a}{t - t_a} \right)^p \quad (74)$$

$V_{c(t)}$  : Débit tangentiel au temps « t »

$V_{c(0)}$  : Débit tangentiel de départ

$t_1$  : Période de maintien du débit tangentiel initial  $V_{c(0)}$

p : Puissance (>0)

$t_a$  étant un paramètre asymptotique de temps déterminant le degré de courbure de la courbe de décroissance ((53)).

## 1.1.2. Mode d'élution stérique/hyperlayer

### 1.1.2.1. Description

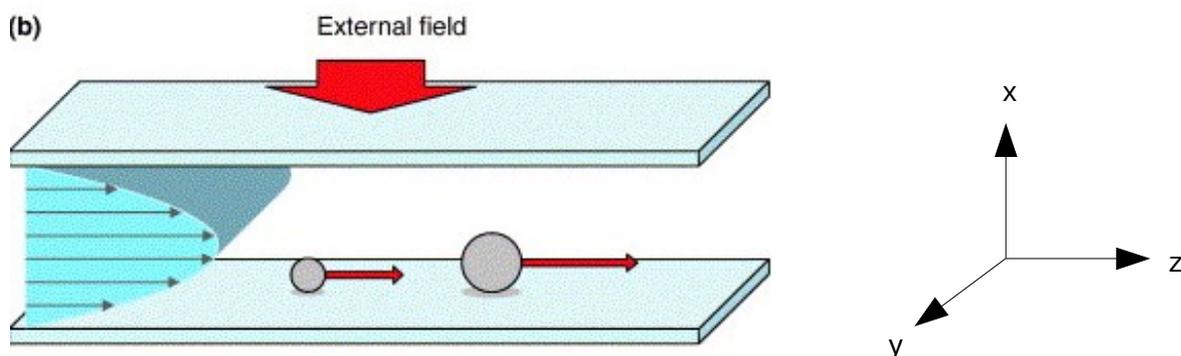


Figure 11: Représentation du mode d'élution stérique (au sens strict) dans un canal de FFF

Lorsque les particules constituant un analyte atteindront une certaine taille (de 100 nm à 1  $\mu$ m selon la force du champ ((54))), la situation changera. Ainsi, le mode

d'élution Brownien ne s'appliquera plus, et le mode d'élution stérique s'appliquera alors. Dans ce mode, la valeur  $l$  correspondant au déplacement brownien moyen (ou, plus simplement, à l'épaisseur du nuage de particules, décrite dans le mode d'élution brownien) devient inférieure au rayon des particules. Les particules ne formeront plus de nuage et les différences de vitesse d'élution se feront exclusivement sur la taille des particules prises isolément.

A partir de ce postulat, un nouveau modèle d'élution a été mis au point par Giddings ((55)). Dans ce modèle, la taille importante d'une particule implique une séparation entre la surface d'accumulation et le centre de gravité de la particule. Dans le cas d'une particule sphérique, cette distance, notée "a", correspond au rayon de la particule. Il est également considéré dans ce modèle que le centre de gravité de la particule subit des transferts browniens sur une section de canal réduite "accessible" au centre de gravité de ladite particule ("accessible core" ou "core" selon les termes de Giddings), la section "inaccessible" du canal correspondant alors à la couche d'exclusion ("exclusion layer"), dont l'épaisseur est déterminée par la grandeur "a" ((55)).

De cette façon, on peut dégager le paramètre suivant, noté  $\alpha$ :

$$\alpha = \frac{a}{w} \quad (75)$$

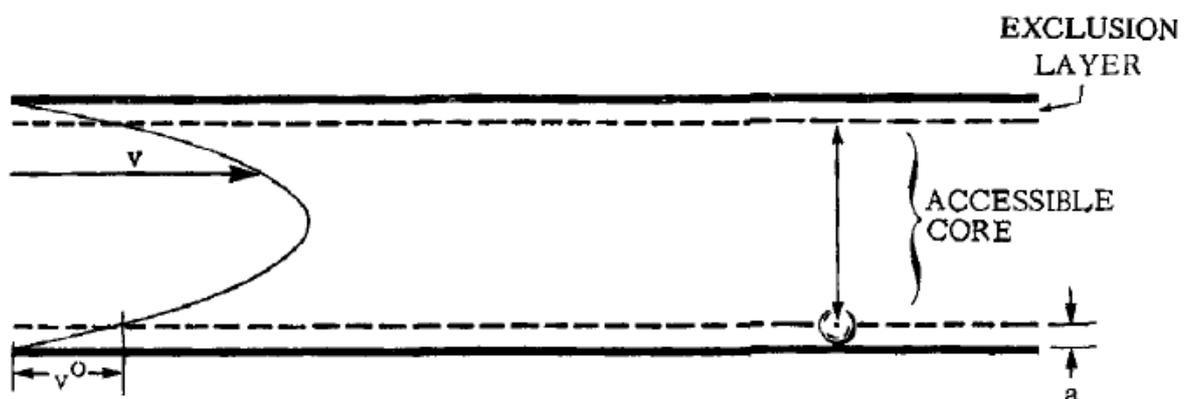


Figure 12: Déplacement d'une particule sphérique dans un canal de FFF selon le mode stérique ((55))

a: Epaisseur de la couche d'exclusion (dans le cas d'une particule sphérique, correspond au rayon de la particule)

w: Epaisseur du canal de séparation

Le "core" peut alors être considéré comme un canal de séparation à part entière, avec ses paramètres et ses dimensions propres.

La vitesse du liquide régnant aux limites du "core" ( $v^0$ ) est obtenue en remplaçant dans l'équation (18) la valeur "x" par la valeur "a":

$$v^0 = 6 \langle v \rangle \left[ \left( \frac{a}{w} \right) - \left( \frac{a}{w} \right)^2 \right] \Leftrightarrow 6 \langle v \rangle (\alpha - \alpha^2) \quad (76)$$

La vitesse moyenne du liquide circulant au sein du "core" ( $\langle v^c \rangle$ ) peut être résumée par l'équation suivante:

$$\langle v^c \rangle = \left( \frac{1}{w - 2a} \right) \int_a^{w-a} (v - v^0) dx \quad (77)$$

En intégrant l'équation, on obtient:

$$\frac{\langle v^c \rangle}{\langle v \rangle} = (1 - 2\alpha)^2 \quad (78)$$

Etant donné que le canal de séparation principal (canal-"parent", en quelque sorte) et le "core" sont considérés comme 2 canaux de séparation à part entière,

deux ratios de rétention pourront être obtenus: un pour le "core" ( $R^c$ ) et un pour le canal-parent ( $R$ )

Ainsi, la vitesse moyenne des particules ( $V$ ) dans le canal-parent correspond à l'équation suivante:

$$V = v^0 + R^c \cdot \langle v^c \rangle \quad (79)$$

De ce fait, le ratio de rétention obtenu pour le canal-parent sera:

$$R = \frac{V}{\langle v \rangle} = \frac{v^0 + R^c \cdot \langle v^c \rangle}{\langle v \rangle} \quad (80)$$

En substituant les équations précédentes, on obtient:

$$R = \frac{V}{\langle v \rangle} = \frac{v^0 + R^c \cdot \langle v^c \rangle}{\langle v \rangle} = \frac{(6 \langle v \rangle (\alpha - \alpha^2))}{\langle v \rangle} + \frac{R^c \cdot \langle v^c \rangle}{\langle v \rangle} \quad (81)$$

$$\Rightarrow R = 6(\alpha - \alpha^2) + R^c \times \left( \frac{\langle v^c \rangle}{\langle v \rangle} \right) \quad (82)$$

$$\Rightarrow R = 6(\alpha - \alpha^2) + R^c \times (1 - 2\alpha)^2 \quad (83)$$

A partir de là, il est également utile de déterminer un autre ratio de rétention, appelé le ratio de rétention idéal ( $R_{id}$ ). Cette valeur correspond au ratio de rétention dans les conditions hypothétiques où le centre de gravité de la particule serait en contact avec la paroi du canal (on imagine alors que la particule suit un mode d'éluion brownien). Ce ratio est ainsi associé à une valeur  $\lambda$  "idéale" ( $\lambda_{id}$ ):

$$\lambda_{id} = \frac{D}{U \cdot w} \quad (84)$$

Où, comme dans le mode brownien:

D: Coefficient de diffusion Brownien des particules (les particules ayant une taille de l'ordre du micromètre, celui-ci sera par conséquent extrêmement faible)

U: Vitesse du flux tangentiel appliqué

w: Epaisseur du canal de séparation

En reprenant l'équation appropriée, on obtient:

$$R_{id} = 6 \lambda_{id} \left( \coth \left( \frac{1}{2 \lambda_{id}} \right) - 2 \lambda_{id} \right) \quad (85)$$

L'épaisseur du "core" a une valeur égale à  $w - 2a$  (voir figure 9), d'où:

$$w - 2a = w - 2\alpha w = w(1 - 2\alpha) \quad (86)$$

On aura ainsi, d'après Giddings:

$$\lambda^c = \frac{\lambda_{id}}{(1 - 2\alpha)^2} \quad (87)$$

Le ratio de rétention obtenu pour le "core" sera ainsi:

$$R^c = 6 \lambda^c \left( \coth \left( \frac{1}{2 \lambda^c} \right) - 2 \lambda^c \right) \quad (88)$$

En combinant les équations, on obtient ((28)):

$$R = 6 (\alpha - \alpha^2) + 6 \lambda_{id} (1 - 2 \alpha) \left( \coth \left( \frac{1 - 2 \alpha}{2 \lambda_{id}} \right) - \frac{2 \lambda_{id}}{1 - 2 \alpha} \right) \quad (89)$$

Ce qui correspond en réalité à l'équation universelle régissant les techniques de fractionnement par couplage flux-force.

Par approximation, cela donne l'équation suivante:

$$R = 6 \alpha + 6 \lambda \quad (90)$$

En fait, lorsque le diamètre des particules augmente,  $\alpha$  augmente et  $\lambda$  diminue. A partir d'un certain diamètre, ces deux paramètres seront tous les deux significatifs (voire se compenseront complètement) et aucune séparation ne se fera à ce moment-là. A partir de là, on passera en mode stérique, ce qui se traduira par un effet inverse du mode brownien: plus le diamètre des particules augmente, les particules les plus massives sortiront plus tôt, par augmentation du facteur  $\alpha$ , qui fera augmenter le ratio de rétention  $R$  ( $\lambda$ , ou plutôt  $\lambda_{id}$ , sera alors négligeable) ((28), (56)).

Cela signifie qu'en théorie, le seuil d'inversion stérique est atteint lorsque  $\lambda = \alpha$ .

En réalité, il a été démontré ((28)) que les particules éluées en mode stérique ne sont pas directement en contact avec la paroi d'accumulation. Au contact de la paroi, la vitesse des particules est en réalité réduite en raison d'une "contre-poussée" longitudinale (opposée au flux longitudinal) liée à la viscosité du liquide. Cet effet à

également tendance à soulever les particules de la paroi d'accumulation, d'où l'appellation "hyperlayer".

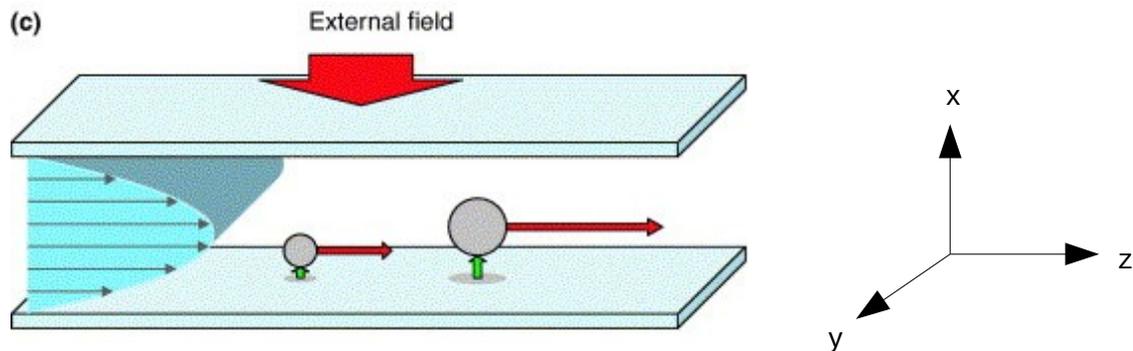


Figure 13: Représentation du mode d'éluion stérique/hyperlayer dans un canal de FFF

A partir de là, on peut introduire un nouveau paramètre (sans dimension) dans l'équation, appelé  $\gamma$ , qui correspond à un facteur de correction lié aux forces de poussée hydrodynamiques ayant tendance à éloigner les particules de la paroi d'accumulation. La nature de ces forces est toutefois encore mal comprise ((57), (15))

On obtient ainsi l'équation suivante ((28), (15)):

$$R=6\gamma(\alpha-\alpha^2)+6\lambda(1-2\alpha)\left(\coth\left(\frac{1-2\alpha}{2\lambda}\right)-\frac{2\lambda}{1-2\alpha}\right) \quad (91)$$

Qui donnera, par approximation :

$$R=6\gamma\alpha+6\lambda \quad (92)$$

Il a été démontré que le facteur  $\gamma$  dépendait de la force du flux longitudinal, de celle du flux tangentiel, du diamètre des particules et de l'épaisseur du canal ((58), (59), (54)), mais dépend aussi d'un grand nombre d'autres paramètres

hydrodynamiques encore non élucidés, ainsi que de la technique employée. La théorie a été approfondie pour les techniques de fractionnement par couplage flux-force à champ thermique et par sédimentation, mais les paramètres obtenus restent encore obscurs. Quant aux techniques à flux tangentiel hydrodynamique, les données sont encore insuffisantes.

### 1.1.2.2. Seuil d'inversion stérique

Au final, on en conclut que le ratio de rétention évolue de cette façon en fonction de la taille et de la force du champ ((54)):

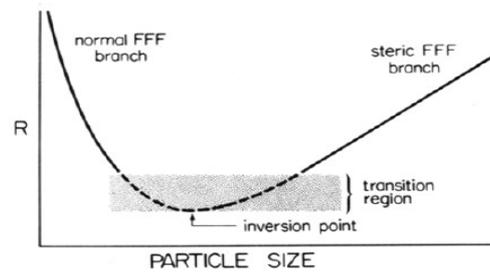


Figure 14: Illustration de la variation du ratio de rétention en fonction de la taille des particules, et de la région de transition stérique ((54)).

On en conclut que pour un même ratio de rétention, deux types de particules peuvent être décrites: un type de particules par le mode brownien, l'autre type, par le mode stérique. On observe également que le ratio de rétention atteint son minimum lors de l'inversion stérique.

Il a également été observé expérimentalement qu'au voisinage du seuil d'inversion stérique (zone grisée de la courbe), le ratio de rétention ne varie quasiment plus et qu'en conséquence, la séparation n'est plus effective. Ainsi, la sélectivité sera faible à quasi-nulle sur une certaine échelle de tailles, ce qui se traduira sur le fractogramme par un faux pic, suivi d'une ligne de base (car théoriquement, plus aucune particule ne sera présente dans la chambre de séparation).

L'effet a été observé en FFF de sédimentation et en Flow-FFF ((60)).

## **1.2. Les différentes techniques mettant en jeu un flux hydrodynamique**

### **1.2.1. Le fractionnement par couplage flux-force à flux symétrique (SF4)**

Il s'agit de la technique de base en matière de FFF hydrodynamique. Dans cette technique, le champ longitudinal est généré par un flux liquidien issu d'une pompe, et le champ latéral est généré par un flux liquidien issu d'une autre pompe. La chambre de séparation (ou canal de séparation) est constituée de 2 frittés poreux séparés d'un espacement d'une très faible hauteur. Le fritté du bas est recouvert d'une membrane d'ultrafiltration, qui (théoriquement) ne laissera circuler que le liquide porteur contenu dans la chambre, mais pas les constituants de l'échantillon. Les 2 frittés sont de forme rectangulaire, les extrémités de chaque fritté sont toutefois triangulaires afin d'assurer la régularité des débits d'entrée et de sortie du canal de séparation ((61)). Le flux latéral entrera de façon perpendiculaire à travers la chambre par le fritté supérieur et en ressortira à la fois par le fritté inférieur et par la sortie longitudinale de la chambre. Les différents constituants de l'échantillon seront placés dans le flux selon les principes évoqués plus haut et élués vers un détecteur et/ou un dispositif de collection de fractions afin d'être caractérisés plus en détail.

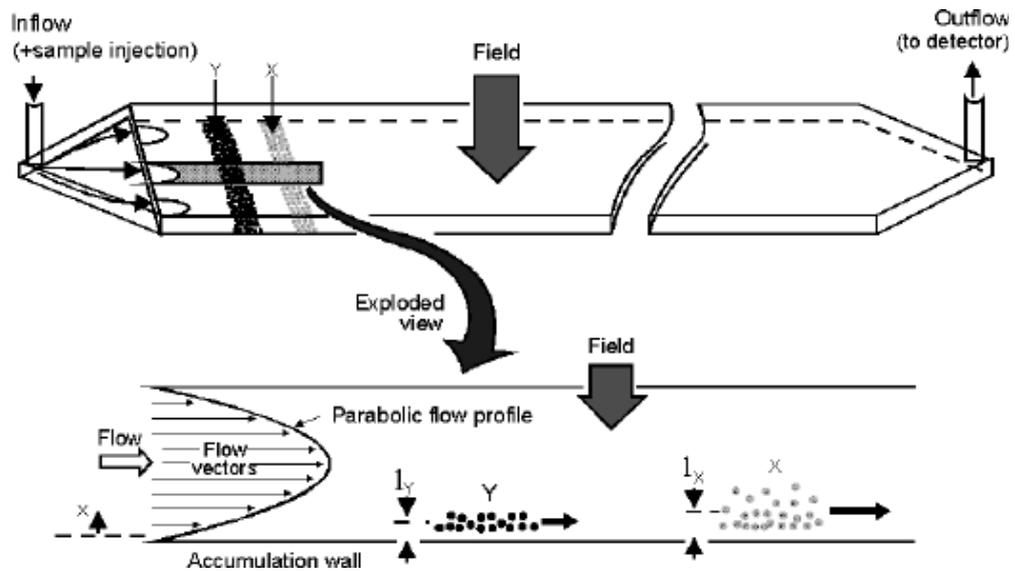


Figure 15: Représentation d'un canal de FFF symétrique ((62))

#### 1.2.1.1. Profils de vitesses

Dans le cadre d'un canal de FFF symétrique, la vitesse longitudinale moyenne du liquide porteur en un point  $z$  donné du canal correspond à ((29), (36)) :

$$\langle v_z \rangle = \frac{\dot{V}_{out}}{b \times w} = \frac{L}{t_0} = \langle \bar{v} \rangle \quad (93)$$

$V_{out}$  : Débit de sortie longitudinal du canal de séparation

$b$  : Largeur du canal

$w$  : Epaisseur du canal

$L$  : Longueur du canal

$t_0$  : Temps de volume mort

Dans un canal de FFF symétrique (rectangulaire, cela va sans dire),  $\langle v_z \rangle$  est constante et correspond ainsi à la vitesse longitudinale moyenne du liquide porteur dans la totalité du canal (notée  $\langle \bar{v} \rangle$ ).

Un canal de FFF symétrique fait intervenir une entrée de fluide issu d'une autre pompe pour exercer le flux latéral. Au niveau de l'entrée latérale ((63)), la vitesse du flux latéral correspond à  $u_0$ , et à  $u_1$  à la sortie latérale (les valeurs intermédiaires correspondant à  $u(x)$ ). Ce gradient de vitesses est notamment liée à des anomalies de perméabilité entre les parois (il est toutefois possible de faire varier ce paramètre artificiellement lors des injections)

Giddings et al. ((63)) ont déterminé que la vitesse du flux latéral sur la longueur du canal donnait l'équation suivante:

$$\frac{d\langle v \rangle}{dz} = \frac{u_0 - u_1}{w} \quad (94)$$

Le profil de vitesses du liquide porteur étant parabolique, la vitesse longitudinale en tout point  $x$  de l'épaisseur du canal est donnée par l'équation (18).

Ainsi, la vitesse latérale (tangentielle) en tout point du canal est donnée par l'équation suivante, obtenue après balance des masses entre les 2 frittés ((63)) :

$$u_x = u_0 + (u_1 - u_0) \left( \frac{3x^2}{w^2} - \frac{2x^3}{w^3} \right) \quad (95)$$

$u_x$  : Vitesse du flux tangentiel en tout point  $x$  de l'épaisseur du canal

$u_0$  : Vitesse du flux tangentiel au fritté d'entrée

$u_1$  : Vitesse du flux tangentiel au fritté de sortie

$x$  : Position déterminée sur l'épaisseur du canal de séparation

w : Epaisseur du canal

La vitesse longitudinale moyenne à l'intérieur du canal est obtenue après transformations des équations précédentes. La démonstration a été effectuée par Giddings et al. ((63)):

$$\langle v_z \rangle = \langle v_0 \rangle + \frac{u_0 - u_1}{w} \times z \quad (96)$$

$\langle v_z \rangle$ : Vitesse moyenne du liquide en une certaine coordonnée "z" de la longueur du canal

$\langle v_0 \rangle$ : Vitesse moyenne du liquide à l'entrée du canal de séparation

$u_0$ : Vitesse du flux tangentiel au fritté d'entrée

$u_1$ : Vitesse du flux tangentiel au fritté de sortie

### 1.2.1.2. Relaxation

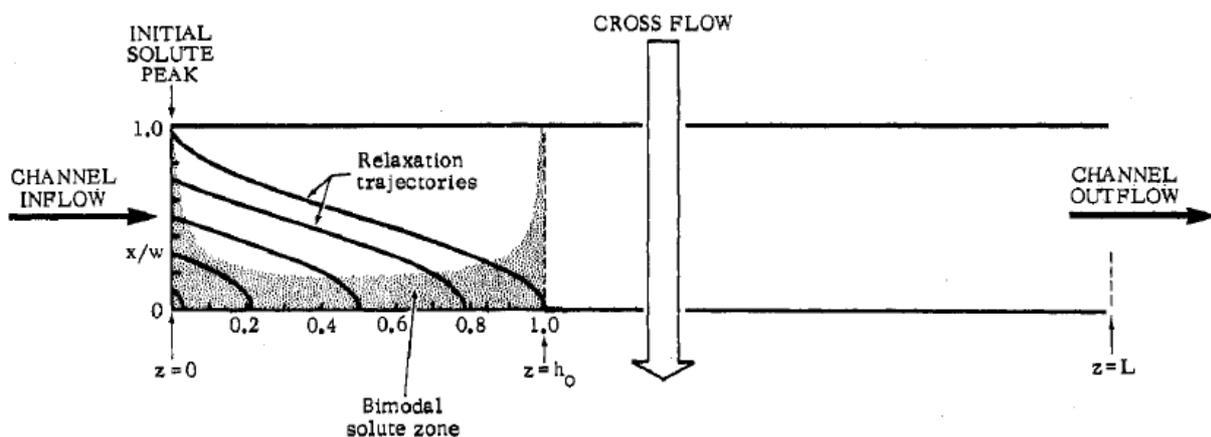


Figure 16: Vue de côté d'un canal de FFF en position de relaxation ((64))

En FFF symétrique, le flux longitudinal et le flux tangentiel étant générés par 2 pompes séparées, il suffit de détourner à l'aide d'une valve le liquide de la pompe générant le flux longitudinal en laissant tourner celle générant le flux radial, puis

d'injecter l'échantillon dans le canal. Cette technique simple provient d'ailleurs des techniques de FFF thermiques et de sédimentation.

Cette méthode est appelée Stop-Flow ((43), (38), (40), (64), (29)). Cette méthode, bien que simple en théorie, n'est toutefois pas sans défauts, car d'une part, elle est peu pratique sur le plan expérimental, et d'autre part, car il a été expérimentalement démontré qu'elle était susceptible d'entraîner des instabilités de la ligne de base et diverses anomalies des pics obtenus, en plus de potentialiser le risque d'adsorption sur la membrane d'accumulation ((64), (65), (29), (34)).

De ce fait, des méthodes dites Stopless-Flow sont apparues ((44), (40)), permettant une relaxation de l'échantillon tout au long de sa circulation à travers le canal, sans interruption de flux. Un des avantages de ce mode de relaxation est de limiter sérieusement l'adhésion des particules à la membrane de séparation ((34), (41)) par effet de cisaillement entre la collision de deux flux (voir plus bas) combinés lors du processus de relaxation ((41)). Toutefois, tout comme en chromatographie d'exclusion stérique (où l'effet de cisaillement est lié à la collision entre la circulation de la phase mobile et de la phase stationnaire), cet effet peut abîmer les particules les plus fragiles, ce qui nécessite un certain compromis entre les débits des flux appliqués.

Pour la FFF symétrique, 2 configurations ont été imaginées ((34)), la configuration Stopless-Flow/Split-Inlet ((29)), dans laquelle le flux longitudinal entrant est partagé en 2 par un « diviseur » (voir figure 17a), l'un des flux (sample inlet), poussant l'échantillon, l'autre (carrier inlet) faisant circuler du liquide pousseur comprimant l'échantillon selon une ligne imaginaire (inlet splitting plane). L'autre configuration est la configuration Stopless-Flow/Frit-Inlet (Frit-Inlet Flow Field-Flow Fractionation ou FI-FI. FFF), où une partie frittée située après l'entrée d'échantillon permet l'entrée de liquide qui comprimera l'échantillon (figure 17b).

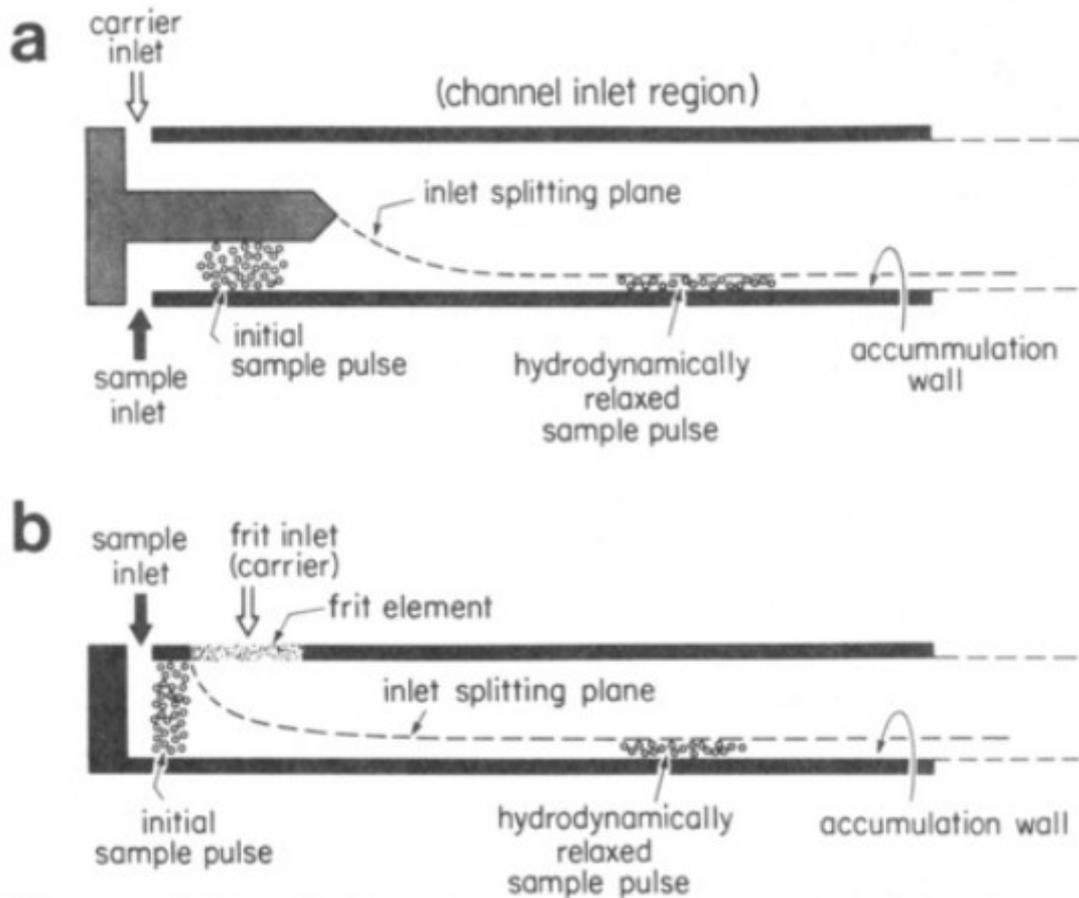


Figure 17: Illustration schématique de la relaxation hydrodynamique dans un système Split-Inlet (a) et dans un système Frit-Inlet (b) ((34))

La configuration Stopless-Flow/Frit-Inlet a pour avantages de réduire la fourchette de variation des forces de cisaillement lors des variations des débits mais a pour principal inconvénient d'augmenter le phénomène d'élargissement des bandes ((41), (15)) (ce qui explique pourquoi la technique Stop-Flow reste quelquefois prisée). Des variantes de canal de type « Frit-Outlet » (partie frittée positionnée en sortie permettant une sortie latérale de liquide porteur) ont été conçues ((40), (41)) afin de concentrer les échantillons sur les couches de vitesses supérieures avant leur passage devant le détecteur. Ainsi, des canaux combinant les 2 caractéristiques ont également été conçus ((66)).

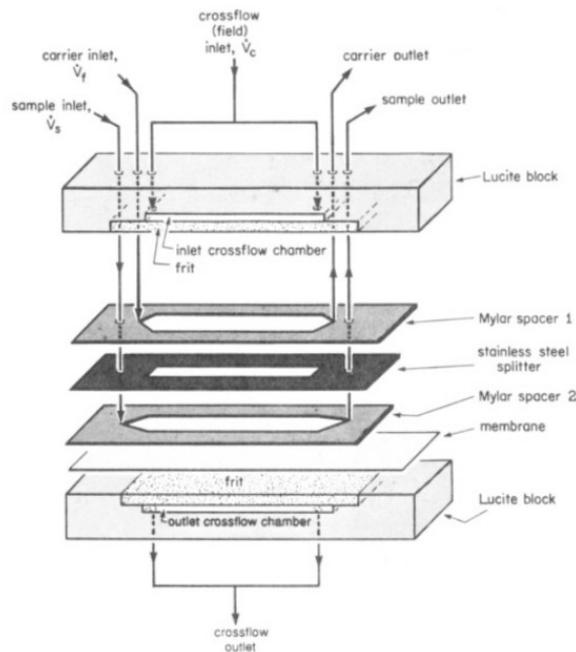


Figure 18: Vue éclatée d'un canal de séparation symétrique de FFF ((34))

### 1.2.2. Le fractionnement par couplage flux-force à flux asymétrique (AF4)

Dès 1987 ((67)), il a été remarqué que la FFF symétrique présentait certains inconvénients. Tout d'abord, la complexité de l'installation (une pompe était nécessaire pour générer le débit axial, une autre était nécessaire pour générer le débit tangentiel). Ensuite, la FFF symétrique posait des problèmes de reproductibilité des résultats, qui pouvaient s'expliquer par les hétérogénéités de perméabilité entre les frittés d'entrée et de sortie tangentiels ((67)) liées à leur processus de fabrication.

De ce fait, un nouveau design de canal de séparation a été imaginé dans lequel le fritté supérieur serait remplacé par une simple plaque de verre ou de plexiglas (supprimant de fait la nécessité d'une deuxième pompe pour générer le champ tangentiel). Ainsi, le champ tangentiel serait généré par la sortie de liquide par le fritté recouvert par la membrane d'ultrafiltration. La technique obtenue présente plusieurs avantages, à savoir la simplification de l'appareillage, la réduction des incertitudes liées à l'hétérogénéité entre les frittés, et surtout, la possibilité de

visualiser directement le déroulement de la séparation, notamment la position du point de focalisation, par le biais de la plaque supérieure. Ainsi est née la technique de fractionnement par couplage flux-force à flux asymétrique, dans laquelle le champ longitudinal, et le champ latéral sont générés par la même pompe.

### **1.2.2.1. Relaxation**

Dès 1987, pour la FFF asymétrique, une méthode équivalente à la méthode Stop-Flow a été imaginée. Toutefois, si l'on arrête le flux longitudinal dans cette technique, le champ tangentiel est de fait supprimé. Un artifice à toutefois été obtenu en détournant à l'aide d'un système de valves lors de la relaxation, une partie du flux longitudinal et en le faisant entrer par la sortie de la chambre de séparation. Le processus exact est connu sous l'appellation de focalisation ((68)). En faisant varier le débit longitudinal d'entrée de chambre de séparation et le débit longitudinal entrant par la sortie de la chambre de séparation, il est possible de moduler la position de la chambre où l'échantillon s'accumulera ((67)) (figure 19A).

Il existe un cas particulier de ce mode de focalisation appelé la relaxation par flux inversé (« reverse flow relaxation » ou « opposing flow relaxation ») où le flux longitudinal d'entrée de chambre est supprimé ((67)), et où par conséquent, la focalisation se fait précisément à l'entrée de la chambre (figure 19B).

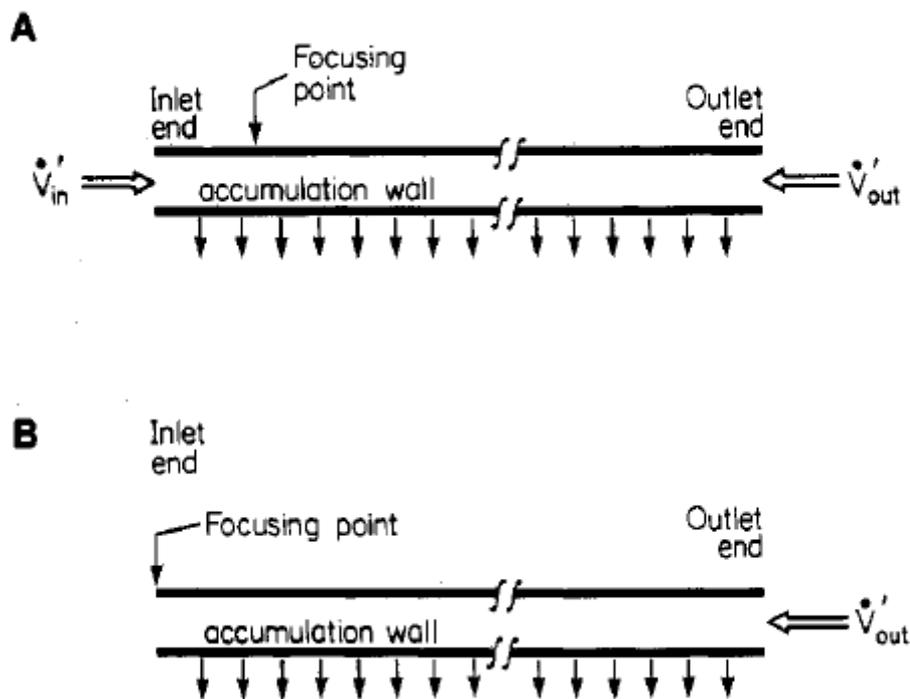


Figure 19: Différentes configurations de focalisation en FFF asymétrique ((67))

Toutefois, tout comme la méthode Stop-Flow en FFF symétrique, la méthode de relaxation par focalisation, une fois employée en pratique, avait pour inconvénient de déformer les pics (effet de tailing) et de décaler leurs temps de rétention. Les méthodes Stopless-Flow ont ainsi été appliquées à la technique de FFF asymétrique. Les canaux de séparation asymétriques ont été modifiés en conséquence, par exemple pour la configuration Stopless-Flow/Frit-Inlet ((65), (69), (70), (71)) où la paroi de déplétion du canal (opposée à la paroi d'accumulation) dont le début (côté de l'entrée de flux longitudinal) a été remplacé par un fritté ((34), (68)). Cette configuration en Frit-Inlet de la FFF asymétrique permet, à l'instar de la Frit-Inlet Flow-FFF, permet de réduire les temps de relaxation et d'analyse, de réduire les interactions avec la membrane et de concentrer l'échantillon in-situ ((61)).

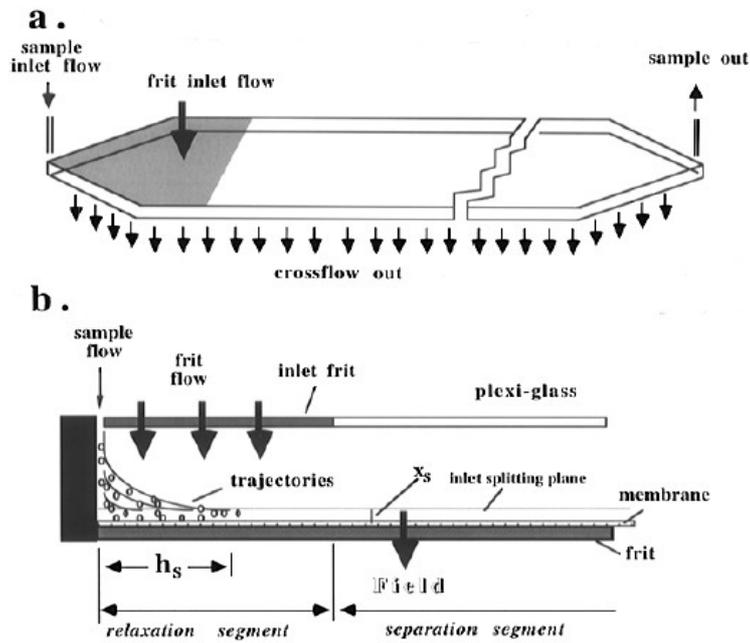


Figure 20: Représentation d'un canal de FFF asymétrique rectangulaire en configuration Frit-Inlet (a) et représentation du mode de relaxation hydrodynamique (b) ((65))

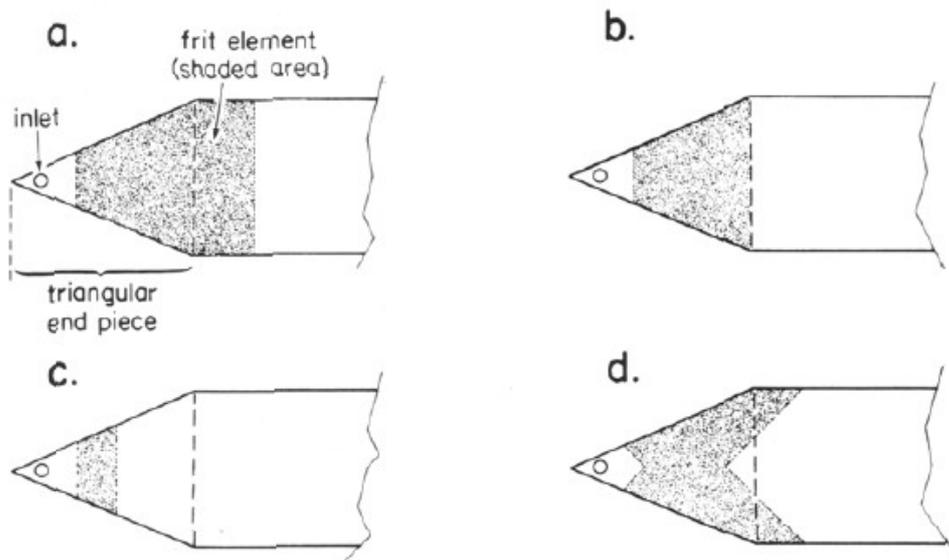


Figure 21: Plusieurs versions de la configuration Frit-Inlet des canaux de FFF ((41))

Au final, cette technique a obtenu assez rapidement quelques succès, et a été sujette à bon nombre d'améliorations, notamment au sujet des matériaux constituant la chambre de séparation, améliorant ainsi sa compatibilité avec certains solutés ou

certaines solvants (notamment organiques). La conception même de la chambre a pu être améliorée : historiquement, les espaceurs situés entre les parois des canaux de FFF étaient sciés ou sculptés à partir d'une plaque (en général de Teflon) d'une épaisseur définie (en FFF symétrique, deux morceaux étaient sciés aux dimensions voulues, placés de chaque longueur d'une des parois, en asymétrique, la plaque étant sculptée et évidée) l'assemblage étant ensuite fixé sur l'autre paroi par perçage puis vissage (autant que possible la colle est évitée), toute la chambre étant ensuite consolidée de façon à éviter les fuites, ce procédé était assez fastidieux et contraignant (notamment en raison du choix restreint des différentes épaisseurs possibles des espaceurs). Ce procédé a par conséquent fini par être remplacé (dans le cas de la FFF asymétrique) par une méthode de gravure directe d'une cavité sur la surface même de la paroi imperméable de la chambre de séparation, permettant un choix plus large d'épaisseurs de canal, et une réduction du problème de fuites liées au nombre de pièces assemblées et au nombre de défauts possibles des dites pièces. Pour finir, des tentatives de miniaturisation ont été effectuées.

Dans les techniques chromatographiques en général, la miniaturisation des instrumentations a plusieurs avantages, à savoir la diminution de la consommation en phase mobile, la réduction des coûts de fabrication, ainsi que l'amélioration de la facilité de couplage avec d'autres méthodes d'analyse, la possibilité d'utiliser un volume plus faible d'échantillon, et l'utilisation de débits plus faibles.

Des tentatives de miniaturisation ont été appliquées à toutes les techniques de fractionnement par couplage flux-force, tout d'abord par la réduction de la dimension des canaux de séparation, avec des résultats mitigés pour les FFF électriques et thermiques.

La miniaturisation de la technique de fractionnement par couplage flux-force en flux asymétrique a été expérimentée en 2004 par Moon et al. ((72)) avec succès sur des protéines et de l'ADN, avec l'emploi de débits de l'ordre du  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

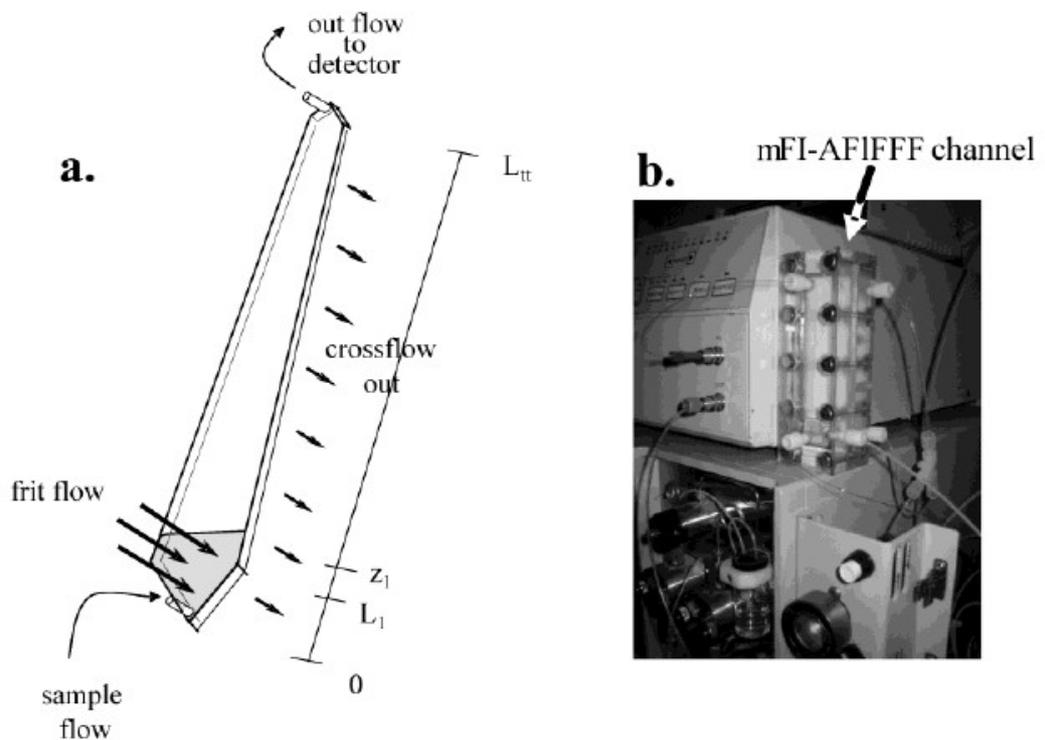


Figure 22: Vue schématique (a) et photographie (b) d'un canal de FFF asymétrique (configuration Frit-Inlet) miniaturisé ((72))

### 1.2.2.2. Détermination du temps de volume mort ( $t_0$ )

En temps normal, le temps de volume mort  $t_0$  correspond a cette équation ((36)) :

$$t_0 = \int_0^L \left( \frac{dz}{\langle v_z \rangle} \right) = \frac{V_0}{\dot{V}_c} \times \ln \left( 1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \right) \quad (97)$$

Le volume mort ( $V_0$ ) est obtenu en multipliant la valeur de l'aire de la membrane de séparation par la hauteur du séparateur ( $w$ ).

Il s'agit de la formule standard pour les canaux asymétriques rectangulaires. Toutefois, en pratique, les extrémités des canaux sont triangulaires, et l'échantillon part généralement du point de focalisation ( $z'$ ).

Ainsi, on obtiendra :

$$t_0 = \int_{z'}^L \left( \frac{dz}{\langle v_z \rangle} \right) = \frac{V_0}{\dot{V}_c} \times \ln \left( 1 + \left( \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \left( 1 - \frac{w \left( b_0 z' - \frac{((z')^2 (b_0 - b_L))}{(2L)} \right) - y}{V_0} \right) \right) \right) \quad (98)$$

$b_0$  : Largeur à l'entrée du canal

$b_L$  : Largeur à la sortie du canal

$L$  : Longueur du canal

$z'$  : Position du point de focalisation

$V_c$  : Débit de liquide sortant par la sortie tangentielle du canal

$V_{out}$  : Débit de liquide sortant par la sortie longitudinale du canal

$V_0$  : Volume géométrique du canal (volume mort)

$w$  : Epaisseur (hauteur) du canal de séparation

$y$  : Aire des pièces triangulaires coupées au début du canal

Qui, une fois simplifié, donnera :

$$t_0 = \frac{V_0}{\dot{V}_c} \times \ln \left( 1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \left( 1 - \frac{A(z') - y}{A_{tot}} \right) \right) \quad (99)$$

$A(z')$  : Aire de la paroi d'accumulation allant du point d'entrée de liquide jusqu'au point de focalisation ( $z'$ )

$A_{tot}$  : Aire totale de la paroi d'accumulation

### 1.2.2.3. Problématiques liées à la vitesse et à la conception des canaux

Les premiers modèles de canaux de séparation ont été conçus sur la base d'un canal de FFF symétrique, c'est à dire rectangulaire (et équipé d'extrémités d'entrée et de sortie triangulaires). Dès les premiers essais ((67)), cette approche comporta un inconvénient avec l'utilisation des canaux de formes rectangulaires similaires à ceux utilisés en FFF symétrique, celui lié à la perte de débit en sortie latérale.

Le calcul des profils de vitesse (linéaire et tangentielle) en tout point du canal s'effectue selon la théorie d'équilibre des masses ((63), (67))

En FFF symétrique, l'application de cette approche donnait le profil de vitesse linéaire suivant :

$$\langle v_z \rangle = \langle v_0 \rangle + \frac{u_0 - u_1}{w} \times z \quad (100)$$

$\langle v_z \rangle$ : Vitesse moyenne du liquide en une certaine coordonnée "z" de la longueur du canal

$\langle v_0 \rangle$ : Vitesse moyenne du liquide à l'entrée du canal de séparation

$u_0$ : Vitesse du flux tangentiel au fritté d'entrée

$u_1$ : Vitesse du flux tangentiel au fritté de sortie (paroi d'accumulation)

En FFF asymétrique, le champ tangentiel étant généré par la fuite de liquide par la membrane de séparation, on obtient ((63), (67)) :

$$\langle v_z \rangle = \langle v_0 \rangle + \frac{-|u_0|}{w} \times z \quad (101)$$

$\langle v_z \rangle$ : Vitesse moyenne du liquide en une certaine coordonnée "z" de la longueur du canal

$\langle v_0 \rangle$ : Vitesse moyenne du liquide à l'entrée du canal de séparation

$u_0$ : Vitesse du flux tangentiel au fritté de sortie (paroi d'accumulation) (possède une valeur « négative » en raison de la fuite de liquide)

Cet effet, en entraînant une importante perte en débit de sortie ((67)), entraîne un allongement important des temps de rétention des solutés. Cet effet est amplifié par la longueur, ce qui, dans les cas extrêmes, empêche complètement la sortie de certains solutés.

Aussi, la vitesse tangentielle en tout point x de l'épaisseur du canal donnera :

$$u_x = -|u_0| \left( 1 - \frac{3x^2}{w^2} + \frac{2x^3}{w^3} \right) \quad (102)$$

$u_x$  : Vitesse du flux tangentiel en tout point x de l'épaisseur du canal

$u_0$  : Vitesse du flux tangentiel au fritté de sortie

x : Position déterminée sur l'épaisseur du canal de séparation

w : Epaisseur du canal

Dès 1991, l'hypothèse selon laquelle la fabrication et l'utilisation de canaux de forme trapézoïdale pourrait permettre de compenser la perte de débit entraînée par la sortie latérale et de permettre une vitesse linéaire constante ((36), (73)) a été émise.

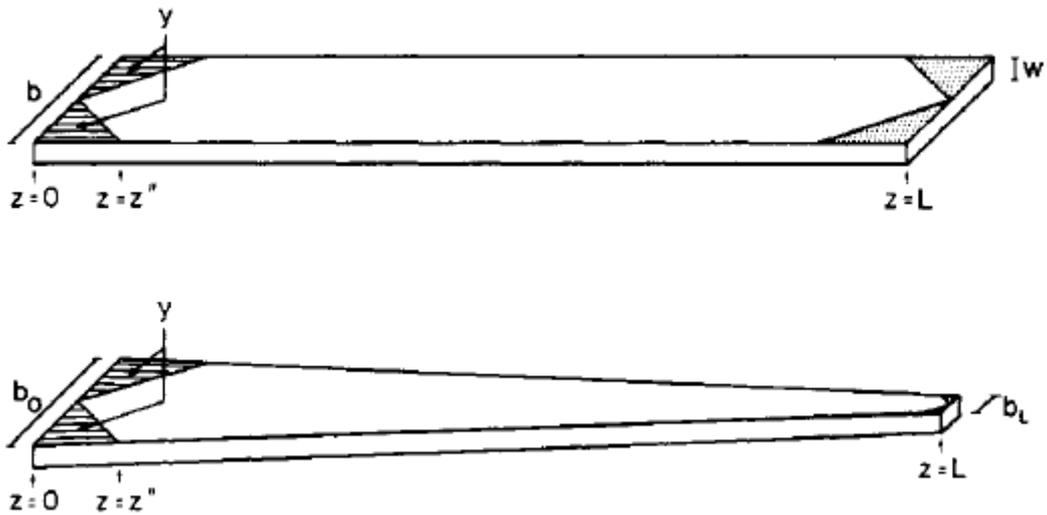


Figure 23: Géométries rectangulaire et trapézoïdale des canaux de FFF asymétrique ((36))

Dans un canal de forme trapézoïdale ((36)), la perte de vitesse est compensée par un étranglement progressif du canal sur sa longueur, limitant ainsi la perte de débit de sortie.

Ainsi, la vitesse longitudinale moyenne en tout point  $z$  donné de la longueur du canal du liquide pousseur correspond à :

$$\langle v_z \rangle = \frac{\dot{V}_{in} - |u_0| A(z)}{w \cdot b(z)} \quad (103)$$

$\langle v_z \rangle$  : Vitesse longitudinale moyenne du liquide en tout point  $z$  donné de la longueur du canal

$\dot{V}_{in}$  : Débit de liquide entrant dans le canal

$w$  : Epaisseur (hauteur) du canal de séparation

$|u_0|$  correspond à la vitesse tangentielle du liquide au contact de la paroi d'accumulation, ce qui correspond à l'équation suivante :

$$|u_0| = \frac{\dot{V}_c \cdot w}{V_0} \quad (104)$$

$V_c$  : Débit de liquide sortant par la sortie tangentielle (« cross-flow » en anglais) du canal

$V_0$  : Volume géométrique du canal (volume mort)

$b(z)$  correspond à la largeur du canal au point  $z$  considéré, et correspond à l'équation suivante :

$$b(z) = b_0 - \frac{z(b_0 - b_L)}{L} \quad (105)$$

$b_0$  : Largeur à l'entrée du canal

$b_L$  : Largeur à la sortie du canal

$L$  : Longueur du canal

$z$  : Longueur allant de l'entrée du canal au point  $z$  considéré

$A(z)$  correspond ainsi à l'aire de la paroi d'accumulation allant du point d'entrée de liquide jusqu'au point  $z$  considéré, et correspond à l'équation suivante :

$$A(z) = \int_0^z b(z) dz = b_0 \cdot z - \frac{z^2(b_0 - b_L)}{2L} \quad (106)$$

Il a été démontré expérimentalement en 1991 par Litzen et al. ((36)), en comparant les gradients de vitesse normalisés obtenues sur des canaux de FFF asymétriques rectangulaires et trapézoïdaux de longueurs identiques soumis à des

ratios de débits identiques (la méthodologie complète a été décrite par Litzen et al. ((36)), Williams ((74)), et Ahn et al. ((73))), qu'un canal asymétrique de forme trapézoïdale permettait de corriger, dans une certaine mesure, la perte de débit observée lors de l'emploi de canaux asymétriques rectangulaires, en maintenant une certaine tenue de vitesse longitudinale, sans pour autant réussir à la maintenir constante (une augmentation de la vitesse longitudinale a même pu être observée sous certaines conditions) ((36), (74)).

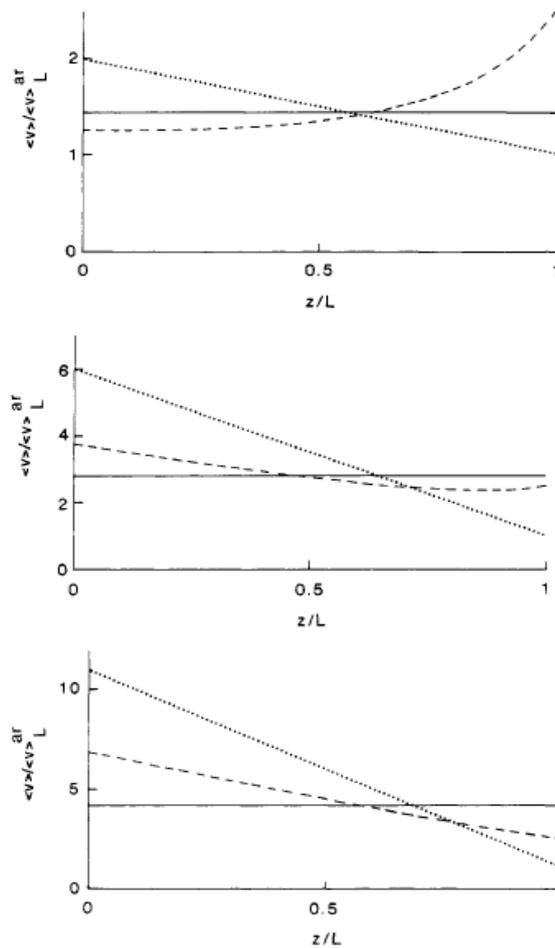


Figure 24: Comparaison des gradients de vitesse sur la longueur dans un canal de FFF symétrique rectangulaire (trait continu), asymétrique rectangulaire (petits points) et asymétrique trapézoïdal (pointillés longs) ((36)).

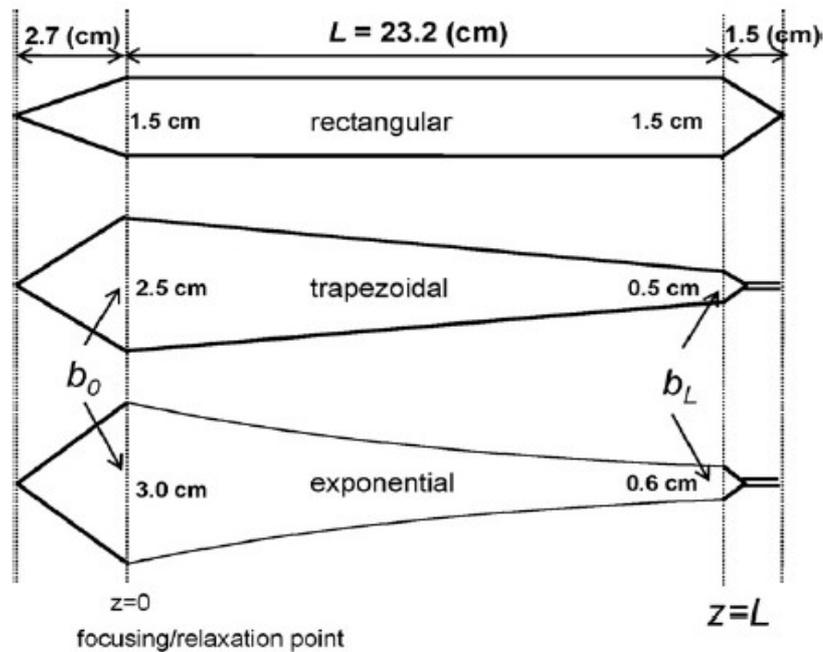


Figure 25: 3 canaux de FFF asymétrique de géométries différentes et de volumes identiques ((73)).

Dès 1997 (bien que l'idée ait été évoquée par Giddings en 1992), l'idée d'utiliser un canal de séparation asymétrique dont la largeur diminue de façon exponentielle sur sa longueur a été théorisée par Williams ((74)). La modélisation des profils de vitesse d'un tel canal a été effectuée par Déjardin ((75), (76)). L'idée a été concrétisée avec succès en 2010 par Ahn et al. ((73)) sur des billes de latex. Toutefois, l'idée n'apporte pas d'amélioration concernant le problème d'élargissement des bandes ((18)), et les canaux asymétriques trapézoïdaux restent les standards actuels en matière de FFF hydrodynamique.

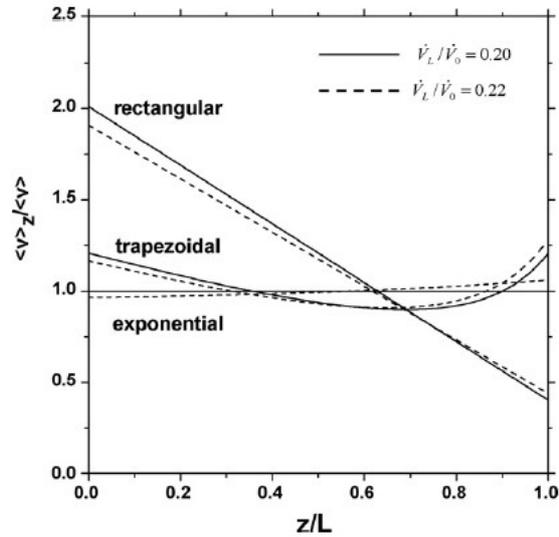


Figure 26: Comparaison des gradients de vitesse sur la longueur dans un canal de FFF symétrique rectangulaire, asymétrique trapézoïdal et asymétrique exponentiel ((73))

#### 1.2.2.4. Détermination des temps de rétention ( $t_r$ ) théoriques

En l'absence de focalisation, le temps de rétention théorique sera ((61)) :

$$t_r = \frac{V_r}{\dot{V}_c} \times \ln \left( 1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \right) = \frac{w}{6D} \times \ln \left( 1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \right) \quad (107)$$

$V_r$  : Volume de rétention

En pratique toutefois, sachant que le mélange d'analytes part depuis le point de focalisation ( $z'$ ), l'équation du temps de rétention théorique sera :

$$t_r = \frac{V_r}{\dot{V}_c} \times \ln \left( 1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \left( 1 - \frac{A(z') - y}{A_{tot}} \right) \right) \quad (108)$$

y : correspond aux aires des parties « retirées » du canal lors de sa conception (aires hachurées sur la figure (23)).

Qui donnera ainsi ((77)) :

$$t_r = \frac{w^2}{6D \left( \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right)} \times \ln \left( 1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \left( 1 - \frac{A(z') - y}{A_{tot}} \right) \right) \quad (109)$$

$$t_r = \frac{w^2}{6D} \times \ln \left( 1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \left( 1 - \frac{A(z') - y}{A_{tot}} \right) \right) \quad \text{si } \lambda \text{ proche de } 0 \quad (110)$$

L'équation du temps de rétention pourra aussi s'écrire ((78), (67)) :

$$t_r = \frac{w^2}{6D} \times \ln \left( \frac{\frac{z'}{L} - \left( \frac{\dot{V}_c + \dot{V}_{out}}{\dot{V}_c} \right)}{\left( 1 - \frac{\dot{V}_c + \dot{V}_{out}}{\dot{V}_c} \right)} \right) \quad (111)$$

### 1.2.2.5. Programmation de champ et de vitesse

A l'instar des autres techniques, des essais de programmation ont été effectués dès 2002 par Moon et al. ((79)). Toutefois, l'emploi d'un canal asymétrique pose quelques problèmes dans le sens où modifier l'une des valeurs de débit ( $\dot{V}_{in}$ ,  $\dot{V}_{out}$ ,  $\dot{V}_c$ ) fait varier les 2 autres. Le temps de volume mort (modifié en fonction du temps de décroissance du champ latéral) peut alors être matérialisé par les expressions suivantes ( $V_0$  correspondant au volume mort du canal) ((79), (80)) :

Si l'on fait varier  $V_{out}$  et  $V_c$ , on aura l'équation suivante :

$$t_0(t) = \frac{V_0}{\dot{V}_c(t)} \ln \left( \frac{\dot{V}_{out}(t) + \dot{V}_c(t)}{\dot{V}_{out}(t)} \right) \quad (112)$$

Si l'on fait varier  $V_{in}$  et  $V_c$ , on aura l'équation suivante :

$$t_0(t) = \frac{V_0}{\dot{V}_c(t)} \ln \left( \frac{\dot{V}_{in}(t)}{\dot{V}_{in}(t) - \dot{V}_c(t)} \right) \quad (113)$$

Ainsi, la vitesse longitudinale moyenne en fonction de la position  $z$  et du temps  $t$  pourra être écrite de 2 façons différentes selon les débits modifiés :

Si l'on fait varier  $V_{out}$  et  $V_c$ , on aura l'équation suivante :

$$\langle v_z \rangle(t) = \frac{\dot{V}_{out}(t) + \dot{V}_c(t) [1 - A(z)/A_{tot}]}{w \cdot b(z)} \quad (114)$$

Si l'on fait varier  $V_{in}$  et  $V_c$ , on aura l'équation suivante :

$$\langle v_z \rangle(t) = \frac{\dot{V}_{in}(t) - \dot{V}_c(t) [V(z)/V_0]}{w \cdot b(z)} \quad (115)$$

Tous les modes de programmation sont utilisables en FFF asymétrique. Toutefois, il n'existe le plus souvent pas de formule simple pour les calculs de temps de rétention et ces derniers requièrent des solutions numériques pour la résolution des intégrales correspondantes :

Si l'on fait varier  $V_{out}$  et  $V_c$ , on aura l'équation suivante :

$$\frac{w^2}{6D} = \int_0^{t_r} \frac{\dot{V}_{out}(t)}{\dot{V}_c(t)} \exp\left(\frac{6Dt}{w^2}\right) dt \quad (116)$$

Si l'on fait varier  $V_{in}$  et  $V_c$ , on aura l'équation suivante :

$$\frac{w^2}{6D} \exp\left(\frac{6Dt_r}{w^2}\right) = \int_0^{t_r} \frac{\dot{V}_{in}(t)}{\dot{V}_c(t)} \exp\left(\frac{6Dt}{w^2}\right) dt \quad (117)$$

La seule exception proposant une formule relativement simple pour le calcul des temps de rétention est la configuration impliquant la modification de  $V_{out}$  et  $V_c$ , en mode de décroissance exponentiel uniquement. L'équation a été développée par Kirkland et al. ((78)) :

$$t_r = \tau + \left( \frac{\tau}{1 + \frac{6D\tau}{w^2}} \right) \ln \left\{ 1 + \left[ \left( \frac{L-z}{L} \cdot \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{out}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{w^2}{6D\tau} \right) \right] + \left[ \frac{w^2}{6D\tau} \left( e^{\frac{-6D\tau}{w^2}} - 1 \right) \right] \right\} \quad (118)$$

### 1.2.3. Le fractionnement par couplage flux-force en fibre creuse

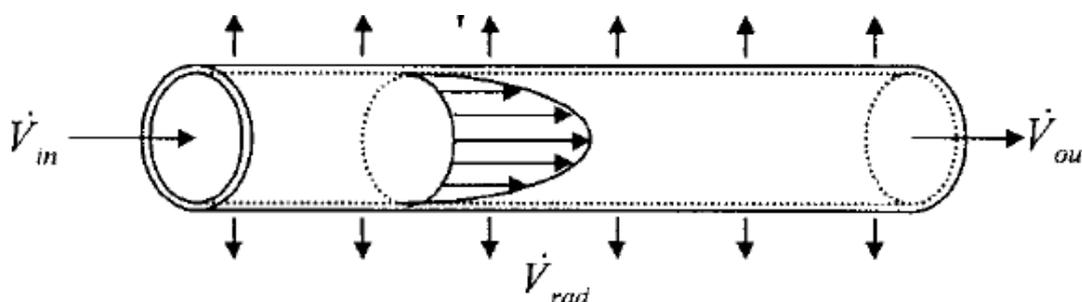


Figure 27: Vue schématique d'une fibre creuse ((81))

La technique de fractionnement par couplage flux-force en fibre creuse a été expérimentée pour la première fois en 1974 par Lee et al. ((82)). L'idée avait pour but de pouvoir concevoir des chambres de séparation moins complexes et peu coûteuses (donc potentiellement à usage unique, à défaut facilement remplaçables) tout en gommant au maximum les inconvénients de la technique asymétrique (les micro-aspérités potentiellement présentes après usinage du canal pouvaient perturber la reproductibilité des pics), le tout en réduisant le volume interne des canaux de séparation.

Les fibres creuses utilisées sont issues de cartouches de filtration. Elles sont en général constituées de céramique (les fibres creuses sont alors obtenues par frittage), ou le plus souvent de polymères tels que la polysulfone ou le polyacrylonitrile.

La fibre est enchâssée dans un morceau de tubulure, percé à un endroit de sa longueur, afin de permettre la sortie tangentielle de liquide.

Etant donné que la section de la fibre est circulaire, le champ tangentiel (ou latéral, « cross-flow » en anglais) est souvent appelé « champ radial » (en référence au rayon de la fibre). En pratique, cela ne fait toutefois pas de différence.

Cette technique fonctionne sur un mode asymétrique, ce qui signifie que le champ radial est généré par la sortie latérale de liquide de la fibre creuse. Toutefois, la perte de vitesse longitudinale engendrée par la perte de liquide ne peut pas être ici compensée par une modification des dimensions du canal de séparation, ce qui signifie qu'il s'agit en réalité d'une technique dérivée de la FFF asymétrique en canal rectangulaire.

### 1.2.3.1. Théories

Les théories sur la rétention en fibre creuse ont été développées par Lee et al. ((81)) ainsi que Jönsson et al. ((56)).

La chambre de séparation (avec à l'intérieur la fibre creuse, notée HF) peut être schématisée de cette façon :

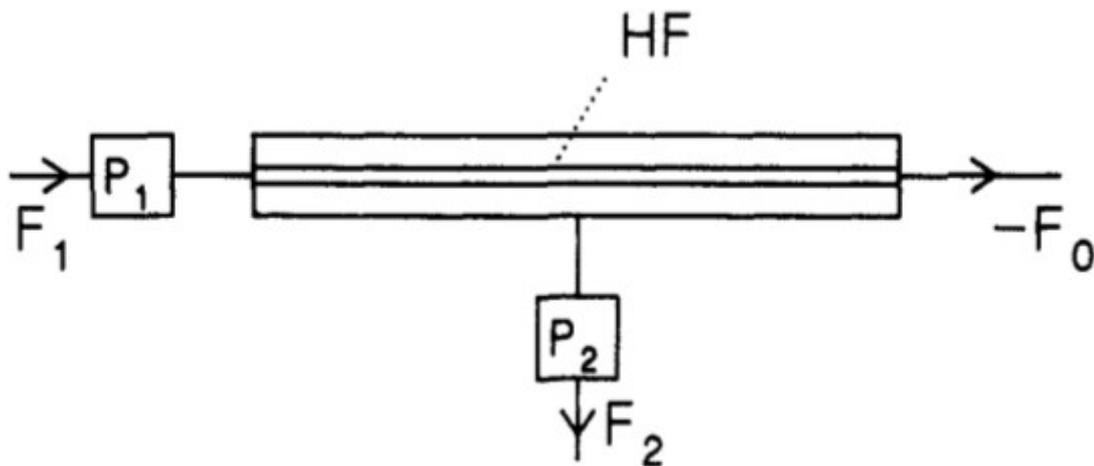


Figure 28: Vue schématisée des débits mis en œuvre à l'intérieur d'une fibre creuse ((56))

$F_1$  ( $V_{in}$ ) correspond au débit de liquide porteur sortant de la pompe  $P_1$ .  $F_2$  ( $V_{rad}$ ) correspond au débit de liquide sortant par la sortie radiale de la chambre de séparation. Dans le cas présent, sa valeur est fixée par une pompe notée  $P_2$  (bien qu'elle puisse être réglée par le biais d'une valve).  $F_0$  ( $V_{out}$ ) correspond au débit de liquide sortant par la sortie axiale de la chambre.

Ainsi :

$$\dot{V}_{in} = \dot{V}_{out} + \dot{V}_{rad} \quad (119)$$

Dans ce système cylindrique, L correspond à la longueur utile de la fibre, R correspond au rayon de la fibre, la coordonnée z correspond à un point donné de la longueur de la fibre, la coordonnée r correspond à un point donné du rayon de la fibre.

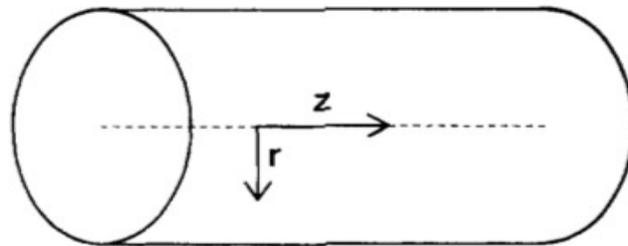


Figure 29: Référentiel de coordonnées mis en œuvre en FFF en fibre creuse ((56))

### 1.2.3.2. Profils de vitesse à l'intérieur de la fibre creuse

D'après Kozinski et al.((83), (56)), en raison de la chute de pression occasionnée par la sortie radiale de liquide, la vitesse longitudinale moyenne du liquide chutera progressivement tout au long de la fibre. Par conséquent, sa valeur en un certain point z de la longueur de la fibre correspond à:

$$\langle v_z \rangle = \langle v_0 \rangle - \frac{2u_r(R_f, 0)}{R_f \alpha} \times (1 - e^{-\alpha z}) \quad (120)$$

$\langle v_z \rangle$  : Vitesse longitudinale moyenne du liquide en un point z déterminé de la longueur de la fibre

$\langle v_0 \rangle$  : Vitesse longitudinale moyenne du liquide en début de fibre (où z=0)

$u_r(R_f,0)$  : Vitesse radiale (au contact de la membrane) du liquide en début de fibre

$R_f$  : Rayon de la fibre

avec la valeur  $\alpha$  correspondant à :

$$\alpha = \left( \frac{\eta\beta}{R_f^3} \right)^{1/2} \quad (121)$$

$\eta$  : Viscosité du liquide

$\beta$  : Perméabilité de la fibre (correspond au débit de liquide obtenu à travers une surface de 1 cm<sup>2</sup> à une différence de pression équivalente à 1-atm)

$R_f$  : Rayon de la fibre

La vitesse radiale au contact de la membrane décroît également avec  $z$  :

$$u_r(R_f, z) = u_r(R_f, 0) e^{-\alpha z} \quad (122)$$

De fait, le profil de vitesses associé à la vitesse radiale correspond à :

$$u_r(r, z) = u_r(R_f, z) \left( 2 \frac{r}{R_f} - \left( \frac{r}{R_f} \right)^3 \right) \quad (123)$$

$r$  : correspond à toute coordonnée située sur le rayon de la fibre (de 0 à  $R_f$ )

En considérant que la circulation du liquide à travers suit un profil parabolique, la vitesse longitudinale en tout point de coordonnées  $(r, z)$  de la fibre correspondra à :

$$v_z(r, z) = v_z(0, z) \left( 1 - \left( \frac{r}{R_f} \right)^2 \right) \quad (124)$$

La vitesse longitudinale moyenne en fonction de  $z$  correspond, selon Giddings et al. ((56)) à :

$$\langle v_z \rangle = \frac{1}{2} \times v_z(0, z) \quad (125)$$

Il est possible de calculer certains paramètres grâce aux débits mis en jeu ( $\dot{V}_{in}$ ,  $\dot{V}_{out}$ ,  $\dot{V}_{rad}$ ) :

$$\dot{V}_{in} = \langle v_0 \rangle \times \pi \cdot R_f^2 \quad \Leftrightarrow \quad \langle v_0 \rangle = \frac{\dot{V}_{in}}{\pi \cdot R_f^2} \quad (126)$$

$$\begin{aligned} \dot{V}_{rad} &= 2\pi \int_0^L u_r(R_f, z) dz = 2\pi \int_0^L u_r(R_f, 0) e^{-\alpha z} dz \\ &= \frac{2\pi R_f \cdot u_r(R_f, 0)}{(\alpha)} \times (1 - e^{-\alpha L}) \\ \Rightarrow u_r(R_f, 0) &= \frac{\dot{V}_{rad} \times \alpha}{2\pi R_f \times (1 - e^{-\alpha L})} \end{aligned} \quad (127)$$

Au final, en modifiant l'équation (120), on obtient :

$$\begin{aligned}
 \langle v_z \rangle &= \frac{\dot{V}_{in}}{\pi \cdot R_f^2} - \frac{2}{R_f \alpha} \times \left( \frac{\dot{V}_{rad} \times \alpha}{2 \pi R_f \times (1 - e^{-\alpha L})} \right) \times (1 - e^{-\alpha z}) \\
 &= \frac{\dot{V}_{in}}{\pi \cdot R_f^2} - \frac{\dot{V}_{rad}}{\pi \cdot R_f^2} \times \left( \frac{1 - e^{-\alpha z}}{1 - e^{-\alpha L}} \right) \\
 \Rightarrow \langle v_z \rangle &= \frac{\dot{V}_{in} - \dot{V}_{rad} \times (z/L)}{\pi \cdot R_f^2}
 \end{aligned} \tag{128}$$

### 1.2.3.3. Plateaux théoriques et temps de rétention

Le nombre de plateaux théoriques est obtenu par une approche différente de la théorie du non-équilibre chère aux techniques de FFF et de chromatographie. L'approche utilisée ici est basée sur la théorie de la dispersion généralisée de Taylor (« general Taylor dispersion theory ») et dépend du nombre de Péclet longitudinal de la membrane ((84), (56), (85)). Ce dernier est défini (dans les techniques de FFF en fibre creuse) par l'équation suivante :

$$Pe = \frac{u_r(R_f, z) \cdot R_f}{D} \tag{129}$$

$u_r(R_f, z)$  : Vitesse radiale (au contact de la membrane) du liquide en un point « z » donné de la fibre

$R_f$  : Rayon de la fibre

$D$  : Coefficient de diffusion de l'analyte concerné

Le nombre de plateaux théoriques pour une fibre idéale est obtenu après résolution de l'équation suivante ((56)) :

$$N = t_r \cdot \frac{D \cdot Pe^2}{4 R^2} \cdot \frac{\left(1 - \frac{4}{Pe} + \frac{72}{Pe^2} - \dots\right)}{\left(1 - \frac{24}{Pe} + \dots\right)} \quad (130)$$

Pour des valeurs de Pe suffisantes (supérieures ou égales à 50 ((56))), le nombre de plateaux théoriques est approché par l'équation suivante :

$$N = \frac{\bar{u}_r^2}{4 D} \cdot t_r \quad (131)$$

En réalité, la théorie de la dispersion généralisée est applicable à toutes les techniques de FFF. Elle a été appliquée aux techniques en champ acoustique ((86)), et électrique ((87)). Une approche basée sur cette théorie a été mise en œuvre par Subramanian et al. ((88)) pour les techniques en flux hydrodynamique. Les résultats obtenus par cette théorie complexe sont voisins de ceux obtenus par l'approche chromatographique de Giddings.

#### 1.2.3.4. Focalisation/Relaxation

Le processus employé actuellement est inspiré du processus de focalisation de la technique asymétrique ((67)). En faisant varier le débit longitudinal d'entrée de chambre de séparation et le débit longitudinal entrant par la sortie de la chambre de séparation, il est possible de moduler la position de la chambre où l'échantillon s'accumulera. Cette position est notée  $\zeta$  (zéta) ((56)).

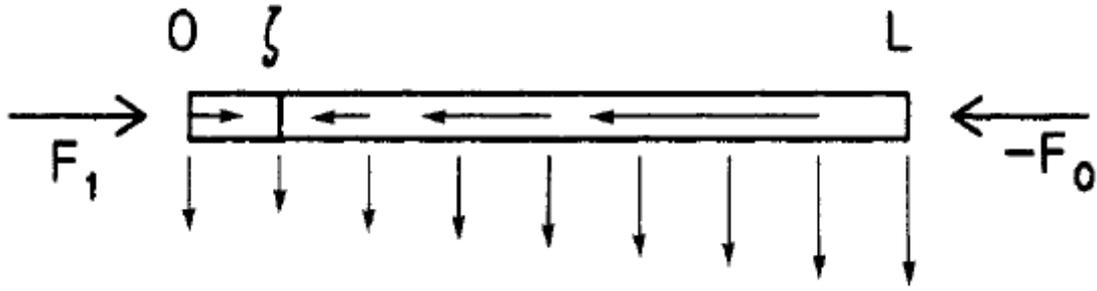


Figure 30: Schéma du processus de focalisation à l'intérieur d'une fibre creuse ((56))

A la position zéta, la vitesse longitudinale moyenne du liquide porteur ( $\langle u_z \rangle$ ) est nulle ((56)). On obtient donc :

$$\begin{aligned} \langle v_\zeta \rangle = 0 &\Leftrightarrow 0 = \langle v_0 \rangle - \frac{2u_r(R_f, 0)}{R_f \alpha} \times (1 - e^{-\alpha \zeta}) \\ &\Leftrightarrow \langle v_0 \rangle = \frac{2u_r(R_f, 0)}{R_f \alpha} \times (1 - e^{-\alpha \zeta}) \end{aligned} \quad (132)$$

En position de focalisation, du liquide porteur entre par la sortie longitudinale du canal de séparation. Celui-ci dispose d'une vitesse longitudinale propre, notée «  $\langle v_L \rangle$  » (le symbole négatif est utilisé en raison du sens de circulation inversé)

$$\begin{aligned} \langle v_\zeta \rangle = 0 &\Leftrightarrow 0 = -\langle v_L \rangle - \frac{2u_r(R_f, L)}{R_f \alpha} \times (1 - e^{-\alpha(L-\zeta)}) \\ &\Leftrightarrow -\langle v_L \rangle = \frac{2u_r(R_f, L)}{R_f \alpha} \times (1 - e^{-\alpha(L-\zeta)}) \end{aligned} \quad (133)$$

La vitesse radiale au niveau de la membrane au point  $\zeta$  ( $u_r(R_f, \zeta)$ ) correspond ainsi à ((56)) :

$$u_r(R_f, \xi) = u_r(R_f, 0)e^{-\alpha\xi} = u_r(R_f, L)e^{-\alpha(L-\xi)} \quad (134)$$

On définit  $\rho$  comme étant le ratio entre le débit de liquide entrant par l'entrée longitudinale de la fibre ( $V_{in}$ , noté  $F_1$  dans les figures (28) et (30)) et le débit de liquide entrant par la sortie longitudinale de la fibre ( $F_0$ , ou plutôt  $-F_0$  en raison du sens inversé)

$$\rho = \frac{F_1}{-F_0} = \frac{\langle v_0 \rangle}{-\langle v_L \rangle} = \frac{\frac{2u_r(R_f, 0)}{R_f \alpha} \times (1 - e^{-\alpha\xi})}{\frac{2u_r(R_f, L)}{R_f \alpha} \times (1 - e^{-\alpha(L-\xi)})} = \frac{u_r(R_f, 0) \times (1 - e^{-\alpha\xi})}{u_r(R_f, L) \times (1 - e^{-\alpha(L-\xi)})} \quad (135)$$

$$\Rightarrow \rho = \frac{u_r(R_f, 0) \times (1 - e^{-\alpha\xi})}{\left( \frac{u_r(R_f, 0) \times e^{-\alpha\xi}}{e^{-\alpha(L-\xi)}} \right) \times (1 - e^{-\alpha(L-\xi)})} = \frac{(1 - e^{-\alpha\xi}) \times e^{-\alpha(L-\xi)}}{(1 - e^{-\alpha(L-\xi)}) \times e^{-\alpha\xi}} \quad (136)$$

Ainsi, en simplifiant l'expression, la position du point de focalisation sur la longueur de la fibre correspondra à ((56)) :

$$\xi = \frac{L \times \rho}{1 + \rho + L \alpha (1 - \rho)^2} \quad (137)$$

A partir de là, il est possible d'adapter le réglage du débit radial ( $V_{rad}$ , noté  $F_2$  dans la figure (28)) en vu d'obtenir les conditions de relaxation nécessaires ((56)) :

$$F_2 = u_r(R_f, \zeta) \cdot 2\pi R_f \cdot \left[ L + \frac{\alpha}{2} \cdot (\zeta^2 - (L - \zeta)^2) \right] \quad (138)$$

Et par conséquent de connaître le réglage du débit d'entrée ( $V_{in}$ , noté  $F_1$ ) à appliquer ((56)) :

$$F_1 = F_2 \cdot \left( \frac{\rho}{1 + \rho} \right) \quad (139)$$

Toutefois, le calcul de ces paramètres nécessite de connaître la valeur de  $\alpha$ , dont le calcul (équation (121)) nécessite de connaître la perméabilité de la fibre, ce qui est loin d'être une évidence. Une piste pour y arriver a été proposée par Griffiths et al. ((89)).

### 1.2.3.5. Temps de focalisation nécessaire

Selon Jönsson et al. ((56)), le temps de focalisation nécessaire correspond au temps nécessaire au champ radial pour transporter une particule depuis le centre de la lumière de la fibre ( $r=0$ ) jusque à la paroi interne de la fibre creuse ( $r=R_f$ )

Ce temps (noté  $t_{rel}$ ) est obtenu après intégration de l'expression suivante. Toutefois, la vitesse radiale au centre de la fibre ( $u_r(0,z)$ ) est nulle, ce qui rend l'intégration théoriquement impossible. Aussi, Jönsson et al. ont contourné le problème en utilisant une valeur proche de zéro, à savoir  $r_0$  (arbitrairement fixée à  $R_f \cdot 10^{-4}$ ).

$$t_{rel} = \int_{r_0}^{R_f} \left( \frac{dr}{u_r(r, z)} \right) = \frac{-R_f}{4u_r(r, z)} \times \ln \left( \frac{(r_0/R_f)^2}{2 - (r_0/R_f)^2} \right) \quad (140)$$

Le résultat obtenu pour  $r_0 = R_f \cdot 10^{-4}$  correspond à :

$$t_{rel} = 5 \times \left( \frac{R_f}{u_r(r, z)} \right) \quad (141)$$

En remplaçant  $u_r(r, z)$  par les équations (117) et (126), on obtient :

$$t_{rel} = 5 \times \left( \frac{R_f}{u_r(r, z)} \right) = 5 \times \left( \frac{R_f \times (2 \pi R_f \cdot (1 - e^{-\alpha L}))}{\dot{V}_{rad} \cdot \alpha \cdot e^{-\alpha z}} \right) = 10 \times \left( \frac{V_0 (1 - e^{-\alpha L})}{\dot{V}_{rad} \cdot \alpha \cdot e^{-\alpha z}} \right) \quad (142)$$

### 1.2.3.6. Détermination du temps de volume mort ( $t_0$ ) et du volume mort de la fibre

Le temps de circulation d'un soluté non retenu à travers la longueur de la fibre (temps de volume mort) est calculé de cette façon ((81)) :

$$t_0 = \frac{V_0}{\dot{V}_{rad}} \times \ln \left( \frac{\dot{V}_{in}}{\dot{V}_{out}} \right) = \frac{V_0}{\dot{V}_{rad}} \times \ln \left( \frac{\dot{V}_{in}}{\dot{V}_{in} - \dot{V}_{rad}} \right) \quad (143)$$

Toutefois, les fibres creuses constituées de polymères (la polysulfone étant l'un des pires exemples ((81), (90))) prennent du volume une fois humides, ce qui complique drastiquement le calcul de  $R_f$ , de  $L$ , et par conséquent du volume mort  $V_0$  de la fibre.

Une méthode permettant d'estimer le volume mort est d'injecter un soluté non retenu à travers la fibre creuse. Cette méthode, déjà expérimentée en FFF

asymétrique ((67), (91)) est toutefois déconseillée ((18)) car très imprécise et non validée.

### 1.2.3.6.1. Temps de rétention théorique

Le temps de rétention d'un analyte à l'intérieur d'une fibre creuse (dans le mode brownien) correspond à l'équation suivante ((92), (85)) :

$$t_r = \frac{R_f^2}{8D} \times \ln\left(\frac{\dot{V}_{in}}{\dot{V}_{out}}\right) = \frac{R_f^2}{8D} \times \ln\left(\frac{\langle v_0 \rangle}{\langle v_L \rangle}\right) \quad (144)$$

Toutefois, sachant que le soluté n'est en général pas élué depuis le début de la fibre, mais plutôt depuis le point de focalisation, on obtiendra l'équation suivante ((93), (90)) :

$$t_r = \frac{R_f^2}{8D} \times \ln\left(\frac{\langle v_\xi \rangle}{\langle v_L \rangle}\right) = \frac{R_f^2}{8D} \times \ln\left(\frac{\dot{V}_{in} - (\xi/L) \cdot \dot{V}_{rad}}{\dot{V}_{out}}\right) \quad (145)$$

La démonstration de ces formules a été effectuée par Jönsson et al. ((56))

### 1.2.3.6.2. Programmation de champ radial et de vitesse

Des essais de séparation en fibre creuse avec décroissance programmée du champ radial ont été effectués dès 1989 avec une décroissance linéaire par Carlshaf et al. ((94)). D'autres essais notables ont eu lieu dès 2005 en fibre creuse de céramique, avec cette fois-ci une décroissance exponentielle du champ, par Kok et al. ((52)).

## 2. Problèmes pratiques liés à l'application des techniques de FFF hydrodynamique

Les techniques de fractionnement par couplage flux-force en flux hydrodynamique s'appliquent aux espèces de dimensions allant du nanomètre au micromètre dispersées en milieu liquide, ce qui correspond à la définition d'un colloïde. Par conséquent, dans cette partie, nous aborderons la définition des colloïdes, le comportement des colloïdes en milieu liquide, ainsi que la nature des interactions mises en jeu.

### 2.1. Définition d'un colloïde

Au sens strict du terme, un colloïde est un système dans lequel des molécules ou des particules polymoléculaires dispersées dans un milieu ont dans au moins une direction une dimension comprise entre 1 nm et 1  $\mu\text{m}$ , ou que des discontinuités de ce système sont retrouvées à des distances de cet ordre ((95)). Il peut arriver que le terme de « colloïde » désigne abusivement la substance dispersée.

A ce titre, plusieurs systèmes considérés comme colloïdaux existent, selon la nature de l'élément dispersé, et celle du milieu de dispersion ((96)) :

Medium	Dispersed particles	Common name of the system
Gaseous	Liquid	Fog, mist, aerosol
Gaseous	Solid	Dust, fume, aerosol
Liquid	Gaseous	Gas dispersions, foams
Liquid	Liquid	Emulsions
Liquid	Solid	Sols, colloidal solutions
Solid	Liquid	Solid emulsions, some gels
Solid	Solid	Alloys, glasses

Tableau 1: Aperçu des différents types de colloïdes ((96))

Dans le cadre des techniques de fractionnement par couplage flux-force, seuls les systèmes « liquide-solide » (le milieu de dispersion étant un liquide et les particules dispersées étant solides, s'entend) (ou « sols ») seront considérés.

Cette configuration englobe un large panel de préparations pharmaceutiques, alimentaires, industrielles, de matrices biologiques, et d'équilibres chimiques naturels.

## **2.2. Les interactions mises en jeu dans les hydrocolloïdes**

### **2.2.1. Les forces de Van der Waals**

Les forces de Van der Waals sont une famille d'interactions (nommée à partir du chimiste hollandais du même nom) regroupant l'ensemble des forces attractives ou répulsives entre plusieurs entités moléculaires différentes, ou au sein d'une seule entité moléculaire, autres que celles liées aux liaisons covalentes, aux doublets non-liants, aux liaisons hydrogène, ou celles liées aux interactions électrostatiques des ions ou des groupements ionisés entre eux ou avec des molécules neutres ((95)).

On distingue les interactions suivantes :

#### **2.2.1.1. Forces de Keesom**

Ces forces proviennent de l'attraction entre dipôles permanents. Des molécules de cette nature, lorsqu'elles sont sujettes au mouvement brownien, s'orientent spontanément (selon les lois de la thermodynamique) afin de permettre l'attraction, en conséquence, ces forces sont considérées comme attractives. L'équation permettant le calcul de l'énergie mise en jeu lors de l'interaction entre deux dipôles permanents est la suivante ((97), (98), (99)) :

$$V_{Keesom} = -\frac{C_{Keesom}}{r^6} \quad C_{Keesom} = \frac{2 \cdot \mu_1^2 \cdot \mu_2^2}{3(4\pi\epsilon_0)^2 \cdot k_B \cdot T}$$

$$\Leftrightarrow V_{Keesom} = -\frac{2 \cdot \mu_1^2 \cdot \mu_2^2}{3(4\pi\epsilon_0)^2 \cdot k_B \cdot T \cdot r^6} \quad (146)$$

$\mu_1$  : Moment dipolaire du premier dipôle permanent (en Coulombs.mètres (C.m))

$\mu_2$  : Moment dipolaire du second dipôle permanent (en Coulombs.mètres (C.m))

$\pi$  : Pi (3,1415...)

$\epsilon_0$  : Permittivité du vide ( $8,854\ 187\ 817... \times 10^{-12}$  F/m)

$k_B$  : Constante de Boltzmann ( $1,3806488(13) \times 10^{-23}$  J/K)

T : Température (en degrés Kelvin)

r : Distance entre les dipôles permanents concernés (m)

Cette valeur est toutefois valable dans le vide. Si les interactions entre dipôles permanents ont lieu dans un milieu homogène (un liquide, par exemple, dans le cas des suspensions colloïdales), la permittivité relative du milieu (notée «  $\epsilon_r$  », sans unité) est à prendre en compte. On obtient ainsi l'équation suivante ((99)) :

$$V_{Keesom} = -\frac{2 \cdot \mu_1^2 \cdot \mu_2^2}{3(4\pi\epsilon_0\epsilon_r)^2 \cdot k_B \cdot T \cdot r^6} \quad (147)$$

### 2.2.1.2. Forces de Debye

Ces forces proviennent des interactions entre dipôle permanent et dipôle induit (molécule initialement neutre polarisée par la proximité d'un dipôle permanent).

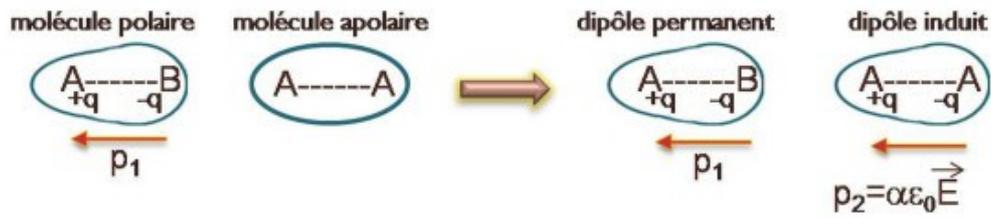


Figure 31: Forces de Debye ((100))

L'équation permettant le calcul de l'énergie mise en jeu lors de l'interaction entre un dipôle permanent et un dipôle induit est la suivante ((97), (98), (99)) :

$$V_{Debye} = -\frac{C_{Debye}}{r^6} \quad C_{Debye} = \frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2}{(4\pi\epsilon_0)^2} \quad \Leftrightarrow \quad V_{Debye} = -\frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2}{(4\pi\epsilon_0)^2 \cdot r^6} \quad (148)$$

Il existe une variante de cette équation dans laquelle la molécule neutre est remplacée par une molécule polaire ou une molécule neutre dont le cortège électronique a spontanément formé un dipôle induit transitoire (donc possédant un moment dipolaire noté  $\mu_2$ ) pouvant modifier elle même la polarité du dipôle permanent (celui-ci est ainsi polarisable et possède sa propre polarisabilité  $\alpha_1$ )

$$C_{Debye} = \frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2 + \mu_2^2 \cdot \alpha_1}{(4\pi\epsilon_0)^2} \quad \Leftrightarrow \quad V_{Debye} = -\frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2 + \mu_2^2 \cdot \alpha_1}{(4\pi\epsilon_0)^2 \cdot r^6} \quad (149)$$

$\mu_1$  : Moment dipolaire du dipôle permanent (en Coulombs.mètres (C.m))

$\mu_2$  : Moment dipolaire de la molécule neutre/polaire (en Coulombs.mètres (C.m))

$\alpha_1$  : Polarisabilité du dipôle permanent (C.m<sup>2</sup>.V<sup>-1</sup>)

$\alpha_2$  : Polarisabilité de la molécule neutre/polaire (C.m<sup>2</sup>.V<sup>-1</sup>)

$\pi$  : Pi (3,1415...)

$\epsilon_0$  : Permittivité du vide ( $8,854\ 187\ 817... \times 10^{-12}$  F/m)

$r$  : Distance entre les dipôles permanents concernés (m)

Cette valeur est toutefois valable dans le vide. Si les interactions entre dipôle permanent et dipôle induit ont lieu dans un milieu homogène (un liquide, par exemple, dans le cas des suspensions colloïdales), la permittivité relative du milieu (notée «  $\epsilon_r$  », sans unité) est à prendre en compte. On obtient ainsi l'équation suivante ((99)) :

$$C_{Debye} = \frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2 + \mu_2^2 \cdot \alpha_1}{(4\pi \epsilon_0)^2} \Leftrightarrow V_{Debye} = -\frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2 + \mu_2^2 \cdot \alpha_1}{(4\pi \epsilon_0 \epsilon_r)^2 \cdot r^6} \quad (150)$$

### 2.2.1.3. Forces de London

Ces forces proviennent des interactions entre deux dipôles induits. Toute molécule possède un cortège électronique. Les fluctuations de ce cortège électronique à une fréquence élevée entraînent l'apparition d'un moment dipolaire transitoire, dont la direction change continuellement en fonction de cette fréquence d'oscillation, entraînant la polarisation d'une molécule voisine. En conséquence, ces forces ont une origine quantique ((99)), contrairement aux deux autres forces citées précédemment.

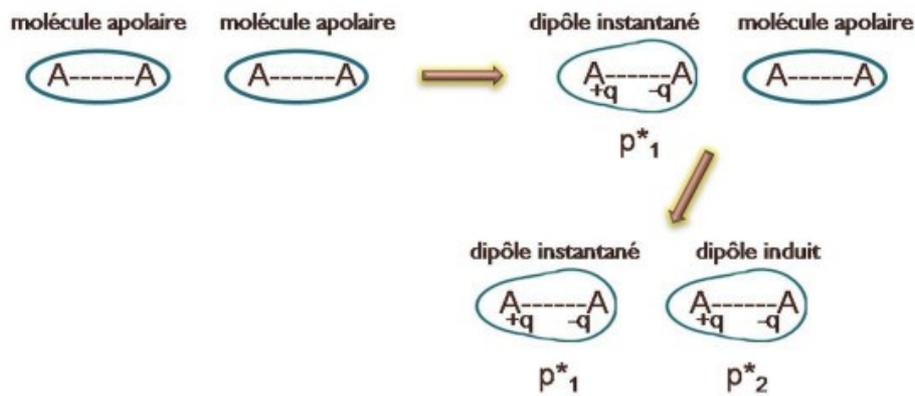


Figure 32: Forces de London ((101))

L'équation permettant le calcul de l'énergie mise en jeu lors de l'interaction entre deux dipôles induits dans le vide est la suivante ((99)) :

$$C_{London} = -\frac{3h}{2} \times \frac{\nu_1 \cdot \nu_2}{\nu_1 + \nu_2} \times \frac{\alpha_1 \cdot \alpha_2}{(4\pi\epsilon_0)^2} \quad (151)$$

$$\Leftrightarrow V_{London} = -\frac{3h}{2} \times \frac{\nu_1 \cdot \nu_2}{\nu_1 + \nu_2} \times \frac{\alpha_1 \cdot \alpha_2}{(4\pi\epsilon_0)^2 \cdot r^6}$$

$h$  : Constante de Planck

$\nu_1$  : Fréquence de vibration du cortège électronique du dipôle induit 1 (en  $s^{-1}$ )

$\nu_2$  : Fréquence de vibration du cortège électronique du dipôle induit 2 (en  $s^{-1}$ )

La prise en compte du milieu de dispersion ne se fait pas par le biais de la constante diélectrique du milieu (contrairement aux forces de Keesom et de Debye) et se fera par le biais de la formule de MacLahlan ((99)) :

$$V_{London} = -\frac{3h}{4\pi} \times \frac{\omega_1 \cdot \omega_2}{(\omega_1 + \omega_2)} \times \frac{\alpha_1(0) \cdot \alpha_2(0)}{(4\pi\epsilon_0)^2 \cdot r^6} \quad (152)$$

$\alpha_1(0)$  : Polarisabilité dans le vide du dipôle induit 1 (C.m<sup>2</sup>.V<sup>-1</sup>)

$\alpha_2(0)$  : Polarisabilité dans le vide du dipôle induit 2 (C.m<sup>2</sup>.V<sup>-1</sup>)

$\omega_1$  : Fréquence angulaire de vibration du cortège électronique du dipôle induit 1 (s<sup>-1</sup>)

$\omega_2$  : Fréquence angulaire de vibration du cortège électronique du dipôle induit 2 (s<sup>-1</sup>)

où la fréquence angulaire correspond à :

$$\omega = 2\pi\nu \quad (153)$$

#### 2.2.1.4. Bilan des interactions de Van der Waals

Les forces de Keesom, Debye et London sont additives. Toutefois, dans le cas de la dispersion d'objets macroscopiques dans un milieu (de dimensions allant du nanomètre jusqu'au visible, comme dans le cas des suspensions colloïdales), il est nécessaire d'intégrer l'équation avec les volumes des objets concernés dans les interactions, et par conséquent de prendre en compte leurs formes. Dans tous les cas, l'intégration de ces interactions introduit une nouvelle valeur appelée la constante d'Hamaker.

La constante d'Hamaker correspondant à l'interaction entre 2 entités notées « i » et « j » (par exemple, une particule et son milieu environnant) correspond à l'équation suivante ((102)) :

$$A_{ij} = \pi^2 \times C \times \rho_i \times \rho_j \quad (154)$$

C : Paramètre C ( $C_{\text{Keesom}} + C_{\text{Debye}} + C_{\text{London}}$ )

$\rho_i$  : Nombre d'atomes par unité de volume pour l'entité i

$\rho_j$  : Nombre d'atomes par unité de volume pour l'entité j

La constante d'Hamaker peut être notée «  $A_{ij}$  » ou «  $A_{ijk}$  » selon le nombre et le type d'entités (particules, solvant, paroi...) concernées. En FFF, il sera courant de retrouver dans la littérature les combinaisons «  $A_{12}$  », «  $A_{123}$  », «  $A_{11}$  », «  $A_{121}$  »..., les indices correspondant généralement à :

1 : Le constituant de la particule

2 : Le milieu (solvant, tampon...)

3 : La paroi d'accumulation, ou, selon le contexte, le constituant d'une autre particule

Il existe autant de constantes d'Hamaker qu'il existe de combinaisons. D'ailleurs, au sens strict du terme, la « constante » d'Hamaker n'est même pas constante : sa valeur réelle varie en fonction d'effets de retard (liés aux interactions de London ((99), (13)) eux-mêmes liés à la distance entre les entités (notamment, entre 2 particules ou entre une particule et la paroi d'accumulation). Ainsi, la constante d'Hamaker décroît en fonction de la distance et des variations significatives de cette constante s'observent sur des variations de distance de l'ordre du nanomètre ((13)). Plus d'informations sont disponibles dans la littérature ((103)).

Plusieurs approximations de l'énergie potentielle de Van der Waals existent selon les différentes combinaisons concernées. Dans le cadre de la FFF, seules les interactions particule-particule et particule-surface sont à considérer.

Ainsi, l'énergie potentielle (ou énergie libre) de Van der Waals entre 2 particules (considérées ici comme sphériques) de rayons différents correspond à l'équation suivante ((97)) :

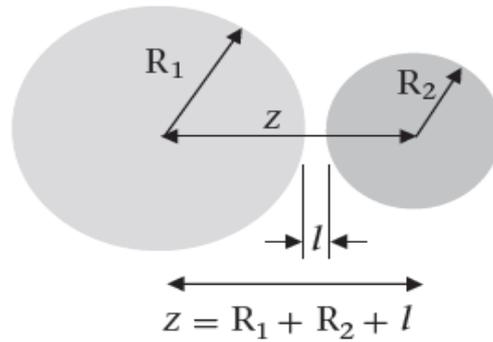


Figure 33: Schéma des forces de Van der Waals s'exerçant sur 2 particules sphériques de rayons différents ((97))

$$\begin{aligned}
 W_{vdW.p-p} &= -\frac{A_{Hamaker}}{3} \times \left[ \frac{R_1 \cdot R_2}{z^2 - (R_1 + R_2)^2} + \frac{R_1 \cdot R_2}{z^2 - (R_1 - R_2)^2} + \frac{1}{2} \cdot \ln \left( \frac{z^2 - (R_1 + R_2)^2}{z^2 - (R_1 - R_2)^2} \right) \right] \\
 \Rightarrow W_{vdW.p-p} &= -\frac{A_{Hamaker}}{6} \times \left[ \frac{2 \cdot R_1 \cdot R_2}{z^2 - (R_1 + R_2)^2} + \frac{2 \cdot R_1 \cdot R_2}{z^2 - (R_1 - R_2)^2} + \ln \left( \frac{z^2 - (R_1 + R_2)^2}{z^2 - (R_1 - R_2)^2} \right) \right]
 \end{aligned} \tag{155}$$

L'énergie potentielle (ou énergie libre) de Van der Waals entre 2 particules (considérées ici comme sphériques) de rayons identiques correspond à l'équation suivante ((97), (104), (13)) :

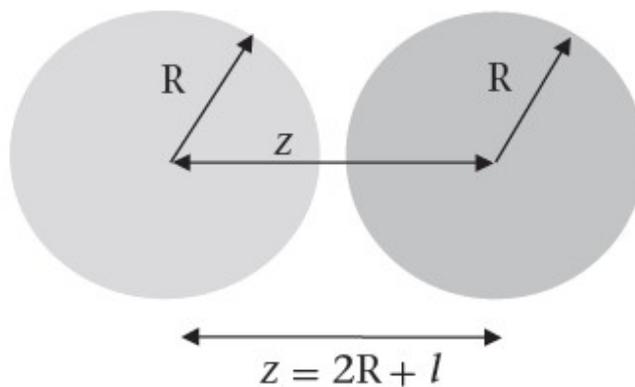


Figure 34: Schéma des interactions de Van der Waals sur des particules sphériques de rayons identiques ((97))

$$\begin{aligned}
W_{vdW.p-p} &= -\frac{A_{Hamaker}}{3} \times \left[ \frac{R^2}{z^2 - (2R)^2} + \frac{R^2}{z^2} + \frac{1}{2} \cdot \ln \left( \frac{z^2 - (2R)^2}{z^2} \right) \right] \\
\Rightarrow W_{vdW.p-p} &= -\frac{A_{Hamaker}}{6} \times \left[ \frac{2 \cdot R^2}{z^2 - 4R^2} + \frac{2 \cdot R^2}{z^2} + \ln \left( \frac{z^2 - 4R^2}{z^2} \right) \right] \\
\Rightarrow W_{vdW.p-p} &= -\frac{A_{Hamaker}}{6} \times \left[ \frac{2 \cdot R^2}{(2R+l)^2 - 4R^2} + \frac{2 \cdot R^2}{(2R+l)^2} + \ln \left( \frac{(2R+l)^2 - 4R^2}{(2R+l)^2} \right) \right] \\
\Rightarrow W_{vdW.p-p} &= -\frac{A_{Hamaker}}{6} \times \left[ \frac{2 \cdot R^2}{(4R^2 + l^2 + 4Rl) - 4R^2} + \frac{2 \cdot R^2}{(2R+l)^2} + \ln \left( \frac{(4R^2 + l^2 + 4Rl) - 4R^2}{(2R+l)^2} \right) \right] \\
\Rightarrow W_{vdW.p-p} &= -\frac{A_{Hamaker}}{6} \times \left[ \frac{2 \cdot R^2}{l^2 + 4Rl} + \frac{2 \cdot R^2}{(2R+l)^2} + \ln \left( \frac{l^2 + 4Rl}{(2R+l)^2} \right) \right]
\end{aligned} \tag{156}$$

L'énergie libre de Van der Waals entre une particule (considérée comme sphérique) et la paroi d'accumulation correspond à l'équation suivante ((97), (104)) :

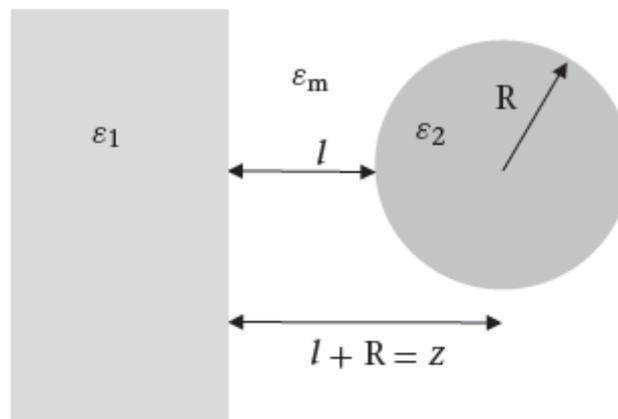


Figure 35: Schéma des interactions de Van der Waals entre une particule sphérique et une surface plane ((97))

$$W_{vdW.p-w} = -\frac{A_{Hamaker}}{6} \times \left( \frac{R}{l} + \frac{R}{2R+l} + \ln \left( \frac{l}{2R+l} \right) \right) \tag{157}$$

En se référant aux notations couramment employées en FFF (« x », correspondant à la distance entre la paroi d'accumulation et le centre d'une particule, et « a », correspondant au rayon de la particule, en faisant l'approximation que celle-ci soit sphérique), on obtient l'équation ((104), (13)) :

$$W_{vdW.p-w} = -\frac{A_{Hamaker}}{6} \times \left( \frac{a}{x-a} + \frac{a}{x+a} + \ln \left( \frac{x-a}{x+a} \right) \right) \quad (158)$$

Lorsque x tend vers a (la particule se rapproche de la paroi d'accumulation), l'équation devient ((13)) :

$$\lim_{x \rightarrow a} W_{vdW.p-w} = -\frac{A_{Hamaker} \times a}{6(x-a)} \quad (159)$$

La force de Van der Waals exercée sur une particule est obtenue en dérivant l'énergie potentielle par rapport à la distance x ((13)) :

$$F_{vdW.p-w} = -\frac{dW_{vdW}}{dx} = -\frac{2 \times A_{Hamaker} \times a^3}{3(x^2 - a^2)^2} \quad (160)$$

Lorsque x tend vers a (la particule se rapproche de la paroi d'accumulation), l'équation devient ((13)) :

$$\lim_{x \rightarrow a} F_{vdW.p-w} = -\frac{A_{Hamaker} \times a}{6(x-a)^2} \quad (161)$$

## 2.2.2. Les forces électrostatiques

Lorsque tout corps est plongé dans un liquide polaire, la surface du corps et les molécules de soluté environnantes se polarisent. La charge de la surface (négative (le plus souvent) ou positive), constituée principalement de groupements de surface dissociés, d'ions adsorbés sur la surface ou substitués plus en profondeur, est alors compensée une couche d'ions dite diffuse (aussi appelée couche de Gouy-Chapman) regroupant alors des contre-ions. Très souvent, il existe entre la surface du corps en contact avec le liquide et la couche diffuse une couche dite de Stern, correspondant à une couche de contre-ions faisant écran.

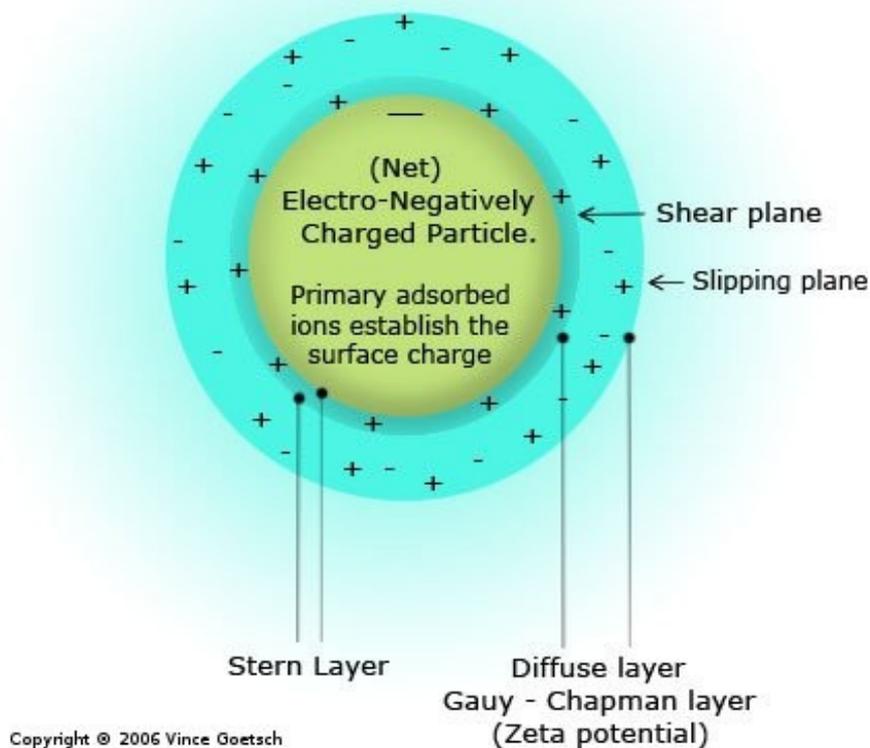


Figure 36: Représentation schématique des différentes couches d'ions impliquées dans les interactions électrostatiques en solution aqueuse ((105))

Plusieurs modèles se sont succédés pour expliquer la formation de ces couches d'ions. Le premier étant celui d'Helmholtz (ayant assimilé l'interface à un condensateur séparant les charges positives et négatives) ((106)). Le modèle le plus utilisé aujourd'hui est celui de Gouy-Chapman, prolongé par le modèle de Stern ((107)). Le modèle de Gouy-Chapman implique que les ions de signe opposé à la charge de la surface subissent un phénomène d'attraction électrostatique par la surface, mais subissent également un phénomène brownien ayant tendance à les en éloigner. De même, les contre-ions et co-ions associés, de charge identique à celle de la surface, subissent un phénomène de répulsion électrostatique, les éloignant naturellement de la membrane, et subissent également l'influence du mouvement brownien, les rapprochant de la membrane. De fait, un état d'équilibre se forme, matérialisé par la loi de distribution des concentrations des ions de Boltzmann ((108)) :

$$c_i = c_{i,\infty} \exp\left(-\frac{z_i \cdot e \cdot \Psi}{k \cdot T}\right) = c_{i,\infty} \exp\left(-\frac{z_i \cdot F \cdot \Psi}{R \cdot T}\right) \quad (162)$$

$c_{i,\infty}$  : Concentration en ions « i » contenue dans la solution (en pratique, suffisamment éloignés de la surface pour être en dehors de l'influence de son potentiel  $\Psi$ , qui sera alors considéré comme nul)

$z_i$  : Valence de l'ion « i » concerné

$e$  : Valeur de la charge élémentaire électronique ( $1,60217653(14) \cdot 10^{-19}$  C)

$k$  : Constante de Boltzmann ( $1,3806488(13) \cdot 10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>)

$F$  : Constante de Faraday ( $96485,3365(21)$  C.mol<sup>-1</sup>) ( $F = N_A \times e$ )

$R$  : Constante des gaz parfaits ( $8,3144598(48)$  J.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>)

$\Psi$  : Potentiel de la région où se situent les ions concernés (en Volts (V) ( $V = J \cdot C^{-1}$ ))

De même, le potentiel électrique associé à cette distribution des ions est matérialisé par l'équation de distribution de Poisson, où la notation nabla ( $\nabla$ ) au carré

correspond à une fonction de dérivées partielles sur trois dimensions (f(x,y,z)) ((108)) :

$$\nabla^2 \Psi = \frac{1}{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r} \sum_i z_i \cdot e \cdot c_i = - \frac{e}{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r} \sum_i z_i \cdot c_{i,\infty} \exp\left(-\frac{z_i \cdot e \cdot \Psi}{k \cdot T}\right) \quad (163)$$

Cette équation différentielle n'a pas de solution. Une solution ne peut être obtenue que si une approximation est concédée. Ainsi intervient l'approximation de Debye-Hückel ((99)) (celle-ci implique qu'autour d'un ion se trouvent un grand nombre de charges opposées ((109))).

On obtient, dans le cas des solutions d'électrolytes symétriques (les ions positifs et négatifs comportent le même nombre de charges, comme dans le cas d'une solution de chlorure de sodium (Na<sup>+</sup> + Cl<sup>-</sup>)) l'équation suivante :

$$\nabla^2 \Psi = \kappa^2 \cdot \Psi \quad (164)$$

dont la solution correspond à :

$$\Psi = \Psi_s \cdot e^{-\kappa \cdot x} \quad (165)$$

Dans le cas des solutions d'électrolytes asymétriques (les ions positifs et négatifs comportent des nombres de charges différents, comme dans le cas d'une solution de chlorure de calcium (Ca<sup>2+</sup> + 2Cl<sup>-</sup>)) , l'approximation de Debye-Hückel donne une équation plus complexe :

$$\nabla^2 \Psi = \frac{2ze c_{i,\infty}}{\epsilon_0 \epsilon_r} \cdot \sinh\left(\frac{ze \Psi}{kT}\right) \quad (166)$$

dont la solution correspond alors à l'équation de Gouy-Chapman :

$$\Psi = \frac{2kT}{ze} \cdot \ln \left( \frac{1 + e^{-\kappa x} \cdot \tanh \left( \frac{ze \Psi_s}{4kT} \right)}{1 - e^{-\kappa x} \cdot \tanh \left( \frac{ze \Psi_s}{4kT} \right)} \right) \Leftrightarrow \tanh \left( \frac{ze \Psi}{4kT} \right) = \tanh \left( \frac{ze \Psi_s}{4kT} \right) \cdot e^{-\kappa x} \quad (167)$$

Dans les 2 cas, la valeur  $\kappa$  correspond à :

$$\kappa = \sqrt{\left( \frac{e^2 \cdot \sum_i z_i^2 \cdot c_{i,\infty}}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k \cdot T} \right)} = \sqrt{\left( \frac{2e^2 \cdot I_n}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k \cdot T} \right)} \quad (168)$$

L'inverse de  $\kappa$  correspond à la longueur de Debye (quelquefois notée  $l_D$ ) et  $I_n$  correspond à la force ionique créée par tous les ions de la solution :

$$I_n = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 \cdot c_{i,\infty} \quad (169)$$

Le modèle de Stern implique quant à lui qu'une partie des contre-ions se concentre sur la surface pour former une troisième couche appelée la couche de Stern, les autres contre-ions formant la couche diffuse (appelée aussi couche de Gouy-Chapman) ((99)).

Le potentiel entre la surface et la couche de Stern correspond au potentiel de surface (noté  $\Psi_s$ ).

Le potentiel entre la couche diffuse et l'extérieur de la couche de Stern correspond au potentiel de Stern (noté  $\Psi^d$ ). Sa mesure est inaccessible et est estimée par le potentiel zéta (noté  $\zeta$ ), qui est le potentiel de la surface de cisaillement entre la couche de Stern et la couche diffuse.

Lors de l'interaction entre deux particules identiques, les couches d'ions entre les surfaces vont interagir (phénomène d'overlapping) ((110)) et verront leur potentiel se modifier (entraînant l'apparition d'entropie s'ajoutant elle-même à l'énergie libre) et exercer généralement une action de répulsion, les surfaces des 2 particules portant des charges de même polarité (cela se compliquera dans le cas de particules différentes ou de l'interaction d'une particule avec une paroi).

Le potentiel zéta est un bon indicateur de la stabilité d'une suspension et est mesurable par des techniques électrophorétiques ((111)) (des détecteurs spéciaux permettent de le mesurer « en ligne », à la sortie du canal de séparation). Plus la valeur absolue de celui-ci est élevée, plus la suspension sera stable. D'une façon générale, plus la salinité augmente, plus les particules auront tendance à s'attirer et plus la suspension colloïdale sera instable et aura tendance à flocculer ((112), (113)).

### 2.2.3. La théorie DLVO

La théorie de la stabilité des colloïdes a été mise au point dans les années 1940 par Derjaguin, Landau, Verveij et Overbeek, d'où l'appellation de théorie DLVO ((114)). Celle-ci repose sur l'effet combiné des forces de Van der Waals et de celles liées aux couches ioniques se formant sur les surfaces en contact avec le liquide. Les forces de Van der Waals et les forces électrostatiques liées aux couches d'ions sont additives. Toute la difficulté réside alors dans le fait de savoir si le bilan des forces ira dans le sens de l'attraction entre les différents corps ou au contraire, dans le sens de la répulsion. La théorie DLVO a pour objectif d'apporter une réponse à cette problématique ((114)).

Cette théorie a d'abord été formulée pour l'agrégation de deux particules identiques, ou homo-agrégation (configuration symétrique), puis a été reprise pour l'agrégation de deux particules différentes (hétéro-agrégation) ou pour l'interaction de particules contre une surface plane (ces deux derniers cas correspondent à un système asymétrique)

Les forces en présence étant additives, l'énergie libre par unité de région correspondra à l'équation suivante :

$$W(h) = W_{vdw}(h) + W_{dl}(h) \quad (170)$$

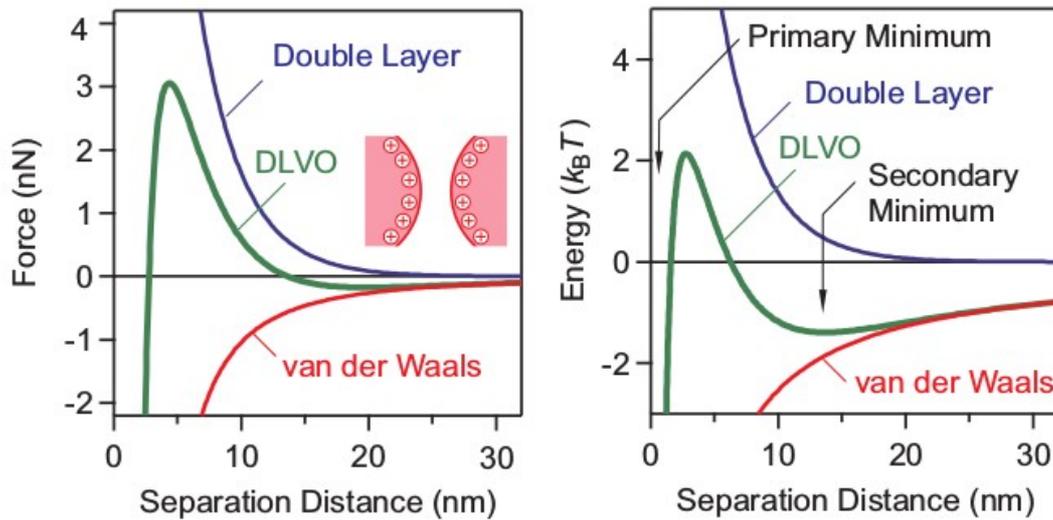


Figure 37: Aperçu de la résultante issue des forces (majoritairement attractives) de Van der Waals et des forces (répulsives) liées aux couches ioniques en fonction de la distance entre 2 corps ((114))

Dans le cas d'un système symétrique à deux particules identiques, quand la somme des 2 composantes sera positive (en raison du signe positif associé à la valeur de l'interaction répulsive des forces répulsives liées aux couches ioniques), les particules se repousseront, permettant ainsi d'obtenir une suspension colloïdale stable a contrario, quand la somme des 2 composantes sera négative (en raison du signe négatif de la composante attractive des forces de Van der Waals), les particules s'attireront, entraînant ainsi une agrégation des particules en dimères, avec la formation de plus gros agrégats dès lors que le processus se poursuit, jusqu'à entraîner une sédimentation de la suspension.

Sans entrer dans les détails sur la théorie DLVO, la mesure de la force exercée entre deux corps se fait par l'intermédiaire de l'approximation de Derjaguin ((115), (116), (117), (118)), qui se limite à l'estimation de la force exercée entre deux

particules. L'approximation de Derjaguin est suffisante pour les espèces dont la taille est de l'ordre du micron, mais est insuffisante pour les tailles inférieures ((115)).

### **2.3. Influence de ces interactions sur l'emploi des techniques de fractionnement par couplage flux-force**

Les théories ci-dessus ne seront applicables, dans le meilleur des cas, que pour les situations les plus simples. Des moyens informatiques seront nécessaires, et les situations plus complexes font encore l'objet d'études aujourd'hui.

En pratique, il est extrêmement difficile de faire la part des choses entre les différents phénomènes, que ce soit pour les interactions particule-particule ou particule-membrane, ainsi qu'entre leurs impacts respectifs sur la mesure des temps de rétention, des coefficients de diffusion, et des diamètres hydrodynamiques des différents analytes.

Les membranes employées dans les techniques de FFF ne sont au sens strict pas destinées à cet usage et sont principalement destinées à l'ultrafiltration et à la purification de l'eau. Dans ces disciplines, les phénomènes de colmatage des membranes sont un véritable problème, lié au phénomènes décrits ci-dessus. En conséquence, ces phénomènes ont été étudiés dans la science des membranes en vue d'en limiter l'influence. De fait, il est instructif de s'intéresser aux résultats de ces études dans le cadre des techniques de FFF, où les interactions particule-particule et particule-membrane représentent l'une des pierres angulaires dans l'interprétation des résultats qui en découlent.

## 2.3.1. Interactions particule-membrane

### 2.3.1.1. Description des membranes et frittés

Les membranes utilisées dans les techniques symétriques et asymétriques sont fabriquées de façon industrielle et fournies sous forme de feuillets, et ajustées par la suite à la géométrie du canal ((15)). Elles se caractérisent par plusieurs propriétés. Tout d'abord, leur structure (symétrique, asymétrique, ou composite), le ou les matériaux (si la structure de la membrane est composite) les constituant, la taille de leurs pores et leur processus de fabrication ((119)), ou encore leur hydrophilie.

Les frittés utilisés sont composés de céramique ou d'acier inoxydable et sont obtenus par fusion partielle des particules de céramique ou d'acier, suffisamment pour que les particules se soudent entre elles au niveau de leurs points de contact, en laissant de l'espace entre elles mais sans aller jusqu'à la fusion complète. En général, la porosité de ces frittés se situe entre 2 et 5  $\mu\text{m}$  et ces derniers doivent être parfaitement plats. Très peu d'informations sont disponibles sur les frittés. En temps normal, ces derniers ne font que supporter la membrane, par conséquent, les caractéristiques des frittés sont peu significatives par rapport à celle des membranes. Toutefois, quelques essais (un peu anecdotiques) de FFF symétrique ont été effectués sans membrane, directement sur les frittés ((120), (121)) de céramique de faible porosité (autour de la valeur de 1  $\mu\text{m}$ ), dont la surface a été soigneusement polie, en mode stérique-hyperlayer uniquement. L'idée de base était de supprimer la membrane pour éviter toute interaction des particules avec la paroi d'accumulation. Il semblerait que le rendement de récupération soit légèrement amélioré par rapport à la FFF sur membrane.

Dans le cas de la technique en fibre creuse, les manipulateurs ont longtemps été contraints de construire leur propre instrumentation. Dans la plupart des cas, les fibres obtenues étaient issues de cartouches de filtration produites industriellement. Ces membranes ont strictement les mêmes caractéristiques, et donc les mêmes avantages et inconvénients que les membranes planes évoquées plus haut pour les FFF symétriques et asymétriques, ce qui génère déjà une énorme quantité d'inconvénients.

Historiquement, les premières fibres utilisées étaient constituées de polysulfone. Elles sont encore utilisées aujourd'hui, notamment pour la fabrication artisanale de canaux de séparation, notamment en raison de leur faible coût. Elles sont fabriquées par la méthode de séparation de phase sèche/phase humide (Dry/wet phase separation) ((122)). Le principal inconvénient des fibres creuses de polymère est leur capacité à gonfler une fois humide (entraînant une augmentation de son diamètre interne), cet effet étant encore accentué par la pression exercée sur la fibre par le champ radial. L'effet a été mis en évidence en HF-FFF par Lee et al. ((81), (93)). D'après une étude menée par Shukla et al. ((123)), le gonflement est le plus marqué lors de l'utilisation de solvants polaires, en raison de leur constante diélectrique élevée. compliquant de fait les calculs de  $R_f$  et  $L$ . Cet effet s'observe également dans les techniques symétrique et asymétrique, où la membrane a tendance à gonfler vers l'intérieur du canal, ce qui limite la précision de la mesure des petites épaisseurs de canal ((18)). Les solvants apolaires, de leur côté, ont tendance à détériorer l'intégrité de la fibre.

De plus, comme les membranes, les fibres creuses constituées de polymère nécessitent un conditionnement avant utilisation. La procédure de conditionnement employée a un impact sur la perméabilité de la fibre ainsi que son élasticité et sa résistance à la pression ((123), (85)). D'autres facteurs entraînent une usure prématurée, comme le pH extrême de certains liquides. Les fibres creuses de céramique sont par conséquent préférables. Des fibres creuses de céramique ont été utilisées dès 2005 par Kok et al. ((52)).

De manière générale, les membranes d'ultrafiltration peuvent être constituées de plusieurs types de matériaux. Elles sont en général constituées de polymères, ou encore de céramique (elles sont alors obtenues par frittage) ((124)).

La taille des pores de la membrane déterminera son usage final :

<i>Membrane type</i>	<i>Membrane material</i>	<i>Pore Size (μm)</i>	<i>Preparation process</i>	<i>Application</i>
Symmetric porous structures	Ceramic, metal, polymer, graphite	0.1–20	Powder pressing and sintering	Microfiltration, gas separation
Symmetric porous structures	Polymer of partial crystallinity	0.2–10	Extruding and stretching of films	Microfiltration, battery separator
Symmetric porous structures	Polymer, mica	0.05–15	Irradiation and etching of films	Microfiltration, point-of-use filter
Symmetric porous structures	Polymer, metal, ceramic	0.5–20	Template leaching of films	Microfiltration
Symmetric porous structures	Polymer	0.5–10	Temperature-induced phase inversion	Microfiltration
Asymmetric porous structures	Polymer	<0.01	Diffusion-induced phase inversion	Ultrafiltration
Asymmetric porous structures	Ceramic	<0.01	Composite membrane gel-sol process	Ultrafiltration

Tableau 2: Procédés de fabrication et usages de différentes membranes poreuses ((119))

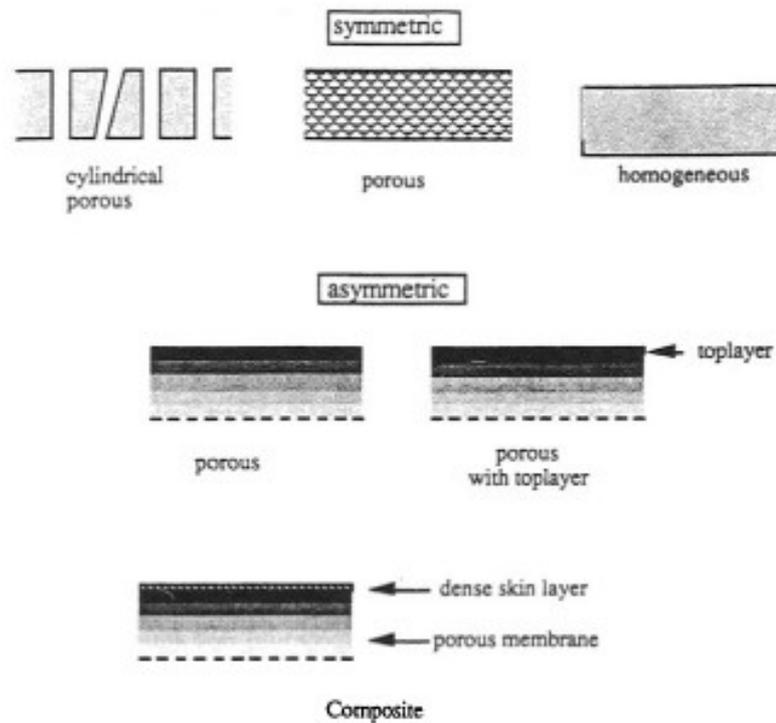


Figure 38: Structure de différentes membranes ((119))

La porosité de la membrane n'est pas uniforme, et les tailles des pores ne sont que des ordres de grandeur, aussi on se référera plutôt au MWCO (Molecular Weight Cut-Off, ou plus simplement abrégé « Cut-off »), qui correspondra à la plus faible masse moléculaire retenue à 90 % par la membrane (la définition n'est toutefois pas standardisée et ce pourcentage peut descendre jusqu'à 80%). Le choix du cut-off est important, car il détermine la taille à partir de laquelle les analytes seront éliminés par le flux latéral (en général, le choix se fait de 5000 à 30000 Da, 10000 Da étant en général un bon compromis).

Ainsi, dans les techniques de fractionnement par couplage flux-force hydrodynamiques, seules les membranes d'ultrafiltration sont utilisées. On se concentrera donc sur celles-ci. Dans le cas des membranes polymériques, un large choix de polymères est disponible : les plus connus étant la polysulfone et le polyacrylonitrile.

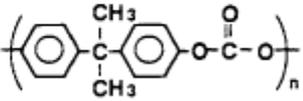
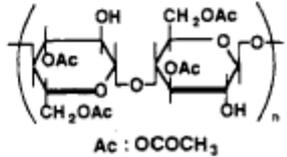
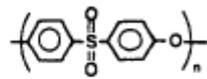
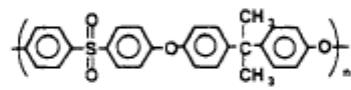
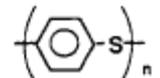
Polymer	Chemical Structure	$T_g/^\circ\text{C}$	$T_m/^\circ\text{C}$
Polyethylene (PE)	$\text{-(CH}_2\text{)}_n$	-60-90	137-143.5
Polyvinylidene fluoride (PVDF)	$\text{-(CH}_2\text{-CF}_2\text{)}_n$	-40	160-185
Polypropylene (PP)	$\text{-(CH}_2\text{-CH)}_n$   CH <sub>3</sub>	-10	167-170
Polycarbonate (PC)		150-155	240
Teflon	$\text{-(CF}_2\text{)}_n$	-113	327
Cellulose Acetate (CA)	 Ac : OCOCH <sub>3</sub>	—	230
Polyethersulfone (PES)		225	—
Polysulfone		190	—
Polyvinylalcohol (PVA)	$\text{-(CH}_2\text{-CH)}_n$   OH	65-85	228-256
Polyacrylonitrile (PAN)	$\text{-(CH}_2\text{-CH)}_n$   CN	80-104	319
Polyphenylenesulfide (PPS)		85	285

Tableau 3: Structure moléculaire et caractéristiques thermiques de plusieurs constituants monomériques des membranes d'ultrafiltration ((125))

Quelle que soit la technique, plusieurs problèmes concernant les membranes se sont posés.

Le premier étant la fixation d'analytes, plus ou moins forte avec la membrane. Cet effet a été longtemps documenté en FFF, et il est avéré que le phénomène est lié à une grande quantité de facteurs, contrôlables ou non. Ce problème entraîne d'une part, la perte d'échantillons (préjudiciable si des traces sont recherchées), une

contamination potentielle des injections suivantes par relargage de la membrane, et à terme, une altération de la perméabilité de la membrane. Ce problème d'interactions est déjà connu dans les autres applications nécessitant des membranes d'ultrafiltration, et plusieurs facteurs ont été dégagés.

Le deuxième problème correspond à la réaction de la membrane vis à vis du solvant. Il existe deux natures de solvant : aqueux, ou organique, et chacune des deux pose un bon nombre de problèmes. Les membranes constituées de polymères seront particulièrement fragiles vis à vis des solvants organiques. Quel que soit le solvant, les membranes de polymère auront également tendance à gonfler vers l'intérieur du canal de séparation, entraînant des biais dans la mesure de l'épaisseur du canal et le calcul du volume mort ((18), (77), (126)). De plus, en raison des différents processus de fabrication des membranes, il apparaît que chaque combinaison membrane-solvant-soluté est un cas particulier ((126)).

Le vrai problème de la FFF est que les différentes unités de recherche travaillent sur des matériels différents, des chambres de séparation fabriquées dans leurs propres ateliers selon leurs moyens, constituées de matériaux pas toujours précisés, avec des membranes d'ultrafiltration qui, à la base, n'ont jamais été particulièrement étudiées pour leurs performances dans cette technique séparative, pas toujours décrites dans la littérature (et quand elles le sont, souvent de manière insuffisante), avec des liquides porteurs divers et variés, avec des protocoles de conditionnement divers et variés, sur des analytes tout aussi divers et variés (billes de polystyrène, nanoparticules métalliques, protéines de natures diverses, ribosomes de plantes, acides nucléiques, bactéries, sédiments de rivière, eaux polluées...), insuffisamment caractérisées (l'immense complexité des phénomènes mis en jeu dans les colloïdes, brièvement abordée ci-dessus, y est pour beaucoup, ainsi que le panel très limité et onéreux des moyens de caractérisation existants, et qui n'offriront le plus souvent qu'une information parcellaire sur les analytes en question) ((127)). Toutefois, certaines revues de FFF et d'ultrafiltration semblent dégager des éléments constants. Il est à noter que les problèmes d'interactions particule-membrane et particule-particule sont liés aux mêmes causes (interactions de Van der Waals et interactions ioniques) et sont par conséquent virtuellement impossibles à traiter

séparément : la plupart des paramètres cités ci-dessous affecteront les deux types d'interaction.

### **2.3.1.2. Effet du champ latéral**

L'application d'un champ latéral fort augmente la rétention mais potentialise le risque d'adsorption définitive d'analytes sur la membrane. La plupart des publications sur la FFF mentionnent cet état de fait ((18), (77)).

### **2.3.1.3. Effets liés au liquide porteur**

#### **2.3.1.3.1. pH du liquide porteur**

De l'adsorption définitive d'analytes sur la membrane a été observée à tous les pH ((92)). Toutefois, des études démontrent ((128), (129)) que la plupart des protéines s'adsorbent en grande quantité sur la surface de la membrane lorsque le pH du liquide porteur s'approche du point isoélectrique des protéines concernées, aussi bien en FFF qu'en ultrafiltration. Il semblerait que généralement, un pH bas soit plus propice à l'adhésion particule-membrane et particule-particule, en raison de la prévalence d'interactions hydrophobes et électrostatiques favorables ((130)).

#### **2.3.1.3.2. Composition du liquide porteur**

Il a été observé plus haut que les forces de Van der Waals et les interactions électrostatiques liées aux couches d'ions affectaient les interactions entre particules mais aussi les interactions avec les surfaces, dont la paroi d'accumulation. Les interactions particule-surface commencent seulement à être étudiées expérimentalement en FFF hydrodynamique. La saturation en sels augmente l'agrégation particule-membrane et l'agrégation entre particules ((129), (23)) L'utilisation de détergents anioniques est susceptible d'entraîner son adsorption sur la membrane par leur chaîne carbonée et d'augmenter la proportion de charges

négligentes sur la membrane (les membranes étant dans la plupart des cas chargées négativement) et de favoriser l'adsorption de particules neutres ou chargées positivement ((131), (130)) (mais de repousser vers la lumière du canal de séparation les particules chargées négativement, diminuant de fait leur temps de rétention). D'autres ions sont susceptibles d'agir par des mécanismes particuliers tels que les ions calcium (par formation de ponts ioniques) ((132)). D'autres substances sont également susceptibles de limiter les interactions particule-particule ou particule-membrane, telles que l'arginine (et dans une moindre mesure, la proline). Ces substances sont susceptibles d'être intéressantes en raison de leur effet non-dénaturant vis-à-vis des protéines. L'effet antiagrégant de ces acides aminés est déjà connu en chromatographie d'exclusion stérique ((133), (9), (134)) et en biotechnologies (bien qu'un effet pro-agrégant ait été observé dans des circonstances particulières) ((135)), malgré le fait que son mode d'action soit encore incomplètement élucidé (l'hypothèse la plus couramment admise est la facilitation de l'établissement d'interactions hydrophobes entre les analytes) ((136)).

#### **2.3.1.4. Effets liés à la membrane**

##### **2.3.1.4.1.1. Rugosité et imperfections de surface**

Cette fixation peut se traduire par un simple effet d'immobilisation sur la membrane, lié à l'application du flux latéral, entraînant les analytes vers la membrane d'ultrafiltration et en piégeant une partie dans le réseau de fibres de la surface de la membrane ((18)). Cet effet peut être contrôlé par une diminution du flux latéral en fin de manipulation.

Toutefois, elle peut également se traduire par la fixation définitive d'analytes sur la membrane. Cet effet est en général visible au niveau du point de focalisation et en conditions d'élution lors de l'utilisation de champs latéraux de force élevée, en partie en raison de la compression du nuage de particules contre la membrane. De fait, il peut se produire des interactions particule-particule ou particule-membrane, réversibles ou non, perturbant l'estimation des quantités réelles d'analytes présentes dans l'échantillon ((18)).

#### **2.3.1.4.1.2. Composition chimique de la membrane et fonctionnalisation des groupements libres de la surface de la membrane**

La composition chimique de la membrane a une influence sur l'adsorption des analytes. Ainsi, une étude menée par Kassalainen et Williams ((92)) a montré que des analytes tels que de la sérum-albumine bovine et des gamma-globulines étaient plus adsorbés sur une membrane de polyéthersulfone que sur une membrane de cellulose régénérée. Les membranes les plus hydrophobes sont les plus enclines à être atteintes par ce phénomène ((125)). Il existe dans la science des membranes des procédures destinées à greffer des groupements hydrophiles, le traitement se fera alors par le biais d'un prétraitement par un surfactant hydrophile ou par procédé enzymatique, ou par greffage de groupements par la chaleur, les rayonnements UV ou par processus chimique (polymérisation interfaciale ou greffage de groupes  $-SO_3H$ ,  $-F$ ,  $-OH$ ). Un autre moyen consiste à préparer directement des membranes ayant des propriétés hydrophiles, en intégrant une substance hydrophile dans le processus. Toutefois, cela ne résume que les procédés les plus simples ((119)). L'idée de modifier chimiquement les groupements exposés de la surface interne du canal de séparation a été appliquée avec succès en FFF gravitationnelle et a été avancée pour la FFF en fibre creuse par Reschiglian et al. ((137), (138)). Si le concept de fonctionnalisation des membranes a potentiellement sa place en FFF, il amène toutefois d'autres problèmes, comme celui de la stabilité des groupements greffés sur la durée et dans des conditions d'utilisation variées ((139)), et de l'impact éventuel des groupements « décrochés » de la membrane sur les constituants de l'échantillon et sur le signal fourni par le système de détection.

#### **2.3.1.4.2. Etat d'ionisation**

D'une manière générale, les membranes sont chargées négativement en milieu aqueux. Exceptionnellement, des membranes ont déjà été chargées positivement dans des essais d'ultrafiltration. Ainsi, Miyama et al. ((140)), après avoir chargé positivement une membrane de polyacrylonitrile au DMF (Diméthylformamide), ont observé une attraction sur la membrane des macromolécules d'albumine chargées négativement. D'autres essais effectués en 2006 par Zydney et al. ((141)) sur de membranes d'ultrafiltration de polysulfone préalablement chargées positivement par des fonctions ammonium quaternaires vont dans le même sens. De même, il a été constaté en FFF hydrodynamique par Bendixen et al. ((142)) que des particules chargées positivement sont totalement fixées sur une membrane chargée négativement.

#### **2.3.1.5. Un détournement un peu original de la FFF**

Toutes ces caractéristiques ont toutefois donné un usage plus original aux techniques de fractionnement par couplage flux-force, celui de mesurer la résistance au colmatage d'une membrane déterminée à un soluté déterminé, dans des conditions définies à l'avance ((143), (144)).

La FFF a été pour la première fois étudiée dans ce contexte dès 2001 par Hartmann et al. ((132)). Une approche appliquant la modélisation de la circulation d'un soluté connu dans un canal de FFF « idéal » et sa comparaison avec les résultats obtenus en situation réelle a été avancée dès 2006 ((145)).

Ces résultats ont pour but de déterminer les propriétés des fibres les moins propices à l'adhésion des particules, notamment dans les techniques de purification de l'eau. Toutefois, les résultats issus de ces approches seront d'une extrême importance dans l'établissement de normes de conception des futures membranes de FFF, des futures substances d'étalonnage, ainsi que dans l'établissement des futurs protocoles de séparation.

### 2.3.2. Interactions particule-particule

Comme cité précédemment, les particules en suspension interagissent également entre elles. Une partie des problèmes liés aux interactions entre particules a été abordée dans la partie précédente (tout du moins sur le plan pratique) traitant des interactions particule-membrane, les problèmes en question étant liés aux mêmes interactions. Plusieurs revues ont déjà examiné l'étendue de ce problème (non-exclusif aux techniques de FFF) sur le plan analytique ((6), (146), (147)).

A partir d'une certaine concentration, ce phénomène est significatif au point de perturber le profil exponentiel de répartition des concentrations. Ce phénomène s'observe tout particulièrement à proximité de la paroi d'accumulation et pour les solutés les plus retenus ((13)).

En théorie, l'importance de ces interactions peut être estimée en prenant en compte la distance entre 2 particules et le volume de la fraction d'analyte concerné (volume correspondant aux analytes seuls), avec l'équation suivante ((13)) :

$$\frac{l}{d} = \frac{1}{2} \cdot \frac{e^{8\varphi}}{\varphi^{1/3}} \Gamma\left(\frac{4}{3}, 8\varphi\right) - 1 \quad (171)$$

$l$  : Distance entre les 2 particules concernées

$d$  : Diamètre d'une particule (supposée sphérique, pour une suspension homogène)

$\varphi$  : Volume de la fraction de l'analyte concerné dans la solution (volume de matière)

Le paramètre  $\Gamma$  correspond à une fonction gamma incomplète définie par l'équation ((13)) :

$$\Gamma(a, z) = \int_z^{\infty} t^{a-1} e^{-t} dt \quad (172)$$

Plus  $\varphi$  augmente, plus la distance entre les particules diminue, ce qui augmente d'autant plus la force des interactions de Van der Waals, et de celles liées aux couches d'ions.

La valeur  $\varphi$  est (théoriquement) obtenue par l'équation suivante ((13)) :

$$\varphi = c \cdot v_p \quad (173)$$

$c$  : Nombre de particules par unité de volume de suspension (concentration « localisée » de particules)

$v_p$  : Volume d'une seule particule

A l'état d'équilibre entre la force du champ et le mouvement brownien, le flux net s'exerçant sur les particules est nul.

Par conséquent, en transformant l'équation (5) de manière à prendre en compte le nombre de particules par unité de volume et en exprimant le mouvement brownien par la pression osmotique localisée, on obtient ((13), (148)) :

$$F \cdot c - \frac{d\Pi}{dx} = 0 \quad (174)$$

$F$  : Force du champ appliquée

$c$  : Nombre de particules par unité de volume de suspension (concentration « localisée » de particules)

$\Pi$  : Pression osmotique localisée

$x$  : Position  $x$  dans l'épaisseur de la chambre

La solution admet une certaine compressibilité osmotique, notée  $Z$ . L'équation, assez similaire à celle des gaz parfaits, est la suivante ((13)) :

$$Z = \frac{\Pi}{k \cdot T \cdot c} = \frac{\Pi \cdot v_p}{\varphi \cdot k \cdot T} \quad (175)$$

$\Pi$  : Pression osmotique localisée

$c$  : Nombre de particules par unité de volume de suspension (concentration « localisée » de particules)

$v_p$  : Volume d'une seule particule

$k$  : Constante de Boltzmann

$T$  : Température

Sous l'effet du champ, la valeur  $\varphi$  varie entre le centre de la lumière du canal et la paroi d'accumulation. Au contact de la paroi d'accumulation, celle-ci est notée «  $\varphi_0$  ». La relation entre  $\varphi$  et  $\varphi_0$  correspond à l'équation suivante :

$$F(\varphi) = F(\varphi_0) - \frac{s}{\lambda} \quad (176)$$

Les paramètres  $\lambda$  et  $s$  correspondant aux paramètres de rétention (voir équations (8) à (16)),  $F$  correspond à une fonction de  $\varphi$  exprimée par la formule suivante :

$$\frac{dF}{d\varphi} = \frac{1}{\varphi} \cdot \frac{\partial(\varphi Z)}{\partial \varphi} \quad (177)$$

L'expression de  $F$  peut être considérablement simplifiée par l'emploi d'approximations telles que celles de Carnahan-Starling ((13), (149)) et en faisant l'hypothèse que les particules sont sphériques, sont non-déformables en suspension

et ne sont sujettes à aucune interaction (on exclut donc les interactions de Van der Waals et les interactions électrostatiques liées aux couches d'ions) autres que les interactions stériques (purement physiques, liées au volume des particules) (modèle des sphères dures) ((149)).

$$F(\varphi) = \ln(\varphi) + \frac{3-\varphi}{(1-\varphi)^3} \quad (178)$$

De même, il est possible d'établir un lien entre  $\varphi$ ,  $s$  et  $\lambda$  ((13)) :

$$-\frac{s}{\lambda} = \ln\left(\frac{\varphi}{\varphi_0}\right) + \left[ \frac{1}{(1-\varphi)^2} - \frac{1}{(1-\varphi_0)^2} \right] + 2 \left[ \frac{1}{(1-\varphi)^3} - \frac{1}{(1-\varphi_0)^3} \right] \quad (179)$$

On peut également dégager une valeur moyenne du volume de la fraction de l'analyte concerné dans la lumière du canal ((13), (149)) :

$$\langle \varphi \rangle = \int_0^1 \varphi ds = \lambda [\varphi_0 Z(\varphi_0) - \varphi_1 Z(\varphi_1)] \quad (180)$$

La valeur  $\varphi_1$  correspond au volume de la fraction de l'analyte concerné au contact de la paroi de déplétion.

D'une manière générale, les valeurs de  $\varphi$  sont obtenues à partir de méthodes informatiques en tenant compte du diamètre effectif des particules et en prenant en compte les variations d'interactions selon la distance entre les particules ((149), (115), (13))

Le fait d'appliquer un champ entraîne également l'apparition de gradients de viscosité (liés aux concentrations transitionnelles en particules), abaissant la vitesse des analytes, modifiant de fait les temps de rétention ((13)). Cette modification de la viscosité est dépendante de  $\varphi$  selon une relation complexe, approchée par l'équation suivante ((13)), valable uniquement pour le modèle des sphères dures :

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{1}{\left(1 - \varphi - 0,35\varphi \cdot \sqrt{1 - \left(\frac{0,7404 - \varphi}{0,7404}\right)^2}\right)^{2,5}} \quad (181)$$

$\eta$  : Viscosité « altérée » par l'analyte

$\eta_0$  : Viscosité du liquide porteur

$\varphi$  : Volume de la fraction de l'analyte concerné dans la solution (volume de matière)

Cette équation ne prend toutefois pas en compte les interactions de Van der Waals ou celles liées aux couches d'ions (hypothèse des sphères dures)

Expérimentalement, il apparaît que la rétention augmente avec  $\langle\varphi\rangle$  (le phénomène est assez bien modélisé par les équations ci-dessus) et avec la concentration (ce phénomène n'est toutefois pas élucidé par les tentatives de modélisation citées ci-dessus et serait lié aux forces de Van der Waals et interactions électrostatiques liées aux couches d'ions) ((13)). Un effet de saturation s'observera toujours malgré les éventuelles précautions prises en raison de la compression des analytes par le champ latéral, entraînant un effet de tailing sur les pics observés ((147)).

Il apparaît qu'il est quelquefois judicieux de travailler avec des suspensions de très faible concentration (toutefois sans réel indice sur ce qu'on appelle une « faible » concentration, donc à déterminer à l'essai, et dépendra probablement de la technique et de la nature de l'échantillon) et de travailler à des niveaux de rétention relativement faibles pour limiter les effets liés aux interactions entre particules,

potentialisés par la compression de l'échantillon ((150)). Le choix du liquide porteur et de la force ionique sera également capital : une force ionique trop élevée pourra entraîner une agrégation des particules entre-elles ou contre la membrane, tandis qu'une force ionique trop faible favorisera la répulsion électrostatique entre particules et entraînera des mauvaises estimations des temps de rétention ou des dimensions des particules (et par extension, de tout autre donnée susceptible d'être extraite des fractogrammes) ((147)). Toutefois les éventuelles modifications de conformation des analytes seront à prendre en compte lors des changements de ces conditions.

## 3. Mise en place expérimentale

### 3.1. Anticorps issus d'un réactif de biochimie

#### 3.1.1. Matériels et méthodes

##### 3.1.1.1. Matériel de chromatographie liquide haute performance, connectique, procédures d'utilisation

Le matériel décrit est similaire à celui décrit dans d'autres publications du laboratoire. Un dégazeur en ligne à vide a été placé entre le réservoir de liquide porteur et la pompe d'HPLC, et a fonctionné constamment au cours des manipulations.

De l'eau bi-distillée (produite au laboratoire de chimie analytique par osmose inverse) et du PBS Duellbecco ont été utilisés. Ces liquides ont subi une sonication de 15 minutes avant la purge de la pompe et ont été remplacés chaque semaine.

Le système d'HPLC utilisé pour faire circuler le liquide à l'intérieur du système et pour la détection est constitué d'une pompe ThermoScientific Spectra Systems P-1500 et d'un détecteur UV ThermoScientific Spectra Systems UV150. La longueur d'onde a été fixée à 280 nm.

L'injection est effectuée par le biais d'une valve à six ports Valco-VICI, contrôlée manuellement par un actuateur à 2 positions, où la position d'injection (A) permet d'injecter un volume d'échantillon correspondant à celui de la boucle d'injection, et la position d'élution (B) permet son élution vers l'intérieur de la fibre creuse.

2 boucles d'injection ont été utilisées :

- La première étant de 31,21  $\mu$ L
- La seconde étant de 5,252  $\mu$ L

Une valve SS-SS1 VH (Nupro, Willoughby, OH, USA) dont le zéro a été ajustée à la butée à été utilisée pour contrôler le flux radial.

2 valves électroniques Rhéodyne MXII Series (notées VA et VB, voir figure 39) pilotées par un script LabView, par l'intermédiaire d'un boîtier de commande National Instruments NI-USB-6008 ont été utilisées afin de permuter le système entre la position de focalisation et la position d'élution.

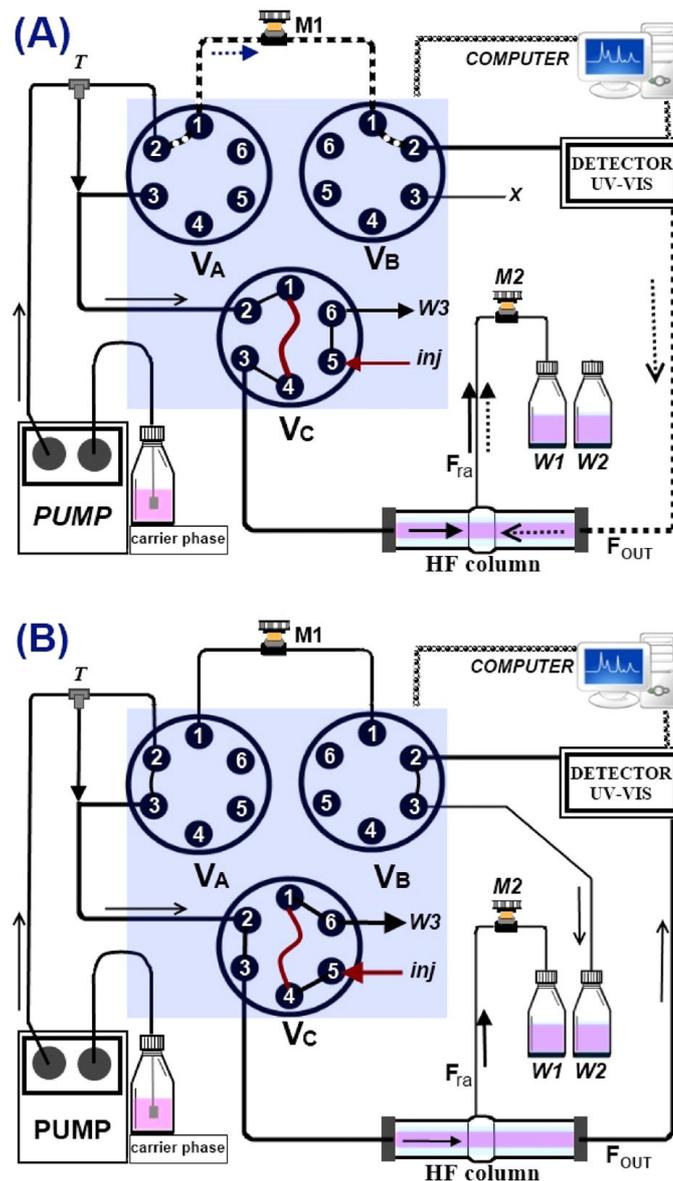


Figure 39: Schéma du montage de FFF utilisé ((151))

Les tubulures de connexion ont été choisies de manière à réduire au maximum les volumes morts et les modifications de pression lors des permutations de valves.

Une procédure similaire à celle déjà décrite par Moon et Reschiglian ((152)) a été mise en place pour l'injection de l'échantillon.

Une injection se déroule en 2 étapes :

- La phase d'injection, avec l'injection de l'échantillon dans le système, déjà en position de focalisation
- La phase d'élution, avec le passage des valves VA et VB en position d'élution et la libération de l'échantillon vers la lumière de la fibre.

### **3.1.1.2. Chambre de séparation**

Les chambres de séparation décrites ont été assemblées au sein du laboratoire de Chimie Analytique. Le montage commence avec le choix du composant principal, à savoir la fibre creuse, qui est composée ici de polysulfone, avec un seuil de coupure (cut-off) de 30 000 Daltons, (UFB-30, Romicon, Koch International, Lyon, France). Les fibres ont été isolées à partir d'une cartouche d'ultrafiltration Romicon UFB-30-5A, GE Healthcare (Europe GmbH Branch France/ 24 Avenue de l'Europe CS 20529/F-78457 Velizy-Villacoublay CEDEX/ France).

2 chambres de séparation ont été montées :

- La première a été conçue avec une fibre de 0,5 cm de diamètre à sec (UFP-30-C-4MA) et d'une longueur effective de 24,5 cm (volume interne à sec = 48,1  $\mu$ L). La fibre est enchâssée dans un morceau de tubulure de Tefzel de 25,5 cm de longueur (Diamètre externe : 1/8 de pouce, Diamètre interne : 1,55 mm), et est maintenue en place avec 2 morceaux de tubulure Tefzel de 0,5 cm de long chacune (Diamètre externe : 1/16 de pouce, Diamètre interne : 0,75 mm) aux 2 extrémités. 2 capillaires PEEK de 12 cm de longueur chacun (360  $\mu$ m de diamètre externe, 100

µm de diamètre interne) ont été insérés à chaque extrémité de la fibre sur une longueur de 0,5 cm, puis sertis par un assemblage de ferrules (Upchurch).

- La seconde a été conçue avec une fibre de 0,9 cm de diamètre à sec et d'une longueur effective de 17 cm (volume interne à sec = 108,1 µL). La fibre est enchâssée dans un morceau de tubulure de PEEK de 17 cm de longueur (Diamètre externe : 1/8 de pouce, Diamètre interne : 1,60 mm), et est maintenue en place avec 2 morceaux de tubulure Tefzel de 0,5 cm de long chacune (Diamètre externe : 1/16 de pouce, Diamètre interne : 0,75 mm) aux 2 extrémités. 2 capillaires PEEK de 12 cm de longueur chacun (1/32 de pouce de diamètre externe, 125 µm de diamètre interne pour le capillaire branché côté pompe, et 1/32 de pouce de diamètre externe, 90 µm de diamètre interne pour le capillaire branché côté détecteur) ont été insérés à chaque extrémité de la fibre sur une longueur de 0,5 cm, puis sertis par un assemblage de ferrules (Upchurch).

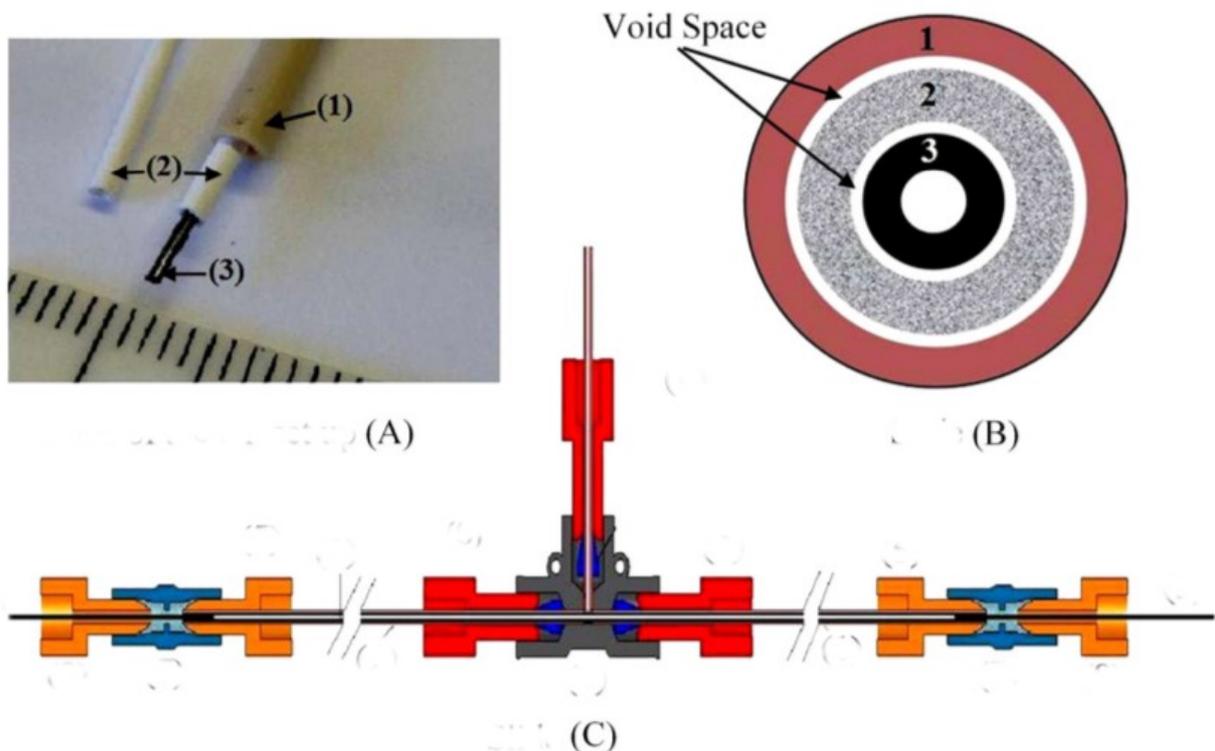


Figure 40: Aperçus d'une chambre de séparation de HF-FFF. (A) Tube conteneur (PEEK ou Tefzel) (1/8 in. OD × 0.080 ID) (1) avec sa fibre creuse (2) et ses capillaires de connectique (3). (B) Section transversale d'une chambre de séparation. (C) Schéma des différents composants de la chambre de séparation ((151))

### 3.1.1.3. Echantillons

Les solutions proviennent de kits de réactifs de dosage du peptide C utilisés sur un automate Roche COBAS. La notice de la solution utilisée indique qu'elle contient des anticorps anti-peptide C biotinylés monoclonaux de souris (sans en préciser la nature) et que ces derniers sont titrés à une concentration de 1mg/L. 2 solutions en fin de vie ont été sorties de l'automate et placés en chambre froide (6°C). Une des solutions a vieilli pendant 2 ans et 4 mois, l'autre a vieilli pendant 9 jours.

### 3.1.1.4. Procédures

- Pour la solution datant de 2 ans et 4 mois

La solution-mère a été diluée à 0,625 mg/L dans de l'eau distillée avant d'être passée en FFF et en SEC. La chambre de séparation utilisée était celle équipée d'une fibre de 17 cm de longueur pour 0,9 cm de diamètre interne à sec. La boucle d'injection utilisée était celle de 49,873  $\mu$ L (ce qui correspond à une masse théorique d'anticorps de 31,2 ng). La solution diluée a été passée avec comme liquide porteur l'eau distillée, puis avec le PBS Duelbecco.

Le débit de la pompe a été fixé à 0,1 mL/min, le débit de sortie axiale a été fixé à 0,05 mL/min, le débit de sortie radiale a été fixé à 0,05 mL/min. Le temps de focalisation a été fixé à 5 min. Un autre essai a eu lieu avec un débit de sortie axiale fixé à 0,02 mL/min et un débit de sortie radiale fixé à 0,08 mL/min.

La solution diluée a été également passée en SEC à travers une colonne Phenomenex BioSep-SEC-s3000, de 300 mm de longueur et de 7,80 mm de diamètre interne. Le débit de la pompe au cours du run était fixé à 0,8 mL/min. La phase mobile utilisée était du PBS Duelbecco.

- Pour la solution datant de 9 jours

Un certain délai s'est écoulé entre l'utilisation des 2 solutions et quelques ajustements liés à l'évolution de la procédure ont été appliqués.

La solution-mère a été utilisée telle quelle (1 mg/L) avant d'être passée en FFF et en électrophorèse. La chambre de séparation utilisée était celle équipée d'une fibre de 24,5 cm de longueur pour 0,5 cm de diamètre interne à sec. La boucle d'injection utilisée était celle de 5,25  $\mu$ L (ce qui correspond à une masse d'anticorps de 5,25 ng). La solution diluée a été passée avec comme liquide porteur l'eau distillée uniquement.

Le débit de la pompe a été fixé à 0,1 mL/min, le débit de sortie axiale a été fixé à 0,02 mL/min, le débit de sortie radiale a été fixé à 0,08 mL/min. Le temps de focalisation a été fixé à 25 min (à un débit de 0,1 mL/min). 3 fractions ainsi que le pic de volume mort ont été collectés en sortie de détecteur.

Le pic de volume mort était compris entre un temps de 1 minute après l'injection et un temps de 3 minutes, 30 seconds après l'injection.

La première fraction a été prélevée entre un temps de 3 minutes, 30 secondes après injection et un temps de 20 minutes après injection.

La deuxième fraction a été prélevée entre un temps de 20 minutes après injection et un temps de 48 minutes, 30 secondes après injection.

La troisième fraction a été prélevée entre un temps de 48 minutes, 30 secondes après injection et un temps de 87 minutes après injection.

Un échantillon de 5,25  $\mu$ L de solution utilisée et les 3 fractions + celle du pic de volume mort obtenues en FFF ont été également ensuite précipités par un mélange d'acétone (10 % du volume d'échantillon initial) et d'acide trichloracétique (TCA)(20 % du volume d'échantillon initial), à -20°C pendant 1 heure, puis centrifugés 10 min à 14000 tours/min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le solide obtenu a été lavé à 2 reprise avec de l'acétone afin d'éliminer toute trace d'acide

trichloracétique. Ensuite, l'acétone a été éliminé et le solide obtenu a subi un séchage, puis a été réhydraté dans 10 µL de tampon approprié.

Le gel utilisé était un gel standard de polyacrylamide, non dénaturant. Un marqueur de taille standardisé (Precision Plus Protein WesternC standards) a été injecté sur le gel, puis les échantillons techniques ont été injectés, puis l'étape de migration a pris place et a duré 1 heure sous une tension de 130 V.

Ensuite, le gel a subi une étape de coloration selon la méthode au Bleu de Coomassie Blue. D'abord, le gel obtenu après migration est placé dans un bain de solution fixante (50 % de méthanol, 10 % d'acide acétique glacial, 40 % d'eau distillée) durant 1 heure sous agitation légère. Le gel est ensuite transféré vers un bain de solution de coloration (0,1 % de Bleu (brillant) de Coomassie R-250, 50 % de méthanol, 10 % d'acide acétique glacial, le reste de la solution étant de l'eau distillée) pendant 20 minutes sous agitation légère. Puis le gel est ensuite transféré vers un bain de solution de décoloration (40 % de méthanol, 10 % d'acide acétique glacial, 50 % d'eau distillée) jusqu'à ce que le fond du gel soit incolore (environ 1 heure), le gel est ensuite stocké dans une solution de stockage (solution à 5 % d'acide acétique glacial dans l'eau distillée) jusqu'à l'analyse.

### 3.1.1.5. Résultats et discussions

On obtient les résultats suivants :

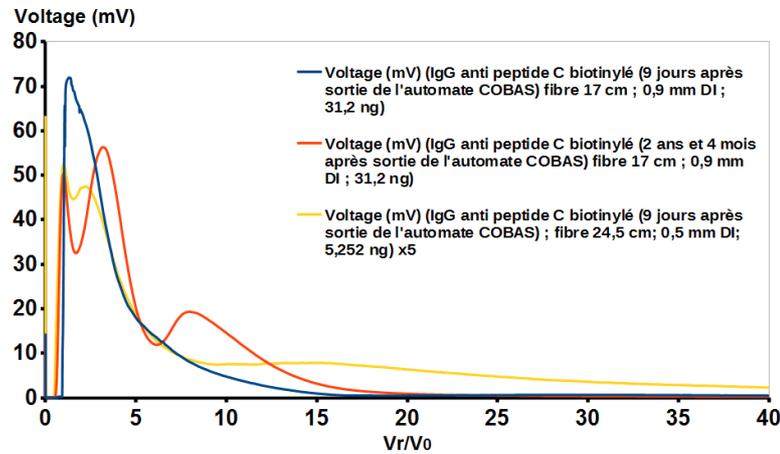


Figure 41: Comparaison des niveaux de rétention ( $V_r/V_0$ ) obtenus dans différentes conditions

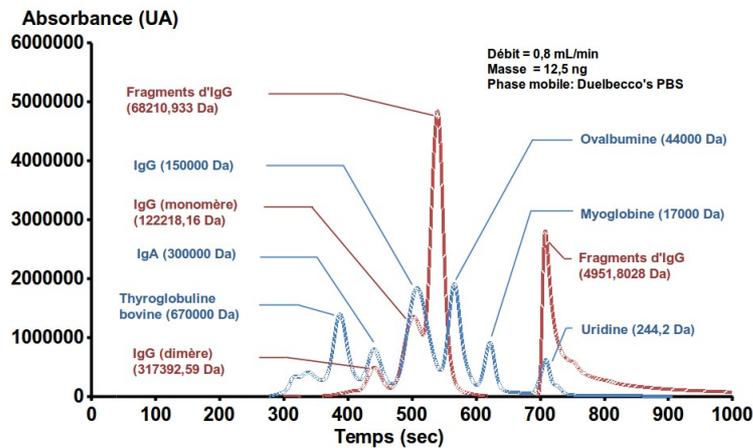


Figure 42: Passage en chromatographie d'exclusion stérique de la solution d'anticorps de 2 ans et 4 mois (courbe rouge). La courbe bleue correspond au mélange de protéines d'étalonnage.

Sur le chromatogramme de SEC d'une solution d'anticorps anti-peptide C ancienne (2 ans et 4 mois), on observe la présence de plusieurs choses. Tout

d'abord, la présence de fragments d'une taille approximative de 5000 Daltons. On observe également la présence de fragments d'une taille approximative de 68000 Daltons, en quantité importante. On observe également sur le chromatogramme de SEC la présence d'éléments d'une taille approximative de 122000 Daltons, ce qui, à priori, ne correspond pas à la taille d'une IgG (une IgG ayant une masse moléculaire d'environ 150000 Daltons). Toutefois, selon d'autres sources, des anticorps On observe également la présence d'éléments d'une taille approximative de 317000 Daltons, ce qui pourrait correspondre à priori à des multimères des anticorps injectés. En comparant les 2 figures, on observe qu'elles donnent la même information, et en observant de plus près le fractogramme, on peut penser que des agrégats de plus grande taille existe (par déconvolution). Toutefois, si c'est effectivement le cas, il est possible que ces derniers soient impossibles à mettre en évidence en SEC, la SEC étant connue pour empêcher le passage des plus gros agrégats et même d'entraîner leur fractionnement en éléments de plus petite taille.

Sur le fractogramme de cette solution, on observe la présence du pic de volume mort puis de 2 pics successifs. Intuitivement, on pourrait penser que le premier pourrait correspondre au monomère, et le deuxième, à un dimère, et à une faible quantité de polymères de plus haut poids moléculaire. Il n'y avait aucune chance de voir les fragments de très faible taille (5000 Daltons) en FFF, le cut-off de la fibre étant de 30000 Daltons. Toutefois, il est à priori possible que ces fragments aient été formés par l'application de forces de cisaillement sur les immunoglobulines en SEC, probablement de la même façon que les fragments de 68000 Daltons.

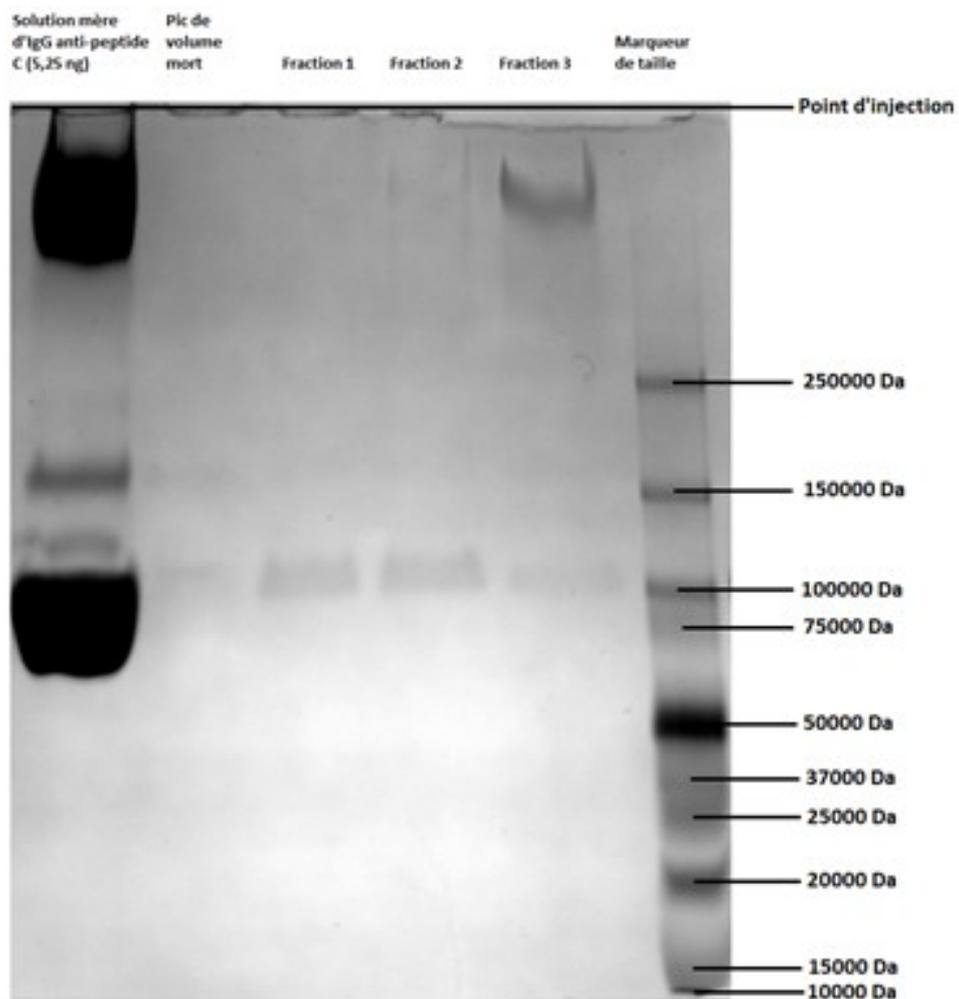


Figure 43: Passage en électrophorèse de la solution d'anticorps anti-peptide C datant de 9 jours, ainsi que des fractions issues de la FFF.

En observant l'électrophorèse d'une solution d'anticorps anti-peptide C plus récente (9 jours), on observe la présence en quantité importante d'éléments d'une masse moléculaire approximative de 100000 Daltons, correspondant vraisemblablement aux anticorps anti-peptide C biotinylés monomériques. En temps normal, la masse moléculaire d'une IgG monomérique se situe autour de 150000 Daltons. Cela pourrait s'expliquer par une séparation du fragment constant (Fc) de l'IgG (d'une masse moléculaire approximative de 50000 Daltons) par le fabricant, le fragment constant pouvant potentiellement perturber certains dosages d'immunoélectrochimie. On observe également la présence d'éléments d'une masse moléculaire de 150000 Daltons, correspondant peut-être à de l'IgG anti-peptide C native (dont le fragment constant n'a pas été séparé). Tout en haut du gel, tout près

du point d'injection, on note la présence en quantité importante d'éléments dont la masse moléculaire dépasse celle des marqueurs de taille, ce qui correspondrait à des agrégats d'IgG de grande taille. On notera aussi l'épaisseur importante des spots, qui correspond à une saturation du gel, ce qui ne concorde pas avec la faible masse d'anticorps injectée en électrophorèse (5,25 ng).

Cette solution a été passée en FFF, le volume mort et 3 fractions ont été récupérées.

Dans la partie correspondant au volume mort, on n'observe pas grand-chose, à part de légères traces d'éléments de masses moléculaires de 100000 Daltons et de 150000 Daltons.

Dans la partie correspondant à la fraction 1, on observe des traces plus nettes d'éléments de masse moléculaire de 100000 Daltons. Rien d'autre n'est observable.

Dans la partie correspondant à la fraction 2, on observe des traces d'éléments de masse moléculaire de 100000 Daltons, ainsi que des éléments de masse moléculaire importante, dépassant celle des marqueurs de taille.

Dans la partie correspondant à la fraction 3, on observe de très faibles traces d'éléments de masse moléculaire de 100000 Daltons, et des traces nettement visibles d'éléments de masse moléculaire importante.

Cela montre que la FFF a entraîné une séparation. Toutefois, étant donné la présence dans la fraction 2 d'éléments de masse moléculaire de 100000 Da et d'éléments de masse moléculaire supérieure à 250000 Da, on peut imaginer qu'un pic (ou une bosse) sur un fractogramme ne correspond pas à un seul type de macromolécule, mais plutôt à un continuum entre éléments de petite taille et éléments de plus grande taille.

En dépit du fait que la séparation selon la masse molaire a bel et bien eu lieu, il apparaît que le contenu réel du vial de réactif est complexe à identifier. Après entretien avec un membre du personnel de Roche (ingénieur à la maintenance des automates COBAS), il s'avère que la composition des réactifs n'est connue que

d'une poignée de personnes, et que la plupart des constituants (pouvant atteindre la quarantaine de produits par vial de réactif) est tenue secrète.

En réalité, la littérature montre qu'il existe un grand nombre de techniques d'ingénierie ((153)) permettant d'améliorer les capacités des anticorps (spécificité et avidité, entre autres), et qu'au final, on ne peut être sûr de rien sur la constitution de l'échantillon injecté ni de ses réactions au vieillissement.

On note également une forte différence de teinte à l'électrophorèse entre les spots obtenus avec l'échantillon injecté directement en électrophorèse et les spots obtenus pour les différentes fractions. Cela peut s'expliquer par un phénomène d'adsorption des IgG sur la membrane, qui est un phénomène régulièrement observé dans les techniques de FFF, probablement encore aggravé par le temps de focalisation important (25 min).

Aussi, il est contestable de chercher à comparer les résultats obtenus avec 2 techniques différentes (SEC et électrophorèse), sur des résultats obtenus avec des configurations différentes de la technique de fractionnement par couplage flux-force en fibre creuse. En réalité, ces manipulations n'étaient pas supposées être superposables et un concours de circonstances a forcé la situation. En réalité, un autre but était poursuivi, qui était la recherche des conditions optimales de séparation.

### **3.2. Cas d'un anticorps à visée thérapeutique : le Cétuximab**

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus courants dans le monde ((154)). Le traitement contre le cancer colorectal fait appel à une chimiothérapie en association avec l'anticorps monoclonal, le cétuximab (Erbix) qui est une immunoglobuline chimérique (humaine/murine) de type IgG1.



Figure 44: Photo commerciale d'un vial de Cetuximab

Cet anticorps monoclonal chimérique est dirigé contre le récepteur du facteur de croissance épidermique humaine (EGFR) ((155)). L'anticorps inhibe de ce fait la voie de signalisation de l'EGFR en se fixant au domaine extracellulaire du récepteur de manière spécifique. Son poids moléculaire est d'environ 152 kDa. L'intérêt clinique du cétuximab a été démontré récemment dans une méta-analyse par Li et coll((154)) où l'efficacité de l'anticorps serait liée à l'expression d'une protéine kinase G codée par le gène KRAS, située en amont de la voie de signalisation de l'EGFR. L'expression du phénotype sauvage du gène KRAS serait un biomarqueur non négligeable dans le traitement du cancer.

### **3.2.1. Matériel et méthodes**

#### **3.2.1.1. Matériel de chromatographie liquide haute performance, connectique, procédures d'utilisation**

Le matériel décrit est similaire à celui décrit dans d'autres publications du laboratoire.

3 types de liquide porteur ont été utilisés :

- De l'eau bi-distillée (produite au laboratoire de chimie analytique par osmose inverse)

- Du PBS Duelbecco (Gibco Inc, Grand Island, NY, USA)

- Du PBS Duelbecco (Gibco Inc, Grand Island, NY, USA) additionné de chlorure de sodium (Prolabo, Fontenay Sous-Bois, France) de façon à ce que la concentration en chlorure de sodium ajouté y atteigne 4 g/L.

Ces liquides ont subi une sonication de 15 minutes avant la purge de la pompe et ont été remplacés chaque semaine. Lors des changements de liquide porteur, le liquide nouvellement installé a été passé pendant 1 heure à un débit de 0,2 mL/min avant toute injection d'échantillon.

Le système d'HPLC utilisé pour faire circuler le liquide à l'intérieur du système et pour la détection est constitué d'une pompe ThermoScientific Spectra Systems P-1000XR et d'un détecteur UV ThermoScientific Spectra Systems UV150. La longueur d'onde a été fixée à 254 nm. Les données reçues par le détecteur ont été acquises par le biais d'un boîtier d'acquisition Keithley M-1111 et traitées par le logiciel d'HPLC Azur 5.0.

3 valves électroniques Rhéodyne MXP7920 (Rheodyne, Cotati, CA, USA) de 6 ports chacune ont été installées. 2 d'entre elles (notées VA et VB, voir figure) ont été utilisées afin de permuter le système entre la position de focalisation et la position d'élution. L'injection est effectuée par le biais de la troisième valve (VC). Les 3 valves étaient pilotées par l'intermédiaire d'un boîtier de commande National Instruments NI-USB-6008 ont été utilisées afin de permuter le système entre la position de focalisation et la position d'élution. Le montage permettait deux modes d'élution : une élution avec un temps de focalisation/relaxation (voir schéma figure 39A) et une élution directe sans focalisation (figure 39B). Lors d'une élution avec un temps de relaxation, les valves de focalisation étaient placées en position de relaxation (figure 39A). Une fois le temps de relaxation écoulé, la configuration des valves basculait en position d'élution de l'échantillon (voir figure 39B).

La boucle d'injection utilisée sur la valve d'injection (VC) était de 2,95  $\mu$ L.

### **3.2.1.2. Chambre de séparation**

Les chambres de séparation décrites ont été assemblées au sein du laboratoire de Chimie Analytique. Le montage commence avec le choix du composant principal, à savoir la fibre creuse, qui est composée ici de polysulfone, avec un seuil de coupure (cut-off) de 30 000 Daltons, (UFB-30, Romicon, Koch International, Lyon, France). Les fibres ont été isolées à partir d'une cartouche d'ultrafiltration Romicon UFB-30-5A, GE Healthcare (Europe GmbH Branch France/ 24 Avenue de l'Europe CS 20529/F-78457 Velizy-Villacoublay CEDEX/ France).

La chambre a été conçue avec une fibre de 0,5 cm de diamètre à sec (UFP-30-C-4MA) et d'une longueur effective de 18,5 cm (volume interne à sec = 36,3  $\mu$ L). La fibre est enchâssée dans un morceau de tubulure de Tefzel de 19,5 cm de longueur (Diamètre externe : 1/8 de pouce, Diamètre interne : 1,55 mm), et est maintenue en place avec 2 morceaux de tubulure Tefzel de 0,5 cm de long chacune (Diamètre externe : 1/16 de pouce, Diamètre interne : 0,75 mm) aux 2 extrémités. 2 capillaires PEEK de 15 cm de longueur chacun (360  $\mu$ m de diamètre externe, 150  $\mu$ m de diamètre interne côté pompe, 360  $\mu$ m de diamètre externe, 100  $\mu$ m de diamètre interne côté détecteur) ont été insérés à chaque extrémité de la fibre sur une longueur de 0,5 cm, puis sertis par un assemblage de ferrules (Upchurch).

### **3.2.1.3. Echantillon**

La solution utilisée est une solution reconstituée de Cetuximab titrée à 5 mg/mL utilisée en routine hospitalière, usagée, issue d'un retour en pharmacie après utilisation (la solution n'est jamais utilisée complètement et des surplus sont régulièrement retournés en PUI).

## **3.2.2. Résultats et discussion**

La solution-mère a été utilisée telle quelle au moment d'être passée en FFF. La boucle d'injection utilisée était celle de 2,95  $\mu$ L (ce qui correspond à une masse

théorique d'anticorps de 14,75 µg). La solution a d'abord été passée avec comme liquide porteur l'eau distillée.

Le débit de la pompe a d'abord été fixé à 0,2 mL/min, le débit de sortie axiale a été fixé à 0,072 mL/min, le débit de sortie radiale a été fixé à 0,132 mL/min, en l'absence de focalisation. L'échantillon a été injecté à plusieurs reprises afin de tester la répétabilité du système.

L'étude de répétabilité a donné les résultats suivants :

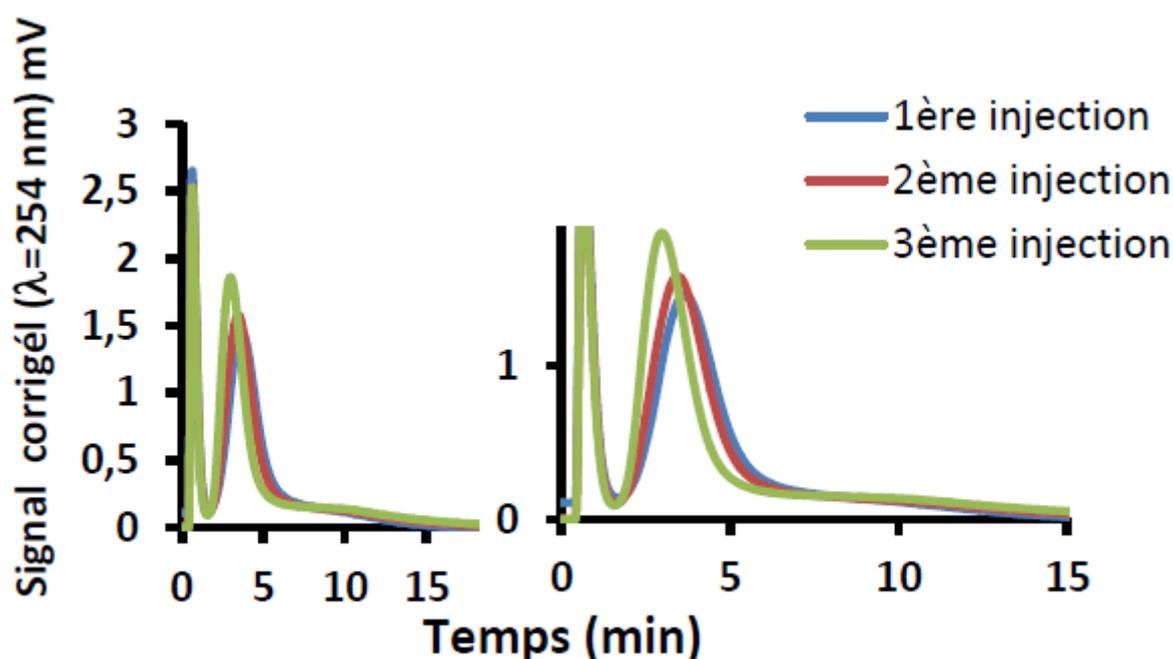


Figure 45: Premiers profils d'élution du cétuximab (injections de « conditionnement »)

On observe sur la figure 45 que les pics correspondant au volume mort, qui correspondent aux pics pour lesquels aucun analyte n'est théoriquement retenu par la colonne de séparation), se retrouvent au même temps d'élution. Les pics du volume mort sont confondus ce qui conforte un premier aspect de répétabilité lié au temps d'élution du volume mort. On observe un second pic d'élution, qui correspond à l'anticorps monoclonal, dans les 3 injections. Toutefois, le cétuximab n'est pas élué au même temps lors de 3 injections et les signaux corrigés correspondant ne sont pas répétables dans ces premières injections (figure 45). Cette non-répétabilité

s'avère transitoire comme le montreront les figures suivantes. On peut considérer qu'une étape de conditionnement de la fibre par une première succession d'injections est à prendre en compte pour les procédures d'injection ultérieures.

A la suite du conditionnement de la fibre neuve, la répétabilité des injections est étudiée dans la figure 46 dans les mêmes conditions expérimentales.

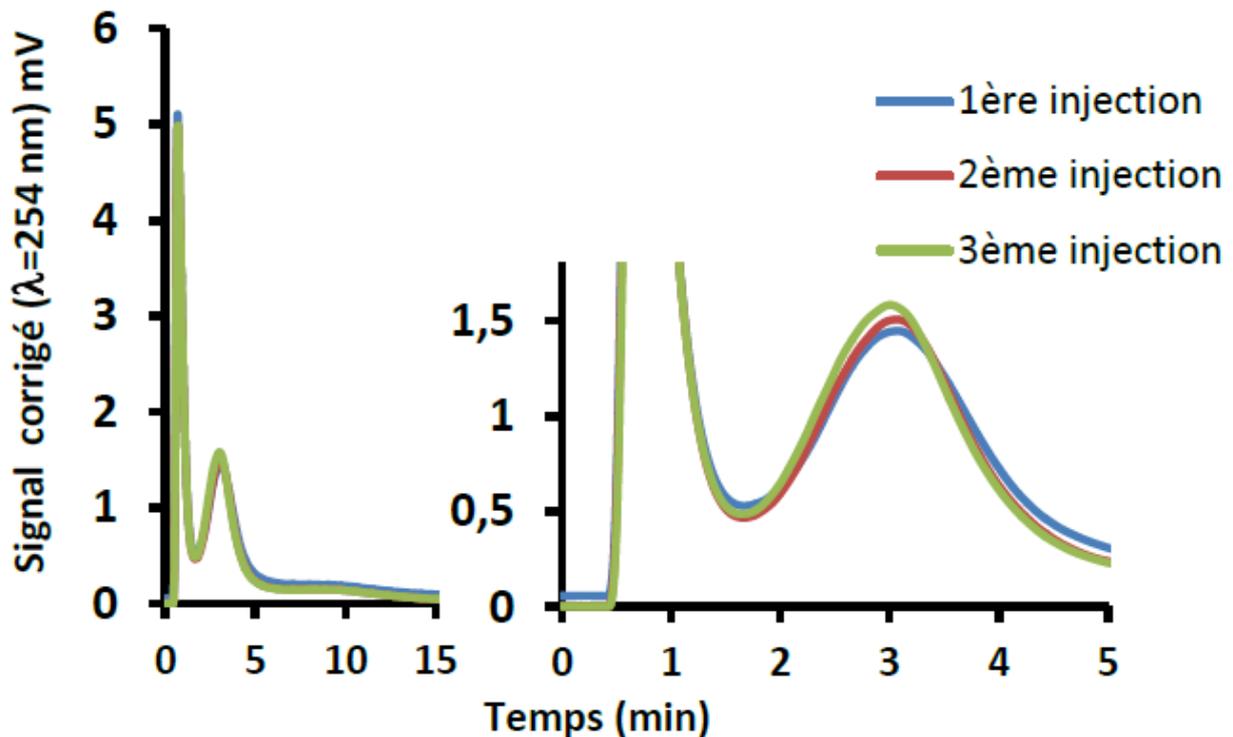


Figure 46: Essais de répétabilité après les injections de conditionnement

On note qu'entre les résultats des figure 45 et 46, une répétabilité est obtenue rapidement et durablement, ce qui est montré par la superposition des 3 profils. La fibre creuse permet donc d'éluer de façon reproductible le cétuximab dans les conditions étudiées. On retrouve les pics du volume mort et les pics correspondants à l'anticorps au même temps d'élutions respectifs. En effet, les profils d'injections tendent à se confondre à un faible débit d'entrée (0,2 mL/min).

Dans un second temps, des essais ont été effectués en modifiant le débit de la pompe, sans modifier les ratios de débits de sortie obtenus : Ainsi, le débit de la pompe a été fixé à 0,4 mL/min (le débit de sortie axiale ayant été alors mesuré à

0,124 mL/min (moyenne sur 3 injections) et le débit de sortie radiale ayant été mesuré à 0,272 mL/min (moyenne sur 3 injections)), puis après 3 injections en l'absence de focalisation, a été réglé à 0,5 mL/min (le débit de sortie axiale ayant été mesuré à 0,179 mL/min (moyenne sur 3 injections) et le débit de sortie radiale ayant été mesuré à 0,347 mL/min (moyenne sur 3 injections)).

Débit d'entrée	Débit axial	Débit radial	Ratio débit radial/débit axial
0,2 mL/min	0,072 mL/min	0,132 mL/min	1,833
0,4 mL/min	0,124 mL/min	0,272 mL/min	2,194
0,5 mL/min	0,179 mL/min	0,347 mL/min	1,939

Tableau 4 : Mesures des débits et ratios de débits

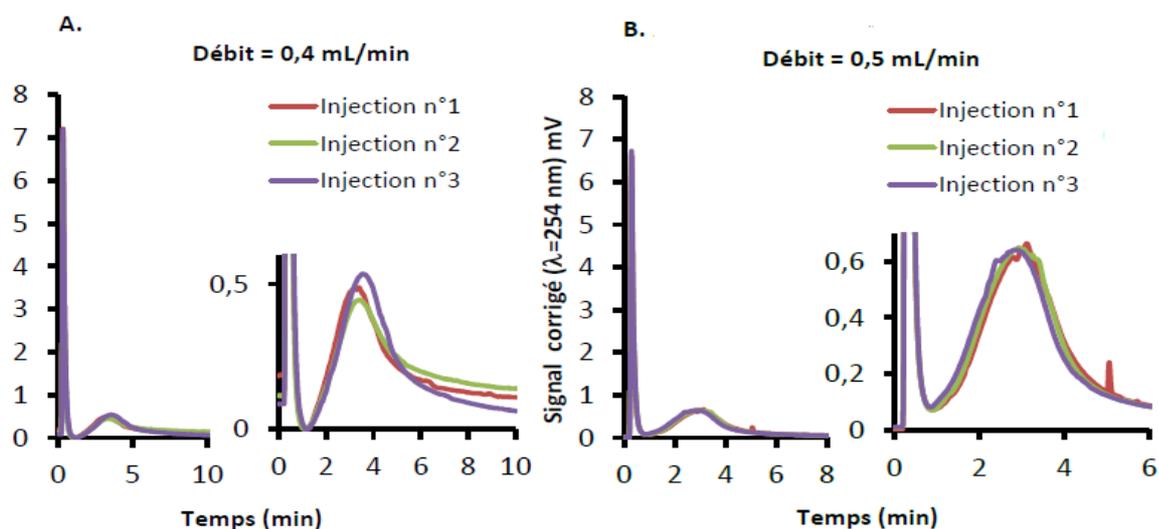


Figure 47: Répétition d'injections de cétuximab en FFF après modification du débit d'entrée de la pompe

Les mesures de temps ont été transformées en niveaux de rétention (voir formule (25) et figure 48).

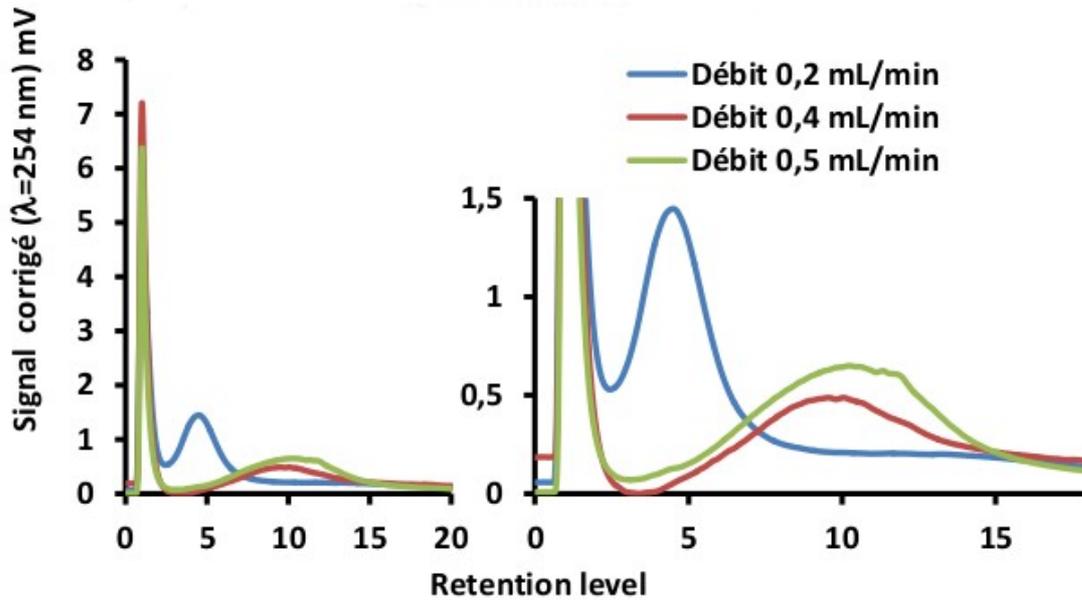


Figure 48: Profils d'élution corrigés par le niveau de rétention pour chaque débit d'entrée

Dans un troisième temps, l'effet de la phase mobile a été étudié. Le débit de la pompe a été fixé à 0,2 mL/min. Toujours sans focalisation, 3 injections ont été effectuées sous PBS, et 3 injections ont été effectuées sous PBS avec chlorure de sodium ajouté.

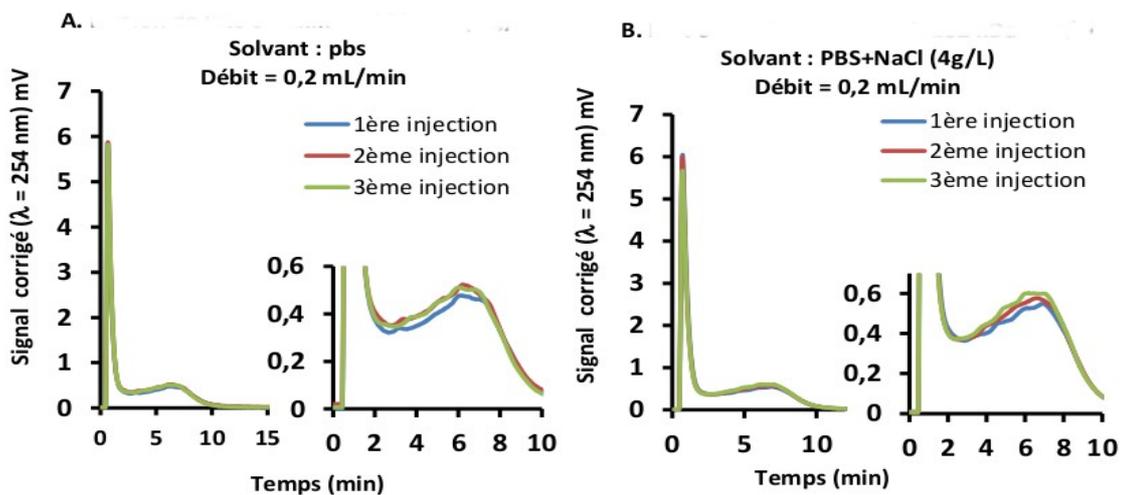


Figure 49: Elution du cétuximab dans du PBS (A) et dans du PBS additionné de chlorure de sodium pour atteindre une concentration en chlorure de sodium ajouté de 4g/L (B)

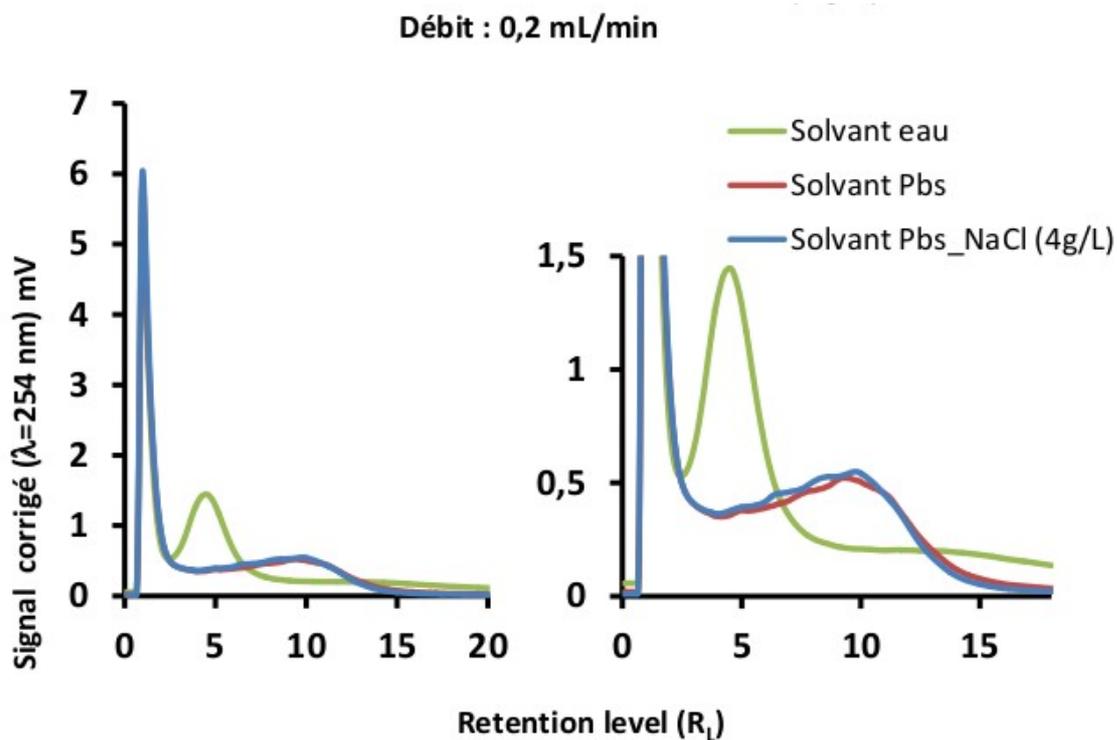


Figure 50: Profils d'éluion du cétuximab dans les 3 liquides porteurs étudiés, corrigés par le niveau de rétention

On observe que dans tous les cas, le niveau de rétention est supérieur à 3,3 (ce qui correspond à un  $\lambda < 0,05$ ) ((156)), ce qui démontre que le système est efficace pour la séparation.

On observe également que l'osmolarité du liquide porteur a tendance à allonger les temps de rétention des pics. Toutefois, étant donné ce qui a été observé dans la littérature sur l'impact de l'osmolarité sur les interactions particule-membrane et particule-particule, cet effet est probablement dû à un effet combiné de l'association entre macromolécules de cétuximab et à l'interaction de macromolécules de cétuximab avec la membrane.

Pour finir, la durée de la focalisation a été étudiée, sous eau distillée uniquement. La position de focalisation a été estimée à 50 % de la longueur de la fibre creuse. 7 valeurs de temps ont été sélectionnées : 4 secondes, 8 secondes, 24 secondes, 32 secondes, 40 secondes, 64 secondes et 88 secondes. Le débit

d'entrée de la pompe a été fixé à 0,2 mL/min et les valeurs des débits de sortie axiale et radiale correspondent aux valeurs du tableau 4.

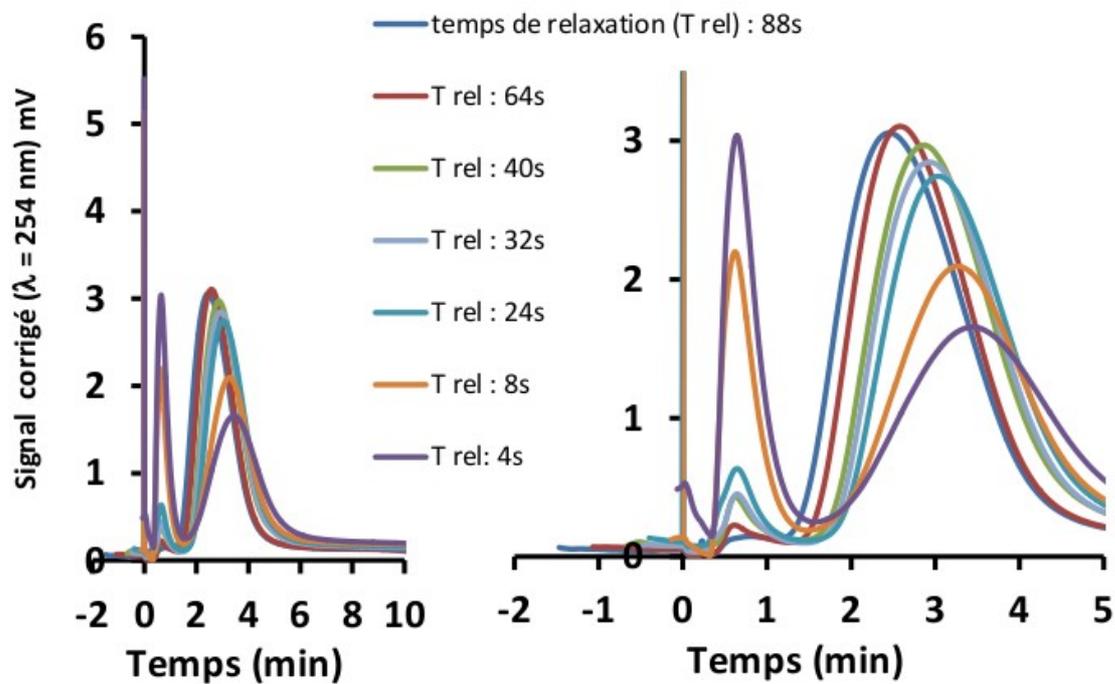


Figure 51: Effet de différents temps de focalisation sur l'élution du cétuximab

On observe qu'une modification du temps de focalisation a un impact significatif sur la résolution et l'élargissement des pics, ainsi que sur l'aire sous la courbe du pic de volume mort.

### **3.3. Essais sur billes de latex**

#### **3.3.1. Matériel et méthodes**

##### **3.3.1.1. Matériel de chromatographie liquide haute performance, connectique, procédures d'utilisation**

Le matériel décrit est similaire à celui décrit dans d'autres publications du laboratoire.

Du PBS Duelbecco a été utilisé. Ce liquide a subi une sonication de 15 minutes avant la purge de la pompe et a été remplacé chaque semaine.

Le système d'HPLC utilisé pour faire circuler le liquide à l'intérieur du système et pour la détection est constitué d'une pompe ThermoScientific Spectra Systems P-1500 et d'un détecteur UV ThermoScientific Spectra Systems UV150. La longueur d'onde a été fixée à 280 nm.

L'injection est effectuée par le biais d'une valve à six ports Valco-VICI, contrôlée manuellement par un actuateur à 2 positions, où la position d'injection (A) permet d'injecter un volume d'échantillon correspondant à celui de la boucle d'injection, et la position d'élution (B) permet son élution vers l'intérieur de la fibre creuse. Une boucle d'injection de 23,07  $\mu\text{L}$  a été utilisée.

Une valve SS-SS1 VH (Nupro, Willoughby, OH, USA) dont le zéro a été ajustée à la butée à été utilisée pour contrôler le flux radial.

2 valves électroniques Rhéodyne MXII Series (notées VA et VB, voir figure 39) pilotées par un script LabView, par l'intermédiaire d'un boîtier de commande National Instruments NI-USB-6008 ont été utilisées afin de permuter le système entre la position de focalisation et la position d'élution.

Les tubulures de connexion ont été choisies de manière à réduire au maximum les volumes morts et les modifications de pression lors des permutations de valves.

Une procédure similaire à celle déjà décrite par Moon et Reschiglian ((152)) a été mise en place pour l'injection de l'échantillon.

Une injection se déroule en 2 étapes :

- La phase d'injection, avec l'injection de l'échantillon dans le système, déjà en position de focalisation
- La phase d'élution, avec le passage des valves VA et VB en position d'élution et la libération de l'échantillon vers la lumière de la fibre.

### **3.3.1.2. Chambre de séparation**

Les chambres de séparation décrites ont été assemblées au sein du laboratoire de Chimie Analytique. Le montage commence avec le choix du composant principal, à savoir la fibre creuse, qui est composée ici de polysulfone, avec un seuil de coupure (cut-off) de 30 000 Daltons, (UFB-30, Romicon, Koch International, Lyon, France). Les fibres ont été isolées à partir d'une cartouche d'ultrafiltration Romicon UFB-30-5A, GE Healthcare (Europe GmbH Branch France/ 24 Avenue de l'Europe CS 20529/F-78457 Velizy-Villacoublay CEDEX/ France).

La chambre de séparation utilisée a été conçue avec une fibre de 0,5 cm de diamètre à sec (UFP-30-C-4MA) et d'une longueur effective de 23,5 cm (volume interne à sec = 48,1  $\mu$ L). La fibre est enchâssée dans un morceau de tubulure de Tefzel de 24,5 cm de longueur (Diamètre externe : 1/8 de pouce, Diamètre interne : 1,55 mm), et est maintenue en place avec 2 morceaux de tubulure Tefzel de 0,5 cm de long chacune (Diamètre externe : 1/16 de pouce, Diamètre interne : 0,75 mm) aux 2 extrémités. 2 capillaires PEEK de 10 cm de longueur chacun (360  $\mu$ m de diamètre externe, 100  $\mu$ m de diamètre interne) ont été insérés à chaque extrémité de la fibre sur une longueur de 0,5 cm, puis sertis par un assemblage de ferrules (Upchurch).

### **3.3.1.3. Echantillons**

Les échantillons utilisés étaient des billes de contrôle (constituées de latex de polystyrène) utilisées dans l'établissement du contrôle de l'exactitude des mesures de taille d'un appareil appelé Coulter (modèle N4 Plus) utilisant le principe de la dispersion de lumière pour établir des mesures de taille. Des billes de latex de 50 nm de diamètre et de 100 nm de diamètre ont été passées en FFF sur notre chaîne. Les suspensions se présentent sous la forme d'un liquide trouble. Un surfactant est présent dans la suspension afin d'éviter la floculation/sédimentation des suspensions.

Un échantillon de suspension de billes de 50 nm a été utilisé tel quel, un échantillon de suspension de billes de 100 nm de diamètre l'a été également.

Un mélange des 2 suspensions à volume égal a été également passé.

### **3.3.2. Résultats et discussion**

Le débit de la pompe a d'abord été fixé à 0,2 mL/min, le débit de sortie axiale a été mesuré à 0,151 mL/min, le débit de sortie radiale a été mesuré à 0,053 mL/min, avec 10 min de focalisation. La localisation du point de focalisation a été estimée à la moitié de la longueur de la fibre.

Les résultats suivants, matérialisés par la figure 52, ont été obtenus.

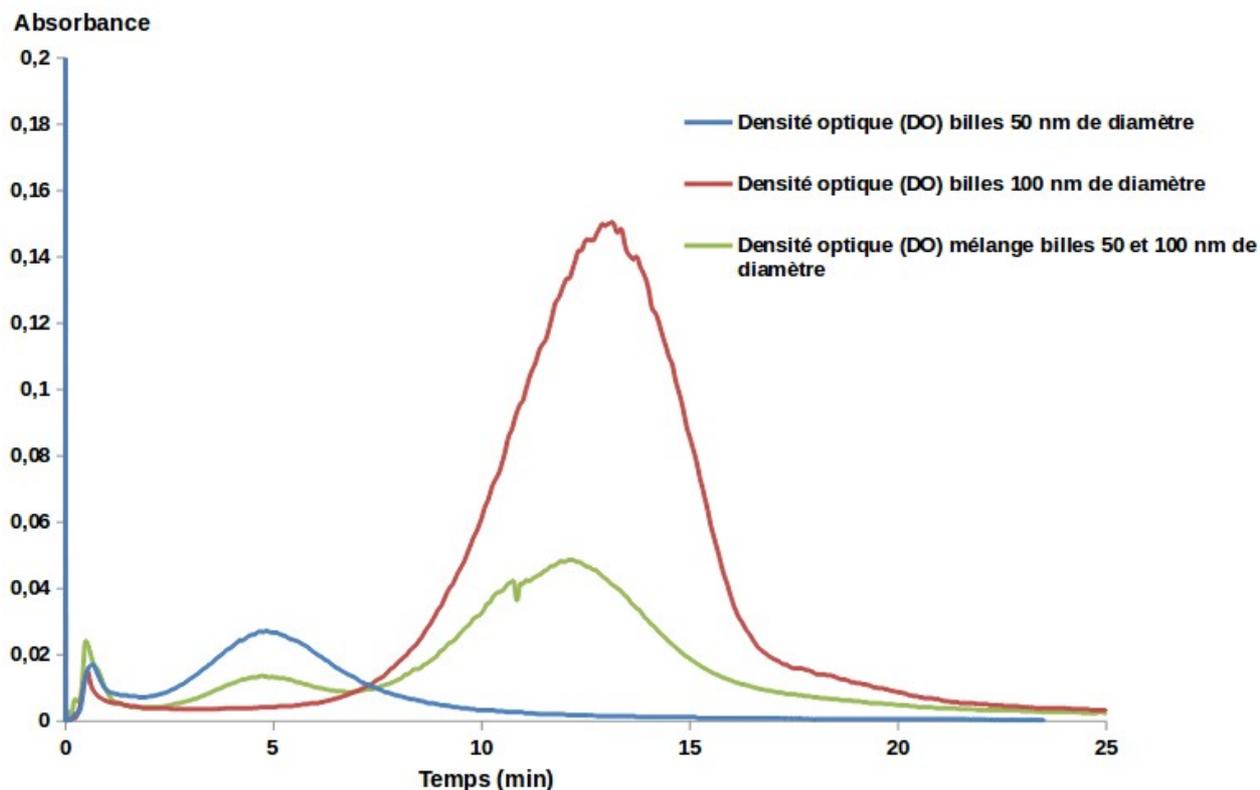


Figure 52: Temps de rétention obtenus après un passage en FFF de billes de 50 nm de diamètre, de billes de 100 nm de diamètre et d'un mélange des deux

On peut noter que les temps de rétention obtenus pour le mélange des billes de 50 nm et de 100 nm de diamètre correspond aux temps de rétention obtenus pour les passages séparés des suspensions des billes de 50 et de 100 nm de diamètre.

Dans un second temps, des essais ont été effectués sur le mélange de billes de 50 et de 100 nm de diamètre, dans les mêmes conditions, avec un temps de focalisation identique, en modifiant le débit de la pompe, sans modifier le débit de sortie radiale (ou, tout du moins, en le conservant au maximum au voisinage de 0,053 mL/min). Ainsi, le débit de la pompe a été fixé à 0,1 mL/min et la valve de sortie radiale a été rajustée. Le débit de sortie axiale a été alors mesuré à 0,042 mL/min, et le débit de sortie radiale a été mesuré à 0,06 mL/min. La courbe obtenue a été superposée avec celle obtenue à la figure 52.

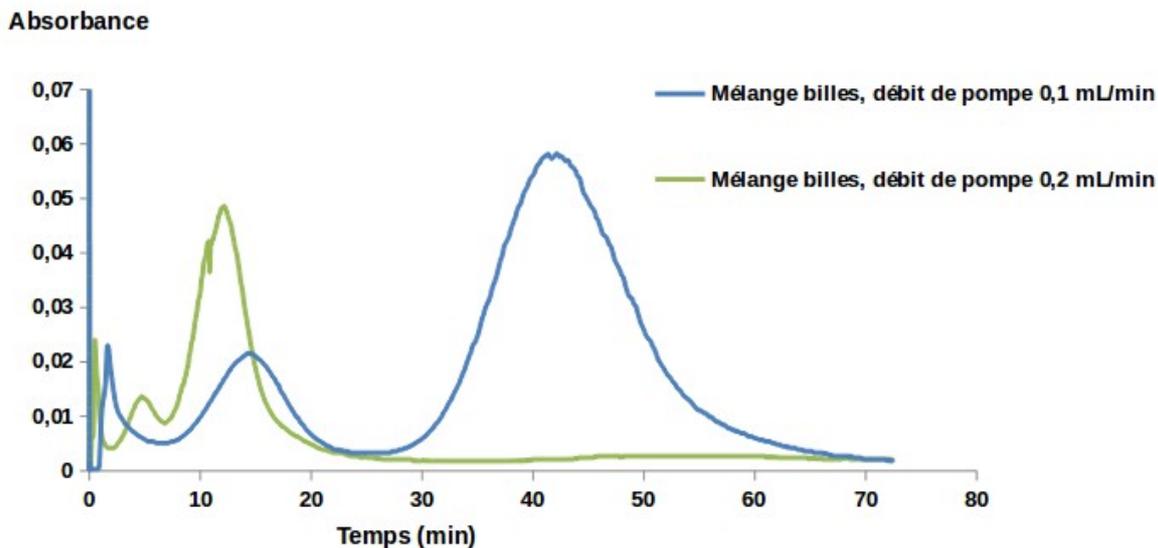


Figure 53: Comparaison des profils obtenus après un passage en FFF du mélange de billes de 50 nm de diamètre et de billes de 100 nm de diamètre, à des débits de pompe de 0,1 mL/min (courbe bleue) et de 0,2 mL/min (courbe verte), avec des débits de sortie radiale voisins

Une comparaison entre les 2 essais montre qu'avec un débit radial comparable, un débit axial fort donne une résolution médiocre entre les pics, mais entraîne la formation de pics plus fins sur le fractogramme, pour un résultat obtenu avec un temps de manipulation plus court. A contrario, un débit axial faible donnera une très bonne résolution entre les pics, mais entraînera la formation de pics plus larges, pour un temps de manipulation considérablement allongé. En outre, on observe qu'après calcul des rapports des temps de rétention pour les 2 essais (100 nm/50 nm), ceux-ci sont quasi-identiques.

Les hauteurs des pics sont difficilement interprétables, les signaux obtenus en spectrométrie UV dépendent à la fois de l'absorbance à la longueur d'onde concernée mais aussi de la turbidimétrie, qui dépend de la valeur du rayon hydrodynamique mais aussi de la forme des particules. Les coffrets de billes de latex ne comprennent aucune valeur de concentration, et on part d'un à priori selon lequel les particules sont sphériques.

## Conclusion

Au final, difficile de conclure quelque chose. Il est admis depuis les années 60 que les techniques de fractionnement par couplage flux-force en flux hydrodynamique permettent la séparation de macromolécules, de particules, de corps, de dimensions allant du nanomètre au micromètre. Ce qui est toutefois sûr est que la FFF est un ensemble de techniques dont le principe est en apparence simple, mais dont la multitude de phénomènes physico-chimiques mis en jeu complique sérieusement la donne. La théorie et les formules élaborées par Giddings et d'autres chimistes de renom expliquent énormément de choses, mais eux-mêmes admettent les limites de ces théories en impliquant l'utilisation d'approximations (particules sphériques, profil parabolique du flux (ce qui en pratique n'est d'ailleurs pas toujours vrai) ((13))) sur ces phénomènes. La compréhension de ces phénomènes nécessitera l'intégration d'une connaissance extensive de la mécanique des fluides, du comportement des particules en suspension, de la façon dont elles interagissent entre elles, avec leur milieu, avec les surfaces. Les techniques de modélisation informatique associées à la compréhension de ces phénomènes ne s'appliquent que dans des cas relativement simples. La diversité des mécanismes mis en jeu induit de fait une forte versatilité de cet ensemble de techniques, et un énorme potentiel d'informations à récolter, ainsi qu'un grand nombre de questions : quel est le but exact de la méthode, quels seront les résultats à obtenir, quels sont les paramètres (potentiellement) gênants (la quantité est incommensurable au vu des mécanismes mis en jeu), dans quelle mesure seront-ils gênants, quel moyen de détection utiliser pour la récupération des données, comment les interpréter... Les réponses à ces questions sont loin d'être une évidence à l'heure actuelle.

A partir de là, on peut commencer à répondre à certaines questions abordées dans l'introduction. La FFF hydrodynamique a été présentée comme une alternative simple et peu coûteuse à d'autres méthodes de référence à la chromatographie d'exclusion stérique et à l'ultracentrifugation analytique.

Au risque de me répéter, la quantité de phénomènes physico-chimiques mis en jeu lors d'un run font voler l'argument de la simplicité en éclats. Il n'existe pas de méthode simple : uniquement des compromis, par exemple entre l'utilisation d'une

certaine phase mobile, de l'application d'un certain débit de pompe, de l'application d'une certaine force de champ (directement liée au débit de sortie latérale) de l'utilisation d'un certain type de membrane aux caractéristiques plus ou moins définies (matière, mode de fabrication, traitement physico-chimique préalable...) et de leur impact sur la modification de conformation ou d'agrégation, définitive ou transitoire (un facteur encore très variable selon les conditions) ((6)) des particules ou macromolécules analysées, et par conséquent, de leur forme, de leur hydrophobie, des interactions attractives ou répulsives entre elles, avec d'autres analytes (avec toutes les modifications que cela est susceptible d'infliger au coefficient de diffusion ou au temps de rétention), avec les parois de la chambre de séparation... sans parler de l'influence d'autres paramètres souvent négligés (température...). La membrane est également sujette à des altérations sur la durée (formation d'une couche de résidus obstruant les pores, dilatation ou contraction, gonflement de la structure, usure...), ce qui pose des questions sur la répétabilité, la reproductibilité des essais, et surtout sur la réelle nature du cahier des charges auquel devraient souscrire les membranes utilisées. Sans parler des systèmes de détection : type de détecteur (le détecteur UV étant l'exemple le plus couramment utilisé, la valeur qu'il produit dépend de l'absorbance liée à la loi de Beer-Lambert, mais qui dans le cadre des particules et des macromolécules, dépend également de la turbidimétrie, liée intimement à la forme et à la taille des particules) et surtout du volume mort de la cellule de détection. Le prétraitement des échantillons les plus complexes sera également un problème à prendre en compte.

On en arrive au deuxième argument, le coût, annoncé comme bas. Mis à part le coût de l'appareillage standard d'HPLC, les chambres de séparation ne coûtent apparemment pas grand-chose, étant donné que le plus souvent, les équipes ont construit leur propre matériel (ce qui a posé au départ quelques problèmes de fuites liées à la fiabilité des assemblages). Les membranes en elles-mêmes ne coûtaient pas grand-chose, étant récupérées sur des appareils d'ultrafiltration. Le problème est que ces membranes n'ont jamais été étudiées pour la FFF, et que par conséquent, un cahier des charges sera à définir pour chaque membrane en fonction de son application voulue (type de membrane, de traitement, durabilité, résistance, rigidité). Une telle dynamique a été observée pour les colonnes de chromatographie (les premiers modèles étaient construits en interne, alors qu'aujourd'hui, certains

modèles construits industriellement atteignent le millier d'euros). Le coût risque donc d'être en réalité plus complexe à estimer.

Quant au fait de servir d'alternative à la chromatographie d'exclusion stérique, il est peu probable. La chromatographie d'exclusion stérique est suffisamment rentrée dans les mœurs et les protocoles d'utilisation fiables sont légion. Le problème des interactions particule-particule et particule-phase stationnaire (ou particule-membrane dans le cas de la FFF) est présent dans tous les cas. Quant au problème de cisaillement, il n'est significatif en chromatographie d'exclusion stérique que pour les polymères les plus gros (autour de 670000 Da, à ajuster selon la concentration de l'échantillon et les conditions de départ) (157)). L'intérêt de la FFF hydrodynamique résidera probablement dans l'étude des nanoparticules artificielles ou naturelles telles que les exosomes (ce qui ouvre des perspectives en matière de diagnostic)

Au final, l'amélioration des techniques de FFF dépendra d'une prise en charge pluridisciplinaire regroupant diverses disciplines telles que la thermodynamique, la science des membranes, l'informatique (pour la modélisation)... La chimie analytique est relativement secondaire dans le sens où l'intérêt de l'analyste est d'utiliser une technique robuste et fiable en vue d'obtenir un résultat donné selon une procédure donnée.

## Bibliographie

1. Zhong X, Loh E, Corbo M, Neumann P. Recent advances in biotherapeutics drug discovery and development [Internet]. INTECH Open Access Publisher; 2011 [cité 1 sept 2015]. Disponible sur: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/25234.pdf>
2. Ueda T. Next-generation optimized biotherapeutics — A review and preclinical study. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. nov 2014;1844(11):2053-7.
3. Patel J, Kothari R, Tunga R, Ritter NM, Tunga BS. Stability considerations for biopharmaceuticals, Part 1 overview of protein and peptide degradation pathways. *BioProcess Int*. 2011;9(1):20-31.
4. Rathore N, Rajan RS. Current Perspectives on Stability of Protein Drug Products during Formulation, Fill and Finish Operations. *Biotechnol Prog*. 6 juin 2008;24(3):504-14.
5. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov*. avr 2005;4(4):298-306.
6. Philo JS. Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? *AAPS J*. 2006;8(3):E564-71.
7. Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Sci Publ Protein Soc*. sept 2002;11(9):2067-79.
8. Andrea Balbo, Peter Schuck. Chapter 14 - Analytical Ultracentrifugation in the Study of Protein Self-association and Heterogeneous Protein-Protein Interactions. In: *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual - 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005.
9. Paula Hong, Stephan Koza, Edouard S. P. Bouvier. A REVIEW SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY FOR THE ANALYSIS OF PROTEIN BIOTHERAPEUTICS AND THEIR AGGREGATES. *J Liq Chromatogr*. 2012;35:2923-50.
10. J. Calvin Giddings. Field-Flow Fractionation: Analysis of Macromolecular, Colloidal, and Particulate Materials. *Science*. 4 juin 1993;260:1456-65.
11. Fraunhofer W, Winter G. The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*. sept 2004;58(2):369-83.
12. Grushka E, Caldwell KD, Myers MN, Giddings JC. Field Flow Fractionation. *Sep Purif Rev*. janv 1973;2(1):127-51.

13. Brown PR, Grushka E. *Advances in chromatography. a Tribute to J. Calvin Giddings Volume 39*. New York: Marcel Dekker; 1998.
14. Provder T, éditeur. *Chromatography of Polymers: Characterization by SEC and FFF* [Internet]. Washington, DC: American Chemical Society; 1993 [cité 17 août 2015]. (ACS Symposium Series; vol. 521). Disponible sur: <http://pubs.acs.org/doi/book/10.1021/bk-1993-0521>
15. Martin E. Schimpf, Karin D. Caldwell, J. Calvin Giddings. *Field-Flow Fractionation Handbook*. Wiley & Sons; 2000. 592 p.
16. Krantz WB. *Scaling analysis in modeling transport and reaction processes: a systematic approach to model building and the art of approximation*. [New York] : Hoboken, N.J: AIChE ; Wiley-Interscience; 2007. 529 p.
17. Giddings JC. *Unified separation science*. New York: Wiley; 1991. 320 p.
18. Wahlund K-G. Flow field-flow fractionation: Critical overview. *J Chromatogr A*. avr 2013;1287:97-112.
19. Dill KA, Bromberg S. *Molecular driving forces: statistical thermodynamics in chemistry and biology*. New York, NY: Garland Science; 2003. 666 p.
20. Batchelor GK. *An introduction to fluid dynamics*. 1. Cambridge mathematical ed., 14. print. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 2010. 615 p. (Cambridge mathematical library).
21. M. Van Bruijnsvoort, R. Tijssen, Wim Th. Kok. Assessment of the Diffusional Behavior of Polystyrene Sulfonates in the Dilute Regime by Hollow-Fiber Flow Field Flow Fractionation. *J Polym Sci Part B Polym Phys*. 1 août 2001;39(15):1756-65.
22. Williams SKR, Benincasa M-A. Field-flow fractionation in analysis of polymers and rubbers. *Encycl Anal Chem Instrum Appl Wiley Chichester*. 2000;7582-608.
23. Kevin J. Wilkinson, Jamie R. Lead. *Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Separation and Characterisation*. International Union of Pure and Applied Chemistry, éditeur. Boca Raton, Fla.: Wiley; 2007. 554 p. (Environmental analytical and physical chemistry series).
24. Gajdos LJ, Brenner H. Field-Flow Fractionation: Extensions to Nonspherical Particles and Wall Effects. *Sep Sci Technol*. mars 1978;13(3):215-40.

25. Beckett R, Giddings JC. Entropic contribution to the retention of nonspherical particles in field-flow fractionation. *J Colloid Interface Sci.* 1997;186(1):53-9.
26. Beckett R, Giddings JC. Entropic contribution to the retention of nonspherical particles in field-flow fractionation. *J Colloid Interface Sci.* 1997;186(1):53-9.
27. J. Calvin Giddings, P. Stephen Williams, Ronald Beckett. Fractionating Power in Programmed Field-Flow Fractionation: Exponential Sedimentation Field Decay. *Anal Chem.* janv 1987;59(1):28-37.
28. Marcus N. Myers, J. Calvin Giddings. Properties of the Transition from Normal to Steric Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* 1982;54:2284-9.
29. Giddings JC. A Pinched Inlet System for Reduced Relaxation Effects and Stopless Flow Injection in Field-Flow Fractionation. *Sep Sci Technol.* juill 1989;24(9-10):755-68.
30. Dettmer-Wilde K, Engewald W, éditeurs. *Practical Gas Chromatography* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cité 17 août 2015]. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-54640-2>
31. Karl-Gustav Wahlund, Helen S. Winegarner, Karin Dahlgren Caldwell, J. Calvin Giddings. Improved Flow Field-Flow Fractionation Water-Soluble Polymers: Programming, Splitting, and Flow Optimization. *Anal Chem.* 1986;58:573-8.
32. Williams PS, Giddings JC, Beckett R. Fractionating Power in Sedimentation Field-Flow Fractionation with Linear and Parabolic Field Decay Programming. *J Liq Chromatogr.* juin 1987;10(8-9):1961-98.
33. Giddings JC. Parameters for Optimum Separations in Field-Flow Fractionation. *Sep Sci.* oct 1973;8(5):567-75.
34. Min-Kuang Liu, P. Stephen Williams, Marcus N. Myers, J. Calvin Giddings. Hydrodynamic Relaxation in Flow Field-Flow Fractionation Using Both Split and Frit Inlets. *Anal Chem.* 1991;63:2115-22.
35. Giddings JC, Yoon YH, Caldwell KD, Myers MN, Hovingh ME. Nonequilibrium Plate Height for Field-Flow Fractionation in Ideal Parallel Plate Columns. *Sep Sci.* août 1975;10(4):447-60.
36. Anne Litzén. Zone Broadening and Dilution in Rectangular and Trapezoidal Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channels. *Anal Chem.* 1991;63:1001-7.

37. J. Calvin Giddings, Mark R. Schure, Marcus N. Myers, George R. Velez. End Effects in Field-Flow Fractionation Channels: Theory and Means for Reducing Incremental Zone Broadening. *Anal Chem.* 1984;56:2099-104.
38. J. Calvin Giddings, Karin D. Caldwell, John F. Moellmer, Thomas H. Dickinson, Marcus N. Myers, Michel Martin. Flow Programmed Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* janv 1979;51(1):30-3.
39. Fraunhofer W, Winter G. The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm.* sept 2004;58(2):369-83.
40. J. Calvin Giddings. Optimized Field-Flow Fractionation System Based on Dual Stream Splitters. *Anal Chem.* 1985;57:945-7.
41. J. Calvin Giddings. Hydrodynamic Relaxation and Sample Concentration in Field-Flow Fractionation Using Permeable Wall Elements. *Anal Chem.* 1990;62:2306-12.
42. J. Calvin Giddings. Non-equilibrium and diffusion: A common basis for theories of chromatography. *J Chromatogr.* 1959;2:44-52.
43. Margo Eikelberger Hovingh, Gary H. Thompson, J. Calvin Giddings. Column Parameters in Thermal Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* févr 1970;42(2):195-203.
44. Seungho Lee, Marcus N. Myers, J. Calvin Giddings. Hydrodynamic Relaxation Using Stopless Flow Injection in Split Inlet Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* 1989;61:2439-44.
45. J. Calvin Giddings, Karin D. Caldwell. Field-Flow Fractionation: Choices in Programmed and Nonprogrammed Operation. *Anal Chem.* 1984;56:2093-9.
46. Giddings JC. A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities. *Sep Sci.* janv 1966;1(1):123-5.
47. Gary H. Thompson, Marcus N. Myers, J. Calvin Giddings. Thermal Field-Flow Fractionation of Polystyrene Samples. *Anal Chem.* août 1969;41(10):1219-22.
48. J. Calvin Giddings, LaRell K. Smith, Marcus N. Myers. Programmed Thermal Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* sept 1976;48(11):1587-92.
49. Frank J. F. Yang, Marcus N. Myers, J. Calvin Giddings. Programmed Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* nov 1974;46(13):1924-30.

50. A. Litzén, Karl-Gustav Wahlund. Improved separation speed and efficiency for proteins, nucleic acids and viruses in asymmetrical flow field-flow fractionation. *J Chromatogr.* 1989;476:413-21.
51. Yau WW, Kirkland JJ. Retention Characteristics of Time-Delayed Exponential Field-Programmed Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Sep Sci Technol.* juill 1981;16(6):577-605.
52. Zhu, Frankema W, Huo Y, Kok WT. Studying Protein Aggregation by Programmed Flow Field-Flow Fractionation Using Ceramic Hollow Fibers. *Anal Chem.* juill 2005;77(14):4581-6.
53. P. Stephen Williams, J. Calvin Giddings. Power Programmed Field-Flow Fractionation: A New Program Form for Improved Uniformity of Fractionating Power. *Anal Chem.* 1987;59:2038-44.
54. Seungho Lee, J. Calvin Giddings. Experimental Observation of Steric Transition Phenomena in Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* 1988;60:2328-33.
55. Giddings JC. Displacement and Dispersion of Particles of Finite Size in Flow Channels with Lateral Forces. *Field-Flow Fractionation and Hydrodynamic Chromatography.* *Sep Sci Technol.* mars 1978;13(3):241-54.
56. Jan Ake Jönsson, Alf Carlshaf. Flow Field-Flow Fractionation in Hollow Cylindrical Fibers. *Anal Chem.* 1989;61:11-8.
57. Wolfgang Fraunhofer. *Asymmetrical Flow Field-Flow-Fractionation in Pharmaceutical Analytics - Investigations in Aggregation Tendencies of Pharmaceutical Antibodies.* [Munich]: Ludwig Maximilians; 2003.
58. S. Kim Ratanathanawongs, J. Calvin Giddings. Dual-Field and Flow-Programmed Lift Hyperlayer Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* 1992;64:6-15.
59. Peterson RE, Myers MN, Giddings JC. Characterization of Steric Field-Flow Fractionation Using Particles to 100  $\mu\text{m}$  Diameter. *Sep Sci Technol.* avr 1984;19(4-5):307-19.
60. Caldwell KD, Nguyen TT, Myers MN, Giddings JC. Observations on Anomalous Retention in Steric Field-Flow Fractionation. *Sep Sci Technol.* déc 1979;14(10):935-46.
61. Messaud FA, Sanderson RD, Runyon JR, Otte T, Pasch H, Williams SKR. An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Prog Polym Sci.* avr 2009;34(4):351-68.

62. Influence of Lecithin on Structure and Stability of Parenteral Fat Emulsions [Internet]. [cité 21 août 2015]. Disponible sur: [http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph\\_Wabel/html/](http://www2.chemie.uni-erlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph_Wabel/html/)
63. Giddings JC. Crossflow Gradients in Thin Channels for Separation by Hyperlayer FFF, SPLIT Cells, Elutriation, and Related Methods. *Sep Sci Technol.* oct 1986;21(8):831-43.
64. Frank J. F. Yang, Marcus N. Myers, J. Calvin Giddings. Peak Shifts and Distortion Due to Solute Relaxation in Flow Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* avr 1977;49(4):659-62.
65. Myeong Hee Moon, Hansun Kwon, Ilyong Park. Stopless Flow Injection in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Using a Frit Inlet. *Anal Chem.* 1 avr 1997;69(7):1436-40.
66. Ping Li, Marcia Hansen, J. Calvin Giddings. Advances in Frit-Inlet and Frit-Outlet Flow Field-Flow Fractionation. *J Microcolumn Sep.* 1998;10(1):7-18.
67. Karl-Gustav Wahlund, J. Calvin Giddings. Properties of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall. *Anal Chem.* 1 mai 1987;59:1332-9.
68. Moon MH, Hwang I. HYDRODYNAMIC VS. FOCUSING RELAXATION IN ASYMMETRICAL FLOW FIELD-FLOW FRACTIONATION. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 31 déc 2001;24(20):3069-83.
69. John Calvin Giddings. Method and apparatus for hydrodynamic relaxation and sample concentration in field-flow fractionation using permeable wall elements. University of Utah, Salt Lake City, Utah; US5193688. p. 15.
70. Min-Kuang Liu, Ping Li, J. Calvin Giddings. Rapid protein separation and diffusion coefficient measurement by frit inlet flow field-flow fractionation. *Protein Sci.* 1993;2:1520-31.
71. Moon MH, Kwon H, Park I. Stopless Separation of Proteins by Frit-Inlet Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* sept 1997;20(16-17):2803-14.
72. Kang D, Moon MH. Miniaturization of Frit Inlet Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* juill 2004;76(13):3851-5.
73. Ahn JY, Kim KH, Lee JY, Williams PS, Moon MH. Effect of asymmetrical flow field-flow fractionation channel geometry on separation efficiency. *J Chromatogr A.* juin 2010;1217(24):3876-80.

74. P. Stephen Williams. Design of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel for Uniform Channel Flow Velocity. *J Microcolumn Sep.* 1997;9:459-67.
75. Déjardin P. Design of an asymmetrical flow field-flow fractionation cell with both mean channel and membrane velocities constant. *J Chromatogr A.* avr 2008;1187(1-2):209-15.
76. Déjardin P. Permeate channel geometry to get constant separation efficiency in asymmetrical Flow Field-Flow fractionation cell with exponential breadth variation. *J Chromatogr A.* août 2008;1203(1):94-8.
77. Kavurt UB, Marioli M, Kok WT, Stamatialis D. Membranes for separation of biomacromolecules and bioparticles via flow field-flow fractionation: Membranes for separation of biomacromolecules and bioparticles via FIFFF. *J Chem Technol Biotechnol.* janv 2015;90(1):11-8.
78. J. J. Kirkland, C. H. Dilks, Jr., S. W. Rementer, W. W. Yau. Asymmetric-channel flow field-flow fractionation with exponential force-field programming. *J Chromatogr.* 1992;593:339-55.
79. Myeong Hee Moon, P. Stephen Williams, Dukjin Kang, Inmi Hwang. Field and flow programming in frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation. *J Chromatogr A.* 2002;955:263-72.
80. Lee H, Kim H, Moon MH. Field programming in frit inlet asymmetrical flow field-flow fractionation/multiangle light scattering: Application to sodium hyaluronate. *J Chromatogr A.* sept 2005;1089(1-2):203-10.
81. Lee WJ, Min B-R, Moon MH. Improvement in Particle Separation by Hollow Fiber Flow Field-Flow Fractionation and the Potential Use in Obtaining Particle Size Distribution. *Anal Chem.* août 1999;71(16):3446-52.
82. H.-L. Lee, J. F. G. Reis, John Dohner, E. N. Lightfoot. Single-phase Chromatography: Solute Retardation by Ultrafiltration and Electrophoresis. *Am Inst Chem Eng J.* juill 1974;20(4):776-84.
83. Kozinski AA, Schmidt FP, Lightfoot EN. Velocity Profiles in Porous-Walled Ducts. *Ind Eng Chem Fundam.* 1 août 1970;9(3):502-5.
84. Mahendra R. Doshi, William N. Gill, R. Shankar Subramanian. Unsteady reverse osmosis or ultrafiltration in a tube. *Chem Eng Sci.* 1975;30:1467-76.
85. Carlshaf A, Jönsson JÅ. Properties of Hollow Fibers Used for Flow Field-Flow Fractionation. *Sep Sci Technol.* mars 1993;28(4):1031-42.

86. S. N. Semyonov, K. I. Maslow. Acoustic field-flow fractionation. *J Chromatogr.* 1988;446:151-6.
87. Chen Z, Chauhan A. Taylor dispersion in cyclic electric field-flow fractionation. *Phys Fluids* 1994-Present. 1 juin 2006;18(6):067105.
88. Krishnamurthy S, Subramanian RS. Exact Analysis of Field-Flow Fractionation. *Sep Sci.* août 1977;12(4):347-79.
89. I. M. Griffiths, P. D. Howell, R. J. Shipley. Control and optimization of solute transport in a thin porous tube. *Phys Fluids.* 2013;25(033101):1-18.
90. Se-Jong Shin, Hyun-Joo Chung, Byoung-Ryul Min, Jin-Won Park, Ik-Sung An, Kangtaek Lee. Improvement of Separation of Polystyrene Particles with PAN Membranes in Hollow Fiber Flow Field-Flow Fractionation. *Bull Korean Chem Soc.* 2003;24(9):1333-8.
91. K.-G. Wahlund, A. Litzén. Application of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel to the separation and characterization of proteins, plasmids, plasmid fragments, polysaccharides and unicellular algae. *J Chromatogr.* 1989;461:73-87.
92. Williams SKR, Caldwell KD, éditeurs. *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2012 [cité 17 août 2015]. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-0154-4>
93. van Bruijnsvoort M, Kok WT, Tijssen R. Hollow-Fiber Flow Field-Flow Fractionation of Synthetic Polymers in Organic Solvents. *Anal Chem.* oct 2001;73(19):4736-42.
94. Alf Carlshaf, Jan Ake Jönsson. Gradient elution in hollow-fibre flow field-flow fractionation. *J Chromatogr.* 1988;461:89-93.
95. International Union of Pure and Applied Chemistry. *Compendium of Chemical Terminology (Gold Book)* [Internet]. Version 2.3.3. International Union of Pure and Applied Chemistry; 2014 [cité 13 oct 2015]. 1622 p. Disponible sur: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>
96. Jirgensons B, Straumanis ME. *A Short Textbook of Colloid Chemistry* [Internet]. Burlington: Elsevier Science; 1962 [cité 4 oct 2015]. Disponible sur: <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1822250>
97. Parsegian VA. *Van der Waals forces: a handbook for biologists, chemists, engineers, and physicists.* New York: Cambridge University Press; 2006. 380 p.

98. Atkins PW, De Paula J. Physical chemistry. New York: W.H. Freeman; 2010.
99. Liu L, Neretnieks I. Interaction between colloidal particles [Internet]. SKB Technical Report TR-10-26, Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co., Stockholm, Sweden; 2010 [cité 3 oct 2015]. Disponible sur: [http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/41/103/41103173.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/41/103/41103173.pdf)
100. FORCES INTERMOLECULAIRES - Forces de Debye [Internet]. [cité 5 oct 2015]. Disponible sur: [http://untori2.crihan.fr/unspf/2009\\_Strasbourg\\_Pigault\\_ForcesIntermoleculaires/co/09\\_Contenu\\_FI.html](http://untori2.crihan.fr/unspf/2009_Strasbourg_Pigault_ForcesIntermoleculaires/co/09_Contenu_FI.html)
101. FORCES INTERMOLECULAIRES - Forces de dispersion de London [Internet]. [cité 5 oct 2015]. Disponible sur: [http://untori2.crihan.fr/unspf/2009\\_Strasbourg\\_Pigault\\_ForcesIntermoleculaires/co/10\\_Contenu\\_FI.html](http://untori2.crihan.fr/unspf/2009_Strasbourg_Pigault_ForcesIntermoleculaires/co/10_Contenu_FI.html)
102. Seung-woo Lee, Wolfgang M. Sigmund. AFM study of repulsive Van der Waals forces between Teflon AF thin film and silica or alumina. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 23 mai 2002;204(1-3):43-50.
103. J. Visser. On Hamaker constants: A comparison between Hamaker constants and Lifshitz - Van der Waals constants. *Adv Colloid Interface Sci.* 1972;3:316-63.
104. Yasushige Mori, Kazuyoshi Kimura, Masataka Tanigaki. Influence of Particle-Wall and Particle-Particle Interactions on Retention Behavior in Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Anal Chem.* 15 déc 1990;62(24):2668-72.
105. What Colloidal Silver is | Explanation Of What A Colloid Is [Internet]. [cité 5 oct 2015]. Disponible sur: [http://wishgranted.com/Colloidal\\_Silver\\_Pages\\_What\\_CS\\_is.htm](http://wishgranted.com/Colloidal_Silver_Pages_What_CS_is.htm)
106. Helmholtz H. Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche. *Ann Phys Chem.* 1853;165(6):211-33.
107. Otto Stern. ZUR THEORIE DER ELEKTROLYTISCHEN DOPPELSCHICHT. *Z Für Elektrochem Angew Phys Chem.* nov 1924;30(21-22):508-16.
108. Wright MR. An introduction to aqueous electrolyte solutions. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley; 2007. 574 p.
109. Girault HH. Electrochimie physique et analytique. Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes; 2007.

110. Dukhin AS, Goetz PJ. Characterization of liquids, nano-and microparticulates, and porous bodies using ultrasound. Vol. 24. Elsevier; 2010.
111. Moon-Hwan Chang, Dosi Dosev, Ian M. Kennedy. Zeta-potential Analyses using Micro Electrical Field Flow Fractionation with Fluorescent Nanoparticles. *Sens Actuators B*. juin 2007;124(1):172-8.
112. Hunter RJ. Zeta potential in colloid science: principles and applications. London ; New York: Academic Press; 1981. 386 p. (Colloid science).
113. Malvern Instruments, éditeur. Zeta Potential: An Introduction in 30 minutes.
114. Trefalt G, Borkovec M. Overview of DLVO Theory. 2014 [cité 4 oct 2015]; Disponible sur: [http://www.colloid.ch/grouppage/pdfs/Overview\\_DLVO\\_Theory1.pdf](http://www.colloid.ch/grouppage/pdfs/Overview_DLVO_Theory1.pdf)
115. Russel WB, Saville DA, Schowalter WR. Colloidal dispersions. 1. paperback ed. (with corr.). Cambridge: Cambridge Univ. Press; 1991. 525 p. (Cambridge monographs on mechanics and applied mathematics).
116. Steven L. Carnie, Derek Y. C. Chan, Jim Stankovich. Computation of Forces between Spherical Colloidal Particles: Nonlinear Poisson-Boltzmann Theory. *J Colloid Interface Sci*. 1994;165:116-28.
117. White LR. On the Deryaguin approximation for the interaction of macrobodies. *J Colloid Interface Sci*. 1983;95(1):286-8.
118. Fröberg JC, Rojas OJ, Claesson PM. Surface forces and measuring techniques. *Int J Miner Process*. 1999;56(1):1-30.
119. Drioli E, Giorno L, éditeurs. Comprehensive membrane science and engineering. Amsterdam: Elsevier, Acad. Press; 2010.
120. Reschiglian P, Melucci D, Zattoni A, Malló L, Hansen M, Kummerow A, et al. Working without Accumulation Membrane in Flow Field-Flow Fractionation <sup>a</sup>. *Anal Chem*. déc 2000;72(24):5945-54.
121. Dora Melucci. Working without accumulation membrane in flow field-flow fractionation. Effect of sample loading on retention. *Ann Chim*. 2004;94:197-206.
122. S.C. Pesek, W.J. Koros. Aqueous quenched asymmetric polysulfone hollow fibers prepared by dry/wet phase separation. *J Membr Sci*. 1994;88:1-19.

123. Rishi Shukla, Munir Cheryan. Performance of ultrafiltration membranes in ethanol-water solutions: effect of membrane conditioning. *J Membr Sci.* 2002;198:75-85.
124. Wu Z, Faiz R, Li T, Kingsbury BFK, Li K. A controlled sintering process for more permeable ceramic hollow fibre membranes. *J Membr Sci.* nov 2013;446:286-93.
125. Keith Scott. *Handbook of Industrial Membranes.* Elsevier Advanced Technology; 1998.
126. J. E. G. J. Wijnhoven, M. R. van Bommel, Hans Poppe, Wim Th. Kok. Practical Experience with Organic Solvent Flow Field-Flow Fractionation. *Chromatographia.* avr 1996;42(7/8):409-15.
127. Gimbert LJ, Andrew KN, Haygarth PM, Worsfold PJ. Environmental applications of flow field-flow fractionation (FIFFF). *TrAC Trends Anal Chem.* oct 2003;22(9):615-33.
128. Lyklema J, Norde W. Interfacial behaviour of biomacromolecules. In: Jacobasch H-J, éditeur. *Interfaces, Surfactants and Colloids in Engineering* [Internet]. Steinkopff; 1996 [cité 21 août 2015]. p. 9-17. (Progress in Colloid & Polymer Science). Disponible sur: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/BFb0114438>
129. A. G. Fane, C. J. D. Fell, A. Suki. The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes. *J Membr Sci.* 1983;16:195-210.
130. Childress AE, Elimelech M. Relating Nanofiltration Membrane Performance to Membrane Charge (Electrokinetic) Characteristics. *Environ Sci Technol.* sept 2000;34(17):3710-6.
131. Jones KL, O'Melia CR. Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. *J Membr Sci.* 2000;165(1):31-46.
132. Rebekah L. Hartmann, S. Kim Ratanathanawongs Williams. Flow field-flow fractionation as an analytical technique to rapidly quantitate membrane fouling. *J Membr Sci.* 2002;209:93-106.
133. Daisuke Ejima, Kouhei Tsumoto, Tsutomu Arakawa. Improved Column Chromatography Performance Using Arginine [Internet]. [cité 18 oct 2015]. Disponible sur: <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/18995-Improved-Column-Chromatography-Performance-Using-Arginine/>
134. Ejima D, Yumioka R, Arakawa T, Tsumoto K. Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography. *J Chromatogr A.* nov 2005;1094(1-2):49-55.

135. Eronina TB, Chebotareva NA, Sluchanko NN, Mikhaylova VV, Makeeva VF, Roman SG, et al. Dual effect of arginine on aggregation of phosphorylase kinase. *Int J Biol Macromol.* juill 2014;68:225-32.
136. Das U, Hariprasad G, Ethayathulla AS, Manral P, Das TK, Pasha S, et al. Inhibition of Protein Aggregation: Supramolecular Assemblies of Arginine Hold the Key. Rutherford S, éditeur. *PLoS ONE.* 14 nov 2007;2(11):e1176.
137. Roda B, Cioffi N, Ditaranto N, Zattoni A, Casolari S, Melucci D, et al. Biocompatible channels for field-flow fractionation of biological samples: correlation between surface composition and operating performance. *Anal Bioanal Chem.* févr 2005;381(3):639-46.
138. Marassi V, Roda B, Zattoni A, Tanase M, Reschiglian P. Hollow fiber flow field-flow fractionation and size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering detection: A complementary approach in biopharmaceutical industry. *J Chromatogr A.* déc 2014;1372:196-203.
139. Li F, Meng J, Ye J, Yang B, Tian Q, Deng C. Surface modification of PES ultrafiltration membrane by polydopamine coating and poly(ethylene glycol) grafting: Morphology, stability, and anti-fouling. *Desalination.* juill 2014;344:422-30.
140. Miyama H, Tanaka K, Nosaka Y, Fujii N, Tanzawa H, Nagaoka S. Charged ultrafiltration membrane for permeation of proteins. *J Appl Polym Sci.* 1988;36(4):925-33.
141. Amit Mehta, Andrew L. Zydney. Effect of Membrane Charge on Flow and Protein Transport during Ultrafiltration. *Biotechnol Prog.* 2006;22:484-92.
142. Bendixen N, Losert S, Adlhart C, Lattuada M, Ulrich A. Membrane-particle interactions in an asymmetric flow field flow fractionation channel studied with titanium dioxide nanoparticles. *J Chromatogr A.* mars 2014;1334:92-100.
143. Kim S, Lee S, Kim C-H, Cho J. A new membrane performance index using flow-field flow fractionation (fl-FFF). *Desalination.* oct 2009;247(1-3):169-79.
144. Hong K, Lee S, Choi S, Yu Y, Hong S, Moon J, et al. Assessment of various membrane fouling indexes under seawater conditions. *Desalination.* oct 2009;247(1-3):247-59.
145. James F. Ranville, Chris Muzny. Predicting Membrane Flux Decline Using Parameters Derived from Field-Flow Fractionation Measurements. U.S. Department of the Interior - Bureau of Reclamation; 2006 juin. (Desalination and Water Purification Research and Development Program). Report No.: Report No. 102.

146. Kammer F von der, Legros S, Hofmann T, Larsen EH, Loeschner K. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *TrAC Trends Anal Chem.* mars 2011;30(3):425-36.
147. Marcia E. Hansen, J. Calvin Giddings, Ronald Beckett. Colloid Characterization by Sedimentation Field-Flow Fractionation - Perturbations Due to Overloading and Electrostatic Repulsion. *J Colloid Interface Sci.* 22 déc 1988;132(2):300-12.
148. Hoyos M, Martin M. Retention theory of sedimentation field-flow fractionation at finite concentrations. *Anal Chem.* 1994;66(10):1718-30.
149. Martin M, Hoyos M, Lhuillier D. Sedimentation equilibrium of suspensions of colloidal particles at finite concentrations. *Colloid Polym Sci.* 1994;272(12):1582-9.
150. Cecilia Arfvidsson, Karl-Gustav Wahlund. Mass overloading in the flow field-flow fractionation channel studied by the behaviour of the ultra-large wheat protein glutenin. *J Chromatogr A.* 2003;1011:99-109.
151. Ibrahim T, Battu S, Cook-Moreau J, Cardot P. Instrumentation of hollow fiber flow field flow fractionation for selective cell elution. *J Chromatogr B.* juill 2012;901:59-66.
152. Pierluigi Reschiglian, Andrea Zattoni, Barbara Roda, Leonardo Cinque, Dora Melucci, Byung Ryul Min, et al. Hyperlayer hollow-fiber flow field-flow fractionation of cells. *J Chromatogr A.* 2003;985:519-29.
153. Kim SJ, Park Y, Hong HJ, others. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells.* 2005;20(1):17-29.
154. Li XX, others. Standard chemotherapy with cetuximab for treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 14 juin 2015;21(22):7022-35.
155. Lievre A. KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 15 avr 2006;66(8):3992-5.
156. Kuklenyik Z, Gardner M, Parks B, Schieltz D, Rees J, McWilliams L, et al. Multivariate DoE Optimization of Asymmetric Flow Field Flow Fractionation Coupled to Quantitative LC-MS/MS for Analysis of Lipoprotein Subclasses. *Chromatography.* 26 févr 2015;2(1):96-117.
157. Barth HG, Carlin FJ. A Review of Polymer Shear Degradation in Size-Exclusion Chromatography. *J Liq Chromatogr.* août 1984;7(9):1717-38.

## Table des figures

Figure 1: Représentation du mode d'élution normal dans un canal de FFF.....	19
Figure 2: Mélange de 2 types de composés macromoléculaires circulant au sein d'un canal de FFF, sans l'influence du champ latéral et avec l'influence du champ latéral.....	20
Figure 3: Expression de l'équation (10) pour différentes valeurs de $\lambda$ ((13)).....	23
Figure 4: Expression de l'équation (15) pour différentes valeurs de $\lambda$ ((13)).....	26
Figure 5: Exemple de représentation des zones virtuelles et des vecteurs de vitesse associés, sur la surface de la lumière d'un canal rectangulaire.....	28
Figure 6: Variation du ratio de rétention en fonction de la valeur $\lambda$ , selon l'équation (23) (trait plein), et selon l'équation linéaire approchée (24) (hachures) ((17)).....	30
Figure 7: Formules des coefficients de friction corrigés en fonction de la forme ((19)).....	32
Figure 8: Aperçu du comportement d'une particule en forme de bâtonnet (nano-rod) en FFF ((25)).....	35
Figure 9: Aperçu du comportement d'une particule en forme de disque en FFF ((25)).....	36
Figure 10: Vue de côté d'un canal de FFF, avec les profils de trajectoire des particules lors de la relaxation. La zone grisée représente la distribution du nuage de particules après relaxation ((29)).....	45
Figure 11: Représentation du mode d'élution stérique (au sens strict) dans un canal de FFF.....	54
Figure 12: Déplacement d'une particule sphérique dans un canal de FFF selon le mode stérique ((55)).....	55
Figure 13: Représentation du mode d'élution stérique/hyperlayer dans un canal de FFF.....	60
Figure 14: Illustration de la variation du ratio de rétention en fonction de la taille des particules, et de la région de transition stérique ((54)).....	61
Figure 15: Représentation d'un canal de FFF symétrique ((62)).....	63
Figure 16: Vue de côté d'un canal de FFF en position de relaxation ((64)).....	65
Figure 17: Illustration schématique de la relaxation hydrodynamique dans un système Split-Inlet (a) et dans un système Frit-Inlet (b) ((34)).....	67
Figure 18: Vue éclatée d'un canal de séparation symétrique de FFF ((34)).....	68
Figure 19: Différentes configurations de focalisation en FFF asymétrique ((67)).....	70
Figure 20: Représentation d'un canal de FFF asymétrique rectangulaire en configuration Frit-Inlet (a) et représentation du mode de relaxation hydrodynamique (b) ((65)).....	71
Figure 21: Plusieurs versions de la configuration Frit-Inlet des canaux de FFF ((41)).....	71
Figure 22: Vue schématique (a) et photographie (b) d'un canal de FFF asymétrique (configuration Frit-Inlet) miniaturisé ((72)).....	73
Figure 23: Géométries rectangulaire et trapézoïdale des canaux de FFF asymétrique ((36)).....	77
Figure 24: Comparaison des gradients de vitesse sur la longueur dans un canal de FFF symétrique rectangulaire (trait continu), asymétrique rectangulaire (petits points) et asymétrique trapézoïdal (pointillés longs) ((36)).....	79
Figure 25: 3 canaux de FFF asymétrique de géométries différentes et de volumes identiques ((73)).....	80
Figure 26: Comparaison des gradients de vitesse sur la longueur dans un canal de FFF symétrique rectangulaire, asymétrique trapézoïdal et asymétrique exponentiel ((73)).....	81
Figure 27: Vue schématique d'une fibre creuse ((81)).....	85
Figure 28: Vue schématisée des débits mis en œuvre à l'intérieur d'une fibre creuse ((56)).....	86
Figure 29: Référentiel de coordonnées mis en œuvre en FFF en fibre creuse ((56)).....	87
Figure 30: Schéma du processus de focalisation à l'intérieur d'une fibre creuse ((56)).....	92
Figure 31: Forces de Debye ((100)).....	100
Figure 32: Forces de London ((101)).....	102
Figure 33: Schéma des forces de Van der Waals s'exerçant sur 2 particules sphériques de rayons différents ((97)).....	105

Figure 34: Schéma des interactions de Van der Waals sur des particules sphériques de rayons identiques ((97)).....	105
Figure 35: Schéma des interactions de Van der Waals entre une particule sphérique et une surface plane ((97)).....	106
Figure 36: Représentation schématique des différentes couches d'ions impliquées dans les interactions électrostatiques en solution aqueuse ((105)).....	108
Figure 37: Aperçu de la résultante issue des forces (majoritairement attractives) de Van der Waals et des forces (répulsives) liées aux couches ioniques en fonction de la distance entre 2 corps ((112)).....	113
Figure 38: Structure de différentes membranes ((117)).....	117
Figure 39: Schéma du montage de FFF utilisé ((149)).....	131
Figure 40: Aperçus d'une chambre de séparation de HF-FFF. (A) Tube conteneur (PEEK ou Tefzel) (1/8 in. OD × 0.080 ID) (1) avec sa fibre creuse (2) et ses capillaires de connectique (3). (B) Section transversale d'une chambre de séparation. (C) Schéma des différents composants de la chambre de séparation ((149)).....	133
Figure 41: Comparaison des niveaux de rétention ( $V_r/V_0$ ) obtenus dans différentes conditions.....	136
Figure 42: Passage en chromatographie d'exclusion stérique de la solution d'anticorps de 2 ans et 4 mois (courbe rouge). La courbe bleue correspond au mélange de protéines d'étalonnage.....	137
Figure 43: Passage en électrophorèse de la solution d'anticorps anti-peptide C datant de 9 jours, ainsi que des fractions issues de la FFF.....	138
Figure 44: Photo commerciale d'un vial de Cetuximab.....	141
Figure 45: Premiers profils d'élution du cétuximab (injections de « conditionnement »).....	144
Figure 46: Essais de répétabilité après les injections de conditionnement.....	145
Figure 47: Répétition d'injections de cétuximab en FFF après modification du débit d'entrée de la pompe.....	147
Figure 48: Profils d'élution corrigés par le niveau de rétention pour chaque débit d'entrée.....	147
Figure 49: Elution du cétuximab dans du PBS (A) et dans du PBS additionné de chlorure de sodium pour atteindre une concentration en chlorure de sodium ajouté de 4g/L (B).....	148
Figure 50: Profils d'élution du cétuximab dans les 3 liquides porteurs étudiés, corrigés par le niveau de rétention.....	148
Figure 51: Effet de différents temps de focalisation sur l'élution du cétuximab.....	149
Figure 52: Temps de rétention obtenus après un passage en FFF de billes de 50 nm de diamètre, de billes de 100 nm de diamètre et d'un mélange des deux.....	153
Figure 53: Comparaison des profils obtenus après un passage en FFF du mélange de billes de 50 nm de diamètre et de billes de 100 nm de diamètre, à des débits de pompe de 0,1 mL/min (courbe bleue) et de 0,2 mL/min (courbe verte), avec des débits de sortie radiale voisins.....	154

## Table des tableaux

Tableau 1: Aperçu des différents types de colloïdes((96)).....	97
Tableau 2: Procédés de fabrication et usages de différentes membranes poreuses ((117)).....	116
Tableau 3: Structure moléculaire et caractéristiques thermiques de plusieurs constituants monomériques des membranes d'ultrafiltration ((123)).....	118
Tableau 4 : Mesures des débits et ratios de débits.....	146

## SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

## Résumé :

Le traitement des pathologies les plus lourdes s'appuie essentiellement aujourd'hui sur les biothérapeutiques. Les biothérapeutiques comprennent à la fois l'utilisation de substances biologiques telles que les anticorps, les facteurs de croissance ou d'autres dérivés protéiques. Dans ce contexte, la purification de macromolécules est devenue un enjeu économique majeur. Cet enjeu économique repose en particulier sur l'emploi de techniques séparatives, telles que l'ultracentrifugation analytique, ou les techniques chromatographiques comme la chromatographie d'exclusion stérique. Depuis quelques années, une nouvelle famille de méthodes de séparation émerge, regroupées sous le terme de fractionnement par couplage flux-force. L'objectif de ce travail est d'évaluer la mise en place et les difficultés inhérentes à ce type de techniques en pratique courante. Dans ce contexte, il faut reconnaître qu'un grand nombre de facteurs de perturbation sont actuellement encore non maîtrisés et que l'amélioration de ces différents points nécessitera une prise en charge pluridisciplinaire.

Mots clés : [Fractionnement par couplage flux-force, Technique analytique, Technique séparative, Colloïdes, Ultrafiltration, Membranes]

## [Flow Field-Flow Fractionation – A study on the application of the hollow-fiber flow field-flow fractionation technique]

### Abstract :

Tackling with the heaviest diseases essentially relies on biotherapeutics. Biotherapeutics include the use of biological substances like antibodies, growth factors, or other protein derivatives. In this context, purification of macromolecules became one of the biggest economic stakes, which mainly rely on the use of separative techniques, such as analytical ultracentrifugation, or size-exclusion chromatography. In the recent years, a promising new family of separative methods regrouped under the term of "field-flow fractionation", springs up. The main purpose of this work is the evaluation of the setting up and the inherent difficulties potentially met by a regular user. In this context, a lot of troublesome points are not controlled and coping with those problems will need a multidisciplinary management.

Keywords : [Field-Flow Fractionation, Analytical technique, Separative technique, Colloids, Ultrafiltration, Membranes]