

Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 9 novembre 2023

Par Rémy Gasiorkiewicz

Sélectivité dans les méthodes de séparation. Cas particulier du Fractionnement par couplage Flux Force : étude bibliographique et mise en place expérimentale par élution de modèles cellulaires.

Thèse dirigée par Serge BATTU

Examineurs :

Pr. Serge Battu, Professeur, Université de Limoges

Dr. Gaëlle Bégaud, Maître de Conférence, Université de Limoges

Dr. Flavien Bessaguet, Maître de Conférence, Université d'Angers

Président

Juge

Juge



Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 9 novembre 2023

Par Rémy Gasiorkiewicz

Sélectivité dans les méthodes de séparation. Cas particulier du Fractionnement par couplage Flux Force : étude bibliographique et mise en place expérimentale par élution de modèles cellulaires.

Thèse dirigée par Serge BATTU

Examineurs :

Pr. Serge Battu, Professeur, Université de Limoges

Dr. Gaëlle Bégau, Maître de Conférence, Université de Limoges

Dr. Flavien Bessaguet, Maître de Conférence, Université d'Angers

Président

Juge

Juge



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} septembre 2022

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROUILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier (*) Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. JOST Jérémy Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

M. BASLY Jean-Philippe (*) Chimie analytique et bromatologie

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

Mme BONAUD Amélie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme DELEBASSÉE Sylvie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Elise (*) Pharmacologie

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland Pharmacologie

M. LÉGER David Biochimie et biologie moléculaire

Mme MARRE-FOURNIER Françoise Biochimie et biologie moléculaire

M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Assistant Hospitalo-Universitaire

Mme MARCELLAUD Elodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

M. DELMON Cédric	Pharmacognosie, botanique et mycologie
Mme KENE MALAHA Angéladine	Épidémiologie, statistique, santé publique

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Remerciements

Aux membres de mon jury,

Je remercie tout particulièrement le professeur Serge Battu, mon professeur puis mon encadrant de stage et enfin mon directeur de thèse. Je vous remercie de m'avoir permis de mettre un pied (un orteil) dans le vaste monde analytique au cours de mon stage. Merci de m'avoir suivi tout au long de ces années, merci pour votre soutien, vos encouragements et votre disponibilité tout au long de ce travail.

Au Docteur Gaëlle Bégaud, je vous remercie également pour votre accompagnement tout au long de mon stage ainsi que pour les enseignements que vous avez pu nous donner. Merci de bien vouloir faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens évidemment à remercier très chaleureusement le Docteur Flavien « Fabien » Bessagnet. Premièrement je te remercie d'avoir accepté de faire parti de mon jury. Et surtout un grand merci d'avoir repris tes études, ma scolarité s'est d'autant mieux passée grâce à toi. Merci également pour tous tes conseils qui ont été précieux. Après tous ces cours et toutes ces discussions tu m'auras presque fait aimer la physiologie ... Merci beaucoup et à très vite pour de nouvelles aventures.

À ma famille et mes proches,

À mes parents et à ma sœur, un grand merci pour votre accompagnement tout au long de mes études. Merci d'avoir facilité l'intégralité de mes études et d'avoir fait le nécessaire pour que je réussisse. Vous allez enfin pouvoir arrêter les allers-retours.

À mes grands-parents, la famille cocotte et la famille broum, merci pour tous les efforts faits pour la réussite de mes études. C'est aussi grâce à vous que j'étais dans des chaussons tout au long de mon cursus. Merci pour l'ensemble des plats et des colis qui ont été particulièrement appréciés.

À tous les autres membres de la famille, je vous remercie de vos visites et je vous remercie d'avoir cru en moi durant ces longues études.

Merci également à tous les membres de ma belle-famille. Ma famille par alliance en somme. Merci de m'avoir fait une place parmi vous et de m'avoir accueilli chez vous (merci Johanne de m'avoir laissé manger tes lasagnes, elles sont tops).

Je tiens également à faire un petit coucou et à remercier Paul avec qui j'ai passé une super seconde partie de mes études. Merci d'avoir eu la même philosophie de vie que moi : rigueur, travail, et sérieux. Et plus sérieusement merci d'avoir eu la foi de me supporter, je t'abandonne désormais dans le côté obscur de la pharmacie la qualité. Bon courage pour ta nouvelle vie et à très vite.

À Claire,

Merci à toi de me supporter au quotidien et d'accepter de continuer de me suivre à l'avenir. Un nouveau chapitre de nos vies s'ouvre désormais, je suis ravi qu'il s'écrive à deux et je suis très pressé de le découvrir avec toi. Ces dernières années ensemble ont été très riches en émotions et je suis sûr que les suivantes seront encore mieux. Une multitude de projets s'ouvre à nous et j'ai hâte de les découvrir. Je t'aime fort titi.

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/>



Liste des abréviations

α : Sélectivité en chromatographie

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CPG : Chromatographie phase gazeuse

CPL : Chromatographie phase liquide

D : Débit de phase mobile en chromatographie

EIFFF : Electrical Field Flow Fractionation (Fractionnement par Couplage Flux Force Électrique ou Électrophorétique)

FFF : Field Flow Fractionation (Fractionnement par Couplage Flux Force)

FIFFF : Flow Field Flow Fractionation (Fractionnement par Couplage Flux Force de Flux)

GrFFF : Gravitational Field Flow Fractionation (Fractionnement par Couplage Flux Force Gravitationnelle)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide haute performance)

K : Coefficient de partage en chromatographie

PBS : Phosphate-Buffered Saline (tampon phosphate salin)

RPM : Rotation Par Minute

R&D : Recherche et Développement

SdFFF : Sedimentation Field Flow Fractionation (Fractionnement par Couplage Flux Force Multi gravitationnel)

SPLITT : Split Flow Thin Cell Fractionation (Séparation de populations cellulaire par couplage Flux-Force)

ThFFF : Thermal Field Flow Fractionation (Fractionnement par Couplage Flux Force Thermique)

t_M : Temps mort en chromatographie

t_R : Temps de rétention

UV : Ultra-Violet

V_M : Volume mort en chromatographie

V_R : Volume de rétention en chromatographie

V_S : Volume de phase stationnaire en chromatographie

Table des matières

Table des équations	16
Introduction	17
I. Le Fractionnement par Couplage Flux-Force.....	19
I.1. D'un point de vue historique.....	19
I.1.1. John Calvin Giddings.....	19
I.1.2. L'évolution des méthodes	20
I.2. Le principe général	21
I.3. Les multiples techniques.....	22
I.3.1. « Flow FFF »	22
I.3.2. « Gravitational FFF »	23
I.3.3. « Thermal FFF ».....	24
I.3.4. « Electrical FFF »	25
I.3.5. Les autres méthodes	25
I.4. Les modes d'élution	26
I.4.1. Le mode normal ou « Brownien »	27
I.4.2. Les modes d'élution « hyperlayer » et stérique.....	28
I.4.2.1. Le mode d'élution « hyperlayer »	29
I.4.2.2. Le mode d'élution stérique	30
II. Le paramètre déterminant d'une séparation : la sélectivité	32
II.1. Dans le monde scientifique	32
II.2. La notion de sélectivité dans le monde chromatographique	33
II.2.1. La chromatographie.....	33
II.2.2. La chromatographie liquide à haute performance	34
II.2.3. Les grandeurs fondamentales	35
II.2.3.1. Le coefficient de partage (K)	35
II.2.3.2. Le temps de rétention (t_R).....	36
II.2.3.3. Volume de rétention (VR)	37
II.2.3.4. Le facteur de capacité (k').....	37
II.2.3.5. La sélectivité (α).....	38
II.2.3.6. Les nombres de plateaux (N) et les grandeurs associées	40
II.2.3.7. La résolution (R_s)	45
II.2.4. Les paramètres physicochimiques influençant la séparation	46
II.2.5. Limites de l'optimisation en HPLC	50
II.3. En Fractionnement par Couplage Flux Force	51
II.3.1. Les paramètres de rétention en SdFFF	51
II.3.2. Les grandeurs fondamentales de séparation	51
II.3.2.1. La sélectivité en fonction de la taille (S_d)	51
II.3.2.2. La Résolution (R_s)	53
II.3.2.3. Le pouvoir de fractionnement.....	53
II.3.3. Limites des théories de SdFFF.....	54
III. Expérimentations.....	55
III.1. Contexte et mise en place.....	55
III.2. Matériel et méthode	56
III.2.1. Matériel opératoire.....	56
III.2.1.1. Culture cellulaire	56

III.2.1.2. SdFFF	58
III.2.1.3. Coulteur Counter	60
III.2.2. Méthode expérimentale	62
III.2.2.1. Conditions opératoires	62
III.2.2.2. Séparation par SdFFF	62
III.2.2.3. Analyse par Coulteur Counter	65
III.2.2.4. Réinjection dans le système de SdFFF	65
III.3. Résultats.....	66
III.3.1. Détermination de la sélectivité de séparation par SdFFF	66
III.3.2. Influence de la durée de culture sur la sélectivité.....	71
III.4. Discussion	72
III.4.1. Analyse de la séparation par SdFFF.....	72
III.4.2. Analyse de l'impact de la durée de culture sur la séparation par SdFFF.....	74
III.4.3. Synthèse générale et analyse.....	75
Conclusion	77
Références bibliographiques	79
Annexes	83
Serment De Galien.....	87

Table des illustrations

Figure 1 : Photographie de J. Calvin Giddings.....	19
Figure 2 : Calendrier des recherches de J. Calvin Giddings	20
Figure 3 : Présentation schématique d'un canal de FFF [4].....	21
Figure 4 : Principe de fonctionnement de la FIFFF (7).....	23
Figure 5 : Principe de fonctionnement de la SdFFF (9).....	24
Figure 6 : Principe de fonctionnement de la ThFFF (11).....	24
Figure 7 : Principe de fonctionnement de l'EIFFF (13).....	25
Figure 8 : Principe de fonctionnement de la Split FFF (16).....	26
Figure 9 : Représentation du mode d'élution normal (ou Brownien) (20)	28
Figure 10 : Comparaison de modes d'élution (mode normal et mode stérique). Étude du temps de rétention dans le système en fonction du diamètre des particules (21)	28
Figure 11 : Représentation du mode d'élution « hyperlayer » (24).....	29
Figure 12 : Représentation du mode d'élution stérique (16).....	30
Figure 13 : Graphique exprimant le temps de rétention pondéré en fonction du a/l.	31
Figure 14 : Premier système nommé "Chromatographie", séparation de chlorophylles par Mikhaïl Tswett (31)	33
Figure 15 : Chromatogramme standard : Analyse d'urine par chromatographie liquide (détecteur : spectromètre de masse) (35).....	34
Figure 16 : Comparaison de chromatogramme possédant des temps de rétention similaires (36).....	36
Figure 17 : Comparaison d'un procédé de mélange par réacteur piston (a) avec la modélisation de ce mélange sous la forme de plateau (b)	40
Figure 18 : Pic extrait d'un chromatogramme type. L'intensité (I) mesurée par le détecteur est exprimée en fonction du temps (t).	41
Figure 19 : Exemple de tracé de l'équation de Van Deemter à des conditions opératoires données. Le graphique expose la vitesse optimale de phase mobile (« Optimum velocity ») afin d'obtenir un taille de plateau minimale (« Minimum plate height ») (41).	43
Figure 20 : Exemple de l'aspect d'un chromatogramme en fonction de la résolution (42).....	46
Figure 21 : Étude de l'importance de chaque variable de l'équation de Purnell (40)	48
Figure 22 : Triangle de Snyder et découpage ne famille de solvants (43).....	49
Figure 23 : Triangle des compromis en chromatographie (44).....	50
Figure 24 : Exemple de courbes de sélectivité lors de la mise en œuvre du mode Inertiel lors de l'élution d'une population cellulaire polydisperse (19)	52
Figure 25 : Représentation de la différenciation de 2 pics en fonction du pouvoir de fractionnement (52)	54

Figure 26 : Culture de WiDr (P23) de faible densité.....	57
Figure 27 : Culture de WiDr (P23) de haute densité.	57
Figure 28 : Représentation du bol de centrifugation(19)	59
Figure 29 : Représentation du fonctionnement d'un Coulteur Counter (54)	61
Figure 30 : Exemple de graphique obtenu par Coulteur Counter	61
Figure 31 : Fractogramme brut d'une séparation cellulaire par SdFFF	63
Figure 32 : Fractogramme d'une séparation cellulaire par SdFFF en fin de collecte	64
Figure 33 : Fractogrammes des réinjections lors de 3 manipulations : 09/07/21 en haut, 16/07/21 au milieu et 06/08/21 en bas.	67
Figure 34 : Graphique combiné brut des courbes de sélectivité des 3 expérimentations détaillées ci-dessus.	70
Figure 35 : Graphique combiné préanalysé des courbes de sélectivité des 3 expérimentations détaillées ci-dessus.	70
Figure 36 : Courbes de sélectivité tracées à 48h/72h/96h de culture (manipulations du 28 au 30 juillet 2021).....	71

Table des tableaux

Tableau 1 : Propriétés biophysiques mises en jeu selon les techniques de FFF.....	22
Tableau 2 : Détermination des temps de rétention (en min) lors de la réinjection de fractions, manipulation du 09/07/2021	68
Tableau 3 : Détermination des temps de rétention (en min) lors de la réinjection de fractions, manipulation du 16/07/2021	68
Tableau 4 : Détermination des temps de rétention (en min) lors de la réinjection de fractions, manipulation du 06/08/2021	68
Tableau 5 : Détermination du diamètre moyen (en μm) de chaque fraction, manipulation du 09/07/2021	69
Tableau 6 : Détermination du diamètre moyen (en μm) de chaque fraction, manipulation du 16/07/2021	69
Tableau 7 : Détermination du diamètre moyen (en μm) de chaque fraction, manipulation du 06/08/2021	69
Tableau 8 : Résultats des trois manipulations présentées	71
Tableau 9 : Résultats de la détermination de la sélectivité en fonction du temps de culture ..	71

Table des équations

Équation 1 : Étude de la dispersion des particules à séparer dans le modèle normal (ou « Brownien »)	27
Équation 2 : Définition du coefficient de partage K	35
Équation 3 : Expression du coefficient de partage	35
Équation 4 : Expression du volume de rétention selon le temps de rétention et le débit de phase mobile et les caractéristiques de la colonne	37
Équation 5 : Expression du temps de rétention selon le coefficient de partage	37
Équation 6 : Définition du facteur de capacité	38
Équation 7 : Expression du temps de rétention en fonction du facteur de capacité	38
Équation 8 : Définition de la sélectivité	38
Équation 9 : Expression de la sélectivité selon les facteurs de capacité	39
Équation 10 : Expression du nombre de plateaux théoriques selon les données du chromatogramme	41
Équation 11 : Expression de la hauteur équivalente à un plateau théorique	41
Équation 12 : Équation de Van Deemter	42
Équation 13 : Équation de Knox	43
Équation 14 : Expression de la vitesse réduite	43
Équation 15 : Expression du nombre de plateaux efficaces	44
Équation 16 : Expression de la capacité de pic	44
Équation 17 : Expression expérimentale de la résolution	45
Équation 18 : Expression théorique de la résolution	46
Équation 19 : Expression de la "Size Selectivity" en SdFFF	52
Équation 20 : Expression de la Résolution en FFF	53
Équation 21 : Expression du pouvoir de fractionnement en SdFFF	53

Introduction

Au sein des sciences séparatives, le Fractionnement par couplage Flux-Force est une technique récente. Face à la chromatographie (le mastodonte du domaine), cette méthode tente de se faire la part belle et tend à se développer. Si les études de pharmacie apportent des connaissances transversales dans des domaines variés, la « FFF » n'en fait pas partie. Dans l'optique de cette thèse, de nombreuses recherches sur cette méthode auront été nécessaires. Afin de transcrire au mieux les principes du Fractionnement par couplage Flux-Force et d'introduire les expérimentations présentées. La première partie de ce document est consacrée aux explications sur ce type de système de séparation. En plus des explications générales concernant la FFF, un système de fractionnement est particulièrement décrit : le Fractionnement par couplage Flux-Force utilisant un champs séparatif multi gravitationnel (SdFFF). Ce type de système est utilisé dans le laboratoire de Chimie analytique de Limoges et sera le support des expériences décrites ultérieurement. Cette thèse expose ainsi un travail diversifié sur une méthode séparative peu décrite.

Outre le travail de présentation de la SdFFF, une donnée est particulièrement étudiée au cours de ce travail : la sélectivité. Cette grandeur fondamentale des systèmes de séparation est autant utilisée en FFF qu'en chromatographie. Elle permet de qualifier objectivement la qualité d'une séparation et d'analyser quels paramètres influencent cette séparation. Cependant, si en chromatographie la sélectivité (notée α) est décrite en détail, le Fractionnement par Couplage Flux Force est beaucoup moins théorisé. Seuls quelques articles évoquent la sélectivité en SdFFF. De plus, ces publications sont toutes axées sur la « Size Selectivity » soit la sélectivité d'élution en fonction du diamètre des particules séparées. Connaissant cela, des interrogations sur la pertinence de cette sélectivité sont permises. La taille des particules suffit-elle à expliquer la qualité d'une séparation par SdFFF ? Afin d'évoquer les premiers éléments de réponse, cette thèse détaille au sein d'une partie bibliographique, les notions entourant la sélectivité et les grandeurs fondamentales d'une séparation. Cette étude est construite en deux temps : premièrement la séparation chromatographique est détaillée, montrant ainsi la précision et le détail des explications sur ce type de système. Dans un second temps, le même travail est effectué sur la séparation par SdFFF. Ce travail est plus succinct car la quantité d'informations à ce propos est moins importante. Une fois le contexte bibliographique posé, la question sur l'intérêt de la « size Selectivity » en SdFFF est investiguée par la mise en place d'un protocole expérimental.

La mise en place de ces expérimentations ayant pour objectif d'étudier la sélectivité s'est inscrite au sein du cursus pharmaceutique, dans le cadre du stage de 5ème année de Pharmacie. Le protocole permettant l'analyse d'une séparation par SdFFF devant répondre à de multiples contraintes, la détermination de ce protocole est une étape importante. En effet, pour obtenir des résultats expérimentaux reproductibles et incontestables, de nombreuses manipulations sont nécessaires. Chacune de ces expérimentations doit répondre aux mêmes standards de qualité et de bonnes pratiques. Les échantillons à séparer étant composés de cellules vivantes, la culture cellulaire associée est également très importante. Les gestes manipulateurs à acquérir afin de manipuler au sein du laboratoire sont aussi un apprentissage nécessaire. Ces notions - qui font partie des incontournables de la vie d'un laboratoire - assurent que le protocole expérimental est correct et que les manipulations sont bien réalisées. Même si dans certains cas, la bonne volonté et l'apprentissage ne suffisent pas à obtenir des résultats exploitables ...

Une fois la SdFFF présentée, les grandeurs fondamentales de séparation étudiées et le protocole défini, les manipulations débutent. La multiplication des expériences est une prérogative importante, notamment pour l'utilisation de SdFFF car le système n'est pas réellement utilisé en routine. Grâce à cela, des résultats sont obtenus et discutés. L'observation de ces résultats ayant pour but de préciser la sélectivité d'élution de modèles cellulaires et de démontrer le caractère uni ou multifactoriel de cette sélectivité dans le cadre de la SdFFF.

Cette thèse reprend ainsi un travail global, aussi bien bibliographique qu'expérimental. Cette démarche a donc pour but de préciser les modèles actuels de sélectivité en SdFFF tout en essayant d'informer sur le monde du Fractionnement par couplage Flux Force qui est encore méconnu.

I. Le Fractionnement par Couplage Flux-Force

I.1. D'un point de vue historique

I.1.1. John Calvin Giddings

L'histoire du Fractionnement par Couplage Flux Force ne peut s'écrire sans évoquer John Calvin Giddings. Le chimiste Américain ayant été le pionner de cette méthode séparative.

Auteur de plus de 180 articles de recherche, John Calvin Giddings est rapidement épris par les sciences séparatives. Dès la fin de ses études, le scientifique travaille et publie sur la chromatographie et devient rapidement une référence dans ce domaine. Auteur (ou co-auteur) de plus de 400 publications et de 32 livres sur ce sujet, il est aujourd'hui considéré comme un élément majeur du domaine (1).

Si ses premiers amours se dirigeaient vers la chromatographie le scientifique de Salt Lake City tente de se diversifier dans les années 1960. Passionné de nature et d'explorations, l'histoire raconte que ses idées à propos de Fractionnement par couplage Flux-Force seraient dues à une sortie en canoé. Le scientifique américain était un adepte de ce sport, l'analyse des courants d'une rivière l'aurait inspiré. Cependant il reste possible que ces informations se rapportent plus à la légende qu'à la réalité. Outre ces considérations anecdotiques, l'idée d'une méthode de séparation liée aux forces et aux flux mis en mouvement est quant à elle très concrète. Les travaux sur le Fractionnement par Couplage Flux Force sont ainsi lancés dès le milieu des années 60 (2).



Figure 1 : Photographie de J. Calvin Giddings

Doublement nommé au prix Nobel de Chimie en 1984 et 1994, John Calvin Giddings est le chimiste Américain ayant mis au point une nouvelle méthode de séparation d'espèces en 1966 : le Fractionnement par couplage Flux Force. Depuis la découverte de cette méthode séparative décrite dans les années 60, J. C. Giddings est en réalité le père d'un tout nouveau chapitre de l'histoire des sciences analytiques (3).

Year →	1955	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	
1. Statistical theory & models	*		**	*																				
2. Nonequilibrium theory					**	**	*			**	*				**									
3. Plate height & column parameters in GC				*	**	**	**	**	**	**	**	*												
4. Basic paper chromatography (& TLC)				**	**	*																		
5. Eddy diffusion				*	*				*	*		*				*								
6. Programmed temperature GC					*	**				*	*													
7. Optimization and separation				*	*	*	*	*	*	*	*			*	**									
8. Physicochem. constants from chrom.				*	*	*	*	*	*	*	*		*	**										
9. Non-Gaussian zones, kinetics				*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*							
10. Electrophoresis				*	**			*	*	*	*	*	**	**	*		*			*	*	**		
11. Misc. general & theoretical chromatography				*	**			*	*	*	*	*	**	**	*		*			*	*	**		
12. Preparative scale GC								**	**	*														
13. Theory of high efficiency LC								*	**	*														
14. High pressure & supercritical GC								*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
15. Steric exclusion chromatography								*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
16. Field-flow fractionation (1-phase chromatography)								*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
17. Non-chromatographic (1954 *)	**	**	**	*	*	**	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Figure 2 : Calendrier des recherches de J. Calvin Giddings

I.1.2. L'évolution des méthodes

Depuis les années 60, les méthodes ont considérablement évolué. En effet, en 1966 le chimiste de Salt Lake City exposait seulement ses premières idées sur la séparation par couplage flux force, désormais les techniques de FFF sont multiples et font intervenir de nombreux principes physiques. Ce sous-groupe au sein des méthodes séparatives se place à côté des techniques chromatographiques en chimie analytique - même si leur utilisation ou les connaissances à leur sujet demeurent encore largement moins approfondies

Le travail effectué dans le domaine permettra au scientifique Américain d'être nommé au prix Nobel de Chimie à deux reprises : en 1984 et 1994. Si ces nominations n'ont pas abouti à la récompense espérée, elles dénotent de majeures avancées scientifiques méritant de plus amples explications ...

I.2. Le principe général

Historiquement, le Fractionnement par couplage Flux Force repose sur une théorie relativement triviale. Des flux qui s'opposent permettent la séparation d'espèces aux caractéristiques biophysiques différentes.

Le flux principal véhicule des espèces à séparer au sein d'un canal. Ce flux n'exerce aucune discrimination de l'échantillon, son unique rôle étant de conduire les éléments tout au long du système sans altération. Au cours de ce transport les particules subissent la force d'un second champ externe influençant leur positionnement au sein de ce flux. Ainsi, selon leurs caractéristiques biophysiques et la nature des forces mises en jeu, ce second flux réarrange les particules étudiées. Le long du canal, des gradients de concentration apparaissent ainsi entre les différentes populations de l'échantillon.

De plus, le flux est laminaire, cela signifie que son écoulement est régulier et suit une disposition spécifique. Les lignes de courant les plus proches des parois sont moins véloces que les lignes centrales. La vitesse de progression de chaque élément dans le canal est ainsi modifiée selon leur placement dans le canal et leur temps de rétention varie. Ce mécanisme permet donc une séparation des espèces dans l'espace (au sein du canal) puis dans le temps (en fin de système).

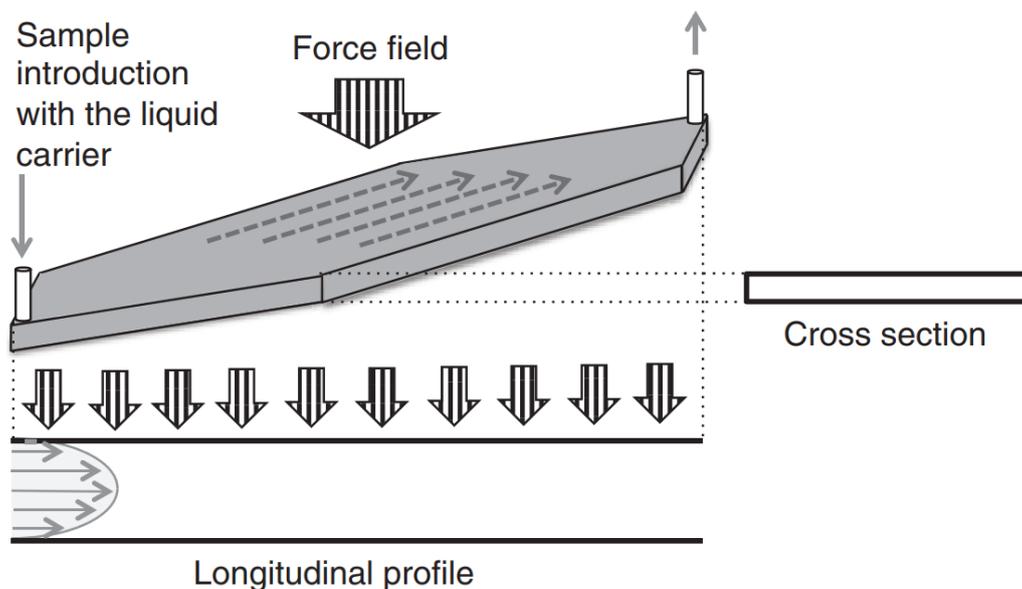


Figure 3 : Présentation schématique d'un canal de FFF [4]

Ces principes sont généraux et communs à chaque méthode de FFF, seuls les types de champs et les propriétés biophysiques des éléments à séparer varient. La diversité des mécanismes utilisables lors de Fractionnement par couplage Flux-Force est ainsi très importante. Chaque méthode présente avantages et inconvénients et dans chaque cas les « pour et les contres » doivent être évalués afin d'utiliser la méthode la plus adaptée (4). Cela laisse imaginer un avenir prometteur pour la méthode même si différentes techniques existent déjà ...

I.3. Les multiples techniques

La théorie générale régissant le Fractionnement par couplage Flux Force permet la diversification des méthodes de séparation associées. Le concept associé à ces systèmes autorise l'utilisation de différents flux afin d'exercer une force sur l'échantillon. Ces flux exercent une force sur les particules à séparer en utilisant leurs caractéristiques, certaines de ces propriétés sont résumées dans le tableau ci-dessous (5) :

Tableau 1 : Propriétés biophysiques mises en jeu selon les techniques de FFF

Techniques de FFF	Propriétés physicochimiques influençant la rétention
Flow FFF	D, d
Thermal FFF	α , D_T
Electrical FFF	D, μ
Sedimentation FFF	M, D, ρ , d

D : Coefficient de diffusion
 α et D_T : Coefficients de diffusion thermique
 μ : Mobilité électrophorétique
M : Masse moléculaire
d : diamètre
 ρ : Densité

Au fil des années, quatre techniques de séparation (reprenant quatre types de forces différentes) ont émergé et sont désormais majoritairement utilisées. Cependant, un élément demeure constant à toutes les techniques : l'utilisation d'un flux laminaire entraînant les espèces à séparer.

I.3.1. « Flow FFF »

La séparation par couplage flux force n'utilisant que les flux (ou « Flow FFF ») est la plus simple des méthodes de FFF. Elle se base sur les principes de mécanique des fluides permettant la séparation d'éléments selon leur taille. Un premier flux de phase mobile (« Cross Flow Out ») induit un gradient selon le diamètre des particules créant un champ de force perpendiculaire au flux véhiculant l'échantillon. Ces particules sont ensuite soumises au phénomène de diffusion impacté par leur différence de taille. Enfin les éléments séparés sont entraînés par un flux laminaire (« Parabolic Flow Profile ») dont la vitesse varie selon le positionnement des lignes de courant dans le canal. L'échantillon est ainsi différencié en fonction de sa taille (4,6).

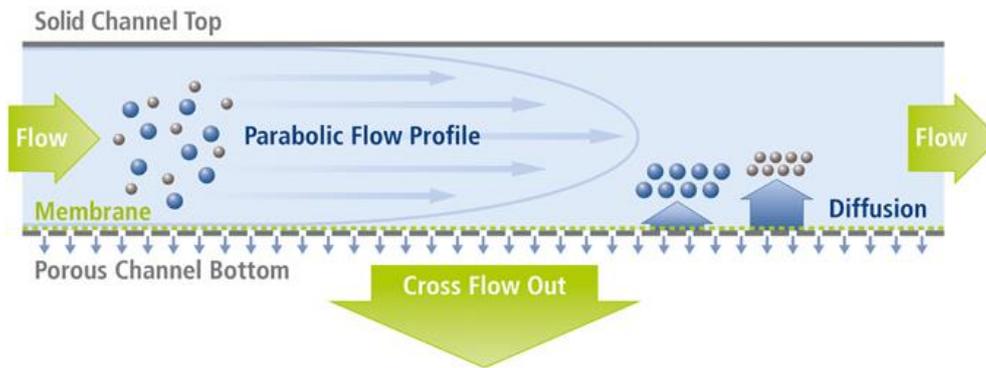


Figure 4 : Principe de fonctionnement de la FIFFF (7)

I.3.2. « Gravitational FFF »

Les systèmes de Fractionnement par couplage Flux Force gravitationnels détiennent une part importante des systèmes de FFF à travers le monde. Avant même toute considération mathématique ou physique, imaginer que la vitesse de déplacement de particules dans un canal est impactée par leur taille et les forces gravitationnelles présentes sur Terre est seulement digne de bon sens. Si à cela s'ajoutent des connaissances scientifiques, différents systèmes de séparation peuvent être développés.

La GrFFF (ou FFF Gravitationnelle) met en jeu un champ externe de faible intensité : la gravité terrestre. Dans un canal horizontal la phase mobile véhicule l'échantillon à séparer. Ainsi, la force d'attraction terrestre s'exerce perpendiculairement sur les particules qui se réarrangent selon leur taille mais aussi leur densité, leur masse, etc. Certes cette méthode est peu coûteuse, les systèmes d'analyse sont faciles à mettre en place et les technologies engagées ne nécessitent pas un entretien poussé. Cependant, les résultats obtenus sont souvent peu intéressants. La faiblesse du champ de séparation mis en place (si toutefois la gravité terrestre peut être considérée faible) doit être compensée par de longs temps de rétention. En effet, afin que la gravité exerce son effet et sépare les particules selon leurs caractéristiques, de longs temps d'élution sont nécessaires dans le canal (8). Les principes associés à ce type de système demeurent cependant utilisables sous couvert d'améliorations ...

Ces améliorations se concentrent dans les systèmes de SdFFF. Le matériel et les méthodes employées par cette technique de séparation sont cruciales dans les expérimentations présentées dans cette thèse. En effet, l'ensemble des manipulations réalisées utilise la SdFFF comme système de séparation.

La SdFFF est le Fractionnement par couplage Flux Force utilisant un champ de force multi-gravitationnel. Lorsque la GrFFF n'utilise que l'attraction terrestre comme champ de force, la SdFFF met en œuvre des forces bien supérieures. Placé dans un canal lui-même positionné dans un bol rotatif, l'échantillon subit de grandes forces centrifuges. Ainsi les particules sont soumises à de multiples « g ». Un « g » est associé à un système de mesure : il correspond à la force exercée par l'accélération due à la pesanteur terrestre. Dans le cadre des systèmes de SdFFF, les forces peuvent atteindre 8g, 10g, 12g et même plusieurs centaines de g. Cette force multi-gravitationnelle permet plus aisément la séparation des particules en fonction de leurs caractéristiques biophysiques et entraîne des contraintes expérimentales moins importantes (particulièrement en termes de temps d'élution). Toutefois ces systèmes présentent des défauts. La dimension mécanique des installations est complexe car les

systèmes sont exposés à d'importantes contraintes : grandes vitesses de rotation, phases mobiles spécifiques, compatibilité aux cellules vivantes, difficultés de nettoyage, etc. Outre ces considérations mécaniques, les mécanismes permettant la séparation des éléments dans le canal sont aussi plus complexes et induisent toujours actuellement des incompréhensions.

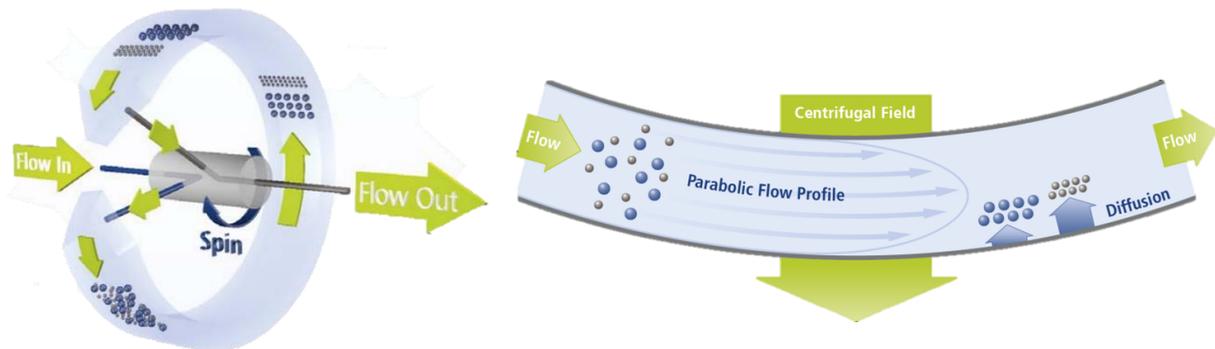


Figure 5 : Principe de fonctionnement de la SdFFF (9)

En ce qui concerne le travail effectué dans cette thèse, le matériel utilisé dans les expérimentations est détaillé dans la partie Matériel et méthode. Les mécanismes physiques, biologiques, ou chimiques mis en jeu dans la séparation sont, quant à eux, explicités dans les parties « Les modes d'éluion » et « Le paramètre déterminant d'une séparation : la sélectivité ».

I.3.3. « Thermal FFF »

La séparation par couplage flux-force utilisant la chaleur (ou « Thermal FFF ») met en jeu un gradient de température entre les deux parois du canal. Entre chacune de ces parois, la différence de température peut varier de 20°C à 100°C. L'avantage de cette méthode est l'utilisation de propriétés spécifiques rarement usitées par ailleurs. En effet lorsque cette méthode est utilisée, les particules se réarrangent dans le canal selon leur taille, leur forme mais aussi un coefficient de diffusion thermique. Ce dernier paramètre rarement utilisé dans d'autres techniques de séparation permet une diversification des méthodes (10). Suite à la séparation de l'échantillon dans le canal, un flux laminaire entraine les particules jusqu'au détecteur situé en bout de chaîne.

Les systèmes de ThFFF sont souvent employés afin de séparer des échantillons de polymères, de gels et de nanoparticules en utilisant des solvants organiques comme phase mobile. Le schéma ci-dessous détaille la méthode de ce type de système :

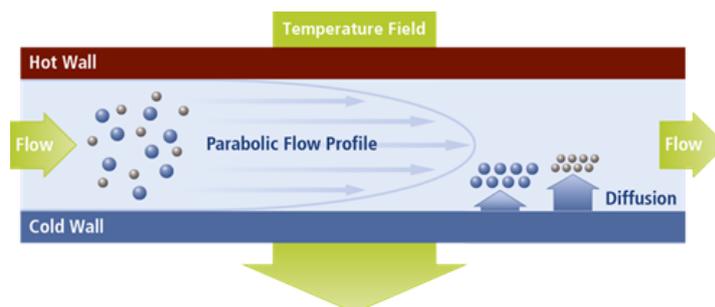


Figure 6 : Principe de fonctionnement de la ThFFF (11)

I.3.4. « Electrical FFF »

L'Electrical Field Flow Fractionation est la technique de séparation utilisant les forces électrophorétiques. Dans le vaste domaine des sciences séparatives et des méthodes analytiques les théories utilisant ce type de forces sont fréquentes. Le plus connu et le plus usité de ces systèmes est simplement appelé « Électrophorèse ». Cette méthode repose sur le déplacement des ions au sein d'un champ électrique. Ces ions sont placés sur une plaque soumise à un type de champ électrique et sont séparés par l'action de ce champ.

L'EIFFF repose sur les mêmes principes. Cependant dans le cadre du Fractionnement par couplage Flux-Force utilisant un champ électrique, l'échantillon ne se situe pas sur une plaque mais dans un canal (comme pour les autres techniques de FFF). Cet échantillon est entraîné par une phase mobile inerte n'interférant pas avec le système de séparation. Les parois du canal sont chargées électriquement : d'un côté la paroi est chargée négativement (anode) et de l'autre positivement (cathode). Selon leur charge, les éléments à séparer diffusent préférentiellement vers l'un des deux bords du canal. Ainsi, sur la longueur du système, l'échantillon se sépare. Puis, entraîné par un flux laminaire dont la vitesse varie selon le positionnement dans le canal, les éléments sont détectés en sortie de système. Ce type d'installation est habituellement utilisé dans le cadre de séparation de nanoparticules (12). Le schéma présenté ci-dessous résume le principe de fonctionnement de ce type de système :

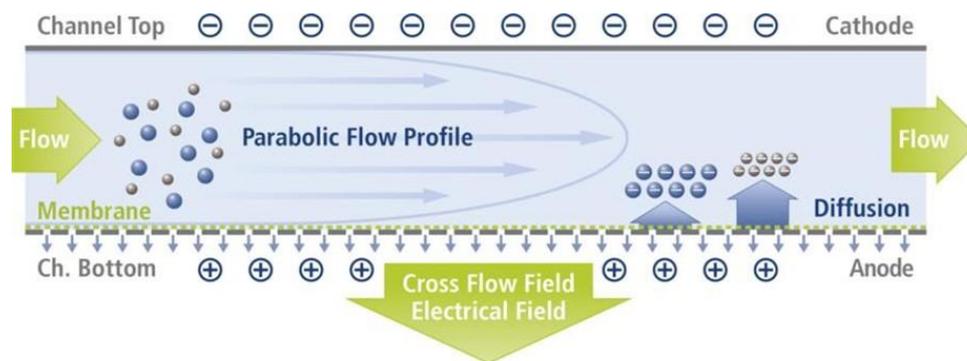


Figure 7 : Principe de fonctionnement de l'EIFFF (13)

I.3.5. Les autres méthodes

Outre les évolutions et les diversifications des méthodes évoquées ci-dessus, des équipes de recherches testent et développent de nouveaux systèmes de FFF.

L'utilisation d'un champ de force acoustique a récemment été évoquée par le scientifique Coréen Jae Youn Hwang afin de séparer de microparticules fluorescentes (14). Dans le système présenté, le champ acoustique est utilisé en complément d'un champ de force gravitaire. Les ultrasons générés influencent la diffusion des particules dans le canal en fonction de leur diamètre. Ainsi la résolution du système de séparation augmente fortement : la machine sans l'ajout du système acoustique ne pouvait séparer convenablement les particules de 1, 3, 5 et 10 micromètres à cause des phénomènes de diffusion. L'ajout du champ acoustique permet désormais d'inhiber ce phénomène diffusif et de séparer convenablement ces populations particulières.

La séparation d'échantillons utilisant couplage Flux-Force à elle aussi été développée par J. Calvin Giddings depuis le siècle précédent. Spécifiquement utilisée pour séparer les cultures cellulaires, la SPLITT (Split Flow Thin Cell Fractionation) utilise le gradient induit par un champ de force afin de dissocier des populations cellulaires. En fin de canal, dans les systèmes de SPLITT, l'échantillon mère est directement séparé en deux échantillons fille. Le champ de force utilisé perpendiculairement afin de séparer les populations peut être de différents types. Cependant, un champ gravitaire est souvent utilisé. Une étude réalisée en 2016 démontre un des intérêts de cette technique. L'article montrant que la SPLITT peut être une méthode de séparation moins agressive et dommageable pour les échantillons (15). Outre la conclusion directe de l'article, ce document met surtout en exergue l'intérêt de la diversité des techniques et montre ainsi les qualités et les défauts que chacune de ces méthodes peut engendrer. Présentation d'un système de séparation utilisant une technique SPLITT :

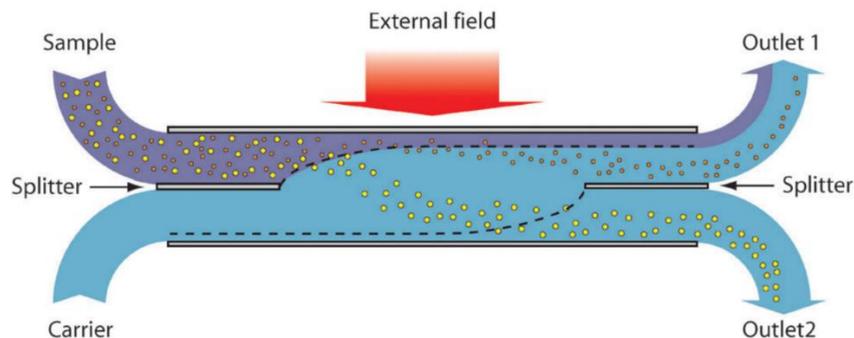


Figure 8 : Principe de fonctionnement de la Split FFF (16)

D'autres techniques demeurent plus confidentielles et se sont moins développées au fil des années. La séparation utilisant un champ de force magnétique fait partie de ces techniques marginales. Le peu d'articles évoquant ce genre de méthodes décrit la séparation d'ions particuliers tels que le nickel (17).

Enfin, au même titre que les associations présentées plus haut, certaines méthodes de Fractionnement par couplage Flux-Force peuvent être couplées afin de rendre la séparation plus efficace, robuste ou performante. Ainsi, de nombreuses découvertes et de nombreux développements de systèmes restent à opérer dans ce domaine de « R&D » qui n'a jamais aussi bien porté son nom. Ces recherches sont d'autant plus variées qu'aux mécanismes et aux théories présentées pour chaque type de FFF s'ajoutent des différenciations liées aux modes d'élution des systèmes ...

I.4. Les modes d'élution

Les modes d'élution correspondent aux mécanismes régissant la séparation au sein d'un système de Field Flow Fractionation. Quels que soient les paramètres techniques et mécaniques abordés auparavant, d'autres facteurs influent sur la séparation des éléments à séparer. Ainsi, en fonction de paramètres tels que la force des champs de séparation ou la taille des particules mises en jeu, la séparation des échantillons sera régie selon différents modèles. Déterminer le bon mode d'élution est crucial car il donne l'ensemble des principes régissant la séparation. Le mode d'élution qualifie la position d'équilibre des particules dans le canal et donc leur ordre d'élution. Ce chapitre évoque particulièrement les modes d'élutions associés à la SdFFF, technique utilisée dans cette thèse et présentée dans la partie Matériel et méthode.

De nos jours la recherche sur les modèles d'élution en FFF se perpétue. Une étude de l'influence du mode d'élution et de l'angle d'un canal de Gravitational Field Flow Fractionation a notamment été réalisée en 2008 par des scientifiques Sud-Coréens montrant l'importance de cette analyse (18).

I.4.1. Le mode normal ou « Brownien »

Le mode d'élution Brownien est considéré comme le mode normal. Cette simplification est d'origine historique. En effet, lorsque les premières découvertes concernant le Fractionnement par couplage Flux-Force ont été réalisées, le mode décrit est devenu la normalité. Lors de ces premières expérimentations, les particules utilisées étaient d'une taille minime, ainsi le mode d'élution décrit correspond à ce type de particules. Le mode d'élution normal (ou Brownien) décrit les particules submicronniennes (19).

Pour ce type d'échantillon, dont le diamètre particulaire est inférieur à $1\mu\text{m}$, le principal facteur de séparation est la diffusion. Lorsque l'échantillon est entraîné dans le canal, les particules se concentrent sur le mur d'accumulation. À ce niveau du canal la concentration en échantillon est très importante et un phénomène diffusionnel entre en jeu. Ce gradient diffusionnel est perpendiculaire au mur d'accumulation et donc également perpendiculaire au flux de phase mobile entraînant les particules. Les forces correspondant à ce gradient sont régies par un phénomène connu : la diffusion Brownienne. Les particules de petits diamètres sont particulièrement sensibles à ce phénomène, ainsi, plus le diamètre particulaire est petit, plus la particule s'éloigne du mur d'accumulation par l'effet de ce coefficient de diffusion moléculaire. La part de l'échantillon la plus éloignée de la paroi est entraînée par un flux de phase mobile plus véloce. Ainsi, elle est éluée plus rapidement du système.

L'équation différentielle présentée ci-dessous détaille le flux appliqué à chaque particule séparée par les forces composant le mouvement Brownien (20). Ainsi, sur la longueur et la totalité de la section du canal, la composition en éléments à séparer peut être déterminée.

Équation 1 : Étude de la dispersion des particules à séparer dans le modèle normal (ou « Brownien »)

$$v(x) = U_x \times c_x - D_x \times \frac{dc_x}{dx}$$

$v(x)$: Vitesse de déplacement des particules depuis le mur d'accumulation vers le centre du canal (cm.mol/s/l)

x : Distance entre la particule et la paroi d'accumulation (cm)

U_x : Vitesse du flux tangentiel fonction de la distance x (cm/s)

c_x : Concentration des particules fonction de la distance x (mol/l)

D_x : Coefficient de diffusion Brownienne fonction de la distance x (cm²/s)

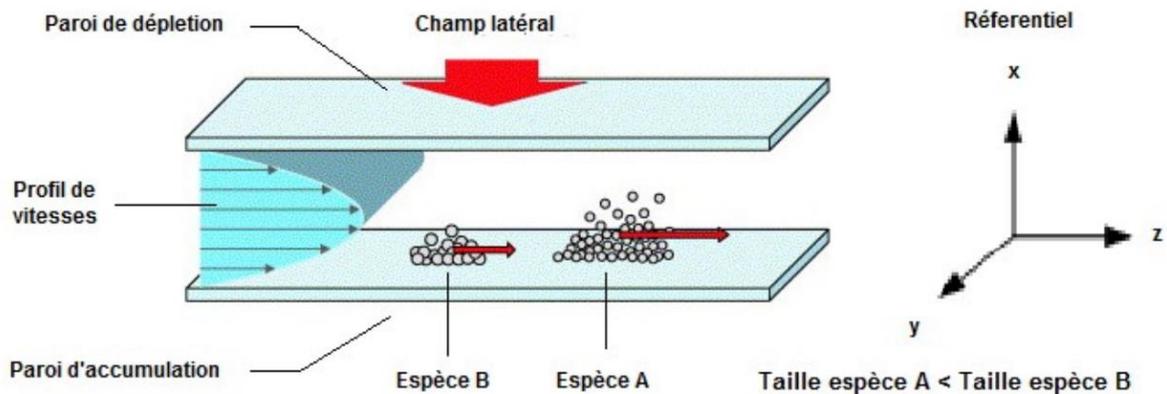


Figure 9 : Représentation du mode d'éluion normal (ou Brownien) (20)

Si la diffusion Brownienne et le mode d'éluion éponyme sont les paramètres permettant la séparation d'un échantillon au diamètre particulaire submicronnien, certaines particules ont des tailles différentes. Empiriquement – et particulièrement au cours des expérimentations présentées dans cette thèse – des particules aux diamètres supérieurs peuvent être séparées grâce aux techniques de FFF. Cette séparation n'étant pas régie par le mode d'éluion normal, d'autres modèles ont été décrits et théorisés. Ainsi, lorsque les échantillons sont composés d'éléments au diamètre de l'ordre du micron, le mode d'éluion normal devient négligeable et les modes stérique et « hyperlayer » sont majoritaires.

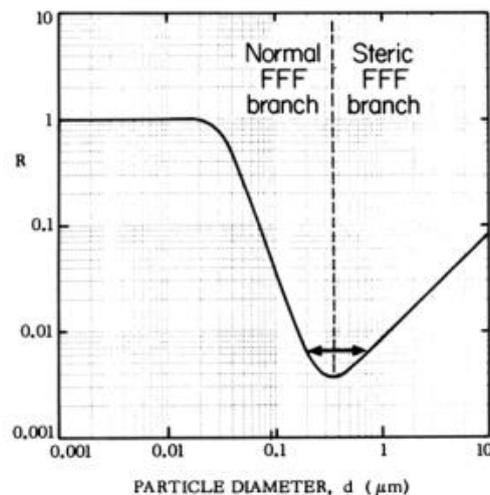


Figure 10 : Comparaison de modes d'éluion (mode normal et mode stérique). Étude du temps de rétention dans le système en fonction du diamètre des particules (21)

I.4.2. Les modes d'éluion « hyperlayer » et stérique

Si le mode d'éluion normal décrit à lui seul la séparation d'échantillons submicronniens, la séparation de particules aux diamètres plus importants est dirigée par différents modes d'éluion. Dans ce cas, le diamètre particulaire ne suffit plus à définir un mode d'éluion et d'autres paramètres entrent en jeu. Lorsque le micron est dépassé par les éléments à séparer, les forces de diffusion Brownienne (et le coefficient de diffusion moléculaire associé) deviennent faibles en comparaison aux forces hydrodynamiques. Ces dernières se traduisent

selon deux types : les forces inertielles et les forces ascensionnelles. Cependant la séparation des particules dont le diamètre est supérieur au micron ne suit pas un modèle unique : leur séparation peut être dirigée par le modèle « hyperlayer » ou le modèle stérique. Le mode d'éluion stérique intervient lorsque le champ externe de séparation est puissant. Le modèle « hyperlayer » est quant à lui utilisé pour les particules de grand diamètre lorsque le champ de séparation (perpendiculaire au flux de matière) est faible ou peu important en comparaison aux forces hydrodynamiques (16).

I.4.2.1. Le mode d'éluion « hyperlayer »

Le mode d'éluion « hyperlayer » est particulièrement important dans cette thèse car il est utilisé dans l'ensemble des manipulations. Ce modèle intervient dans les expérimentations car l'échantillon à séparer est composé de cellules dont le diamètre oscille autour de 10 μ m. Les particules de cette taille (supposées sphériques) sont très peu sensibles à la diffusion Brownienne. Cependant, d'autres forces influent sur ces particules afin d'arriver à une position d'équilibre dans le canal. Ce modèle prend en compte nombreuses de ces forces afin d'arriver à un équilibre permettant la séparation. Si certaines d'entre elles demeurent inconnues ou inexplorées, une liste non exhaustive des forces mises en jeu par le modèle « hyperlayer » est tout de même possible : la force gravitationnelle, les forces hydrodynamiques (inertielles et ascensionnelles), le mouvement Brownien, et l'exclusion stérique au voisinage de la paroi (22). L'intensité de ces forces prend en compte le volume (et donc le diamètre) des particules (la simplification entre le volume et le diamètre étant réalisée en considérant les cellules sphériques, hypothèse qui pourra être discutée dans un second temps). Ainsi, selon la littérature actuelle, le principal aspect régulant la position des cellules dans le canal est la taille (le diamètre) de ces particules. Au même titre que pour le mode d'éluion normal, la position des cellules dans le canal influe leur moment d'éluion. Dans le cas du mode d'éluion « hyperlayer », plus la taille des particules grandit, plus les forces amenant les cellules vers le centre du canal s'intensifient, plus les cellules sont éluées rapidement (23).

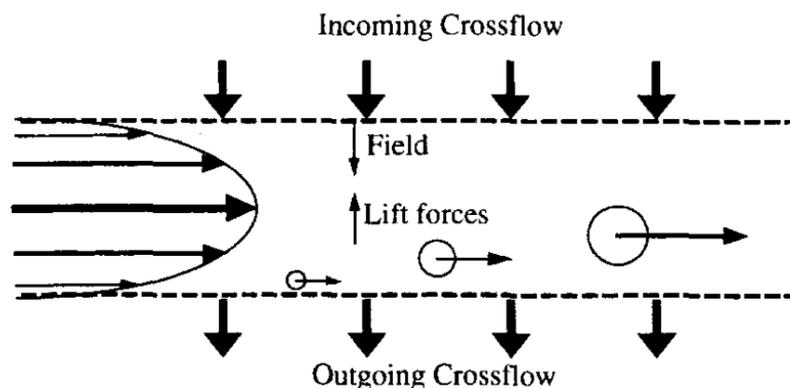


Figure 11 : Représentation du mode d'éluion « hyperlayer » (24)

Dans ce schéma le champ de force perpendiculaire entrainant le champ de séparation (« Field ») est matérialisé par un flux transversal (« Incoming Crossflow »). Les forces hydrodynamiques sont nommées « Lift forces ».

Une réserve est tout de même appliquée aux affirmations selon lesquelles la taille serait le seul paramètre lors de la séparation des échantillons. Cette réserve est à la base des manipulations opérées dans le cadre de cette thèse. Ainsi il est possible de se demander si le diamètre des cellules, et la sélectivité d'éluion en fonction de la taille (« Size Selectivity ») qui

en découle, peuvent à eux seuls expliquer les phénomènes de séparation observés dans les systèmes de SdFFF fonctionnant en mode d'élution « hyperlayer » ?

I.4.2.2. Le mode d'élution stérique

Développé depuis les années 70, le mode d'élution stérique est une adaptation du modèle « hyperlayer ». Dans ce cas, le champ multi-gravitationnel est très important face aux autres forces. Ainsi, les particules sont plaquées sur le mur d'accumulation et glissent sur cette paroi sans occuper la totalité de la section du canal. Ce mode d'élution, atteint lorsque d'importantes forces gravitationnelles sont mises en jeu, peut aussi apparaître si le débit de phase mobile est très faible. Dans ces conditions l'ordre d'élution est similaire au modèle « hyperlayer ». Si les particules sont toutes collées au mur d'accumulation, celles dont le diamètre est plus grand seront entraînées par des flux de phase mobile plus rapides. De cette façon les cellules aux plus grands diamètres seront éluées en premier.

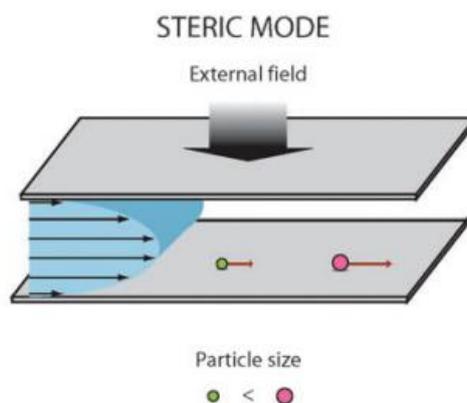


Figure 12 : Représentation du mode d'élution stérique (16)

Malgré des avantages certains, le mode d'élution stérique comporte aussi des défauts : les champs mis en jeu sont très importants et les particules plaquées à la paroi créent du déchet dans le canal (pouvant aller jusqu'au colmatage). Ces éléments peuvent avoir des impacts sur la reproductibilité au fil des manipulations. De plus, en fonction de la taille et de la masse des particules étudiées, certains éléments peuvent être co-élués.

Si le mode d'élution stérique permet l'expression de nombreux mécanismes séparatifs, il peut tout de même être amélioré. En effet, l'aspect direct et défini d'un modèle n'est que très rarement exact et des précisions doivent adapter les théories. C'est dans ce dessin que les modèles peuvent être modifiés ou adaptés tel que le modèle stérique en un modèle « stérique-entropique ». Ainsi les modèles théoriques sont au plus proche de la réalité et décrivent les mécanismes s'opérant dans le système (25).

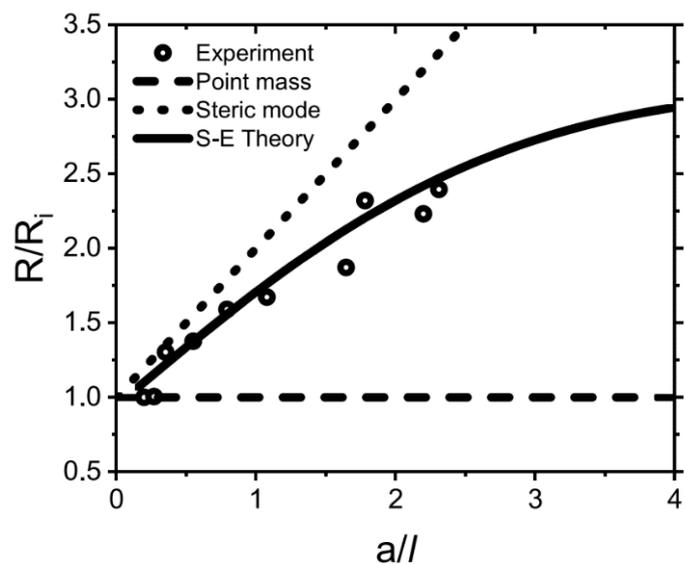


Figure 13 : Graphique exprimant le temps de rétention pondéré en fonction du a/l . Les résultats permettent la comparaison de l'efficacité prédictive de différents modes d'élution théoriques (« point mass » : mode normal ou Brownien / « Steric mode » : mode stérique / « S-E Theory » : mode stérique -entropique) face à la réalité expérimentale (« Experiment »)

II. Le paramètre déterminant d'une séparation : la sélectivité

II.1. Dans le monde scientifique

Dans le monde scientifique, la sélectivité prend plusieurs formes selon le domaine dans laquelle on l'applique. Ce terme générique, employé dans de très nombreux domaines, n'a pas la même signification en fonction du contexte. Quelques exemples peuvent montrer rapidement la variabilité de sens du terme « sélectivité » :

- En chimie organique, elle se nomme chimiosélectivité et décrit un ordre préférentiel de réactivité entre fonctions (26)
- En statistique, le terme sélectivité signifie « sensibilité » et décrit la précision d'un test
- En électricité, la sélectivité permet d'assurer la continuité de service tout en assurant la sécurité de l'installation (27)
- En biologie, la sélectivité correspond à la sélection naturelle (28)

Dans le domaine de la chimie analytique la sélectivité est la capacité d'un système à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser au sein d'un mélange de composants. Ainsi, la sélectivité est la propriété d'une procédure d'analyse de convenir exclusivement à la caractéristique de l'analyte, avec la garantie que le résultat de l'analyse ne provienne que de l'analyte (29).

Outre cette explication barbare, cette notion peut se résumer plus simplement. La sélectivité correspond au fait d'« être capable de différencier un analyte d'une autre espèce dans un échantillon (en évitant les interférences) » (30). Ainsi, dans le monde analytique, la notion de sélectivité est toujours utilisée afin de définir une séparation. Au cours de cette thèse, les domaines évoqués ne dérogent pas à cette règle et abordent la sélectivité comme une variable qualifiant les séparations mises en jeu. En chromatographie liquide, la sélectivité d'élution (notée α) est une grandeur fondamentale bien décrite alors que pour la SdFFF, la sélectivité en fonction de la taille (appelée « Size Selectivity ») est toujours à l'étude. D'où l'intérêt de cette thèse ...

II.2. La notion de sélectivité dans le monde chromatographique

La sélectivité est une caractéristique générale permettant de théoriser les principes de fonctionnement d'une machine et d'analyser la qualité de la séparation par un système. Dans de nombreux cas, ce terme regroupe des notions et des concepts abstraits qui demandent à être explorés : le Fractionnement par Couplage Flux Force faisant partie de ces domaines toujours étudiés.

II.2.1. La chromatographie

Au sein du vaste monde analytique, une catégorie de système se démarque cependant : la chromatographie. Cette technique de séparation est apparue pour la première fois dans une publication au début du XX^{ème} siècle. À ce moment-là, le botaniste Russe Mikhaïl Tswett utilise le terme « Chromatographie » pour décrire un système permettant la séparation de chlorophylles (31). La technique utilisée prendra ensuite le nom de chromatographie d'adsorption car les techniques se sont multipliées par la suite.

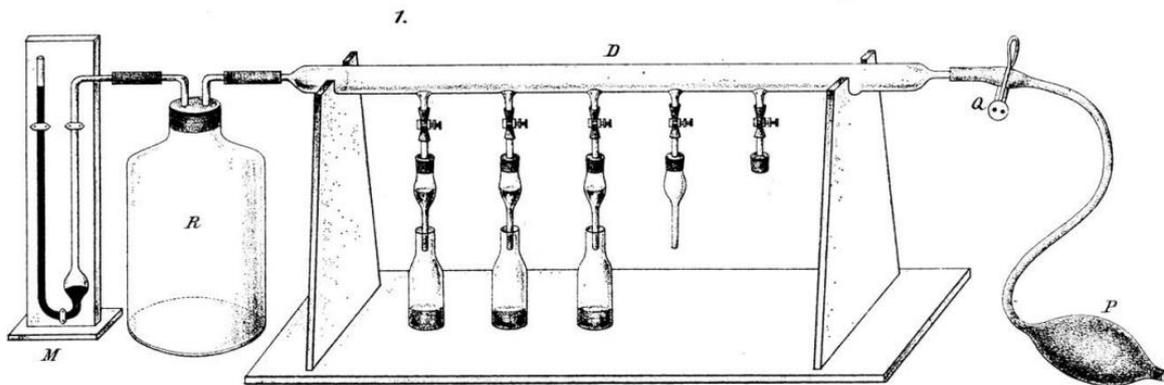
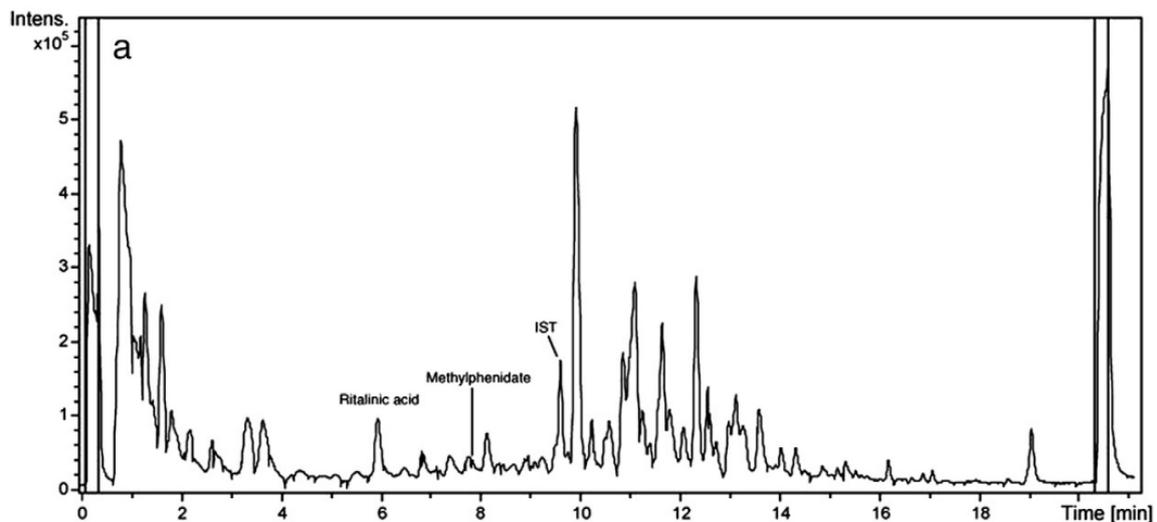


Figure 14 : Premier système nommé "Chromatographie", séparation de chlorophylles par Mikhaïl Tswett (31)

En effet depuis l'évocation de la chromatographie, et jusqu'à nos jours, les méthodes se sont diversifiées et perfectionnées faisant aujourd'hui de la chromatographie la technologie à la pointe de la chimie analytique. Les systèmes de chromatographie s'étendent de la chromatographie sur couche mince (CCM), enseignée et utilisée depuis les classes primaires, jusqu'aux techniques utilisant des fluides supercritiques. Et de nouvelles méthodes se développent chaque jour. Un dénominateur commun régit cependant l'ensemble de ces techniques : le désir de séparer d'une façon incontestable les éléments d'un échantillon, d'une solution voire même d'un produit industriel. La qualité et l'efficacité de cette séparation s'incluent dans une notion : la sélectivité (32). Cependant les propriétés et les lois décrivant les méthodes de chromatographie sont multiples. La sélectivité seule ne détaille pas l'ensemble de la séparation (33). Ce chapitre regroupe donc les paramètres expliquant la qualité (ou la non-qualité) d'une séparation en chromatographie. Afin de demeurer concis et d'évoquer une majorité d'éléments régissant une méthode séparative, seules les lois régissant l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) seront détaillées ci-dessous. Dans le cas où d'autres méthodes seraient évoquées, ces dernières seraient expliquées et précisées.

II.2.2. La chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance est une méthode très développée dans les laboratoires du monde entier. Ce système analytique est composé d'une pompe mettant en mouvement une phase mobile (d'où l'appellation « chromatographie liquide »). Les éléments à séparer se situent dans le flux de phase mobile et sont entraînés dans des tubulures vers une colonne de séparation. Habituellement, en laboratoire, l'échantillon à séparer est introduit au sein de la phase mobile par un injecteur (cela sera également le cas pour le système de SdFFF présenté dans la partie « Matériel et méthode »). Ainsi l'ensemble des éléments rejoint une colonne de chromatographie dans laquelle la séparation s'opère. Une colonne de chromatographie est composée d'une phase stationnaire poreuse dont les propriétés conditionnent la réussite de l'opération. Selon leurs propriétés, les molécules sont plus ou moins retenues et mettent plus longtemps à traverser le système. Chacune de ces molécules traverse la colonne avec un temps qui lui est propre, appelé temps de rétention. Dans des conditions standardisées, ce temps est caractéristique de la molécule d'intérêt et contribue à son identification. Enfin à la sortie de la colonne un détecteur analyse la qualité de la séparation (spectroscopie UV, spectromètre de masse, ...) et retranscrit les résultats sur un chromatogramme. Ce diagramme est le résultat de la séparation, il permet sa description et son analyse. Peu importe le type de chromatographie ou la technologie de détection employée, un chromatogramme retranscrira toujours la séparation (34).



En reprenant les principes régissant l'HPLC de nombreuses propriétés du système paraissent critiques. En effet, la qualité d'une séparation réalisée par chromatographie liquide à haute performance est fonction de nombreux paramètres. De plus, de multiples lois gouvernent les séparations faites par HPLC. Au fil des années, différentes publications ont été introduites, confirmées et détaillées permettant la confirmation de ces lois.

II.2.3. Les grandeurs fondamentales

La chromatographie et spécifiquement l'HPLC se décrivent par une multitude de grandeurs fondamentales. Ces notions détaillent la séparation et expliquent les mécanismes permettant cette dernière. Au fil des années les publications issues des recherches sur le sujet ont détaillé les théories permettant l'utilisation de colonnes de chromatographie en chimie analytique. De plus, l'étude des grandeurs fondamentales régissant l'HPLC nous renseigne sur les paramètres physicochimiques influençant la séparation. Ainsi, dans un premier temps, il est important de comprendre quels paramètres qualifient une séparation.

II.2.3.1. Le coefficient de partage (K)

Le coefficient de partage est la grandeur à la base de séparation des solutés. Sa définition littérale est : « la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles l'une stationnaire (particules solides imprégnées ou non d'un liquide), l'autre mobile (liquide) » (33).

D'un point de vue théorique, le coefficient de partage, appelé aussi constante de distribution de Nernst ou coefficient de thermodilution, se calcule grâce à la formule :

Équation 2 : Définition du coefficient de partage K

$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

K : Coefficient de partage (sans unité)

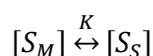
c_s : concentration de soluté dans la phase stationnaire (mol/l)

c_m : concentration de soluté dans la phase mobile (mol/l)

Dans un échantillon composé de divers solutés, chaque élément est défini par son propre coefficient de partage. Plus cette grandeur est élevée plus la vitesse de déplacement de la molécule au sein du système diminue. Cette valeur dépend de l'affinité du soluté pour les phases mobile et stationnaire. Dans le cas le plus courant, en HPLC, la différence d'affinité est due à la différence de polarité entre les constituants et les phases du système. Ce type de chromatographie dont les principales interactions sont hydrophiles ou hydrophobes, se nomme chromatographie de partage. Toutefois, penser que seules les interactions polaires sont à l'origine de la séparation est une simplification car de nombreuses méthodes de chromatographie liquide existent, mettant en jeu divers mécanismes. Un autre exemple d'HPLC est la chromatographie d'exclusion stérique qui utilise le volume hydrodynamique particulière afin de séparer les solutés dans la colonne.

Le coefficient de partage permet également l'interprétation thermodynamique des séparations par chromatographie. Il est le lien entre la phase mobile et la phase stationnaire. Par analogie aux coefficients de réaction, le coefficient de partage peut s'écrire :

Équation 3 : Expression du coefficient de partage



$[S_M]$: Soluté dissous dans la phase mobile

$[S_S]$: Soluté dissous dans la phase stationnaire

Cette étude thermodynamique explique les réactions d'échange, de complexation, de partage, etc.

II.2.3.2. Le temps de rétention (t_R)

Le temps de rétention, noté t_R , est la grandeur fondamentale directement accessible lors des expérimentations. Cette valeur est la plus facile d'accès car elle s'observe simplement sur le chromatogramme. Le temps de rétention dépend de l'affinité du soluté avec les phases mobiles et stationnaires. Plus l'affinité pour la phase mobile (souvent intégrée dans une colonne) est grande, plus le temps de rétention du soluté sera important. L'intérêt de l'analyste est de mettre en place les conditions opératoires permettant de séparer les solutés, cela consiste donc à différencier leur temps de rétention. Néanmoins, le temps de rétention n'est pas la seule grandeur à prendre en compte pour obtenir une bonne séparation. La figure présentée ci-dessous montre différents chromatogrammes.

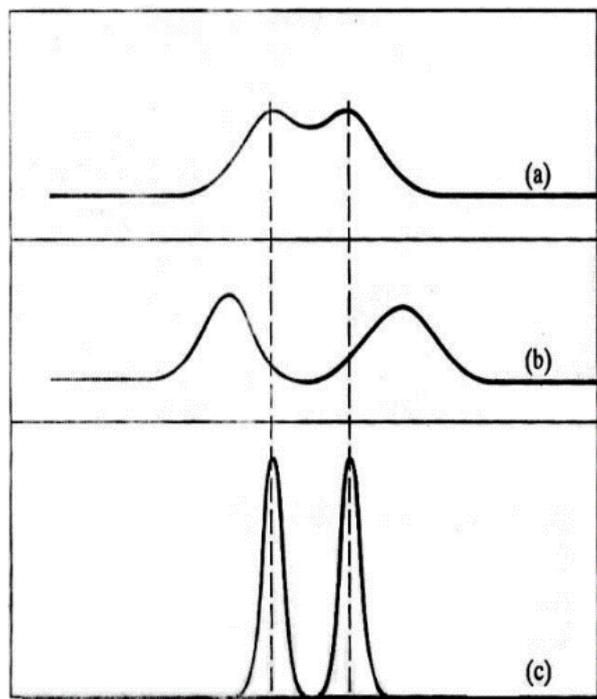


Figure 16 : Comparaison de chromatogramme possédant des temps de rétention similaires (36)

Dans les 3 cas (a, b et c) les temps de rétention sont similaires, cependant la qualité des séparations est totalement différente. L'analyse transcrite dans le chromatogramme « a » ne permet pas une séparation efficace. Le chromatogramme « b » est plus optimisé mais ne montre pas des pics totalement distincts et les temps de rétention diffèrent légèrement. La séparation « c » est la plus optimisée, elle dissocie totalement les solutés. Cependant, il est important de connaître les conditions à mettre en œuvre pour obtenir le chromatogramme « c » pour observer si elles ne sont pas trop drastiques. Quoi qu'il en soit, ces diagrammes introduisent l'idée que d'autres critères doivent être pris en compte afin de définir les conditions opératoires.

II.2.3.3. Volume de rétention (V_R)

Le volume de rétention est directement lié au temps de rétention. Ce volume correspond au volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque composé.

Le volume de rétention relie les grandeurs évoquées précédemment dans différentes équations qui nécessitent l'introduction de nouveaux paramètres caractérisant la rétention :

- Le volume mort V_M correspond au volume de phase mobile dans le système entre l'injecteur et le détecteur.
- Le volume de phase stationnaire V_S correspond au volume de phase stationnaire dans la colonne. Son unité varie selon les formules dans lequel il est employé.
- Le temps de rétention réduit t_R' correspond au temps de rétention du soluté auquel le temps mort est soustrait.

Le temps mort t_M correspond au temps que la phase mobile met depuis l'injecteur pour rejoindre le détecteur. Lors de l'injection d'un échantillon dans le système de chromatographie, un soluté non retenu par la phase stationnaire aurait un temps de rétention égal au temps mort.

Ainsi, pour chaque soluté :

Équation 4 : Expression du volume de rétention selon le temps de rétention et le débit de phase mobile et les caractéristiques de la colonne

$$V_R = t_R \times D = t_R \times u \times S \times \varepsilon$$

V_R : Volume de rétention

t_R : Temps de rétention

D : Débit de phase mobile

u : Vitesse linéaire de phase mobile

S : Section de la colonne

ε : Porosité de la colonne

Équation 5 : Expression du temps de rétention selon le coefficient de partage

$$V_R = V_M + K \times V_S$$

V_M : Volume mort

V_S : Volume de phase stationnaire

II.2.3.4. Le facteur de capacité (k')

Le facteur de capacité est une grandeur adimensionnée. Dans l'ensemble du monde scientifique, les chercheurs ont toujours exprimé les problèmes rencontrés selon des variables adimensionnées. L'utilisation de grandeurs exemptes de toute unité permet de s'affranchir des paramètres géométriques au sein d'un système donné. La chromatographie ne déroge pas à la règle, l'introduction du facteur de rétention (ou facteur de capacité) contribue à cet affranchissement.

Le facteur de capacité se définit par : « paramètre caractérisant la rétention d'un composé » (37) et « permettant d'appréhender la capacité de la colonne à retenir le composé dans les conditions d'élution paramétrées » (38).

D'un point de vue équationnel, la définition du facteur de rétention et les équations détaillées ci-dessus donnent lieu à :

Équation 6 : Définition du facteur de capacité

$$k' = K \times \frac{V_S}{V_M} = K \times \frac{V_R - V_M}{K \times V_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V_R}{V_M} - 1 = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

k' : Facteur de capacité

t_M : Temps mort

Soit :

Équation 7 : Expression du temps de rétention en fonction du facteur de capacité

$$t_R = t_M \times (1 + k')$$

Si le facteur de capacité est inférieur à 1, le temps de rétention de la molécule concernée est trop proche du temps mort (temps auquel le front de solvant apparaît : l'arrivée de la phase mobile au détecteur). Les pics du volume mort et du soluté concerné risqueraient de se superposer. À l'inverse, si le facteur de capacité k' est supérieur à 10, le temps de rétention de la molécule est trop long. Dans ce cas le pic risque de s'élargir, les limites de détection seraient atteintes et le temps d'analyse deviendrait trop important. Ainsi un ajustement des conditions opératoires est nécessaire afin de de s'assurer un bon facteur de rétention, même si cette grandeur n'est pas la seule à définir une bonne qualité de séparation ...

II.2.3.5. La sélectivité (α)

Habituellement, en chimie séparative, la sélectivité est la notion permettant de qualifier une analyse. Cela est aussi vrai en chromatographie mais dans ce domaine la sélectivité n'est qu'un élément au sein de multiples grandeurs fondamentales.

La sélectivité (ou facteur de séparation) est la première grandeur étudiée dans ce document résultant de la comparaison de deux solutés. Elle caractérise la distance séparant deux pics de solutés sur un même chromatogramme. Par cette fonction la sélectivité est une donnée majeure afin de séparer distinctement des analytes. Dès lors que leur sélectivité d'élution est supérieure à 1 les deux molécules sont séparées ($\alpha=1$ signifiant que les solutés sont co-élus).

D'un point de vue mathématique la sélectivité (α) se définit par :

Équation 8 : Définition de la sélectivité

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_M}{t_{R_1} - t_M} = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}}$$

α : Sélectivité

t_{R_2} : Temps de rétention du soluté 2

t_{R_1} : Temps de rétention du soluté 1

t'_{R_2} : Temps de rétention réduit du soluté 2

t'_{R_1} : Temps de rétention réduit du soluté 1

De plus, en reprenant les équations précédentes, la sélectivité peut être exprimée selon le coefficient de partage et le facteur de capacité :

Équation 9 : Expression de la sélectivité selon les facteurs de capacité

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

k'_2 : Facteur de capacité du soluté 2

k'_1 : Facteur de capacité du soluté 1

D'un point de vue des conditions expérimentales, la sélectivité évolue en fonction des phases mobiles et stationnaires. Dans le cadre de la chromatographie d'affinité, la différence d'élution entre les solutés est due aux différentes forces de liaison (39). En effet, en prenant l'exemple d'une séparation de deux solutés (nommés A et B), au moins quatre interactions sont à prendre en compte :

- Soluté A – Phase mobile
- Soluté B – Phase mobile
- Soluté A – Phase Stationnaire
- Soluté B – Phase Stationnaire

La multiplicité des interactions amène une importante variabilité des conditions opératoires : un léger changement de la phase mobile pouvant ainsi totalement améliorer (ou détériorer) la sélectivité d'élutions d'un soluté face à un autre. Ainsi, lors de la mise au point d'un protocole d'analyse par HPLC, la composition de la phase mobile et le choix de la colonne sont des données capitales. Modifier le pourcentage de solvant polaire (ou apolaire) peut drastiquement influencer la sélectivité. L'implication de la phase mobile dans les paramètres de séparation n'existe pas en SdFFF car cette phase est seulement employée comme véhicule de l'échantillon. En Fractionnement par Couplage Flux-Force, d'autres notions seront à prendre en compte afin d'analyser la sélectivité. Ces notions seront étudiées dans les chapitres suivants.

De plus, n'évoquer que la composition des phases afin de calculer la sélectivité d'élution en HPLC serait faux. D'autres paramètres permettent d'optimiser cette grandeur fondamentale - comme la température qui influe directement sur la valeur du facteur de séparation notamment en agissant sur les affinités entre phases et solutés (40).

II.2.3.6. Les nombres de plateaux (N) et les grandeurs associées

Afin d'expliquer la séparation par chromatographie un modèle de plateau a été mis en place. Ce modèle statique résume la colonne de chromatographie en une succession de zones aux propriétés identiques. En effet, dans de nombreux domaines scientifiques, les systèmes sont soumis à des variations temporelles ou linéaires. L'étude de ces systèmes implique souvent des intégrations mathématiques multivariées. Sans l'aide de méthode numérique, l'obtention des résultats analytiques grâce à ces intégrations est très lourd, voire impossible. Pour contourner le problème ces procédés complexes sont découpés en un ensemble de systèmes simples pouvant être étudiés individuellement.

Pour illustrer ce propos, dans le cadre d'un réacteur piston, le volume du réacteur est découpé en de multiples tranches dont la composition est fixe et homogène.

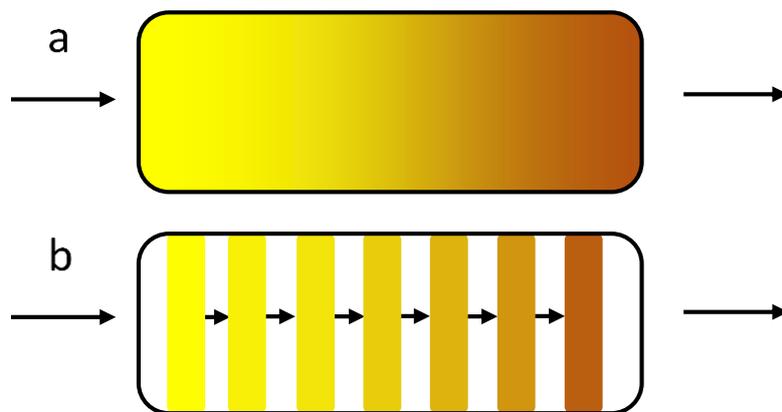


Figure 17 : Comparaison d'un procédé de mélange par réacteur piston (a) avec la modélisation de ce mélange sous la forme de plateau (b)

La méthode de découpage de la colonne de chromatographie est similaire à celle présentée ci-dessus. Dans une méthode de chromatographie les tranches sont des plateaux théoriques et l'équilibre atteint ne concerne pas la composition du mélange mais l'équilibre thermodynamique. Cette définition par plateau permet une étude plus spécifique de la séparation et notamment du chromatogramme. Avant l'utilisation du modèle statique, la seule information lisible sur ce diagramme résultant de la séparation était le temps de rétention de chaque soluté. Cependant cette information seule ne suffisait pas à établir la qualité de la séparation. Le découpage de la colonne en plateaux introduit deux nouvelles notions sur le chromatogramme exprimées sur le diagramme suivant :

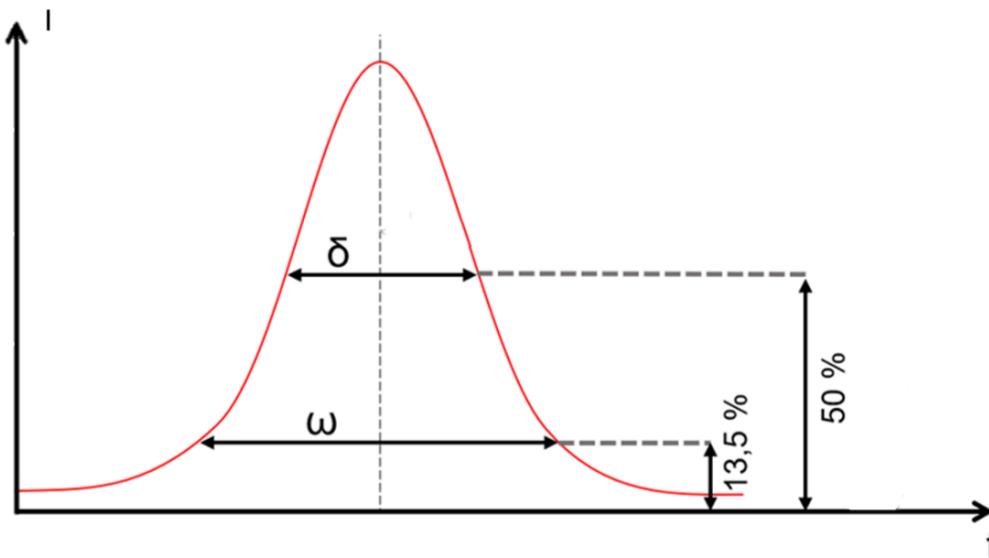


Figure 18 : Pic extrait d'un chromatogramme type. L'intensité (I) mesurée par le détecteur est exprimée en fonction du temps (t).

La largeur du pic à la base (à 13.5% de l'intensité maximale afin de prendre en compte le bruit de fond) est représentée avec le symbole ω et la largeur du pic à mi-hauteur (pour $I = I_{\max}/2$) est notée δ .

Équation 10 : Expression du nombre de plateaux théoriques selon les données du chromatogramme

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{\omega}\right)^2 = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{\delta}\right)^2$$

N : Nombre de plateaux théoriques

t_R : Temps de rétention (min)

ω : Largeur du pic (sur le chromatogramme) à la base (min)

δ : Largeur du pic (sur le chromatogramme) à mi-hauteur (min)

Cette expression permet d'obtenir le nombre de plateaux théoriques d'une colonne mise en œuvre dans des conditions opératoires spécifiques et pour un soluté déterminé. Ce nombre de plateaux théoriques (appelé aussi efficacité) est un moyen de qualification opérationnelle, un suivi de performance d'une colonne spécifique, dans ces conditions spécifiques. Cette donnée est particulièrement utile afin d'observer le vieillissement de la colonne au fil des analyses. Afin de comparer différentes colonnes dont les tailles varient, la hauteur équivalente à un plateau théorique est introduite.

Équation 11 : Expression de la hauteur équivalente à un plateau théorique

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

$HEPT$: Hauteur équivalente à un plateau théorique (m/plateau)

L : Longueur de la colonne (m)

Dans le cadre de la chromatographie liquide haute performance, le HEPT est compris entre 0.001mm et 1mm.

Nombreuses modélisations ont été réalisées autour de la notion d'HEPT. Les scientifiques Van Deemter et Knox ont utilisé la hauteur équivalente à un plateau théorique afin d'optimiser les paramètres opératoires de séparations chromatographiques.

Au milieu du XX^{ème} siècle, Jan Van Deemter expose à la communauté scientifique une équation modélisant la théorie cinétique. Si cette équation est plus fréquemment utilisée en CPG (chromatographie phase gazeuse), elle s'applique également en chromatographie liquide en appliquant quelques corrections (équation de Knox). L'équation de Van Deemter (donnant lieu à la courbe de Van Deemter) exprime la hauteur équivalente à un plateau théorique en fonction de la vitesse de phase mobile et d'autres critères.

Équation 12 : Équation de Van Deemter

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

A : Terme de remplissage (cm)

B : Terme de diffusion (cm²/sec)

C : Terme de transfert de masse (sec)

u : vitesse de la phase mobile (cm/s)

Le terme de remplissage (*A*) traduit l'organisation de la phase stationnaire dans la colonne. Si les particules fixes sont parfaitement organisées et ne laissent aucun chemin préférentiel à la phase mobile et aux solutés, la grandeur *A* est négligeable. Si la phase stationnaire est organisée par amas, laissant des zones de la colonne dépourvue de particules, les échanges soluté – phase stationnaire ont moins lieu et la grandeur *A* devient importante. Au vu de l'équation de Van Deemter, plus le terme de remplissage est élevé, plus la hauteur équivalente à un plateau théorique est importante et plus la colonne doit être longue afin de séparer correctement l'échantillon.

Le terme de diffusion (*B*) est particulièrement important en CPG mais peut souvent être négligé en chromatographie liquide. Ce terme traduit la notion d'entropie dans la séparation de composés. Lorsque la vitesse augmente, le terme de diffusion devient totalement négligeable. Il n'est donc pris en compte que pour des vitesses très faibles de phase mobile.

Le terme de transfert de masse (*C*) traduit la résistance au transfert du soluté entre les deux phases (mobile et stationnaire). Ce terme est le plus important en chromatographie liquide. Lorsque la vitesse de la phase mobile augmente, l'équilibre thermodynamique est plus difficile à atteindre et la séparation ne se fait plus correctement.

L'équation de Van Deemter s'exprime pour chaque séparation selon les termes évoqués ci-dessus. Ainsi la valeur de la hauteur équivalente à un plateau théorique en fonction de la vitesse de la phase mobile peut être tracée.

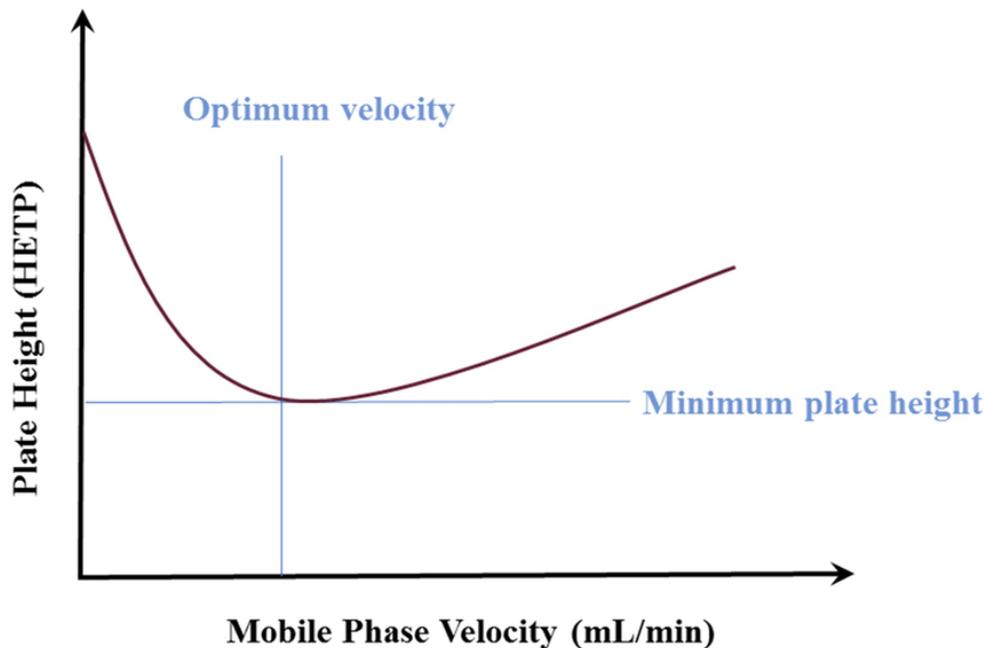


Figure 19 : Exemple de tracé de l'équation de Van Deemter à des conditions opératoires données. Le graphique expose la vitesse optimale de phase mobile (« Optimum velocity ») afin d'obtenir une taille de plateau minimale (« Minimum plate height ») (41).

Graphiquement, la hauteur équivalente à un plateau théorique minimale est facilement identifiable et permet de retrouver le débit de phase mobile optimal. Si toutefois des précisions sont nécessaires afin d'identifier le débit exact, une étude mathématique rapide peut être effectuée. En effet le débit de phase mobile optimal correspond au minimum global de la fonction. Ce minimum étant accessible par la dérivation de l'équation de Van Deemter.

La modélisation de Van Deemter, dans sa forme présentée ci-dessus, est particulièrement utilisée en CPG. Dans le cadre de la chromatographie liquide, cette équation est modifiée laissant place à l'équation de Knox.

Équation 13 : Équation de Knox

$$HEPT = A \times u'^{1/3} + \frac{B}{u'} + C \times u'$$

u' : Vitesse réduite (cm)

Sachant que :

Équation 14 : Expression de la vitesse réduite

$$u' = \frac{u \times d_p}{D_M}$$

d_p : diamètre des particules (cm)

D_M : coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile (cm)

Grâce à l'équation de Knox, un travail similaire de recherche de débit de phase mobile optimal peut être réalisé. Chaque terme de l'équation de Van Deemter correspond au terme éponyme dans la formule de Knox. Ces termes A, B et C sont définis par des équations spécifiques impliquant de nombreuses variables listées ci-dessous :

- λ : Facteur d'obstruction
- γ : Facteur de remplissage
- u : Vitesse linéaire de la phase mobile
- D_m : Coefficient de diffusion dans la phase mobile
- D_s : Coefficient de diffusion dans la phase stationnaire
- k' : Facteur de capacité
- d_p : Diamètre des particules du support
- d_f : Épaisseur de la couche liquide sur la phase stationnaire

Ces variables jouent donc un rôle prépondérant dans la séparation des solutés.

Deux autres paramètres permettant de qualifier la séparation sont aussi calculés grâce au nombre de plateaux théoriques :

- Le nombre de plateaux efficaces (N_{ef})
- La capacité de pic (n)

Le nombre de plateaux efficaces est un marqueur plus concret de la réelle efficacité de la séparation effectuée dans la colonne.

Équation 15 : Expression du nombre de plateaux efficaces

$$N_{ef} = \left(\frac{k'}{1+k'} \right)^2 \times N = \frac{16 \times (t_R - t_M)^2}{\omega^2} = \frac{5.54 \times (t_R - t_M)^2}{\delta^2}$$

N_{ef} : Nombre de plateaux efficaces

La capacité de pic est une grandeur traduisant la qualité de la séparation dans la colonne et donc sur le chromatogramme.

Équation 16 : Expression de la capacité de pic

$$n = 1 + \sqrt{\frac{N}{16}} \times \ln \left(\frac{t_\omega}{t_\alpha} \right)$$

n : Capacité de pic

t_ω : Temps de rétention du premier pic du chromatogramme

t_α : Temps de rétention du dernier pic du chromatogramme

II.2.3.7. La résolution (R_s)

La résolution synthétise et regroupe trois grandeurs fondamentales évoquées précédemment : la sélectivité, le facteur de capacité et le nombre de plateaux. Cette donnée quantitative mesure l'aptitude d'une colonne à séparer 2 analytes. La résolution traduit ainsi la qualité d'une séparation.

Cette valeur est accessible expérimentalement par l'étude du chromatogramme grâce à la formule suivante :

Équation 17 : Expression expérimentale de la résolution

$$R_{S_{1-2}} = 2 \times \frac{(t_{R1} - t_{R2})}{\omega_1 + \omega_2} = 1.17 \times \frac{(t_{R1} - t_{R2})}{\delta_1 + \delta_2}$$

$R_{S_{1-2}}$: Résolution

t_{R1} : Temps de rétention du composé 1 (min)

t_{R2} : Temps de rétention du composé 2 (min)

ω_1 : Largeur du pic à la base du composé 1 (min)

ω_2 : Largeur du pic à la base du composé 2 (min)

δ_1 : Largeur du pic à mi-hauteur du composé 1 (min)

δ_2 : Largeur du pic à mi-hauteur du composé 2 (min)

La valeur de résolution obtenue indique la qualité de la séparation, plus le R_s est faible plus le chevauchement est grand :

- Si $R_s \leq 1$, le chevauchement des aires des pics est important : les solutés s'éluent simultanément. Une séparation claire des produits n'est donc pas atteinte.
- Si $1 < R_s < 2$, le chevauchement des aires est peu important ou inexistant. Le signal transmis par le détecteur revient à la ligne de base entre chaque pic. Une différenciation des solutés est possible sur le chromatogramme : la qualité de la séparation est bonne. Une résolution optimale est admise pour une valeur supérieure à 1,5.
- Si $R_s \geq 2$, la séparation est considérée « trop importante », un temps conséquent s'écoule entre chaque pic sur le chromatogramme. La séparation devient inutilement longue (même si elle reste qualitativement tout à fait correcte).

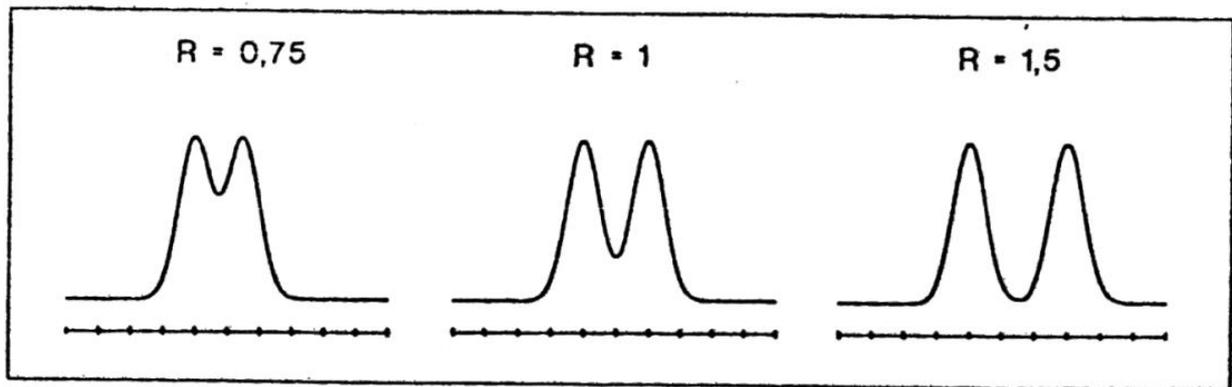


Figure 20 : Exemple de l'aspect d'un chromatogramme en fonction de la résolution (42)

Outre le calcul expérimental, la valeur de résolution s'exprime également par une formule théorique. L'expression affichée ci-dessous met en évidence les grandeurs fondamentales impliquées au sein de la mesure de résolution.

Équation 18 : Expression théorique de la résolution

$$R_{S_{1-2}} = \frac{1}{4} \times \left(\frac{\alpha_{1-2} - 1}{\alpha_{1-2}} \right) \times \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \times \sqrt{N_2}$$

α_{1-2} : Sélectivité entre les composés 1 et 2

k'_2 : Facteur de capacité du soluté 2

N_2 : Nombre de plateaux théoriques pour le soluté 2

Cette formule reprend les trois paramètres cruciaux évoqués précédemment : la sélectivité, le facteur de capacité et le nombre de plateaux. Elle montre ainsi les leviers permettant la mise en place et l'optimisation d'une analyse de qualité. Chacune de ces trois grandeurs impliquant elle-même différents critères opératoires et différents paramètres physicochimiques influençant la séparation.

II.2.4. Les paramètres physicochimiques influençant la séparation

L'étude des principes de séparation par chromatographie démontre l'importance d'un grand nombre de paramètres. La sélectivité qui est souvent mise en avant comme la grandeur fondamentale d'une séparation ne permet pas d'expliquer à elle seule les performances et l'intérêt de la chromatographie. De nombreux coefficients décrivent les propriétés mises en jeu lors d'une séparation. Dans un premier temps, ces facteurs semblent lointains et difficiles à appréhender. Cependant, après quelques recherches, il est possible de comprendre et de montrer quels sont les principes généraux d'une séparation dans une colonne d'HPLC. L'avantage majeur de ce type de système est sa spécificité et son adaptabilité. En fonction des phases utilisées (mobiles et stationnaires) les paramètres physicochimiques mis en jeu sont multiples. Cette diversité complique fortement la compréhension des systèmes de chromatographie mais permet de vastes possibilités d'extraction ou de purification. Cette étendue de possibilités résume à elle seule l'intérêt de la chromatographie et explique pourquoi la méthode est la plus utilisée dans les laboratoires et les industries du monde.

Le principal facteur démontrant la qualité d'une séparation par HPLC est la résolution. Optimiser la résolution correspond souvent à améliorer l'analyse. La formule exprimant la résolution nommée équation de Purnell et expliquée ci-dessus met en jeu la sélectivité (α), le facteur de capacité (k') et le nombre de plateaux théoriques (N). Ces données, dont les tenants et aboutissants ont été présentés ci-dessus exercent une influence directe sur l'analyse et permettent l'optimisation des conditions d'analyse. Optimiser ces 3 grandeurs permet d'améliorer la résolution et donc la séparation.

Premièrement, la sélectivité (α), la mesure du temps ou de la distance entre les maxima de deux pics, peut être améliorée grâce à différents leviers :

- Le changement de la nature et de la composition de la phase mobile
- Le changement de la nature et de la composition de la phase stationnaire
- La modification de la température
- L'augmentation du temps d'analyse
- La modification des dimensions de la colonne et particulièrement l'agrandissement de la longueur

Le facteur de capacité (k') correspond à la notion de rétention dans la colonne. Cette grandeur peut être améliorée grâce à :

- Le changement de la nature et de la composition de la phase mobile
- Le changement de la nature et de la composition de la phase stationnaire

Enfin, le nombre de plateaux théoriques (N) est aussi une grandeur impliquée dans le calcul de la résolution. Ce nombre de plateaux théoriques peut être optimisé grâce à :

- L'augmentation de la longueur de la colonne
- La baisse de la granulométrie au sein de la colonne (modification de la phase mobile)

Ces trois paramètres jouent un rôle direct dans la détermination et l'optimisation de la résolution. Cependant leur implication respective dans la formule de Purnell est variable. L'étude mathématique de cette formule permet d'identifier leur importance lors de l'optimisation de la résolution d'une analyse. Cette étude est exposée graphiquement ci-dessous :

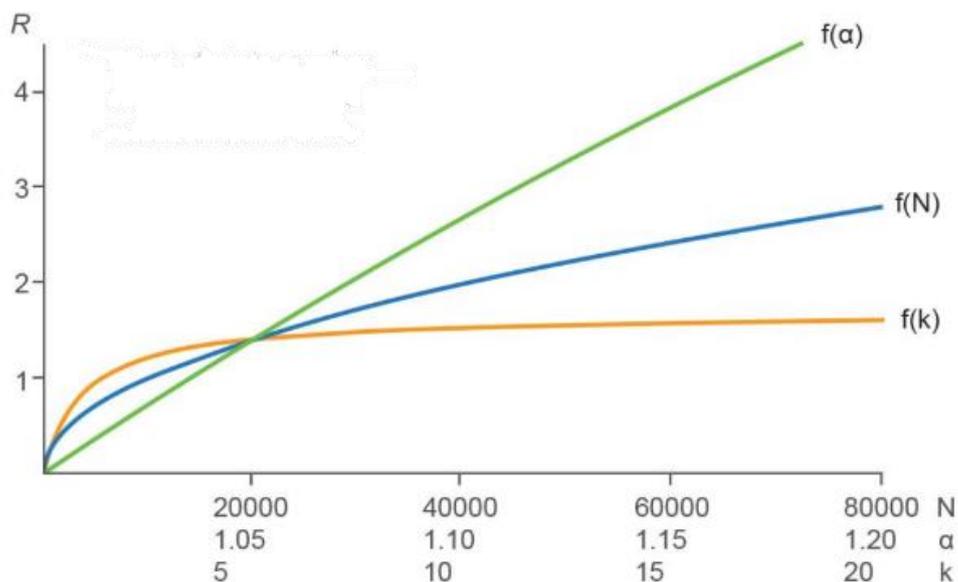


Figure 21 : Étude de l'importance de chaque variable de l'équation de Purnell (40)

Les trois courbes représentent l'évolution de la résolution (notée R sur l'axe des ordonnées) en fonction des trois paramètres évoqués ci-dessus :

- La courbe verte exprime la résolution en fonction de la sélectivité (α)
- La courbe bleue exprime la résolution en fonction du nombre de plateaux théoriques (N)
- La courbe jaune exprime la résolution en fonction du facteur de capacité (k)

L'observation des pentes de chacune de ces courbes démontre que la sélectivité est le paramètre ayant le plus grand effet sur la résolution. En effet, pour une faible variation de sélectivité, l'évolution de la résolution est importante.

Un biais est toutefois à noter ; le graphique expose la résolution en fonction de l'évolution des paramètres évoqués ci-dessus mais le choix de la plage de variation de ces trois paramètres est totalement empirique. Si la plage de variation de la sélectivité ne s'étendait pas jusqu'à 1,20 mais seulement jusqu'à 1,05 on ne pourrait pas conclure de la même façon. Cette étude mathématique exprime ainsi une tendance qualitative sans être exploitable quantitativement.

En chromatographie liquide, le levier le plus important est la composition des phases. Cette donnée est la variable la plus importante lors de l'optimisation d'une analyse. Elle est impliquée dans les valeurs de sélectivité et de facteur de capacité. Ainsi la composition des phases mobiles et stationnaires est le principal acteur de la résolution. Ces observations ont notamment été réalisées fin du XXème siècle par Lloyd R Snyder Afin d'optimiser toute analyse, ce scientifique Américain a mis au point le triangle de Snyder. La figure présentée ci-dessous est un outil de choix pour déterminer la composition optimale de la phase mobile lors de la mise en place d'une analyse.

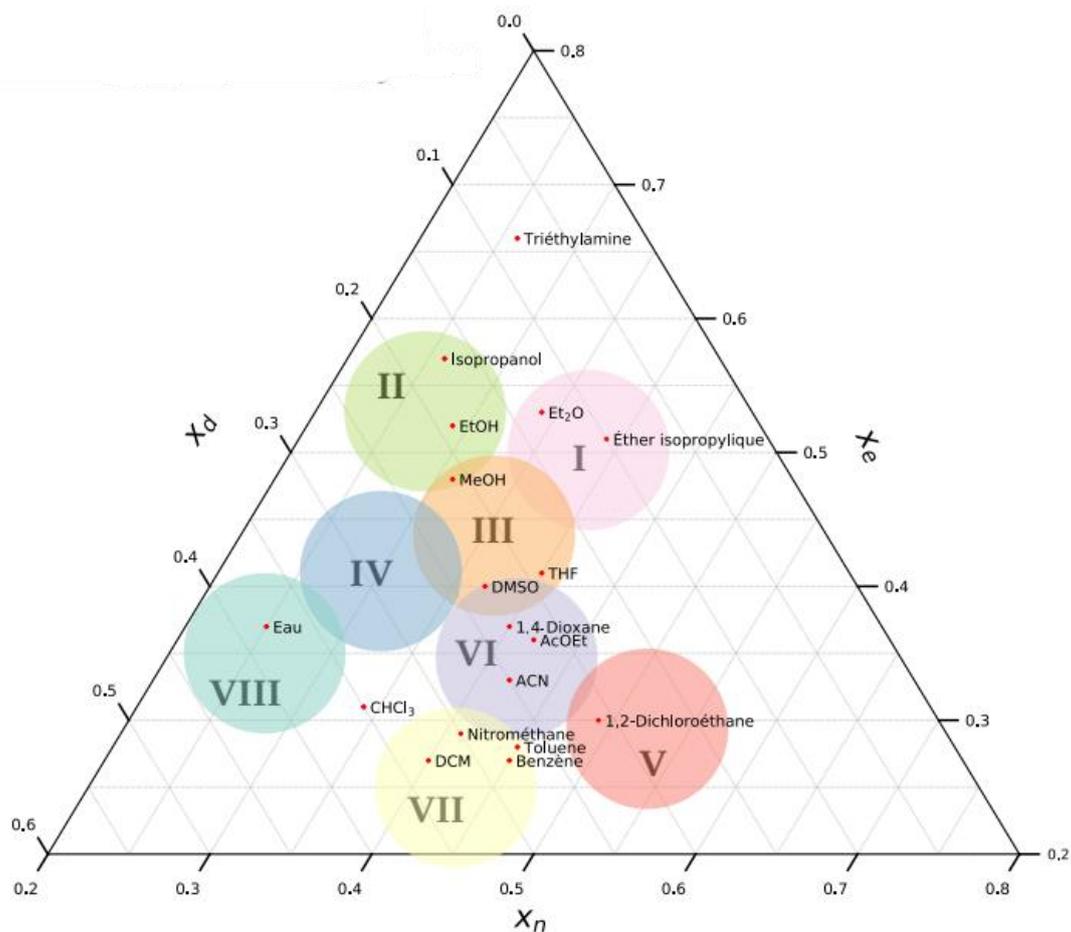


Figure 22 : Triangle de Snyder et découpage ne famille de solvants (43)

Dans ce triangle, les solvants sont décomposés en sept grandes familles en fonction des interactions de Van der Waals regroupées sous le terme de « dipolarité ». L'axe x_e représente le pourcentage de composés donneur de proton du solvant. L'axe x_d représente le pourcentage de composés accepteur de proton du solvant. Enfin, l'axe x_n représente le pourcentage de composés polarisés ou polarisables du solvant. Sans entrer dans les détails, ce triangle offre toutes les possibilités données par les solvants composant la phase mobile. Naviguer au sein du triangle de Snyder permet l'amélioration (ou la dégradation) de la séparation.

De plus, outre les paramètres impliqués dans la résolution, d'autres variables jouent des rôles dans la qualité de la séparation. Par exemple, les données impliquées dans la formule de Knox (voir dans le chapitre Les nombres de plateaux (N)) influencent directement la HEPT et donc l'efficacité N de la colonne. La chromatographie est donc un domaine complexe aux multiples paramètres.

II.2.5. Limites de l'optimisation en HPLC

L'optimisation d'une analyse par HPLC ne peut cependant jamais être totale. La résolution est certes très importante mais ne caractérise pas à elle seule une « bonne séparation ». L'optimisation parfaite d'un critère de la séparation entraîne forcément une dégradation des autres paramètres. Selon les types d'analyse, certains critères sont prioritaires face à d'autres. Le travail de l'analyste est d'évaluer l'importance de chacun de ces critères afin de proposer les conditions opératoires les plus propices et ainsi d'obtenir le résultat attendu. Cette compromission permanente réalisée par l'analyste se traduit par le triangle des compromis.

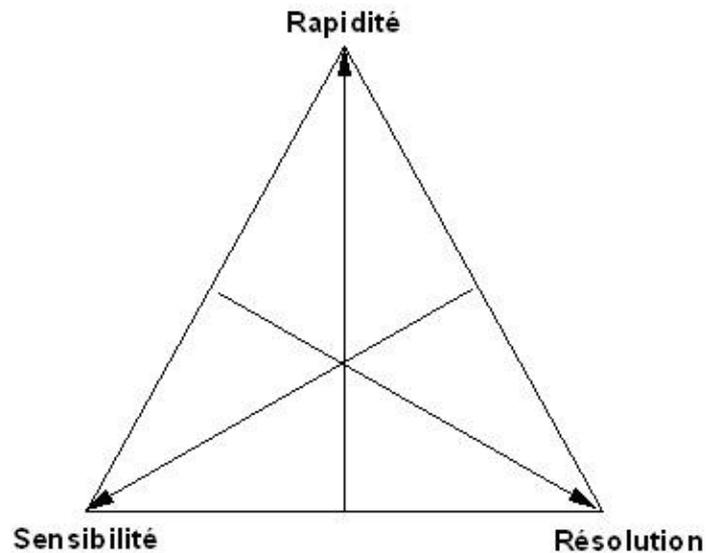


Figure 23 : Triangle des compromis en chromatographie (44)

Ce triangle montre que le compromis est toujours nécessaire en HPLC. Si une des trois caractéristiques présentée est privilégiée et totalement optimisée, les autres paramètres en pâtiront. En reprenant l'exemple d'une optimisation de la résolution, l'analyse sera alors très longue et peu sensible. Le choix d'une analyse combinant chacun des paramètres (qui se situera donc dans le cœur du triangle) ne sera cependant pas la solution lors de chaque séparation ou purification. Dans le cadre d'analyses en chaîne, la rapidité deviendra un critère de choix. La détermination des conditions opératoires à employer est donc une histoire de compromis.

L'étude des propriétés influençant la séparation des solutés dans le système de chromatographie est l'intérêt premier de cette revue bibliographique. Les informations disponibles montrent que l'HPLC est un domaine perfectionné dans lequel de nombreux paramètres sont impliqués. Cette complexité permet de moduler à souhait les analyses. L'analyste a donc de nombreuses variables d'ajustement permettant d'optimiser la séparation ce qui n'est pas forcément le cas avec les systèmes de FFF (45) ...

II.3. En Fractionnement par Couplage Flux Force

La séparation par couplage flux force est un domaine vaste dans lequel de nombreux types de séparations coexistent. Le laboratoire de chimie analytique de Limoges n'abrite cependant qu'un unique type de FFF : la SdFFF. Ainsi, comme pour le chapitre « La notion de sélectivité dans le monde chromatographique » qui ne s'était focalisé que sur la chromatographie liquide, les études bibliographiques exposées ici seront spécifiques à la Sedimentation Field Flow Fractionation. Si des digressions concernant d'autres types de FFF sont réalisées, elles seront spécifiées et remises dans leur contexte.

II.3.1. Les paramètres de rétention en SdFFF

Dans le monde du Fractionnement par couplage Flux-Force, peu de grandeurs fondamentales sont décrites. Il est donc impossible de définir des expressions et des formules spécifiques à chaque segment de la séparation. Toutefois, une grandeur est la clé de séparation : le temps de rétention du composé dans le système. Cette donnée retranscrit le temps pris par la particule (ou la cellule) entre son injection dans le canal et son élution devant le détecteur. L'intérêt du système est de différencier les populations particulières en interférant sur leur temps de rétention en fonction de leurs propriétés. La variation du temps de rétention, appelé aussi temps d'élution, est donc l'objectif final.

En chromatographie d'affinité, le principal levier permettant la variation du temps d'élution de chaque composé est la composition des phases mobiles et stationnaires. Dans ce domaine, les liaisons entre les particules et les phases vont plus ou moins retenir les composés dans la colonne et ainsi impacter le temps de rétention. L'analogie en SdFFF est impossible car les systèmes de Fractionnement par couplage Flux-Force n'utilisent pas de phase stationnaire ou de phase mobile au sens propre du terme. Ils n'impliquent donc pas de liaison d'affinité. En FFF, les différences de temps de rétention sont provoquées par un champ de force perpendiculaire au flux de l'échantillon dans le canal. Ce champ, couplé aux propriétés laminaires du flux véhiculant l'échantillon permet la séparation de l'échantillon. Toutes ces données sont spécifiées et détaillées dans le chapitre : « Le Fractionnement par Couplage Flux-Force ».

II.3.2. Les grandeurs fondamentales de séparation

Trois notions sont importantes quand on évoque le Fractionnement par Couplage Flux Force : la sélectivité, la résolution et le pouvoir de fractionnement. Ces paramètres reprennent en partie les noms et les idées des grandeurs évoquées en chromatographie mais ne correspondent pas totalement à ces dernières.

II.3.2.1. La sélectivité en fonction de la taille (S_d)

Dans le monde du Fractionnement par couplage Flux-Force, la notion de sélectivité est moins bien décrite que dans le reste de la chimie analytique, mais les formules traduisant ce révélateur tendent à se préciser.

En SdFFF la sélectivité directement est reliée au diamètre des particules à séparer. Dans ce cas, le terme employé est « Size Selectivity ». La sélectivité basée sur la taille se décrit

comme : « Sd, le pourcentage de variation du temps de rétention par rapport au pourcentage de variation de la taille des particules, dans la limite de petites variations de taille » soit (46,47) :

Équation 19 : Expression de la "Size Selectivity" en SdFFF

$$S_d = \left| \frac{d \log(t_r)}{d \log(d)} \right|$$

Sd : Sélectivité basée sur la taille

Tr : Temps de rétention

D : Diamètre de la particule éluée

Par l'application de cette formule, une courbe de sélectivité est tracée grâce au temps de rétention et au diamètre cellulaire. Sa pente décrit la sélectivité de la méthode dans des conditions définies. La pertinence de la courbe obtenue est tout de même fonction du coefficient de régression. Une valeur de sélectivité ne peut être admise que si ce coefficient est très proche de 1.

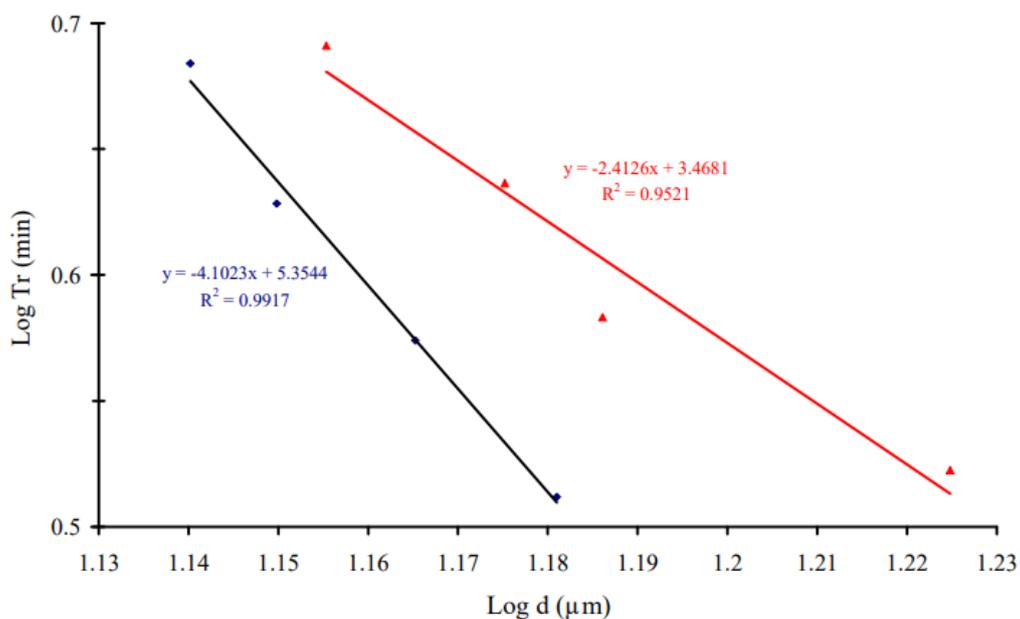


Figure 24 : Exemple de courbes de sélectivité lors de la mise en œuvre du mode Inertiel lors de l'éluion d'une population cellulaire polydisperse (19)

La détermination de la « Size Selectivity » dans diverses expériences a notamment permis une constatation : face aux autres méthodes analytiques, la SdFFF possède une sélectivité améliorée (48,49).

En dehors de cette information, peu de publications évoquent la notion de sélectivité en SdFFF. Diverses formules permettent de décrire les séparations grâce à cette méthode mais elles ne décrivent pas la sélectivité d'éluion (50,51).

II.3.2.2. La Résolution (R_s)

Pour le Fractionnement par couplage Flux-Force dont le champ de séparation est une force multi-gravitationnelle, la Résolution est décrite à partir du fractogramme et dépend de la séparation et donc de la sélectivité S_d (47). Elle est notée R_s . Cette grandeur est un indicateur de la bonne séparation de 2 populations à séparer.

Équation 20 : Expression de la Résolution en FFF

$$R_s = \frac{\Delta_z}{2 \times (\sigma_1 + \sigma_2)}$$

Δ_z : Différence de rétention entre 2 pics

σ_1 : Largeur du premier pic sur le fractogramme (min)

σ_2 : Largeur du deuxième pic sur le fractogramme (min)

II.3.2.3. Le pouvoir de fractionnement

Le pouvoir de fractionnement (F_d) est un paramètre adimensionnalisé qui est déterminé grâce à la Résolution. Cet indicateur démontre la différenciation entre 2 pics et s'exprime selon l'équation suivante (20,52) :

Équation 21 : Expression du pouvoir de fractionnement en SdFFF

$$F_d = \frac{R_s \times \overline{d_H}}{\delta d_H}$$

R_s : Résolution entre 2 pics

$\overline{d_H}$: Moyenne des diamètres entre les particules des 2 populations

En prenant l'exemple d'une injection en SdFFF d'un échantillon contenant 2 populations de particules calibrées dont le diamètre diffère de 10 %. Dans ces conditions la séparation des deux pics n'intervient que pour un $F_d \geq 10$.

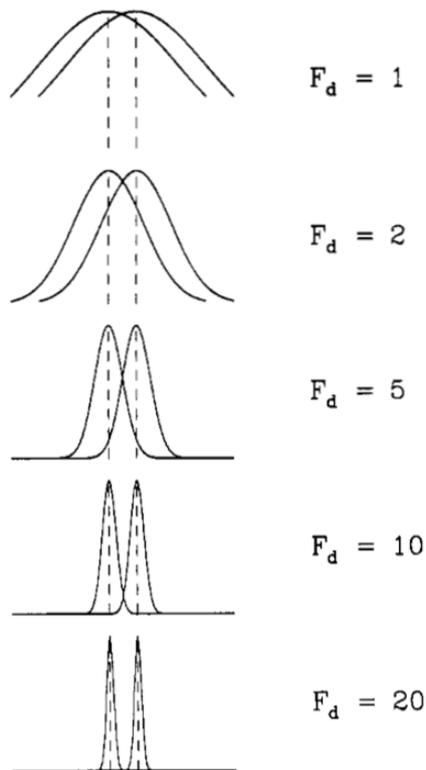


Figure 25 : Représentation de la différenciation de 2 pics en fonction du pouvoir de fractionnement (52)

II.3.3. Limites des théories de SdFFF

Bien que les méthodes de FFF présentent de nombreux avantages, elles ne sont pas exemptes de limites. Premièrement, peu de grandeurs fondamentales sont décrites en Fractionnement par couplage Flux Force et spécifiquement en SdFFF. De plus, la sélectivité qui est décrite ne prend en compte qu'une grandeur : le diamètre cellulaire. Outre ces considérations, peu de publications décrivent cette méthode. La FFF, et les sous domaines qui la composent, sont relativement nouveaux dans le monde scientifique et méritent de plus amples recherches (comme celles effectuées au sein du laboratoire de Chimie Analytique de Limoges). Par exemple, en ce qui concerne la sélectivité, n'évoquer et n'utiliser dans les équations que la taille des cellules semble limité. Au vu des autres exemples de séparations analytiques, différents paramètres pourraient potentiellement entrer en ligne de compte et préciser les théories actuellement admises. La mise en place d'un protocole visant à préciser ces théories est le but de cette thèse, et mérite donc de plus amples explications ...

III. Expérimentations

III.1. Contexte et mise en place

L'étude de la séparation par Sedimentation Field Flow Fractionation n'est pas une pratique courante, notamment lors des études de Pharmacie. Ces études intègrent certes de la chimie analytique mais les principes de Fractionnement par couplage Flux Force n'y sont pas abordés. Cependant tout un chacun connaît la rigueur appropriée aux manipulations scientifiques. Sachant que la mise en place d'expérimentations adaptées, spécifiques et reproductibles est une prérogative à tout protocole opératoire, de nombreuses recherches auront été nécessaires aux expérimentations présentées dans cette thèse. À la suite des recherches bibliographiques présentées dans le chapitre « Le Fractionnement par Couplage Flux-Force », l'appréhension de systèmes de séparations complexes est aussi importante. Le laboratoire de chimie analytique de la faculté possède différents systèmes de SdFFF mais les expériences ont constamment été réalisées sur la même machine. De plus la compréhension de quelques principes et des bonnes pratiques de culture cellulaire a aussi été nécessaire. Enfin l'utilisation d'un système de comptage des cellules en fonction de leur taille est aussi importante dans l'optique d'analyser les résultats.

Outre les contraintes liées à la difficulté de prise en main du système, l'aspect mécanique est aussi complexe. Afin de répondre aux problématiques liées à l'utilisation d'un flux de phase mobile, à l'injection d'un échantillon dans ce flux ou à la détection de particules en bout de chaîne, des éléments mécaniques usuels de chromatographie sont utilisés. Cependant le bol rotatif est un élément spécifique au Fractionnement par couplage Flux-Force par champ multi-gravitationnel. La définition des spécifications techniques de ce bol ainsi que des joints tournants (permettant la liaison entre les éléments mécaniques fixes et le bol) est à la base des expérimentations.

La compréhension des principes de culture cellulaire, la maîtrise du système de SdFFF, ainsi que la connaissance de la méthode d'analyse sont d'importantes parts de la mise en place de cette expérience. Ces éléments ont concerné une grande partie de mon stage mais étaient nécessaires à ma formation. L'ensemble des données explicitant le déroulement des manipulations et l'analyse des résultats sont détaillés ci-dessous.

III.2. Matériel et méthode

III.2.1. Matériel opératoire

III.2.1.1. Culture cellulaire

Pour l'ensemble des expérimentations, la culture cellulaire a nécessairement été à la base de chaque analyse. Certes les protocoles ont pour but final de spécifier et de comprendre les mécanismes régissant la séparation par SdFFF, cependant ces analyses seraient impossibles sans espèces à séparer. Dans le laboratoire de chimie analytique de Limoges, les analyses se font sur des échantillons de cellules vivantes. La culture cellulaire joue donc un rôle primordial à toutes expérimentations.

Néanmoins cultiver des cellules ne se pratique pas sans règles ni formations. Outre les contaminations croisées et la contamination des locaux (utilisés par d'autres membres du services) la reproductibilité d'analyse est une prérogative à tout protocole expérimental. Ainsi les bonnes pratiques de laboratoire (et de culture cellulaire) sont cruciales et nécessairement appliquées.

Plusieurs conditions sont nécessaires au choix du modèle cellulaire pour ces expérimentations. Premièrement les cellules doivent se multiplier rapidement afin d'avoir la possibilité de réaliser de nombreuses manipulations. De plus, les éléments à analyser doivent avoir un diamètre de l'ordre du micromètre dans le but d'utiliser la SdFFF dans des conditions choisies (Cf. « Les modes d'élution »). Enfin, la facilité de manipulation est aussi à prendre en compte.

Les cellules vivantes sont de très bons supports aux expérimentations de séparation car elles diffèrent entre elles et ne sont jamais totalement homogènes au sein d'une même population. Si un modèle cellulaire est défini par des caractéristiques globales (spectre de taille, de forme, de densité, etc) des variations existent toujours entre les cellules. Une cellule mère engendrera deux filles hétérogènes. Cette légère variabilité au sein de la population est tout de même nécessaire ; elle est le moteur de la séparation. En fonction du procédé analytique utilisé, et des paramètres de séparation mis en jeu, ce paramètre différenciera les différentes populations. Cependant, les variations biophysiques des éléments à séparer ne doivent pas être trop importantes sinon des modes d'élution différents de SdFFF entreraient en jeu et fausseraient l'analyse finale (Cf. « Les modes d'élution »). Ces critères expliquent l'utilisation de modèles cellulaires en lieu et place de billes usinées régulièrement, dont les propriétés sont en tout point identiques.

Connaissant ces paramètres, ainsi que les disponibilités du service, une ligne cellulaire nommée WiDr est sélectionnée. Ces cellules proviennent d'un cancer colorectal et sont immortalisées. Initialement, les cellules sont prélevées au niveau de la tumeur primaire d'un adénocarcinome situé dans le colon d'un patient (malheureusement mort depuis un long moment désormais) (53). Après ce prélèvement (et des manipulations externes qui ne sont pas comptabilisées pour nous), elles sont acheminées au laboratoire de Limoges et nommées « P1 » : premier passage. À ce moment-là, ces cellules sont implantées dans un milieu de culture adapté à leur nombre (flasque, tube, etc) et leur multiplication peut débuter. Un passage correspond au repiquage d'un milieu de culture à un autre, ainsi, les passages traduisent le nombre de répliquages que les cellules ont effectués. Des cellules récemment prélevées, ayant subi quelques manipulations et ne s'étant pas démesurément multipliées auront un faible nombre de passages. À l'inverse, après de nombreux repiquages, la

population cellulaire aura un nombre de passages élevé. Lorsque les cellules atteignent « P25 » soit le 25^{ème} repiquage d'une même lignée cellulaire, elles deviennent difficilement utilisables car leurs caractéristiques peuvent avoir évolué anarchiquement. Au cours des expérimentations présentées ici, les cellules utilisées s'étendaient de « P15 » à « P25 ».

La culture des WiDr est assez simple même si elle nécessite une rigueur quotidienne. Ces cellules se développent en adhérant à une paroi. Dans le cadre de ces expérimentations, les cellules évoluent dans des flasques plastiques de 75cm². La culture s'effectue toujours sur 75cm², dans une étuve à 37°C, avec une atmosphère de culture à 5% du volume de CO₂. Lors d'un repiquage, une proportion de cellules du passage précédent est isolée dans une nouvelle flasque dont le milieu de culture (contenant les nutriments) est renouvelé. Ainsi ces cellules obtiennent l'espace et les nutriments propices à leur nouveau développement. Au moment de leur nouvel ensemencement, les cellules sont en faible densité (environ 1x10⁶ cellules par flasqueensemencée). Au bout de quelques jours, et de quelques multiplications, leur nombre augmente et elles sont ainsi en haute densité dans la flasque. C'est à ce moment-là qu'elles doivent être repiquées de nouveau. Ces manipulations permettent la multiplication des flasques et donc des expérimentations de séparation.

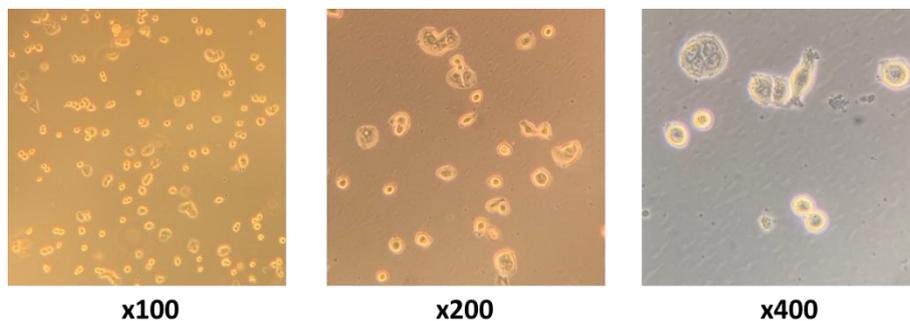


Figure 26 : Culture de WiDr (P23) de faible densité.
Observation au microscope optique (x100 / x200 / x400)

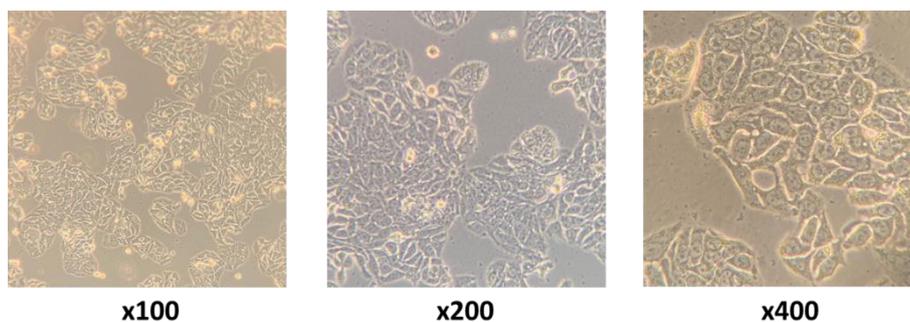


Figure 27 : Culture de WiDr (P23) de haute densité.
Observation au microscope optique (x100 / x200 / x400)

Dans l'optique d'effectuer des séparations par SdFFF répétables, la culture cellulaire est normalisée et conditionnée. Soixante-douze heures avant le début de la manipulation, les cellules sont décollées puis comptées pour être repiquées et remises en culture à une concentration de 1x10⁶ cellules par flasque de 75cm². Ainsi elles peuvent se développer dans les mêmes conditions quel que soit le jour de manipulation. De plus, chaque échantillon à séparer par SdFFF est composé du même nombre de cellules (aux incertitudes manipulatoires près).

III.2.1.2. SdFFF

Si le Fractionnement par couplage Flux-Force tend à se développer, se populariser et se propager, les systèmes sont rares à ce jour. Ainsi, aucune chaîne de SdFFF n'existe – pour le moment – « clé en main » dans le commerce. Le service de chimie analytique a construit de toutes pièces des systèmes de séparation fonctionnels dont les expérimentations présentées ici, et moi-même, ont pu bénéficier. Cela explique notamment le réemploi de certains appareils utilisés en chromatographie (HPLC).

Un système de SdFFF s'étend du flacon de phase mobile jusqu'au bécher-poubelle final. Entre ces deux extrémités, différents éléments permettent la séparation des cellules. Les explications ci-dessous détaillent l'intégralité du système dans le sens du flux primaire : le flux de phase mobile.

La phase mobile est le support de l'échantillon au cours de l'expérimentation. Elle permet la mise en mouvement des cellules à séparer au sein du flux principal. Tout au long des manipulations, la phase mobile utilisée est du PBS. Ce tampon phosphate salin est une solution couramment utilisée dans la culture et le maintien cellulaire car il est isotonique (concentration physiologique en sels du corps humain). Les cellules en suspension dans ce liquide ont ainsi moins de chances d'éclater à cause des différences de potentiels électriques. De plus, grâce à ses propriétés tampons (pH à 7,4) il reproduit fidèlement les conditions du développement humain. Les cellules de l'échantillon mère sont initialement diluées dans cette phase mobile lors de la culture cellulaire. Le PBS peut être acheté ou préparé. Lorsqu'il est acheté, le PBS est stérile et prêt à l'emploi. Dans la vie courante du laboratoire, pour des raisons économiques, le PBS utilisé est préparé avec une poudre ajoutée à de l'eau stérile. Par la suite il est autoclavé afin d'éviter toute contamination.

La phase mobile est entraînée dans le système à travers des tubulures par l'aspiration d'une pompe. Ces éléments proviennent de systèmes de chromatographie fréquemment utilisés et sont nommés : Tubulures Peek®. La pompe permet la circulation de la phase mobile dans le circuit. Elle est adaptée aux tubulures, à la longueur du circuit et aux pertes de charges que cela implique. Au cours des expériences, deux pompes ont été utilisées : Waters® 515 HPLC Pump et Shimadzu® LC-20AD. Certes le remplacement de matériel expérimental nuit à la reproductibilité opératoire, néanmoins les débits de phase mobile mis en jeu étaient contrôlés par empotage lors de chaque expérience. La technique d'empotage consistant à mesurer la qualité de volume s'écoulant dans les tubulures durant un temps défini et à ainsi déterminer le débit moyen sur cette période définie. Enfin, un dernier élément est directement emprunté aux systèmes conventionnels de chromatographie : l'injecteur. L'échantillon à séparer est injecté dans le flux de phase mobile grâce à cet appareil. L'utilisation d'un injecteur courant et parfaitement connu assure la reproductibilité de cette phase de la séparation. Ainsi, 100 µL d'échantillon pénètrent dans le flux primaire lors de chaque injection. Le matériel utilisé est une vanne manuelle Rheodyne® 7125i nécessitant le remplissage d'une chambre d'injection grâce à une seringue puis l'injection manuelle de l'échantillon.

Suite à l'injection, la phase mobile véhicule l'échantillon à analyser dans le bol de centrifugation. Dans ce système rotatif s'appliquent les forces permettant la séparation des cellules. Cependant, d'un point de vue mécanique, le passage de l'échantillon entre les tubulures fixes et le bol en mouvement n'est pas aisé. Dans le système utilisé, la liaison entre ces éléments s'effectue grâce à des joints tournants. Ces joints, développés par l'IUT de Limoges, sont assemblés au sein du laboratoire. Un support de guidage permet d'assurer la mise en contact de pièces en caoutchouc qui assurent l'étanchéité. La mise en rotation de

chaque élément mobile devant être fluide, constante et régulière, un roulement à bille est nécessaire. L'ensemble de ce système de jointure est maintenu en place grâce à des ressorts assurant le fonctionnement du système. Un montage méticuleux des joints tournants est crucial ; le système pouvant être capricieux.

Les joints tournants permettent l'arrivée de l'échantillon dans le bol de centrifugation. À ce niveau du système, la séparation s'opère. Cette pièce doit être solide car elle est soumise à d'importantes contraintes. En effet, le bol doit permettre le passage de l'échantillon tout en supportant d'importantes forces rotationnelles. Ces caractéristiques sont permises grâce à la structure de guidage métallique. Au sein de cette structure, des feuilles de Mylar® sont découpées et permettent le passage de la phase mobile. Ce canal est placé entre des plaques de polystyrène serrées fortement afin d'assurer l'étanchéité. Cependant, lorsque ce système a été développé, certains résultats semblaient incohérents. Après investigations, ces résultats illogiques ont été imputés à des déformations du canal. La force de serrage appliquée aux plaques de polystyrène assurait certes une bonne étanchéité ; cependant elle déformait le canal dans lequel passaient la phase mobile et l'échantillon. Un dilemme s'imposait alors : serrer moins mais craindre des fuites ou serrer trop et fausser les résultats. Heureusement une solution satisfaisant toutes les conditions est trouvée : ajouter un contre canal. Cette plaque dont les découpages rappellent le canal utilisé permet d'éviter tout point de compression en absorbant le surplus de serrage. L'échantillon peut ainsi circuler dans un système parfaitement régulier. Le canal ainsi créé mesure 175 µm d'épaisseur et 81,7 cm de longueur (chaque extrémité du canal étant triangulaire).

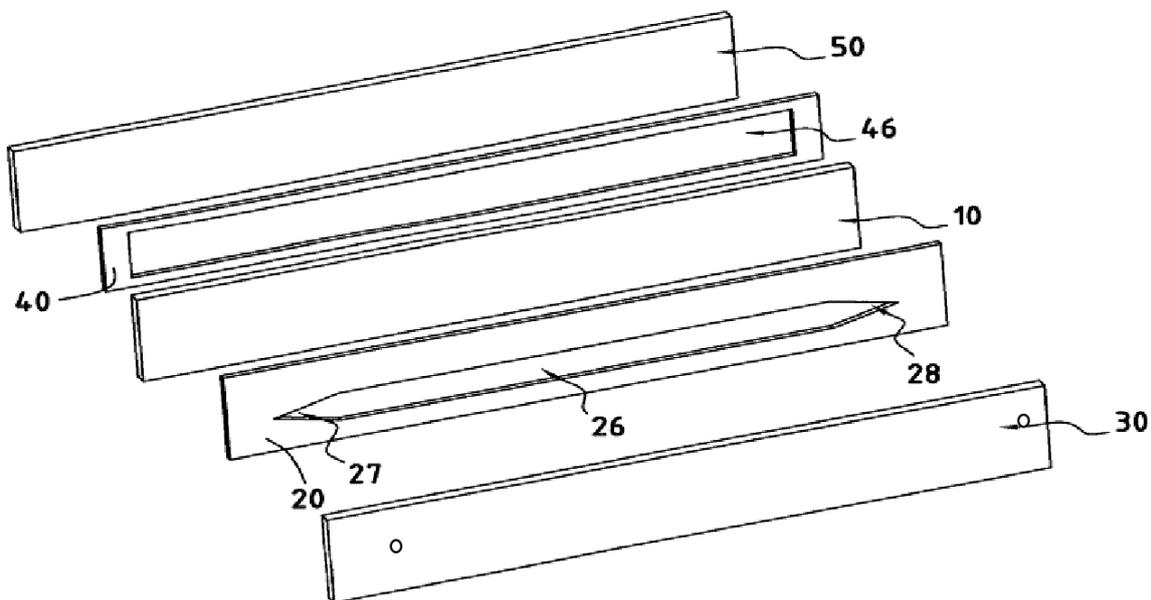


Figure 28 : Représentation du bol de centrifugation(19)

Légendes : 20 : canal / 27-28 : entrée-sortie du canal / 26 : volume du canal / 30 : paroi d'accumulation percée pour la fixation des tubulures Peek® au niveau des extrémités du canal / 10 : paroi de déplétion / 40 : contre canal / 46 : volume du contre canal / 50 : paroi de serrage du contre canal

En sortie de bol de centrifugation, l'échantillon, normalement séparé, traverse de nouveau un joint tournant afin de rallier le détecteur UV-Visible. Le détecteur utilisé dans ce système est un Waters 486 Tunable Absorbance Detector. Néanmoins, son usage est détourné. En effet, un détecteur UV-Visible est habituellement utilisé en corrélation avec la loi de Beer-Lambert. Ici, les propriétés d'absorbance ne sont pas recherchées, le détecteur fonctionne seulement comme un compteur particulaire. Ainsi, lorsqu'une cellule, un débris ou une particule traverse le faisceau UV-Visible, le détecteur envoie l'information au boîtier d'acquisition traduisant le signal pour le logiciel de l'ordinateur.

Le logiciel est le dernier élément du matériel opératoire. Aucun logiciel commercialisé ne correspondant aux besoins du laboratoire lors du développement de la méthode, ce dernier a été développé de toutes pièces. Ce programme informatique à l'interface un peu datée est toutefois clé dans l'analyse des résultats car il intègre le signal mesuré par le détecteur et trace une prévisualisation du fractogramme. Cette représentation décrit l'intensité du signal (en mV) en fonction du temps. Elle est très utile afin de régler les paramètres opératoires au cours de l'expérimentation. Par la suite, les données de ce fractogramme sont exploitées sur Excel. Le fractogramme final obtenu correspond à l'absorbance en fonction du temps.

III.2.1.3. Coulteur Counter

Après les étapes de séparation, différents extraits sont prélevés de l'échantillon mère (Cf. Conditions des manipulations et méthode expérimentale). Chacun de ces échantillons est analysé et un diamètre caractéristique est attribué aux cellules composant l'extrait. Cependant, peu de systèmes permettent de mesurer une telle quantité de cellules dans un temps assez court. Les technologies associées à ces systèmes sont spécifiques et peu courantes. Au sein du service de chimie analytique, l'appareil utilisé à cet effet est le Coulteur Counter.

Utilisé depuis la seconde partie du XX^{ème} siècle, le Coulteur Counter permet – comme son nom l'indique - de compter les cellules et de les quantifier selon leur taille. Sa technologie se base sur des mesures d'impédance électrique. L'échantillon à analyser est dilué dans un électrolyte (nommé ISOTON[®] lors de ces expérimentations). Cette solution conductrice entraîne une différence de résistance électrique entre deux électrodes placées dans une pipette. Au sein de cette pipette, les deux électrodes se situent dans des compartiments différents, simplement reliés par un orifice circulaire. Lorsque les cellules se déplacent par l'orifice, une quantité d'ISOTON[®] égale à leur volume se déplace dans le sens opposé. Ce volume de solution conductrice qui s'est déplacé entraîne une différence de résistance électrique mesurée par les électrodes. Cette mesure est transcrite en volume de particule et supposant les cellules sphériques un simple calcul mathématique détermine le diamètre de la cellule qui s'est déplacée.

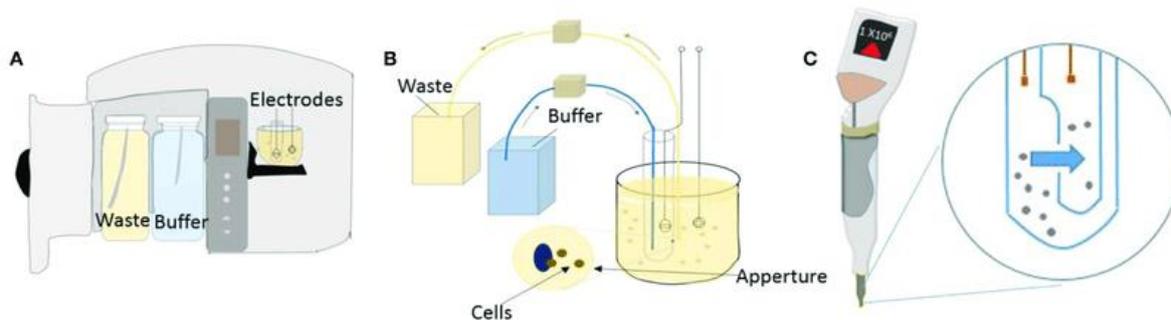


Figure 29 : Représentation du fonctionnement d'un Coulteur Counter (54)

A : Coulteur Counter / B : Système de détection au sein de l'appareil / C : Orifice calibré permettant la mesure des cellules

Chaque cellule qui se déplace est comptabilisée et une analyse de la distribution des cellules en fonction de leur taille est automatiquement réalisée par le logiciel pilotant l'appareil. Ainsi la dispersion en taille des cellules de chaque extrait séparé par Coulteur-Counter est donné par un graphique tel que présenté ci-dessous.

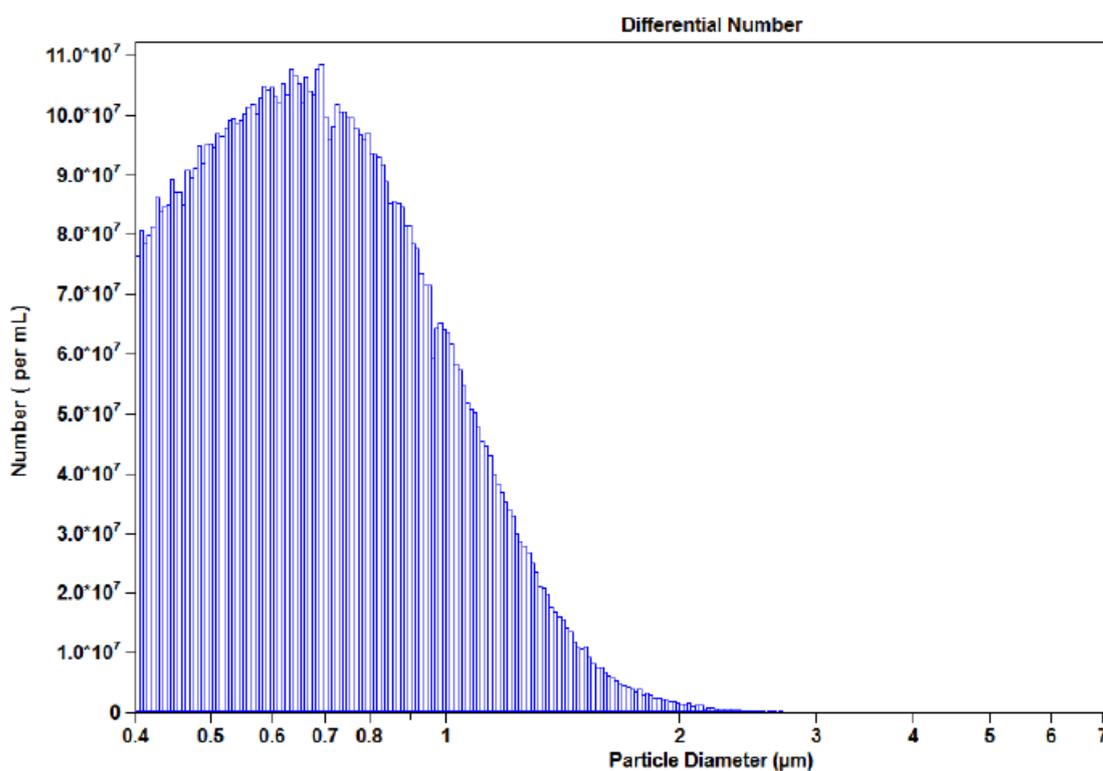


Figure 30 : Exemple de graphique obtenu par Coulteur Counter

III.2.2. Méthode expérimentale

III.2.2.1. Conditions opératoires

La normalisation des conditions opératoires est cruciale permettant ainsi d'assurer la reproductibilité et la répétabilité des expérimentations tout au long des manipulations. Dans cette optique, la culture cellulaire est uniformisée comme cela est détaillé dans la partie Culture cellulaire. Ainsi les échantillons à séparer sont similaires et les résultats expérimentaux ne dépendent plus de cette partie. Le nombre de cellules par échantillon est fixé entre $2,5 \cdot 10^6$ cellules/ml et $3,0 \cdot 10^6$ cellules/ml. Ce comptage est effectué grâce aux cellules de Malassez. L'hématimètre (lame de verre permettant le comptage cellulaire au microscope) permet de quantifier le nombre de cellules en suspension dans un petit volume de solution afin d'en extrapoler la valeur globale dans l'échantillon total. Cette technique inventée par le médecin Louis-Charles Malassez est certes expérimentale et soumise à d'importantes erreurs manipulatoires, cependant elle est rapide et adaptée au type d'expérimentation réalisé ici. La qualité de la séparation de l'échantillon n'étant pas directement fonction du nombre de cellules, cette information demeure additionnelle et non critique. La concentration cellulaire de l'échantillon mère est tout de même renseignée sur le fractogramme expérimental afin de n'omettre aucune information pouvant servir à l'analyse des résultats.

La majeure partie du travail exposé ici détaille la séparation d'éléments au sein d'un échantillon. Les paramètres opératoires et les conditions de ces manipulations sont donc, eux-aussi, normalisés. Le canal dans lequel les cellules sont différenciées ne varie pas entre les expérimentations, son épaisseur et de 175mm. Le débit de phase mobile (PBS) demeure à 0,8mL/min. Ce débit est systématiquement vérifié par empotage lors de chaque expérience. Le bol rotatif exposant l'échantillon à une force multi-gravitationnelle est identique lors de chaque expérience. Sa vitesse de rotation est de 219 RPM. Ainsi, la force appliquée au sein du canal est de 8g. L'ensemble de ces conditions est déterminé afin de d'obtenir le type de séparation souhaitée. Dans les expérimentations présentées, l'échantillon se compose de particules dont le diamètre est supérieur au micron (les cellules de lignées WiDr mesurant une dizaine de micron en moyenne). Dans ce cas, le mode d'élution Brownien n'est pas cohérent (voir paragraphe « Les modes d'élution »). De plus, en fixant la valeur de la force appliquée au canal, le champ de force appliqué aux cellules ne plaque pas l'échantillon sur la paroi d'accumulation. Ainsi, le mode d'élution utilisé est le modèle « hyperlayer » et l'analyse des résultats s'effectue en utilisant les théories régissant ce modèle. Le détecteur situé en bout de chaîne observant le passage de cellules demeure réglé à une longueur d'onde de 254nm.

III.2.2.2. Séparation par SdFFF

Cette partie ne détaille pas les protocoles de mise en route, d'atteinte du régime permanent, d'arrêt et de nettoyage du système de SdFFF. Seules les méthodes permettant la réalisation des expériences de séparation sont expliquées.

Lorsque les cellules sont comptées et mises en solution dans la phase mobile (PBS), la séparation de l'échantillon peut débuter. À ce moment-là, l'ensemble des conditions expérimentales sont respectées. La séparation d'un échantillon complet de cellules en suspension se compose de multiples injections dans le canal de FFF. Le dimensionnement du système de SdFFF ne permettant pas l'injection du volume total de l'échantillon. De plus, afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules ségréguées à analyser, l'addition de différentes

collectes est nécessaire. Lors de chaque injection, un fractogramme décrit la séparation du volume échantillonnaire injecté. Ce fractogramme est obtenu grâce au détecteur UV-Visible qui décrit le passage d'éléments en sortie de canal en fonction du temps. Le tracé de cette courbe est similaire lors de chaque injection dont la séparation s'est correctement réalisée. Outre le fractogramme, une feuille d'expérience retraçant l'ensemble des paramètres opératoires est aussi complétée lors de chaque expérience (Annexe 1).

Widr-Sd : 8g; 0,80 mL/min, 254 nm, 0,25.10⁶C

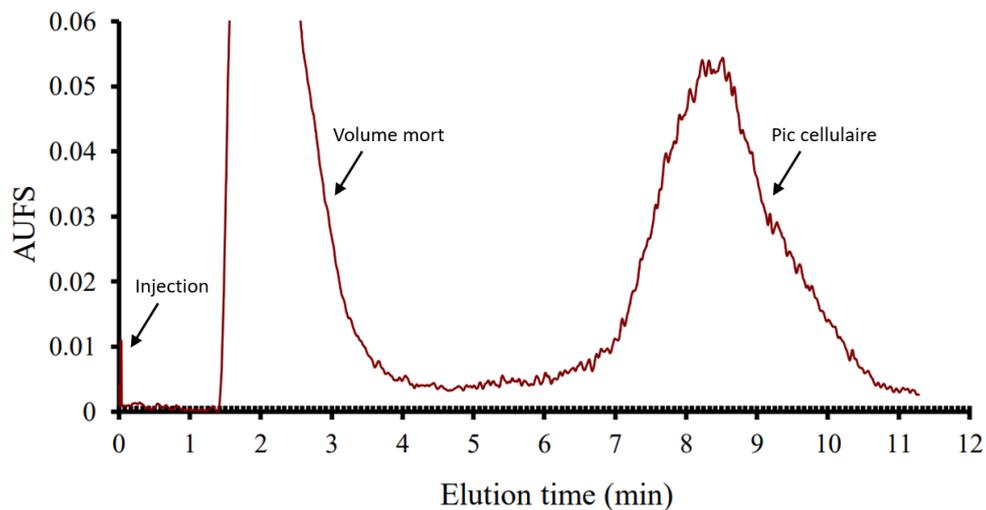


Figure 31 : Fractogramme brut d'une séparation cellulaire par SdFFF

L'acquisition des données obtenues par le détecteur fournit un tracé caractéristique analysable selon le protocole suivant :

- Le premier pic visible au bout de quelques secondes est très fin, il est sous la forme d'un Dirac. Ce pic correspond à l'injection du volume à séparer mais ne donne aucun résultat intéressant lors de l'analyse. Au cours des manipulations la présence de ce pic certifie la réalisation de l'injection.
- Après environ 90 secondes, un pic dont la base est significativement plus large et dont l'intensité est beaucoup plus importante débute. Les éléments élués à ce moment du fractogramme et observés par le détecteur correspondent à une population cellulaire non saine. Ces particules composent le « Volume mort ». Dans ce volume mort, différents types de particules s'éluent durant environ 2 minutes : débris cellulaires, amas cellulaires, poussières, déchets, etc. Le volume mort n'est d'aucune utilité pour la suite des expérimentations mais sa détection à un temps régulier est caution du bon état du système au fil des injections. Plus l'expérimentation est longue, plus la concentration de ces particules et donc l'intensité sur le fractogramme sera importante.
- Quelques minutes après la fin de la détection du volume mort, un nouveau pic apparaît. Ce dernier correspond à la zone d'intérêt du fractogramme : le pic cellulaire. Pendant 4 à 5 minutes, des éléments sont élués par le système et détectés par le détecteur UV-Visible. Ce pic cellulaire est composé de cellules vivantes séparées selon le gradient créé par le champ externe dans le bol de centrifugation. La collecte de fraction cellulaire s'effectue au moment de ce pic.

Widr-Sd : 8g; 0,80 mL/min, 254 nm, 0,25.10⁶C

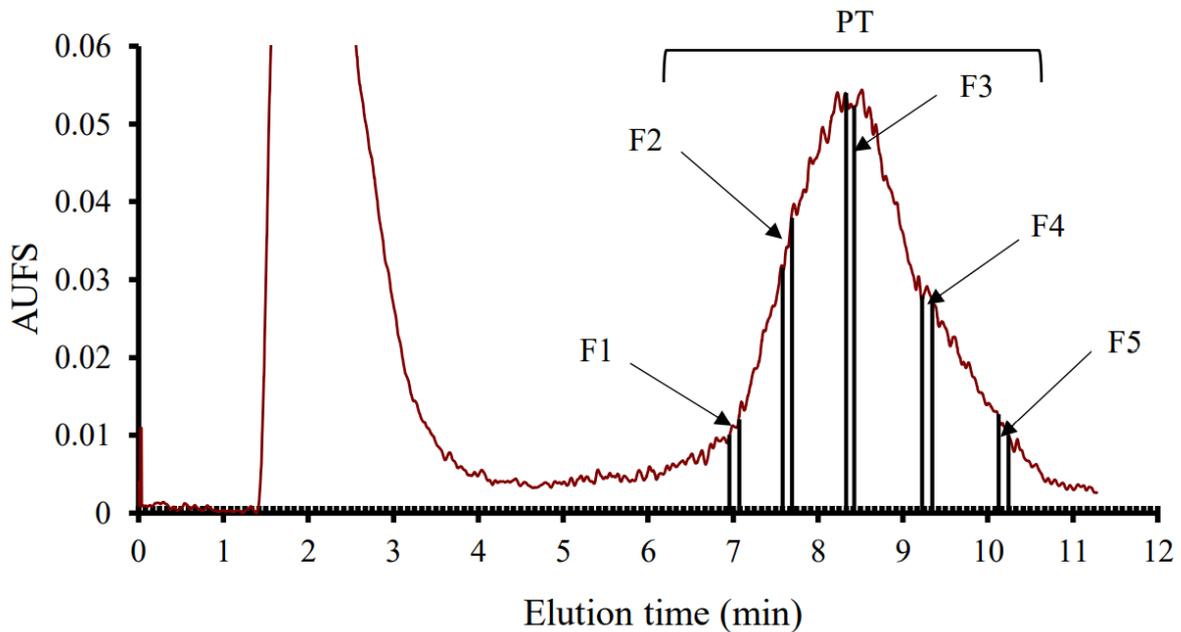


Figure 32 : Fractogramme d'une séparation cellulaire par SdFFF en fin de collecte

L'intérêt principal de l'expérimentation réside dans la séparation de l'échantillon cellulaire. Le pic cellulaire est élué en dernier et se compose des cellules vivantes. Il est séparé en plusieurs fractions qui permettront dans un second temps d'analyser la séparation. Arbitrairement et empiriquement, le pic a été divisé en 5 zones reflétant 5 populations cellulaires dont les caractéristiques devraient varier. Ces zones aux temps de rétention différents correspondent aux moments de collecte de l'échantillon. Chaque fraction est collectée durant 5 à 10 secondes. Ainsi dans les 5 tubes nommés F1/F2/F3/F4/F5 sont collectées les cellules des fractions correspondantes. La collecte des cellules s'effectue en fin de ligne, après le détecteur UV-Visible, dans un peu de milieu de culture afin de conserver les cellules en vie. Injection après injection, les cellules collectées aux mêmes temps de rétention sont stockées dans les mêmes tubes. Ainsi à la fin des manipulations, lorsque toutes les injections sont réalisées, les 5 tubes de collecte sont respectivement remplis de cellules aux caractéristiques identiques. Additionnellement à la collecte des fractions, une collecte de plusieurs « Pic Totaux » (ou PT) est aussi réalisée. Le tube contenant le pic total aura pour but de s'assurer de la réalité du comportement des cellules lors des réinjections.

III.2.2.3. Analyse par Coulteur Counter

À la suite de la séparation par SdFFF, l'échantillon est divisé en cinq tubes supposés contenir des populations cellulaires différentes. Cependant au sein de chaque tube la caractéristique des cellules ayant permis une séparation dans le canal doit être similaire. Selon l'expérience mise en jeu et le protocole mis en place, cette caractéristique doit être le diamètre particulaire.

Outre les cinq échantillons reflétant la séparation, le tube contenant le pic total est aussi analysé. Enfin, un petit volume de l'échantillon mère nommé « Crude » est étudié et compté à chaque manipulation afin d'observer le comportement de la lignée de WiDr.

Ainsi, sept comptages sont réalisés grâce au Coulteur Counter. Chacun de ces comptages dure jusqu'à l'obtention d'un nombre de particules significatif (ce nombre correspond à quelques milliers). Les données majeures recueillies par ce système d'analyse sont les diamètres médian et moyen des particules comptées. La dispersion du pic cellulaire est aussi prise en compte afin d'être analysée. Enfin, le nombre de particules comptées est renseigné à chaque manipulation.

L'ensemble des résultats est noté sur une feuille de résultats appropriée (voir Annexe 2).

III.2.2.4. Réinjection dans le système de SdFFF

La dernière étape de cette expérience est la réinjection de chaque fraction (et du pic total) dans le système de SdFFF. Cette réinjection permet de tracer un fractogramme final comprenant l'ensemble des résultats. Cette étape est utile afin de préciser le temps de rétention de chaque fraction.

Ainsi, cette réinjection marque la fin de l'expérimentation. L'ensemble des données utiles à l'analyse ayant été collecté.

III.3. Résultats

La mise en place d'expérimentations en SdFFF n'est pas courante dans le monde pharmaceutique, elle est encore moins au cours des études de pharmacie. Afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles les conditions et méthodes opératoires ont scrupuleusement été respectées et de nombreuses manipulations ont été réalisées.

De plus, chaque fractogramme doit pouvoir être analysé sans nécessiter l'ajout de contexte. Les informations critiques de la manipulation doivent y être directement accessibles. Dans cette optique, pour chaque graphique obtenu, les conditions opératoires critiques sont détaillées dans le titre du graphique.

Ces informations sont :

- Le type de chromatogramme tracé
- La date de l'expérimentation
- La force du champ de séparation multi gravitationnel (en nombre de g)
- Le débit de phase mobile employé (en ml/min)
- La longueur d'onde réglée sur le détecteur (en nm)
- Le nombre de cellules comptées dans l'échantillon mère

Au cours des manipulations, les données obtenues grâce au logiciel de pilotage du système de SdFFF sont difficilement lisibles directement. Une macro (ensemble d'action exécutées automatiquement) développée au sein du laboratoire permet l'importation des données sur Excel afin de tracer les courbes exploitables présentées ci-dessous.

Avant d'exposer les résultats, il semble important de rappeler le but des expérimentations : Séparer les différentes populations cellulaires d'un échantillon et observer la sélectivité de cette séparation en fonction de la taille des particules.

Les expérimentations réalisées se présentent sous deux protocoles :

- Premièrement, une série d'expériences permet de déterminer la sélectivité d'éluion obtenue par ce système de SdFFF dans les conditions opératoires définies. Dans cette optique, de nombreuses expérimentations au même protocole expérimental sont réalisées et les résultats obtenus sont exploités.
- Dans un second temps, une étude de la sélectivité de la séparation en fonction du temps de culture cellulaire est réalisée.

III.3.1. Détermination de la sélectivité de séparation par SdFFF

Comme évoqué dans la partie « Méthode expérimentale », la première partie des expérimentations correspondait à la récolte de différentes populations cellulaires nommées fractions et éluées à différents temps de rétention. Cette partie est détaillée dans la « Figure 32 : Fractogramme d'une séparation cellulaire par SdFFF en fin de collecte » et ne nécessite pas de précision spécifique.

Une fois ces fractions collectées, elles sont analysées par Coulter Counter afin de déterminer la taille moyenne des cellules de la population. Outre cette détermination de leur diamètre, les fractions sont également réinjectées dans le système de séparation avec les exactes mêmes conditions opératoires que lors de la séparation précédente. De cette façon le temps de

réention exact de chaque échantillon dans le système peut être déterminé. Au vu du nombre important de manipulations réalisées, seuls certains fractogrammes représentatifs sont présentés. Différentes dates de manipulation sont choisies afin de garantir la reproductibilité des résultats obtenus.

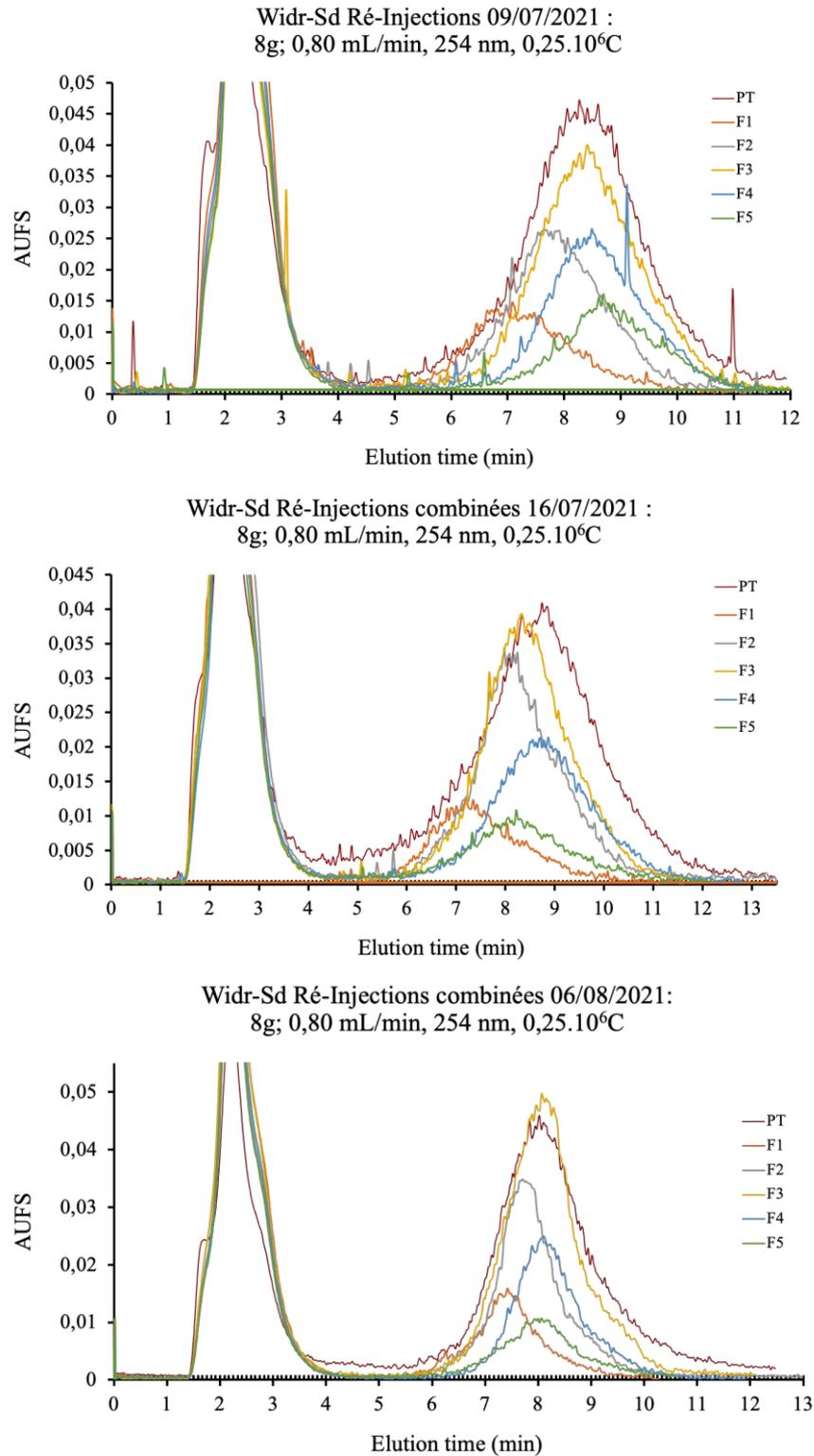


Figure 33 : Fractogrammes des réinjections lors de 3 manipulations : 09/07/21 en haut, 16/07/21 au milieu et 06/08/21 en bas.

Cet ensemble de fractogrammes est la transcription de trois expérimentations réalisées au cours de l'été 2021. Ils représentent la réinjection dans le système des fractions cellulaires collectées après la séparation des échantillons initiaux. Pour chaque manipulation, les courbes obtenues traduisant les réinjections sont combinées sur un même fractogramme afin de comparer les temps de rétention de chaque fraction. Sur chaque graphique, la réinjection du pic total (PT) est matérialisée en rouge, la réinjection de la première fraction collectée (F1) est matérialisée en orange, la réinjection de la deuxième fraction collectée (F2) est matérialisée en gris, la réinjection de la troisième fraction collectée (F3) est matérialisée en jaune, la réinjection de la quatrième fraction collectée (F4) est matérialisée en bleu et la réinjection de la cinquième fraction collectée (F5) est matérialisée en vert.

Ces fractogrammes permettent d'identifier clairement les temps de rétention de chaque réinjection de fraction (le temps de rétention du pic total n'étant pas nécessaire à nos futures discussions).

Tableau 2 : Détermination des temps de rétention (en min) lors de la réinjection de fractions, manipulation du 09/07/2021

Fraction	Temps de rétention		Tr (min)
	Minutes	Secondes	
F1	7	2	7.03
F2	7	49	7.82
F3	8	26	8.44
F4	8	29	8.48
F5	8	42	8.70

Tableau 3 : Détermination des temps de rétention (en min) lors de la réinjection de fractions, manipulation du 16/07/2021

Fraction	Temps de rétention		Tr (min)
	Minutes	Secondes	
F1	7	14	7.23
F2	8	6	8.10
F3	8	20	8.33
F4	8	44	8.73
F5	8	11	8.18

Tableau 4 : Détermination des temps de rétention (en min) lors de la réinjection de fractions, manipulation du 06/08/2021

Fraction	Temps de rétention		Tr (min)
	Minutes	Secondes	
F1	7	26	7.43
F2	7	44	7.73
F3	8	4	8.07
F4	8	6	8.10
F5	8	4	8.07

Outre les informations de temps de rétention, le diamètre moyen des cellules collectées est aussi déterminé pour chaque fraction. Cette donnée est en effet une prérogative à toute analyse complémentaire. Pour ce type de particule, un Coulter Counter est utilisé afin de mesurer le diamètre des cellules collectées. Après l'analyse, les résultats sont rapportés dans un tableau tel que présenté dans l'annexe : Feuille de résultats du Coulter Counter.

Pour les trois manipulations spécifiquement présentées ici, les résultats sont reportés ci-dessous :

Tableau 5 : Détermination du diamètre moyen (en μm) de chaque fraction, manipulation du 09/07/2021

Fraction	Diamètre médian (en μm)
F1	15.03
F2	14.44
F3	13.90
F4	13.72
F5	13.37

Tableau 6 : Détermination du diamètre moyen (en μm) de chaque fraction, manipulation du 16/07/2021

Fraction	Diamètre médian (en μm)
F1	14.97
F2	14.50
F3	13.99
F4	13.66
F5	12.49

Tableau 7 : Détermination du diamètre moyen (en μm) de chaque fraction, manipulation du 06/08/2021

Fraction	Diamètre médian (en μm)
F1	15.25
F2	14.50
F3	13.84
F4	13.73
F5	13.65

L'ensemble des données présentées permet de tracer les courbes représentant le logarithme décimal du temps de rétention en fonction du logarithme décimal du diamètre cellulaire. Pour chaque manipulation cinq points sont obtenus (chaque point représentant une fraction). Une régression linéaire est réalisée pour ces cinq points pour chaque expérimentation. Ainsi deux données sont directement exploitables sur le graphique : la pente de la courbe (la sélectivité de séparation) et le coefficient de régression linéaire (donnée traduisant la représentativité du modèle linéaire).

Le graphique présenté ci-dessous cumule les trois manipulations :

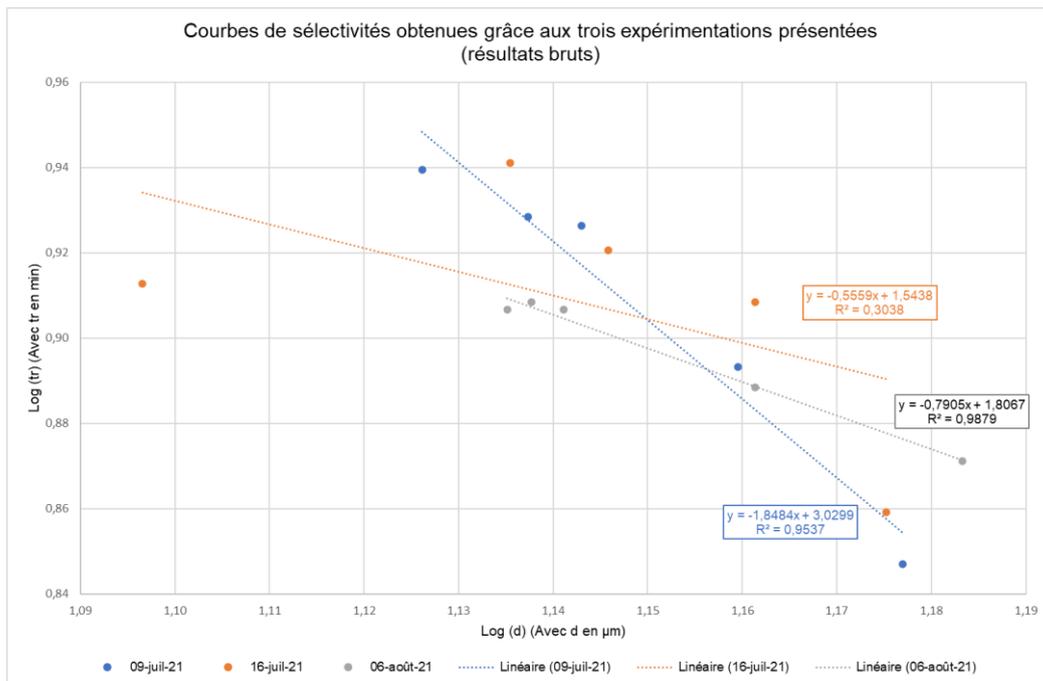


Figure 34 : Graphique combiné brut des courbes de sélectivité des 3 expérimentations détaillées ci-dessus.

Après une rapide analyse, un point peut immédiatement être écarté des résultats de par son incohérence. Ce point aberrant correspond à la 5^{ème} fraction réinjectée au cours de l'expérience réalisée le 16 juillet 2021. Les résultats terminaux sont donc :

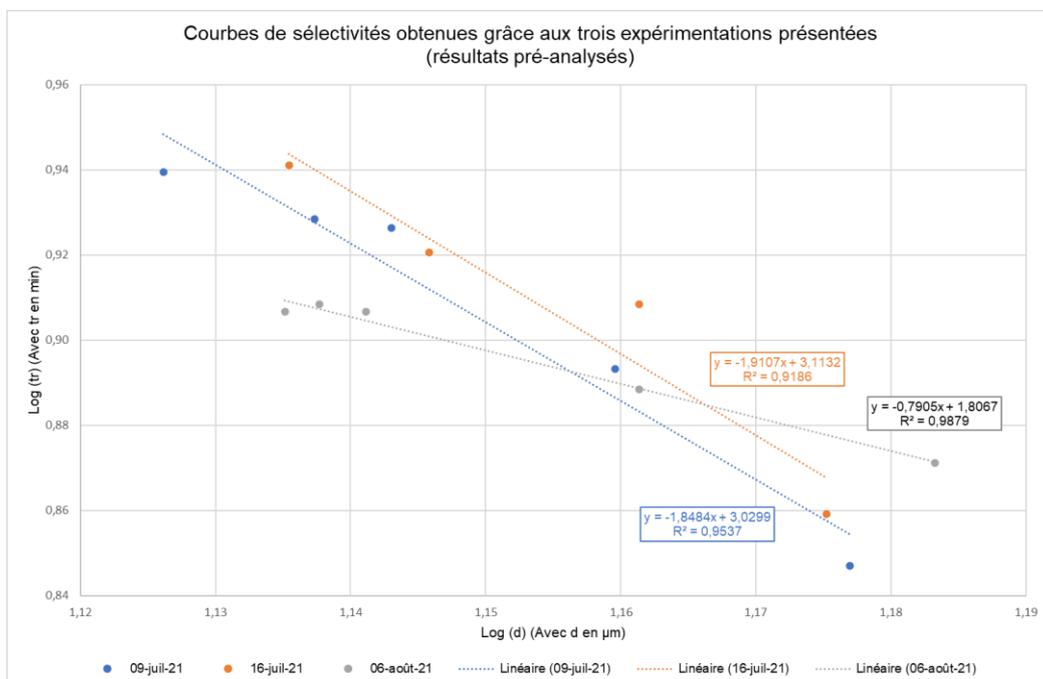


Figure 35 : Graphique combiné préanalysé des courbes de sélectivité des 3 expérimentations détaillées ci-dessus.

Ainsi les résultats des expérimentations sont :

Tableau 8 : Résultats des trois manipulations présentées

Date de manipulation	Pente (sélectivité)	R ²
09 juillet 2021	1.8	0.95
16 juillet 2021	1.9	0.92
06 août 2021	0.8	0.99

III.3.2. Influence de la durée de culture sur la sélectivité

L'influence du temps de culture sur la séparation par SdFFF est aussi étudiée dans cette thèse. Ce paramètre opératoire entraîne de nombreuses variations sur la population cellulaire tout en utilisant les mêmes cellules initiales. Afin de manipuler dans ces conditions, les cellules sont repiquées le lundi matin puis les expérimentations débutent le mercredi suivant, soit 48h après le repiquage. Cette série d'expériences se poursuit le jeudi et le vendredi. Les protocoles opératoires de chaque séparation sont similaires à ceux présentés jusqu'ici. Les résultats intermédiaires ne sont pas détaillés, seules les courbes de sélectivité (soit le but de ces expériences) sont présentées ci-dessous :

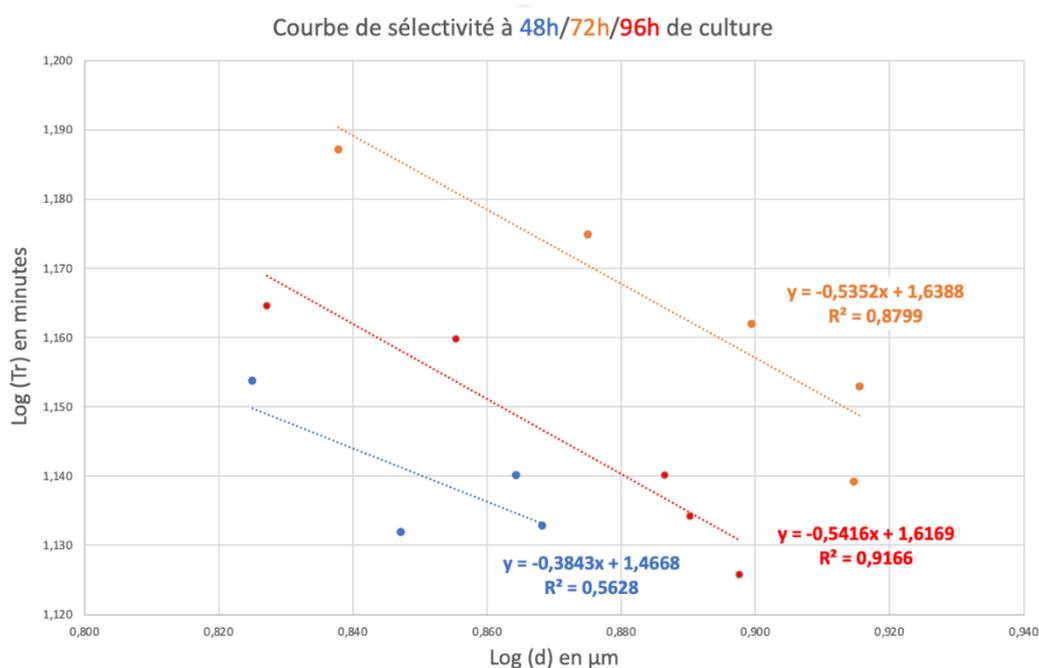


Figure 36 : Courbes de sélectivité tracées à 48h/72h/96h de culture (manipulations du 28 au 30 juillet 2021)

Ainsi les résultats de ces expérimentations sont :

Tableau 9 : Résultats de la détermination de la sélectivité en fonction du temps de culture

Durée de culture (h)	Sélectivité	R ²
48	0.4	0.56
72	0.5	0.88
96	0.5	0.92

III.4. Discussion

Les expérimentations présentées dans cette thèse explorent un thème principal : l'étude de la sélectivité d'une séparation par SdFFF. Ces manipulations doivent permettre d'observer si la « Size Selectivity » (ou sélectivité en fonction de la taille des particules) est correctement définie dans le monde de la SdFFF. Elles doivent également déterminer si la taille des particules est la seule donnée ayant un impact concret sur la qualité de la séparation. Cette étude aura occupé la majorité des expériences réalisées au cours de l'été 2021. Cependant les résultats obtenus demeurent discutables.

III.4.1. Analyse de la séparation par SdFFF

Cette partie s'intéresse à la première série d'expériences dont le but était de déterminer la sélectivité de séparations par SdFFF lors de trois manipulations réalisées différents jours. Les résultats bruts de cette série d'expériences sont présentés dans la partie : Détermination de la sélectivité de séparation par SdFFF.

Premièrement, le prélèvement de fractions séparées par SdFFF s'est déroulé sans encombre. Après cette phase initiale des expérimentations les sept tubes obtenus sont :

- La première fraction notée « F1 »
- La deuxième fraction notée « F2 »
- La troisième fraction notée « F3 »
- La quatrième fraction notée « F4 »
- La cinquième fraction notée « F5 »
- Le pic total noté « PT »
- Un extrait de l'échantillon mère noté « Crude »

Dans un second temps, l'analyse de la séparation s'effectue grâce à deux tests : la réinjection des fractions dans le système ayant permis la séparation et la mesure du diamètre de ces fractions collectées.

Concernant la réinjection des fractions dans le système, cette manipulation a pour but de préciser le temps de rétention auquel les prélèvements avaient été effectués. Ainsi, étant donné la constance des conditions opératoires entre la séparation de l'échantillon mère et les réinjections, chaque fraction doit, lors de la réinjection, être détectée au temps auquel elle avait été collectée initialement. La détection d'une fraction spécifique doit se matérialiser sur le fractogramme par un pic fin correspondant à une population cellulaire spécifique car chaque cellule doit posséder les mêmes caractéristiques. En combinant chacune de ces réinjections sur un seul et même graphique, les pics correspondant à chaque fraction devraient s'échelonner selon leur ordre de collecte. Ces fractogrammes combinés sont présentés dans la Figure 33. L'analyse des résultats des trois expériences présentées est représentative de l'ensemble des manipulations effectuées au cours de l'été. Au cours de chaque manipulation, les réinjections des fractions F1, F2 et F3 se déroulent comme attendu, les temps de rétention dans le système s'échelonnant chronologiquement. Le temps auquel le pic de la première fraction F1 est détecté étant inférieur à celui de F2, lui-même inférieur à F3. Toutefois, des incohérences apparaissent pour les fractions F4 et F5. Pour chaque réinjection, les populations cellulaires F4 et F5 se détectent à la sortie de système dans le même temps que F3. Le Tableau 2, Tableau 3 et le Tableau 4 montrent cette co-élution. Pour l'expérience réalisée le 16 juillet 2021, le temps de rétention de la fraction F5 est même significativement

inférieur au temps de rétention de la fraction F4. Ces perturbations d'élution laissent entrevoir des incohérences dans la détermination de la sélectivité.

L'autre partie des expérimentations, permettant l'étude de la sélectivité, concerne la mesure du diamètre moyen de chaque fraction collectée. En prenant en compte les conditions expérimentales et le modèle d'élution, plus la taille des cellules à séparer diminue, plus le temps de rétention de ces éléments devrait être élevé. Cette projection sur l'ordre d'élution des cellules est cependant basée sur les théories actuellement admises sur le Fractionnement par couplage Flux-Force. En supposant le fait que seule la taille des particules influence leur temps de rétention, le modèle explique que les cellules plus volumineuses s'éluent en premier. La remise en cause de ces théories étant le fondement de cette thèse, l'ordre d'élution pourrait être discuté. Le Tableau 5, le Tableau 6 et le Tableau 7 transcrivent cette tendance. Au fil de l'élution, le diamètre médian des cellules diminue. Cependant des incohérences apparaissent pour les fractions F4 et F5. Le diamètre des particules de la cinquième fraction est bel et bien inférieur au diamètre des cellules éluées dans la quatrième fraction mais la différence entre ces tailles est très faible. Bien plus faible qu'entre les fractions F1-F2, F2-F3, et F3-F4.

La détermination du temps de rétention de chaque fraction réinjectée et de leur diamètre médian permet de tracer les courbes de sélectivité présentées dans la Figure 34. L'interprétation de ces courbes donne les valeurs de sélectivité d'élution de chacune des trois expériences présentées. Cette grandeur fondamentale résulte de la pente de la régression linéaire tracée grâce aux points obtenus lors des réinjections. Cette méthode de calcul est détaillée dans la partie II.3 : En Fractionnement par Couplage Flux Force. Les valeurs de sélectivité déterminées graphiquement sont analysées en prenant en compte le coefficient de régression linéaire (R^2). Un coefficient de régression linéaire proche de 1 indique que les résultats obtenus démontrent une tendance statistiquement interprétable. L'expérience de 16 juillet 2021 expose la présence d'un point aberrant donnant un R^2 de cette régression très faible. Le tracé de la courbe représentant cette régression linéaire montre que ce point correspond à la cinquième fraction réinjectée. En inhibant ce point incohérent, la courbe de sélectivité obtient un coefficient de régression linéaire correct. Cette nouvelle droite, ainsi que les courbes obtenues dans les deux autres expériences explicitées sont présentées dans la Figure 35.

Pour cette série d'expérimentations, les sélectivités mesurées se situent entre 0,8 et 1,9. Les manipulations du 09 et 16 juillet 2021 donnent une sélectivité de 1,8 et 1,9. Ces valeurs sont correctes et démontrent une séparation assez qualitative. Cependant d'importants bémols doivent pondérer ces analyses. Premièrement les coefficients de régression linéaires associés aux interpolations de ces deux expérimentations restent faibles. Habituellement, une interpolation est considérée correcte si ce R^2 est supérieur ou égal à 0,99. Ce qui est loin d'être le cas ici. Deuxièmement, la dernière expérience, effectuée le 06 août 2021 donne une sélectivité bien plus faible : 0,8. Cette dernière expérience est importante car son interpolation linéaire est très crédible ($R^2 = 0.99$). Elle démontre donc que lorsque l'expérience se déroule correctement, la sélectivité associée à la taille est plus faible. Troisièmement, des anomalies d'élution avaient été observées et décrites, ce qui n'assure pas une séparation qualitative. Enfin, un point aberrant a dû être supprimé de l'analyse car il empêchait toute interpolation et cette simplification ne garantit pas d'erreur d'interprétation.

En résumé, les bonnes valeurs de sélectivité calculées lors de deux premières expériences sont à relativiser. Les interprétations effectuées laissent penser que des erreurs ont sans doute été commises au cours des manipulations. De plus, la sélectivité calculée uniquement en

fonction du diamètre cellulaire ne semble pas être assez précise pour décrire totalement la qualité de la séparation car les valeurs trouvées sont peu spécifiques. D'autres paramètres entrent sans doute en ligne de compte pour une séparation par SdFFF.

III.4.2. Analyse de l'impact de la durée de culture sur la séparation par SdFFF

Afin d'étoffer les expérimentations et de tester divers paramètres, d'autres manipulations sont également effectuées. Entre le 28 et le 30 juillet 2021, une série de trois expériences aux mêmes conditions opératoires est réalisée : les mêmes cellules-mères (cellules issues de la même lignée) sont mises en culture avec des paramètres identiques de SdFFF. Dans l'optique d'être précis et de pousser la démarche scientifique à son paroxysme, les conditions météorologiques sont également contrôlées et sont similaires au cours des trois jours. Seul le temps de culture diffère : le 28 juillet les cellules sont en culture depuis 48h, le 29 juillet les cellules sont en culture depuis 72h et le 30 juillet les cellules sont en culture depuis 96h. Chaque jour, les échantillons exploités sont séparés par SdFFF selon le protocole préalablement détaillé. Ces manipulations permettent l'obtention de la sélectivité d'élution en fonction de la durée de culture.

D'un point de vue quantitatif et après observation au microscope optique, des différences au niveau des cellules sont observables en fonction de leur temps de culture. Les flasques cellulaires repiquées 48h avant la manipulation sont peu denses et les cellules observées sont homogènes. Elles sont petites, régulièrement rondes, et se collent peu. Dans l'expérience durant laquelle les cellules sont repiquées 96h avant utilisation, ces dernières sont bien plus hétérogènes. Elles sont plus nombreuses, avec des formes diverses (plus allongées notamment) et elles se collent dans la flasque. En résumé, la manipulation effectuée après 96h de culture met en jeu une population cellulaire bien plus diverse en termes de taille, de forme et de concentration. De plus, il est possible d'imaginer que d'autres paramètres physico-chimiques varient en fonction du temps de culture entre le dernier repiquage et la séparation.

Les résultats de ces expérimentations sont eux aussi discutables. Pour les 3 manipulations, la sélectivité en fonction de la taille déterminée est très faible et ne correspond pas aux attentes pour un système de SdFFF. Ces résultats sont d'ailleurs peu interprétables car les coefficients de régression linéaires sont faibles ($<0,95$ pour l'ensemble des manipulations et même égal à $0,56$ pour la première expérience). Les interpolations linéaires sont donc peu fiables.

Au vu des résultats et de leur analyse, donner des conclusions définitives sur ces expériences permettant l'analyse de la « Size Selectivity » en fonction du temps de culture, est impossible. Cependant les mêmes remarques au sujet des expérimentations précédentes sont possibles : le protocole ou la réalisation des manipulations est potentiellement en cause, la méthode d'analyse se basant sur une interpolation linéaire et sur la sélectivité en fonction de la taille est discutable et baser les modèles séparatifs de SdFFF sur le diamètre cellulaire seul semble incomplet. Des expérimentations additionnelles apporteraient des réponses et différents axes d'analyses différents pourraient amener des solutions.

III.4.3. Synthèse générale et analyse

Sans apporter de réponse ferme et définitive aux problématiques initiales, les séries d'expériences présentées dans cette thèse communiquent des informations intéressantes sur le Fractionnement par couplage Flux-Force et sur la sélectivité dans ce type de séparation.

Les publications sur le sujet indiquent que la séparation par SdFFF est efficace et sélective, cependant les observations effectuées dans cette thèse ne le démontrent qu'en partie. Si les séparations des échantillons mères se sont bien déroulées, des problèmes apparaissent lors des réinjections. Pour la grande majorité des expériences (la totalité à une ou deux exceptions près), les fractions collectées en dernier lors de la séparation sont éluées à des temps de rétention aberrants lors de la réinjection. De plus, après analyse de la taille des cellules en fonction de leur temps de rétention, la sélectivité calculée demeure très faible. Le problème lié à la valeur de « Size Selectivity » peut s'expliquer par la méthode de calcul de cette grandeur fondamentale qui ne prend en compte que le diamètre des cellules et leur temps de rétention. Cependant on peut noter que les valeurs de sélectivité déterminées demeurent dans les spécifications théoriques avancées par Martin des années auparavant. Si les manipulations effectuées ne montrent pas avec certitude l'implication d'autres paramètres lors du Fractionnement par couplage flux force à l'aide d'un champ multi gravitationnel, elles démontrent néanmoins que le diamètre des particules seul ne peut permettre de déterminer avec précision la sélectivité de la méthode. Le bilan sur la sélectivité est donc contrasté.

Outre l'analyse des valeurs de sélectivité, les résultats des manipulations et leur analyse associée sont crédibles mais demeurent loin de nos hypothèses. Au cours de l'interprétation des résultats de nombreux coefficients de régression linéaires sont apparus faibles (voire très faibles). Ces valeurs calculées afin d'obtenir la sélectivité de la séparation sont aussi révélatrices de la pertinence du protocole expérimental et de la qualité des manipulations. Toutefois, aucune information ne permet de déterminer quels sont les aspects expérimentaux qui ont péché dans la réalisation de ces expériences. Des idées de d'investigations et des axes d'améliorations pourraient être proposées pour comprendre quels sont les erreurs observables ici. Le protocole expérimental et les manipulations pourraient être testés en utilisant des billes en latex calibrées à la place des cellules. Le comportement et les paramètres de ces billes sont parfaitement connus et analyser leur séparation montrerait si le système de séparation et l'expérimentation sont robustes. Cela permettrait de calibrer le système avant le passage des cellules et de s'assurer que les gestes du manipulateur (moi) sont les bons. En plus de cette calibration, le protocole pourrait être modifié afin de se rapprocher de la réalité théorique étudiée plus tôt.

Une analyse différente des résultats obtenus expérimentalement pourrait également être faite. Comme cela a été évoqué précédemment, une dérive des résultats est particulièrement visible lors des dernières réinjections. Connaissant cela, un protocole manipulateur différent et une analyse séparée des réinjections F1 à F3 et F3 à F5 serait intéressants. En effet entre la première et la dernière fraction collectée, il n'est pas incongru de penser que de nombreux paramètres biophysiques des cellules changent. Les populations cellulaires collectées (et donc réinjectées) en premier ont certes des tailles largement supérieures mais avec cette différence de taille d'autres paramètres peuvent (et doivent) également varier. Au vu des travaux évoqués dans la partie bibliographique et de l'expérience des enseignants chercheurs du laboratoire, une exploration d'un autre paramètre biophysique serait intéressante : la densité cellulaire. Cette donnée déjà utilisée dans d'autres méthodes séparatives n'est pas

pris en compte ici alors qu'elle pourrait expliquer de nombreuses observations expérimentales...

Une question se pose alors : doit-on acter la réalité théorique comme vérité, ou est-ce la réalité expérimentale qui doit faire foi ? La bonne réponse se situe sans doute - comme souvent - dans le compromis. L'analyse des résultats pourrait aussi être changée : les temps de collecte pourraient être utilisés pour calculer la sélectivité à la place des temps d'élution déterminés grâce aux réinjections. Notamment si les temps des réinjections sont aberrants. De nombreuses améliorations sont donc envisageables.

Pour résumer et terminer cette discussion, dans le monde de la SdFFF, la sélectivité est seulement calculée grâce à la taille des particules et ne semble pas expliquer à elle seule les mécanismes de séparation. Cependant, les résultats expérimentaux présentés sont peu nombreux et difficilement analysables. Ils ne permettent pas de conclure avec certitude sur l'intérêt de la « size Selectivity ». Enfin, d'autres paramètres physicochimiques des cellules analysées pourraient être étudiés et des modèles montrant la sélectivité de séparation des cellules par rapport à ces paramètres pourraient être testés : densité, forme, etc.

Beaucoup de travail reste donc à accomplir ...

Conclusion

La SdFFF utilisée au sein du Laboratoire de Chimie Analytique de Limoges est une méthode innovante et peu exploitée dans les sciences séparatives. Cette technique utilisant une combinaison de mécanique des fluides et d'application de champ de force dispose d'importantes perspectives d'avenir. D'un point de vue personnel, mettre un pied dans ce domaine m'aura permis l'exploration de compétences peu développées au cours des études de Pharmacie. Le stage d'application aboutissant à cette thèse aura eu pour but d'étudier un domaine regroupant de nombreuses connaissances scientifiques qui restent encore à approfondir.

Le principal dessein de cette thèse est l'analyse de la sélectivité et des grandeurs fondamentales impliquées dans les méthodes séparatives. Dans cette étude, l'accent est donné aux méthodes chromatographiques mais aussi, et surtout, au cas particulier du Fractionnement par couplage Flux Force. Ainsi, plusieurs parties sont nécessaires à la compréhension et l'exposition du sujet. Dans un premier temps, les principes associés aux méthodes de SdFFF sont étudiés. Ces recherches permettent la compréhension du système utilisé et des mécanismes mis en jeu. Dans un second temps, des recherches bibliographiques sur les mécanismes de séparation sont importantes. Au centre de ces recherches se situe une grandeur fondamentale impliquée dans toutes les séparations analytiques : la sélectivité. Ce terme souvent utilisé en sciences devant être précisé et spécifié pour chaque type d'analyse. L'étude bibliographique menée permet d'observer la multitude d'informations disponibles sur la chromatographie (et notamment l'HPLC) mais aussi le manque d'information concernant le Fractionnement par couplage Flux Force. Une fois ce constat réalisé, la suite logique correspond à la mise en place d'un protocole expérimental ayant pour but d'analyser la sélectivité en SdFFF et de décrire les paramètres influençant cette grandeur fondamentale.

Les expériences réalisées et présentées dans cette thèse reprennent ainsi toutes les étapes nécessaires à l'obtention de résultats exploitables. À de multiples reprises, des cellules cancéreuses de lignée WiDr sont séparées dans le système de Fractionnement par couplage Flux Force utilisant des forces multi gravitationnelles. La répétition de ces analyses a pour but de comprendre les critères influençant la séparation. En effet, les recherches bibliographiques précédemment évoquées sur les facteurs influençant la séparation par SdFFF ne décrivent qu'un seul critère discriminant : le diamètre des cellules. L'intérêt majeur des expériences présentées dans cette thèse est donc l'examen de la véracité de cette théorie et la recherche d'autres paramètres pouvant influencer la séparation.

Cependant, malgré un protocole bien construit, des manipulations précautionneuses et des résultats conformément analysés, les conclusions de cette étude ne sont pas évidentes. Les courbes de sélectivité tracées n'ont à aucun moment un coefficient de régression linéaire supérieur aux spécifications de validité. De plus, l'analyse globale des résultats montre des incohérences dans les données récoltées. Malgré ces bémols, une tendance semble se dessiner lors de la discussion des résultats. Lorsque les manipulations se déroulent sans perturbation, la sélectivité d'éluion est assez faible (très souvent inférieure à 1) et ne peut pas totalement s'expliquer par le diamètre des cellules. Ce paramètre étudié indépendamment (grâce à la « size Selectivity ») ne semble pas suffisant afin d'analyser la séparation qui s'opère dans le système.

Certaines publications récentes évoquent la densité, la forme ou la rigidité cellulaire comme des paramètres qui pourraient agir sur la séparation des composés dans un système de SdFFF. À l'avenir, ces paramètres pourraient être intégrés dans les équations régissant le Fractionnement par couplage Flux-Force qui utilise un champ externe multi gravitationnel : permettant ainsi de compléter les modèles déjà existants. Ces hypothèses demandent à être explorées, testées, prouvées et vérifiées mais feront sans doute un sujet intéressant pour de futurs projets ...

Références bibliographiques

1. J. Calvin Giddings papers - Archives West [Internet]. [cité 31 août 2022]. Disponible sur: <https://archiveswest.orbiscascade.org/ark:80444/xv23925>
2. Giddings JC. SHORT BIOGRAPHY OF J. CALVIN GIDDINGS. :28.
3. Présentation Rapide J. Calvin Giddings.
4. Wahlund KG. Flow field-flow fractionation: Critical overview. *Journal of Chromatography A*. avr 2013;1287:97-112.
5. IBRAHIM T. Développement Instrumental et méthodologique des méthodes de fractionnement flux force en fibre creuse; applications aux biotechnologies [Chimie Analytique et Biologie cellulaire]. [Limoges]: Limoges; 2012.
6. Arakawa T, Philo JS, Ejima D, Sato H, Tsumoto K. Aggregation Analysis of Therapeutic Proteins, Part 3: Principles and Optimization of Field-Flow Fractionation (FFF). 2007;
7. Flow Field Flow Fractionation [Internet]. Wyatt Technology. [cité 24 nov 2022]. Disponible sur: <https://www.wyatt.com/library/theory/flow-field-flow-fractionation-theory.html>
8. Sanz R, Puignou L, Galceran M, Reschiglian P, Zattoni A, Melucci D. Coupling gravitational and flow field-flow fractionation, and size-distribution analysis of whole yeast cells. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. août 2004 [cité 28 nov 2022];379(7-8). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-004-2672-4>
9. Postnova_FFFSystems_BS_2016_10.pdf [Internet]. [cité 29 nov 2022]. Disponible sur: https://www.ewcps2017.at/documents/affil/Postnova_FFFSystems_BS_2016_10.pdf
10. Murima D, Pasch H. Characterization of Complex Branched Polymers by Multidetector Thermal Field-Flow Fractionation. *Macromol Rapid Commun*. févr 2020;41(3):1900556.
11. User S. Thermal Field-Flow Fractionation Principle [Internet]. [cité 30 nov 2022]. Disponible sur: <https://www.postnova.com/knowledge/field-flow-fractionation/thermal-fff.html>
12. Tasci TO, Johnson WilliamP, Fernandez DiegoP, Manangon Eliana, Gale BruceK. Circuit modification in electrical field flow fractionation systems generating higher resolution separation of nanoparticles. *Journal of Chromatography A*. oct 2014;1365:164-72.
13. EAF4 Electrical-Asymmetrical Flow FFF for Characterization of sample CHARGE and SIZE - - 2 Dimensional FFF Characterization with Electrical field combined to Flow Field in a single Separation Channel [Internet]. [cité 30 nov 2022]. Disponible sur: <https://www.analytica-world.com/en/products/1128461/eaf4-electrical-asymmetrical-flow-fff-for-characterization-of-sample-charge-and-size.html>
14. Hwang JY, Youn S, Yang IH. Gravitational field flow fractionation: Enhancing the resolution power by using an acoustic force field. *Analytica Chimica Acta*. janv 2019;1047:238-47.
15. Urbina A, Godoy-Silva R, Hoyos M, Camacho M. Acute hydrodynamic damage induced by SPLITT fractionation and centrifugation in red blood cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 mai 2016;1020:53-61.
16. Lenshof A, Laurell T. Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chem Soc Rev*. 2010;39(3):1203.

17. Janca J. Field-Flow Fractionation Analysis of Macromolecules and Particles. Marcel Dekker Inc. New York; 1987. 336 p. (Chromatographic Science Series).
18. Park MR, Kang DY, Chmelik J, Kang N, Kim JS, Lee S. Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A*. oct 2008;1209(1-2):206-11.
19. Begaud G. Fractionnement par couplage Flux Force de Sédimentation : applications au tri cellulaire dans le domaine de l'oncologie. Limoges;
20. Marc M. Le fractionnement par couplage flux-force en flux hydrodynamique : étude de l'application de la technique de fractionnement par couplage flux-force en fibre creuse. 2016.
21. Myers MN, Giddings JCalvin. Properties of the transition from normal to steric field-flow fractionation. *Anal Chem*. 1 nov 1982;54(13):2284-9.
22. Quintans S. Le fractionnement par couplage flux force (FFF) : théorie et expérimentation. [Limoges]: Limoges; 1999.
23. Ratanathanawongs SKim, Giddings JCalvin. Dual-field and flow-programmed lift hyperlayer field-flow fractionation. *Anal Chem*. 1 janv 1992;64(1):6-15.
24. Jensen KD, Williams SKR, Calvin Giddings J. High-speed particle separation and steric inversion in thin flow field-flow fractionation channels. *Journal of Chromatography A*. oct 1996;746(1):137-45.
25. Tadjiki S, Beckett R. Experimental verification of the steric-entropic mode of retention in centrifugal field-flow fractionation using illite clay plates. *Journal of Chromatography A*. févr 2018;1538:60-6.
26. Nahmany M, Melman A. Chemoselectivity in reactions of esterification. *Org Biomol Chem*. 2004;2(11):1563.
27. La sélectivité des circuits électriques : qu'est ce que c'est ? - NEGOWATT [Internet]. [cité 23 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.negowatt.fr/la-selectivite-des-circuits-electriques-quest-ce-que-cest>
28. AquaPortail [Internet]. [cité 23 mai 2023]. Sélectivité : définition et explications. Disponible sur: <https://www.aquaportail.com/definition-4688-selectivite.html>
29. Heuskin S, Marlet C. Validation de méthodes analytiques Quelques définitions.
30. Daniel CH. Quantitative Chemical Analysis. 8ème. 2010.
31. Strain HH, Sherma J. M. Tswett: « Adsorption analysis and chromatographic methods: Application to the chemistry of chlorophylls ». *J Chem Educ*. avr 1967;44(4):238.
32. Latreche L. Development of HPLC/UV and HPLC/MS analytical methods for FR-900098 : a novel antimalarial compound experimental pharmacokinetic studies on rat and micro-pig [Internet] [These de doctorat]. Strasbourg; 2009 [cité 15 oct 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2009STRA6239>
33. Cuq JL. Manuscrit de cours : la chromatographie liquide.

34. Laura CE. Mise en place et validation du dosage du cortisol urinaire, du cortisol salivaire et des androgènes en LC-MS/MS. 2014;
35. Jiwan JLH, Wallemacq P, Hérent MF. HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory? *Clinical Biochemistry*. janv 2011;44(1):136-47.
36. Ilham K. Élément de Chime Instrumentale.
37. Grandeurs de rétention en chromatographie [Internet]. [cité 24 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/grandeurs-retention.php>
38. Chimactiv - Ressources pédagogiques numériques interactives dans l'analyse chimique de milieux complexes [Internet]. [cité 24 mars 2023]. Disponible sur: <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/bases/hplc/savoir-plus/3>
39. Mise au point d'une séparation par HPLC.
40. Agilent Technologies. Chromatographie liquide haute performance Principes de base : Théorie. 2015.
41. Gumustas M, Zalewski P, Ozkan SA, Uslu B. The History of the Core–Shell Particles and Applications in Active Pharmaceutical Ingredients Via Liquid Chromatography. *Chromatographia*. janv 2019;82(1):17-48.
42. CHROMATOGRAPHIE - ASPECTS GENERAUX.
43. Verot M. Chromatographie.
44. COURS DE CHROMATOGRAPHIE (Master de Chimie 1ère année) Faculté des Sciences d'Orsay [Internet]. [cité 22 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.masterchimie1.universite-paris-saclay.fr/Chromatoweb/optimisation.html>
45. Snyder LR, Kirkland JJ. Introduction to modern liquid chromatography. 2d ed. New York: Wiley; 1979. 863 p.
46. Martin M, Beckett R. Size selectivity in field-flow fractionation: Lift mode of retention with near-wall lift force. *Journal of Physical Chemistry A*. 2012;116(25):6540-51.
47. Battu S, Martin M. Présentation Selectivité 18 octobre 2018. 2018. p. 47.
48. Ivaneev AI, Ermolin MS, Fedotov PS, Faucher S, Lespes G. Sedimentation Field-flow Fractionation in Thin Channels and Rotating Coiled Columns: From Analytical to Preparative Scale Separations. *Separation & Purification Reviews*. 2 oct 2021;50(4):363-79.
49. Kirkland JJ, Yau WW, Szoka FC. Sedimentation Field Flow Fractionation of Liposomes. *Science*. 15 janv 1982;215(4530):296-8.
50. Yang FJF, Myers MN, Giddings JCalvin. Programmed sedimentation field-flow fractionation. *Anal Chem*. 1 nov 1974;46(13):1924-30.
51. Schure MR, Caldwell KD, Giddings JCalvin. Theory of sedimentation hyperlayer field-flow fractionation. *Anal Chem*. 1 juin 1986;58(7):1509-16.

52. Giddings JC, Williams PS, Beckett R. Fractionating Power in Programmed Field-Flow Fractionation: Exponential Sedimentation Field Decay. *Analytical Chemistry*. 1987;59(1):28-37.
53. Noguchi P, Wallace R, Johnson J, Earley EM, O'Brien S, Ferrone S, et al. Characterization of WiDr: A human colon carcinoma cell line. *In Vitro*. juin 1979;15(6):401-8.
54. Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol*. 18 juin 2019;7:147.

Annexes

Annexe 1. Feuille d'expérience lors de l'injection	84
Annexe 2. Feuille de résultats du Coulteur Counter	85
Annexe 3. Feuille d'expérience lors de la réinjection.....	86

Annexe 1. Feuille d'expérience lors de l'injection

Fichier n°	Date	Canal	Débit	Moteur	RPM	G	AUFS	Description Echantillon	PT /Inj	F ₁ :	F ₂ :	F ₃ :
W10R-1949xd	16/07	175 µm	0,8	1070	219	8	0-1	Vm: 0,073 à 2,11 min Pic: 7,00-12,30 (0,045 à 9,30)	PT			
-1950xd	/	/	/	/	/	/	/	Vm: 0,074 à 2,11 min Pic: 7,00-12,15 (0,052 à 9,10)	PT			
-1951xd	/	/	/	/	/	/	/	Vm: 0,032 à 2,12 min Pic: 6,30-12,00 (0,055 à 9,00)	PT			
-1952xd	/	/	/	/	/	/	/	F ₁ : 7,25-7,30 / F ₂ : 8,10-8,15 / F ₃ : 8,65-9,00 F ₄ : 10,00-10,05 / F ₅ : 11,05-11,10	①	Vm: 0,101 à 2,11 min		
-1953xd	/	/	/	/	/	/	/		②	Vm: 0,054 à 2,12 min		
-1954xd	/	/	/	/	/	/	/		③	Vm: 0,100 à 2,11 min		
-1955xd	/	/	/	/	/	/	/		④	Vm: 0,115 à 2,11 min		
-1956xd	/	/	/	/	/	/	/		⑤	Vm: 0,111 à 2,10 min		
-1957xd	/	/	/	/	/	/	/	F ₁ : 7,10-7,15 / F ₂ : 7,55-8,00 / F ₃ : 8,40-8,45 F ₄ : 9,45-9,50 / F ₅ : 10,50-10,55	⑥	Vm: 0,130 à 2,15 min		
-1958xd	/	/	/	/	/	/	/		⑦	Vm: 0,120 à 2,16 min		
-1959xd	/	/	/	/	/	/	/		⑧	Vm: 0,133 à 2,14 min		
-1960xd	/	/	/	/	/	/	/		⑨	Vm: 0,132 à 2,14 min		
-1961xd	/	/	/	/	/	/	/		⑩	Vm: 0,142 à 2,15 min		
-1962xd	/	/	/	/	/	/	/		⑪	Vm: 0,153 à 2,14 min		
-1963xd	/	/	/	/	/	/	/	F ₁ : 7,00-7,05 / F ₂ : 7,45-7,50 / F ₃ : 8,30-8,35 F ₄ : 9,35-9,40 / F ₅ : 10,40-10,45	⑫	Vm: 0,147 à 2,15 min		
-1964xd	/	/	/	/	/	/	/		⑬	Vm: 0,158 à 2,16 min		
-1965xd	/	/	/	/	/	/	/		⑭	Vm: 0,163 à 2,14 min		
-1966xd	/	/	/	/	/	/	/		⑮	Vm: 0,177 à 2,16 min		

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.

Sélectivité dans les méthodes de séparation. Cas particulier du Fractionnement par couplage Flux Force : étude bibliographique et mise en place expérimentale par élution de modèles cellulaires.

Le Fractionnement par couplage Flux-Force développé au sein du Laboratoire de Chimie Analytique de Limoges met en lumière un potentiel peu exploité dans les sciences séparatives. Cette technique, combinant mécanique des fluides et champs de force, offre des perspectives d'avenir prometteuses. L'objectif principal de cette thèse était d'analyser ces possibilités et de rappeler les théories autour de la sélectivité et des grandeurs fondamentales dans les méthodes séparatives. Une comparaison a ainsi été effectuée entre les méthodes chromatographiques et le Fractionnement par couplage Flux-Force. Les expériences ont cherché à décrire les paramètres influant sur la sélectivité en SdFFF, en utilisant des cellules cancéreuses de lignée WiDr, révélant des défis dans la compréhension des critères de séparation. L'objectif affiché de ces expérimentations était le questionnement de la sélectivité en SdFFF et l'importance du diamètre des cellules dans la détermination de ce paramètre. Malgré des résultats complexes et parfois incohérents, des hypothèses émergent, notamment sur l'impact de la densité, de la forme et de la rigidité cellulaire sur la séparation, ouvrant la voie à de futurs développements et à l'intégration de ces paramètres dans les modèles existants, afin d'enrichir le domaine de la séparation analytique.

Mots-clés : Fractionnement par couplage Flux-Force, SdFFF, Méthodes séparatives, Grandeurs fondamentales, Sélectivité, Chromatographie, HPLC, Cellules cancéreuses, Champ de force

Selectivity in Separation Methods: The Case of Flow Field-Flow Fractionation - Bibliographic Study and Experimental Implementation through Cellular Model Elution.

Field-flow fractionation developed at the Laboratory of Analytical Chemistry in Limoges highlights a largely unexplored potential in separative sciences. This technique, combining fluid mechanics and field forces, offers promising future prospects. The main objective of this thesis was to analyse these possibilities and revisit the theories surrounding selectivity and fundamental parameters in separative methods. A comparison was made between chromatographic methods and flow-field-flow fractionation. The experiments aimed to describe the parameters influencing selectivity in SdFFF, using WiDr cancer cell lines, revealing challenges in understanding separation criteria. The stated objective of these experiments was to question selectivity in SdFFF and the significance of cell diameter in determining this parameter. Despite complex and sometimes inconsistent results, hypotheses emerge, particularly regarding the impact of density, shape, and cellular rigidity on separation, paving the way for future developments and integration of these parameters into existing models to enhance the field of analytical separation.

Keywords: Field Flow Fractionation, SdFFF, Separation process, Fundamental parameters, Selectivity, Chromatography, HPLC, Cancer cells, Field force

