

**Caractérisation de colloïdes
nanoparticules et macromolécules par**

**Fractionnement Flux-Force (Field
Flow Fractionation ou FFF)**



1. Introduction

Sommaire

- **1.1. Terminologie, objets et milieux d'étude**
- **1.2. Paramètres et propriétés d'intérêt**
- **1.3. Méthodes et stratégies analytiques de caractérisation, approches comparatives**

1. Introduction: objet d'étude

- Objets d'étude: Tout objet compris entre 1 nm et 50 000 nm

Quelque soit son origine :

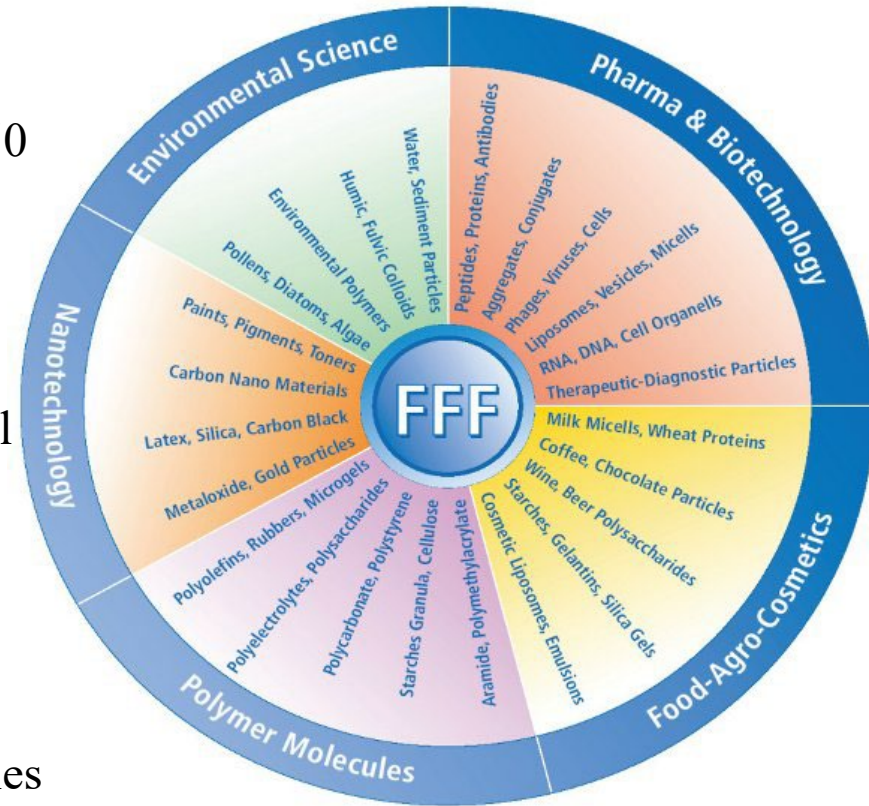
Manufacturé, produit non intentionnellement, naturel

Quelque soit sa nature:

Macromolécules (protéines, polymère...)

Organismes vivant (virus, bactéries, cellules...)

Solides amorphes ou cristallisés (Graphène, particules métalliques...)



1.1 – Terminologie

Objets d'étude =

analytes définis selon leur taille, dans la gamme \approx (1- 50 000) nm

→ de toute origine,
naturelle, manufacturée, produite non intentionnellement

→ de toute nature,
macromolécules (protéines, polymères...),
organismes vivants (virus, bactéries, cellules...),

solides amorphes ou cristallisés (carbone/ graphène,
métaux, oxydes de métaux/métalloïdes,
précipités)

dispersés, assemblés en particules ou agrégés...

*organique,
inorganique ou
mixte*

→ Nanomatériaux⁽¹⁾ =

Nano-objets : ≥ 1 de ses 3 dimensions externes

à l'échelle nano:

Nanofibres, nanotubes... 2D externes

Nanoparticules 3D externes

gamme
≡ (1- 100) nm

Matériaux nano-structurés (structure interne ou surface)

→ **Etat colloïdal**⁽²⁾ = état de subdivision de la matière impliquant des molécules ou des particules polymoléculaires **dispersées** dans un milieu et ayant des dimensions entre environ 1 nm et 1000 nm, ou impliquant un système dans lequel des discontinuités existent à des distances de cet ordre

→ état dispersé → suspension (stable!)

→ **Cette définition implique notamment tout objet en suspension et ayant cette gamme de taille**

(1) ISO/NP TS 800004-2 et 5 ; ISO/TS 27687

(2) 1972, 31, 605, IUPAC Compendium of Chemical terminology, 2nd edition (1997)

→ Tout en suspension et ayant cette gamme de taille

{	existant	dans un milieu liquide	<i>Par ex. fluides biologiques, eaux naturelles, solution aqueuse, ou pas</i>
	synthétisés		

{	préparés	dans un milieu liquide	<i>Par ex. solution aqueuse ou pas (extraction, dissolution...)</i>
	obtenus		

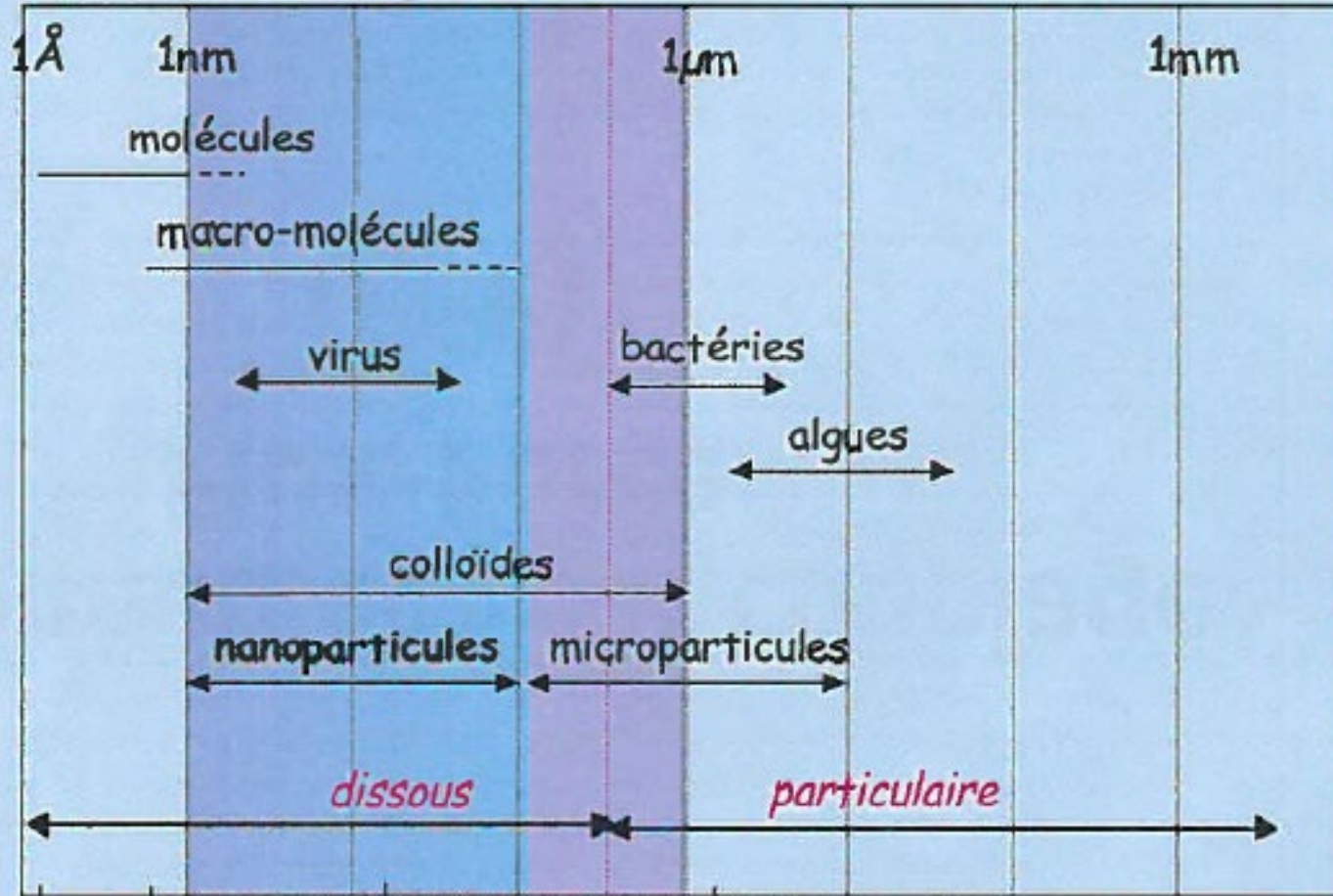
EU Definition Recommendation 2011/696/EU

“a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm-100 nm.

In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety or competitiveness the number size distribution threshold of 50 % may be replaced by a threshold between 1 and 50 %. [...]

Diamètre en m

10^{-10} 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2}



1 Å

1 nm

1 μm

1 mm

molécules

macro-molécules

virus

bactéries

algues

colloïdes

nanoparticules

microparticules

dissous

particulaire

0.1

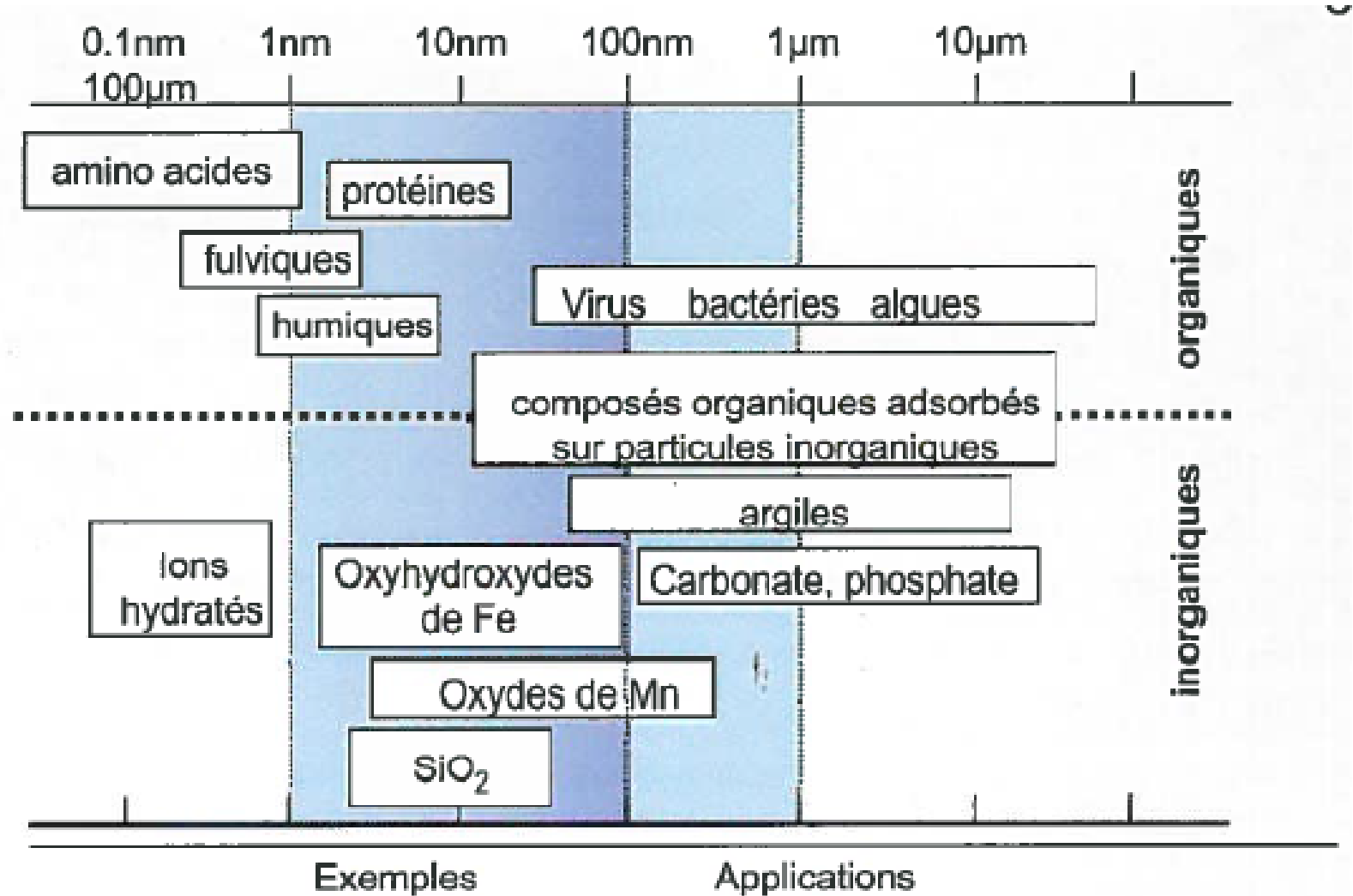
1

1000

1000 000

Masse molaire (kDa)

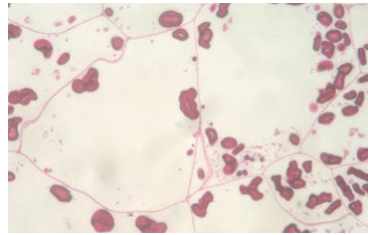
Environnement



Vivant, alimentaire, cosmétique, biopolymères

>100µm

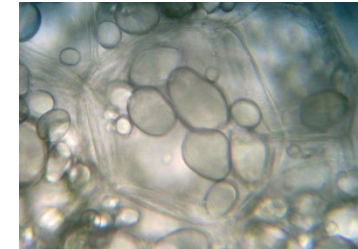
Cellule



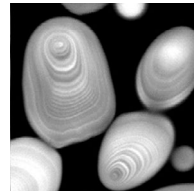
1-100µm

Organite cellulaire

Edifices supramoléculaires

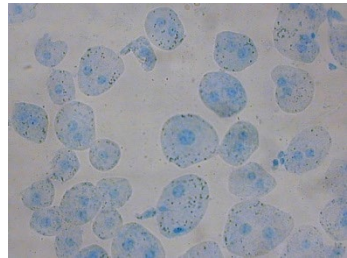


Grains d'amidon



Micelles (ex : lait)

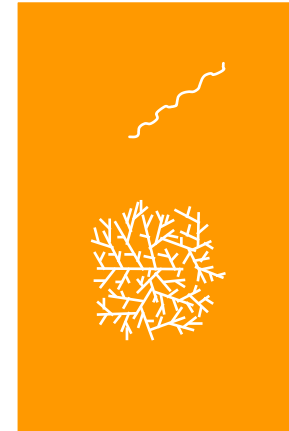
Liposomes



100-500nm

Agrégats protéiques
(ex : blé)

Polysaccharides



2nm

Molécule

Protéines

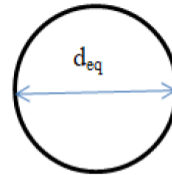


1. Introduction: diamètre équivalent

- La majorité des techniques de caractérisation en taille dans la gamme nano identifient une caractéristique de la nanoparticule à analyser et en déduisent un diamètre dit diamètre équivalent (mesure indirecte).
- Avantage d'une sphère: 1 seule donnée (diamètre ou rayon) suffit à la définir.



Particle with a property p_1



Equivalent sphere with the same property p_1 .

- Diamètre équivalent (d_{eq}) en p_1 : diamètre qu'aurait une sphère ayant la même propriété p_1 que la particule analysée.
- Exemples de d_{eq} : diamètre hydrodynamique (d_h), diamètre équivalent en volume (d_v), etc.,

ISO TC 229: Guidance on physico-chemical characterization for manufactured nano-objects submitted for toxicological testing (2006. Review 2011).

Properties

- ✓ Chemical composition
- ✓ Shape

- ✓ **Size**

- ✓ Crystal structure
- ✓ Specific area

- ✓ **Size distribution**

- ✓ Degree of agglomeration/aggregation
- ✓ Surface area
- ✓ Surface chemistry
- ✓ Solubility/Dispersibility

Methods

ICP
Microscopies: AFM/TEM,SEM

TEM,SEM/ DLS / FFF,...

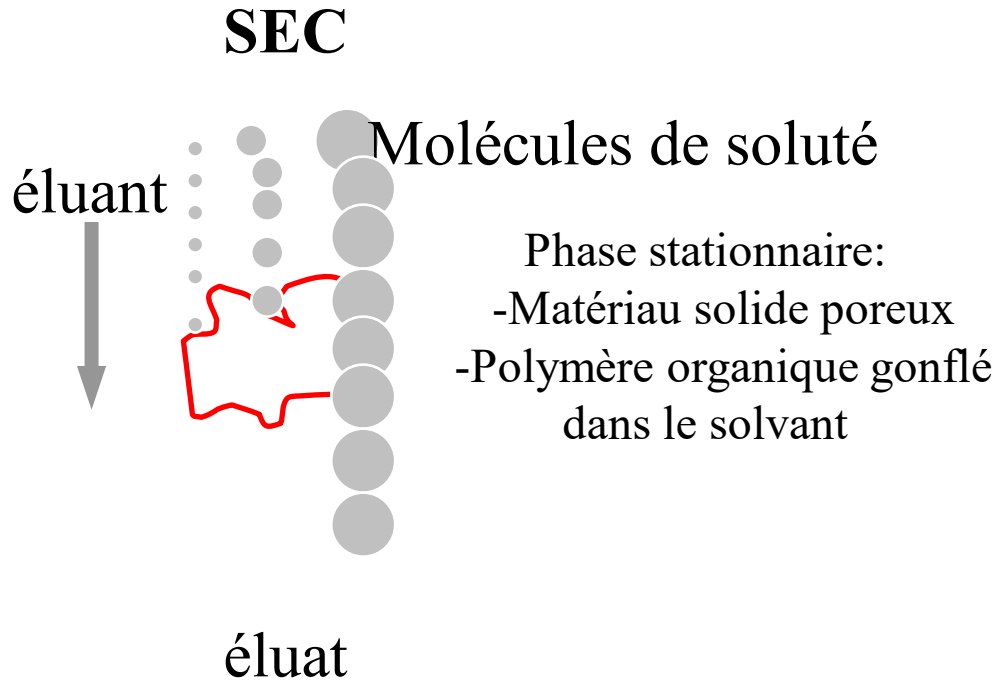
XRD
BET/ AFM,TEM

DLS,SLS/LIBD/AFM,TEM

Zeta potential

1.4- SEPARER

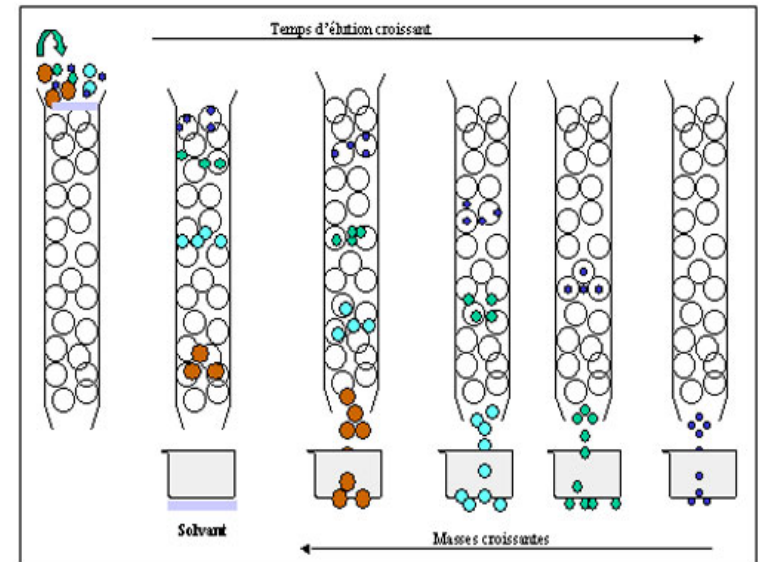
a) Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)



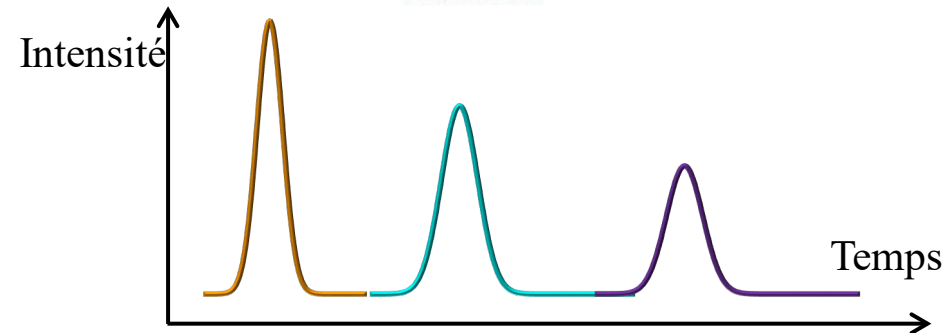
2 phases
mais faible pouvoir de résolution

1) Introduction de l'échantillon

2) Grosses molécules ne pénètrent pas dans tous les pores → séparation par la taille

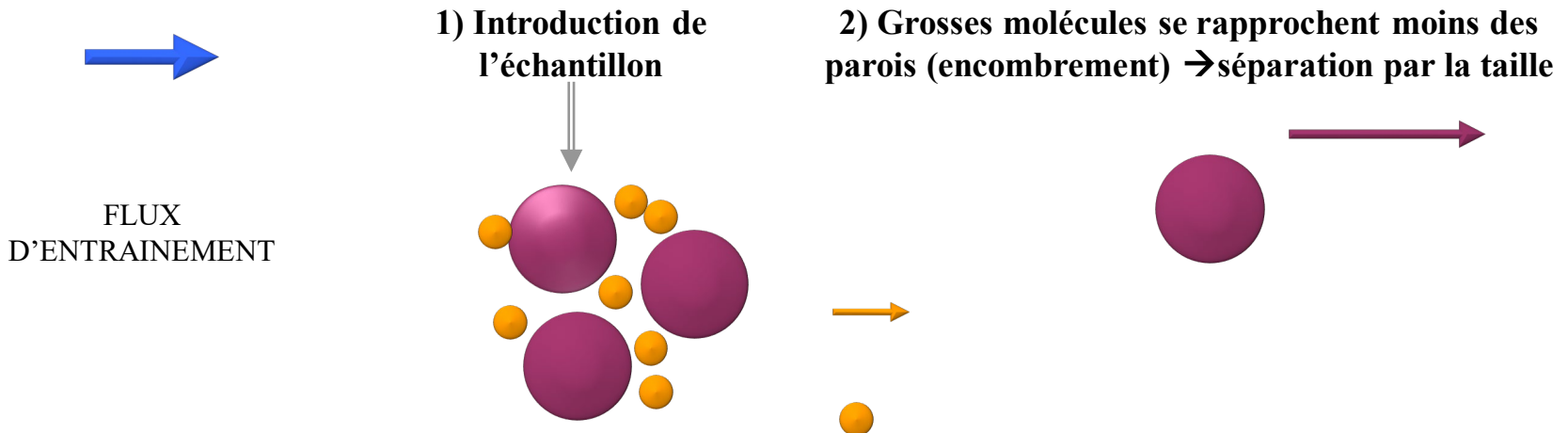


Principe de la SEC



b) Chromatographie hydrodynamique (HDC)

Chromatographie hydrodynamique dans un capillaire

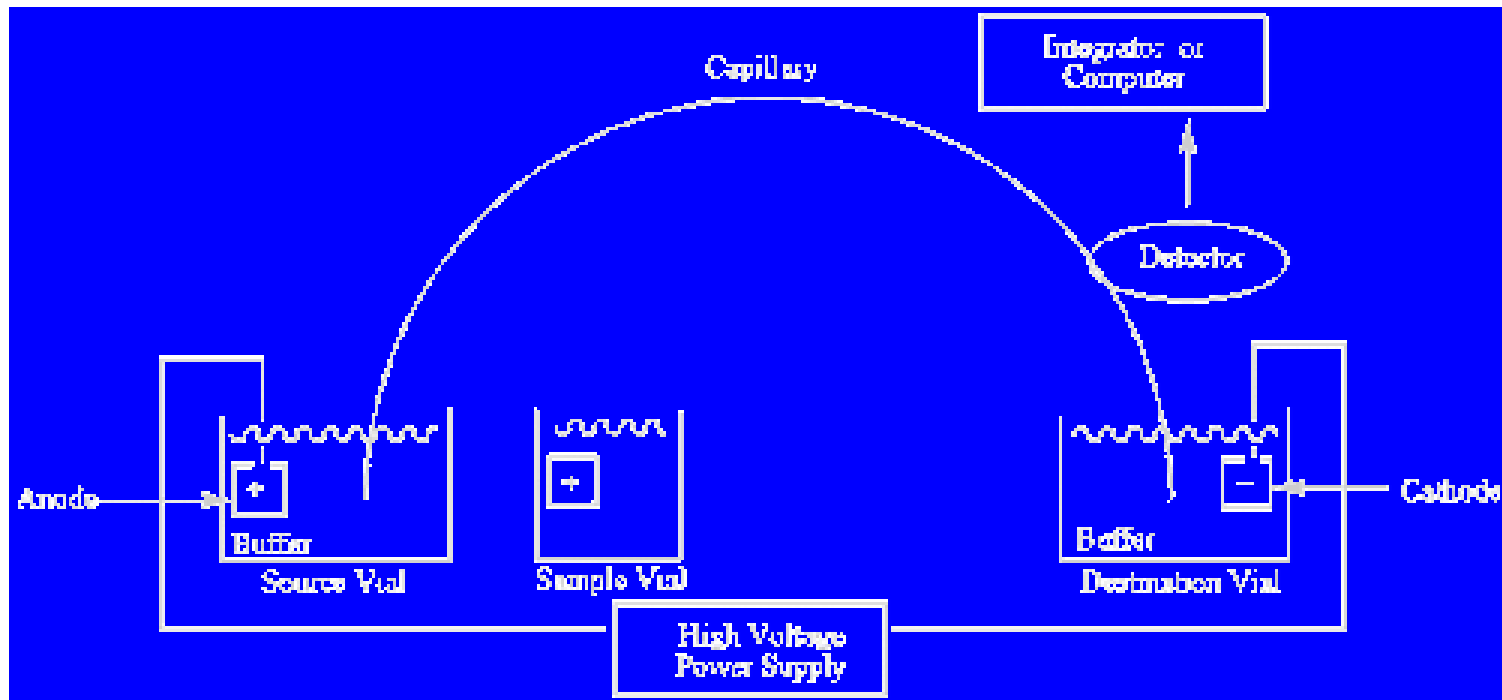


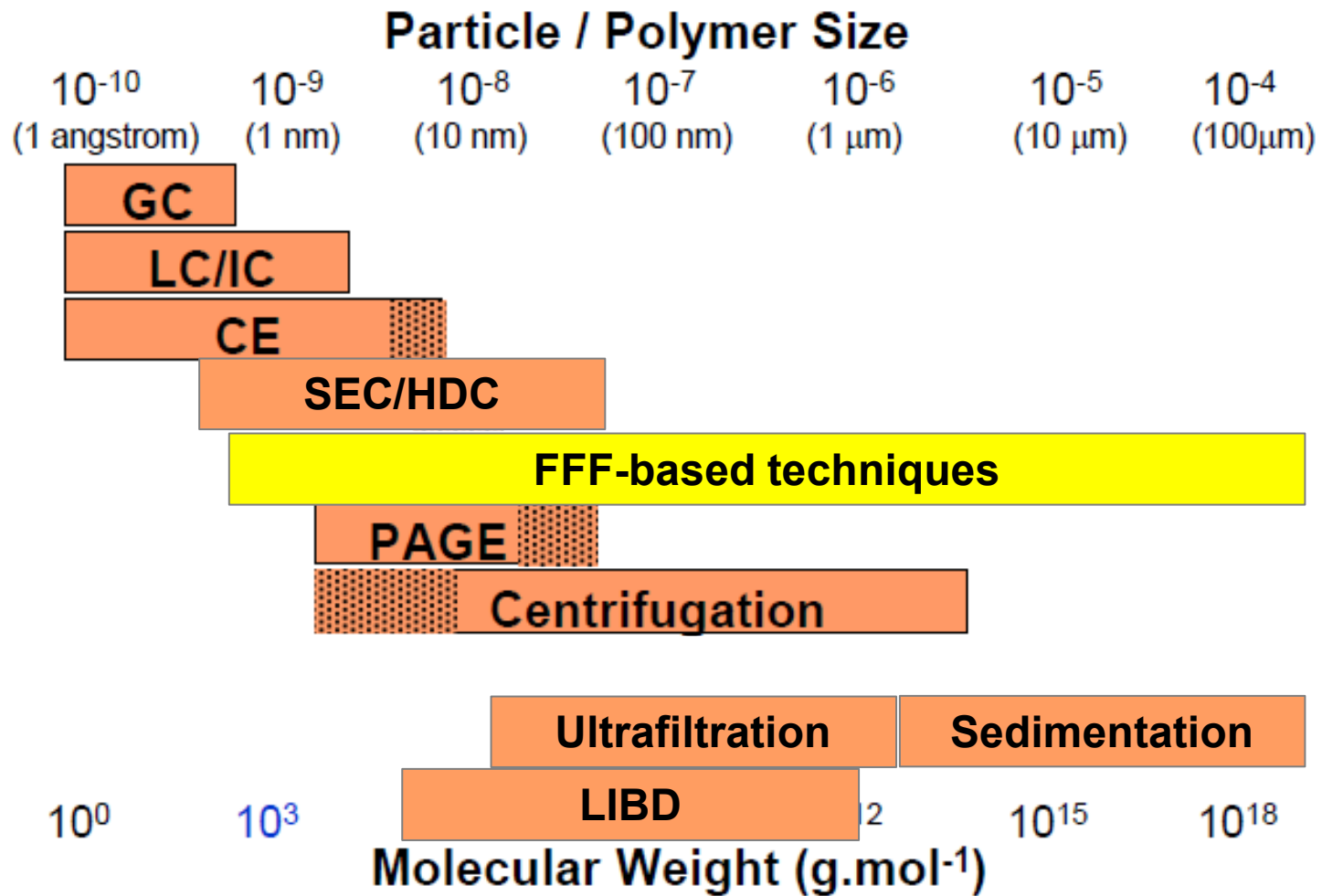
☞ Colonnes remplies de billes pleines : mise en œuvre plus simple

☞ Méthode permettant de travailler avec de très grosses molécules non fractionnables par SEC mais peu résolutive

c) Electrophorèse capillaire (CE)

Méthode d'analyse basée sur la séparation des espèces chargées sous l'effet d'un champ électrique continu dans un tube capillaire de 50 à 100 μm \varnothing rempli d'une solution d'électrolytes.





1.5- DETECTER

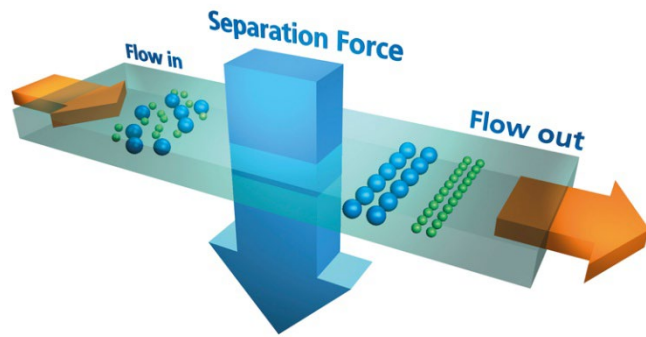
- a) UV/ Fluorescence
- b) Réfractométrie (RI)
- c) Spectrométries atomiques (ICP-MS, ICP-AES, ...)
- d) Microscopies électroniques
- e) Détecteurs de radioactivité
- f) Diffusion de la lumière (MALS, QELS...)



2. Fractionnement Flux Force (FFF)

Sommaire

- **2.1. Principe général**
- **2.2. Les différentes étapes**
- **2.3. Les modes d'éluion**
- **2.4. Formalisation théorique**



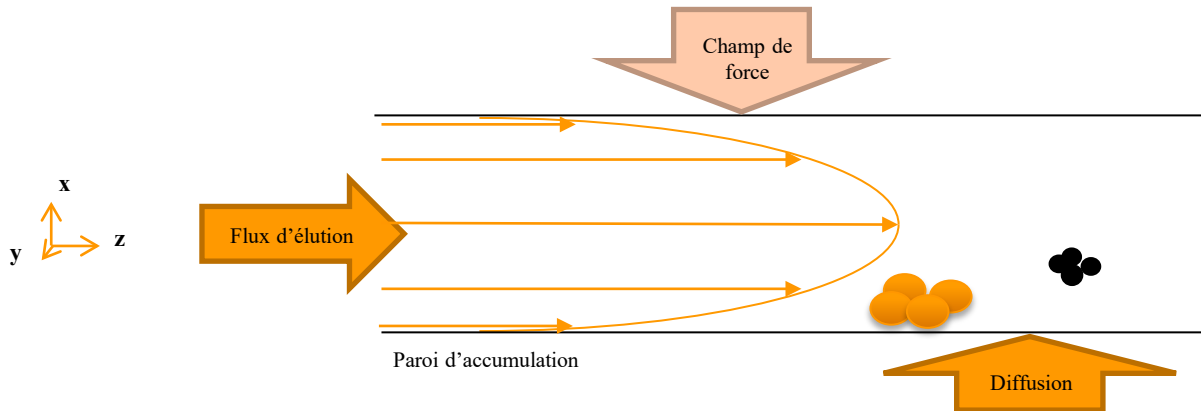
Inventeur :
J.C. Giddings
(1966)



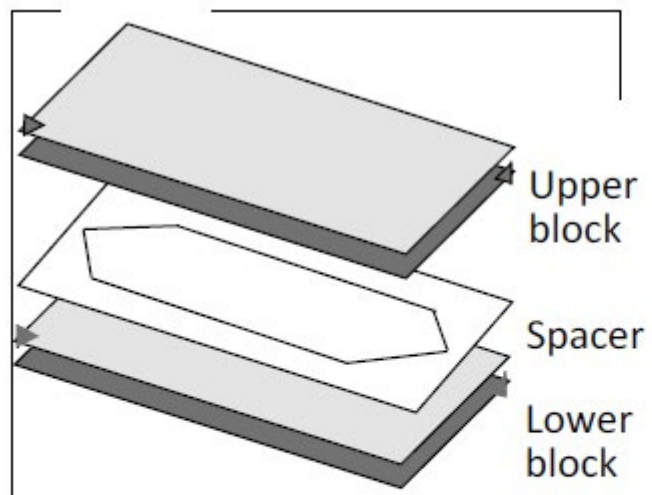
- Le fractionnement par couplage Flux-force (FFF, field flow fractionation) constitue une famille flexible de techniques de chromatographie liquide.
- Le principe de séparation est basé uniquement sur les interactions entre l'échantillon et un flux physique externe sans phase stationnaire, la sélectivité dépendant du **coefficient de diffusion**.
- Ces techniques permettent de réaliser des séparations rapides d'objets
- Le fractionnement par couplage Flux-force est utilisé pour séparer des colloïdes, des polymères mais aussi des liposomes ou même des bactéries.

2.1. Principe général

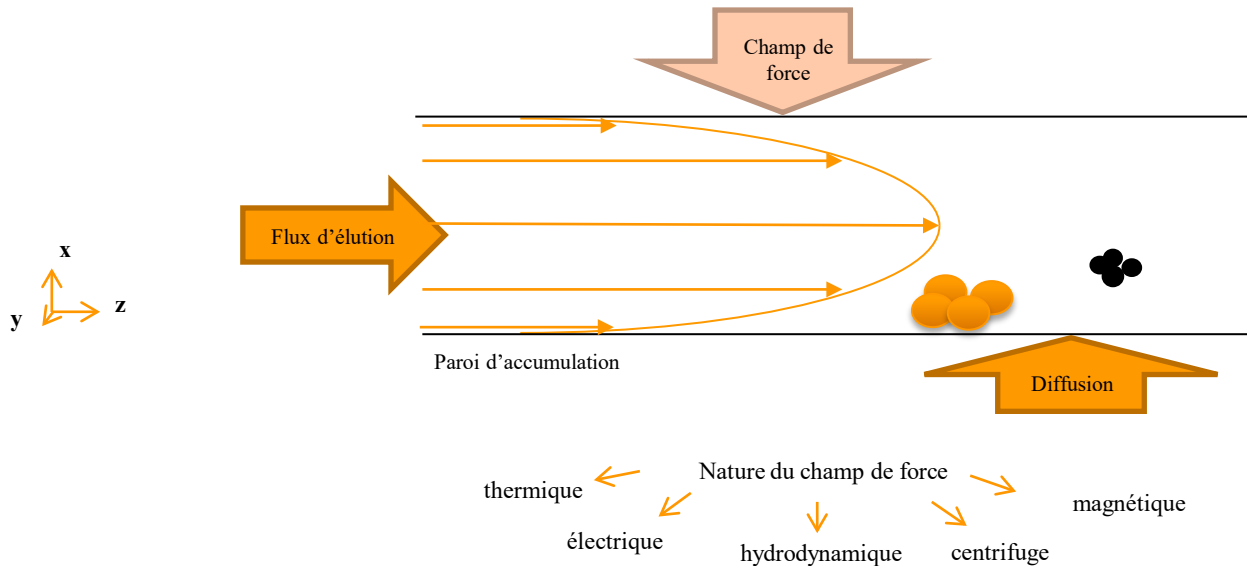
« Le fractionnement par couplage flux-force est basé sur la migration différentielle, sous l'effet d'un champ de force, d'objet de taille nano et/ou micrométrique au sein d'une phase mobile. Cette force s'exerce perpendiculairement (axe x transversal) à la direction de l'écoulement de la phase mobile (axe z longitudinal) dans un système séparatif (le canal). »



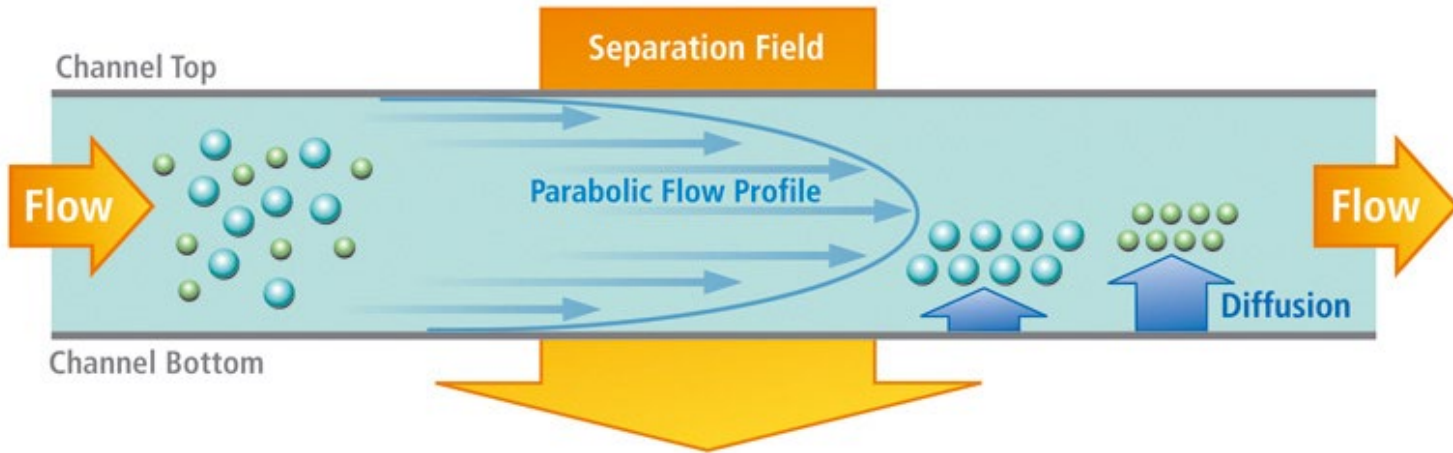
2.1. Principe général



2.1. Principe général



- Le fractionnement se basera sur une caractéristique physico-chimique de l'échantillon dépendant de la nature du champ de force appliqué.



Flow FFF

Asymmetrical Flow FFF

Sedimentation FFF

Thermal FFF

Centrifugal FFF

Split Flow Thin Cell Fractionation (SPLITT)

Electrical

Acoustique

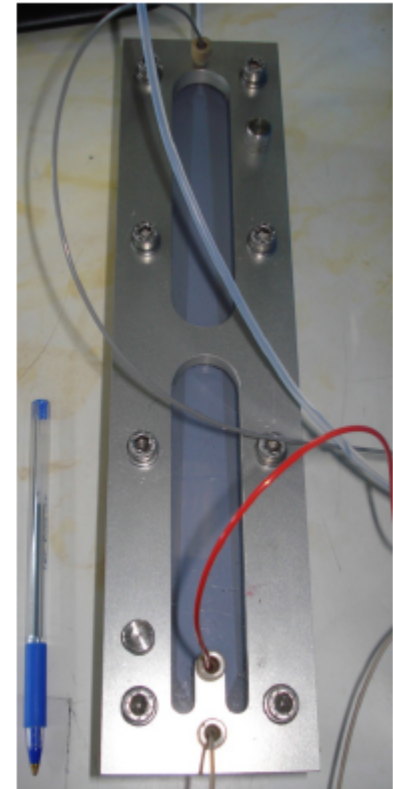
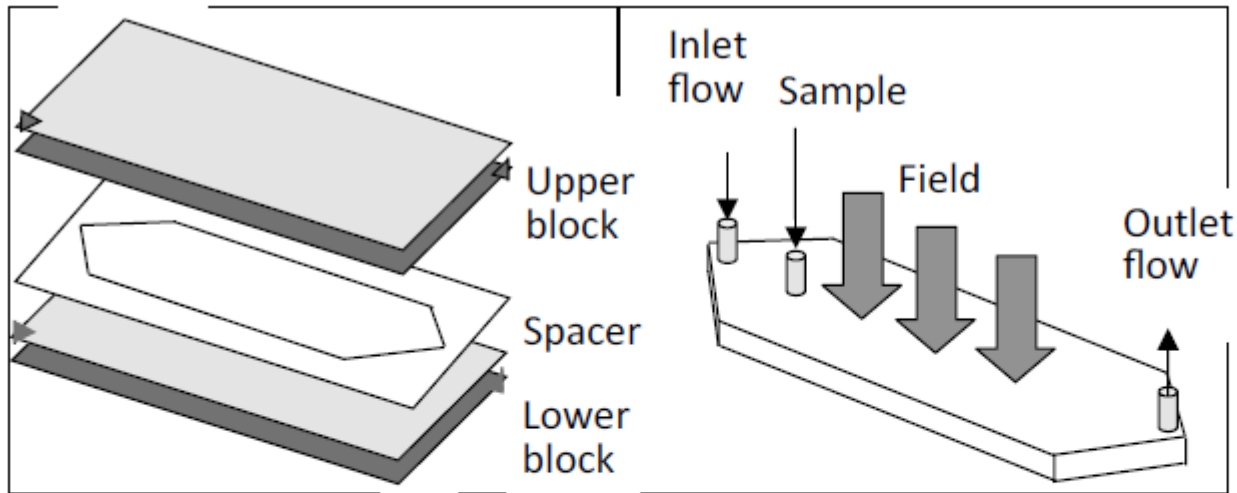
2.1. Principe général

L'échantillon est introduit à l'extrémité du canal par un flux qui est ensuite arrêté.

Un champ est alors appliqué perpendiculairement au flux d'éluion de l'échantillon.

Champ = : -T
-flux
-gravitation
-électrique

conduit les molécules à travers l'épaisseur du canal vers la paroi d'accumulation.

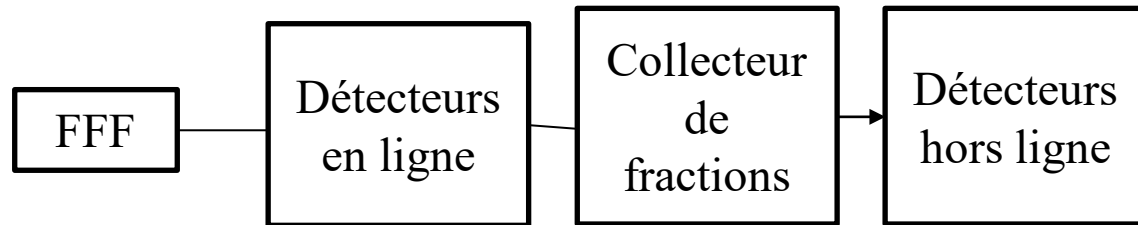




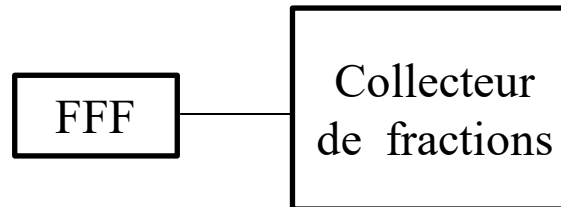
2.1. Principe général

Qu'est ce qu'on peut faire avec la FFF ?

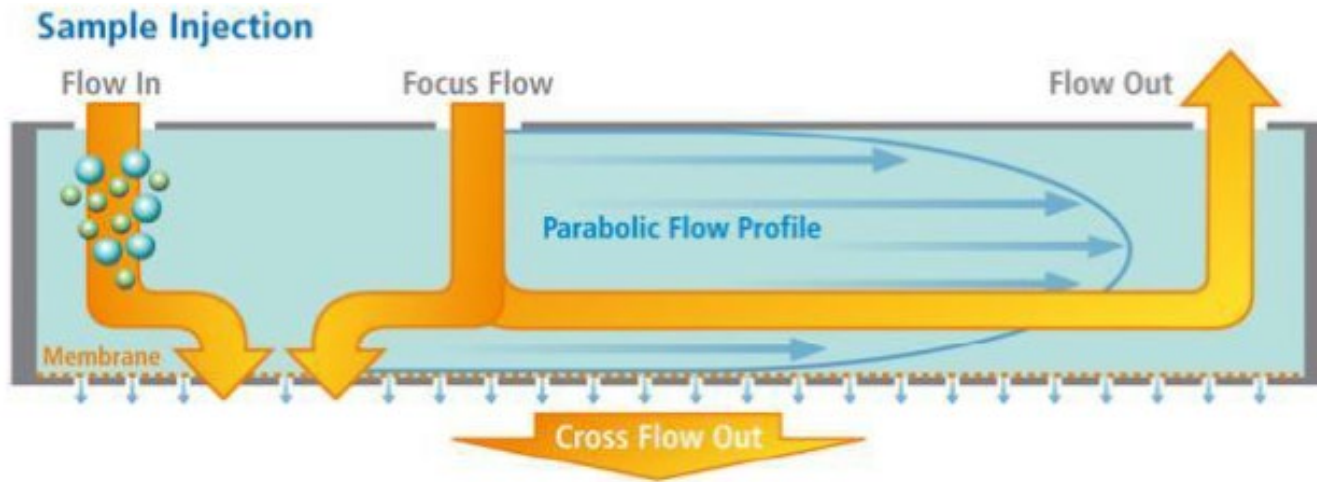
En tant que technique d'analyse



En tant que méthode semi-préparative pour purifier et/ou préconcentrer votre analyte d'intérêt



2.2. Les différentes étapes d'une analyse FFF



Une analyse par FFF se décompose en 3 étapes:

- 1) l'injection de l'échantillon
- 2) la relaxation de l'échantillon
- 3) l'élution

Stabilisation/équilibre du système

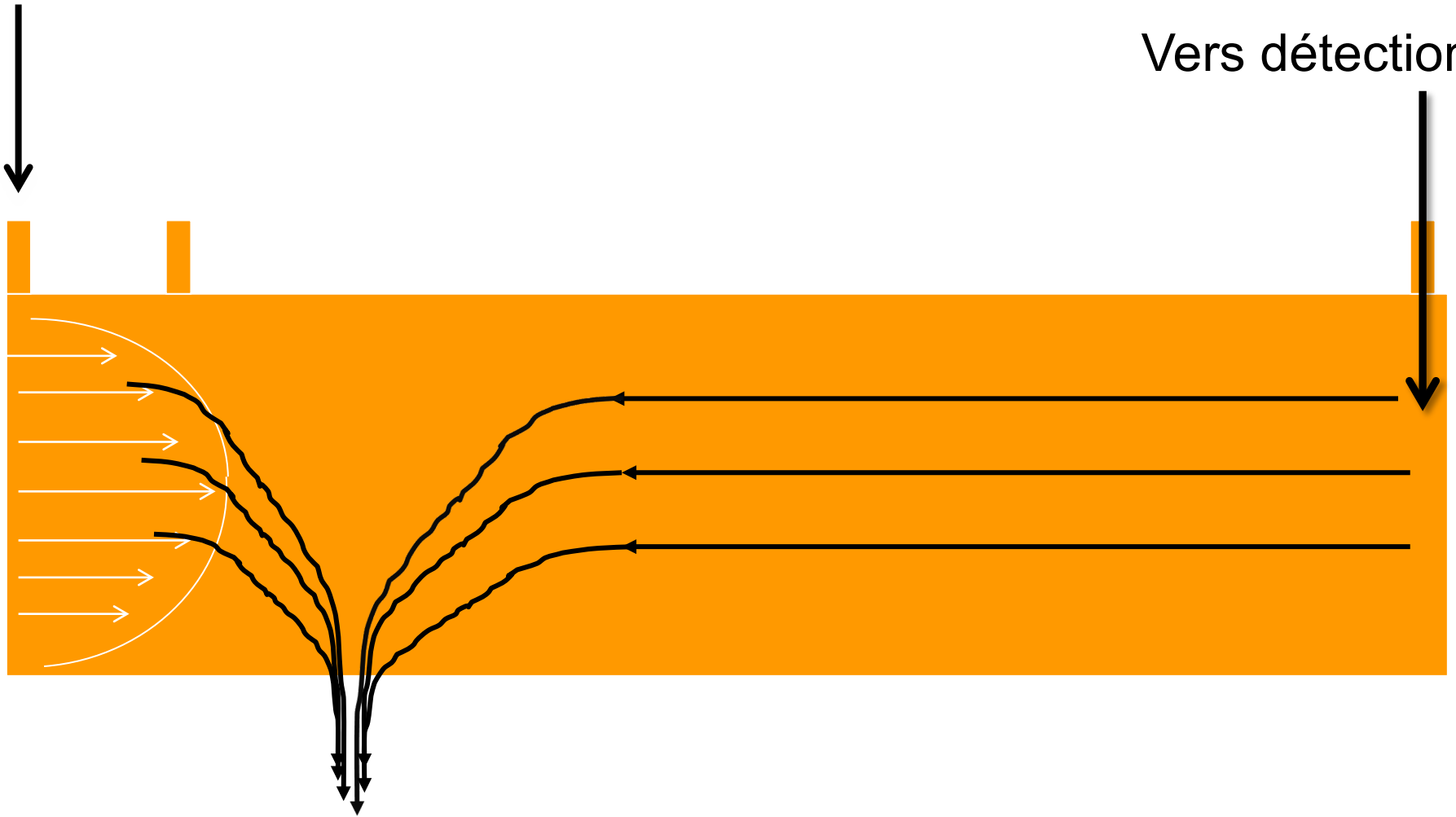
éluant



Inversion des flux

éluant

Vers détection

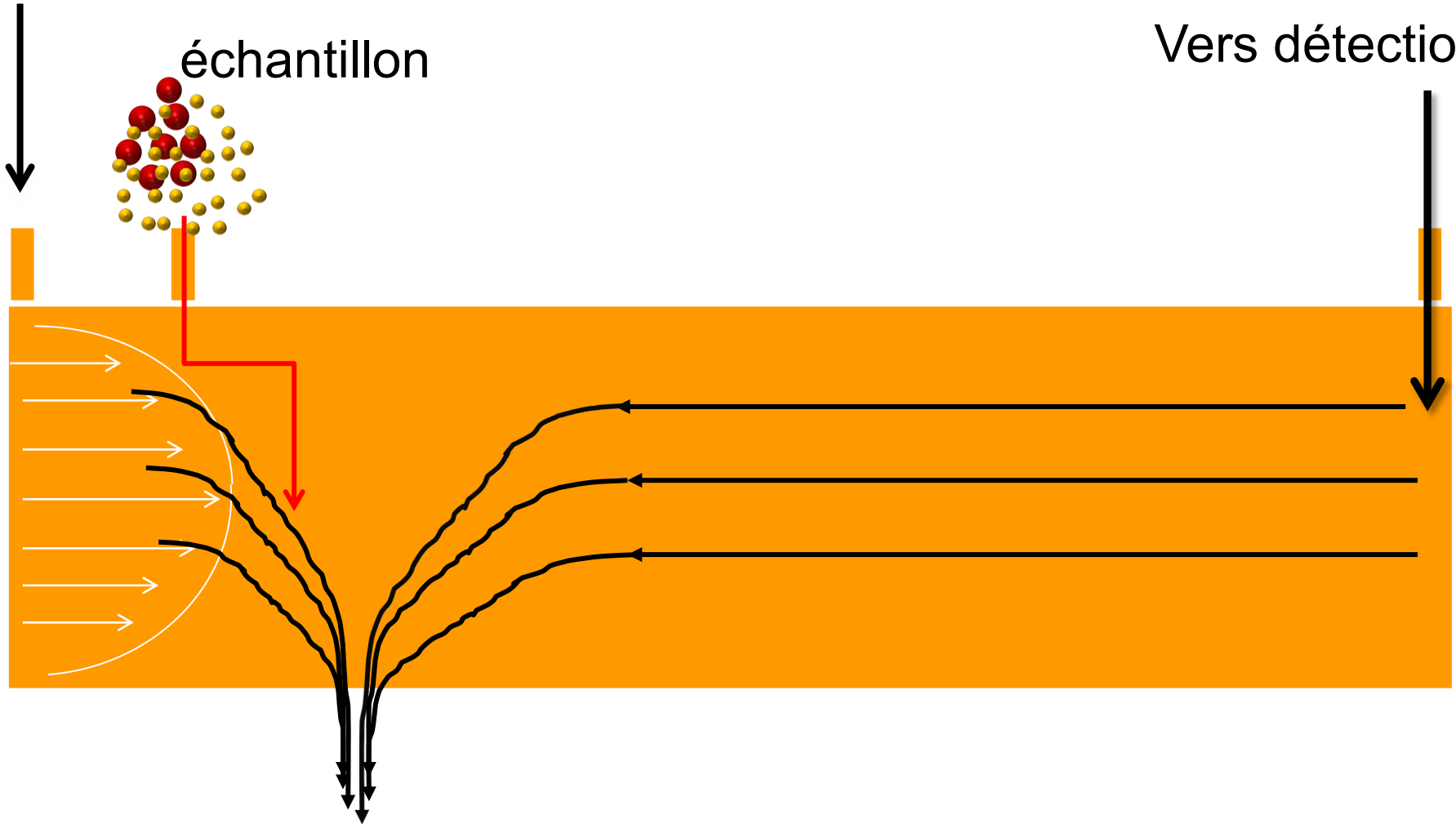


Etape 1 : Injection de l'échantillon

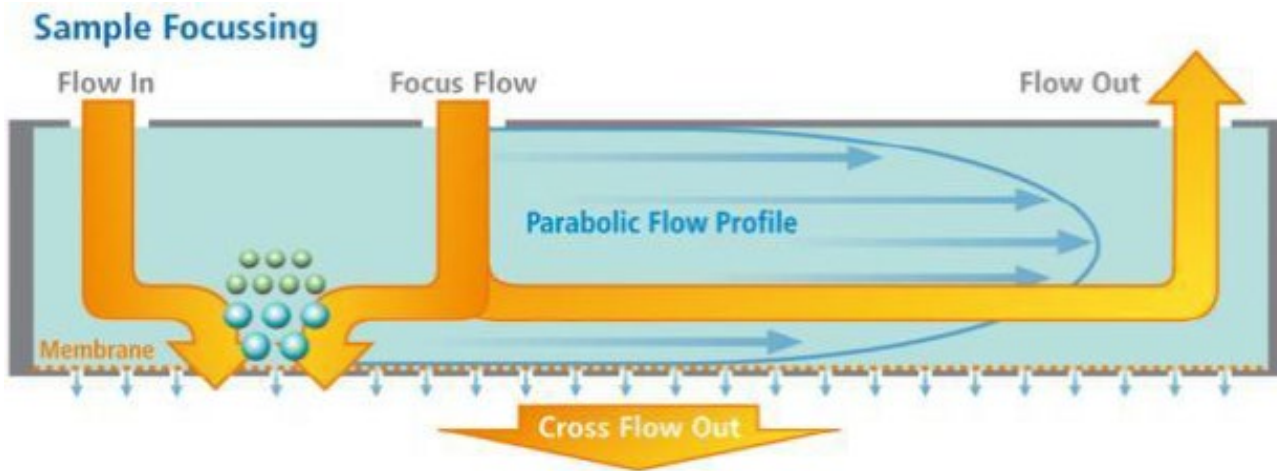
éluant

échantillon

Vers détection



2.2. Les différentes étapes d'une analyse FFF



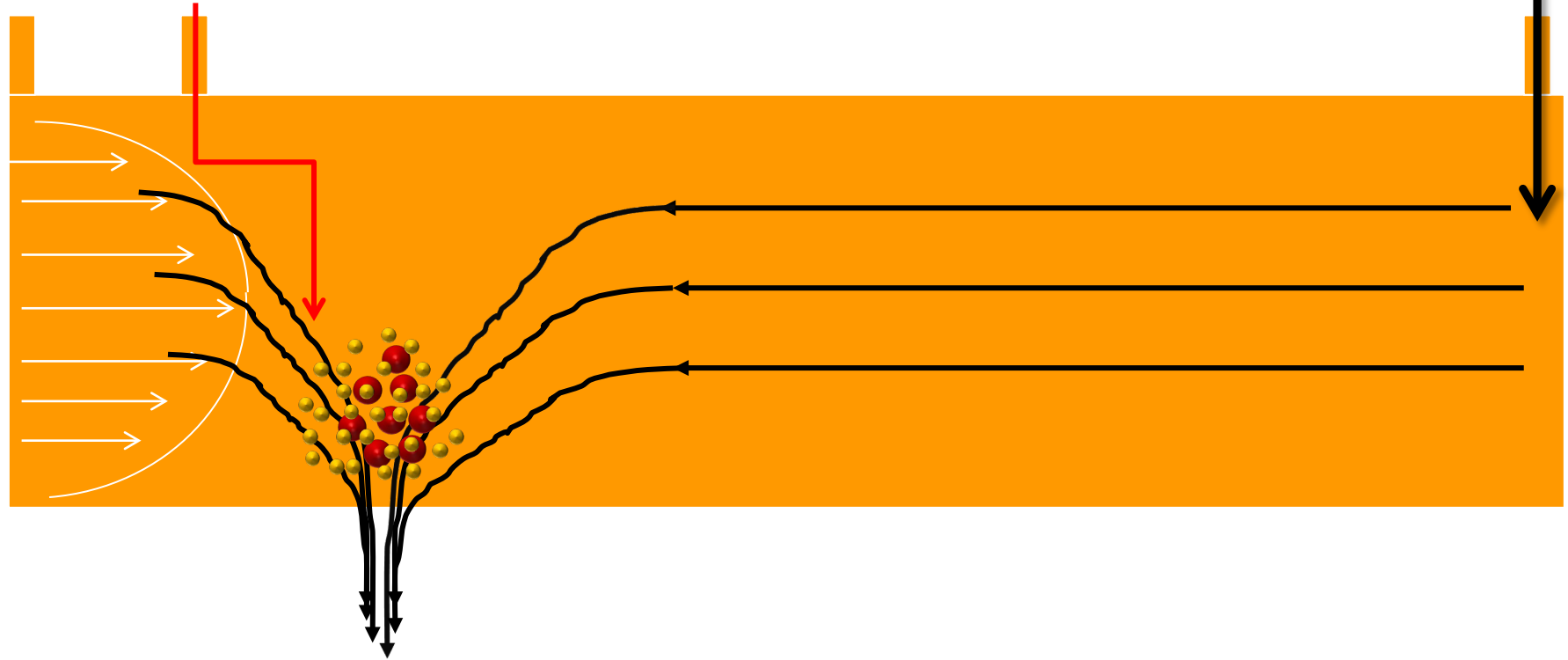
Pendant la relaxation les composés de l'échantillon prennent leur position d'équilibre au sein du canal afin de pouvoir être correctement séparés par la suite.

Etape 2 : Focalisation de l'échantillon

éluant

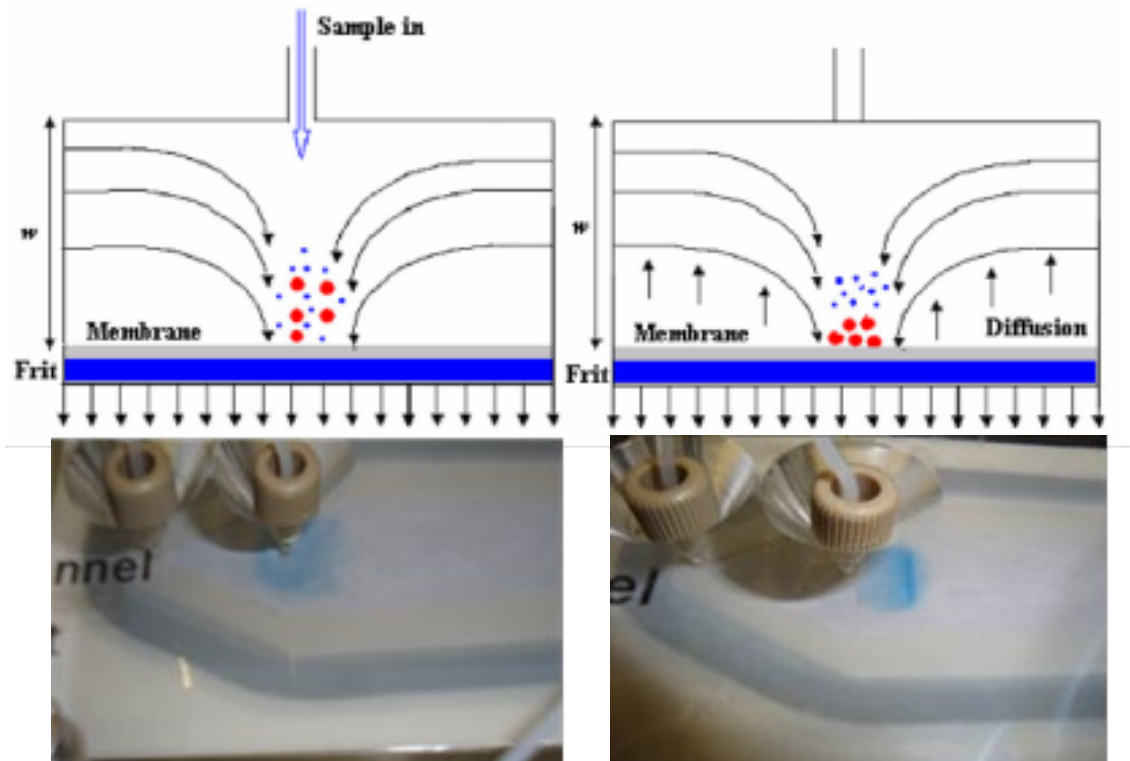
Vers détection

échantillon



Ligne de focalisation

- Correspond à la ligne de dépôt en SEC : doit être la plus fine et la plus homogène possible
- Paramètre important pour la résolution des pics et la diffusion
- Mise en jeu du flux longitudinal et du flux croisé
- Comment la régler ? ⇔ Expériences au dextrane bleu
- Paramètres à régler : régulation des pressions, débit d'injection, temps de focalisation, débits des flux



Etape 3 : Relaxation/diffusion de l'échantillon

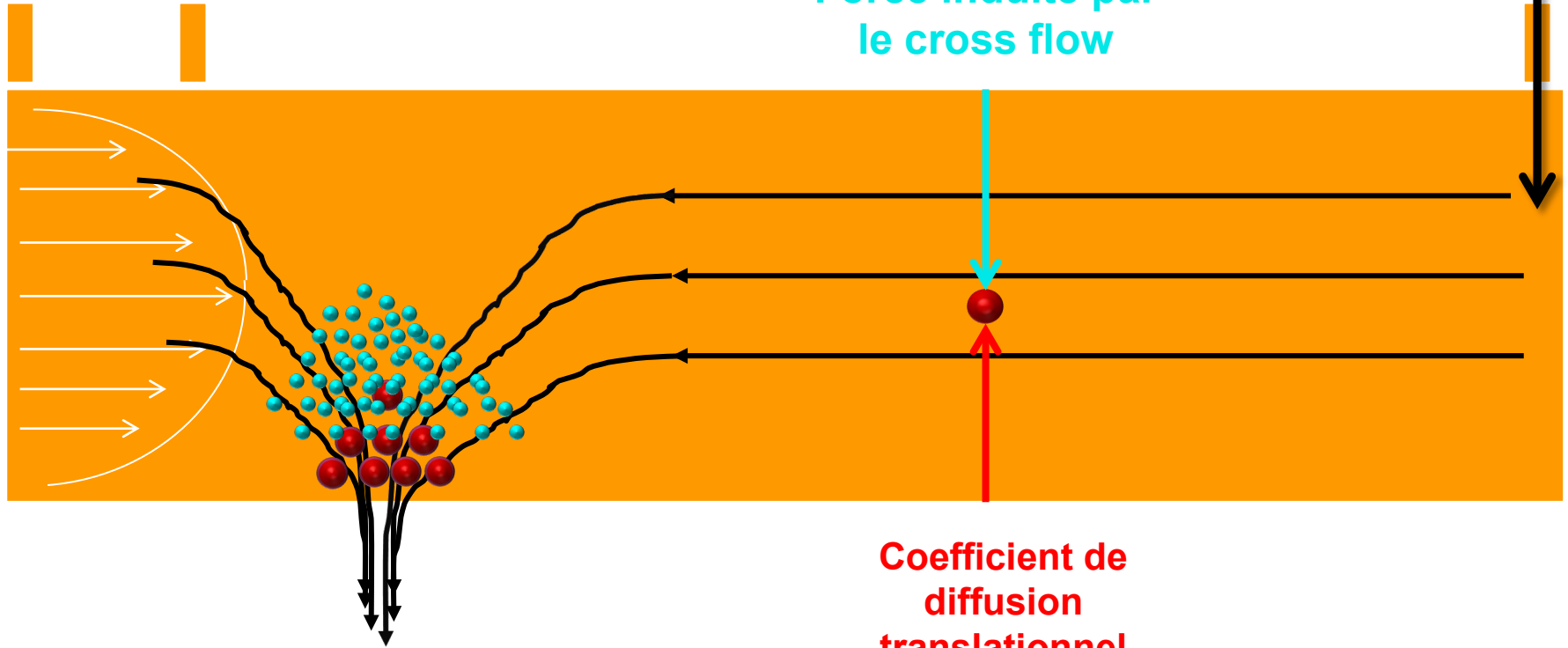
éluant

échantillon

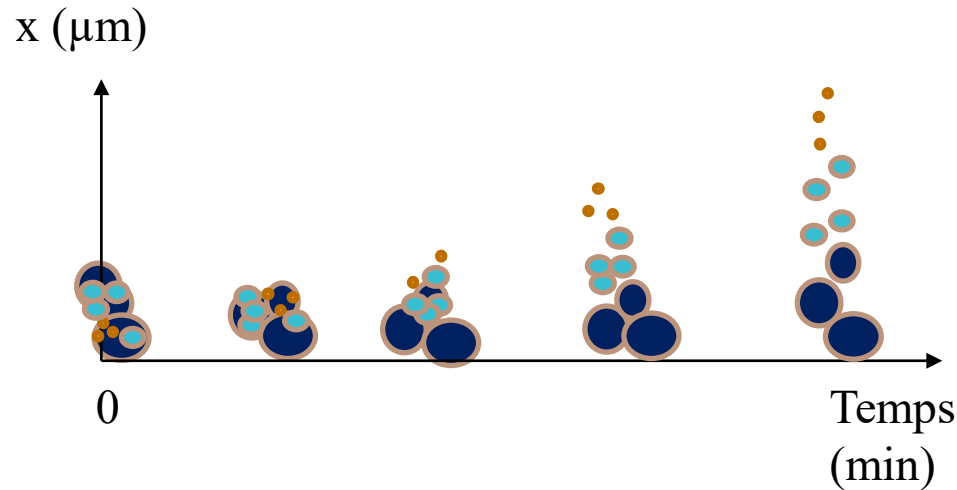
Vers détection

Force induite par
le cross flow

Coefficient de
diffusion
translationnel
(D_t)



2.2.1. Etapes de relaxation



$$\tau = \frac{kT w}{DF} \left(\frac{1}{2} * \frac{kT}{F w} * \frac{1}{e^{\frac{F w}{kT}} - 1} \right)$$

w : épaisseur du canal (m)

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

F : Force ou champ appliqué ($\text{N} \Leftrightarrow \text{kg m s}^{-2}$)

k : constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$)

T : température (K)

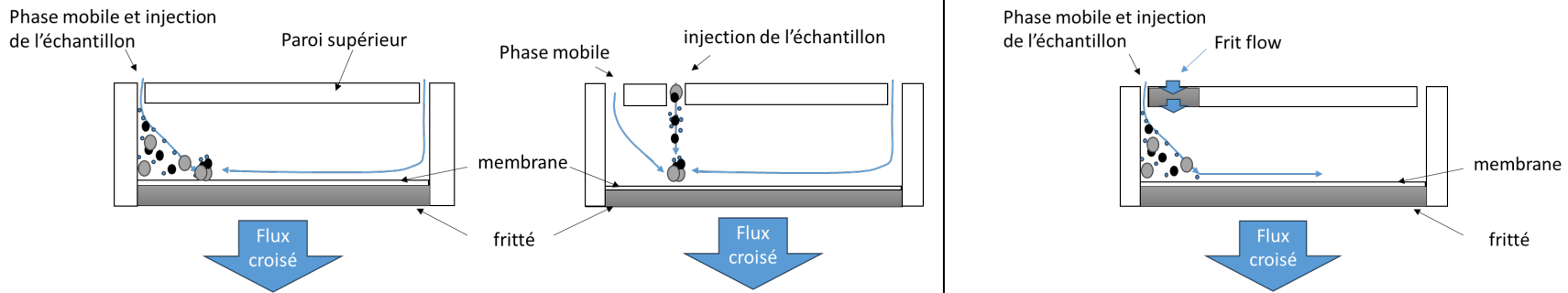
Le temps de relaxation, τ , est le temps requis, après l'injection pour atteindre l'état d'équilibre.

Si l'étape de relaxation n'est pas assez longue, la séparation ne sera pas dans de bonnes conditions et la résolution sera mauvaise.

En pratique: une relaxation de 5 min permet d'atteindre un bon niveau de relaxation

2.2.1. Etapes de de relaxation

Focalisation vs relaxation hydrodynamique



Avantages:

- Les pics d'élution sont moins larges
- Bonne résolution

Désavantages

- Peut entraîner l'agglomération de l'échantillon
- Adsorption de l'échantillon sur la membrane

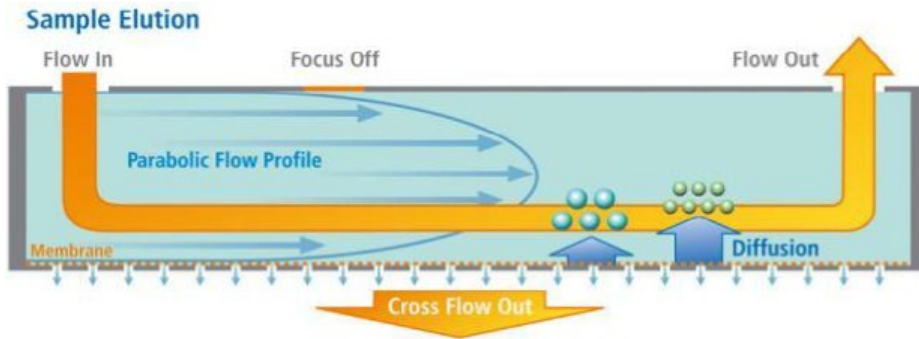
Avantages:

- relaxation plus douce => moins de risque d'adsorption

Désavantages

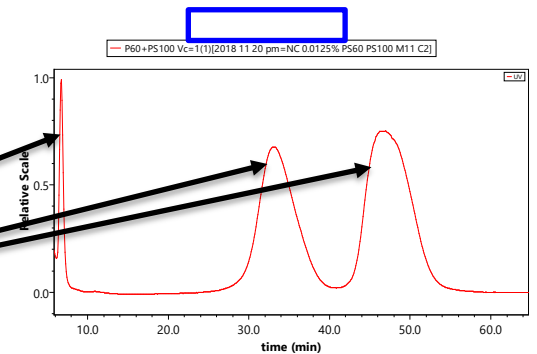
- Augmentation de la largeur des pics
- Moins bonne résolution des pics

2.2. Les différentes étapes d'une analyse FFF



Une fois la phase de relaxation terminée, le flux de focus est arrêté et les différentes populations de l'échantillon sont fractionnées et éluées.

t_0 : temps mort
 t_r : temps de rétention

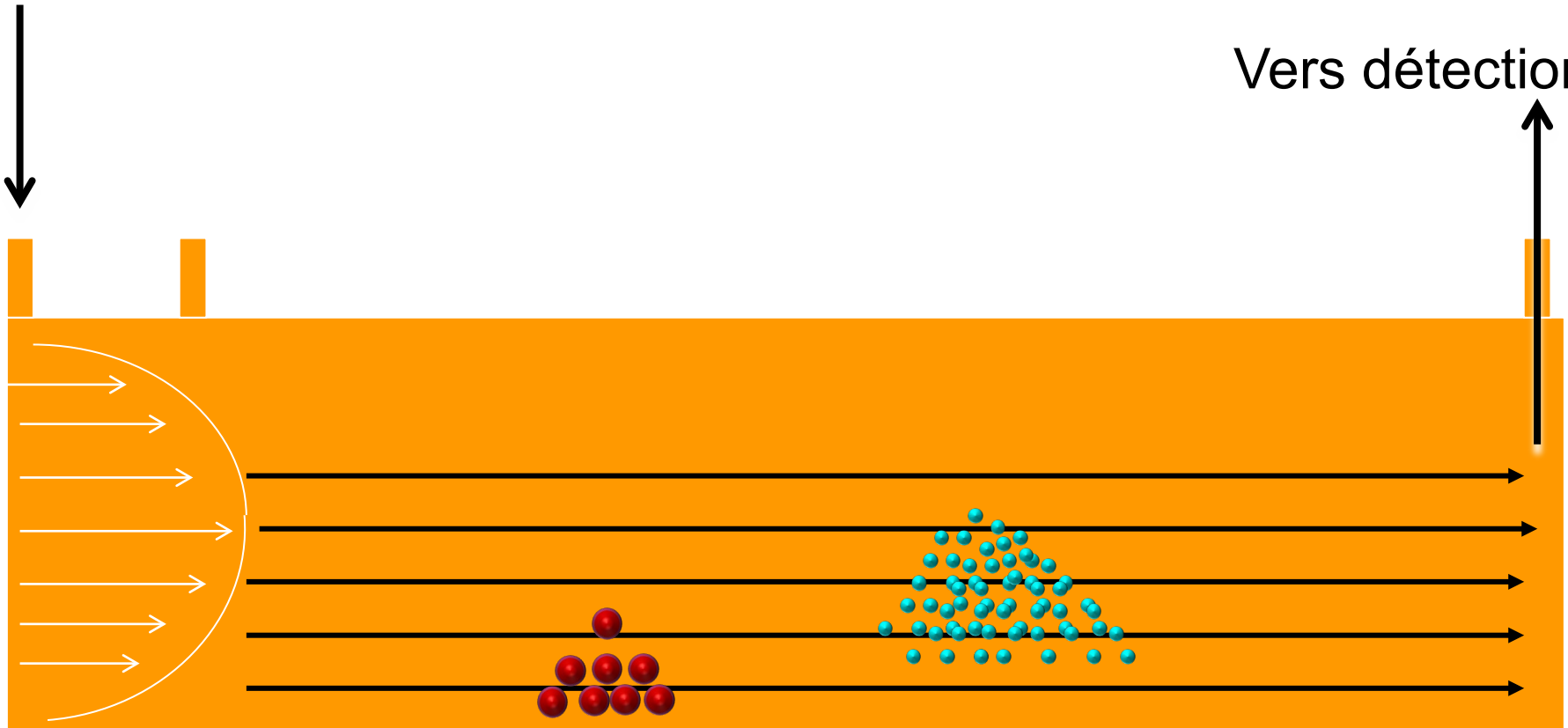


t_0 : temps mort: temps nécessaire pour qu'un composé non retenu traverse le canal.

Etape 4 : Elution / Fractionnement

éluant

Vers détection



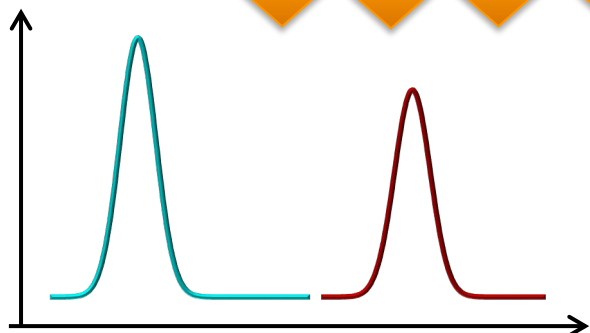
⇒ La séparation s'opère sur 10 μm d'épaisseur dans le canal

Etape 4 : Elution / Fractionnement

éluant

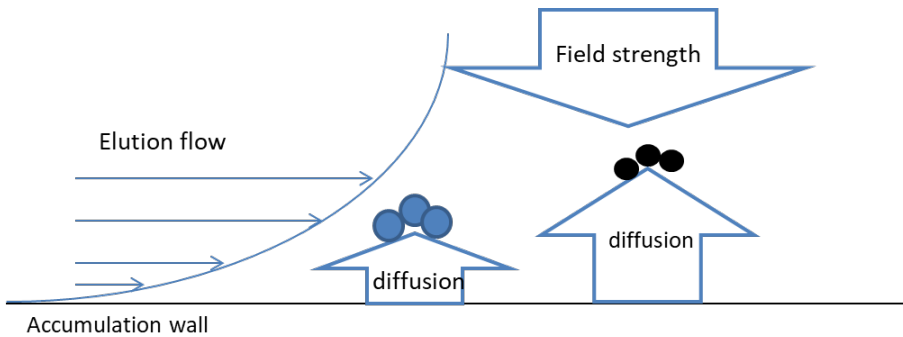


Intensité



⇒ Les grosses molécules/particules sont éluées plus lentement que les petites (fn $D_T \sim R_H$),
en mode normal

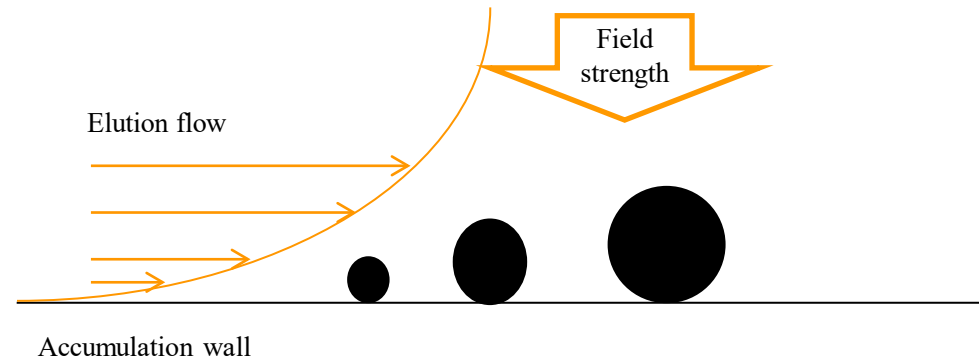
2.3. Modes d'éluions



(1) Mode Brownien (mode normal)

Ce mode gouverne l'éluion des « petites » particules (diamètre < 1µm). La rétention des particules est basée sur le coefficient de diffusion des particules reliable à la taille des particules par la loi de Stokes-Einstein:

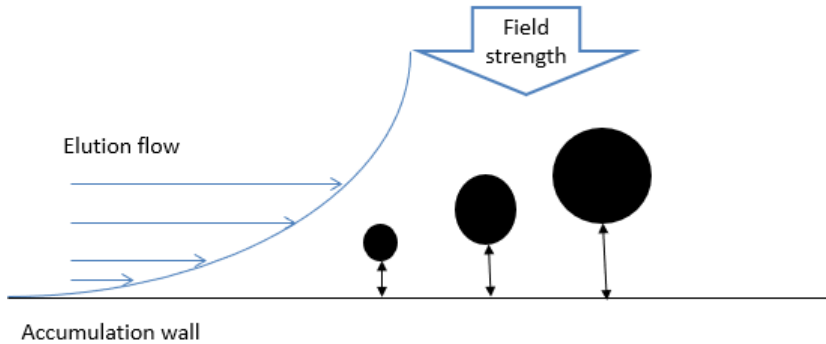
$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h}$$



(2) Mode stérique

A partir d'une certaine taille (diamètre ~ 600 nm) la diffusion devient négligeable. La rétention des particules est basée sur leur taille. Les plus grandes particules sortent plus vite que les petites

2.3. Modes d'élutions

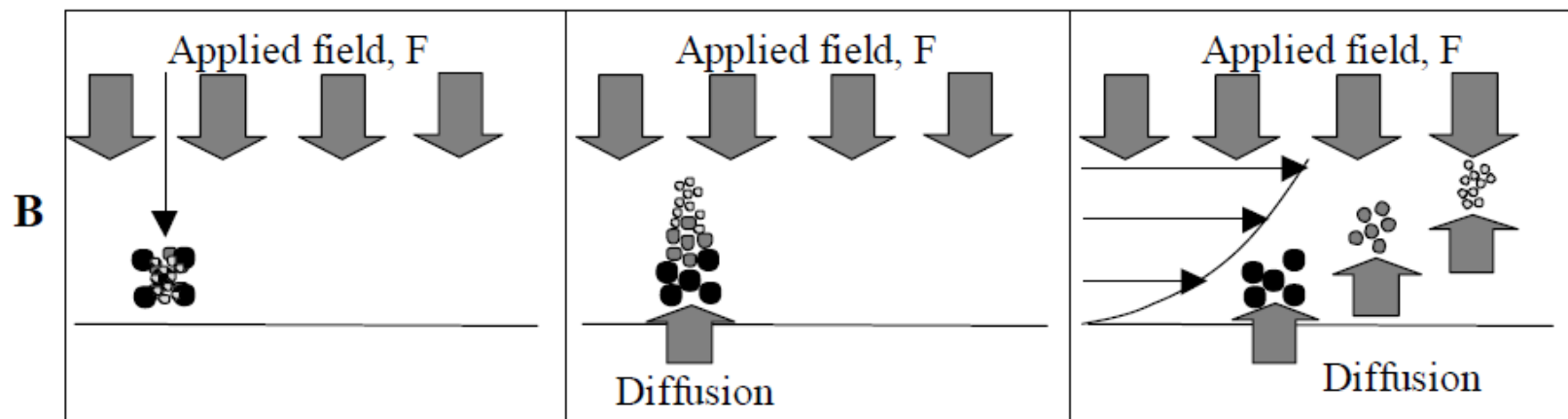
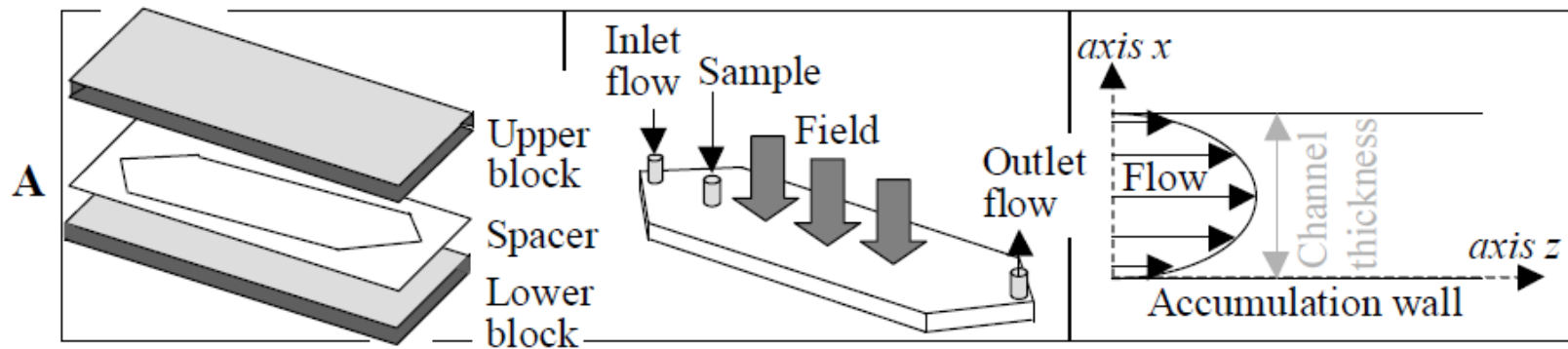


(3) Mode lift-hyperlayer

Si le flux d'élution est important, des forces de portances vont permettre aux particules d'accéder à des lignes de flux élevées et s'éluer plus vite. L'ordre d'élution reste le même que celui du mode stérique.

La différence entre le mode stérique et lift hyperlayer est plus théorique que pratique.

Les forces de portances dans le canal étant très difficile à caractériser. Il n'y a pas d'équations permettant de décrire précisément ce mode d'élution.





4. Formalisation théorique

Type de FFF	λ	caractéristique physico-chimique de l'analyte
Sedimentation-FFF/Gravitational-FFF	$\lambda = \frac{6kT}{d_v^3 Gw(\rho_s - \rho)}$	d_v, ρ_s
Thermal-FFF	$\lambda = \frac{D}{D_T \Delta T}$	D, D_T
Electrical-FFF	$\lambda = \frac{kT}{3\pi\eta d_h \mu E w}$	d_h, μ
Flow-FFF	$\lambda = \frac{kTV^0}{3\pi\eta d_h Q_c w^2}$	d_h

Selon la nature de la force que l'on applique, les analytes seront séparés en fonction d'une de leurs propriétés physicochimiques différentes

d_v : diamètre équivalent en volume [m]

ρ_s : masse volumique de la particule [kg m^{-3}]

D_T : mobilité thermophorétique (ou coefficient de Soret D_T/D)

μ : mobilité électrophorétique [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]



2.4. Formalisation théorique

Le modèle dit standard ou classique repose sur plus hypothèses liées:

- 1) Le mode d'élution et la géométrie du canal**

- 2) Le processus de migration**

- 3) Le profil de distribution de la vitesse de la phase mobile**

- 4) Le profil de distribution de la concentration**



1) Hypothèses liées au mode d'élution et la géométrie du canal



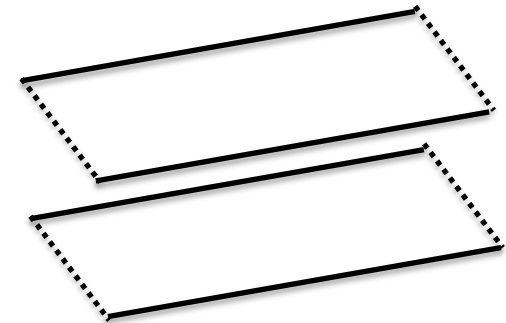
Les particules à l'intérieur du canal se déplacent sous le régime brownien.
La taille des particules est inférieure à $1\mu\text{m}$

Le canal est assimilé à 2 plans infiniment parallèles: Les effets de bord ne sont pas pris en compte dans les équations.

Cette hypothèse est valable uniquement lorsque le ratio largeur/ épaisseur est supérieur ou égal à 60 (*Giddings and Shure, 1987*)



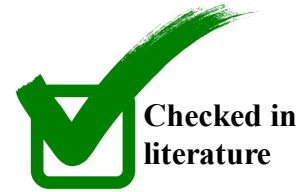
Considéré
comme



Pas d'effets de bord



2) Hypothèses liées à la stationnarité du processus de migration



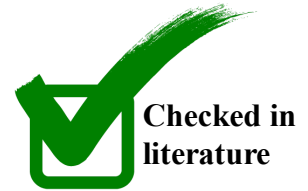
Le modèle s'applique uniquement si l'élution est isocratique pendant toute l'analyse

➔ Le champ de force appliqué doit être constant pendant toute l'analyse

Le modèle suppose que l'élution ne commence qu'une fois que la relaxation des particules dans le canal est terminée.

➔ L'étape de relaxation doit être suffisamment longue pour permettre aux particules d'être dans une position d'équilibre

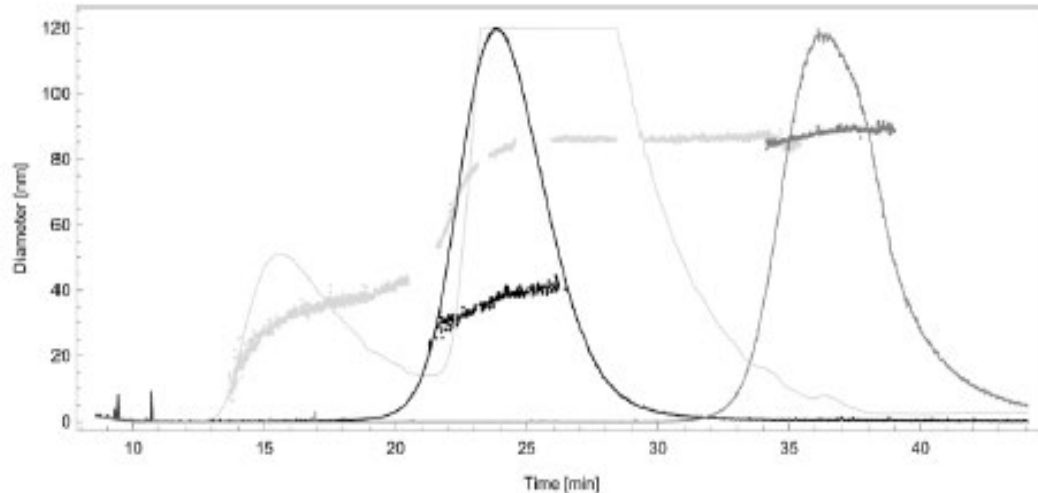
3) Hypothèses liées au profil de distribution de la vitesse de la phase mobile



- Le profil de vitesse du flux d'élution est supposé laminaire.
- L'analyse est réalisée dans des conditions isothermes

4) Hypothèses liées au profil de distribution de la concentration dans le canal

- La concentration est supposée décroître exponentiellement tout au long du canal.
- Les particules sont représentées comme des points (pas d'effets stériques ni de force de portance)
- Les interactions particules-particules et particules-parois sont considérées comme négligeable par rapport à l'influence du champ de force appliquée



- **Effet de l'overloading sur le temps de rétention (Caebergs et al., 2019):**

Un mélange d'étalons de polystyrène (PS) à 50 et 100 nm a été collecté puis réinjecté en utilisant les mêmes conditions de fractionnement.

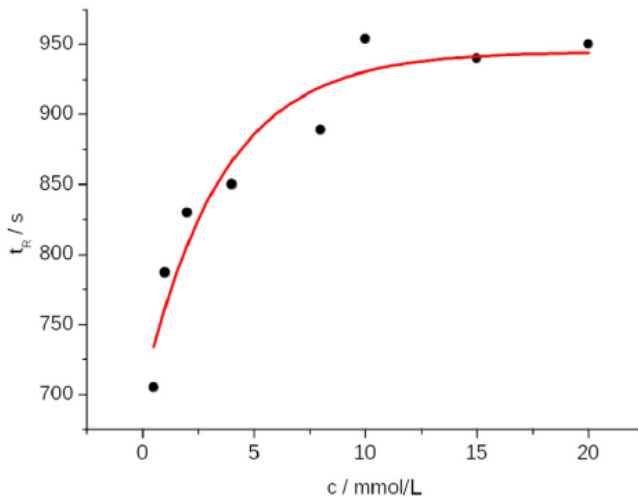
- Lorsque qu'un échantillon trop concentré est injecté dans le canal celui-ci n'arrivera pas à se relaxer correctement. ce qui provoque un décalage du temps de rétention



4) Hypothèses liées au profil de distribution de la concentration dans le canal

□ Dépend des conditions

- La concentration est supposée décroître exponentiellement tout au long du canal.
- Les particules sont représentées comme des points (pas d'effets stériques ni de force de portance)
-
- Les interactions particules-particules et particules-parois sont considérées comme négligeable par rapport à l'influence du champ de force appliquée



- **Influence de la force ionique sur la rétention de PS100 (*Nickel et al.,2021*).**

A basse force ionique les interactions électrostatiques ne sont pas négligeables et influencent de façon importante la rétention de la particule.



2.4. Formalisation théorique

Du à la dernière hypothèse, le modèle classique n'a pas une grande gamme d'application mais permet d'avoir une vue globale sur les paramètres importants gouvernant l'éluion.

Plusieurs modèles ont été développé depuis pour mieux caractériser le comportement d'éluion des particules:

- Prise en compte des effets stériques
- Prise en compte des interactions électrostatiques et de Van der Waals particule-paroi. $t_r = f(\lambda, I, A_{123}, \zeta_p, \zeta_w)$
- Prise en compte de l'effet du surfactant. $t_r = f(\lambda, C_s)$
- Application du modèle lorsque le champ de force appliquée varie.
- Prise en compte de la forme des particules (modèle développée pour les nanotube)



2.4.1. Formalisation théorique: mode Brownien

Équation de départ

$$R = \frac{t_0}{t_r} = \frac{v_{analyte}}{v_{phase\ mobile}} = \frac{\langle cv \rangle}{\langle c \rangle \langle v \rangle}$$

$$\frac{t_0}{t_r} = \frac{v_{analyte}}{v_{carrier}}$$

hypothèse des plan parallèles

$$\frac{\int_0^w c(x)v(x)dx}{\int_0^w c(x)dx \langle v(x) \rangle}$$

Vitesse d'un flux laminaire

$$v(x) = 6\langle v(x) \rangle \left(\frac{x}{w} - \left(\frac{x}{w} \right)^2 \right)$$

c_0 : concentration de l'échantillon à $x=0$ [mol m^{-3}]

$\langle v(x) \rangle$: Vitesse Moyenne du flux [m s^{-1}]

w : épaisseur du canal [m]

profil de distribution de la concentration

$$c(x) = c_0 \exp\left(-\frac{Fx}{kT}\right)$$

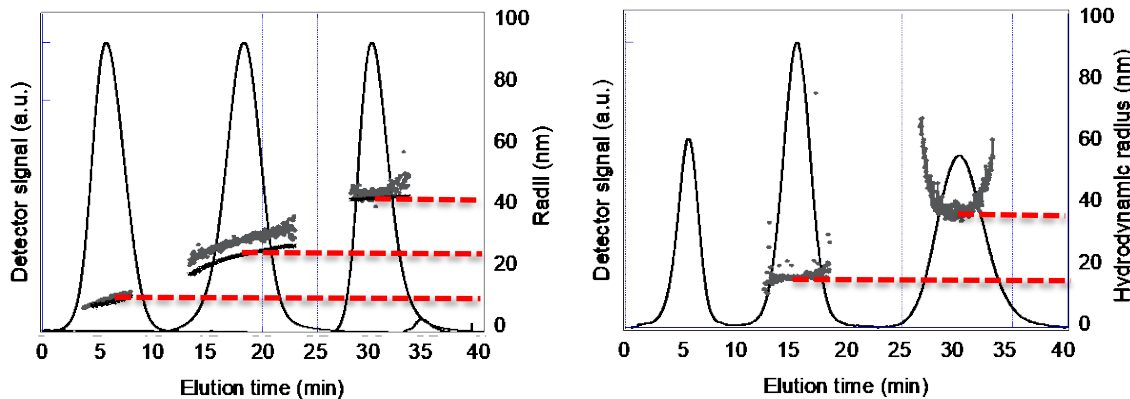
x : distance entre le centre de la particule et la paroi [m]

Exploitation: FI-FFF est une technique capable de fractionner en fonction de la taille hydrodynamique.

Elle a été et est utilisée pour fractionner tout type d'analyte, de l'échelle nano- à l'échelle microscopique, dans les domaines :

- des nanotechnologies : nanoparticules, nanotubes,
- des polymères hydrosolubles, naturels ou synthétiques
- de l'environnement : colloïdes naturels, nano/micro plastiques
- de la santé et de l'alimentaire : virus, protéines...

FI-FFF tire avantage à être couplée à différents détecteurs l' Ultra-Violet (UV), la diffusion de lumière multi-angle (MALS), le réfractomètre, et le spectromètre de masse atomique (ICPMS), plusieurs détecteurs pouvant être couplés à la suite l'un de l'autre (AF4-Multidétection) → *cf cours suivant*



From (Gigault et al.,2015)

Fractogrammes AF4 de nanoparticules de:

- latex (à gauche)
- or (à droite)

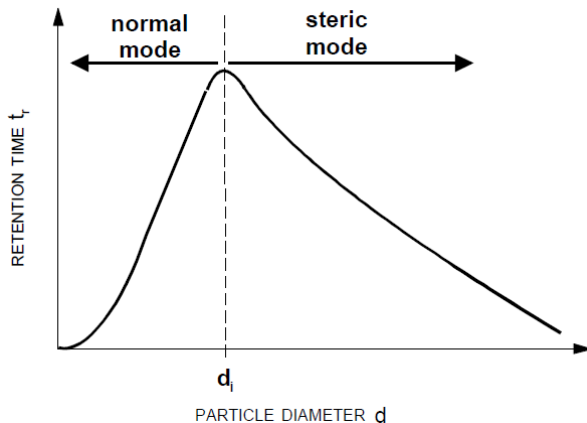
2.4.2. Formalisation théorique: mode stérique

$$\frac{\int_{0+r_h}^{w-r_h} c(x)v(x)dx}{\int_{0+r_h}^{w-r_h} c(x)dx \langle v(x) \rangle} \quad \Rightarrow \quad R = 6\alpha(1 - \alpha) + 6\lambda(12\alpha) \left(\coth\left(\frac{1 - 2\alpha}{2\lambda}\right) - \frac{2\lambda}{1 - 2\alpha} \right)$$

$$\alpha = \frac{d_h}{2w}$$

On passe du mode brownien au mode stérique lorsque $\alpha > \lambda$

- Le point d'inversion dépend des paramètres appliqués.
- Il est intéressant d'estimer le point d'inversion du mode d'élution lorsque l'on travaille avec des particules entre 500 nm- 1 μm



Le flux d'élution impacte les forces de portances. Ce paramètre est donc important à optimiser lorsque l'on travaille en mode stérique/hyperlayer.



2.4.3. Formalisation théorique: mode stérique=> mode hyperlayer

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



$\alpha \gg \lambda$

$$R = 6\alpha = 3 \frac{d_h}{w}$$

Contradiction entre la théorie et la pratique → Présence de forces de portance



Ajout d'un facteur de corrections γ qui se détermine expérimentalement

$$R = \gamma 3 \frac{d_h}{w}$$

$\gamma = f(\text{flux d'éluion, taille de l'échantillon})$

Paramètres d'évaluation du fractionnement

Permettent d'évaluer l'efficacité et la qualité du fractionnement

La sélectivité:
$$S_d = \frac{|d \log t_R|}{|d \log d|}$$

Exprimée en fonction du diamètre de la particule; mesure la capacité intrinsèque à séparer des particules selon leur taille, avec:
 t_R : temps de rétention d'une particule de diamètre d

La sélectivité permet de s'affranchir du "manque de pic" dû à la polydispersité. C'est pourquoi elle est préférée à la résolution pour évaluer l'efficacité du fractionnement.

Le recouvrement:
$$R\% = \frac{S}{S_0} \times 100$$

Représente la quantité d'échantillon qui demeure dans le canal et qui est fractionné, avec:
 S : aire du pic après fractionnement ($V_C > 0$)
 S_0 : aire du pic sans fractionnement ($V_C = 0$)

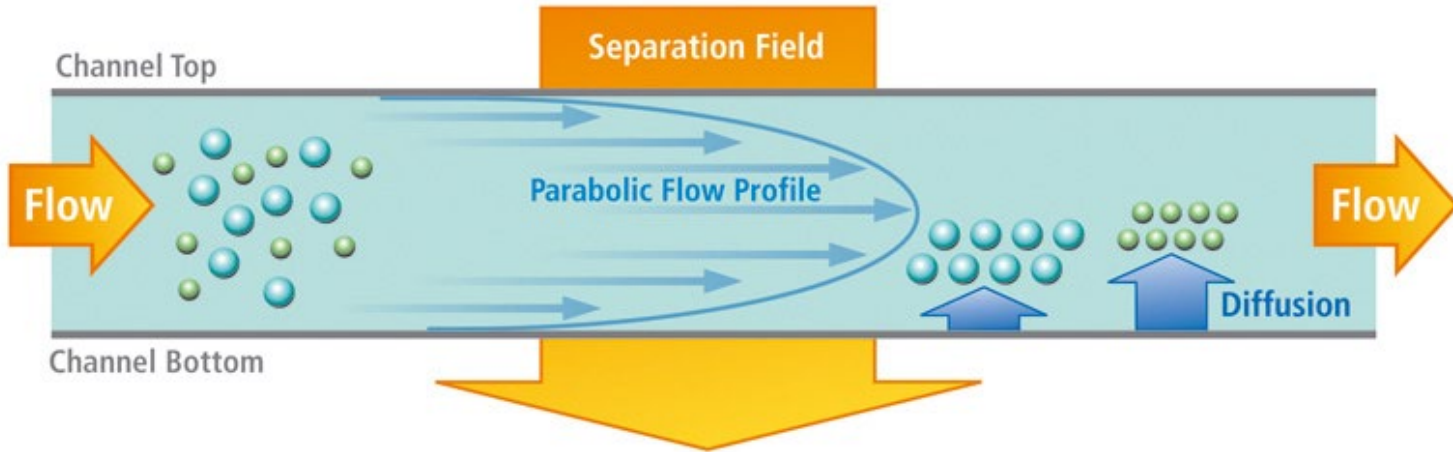
Autre critère qualitatif:

La forme du pic

ex. : dédoublement du pic \Rightarrow interaction des particules avec la paroi du canal? Trop d'échantillon injecté? Formation in situ d'agrégats? Présence réelle d'agrégats dans l'échantillon?
pic trop étroit pour un échantillon polydisperse \Rightarrow fractionnement non efficace dû à une force trop faible?
Trop d'échantillon injecté?



2.3. les différentes techniques de FFF



Flow FFF

Asymmetrical Flow FFF

Sedimentation FFF

Thermal FFF

Centrifugal FFF

Split Flow Thin Cell Fractionation (SPLITT)

Electrical

Acoustique

L'effet de la force sur la migration des analytes dans le canal dépend de la nature de cette force

→ Différentes caractéristiques pourront donc être obtenues selon son choix. En effet :

$$t_R = \frac{t_0}{6 \frac{D}{wU_x} \left\{ \frac{1 + e^{-\frac{wU_x}{D}}}{1 - e^{-\frac{wU_x}{D}}} - \frac{2D}{wU_x} \right\}}$$

w: hauteur du canal

D: coefficient de diffusion

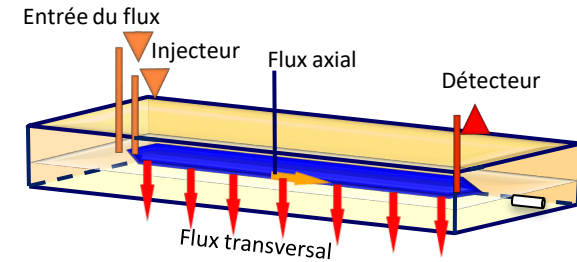
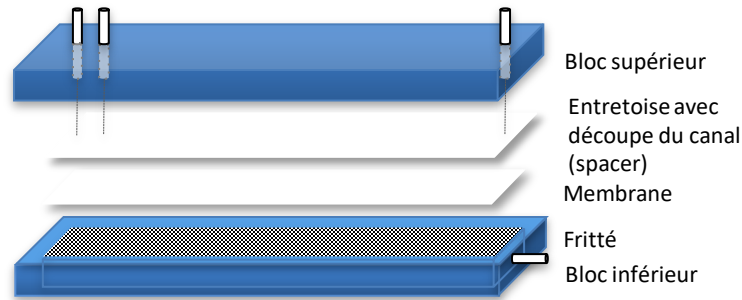
U_x : vitesse transversale de l'analyte

Mode normal d'éluion

Force	U_x	Caractéristiques de l'analyte
Hydrodynamique	$\frac{Q_c}{V_0} w$	Diffusion D
Gravitationnelle/ Centrifuge	$\frac{vD}{kT} (\rho' - \rho)g$	D, volume v, densité ρ'
Thermique	$D_T \frac{\Delta T}{w}$	D, Mobilité thermophorétique D_T (ou coefficient de Soret D_T/D)
Electrique	$ \mu \frac{\Delta V}{w}$	D, Mobilité électrophorétique μ

2.3.1. FFF hydrodynamique

= FFF par filtration dans un système dit "asymétrique", AsFI-FFF ou A4F ou AF4 :



Rétention en mode brownien (FI-FFF) : si $t_r > 8 t_0$

$$t_r = \frac{\pi \eta w^2 d_h Q_c t_0}{2kTV^0}$$

η : viscosité de la phase mobile [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]

Q_c : débit cross flow [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$]

T: Température [K]

V^0 : volume géométrique du canal [m^3]

d_h : diamètre hydrodynamique [m]

$$t_r = f(d_h)$$

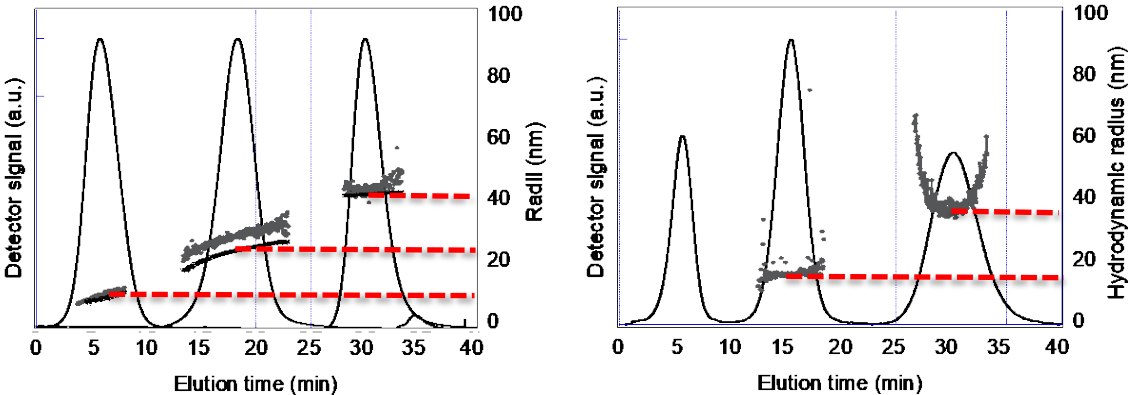
→ Permet d'atteindre la taille hydrodynamique

Exploitation: FI-FFF est une technique capable de fractionner en fonction de la taille hydrodynamique.

Elle a été et est utilisée pour fractionner tout type d'analyte, de l'échelle nano- à l'échelle microscopique, dans les domaines :

- des nanotechnologies : nanoparticules, nanotubes
- des polymères hydrosolubles, naturels ou synthétiques
- de l'environnement : colloïdes naturels, nano/micro plastiques
- de la santé et de l'alimentaire : virus, protéines...

FI-FFF tire avantage à être couplée à différents détecteurs l'Ultra-Violet (UV), la diffusion de lumière multi-angle (MALS), le réfractomètre, et le spectromètre de masse atomique (ICPMS), plusieurs détecteurs pouvant être couplés à la suite l'un de l'autre (AF4-Multidétection)



From (Gigault et al.,2015)

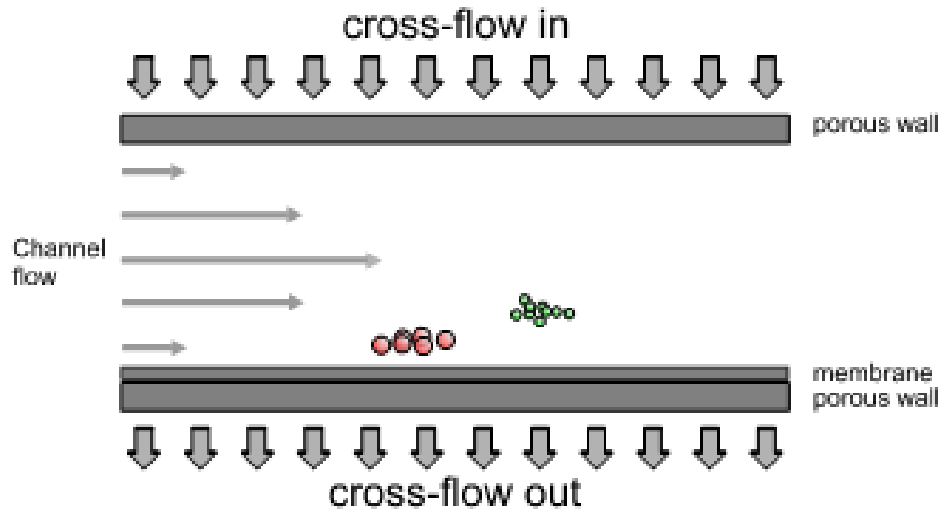
Fractogrammes AF4 de nanoparticules de:

- latex (à gauche)
- or (à droite)

Flow FFF (FFFF)

<https://www.wyatt.com/library/theory/flow-field-flow-fractionation-theory.html>

Symmetrical Cross-Flow FFF



- Canal rectangulaire
- Flux croisé traversant la largeur du canal (arrivée par le haut)

☞ Première technique de flow FFF (1976), quasiment plus utilisée actuellement, au profit de l'A4F (1987).

Avantages de l'A4F :

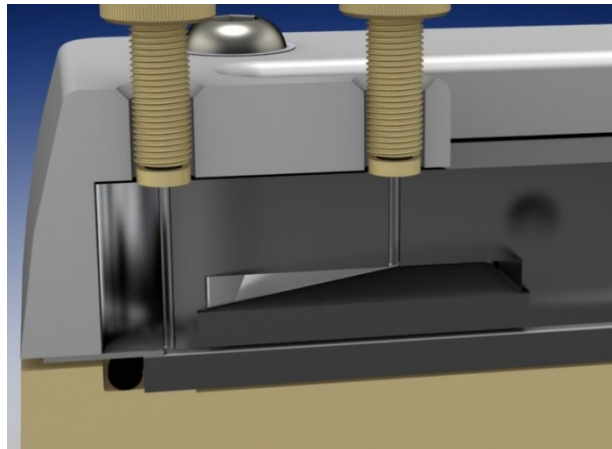
- construction et manipulation plus simples
- visualisation de l'échantillon à travers une paroi transparente,
- ↘ des imperfections de flux et procédure d'injection permettant un meilleur fractionnement (l'échantillon forme une bande plus étroite au début de la procédure de séparation)

⇒ séparations plus rapides et plus efficaces en A4F

Frit-Inlet AF4 (FI-AF4)

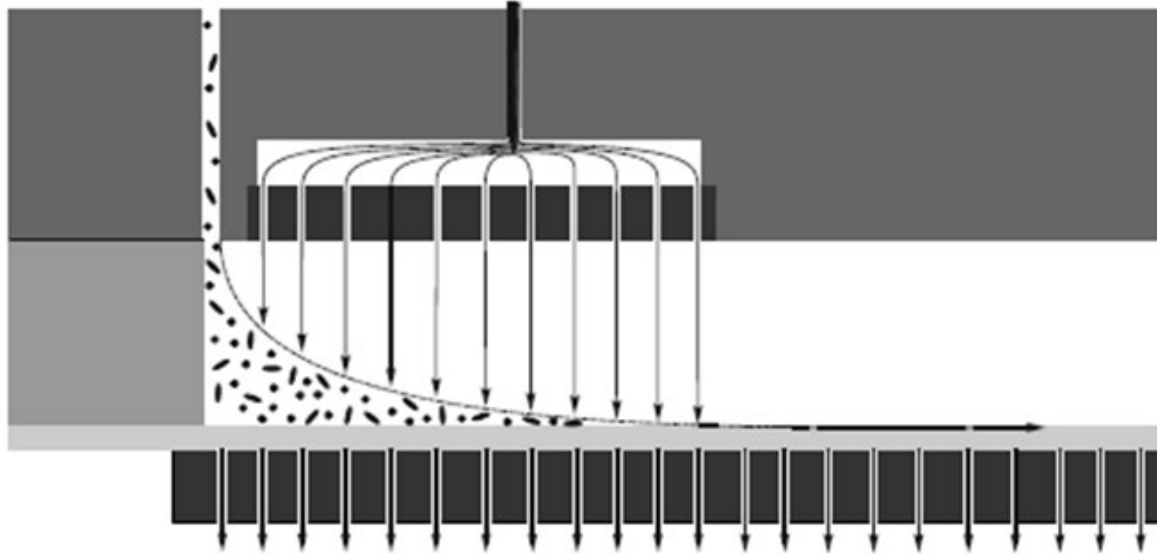
Moyen alternatif pour **séparer par AF4 sans étape de Focalisation**

- Un fritté est placé sous le port d'entrée dans le canal (Inlet) dans le bloc supérieur.
- Echantillon injecté directement à l'entrée du canal.
- Flux équivalent au flux croisé introduit via le fritté du bloc supérieur.
- Relaxation accomplie à la volée sans étape de Focalisation.



FI-AF4 :

Principe de Relaxation

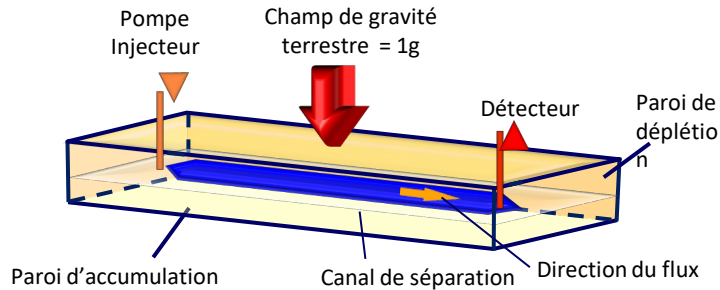


- ☞ La relaxation s'opère pendant que l'échantillon est transporté sur la première section du canal AF4 avec le flux passant par le fritté placé en haut

Avantages du frit inlet :

- Introduction dans le canal plus douce
- Permet de travailler sur des échantillons ayant une forte tendance à l'agrégation ou à la gélification

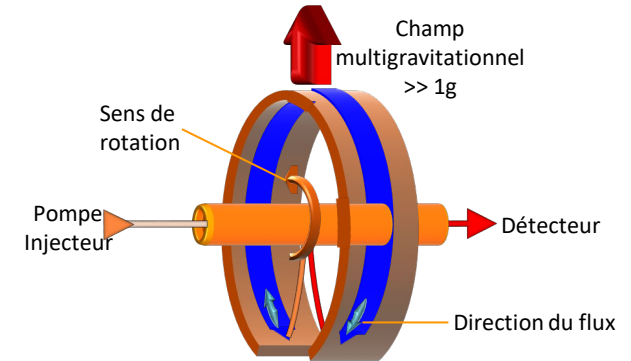
2.3.2. FFF gravitationnelle / centrifuge



FFF gravitationnelle ou GrFFF : le champ de gravité est celui du champ terrestre, soit $\approx 1g$.

Avantages : simplicité de construction par simple serrage de l'entretoise entre deux plaques de verre ou de matière plastique constituant le canal.

Inconvénients : champ faible et peu ou pas modulable; difficilement applicable à des particules sub-microniques.

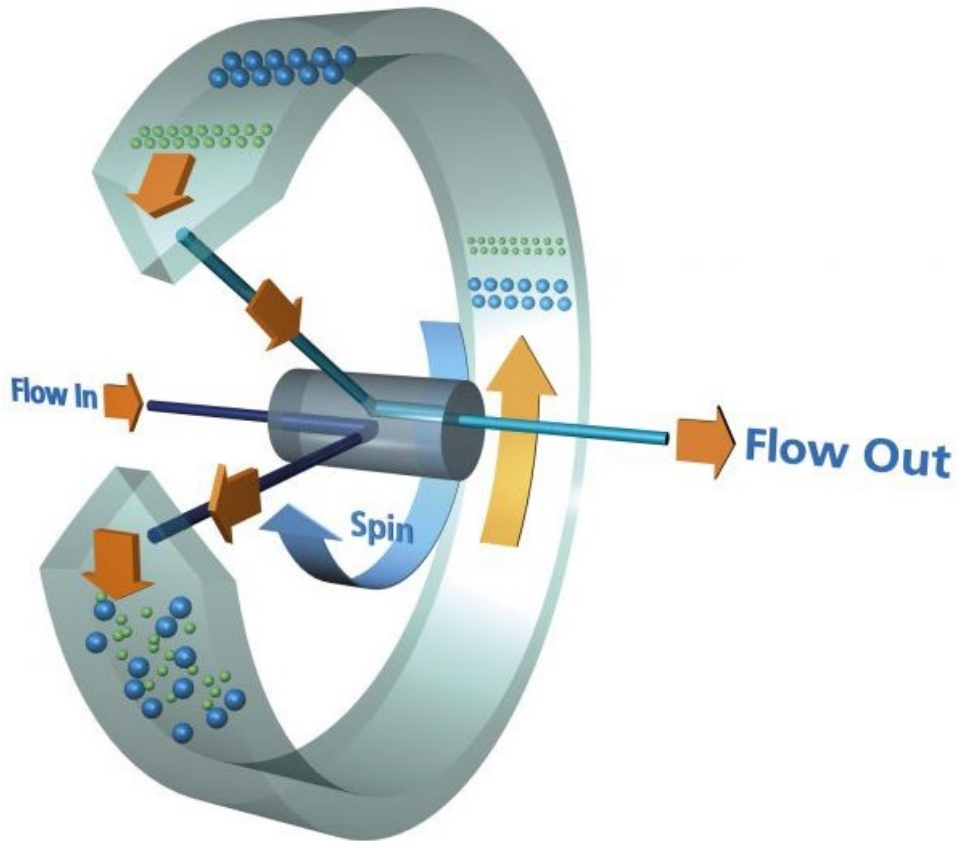
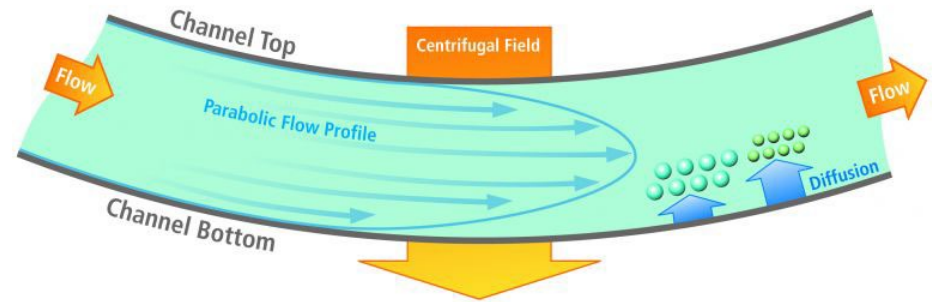


FFF multigravitationnelle ou par sédimentation centrifuge (SdFFF): le champ de gravité est un multiple du champ terrestre, soit $\gg 1g$, obtenu par insertion du canal de séparation dans un système rotatif

Avantages : Champ puissant, modulable et programmable en fonction de la régulation de la vitesse de rotation, permettant l'analyse de particules colloïdales ;

Inconvénients : nécessite une instrumentation relativement complexe (serrage du canal dans le bol de centrifugation, joints tournants)

2.3.2. FFF gravitationnelle / centrifuge



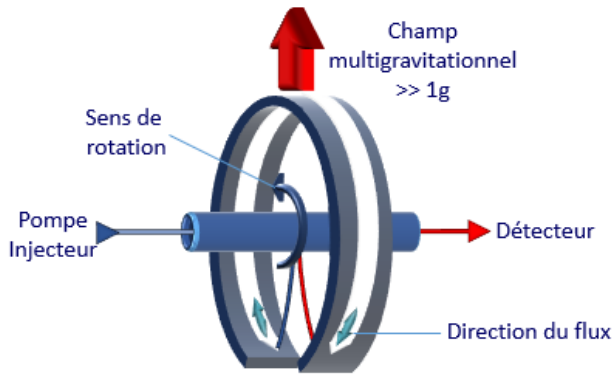
2.3.2. FFF gravitationnelle / centrifuge

-**par sédimentation** : canal placé dans une centrifugeuse. Technique bien adaptée pour la séparation et la caractérisation de la **distribution en taille de supramolécules colloïdales (taille > 0,1 μ m)** (cette limite inférieure dépend légèrement de leur densité).

Dans cette méthode, le canal en forme de ruban est incurvé pour être logé à l'intérieur d'une centrifugeuse permettant d'atteindre une accélération de 1000g. Des joints rotatifs permettent l'alimentation en liquide vecteur et l'introduction de l'échantillon ainsi que l'évacuation de l'effluent vers un détecteur statique. La **sélectivité de cette méthode est très élevée puisque le temps de séjour est proportionnel au cube de la taille.**

Il est possible par cette méthode d'étudier des phénomènes d'agrégation, de croissance, de déterminer par exemple la **quantité de polymères adsorbée sur une particule solide** et , même d'accéder à des **constantes d'équilibre de réactions de complexation se produisant à la surface de particules.** Cette méthode permet aussi de caractériser la distribution des gouttelettes d'émulsions et de contrôler leur stabilité.

2.3.2 FFF gravitationnelle / centrifuge



$$t_r = \frac{d_v^3 \pi G W (\rho_s - \rho) t_0}{36 k T}$$

$$G = \left(\frac{\pi}{30} \text{rpm} \right)^2 R_c$$

$$t_r = f(d_v, \rho_s)$$

La SdFFF utilise un champ de force centrifuge afin de séparer les composés en fonction de leur taille et de la masse volumique.

d_v : diamètre équivalent en volume [m]

G : vitesse centrifuge radiale [$m s^{-2}$]

ρ_s : masse volumique de l'analyte [$kg m^3$]

ρ : masse volumique de la phase mobile [$kg m^3$]

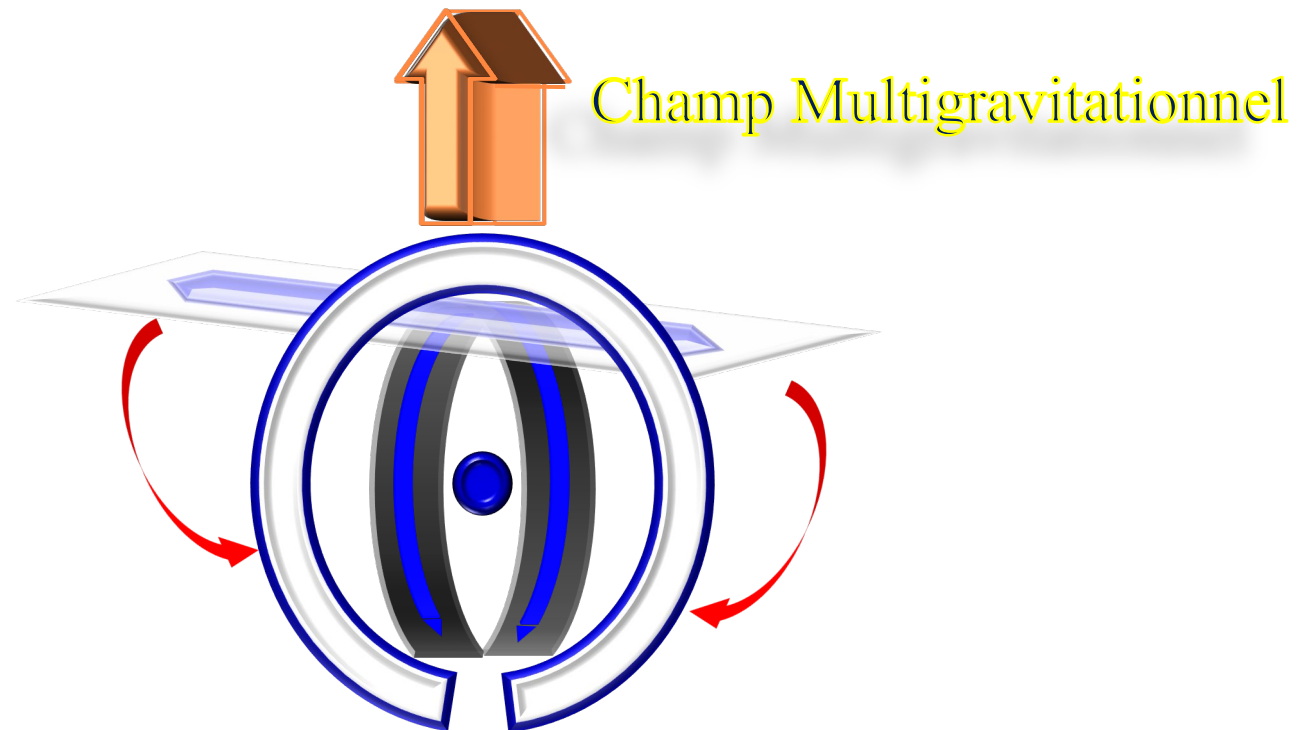
rpm : nombre de tour par minutes [s^{-1}]

R_c : rayon de courbure [m]

2.3.2. FFF gravitationnelle / centrifuge

SdFFF : Sedimentation FFF ou FFF multigravitationnelle. Le champ multigravitationnel ($\gg 1g$) est obtenu par la rotation du canal dans un dispositif particulier:

- avantages : Champ intense, variable et programmable permettant des séparations efficaces et rapides,
- désavantages : instrumentation complexe.





2.3.3. Flow ou Sd-FFF ?

- La FI-FFF et la Sd-FFF sont 2 techniques qui fractionnent en fonction de la taille.

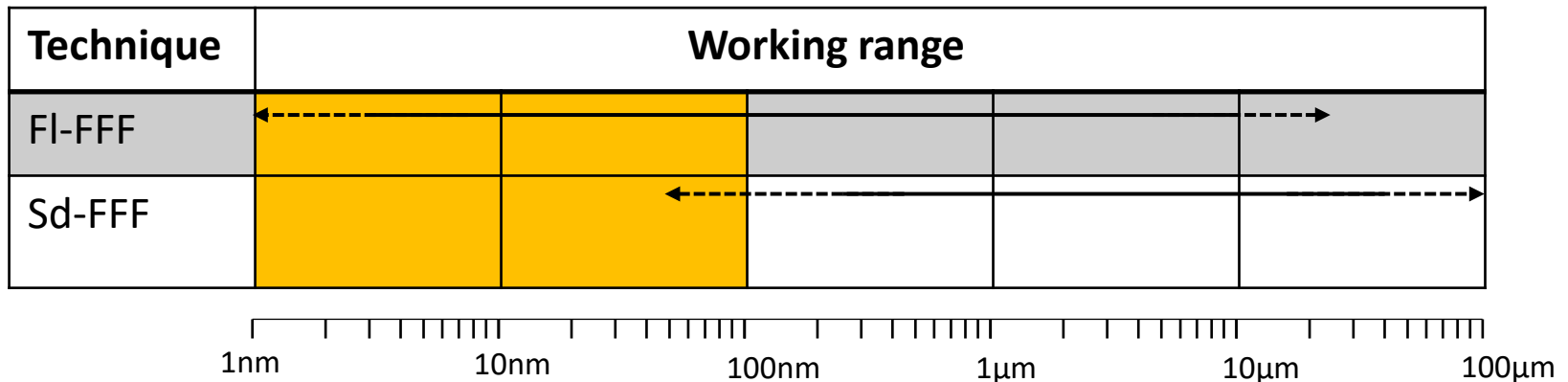
$$S_d = \frac{|d(\log(t_r))|}{|d(\log(d))|}$$

Sélectivité (S_d): Capacité de la technique de séparer les composants

Dans des conditions optimales:

la FI-FFF aura une $S_d=1$ et

la Sd-FFF une S_d de 3 (cf. Eq de rétention).



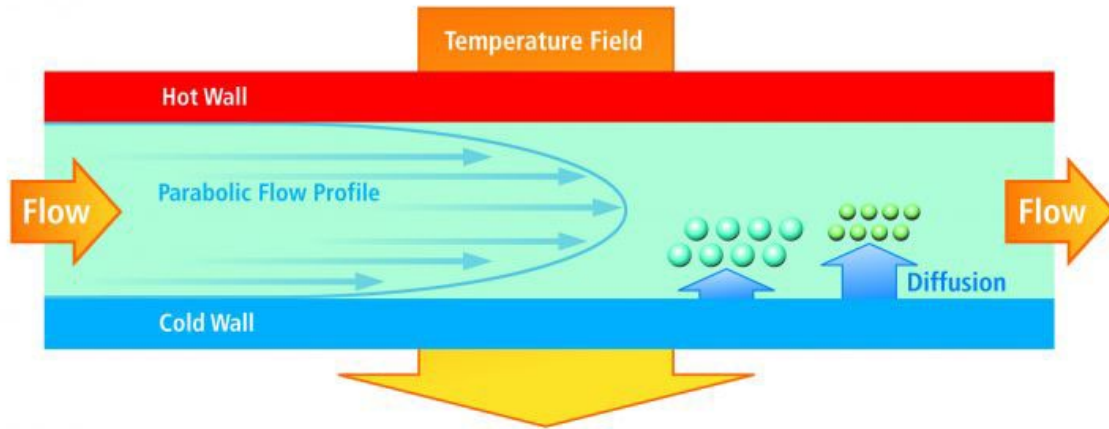
2.3.4. FFF thermique

Dans la technique de FFF thermique, le champ de force provient de la mise en œuvre d'un **gradient de température** obtenu en chauffant la plaque supérieure au moyen de résistances électriques et en refroidissant la plaque inférieure par une circulation d'eau. Au moyen d'une différence de température de quelques dizaines de degrés entre les plaques (typiquement entre 20 et 100°K), on obtient un gradient thermique suffisamment intense pour permettre la **séparation de polymères en solution en fonction à la fois de leur masse molaire et de leur composition chimique**, avec une résolution comparable voire meilleure à celle de la chromatographie par perméation de gel. La Th FFF peut ainsi séparer 2 polymères de même masse molaire mais de composition chimique différente (ex. PS et PMMA) en 2 pics distincts.

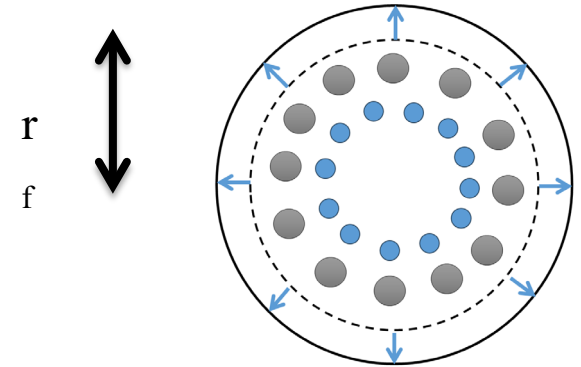
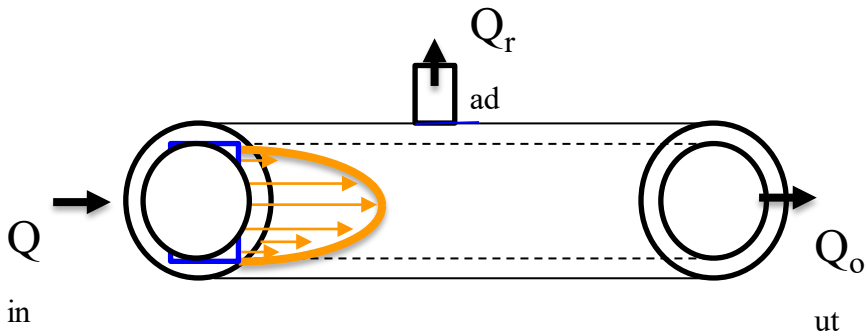
Du fait que le cisaillement dans le canal est purement tangentiel, la FFF thermique offre surtout l'avantage de **permettre l'analyse de polymères de très haute masse molaire (au moins 30 000 000 Da) sans le risque de dégradation mécanique rencontré dans les colonnes remplies de chromatographie. Il est aussi possible de séparer par cette méthode des copolymères en fonction de leur composition et de leur conformation.**

La mesure du temps de séjour donne un accès direct au coefficient Soret, rapport du coefficient de diffusion thermique au coefficient de diffusion moléculaire. La caractérisation des espèces selon des paramètres classiques (masse moléculaire par exemple) est difficile sans étalonnage préalable du fait que le phénomène de diffusion thermique n'est pas suffisamment bien compris à l'heure actuelle pour prévoir les coefficients Soret. Toutefois la méthode de FFF thermique s'avère être un outil physico-chimique particulièrement performant pour la détermination expérimentale des coefficients Soret et donc **l'étude du mécanisme de diffusion thermique.**

FFF thermique (ThFFF)



2.3.5. FFF hydrodynamique à fibre creuse/Hollow fiber FFF (H5F)



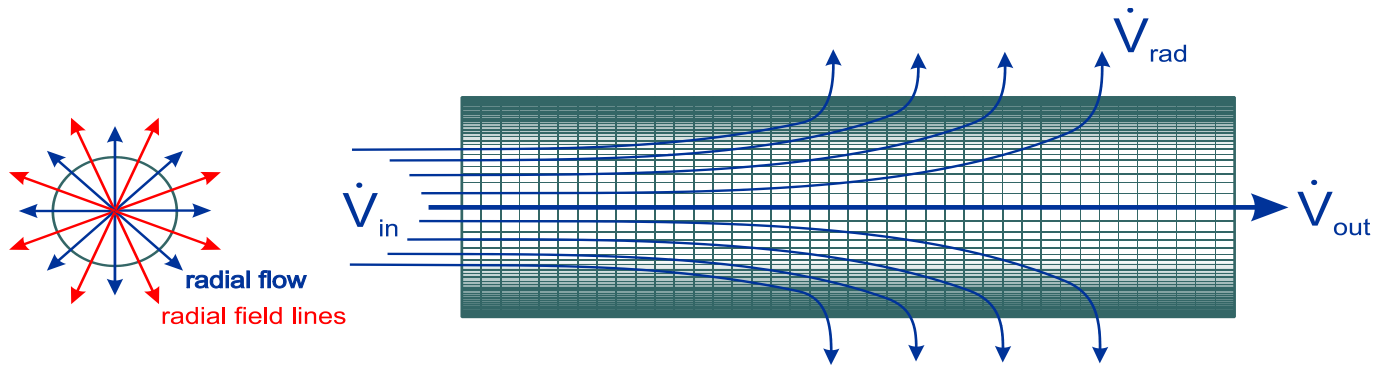
Le flux croisé est appliqué radialement par rapport au flux d'élué.

Si $t_r > 12,5 t_0$

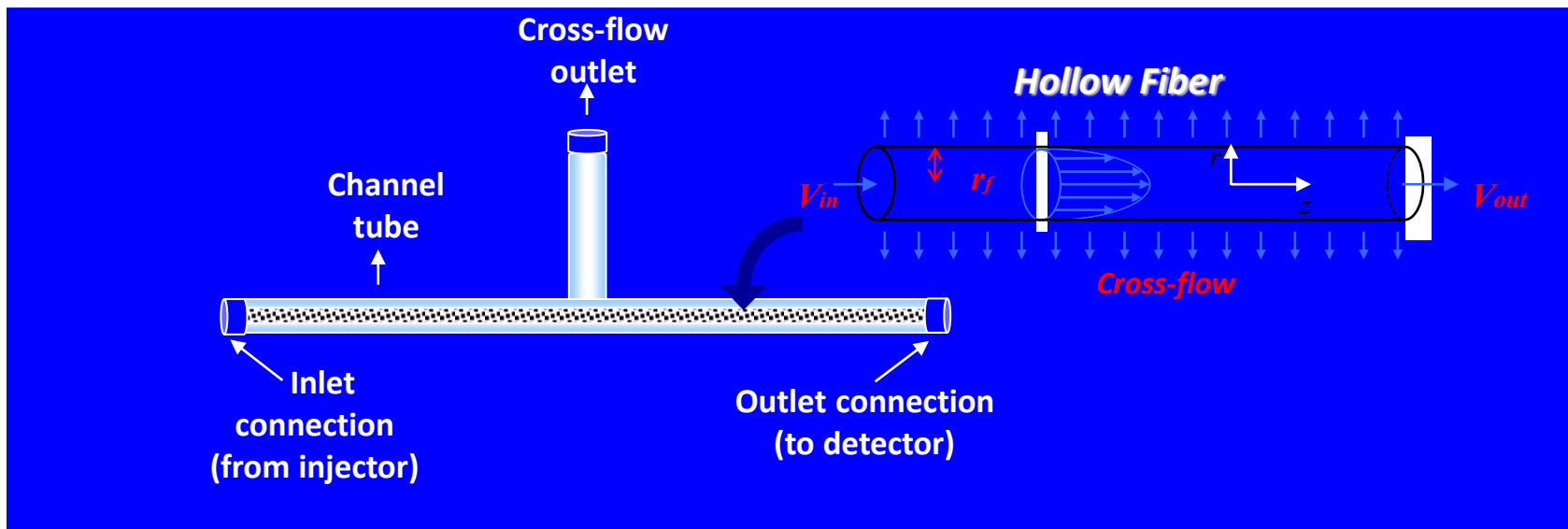
$$t_r = \frac{3\eta d_h Q_{rad} t_0}{8kTL}$$

- Le volume d'une fibre creuse est généralement plus petit que le volume d'un canal standard => dilution plus faible pendant l'analyse.
- Ici on change la fibre au lieu de la membrane

Principe de la séparation par Hollow-Fiber Flow-FFF (HF5)



Le flux croisé en HF5 est généré par le flux d'élué, qui se partage dans des directions **longitudinale et radiale**.



Hollow-Fiber Flow-FFF (HF5)

Cartouche HF5



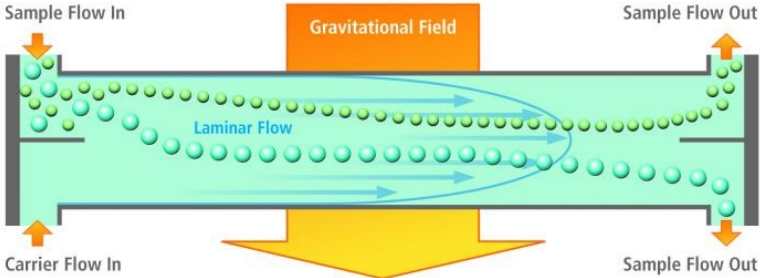
- Jetable, stérilisable
- membrane: PES 10 kDa, rayon 400 μm

Hollow-Fiber Flow-FFF (HF5) connue depuis 1976, comme le canal plat de FFF.

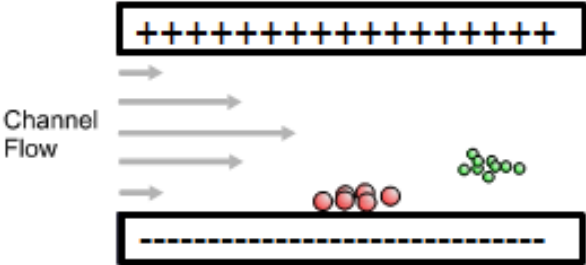
Géométrie complètement différente de canal : **fibre creuse**

Autres techniques de FFF

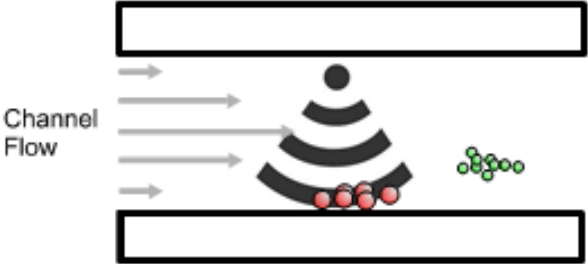
SPLITT FFF



Electrical FFF



Acoustic FFF





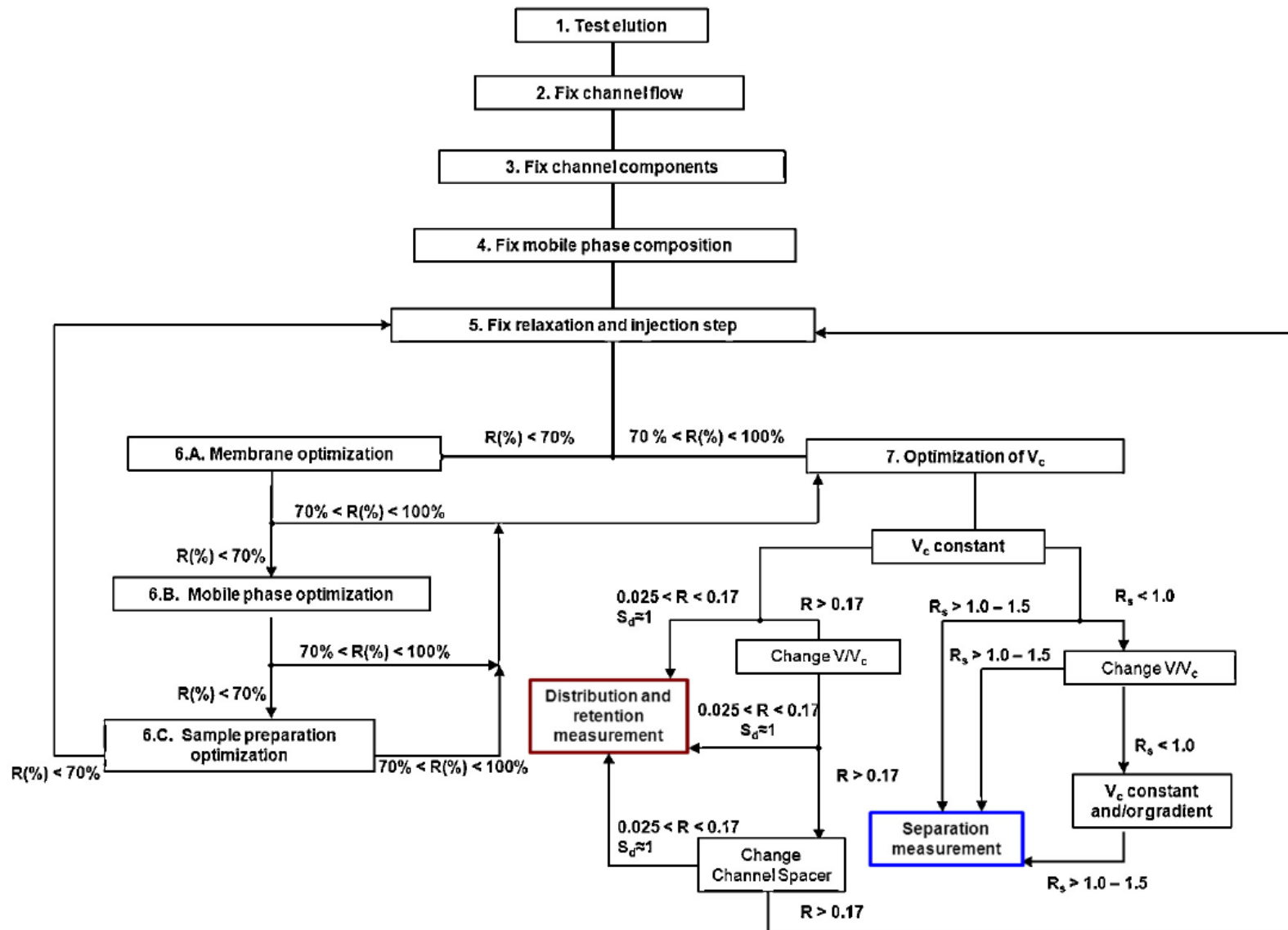
3. Fractionnement Flux-Force hydrodynamique (Flow FFF, FIFFF, A4F)

Sommaire

- 3.1. Développement et optimisation d'une méthode en A4F***
- 3.2. Obtention d'une taille ou d'une masse***
- 3.3. L'appareillage***

3.1. Développement et optimisation d'une méthode en A4F

Développement & Optimisation d'une méthode



1- Faire une élution test

Injecter l'échantillon dans des conditions "standard"

⇒ Informations préliminaires (comportement de l'échantillon dans le système : guider l'optimisation).

Attention : il faut dès le départ prendre en compte les spécificités du matériau.

Ex : Si particule chargée : mettre une force ionique dans la phase mobile.
Si polymère, se placer bien en-dessous de la C^* .

Méthode test « type »

Phase mobile : si molécule soluble ou dispersible dans l'eau, choisir plutôt une solution faiblement saline (sel monovalent).

Spacer (épaisseur du canal, ω) : entre 290 et 370 μm .

Membrane : cellulose ou PES, cut off 10 kDa

Flux d'entraînement (flux dans les détecteurs) : 0,5 à 1 mL/min

Flux croisé (Cross flow) pendant l'élution : 0,5 à 1 mL/min

Flux croisé pendant la focalisation/relaxation : 0,5 à 3 mL/min pendant 4 min d'injection et 1 à 4 min sans flux d'injection.

2- Fixer le flux d'entraînement (channel flow)

Flux d'entraînement (flux dans les détecteurs) :

$$\dot{V}_p = 0,5 \text{ à } 1 \text{ mL/min}$$

Impact direct sur la **largeur des pics** (band broadening) puisqu'il influence le temps de résidence dans le canal

- $< 0,5 \text{ mL/min}$: temps de séjour long dans le canal, pouvant déboucher sur une perte importante d'échantillon
- $> 1 \text{ mL/min}$: la pression dans le canal \nearrow et on doit appliquer un flux croisé conséquent pour fractionner les très petits analytes.

3- Fixer la géométrie du canal

Géométrie canal (largeur, longueur, forme et épaisseur du canal) : facteur ayant un rôle fondamental dans le processus d'élution et de fractionnement

- Largeur du canal : rôle sur la forme du pic (paramètre non crucial)
- **Epaisseur du canal** (ω , défini par la taille du spacer) : généralement entre 250 et 450 μm .

Typiquement :
450 μm pour petits colloïdes
250 ou 350 μm pour 10-1000 nm

Rôle fondamental : conditionne le profil de vitesse parabolique dans le canal
→ relatif à la vitesse d'élution.

➔ A choisir en tenant compte du coefficient de diffusion des objets

Ex : Si ω ↗ de 250 μm à 490 μm , l'analyte positionné au point bas du profil de vitesse aura un **temps de résidence supérieur** dans le canal.

4- Fixer la composition de la phase mobile

La phase mobile (ou éluant) doit être compatible avec l'analyte

Ses propriétés (composition, force ionique, pH) influencent directement la double couche électronique (EDL) des objets chargés et des membranes.

L'épaisseur de l'EDL est définie par la loi de Debye :

$$\kappa^{-1} = 0.304 \frac{1}{\sqrt{I}}$$

Valable pour un électrolyte monovalent à 25°C en solution aqueuse,
l : longueur de Debye (nm), I : force ionique.

$$I = 1/2 \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

c_i : concentration de chaque espèce ionique en mol L⁻¹, z_i : charge de valence de l'ion.

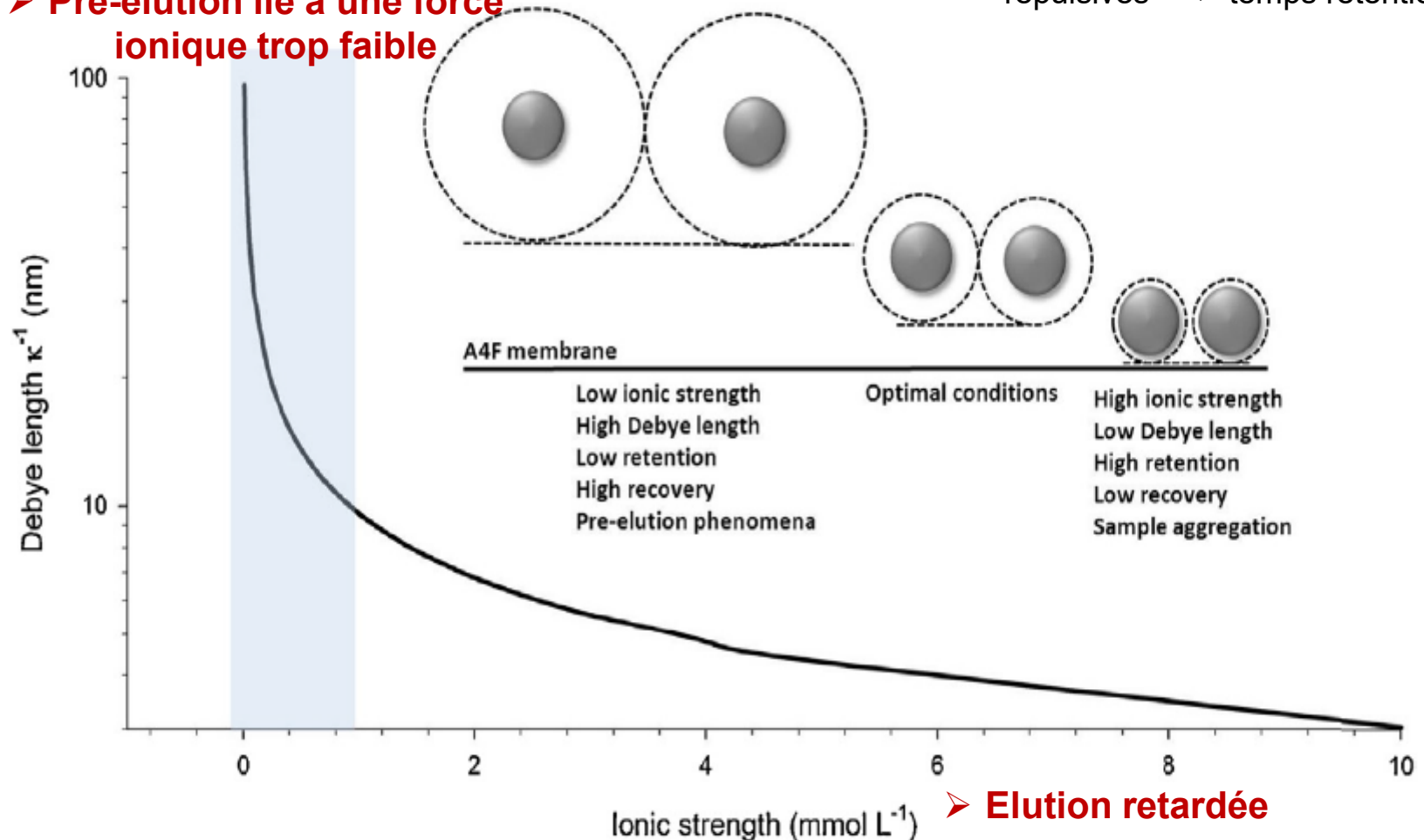
L'importance de κ^{-1} dépend seulement des propriétés de l'éluant pas de celles de la surface de la membrane.

**Choisir un système non réactif,
Pour objets chargés : force ionique modérée amenée par un sel monovalent
plutôt ou un tampon peu salin (protéines), pour objets neutres : un biocide
(type NaN₃ à 0.02%) est adapté.**

Force ionique de la phase mobile

- Rendement élution fort
- Pré-élution lié à une force ionique trop faible

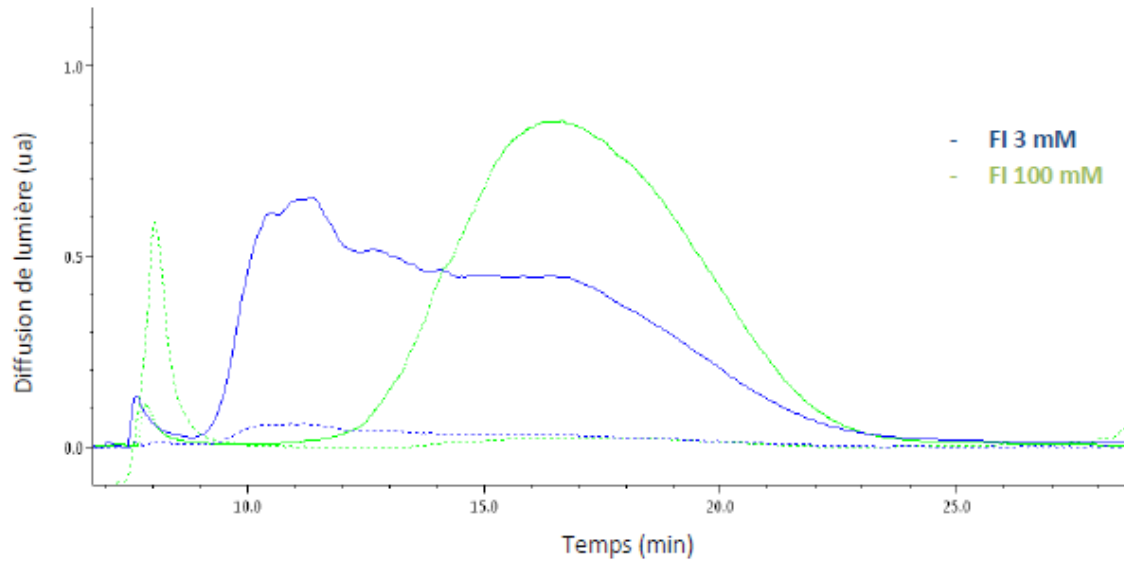
↗ I = ↘ interactions électrostatiques répulsives = ↗ temps rétention



J. Gigault et al. / Analytica Chimica Acta 809 (2014) 9–24

- Elution retardée
- Rendement élution faible
- Elargissement des pics

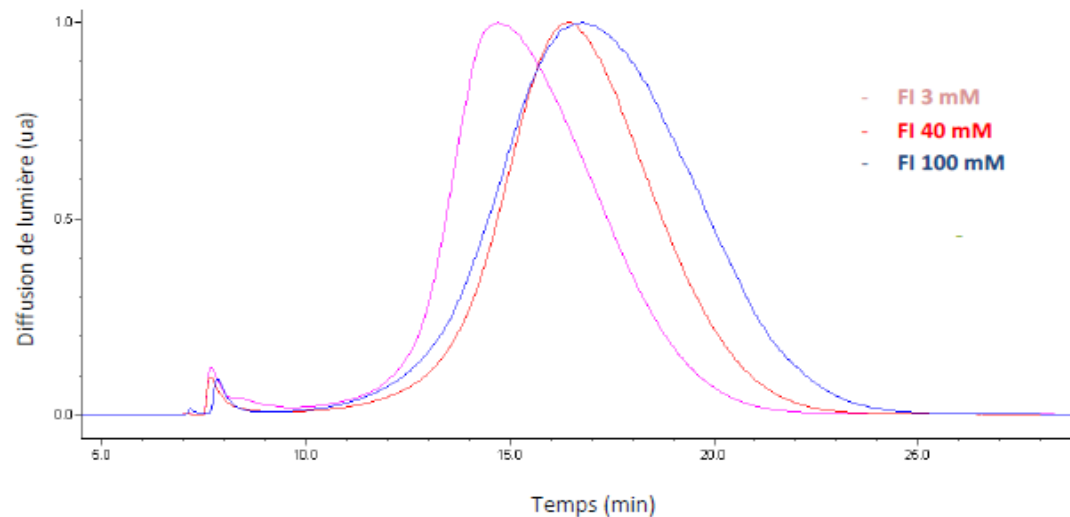
Effet de la force ionique de l'éluant



➤ phénomène de pré-élution lié à une force ionique trop faible

➤ Optimum de FI

Amidons cationiques



5- Fixer les étapes d'injection et de relaxation

➤ Injection

Fixer flux d'injection et volume d'injection + concentration en analyte.

Pendant injection : analyte distribué uniformément dans l'épaisseur du canal.

➤ Focalisation/Relaxation

Concentration de l'analyte sur une fine bande proche de la membrane +
Equilibrer l'analyte dans la phase mobile avant élution

- **Ajustement de la position de la bande** en **contrôlant la balance des flux** (position proche du port d'injection généralement).
- **Temps de relaxation (τ)** : choisi en fonction du flux croisé (\dot{V}_c) appliqué pendant la focalisation.

$$\tau = 1.2 \frac{V_0}{\dot{V}_c}$$

$$\tau = \frac{w.k.T}{D.F} \left(\frac{1}{2} \frac{k.T}{F.w} \frac{1}{e^{\frac{F.w}{kt}} - 1} \right)$$

• **Flux croisé pendant la focalisation/relaxation** :

Pour des analytes fragiles (cf liposomes), sujets à l'agrégation ou interagissant avec la membrane : travailler à de faibles flux croisés (entre 0,5 et 1mL/min). Pour des échantillons complexes et polydispersés et pour les "petites" macromolécules, on peut monter à 2-3 mL/min.

6A- Optimiser la membrane

Un des facteurs limitants en A4F : qualité de la membrane

(doit rejeter les différents constituants, être perméable à l'éluant et inerte vis à vis de l'échantillon et de l'éluant)

- ➔ **Différents types de membranes disponibles** (matériaux, cut-off)
- ➔ Choix d'une membrane : tenir compte du **type d'échantillon à analyser et de l'éluant utilisé**

Membrane à base de cellulose : la plus polyvalente (pas trop hydrophobe).

Il en existe d'autres : polyvinylpyrrolidone ou polyethersulfone (PES)...

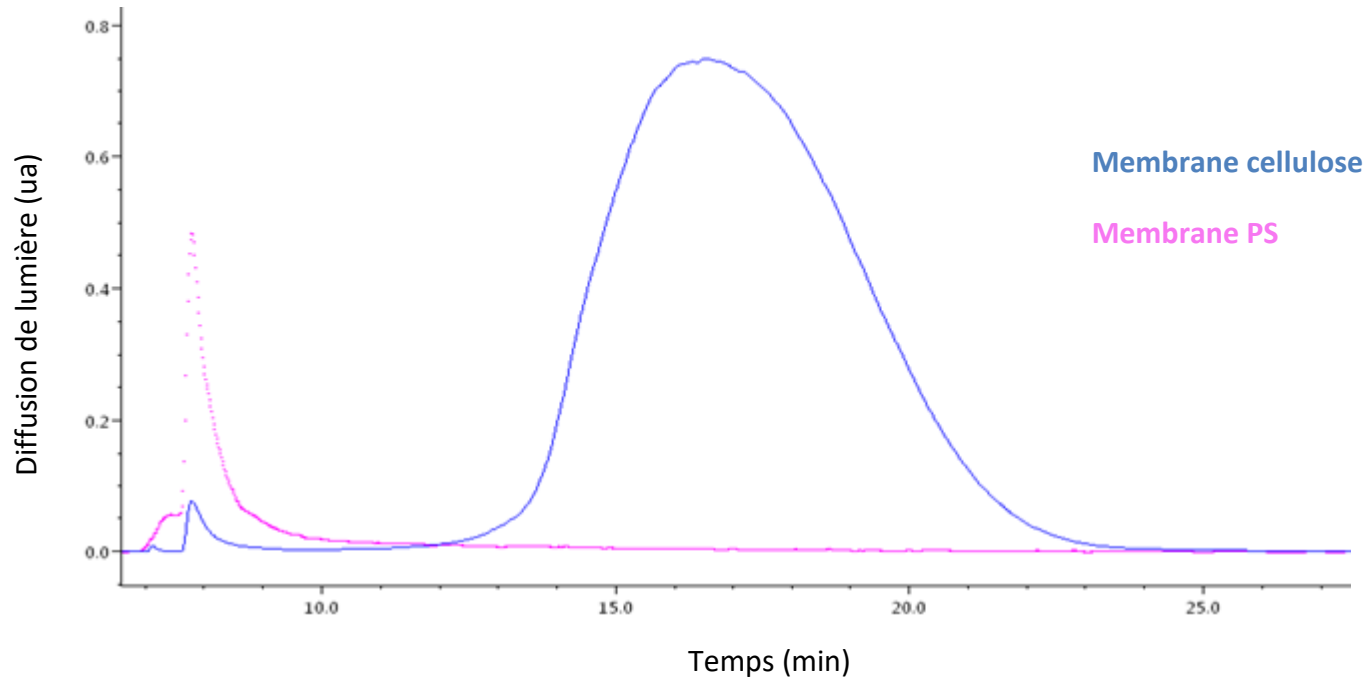
Cut off : 1, 5, 10 kDa à choisir selon la taille des particules/molécules à analyser

D'abord faire une elution sans cross-flow pour établir le point zéro du recouvrement de l'analyte.

⇒ **Si $R(\%) < 70\%$ (lors d'une élution sans cross flow) : interaction significative et fixation de l'analyte sur la membrane**

- **Taille des pores** de la membrane (perte?) : ↘ **cut-off** de la membrane, si pas d'amélioration de R% → interaction forte avec la membrane
- Dans certains cas un **conditionnement ou un traitement** de la membrane peut être efficace
- Sinon, il faut **optimiser la phase mobile** après avoir optimisé la taille du cut-off de la membrane. Modifier le pH et la composition de la phase mobile est plus efficace que changer la composition de la membrane.

Effet du type de membrane



Amidon cationique

6B- Optimiser la phase mobile

Composition et force ionique de la phase mobile à déterminer selon les propriétés physico-chimiques initiales de l'échantillon (e.g., taille, potentiel zeta, chimie de surface, présence de surfactants, etc...)

Pour l'optimiser : force ionique, pH, composition.

- ✓ Généralement **pH** neutre
(attention aux bornes du domaine de pH : pb d'intégrité du système)
- ✓ **Force ionique = paramètre le plus important car joue sur les propriétés électrostatiques du système**

Force ionique importante ($I > 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) \nearrow temps rétention de l'analyte dans le canal (interactions électrostatiques répulsives), surtout si I identique à la charge de surface de la membrane

- ✓ **Composition et nature**

Ex: la présence de ligands hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) \searrow ou élimine les interactions entre la membrane et l'analyte.

6C- Optimiser la préparation de l'échantillon

Si après modification de la phase mobile et de la membrane pas d'amélioration : travailler à la préparation de l'échantillon. Problème souvent dû à la concentration en analytes.

➤ **C trop faible : mauvais rapport signal/bruit**

Reconcentrer en utilisant par ex un dispositif d'ultrafiltration muni du même type de membrane.

➤ **C trop forte : effet d'overloading**

Le mode de rétention classique ne peut pas s'opérer à forte concentration puisque de fortes interactions entre des particules voisines peuvent modifier leur distribution spatiale

⇒ **pics distordus et/ou décalés plus tôt ou plus tard selon la nature de l'échantillon**

De plus, le processus de fractionnement entraîne une \nearrow de la C au point de focalisation et proche de la paroi d'accumulation

⇒ gélification ou précipitation des constituants de l'échantillon.

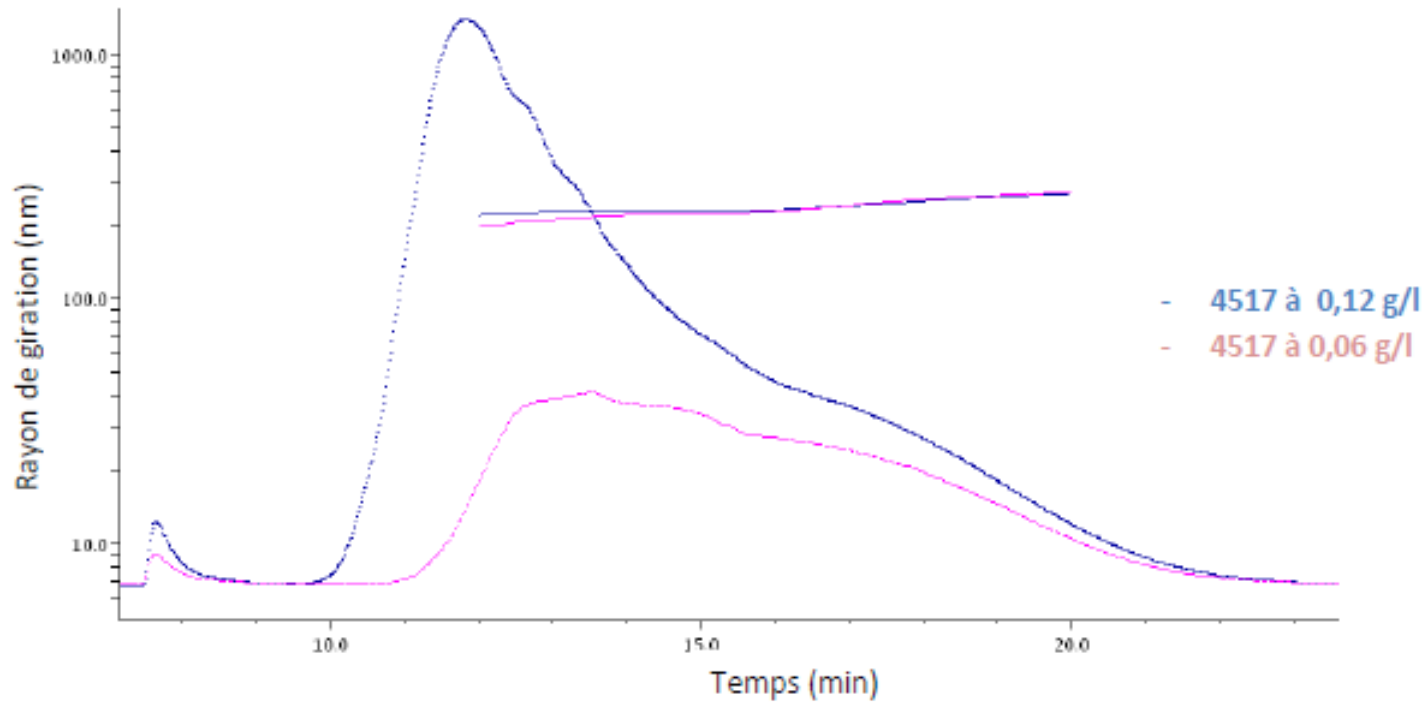
Ex : *Cas des polymères*

La **concentration d'enchevêtrement c^*** peut être rapidement atteinte (focalisation) : les polymères enchevêtrés sont élués plus tard que le polymère isolé, ce qui entraîne un élargissement ou un décalage du pic vers les forts temps de rétention.

Une **concentration maximale d'injection** peut être évaluée grâce à la relation simple : λc^* .

Effet de la concentration en échantillon

Overloading : effet de la concentration



Amidon cationique

7- Optimiser le flux croisé \dot{V}_c

$$R(\%) \geq 70\%$$

2 objectifs principaux en A4F :

- ❖ Obtenir des distributions en taille à partir du temps de rétention
- ❖ Séparer plusieurs composants d'un mélange

Théorie de l'A4F plus simple avec un flux croisé constant

- 1- Essayer de travailler à **flux croisé constant** tout au long de l'élution
- 2- Si le rendement, la sélectivité et la rétention ne sont pas acceptables : faire varier le flux croisé en maintenant constant le flux d'entraînement.

Flux croisé trop important \Rightarrow risques d'interactions avec la membrane ou pics très larges

- Si **l'objectif est une distribution de taille** et pas d'amélioration en changeant le flux croisé :

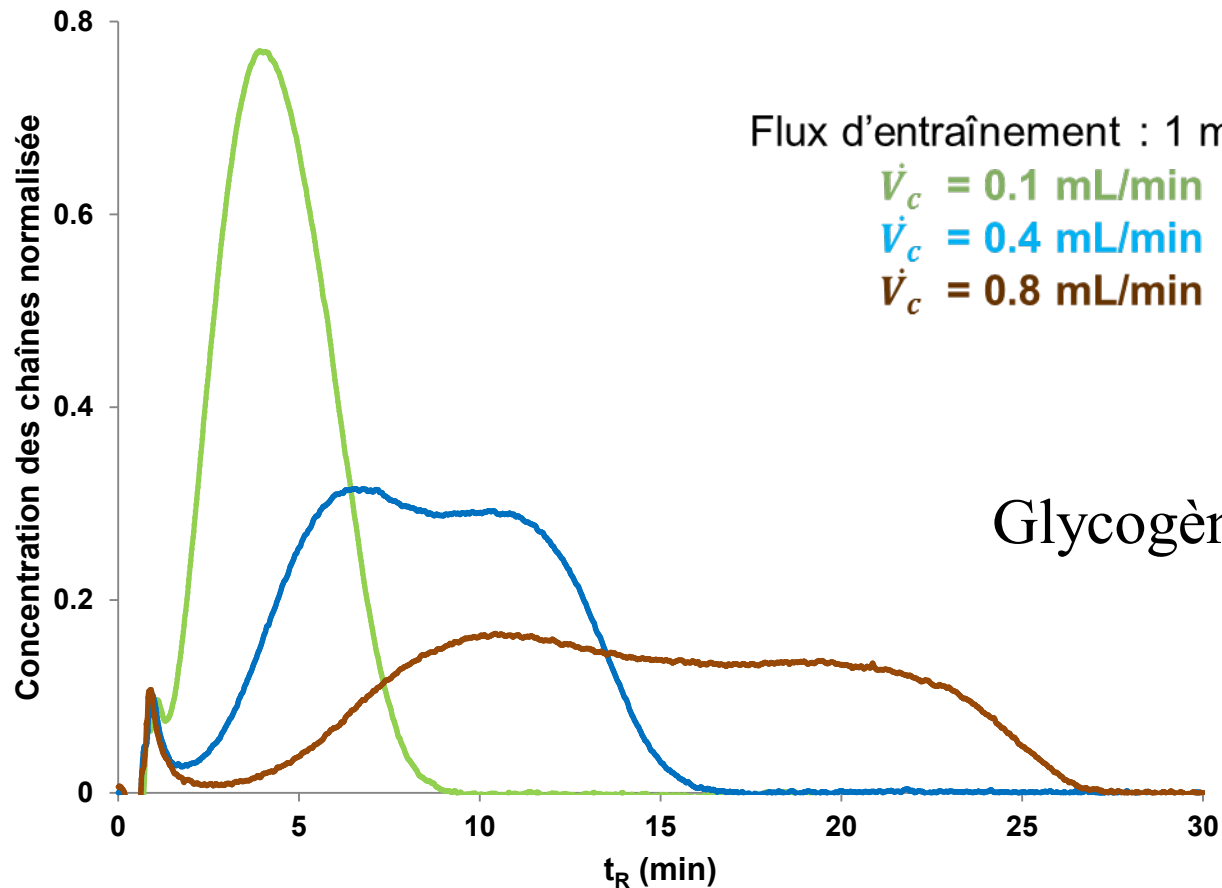
ω non approprié \Rightarrow changer le **spacer** (cf étape 3), $\omega \nearrow t_R \nearrow$

- Si **l'objectif est plutôt la résolution de différents composés** et pas d'amélioration en changeant le flux croisé :

Utiliser un **programme d'élution avec un gradient de flux croisé**

\Rightarrow meilleure séparation entre 2 populations (échantillons polydisperses) avec une résolution acceptable (ex : $R_s > 1$).

Effet du flux croisé \dot{V}_c



Amélioration de la sélectivité

3.2. Obtention d'une distribution en taille ou en masse

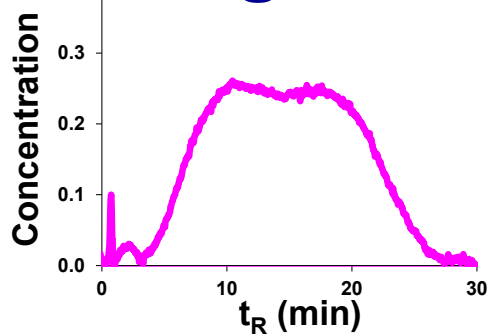
Obtention d'une distribution en taille ou en masse

La détermination d'une distribution en taille est importante pour les échantillons tels que :

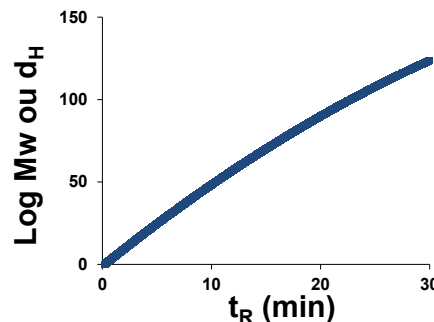
- ☞ Les suspensions colloïdales (particules de dimensions et densités variables)
- ☞ Les macromolécules complexes (macromolécules polydisperses et/ou branchées, agrégats protéiques, acides humiques, etc...)
- ☞ Les nanoparticules (liposomes, etc...)

Transformer le fractogramme en distribution

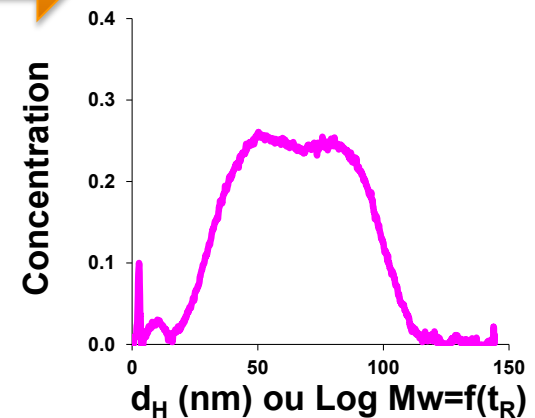
Fractogramme



Calibration



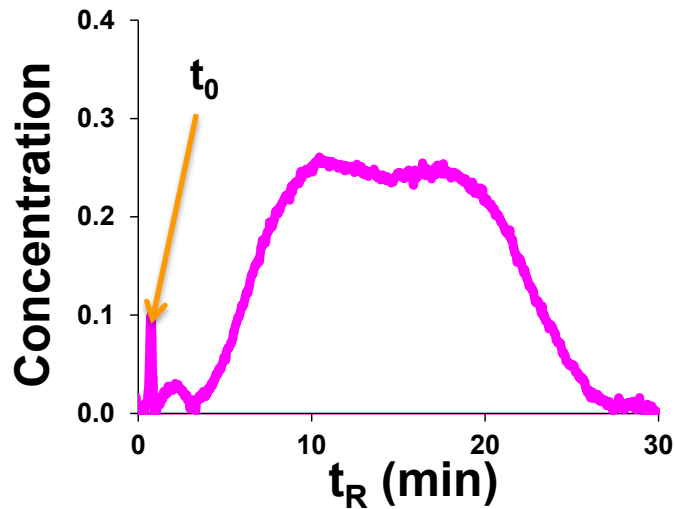
Distribution



Fractogramme

Choix de la fenêtre de temps correspondant à la bande d'éluion de l'échantillon.

Démarrage après le pic correspondant au **temps mort (t_0)**

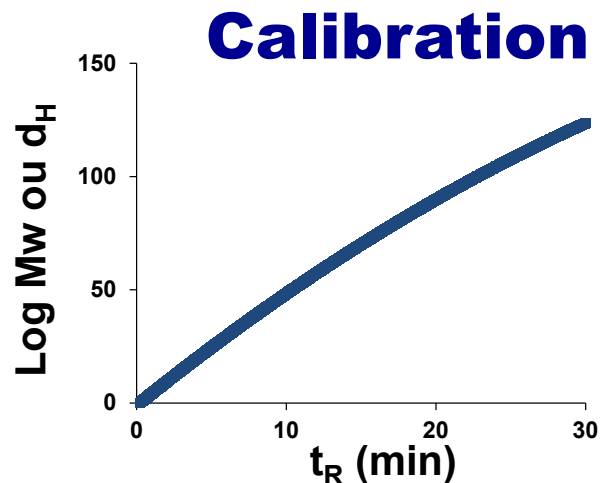


Détermination de la relation taille (ou Mw) temps de rétention

❖ Détecteurs permettant de déterminer d_H ou R_H et M_w (MALLS, QELS)

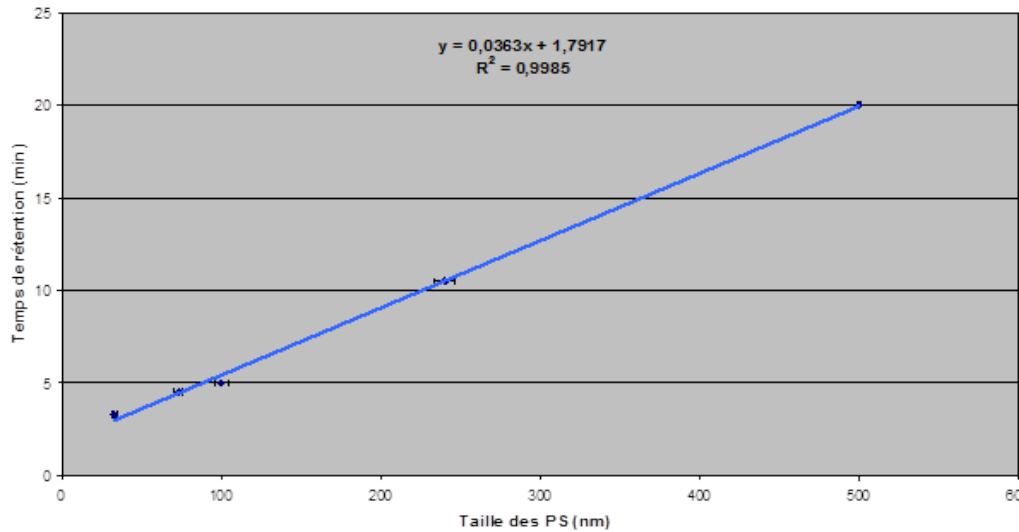
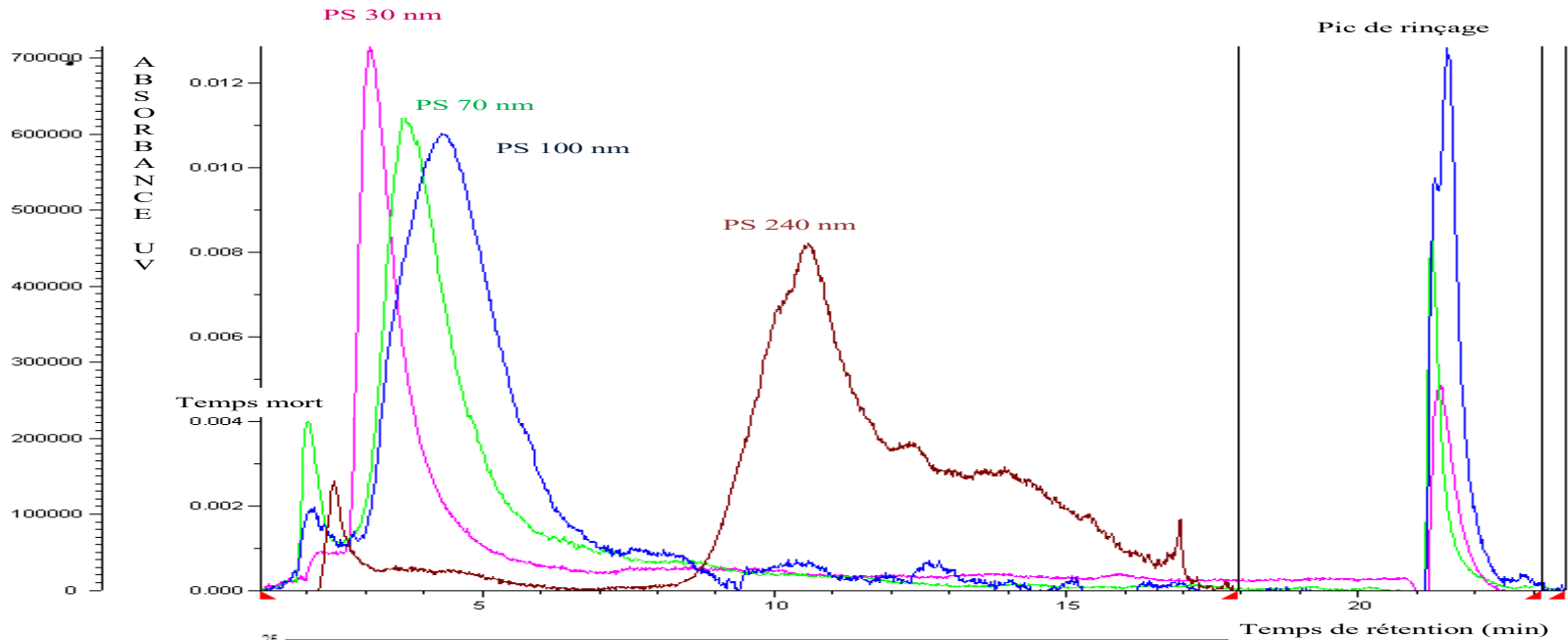
❖ Calibration en d_H ou R_H et M_w en utilisant une série d'étalons monodisperses de d_H ou M_w connus (sphères latex, pullulans).

❖ Calcul



Courbe de calibration (étalons monodisperses)

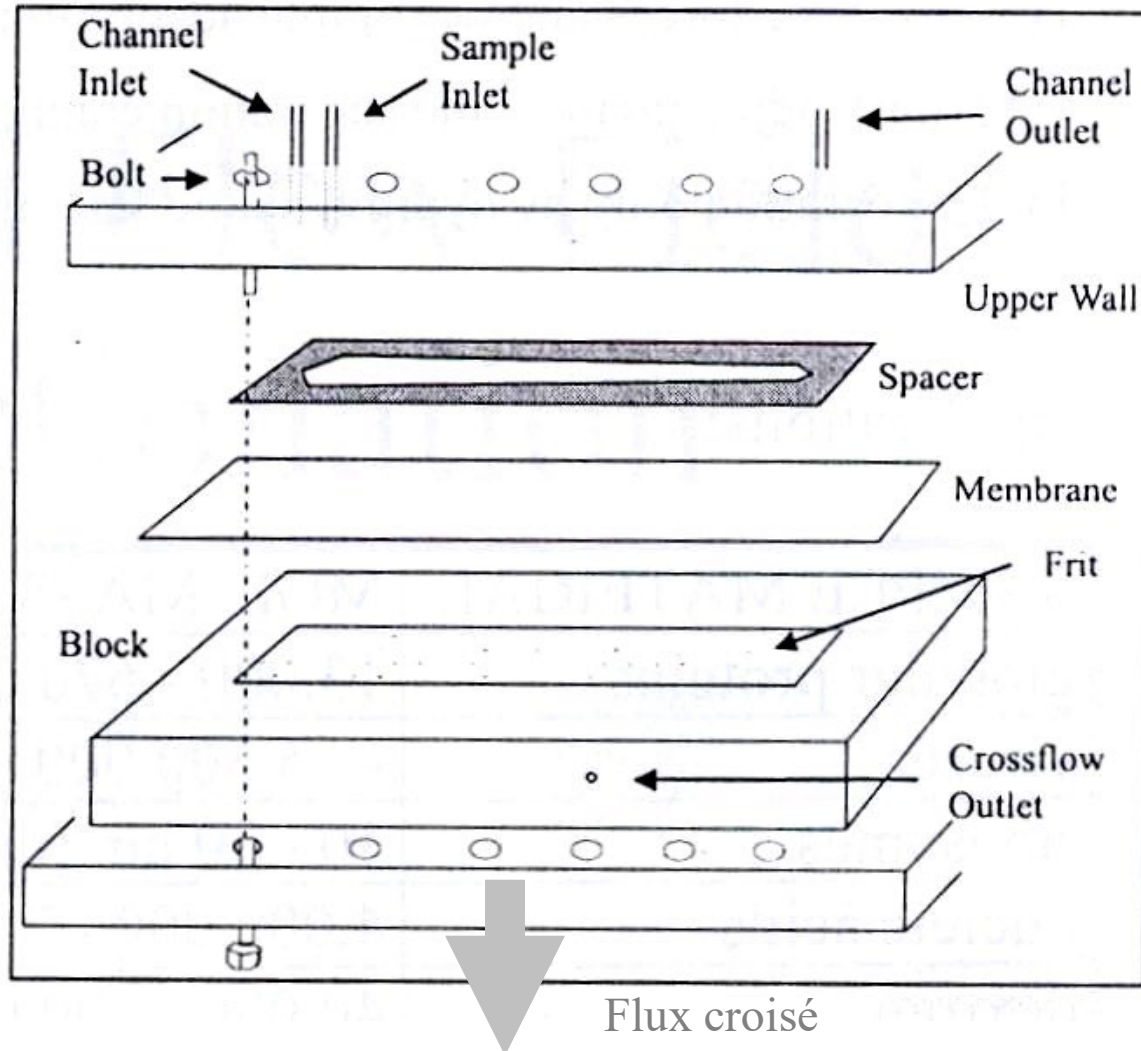
Analyse des particules de polystyrène (PS)



3.3. L'appareillage en Flow FFF

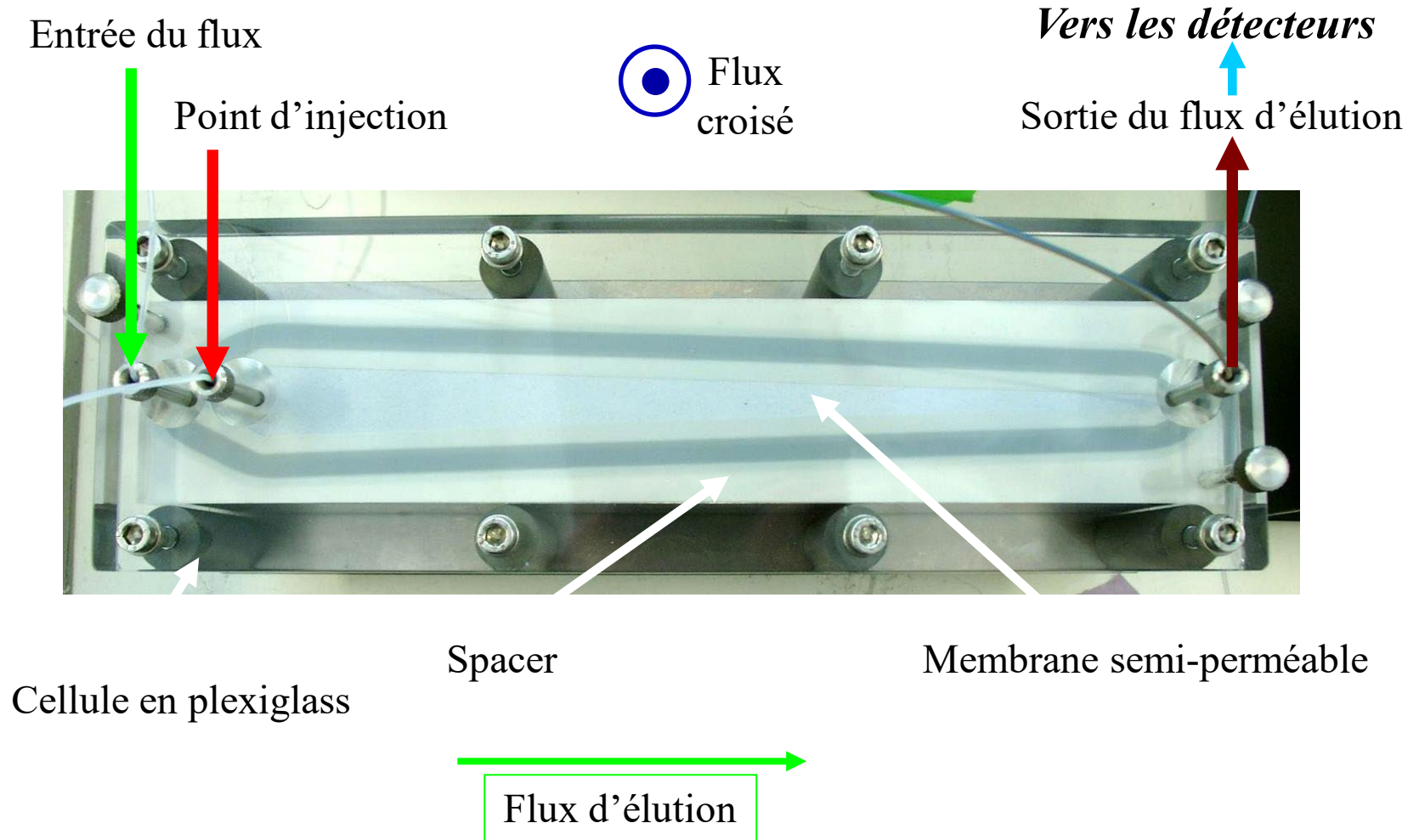
AFFFF : CELLULE DE FRACTIONNEMENT

VUE dans l'épaisseur

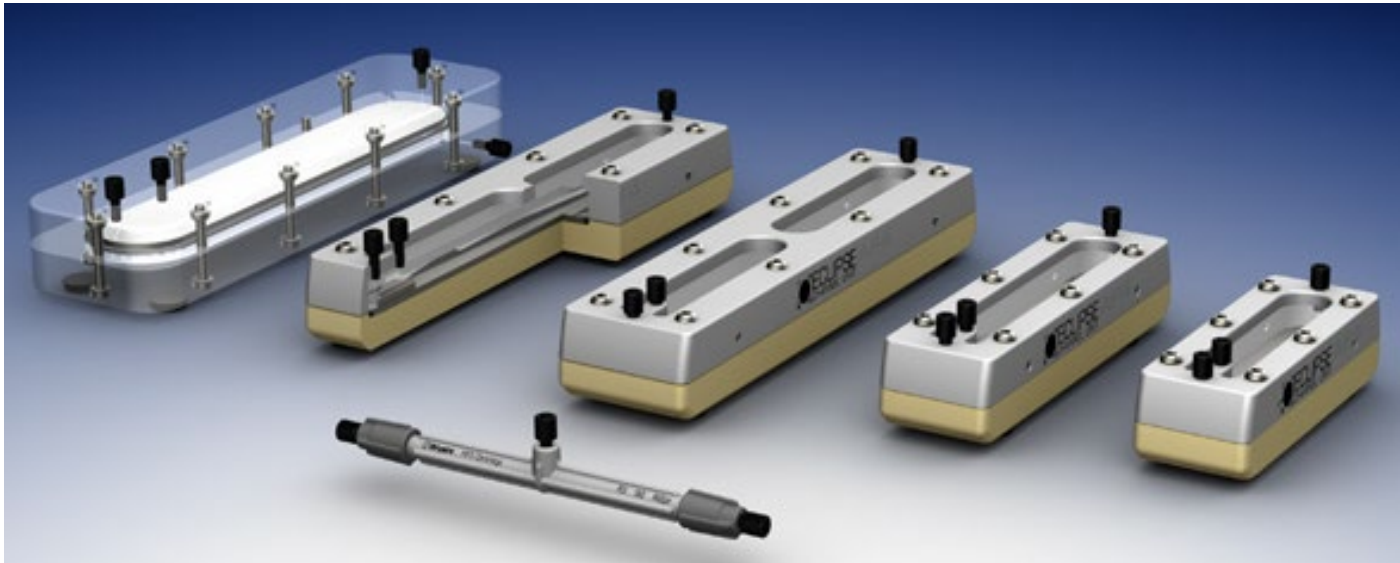


AFFFF : CELLULE DE FRACTIONNEMENT

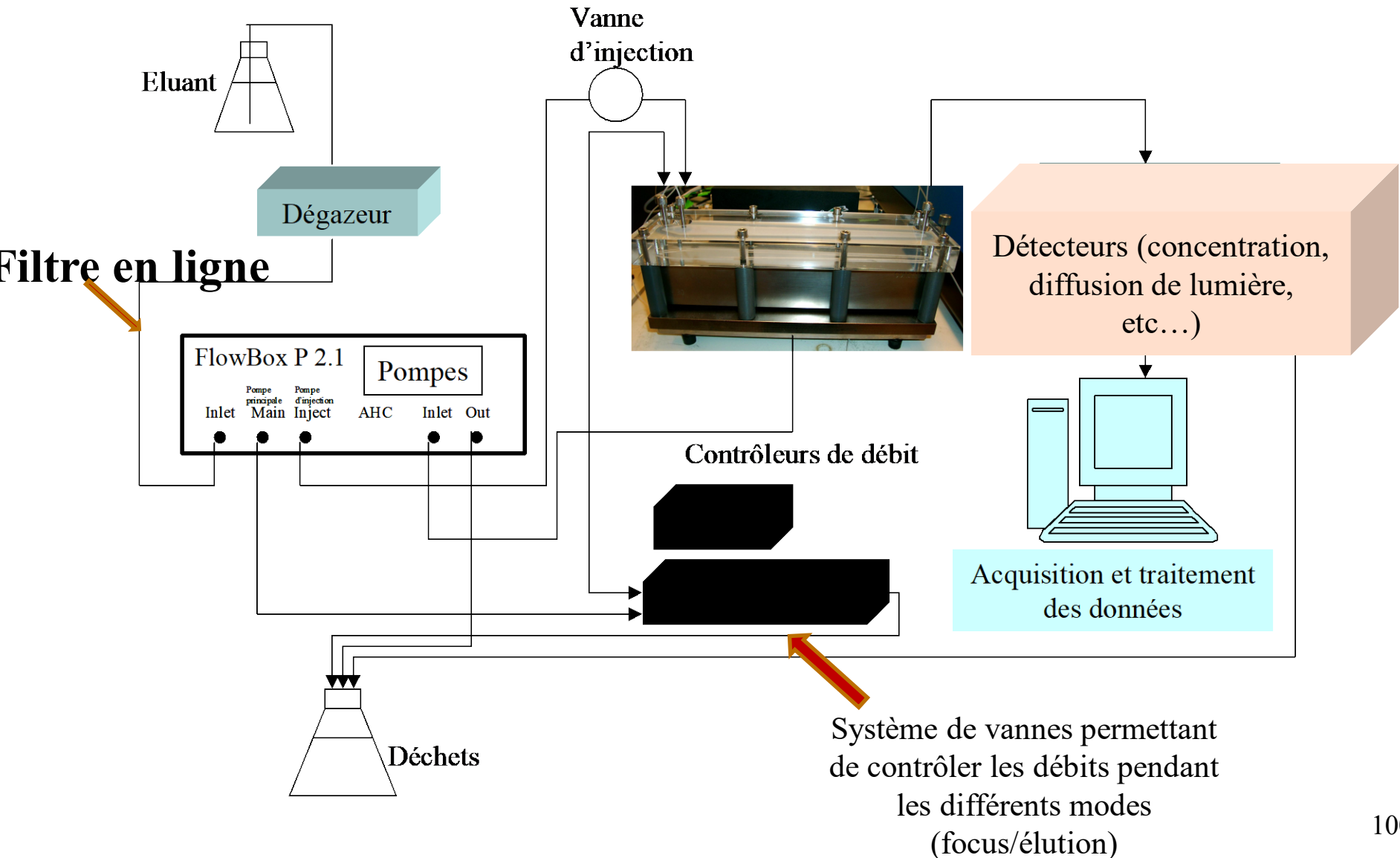
VUE de haut



Exemples de canaux de A4F



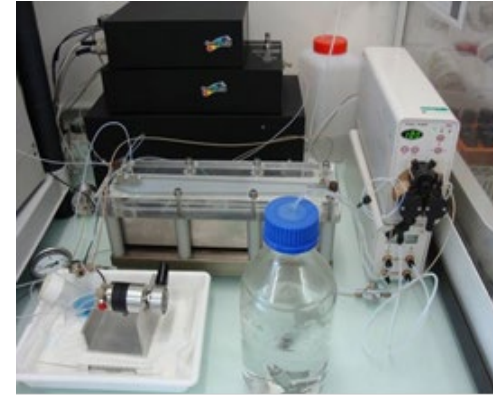
Montage d'un système de A4F



Flow FFF : Appareillages commerciaux



CONSENXUS (Allemagne)



POSTNOVA (Allemagne)



WYATT Technology (Allemagne)





4. Quelques exemples d'applications

Sommaire

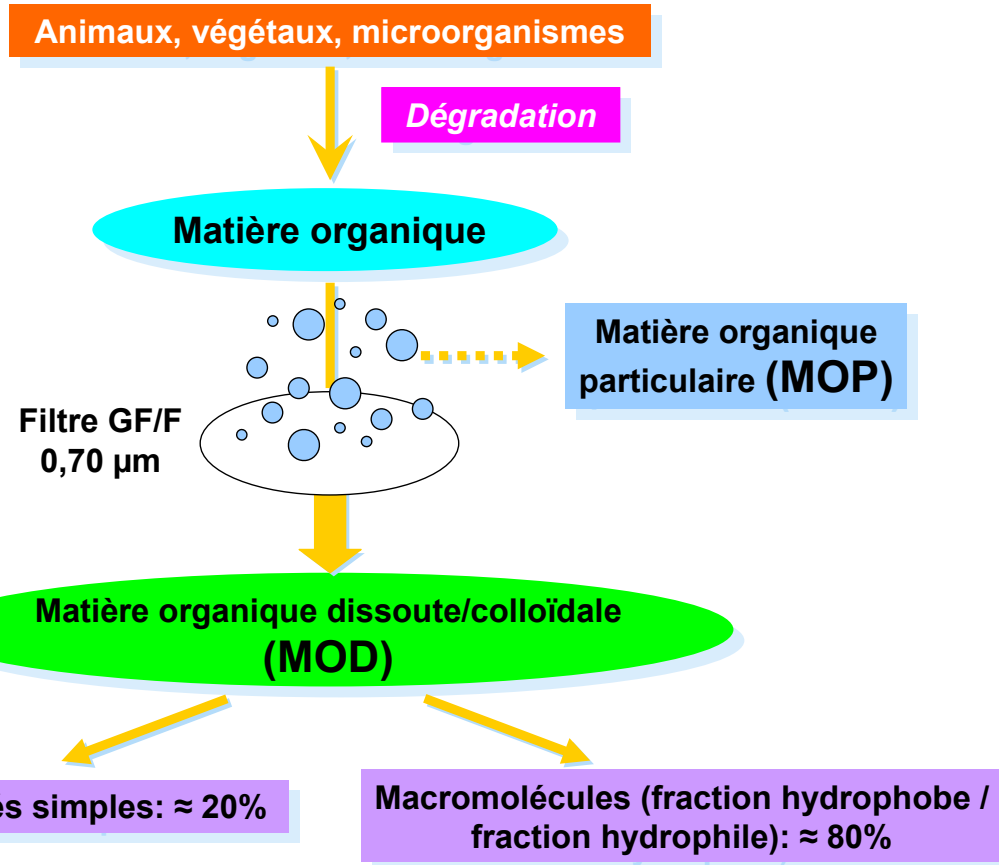
- 3.1. colloïdes environnementaux dans les milieux aquatiques naturels***
- 3.2. Les micro/ nanoplastiques***
- 3.3. les applications en santé***



6.1 colloïdes environnementaux dans les milieux aquatiques naturels



La matière organique dissoute dans les environnements aquatiques



Origines en milieu aquatique

Autochtone naturelle

:

provenant du biote présent dans le milieu (algues, bactéries, macrophytes...)

Allochtone naturelle :

issue des sols

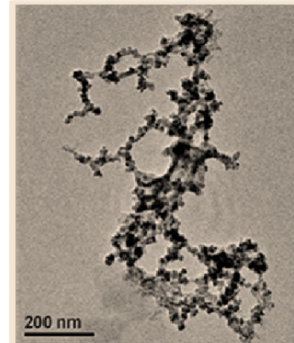
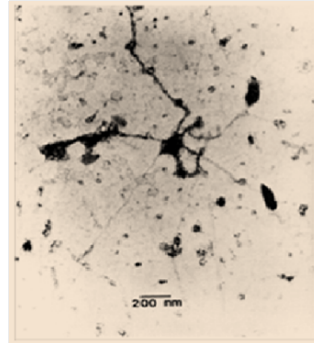
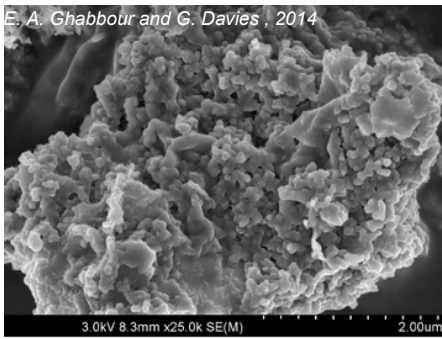
Allochtone

anthropique : rejets

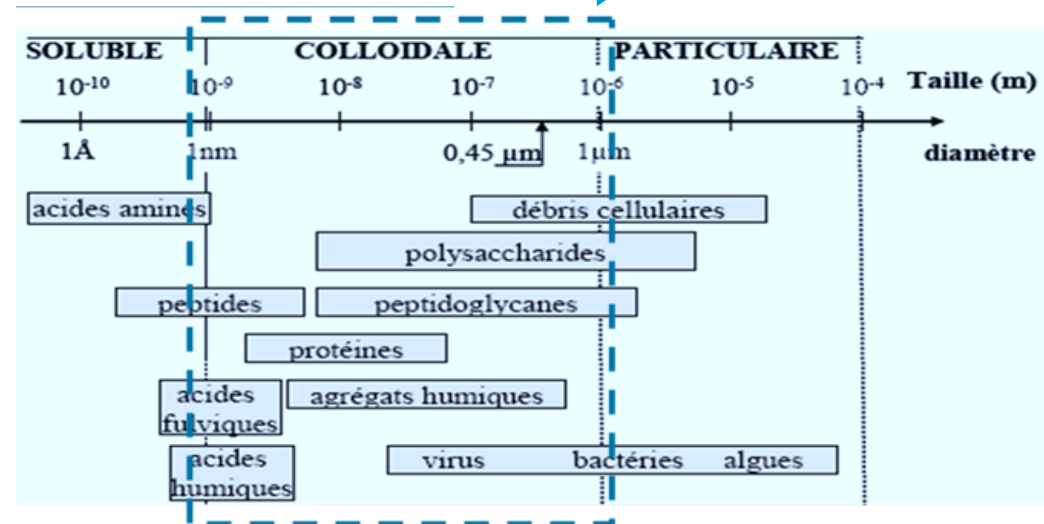
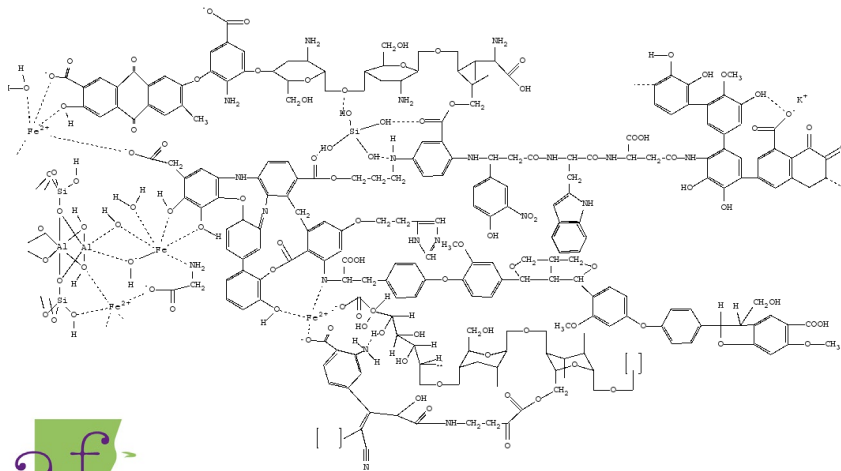


La matière organique dissoute dans les environnements aquatiques

E. A. Ghabbour and G. Davies, 2014

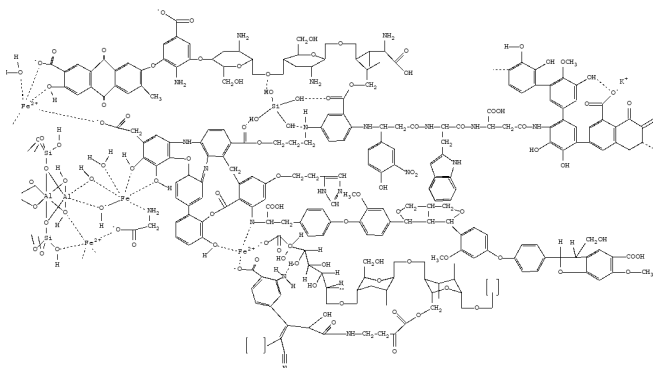


Les colloïdes naturels: des macromolécules entre 1 nm et 1 μm.





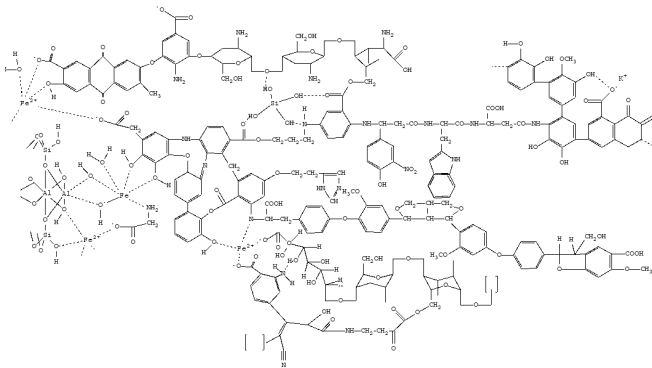
La matière organique dissoute dans les environnements aquatiques



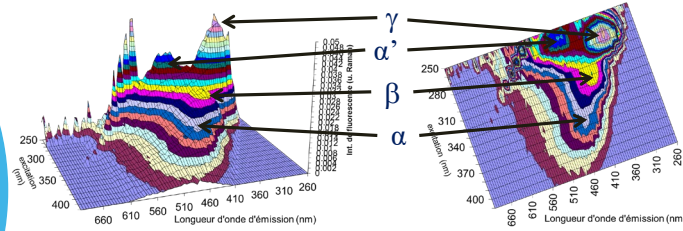
Grande complexité
-milieu
environnementaux
-hétérogénéité des
colloïdes



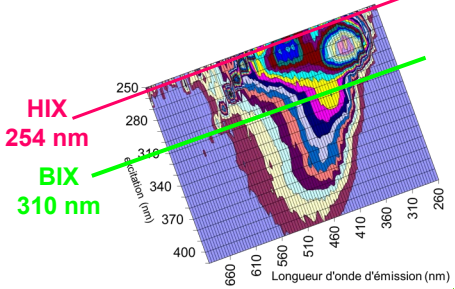
La matière organique dissoute dans les environnements aquatiques



Grande complexité
-milieu environnementaux
-hétérogénéité des colloïdes

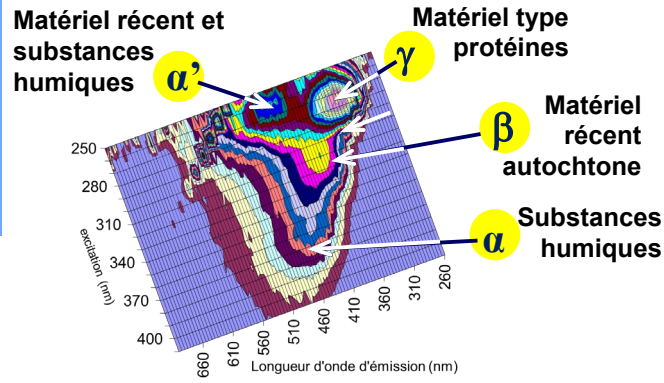


HIX: Indice d'humification
aromaticité, maturité de la MOD



BIX: Production autochtone récente
MOD récente, activité biologique

Spectroscopie de fluorescence
Caractérisation globale de la MOD en milieux aquatiques

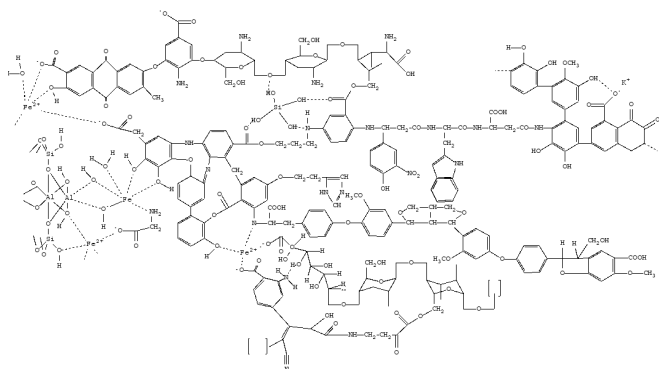


Intensité du signal = Concentration en MOD fluorescente
Type de bande = Type de matériel organique fluorescent
Indices de fluorescence = Source et maturation de la MOD





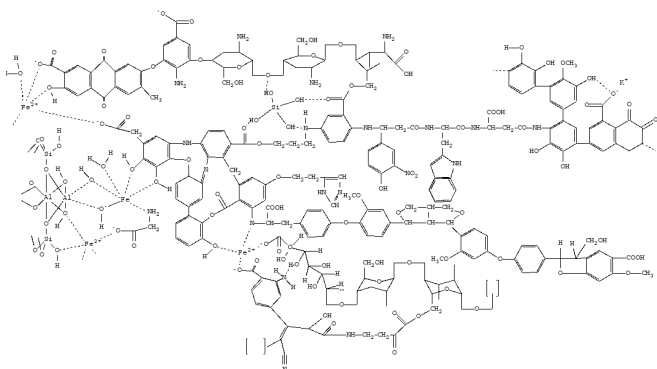
La matière organique dissoute dans les environnements aquatiques



Grande complexité
-milieu
environnementaux
-hétérogénéité des
colloïdes

Rôle crucial pour
les processus
- physiques
- chimiques
- biologiques
dans
l'écosystème

La matière organique dissoute dans les environnements aquatiques



Grande complexité
-milieux
environnementaux
-hétérogénéité des
colloïdes

Rôle crucial pour
les processus

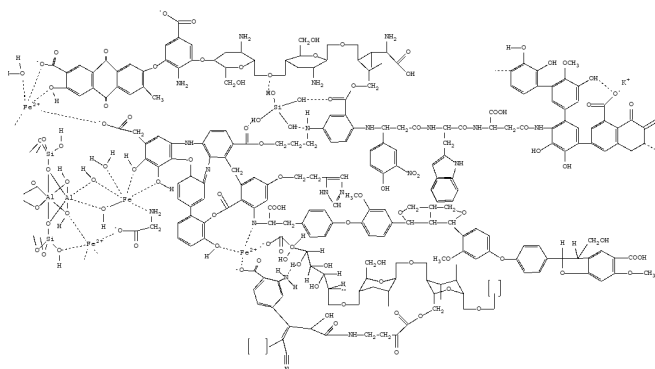
- physiques
 - chimiques
 - biologiques
- dans
l'écosystème

Interaction
avec les polluants

- répartition
dissous /
particulaire
- solubilité
- biodisponibilité



La matière organique dissoute dans les environnements aquatiques



Grande complexité
-milieux
environnementaux
-hétérogénéité des
colloïdes

Rôle crucial pour
les processus

- physiques
 - chimiques
 - biologiques
- dans
l'écosystème

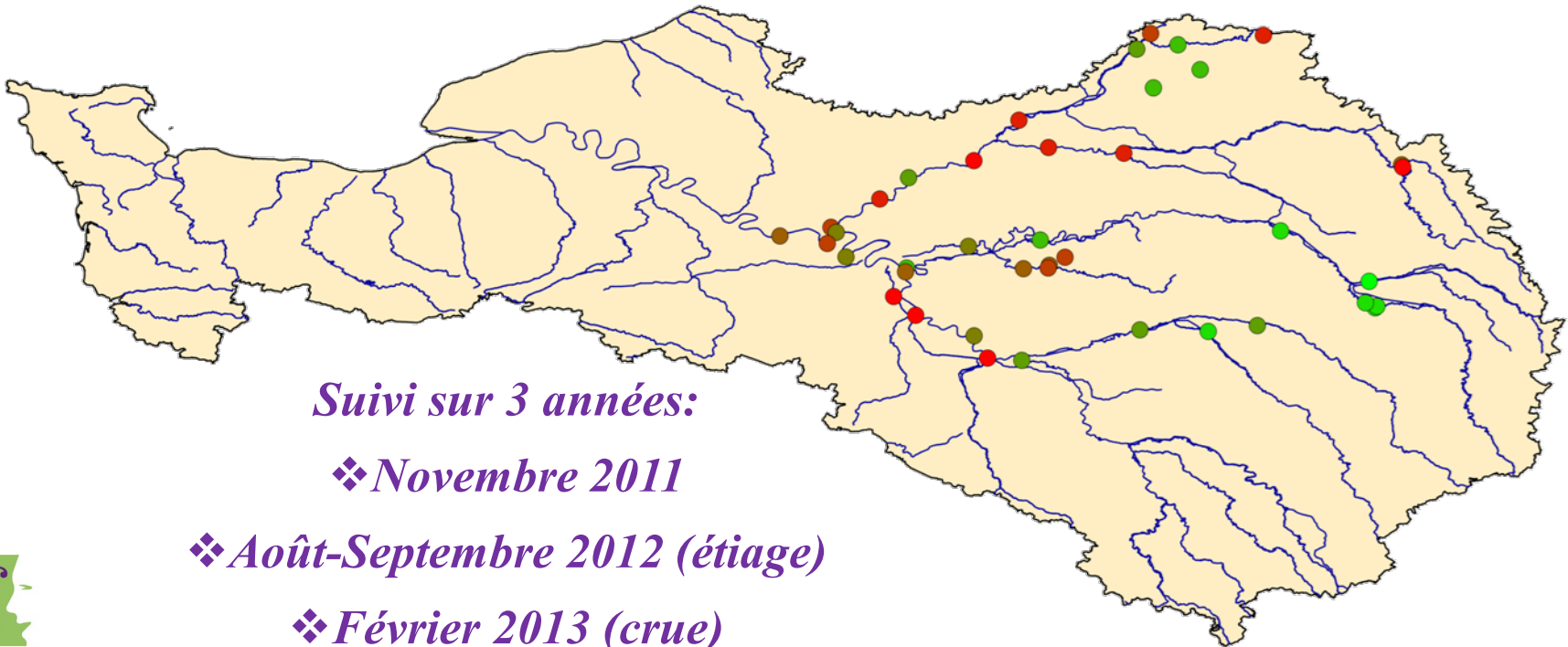
Interaction
avec les polluants

- répartition
dissous /
particulaire
- solubilité
- biodisponibilité

Propriétés de la matière organique liées à la taille des molécules

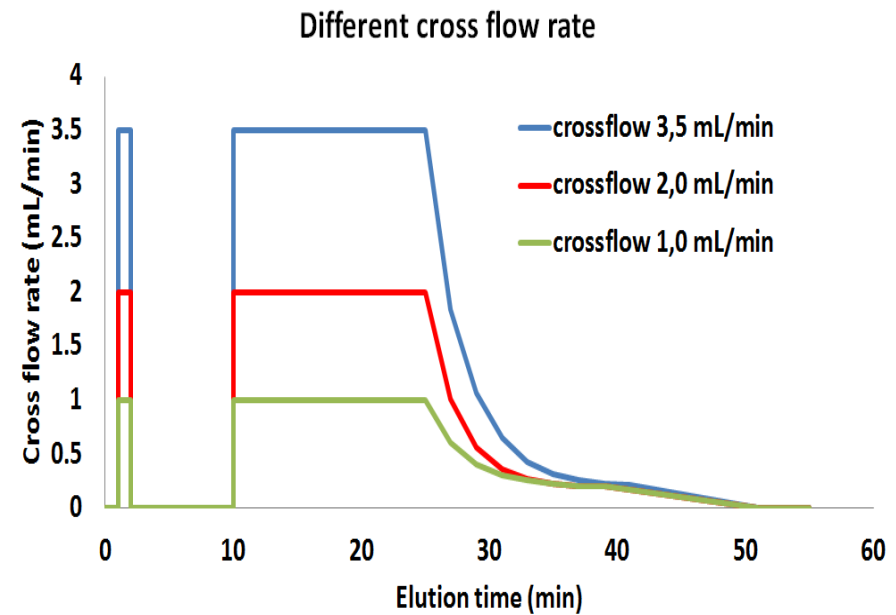
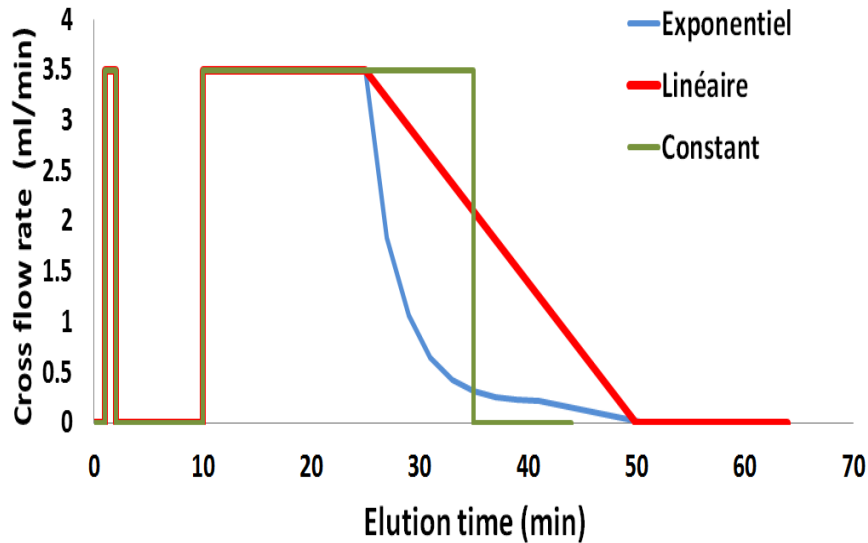


Application à l'étude des colloïdes environnementaux dans le bassin versant de la Seine

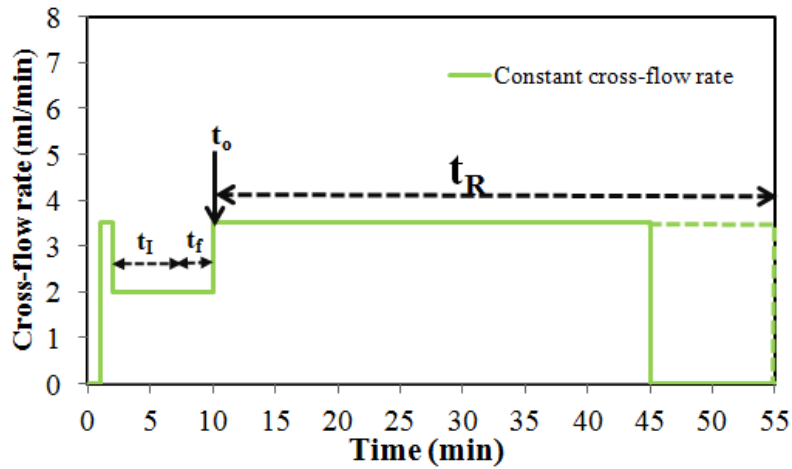
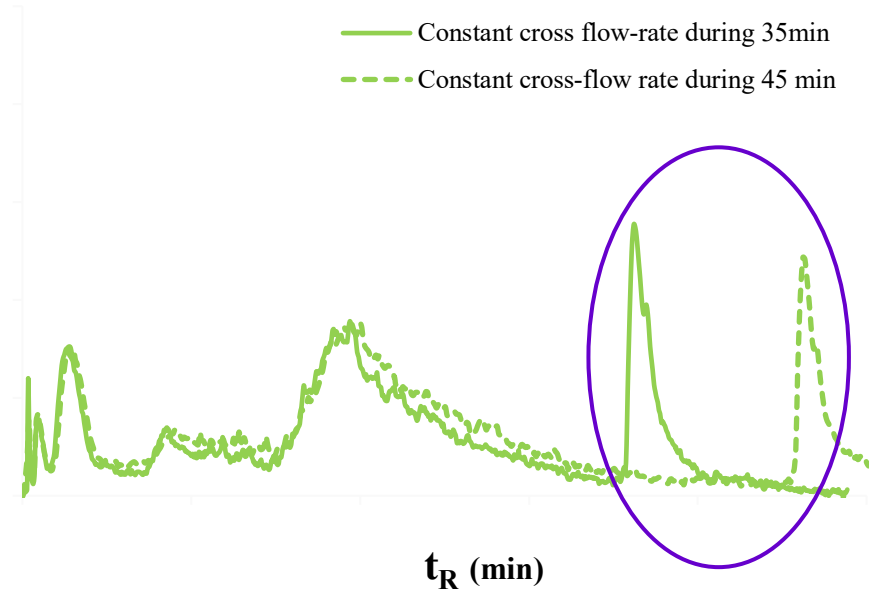




Optimisation du flux croisé

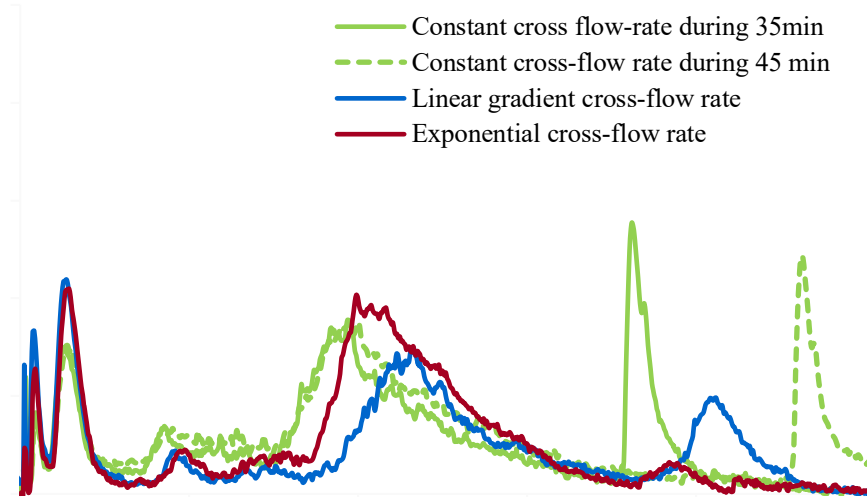
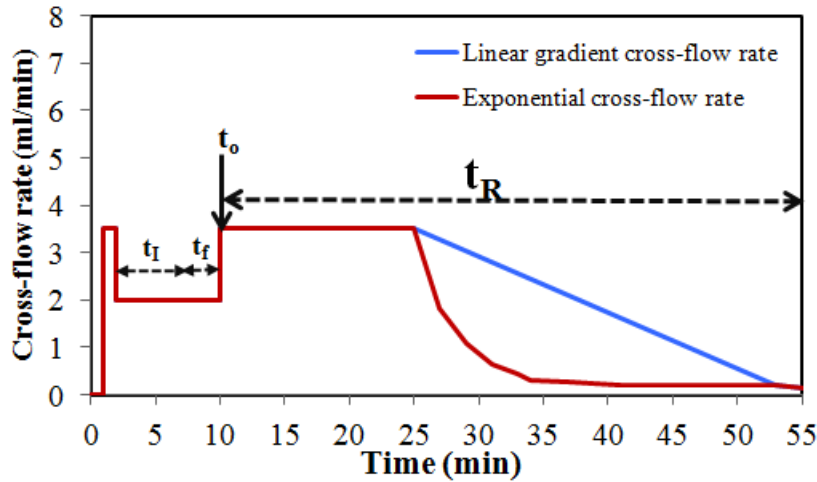


Optimisation du flux croisé

 a_{280} (nm^{-1})

Elution après la fin de l'analyse de composés en quantité non négligeable

Optimisation du flux croisé



➔ Gradient de flux croisé: amélioration de la séparation des plus grosses molécules

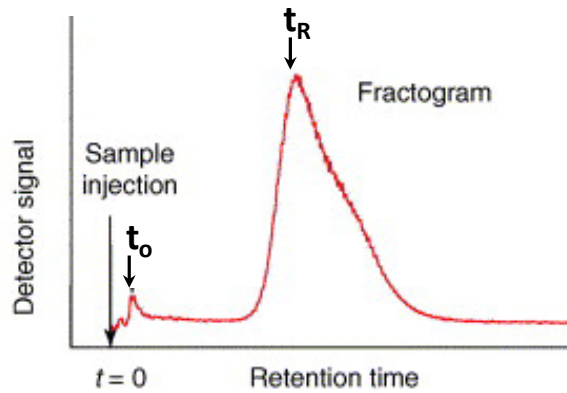


Conditions retenues:

Flux croisé constant pendant 15 min puis gradient exponentiel jusqu'à 0.2 ml/min en 28 min



Optimisation du flux croisé



$$t_R = \frac{\omega}{6D} \ln\left(1 + \frac{V_c}{V_p}\right)$$

t_R : retention time (min)

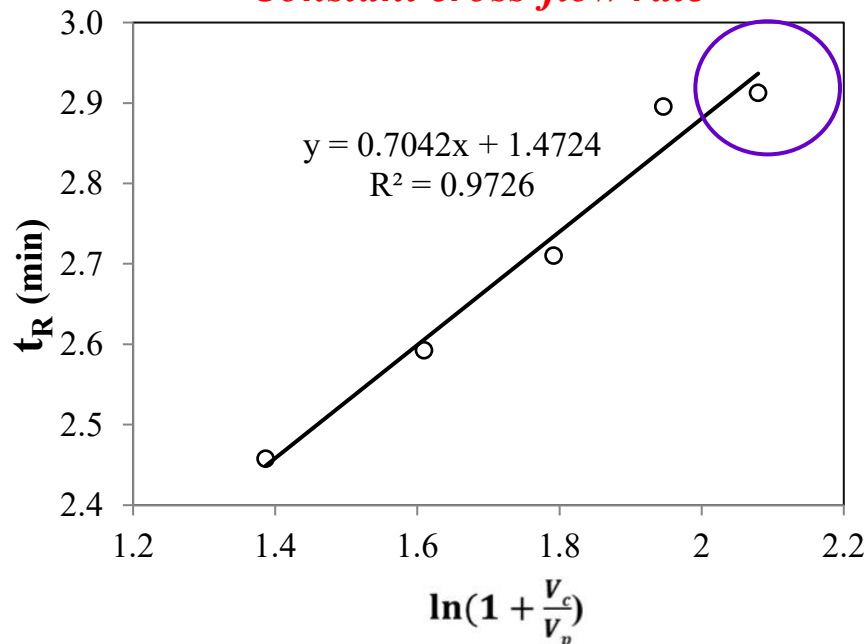
ω : channel thickness (m)

V_c : cross-flow rate (ml/min)

V_p : channel/detector flow (ml/min)

D : diffusion coefficient (m^2/s)

Constant cross-flow rate

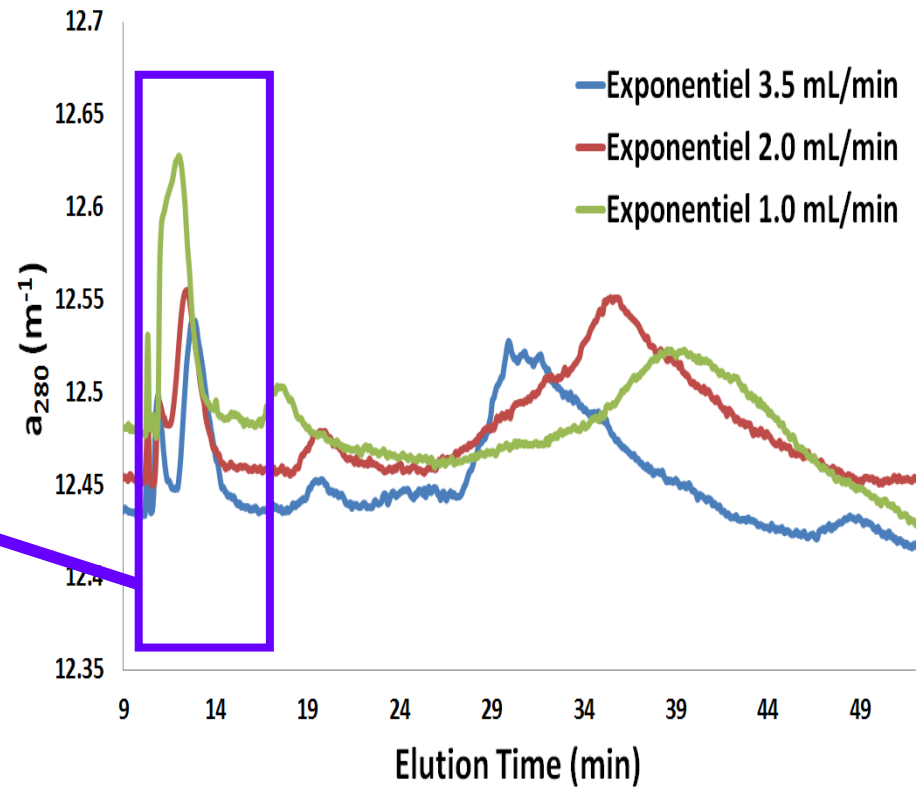
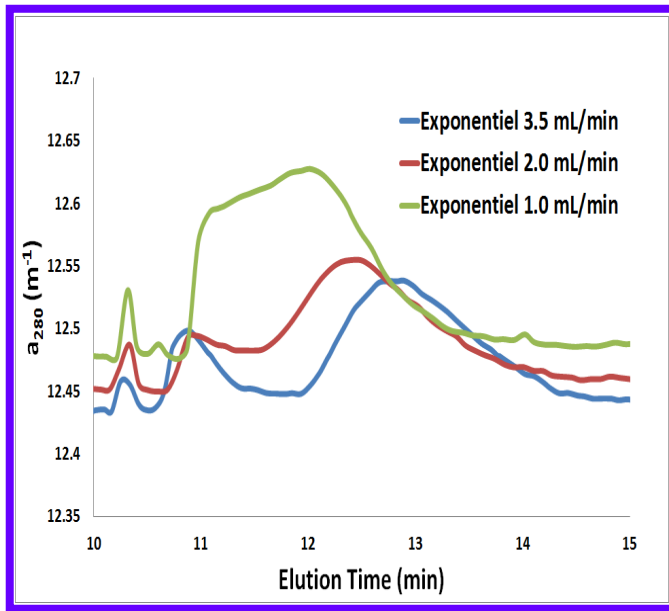
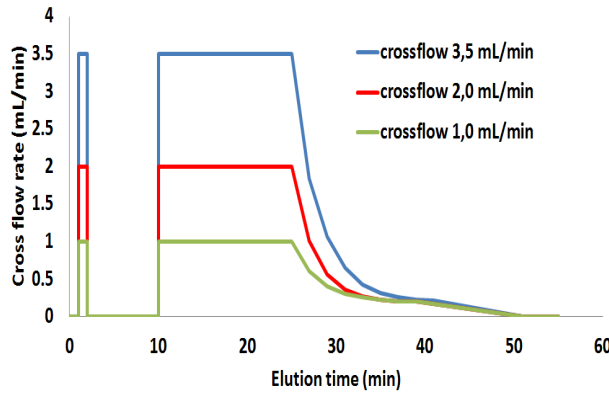


Augmentation du flux croisé:
meilleure résolution pour la
séparation des plus petites
molécules de MOD.



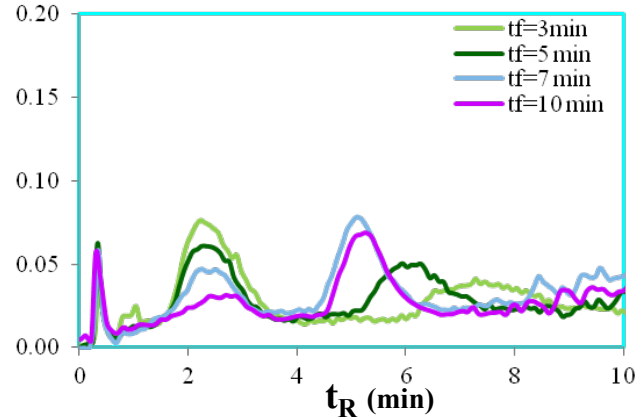
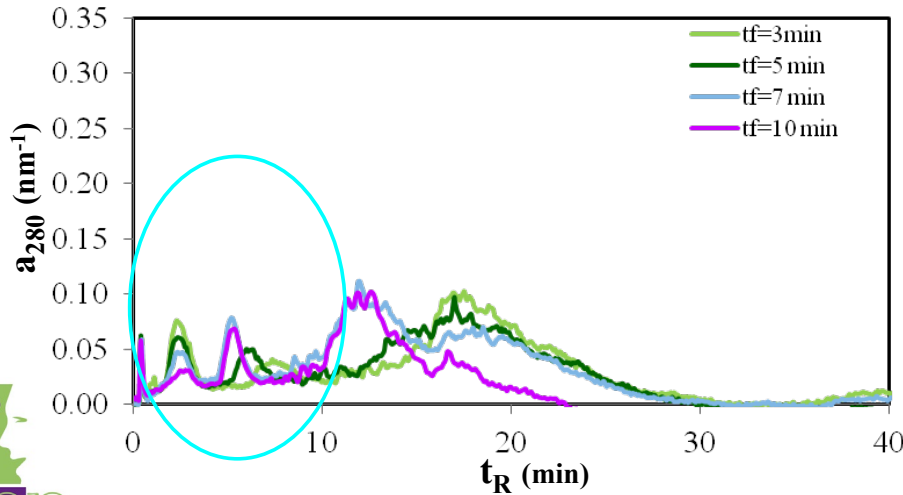
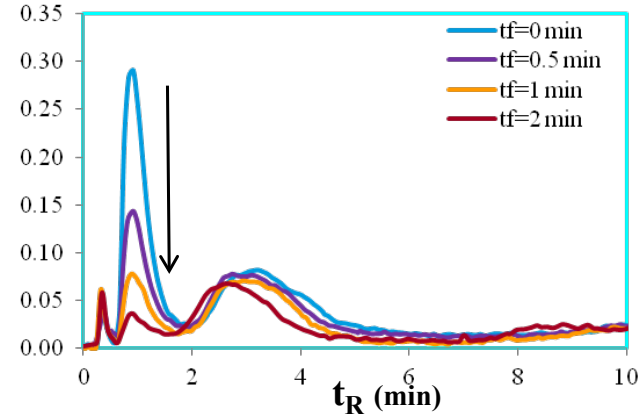
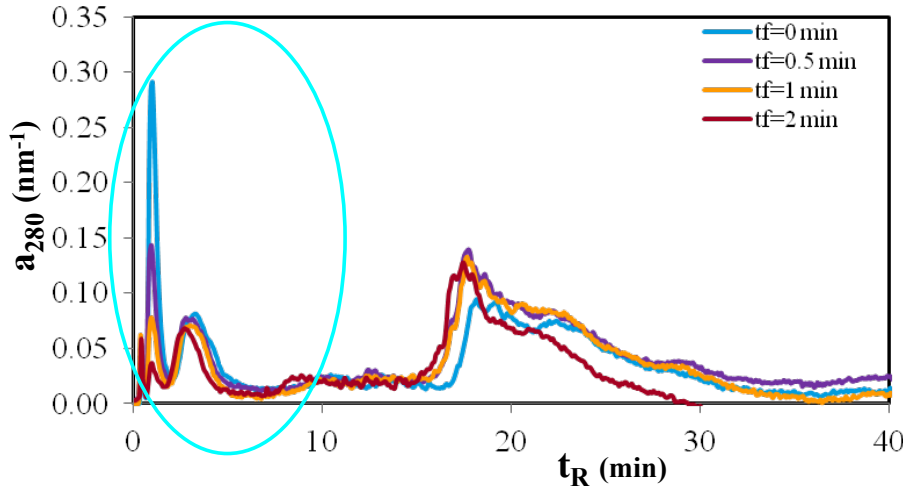
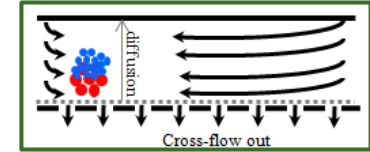
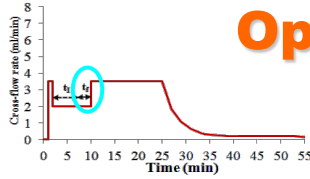
Optimisation du flux croisé

Different cross flow rate



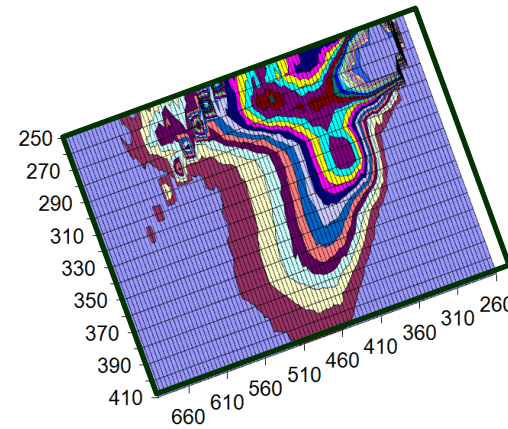
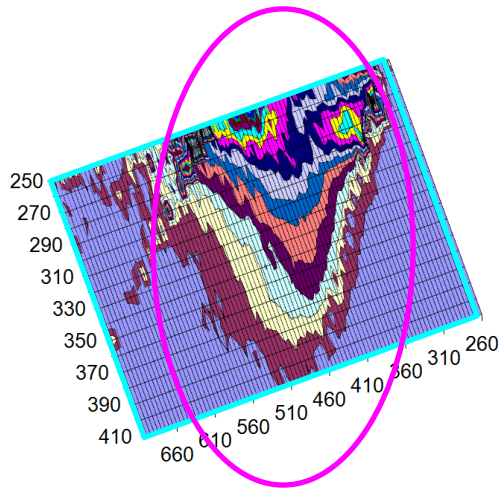
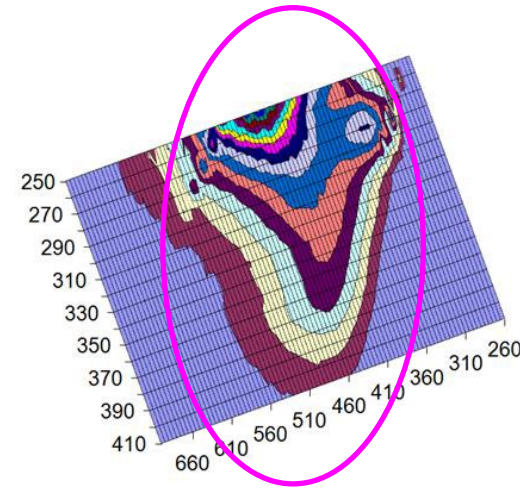
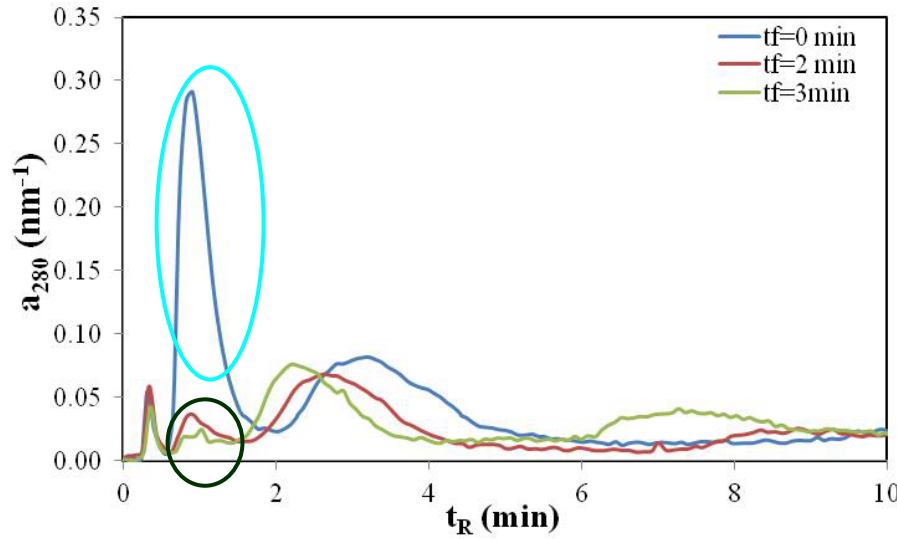
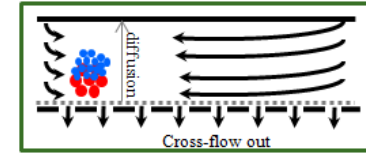
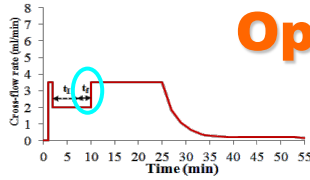


Optimisation du temps de focus





Optimisation du temps de focus

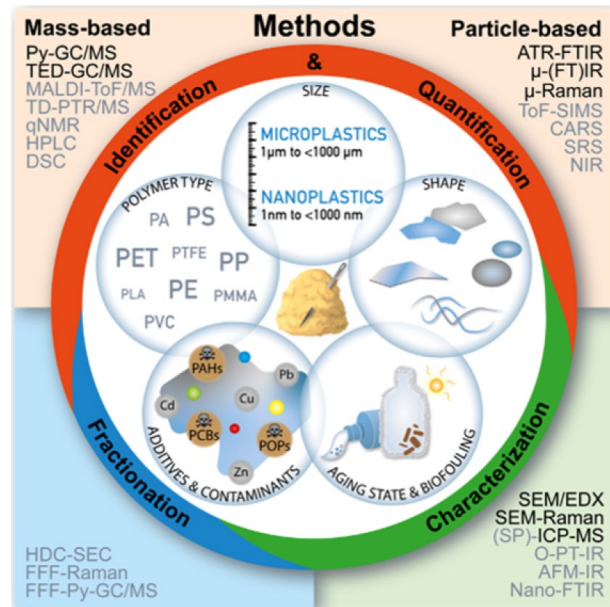




6.2 les nano/microplastiques

DEVELOPING CORE CAPABILITIES ON MICRO-NANO-PLASTICS : METHODOLOGICAL AND METROLOGICAL NEEDS

- ❑ Lack of appropriate **methods** for **sampling, sample processing, identification and quantification**
 - ❑ **Quantitative data** are still scarce and questionable: measurement protocols are not harmonized, nowadays difficult interpretation and comparability of the measurement values, no reliable data available for risk assessment
 - ❑ Importance of methodological development for the **characterisation of nanoplastics**
- ❑ Lack of **metrological traceability** - especially for NPLs - to guarantee standardisation and comparability of the results
 - ❑ Lack of representative **reference materials**
 - ❑ Need for procedures which allow the measurement in **complex matrices, preserving the MPs characteristics** during sample preparation, which is a major source of measurement uncertainty
 - ❑ Absence of **key comparisons and pilot studies**

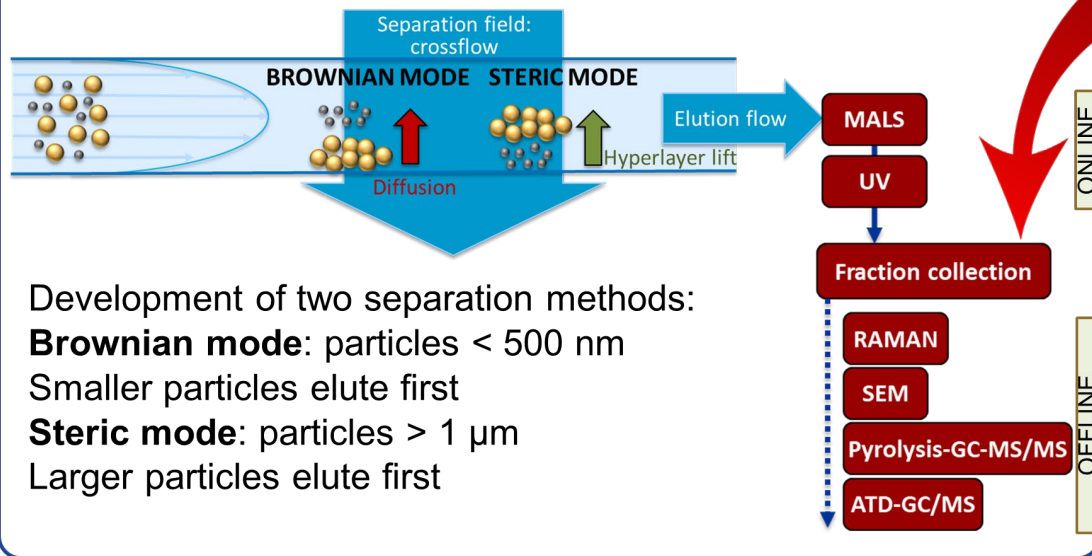


Ivleva, 2021, Chemical Reviews

DEVELOPING CORE CAPABILITIES ON MICRO-NANO-PLASTICS : METHODOLOGICAL AND METROLOGICAL NEEDS

OUR ANALYTICAL TOOLBOX

Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)
DOUBLE MODE + online/offline multi-detection (MD)



Development of two separation methods:
Brownian mode: particles < 500 nm
 Smaller particles elute first
Steric mode: particles > 1 μm
 Larger particles elute first

ANALYTICAL CHALLENGE

Development of
cleaning/preconcentration
procedures
post-fractionation

MICROPLAST
Project



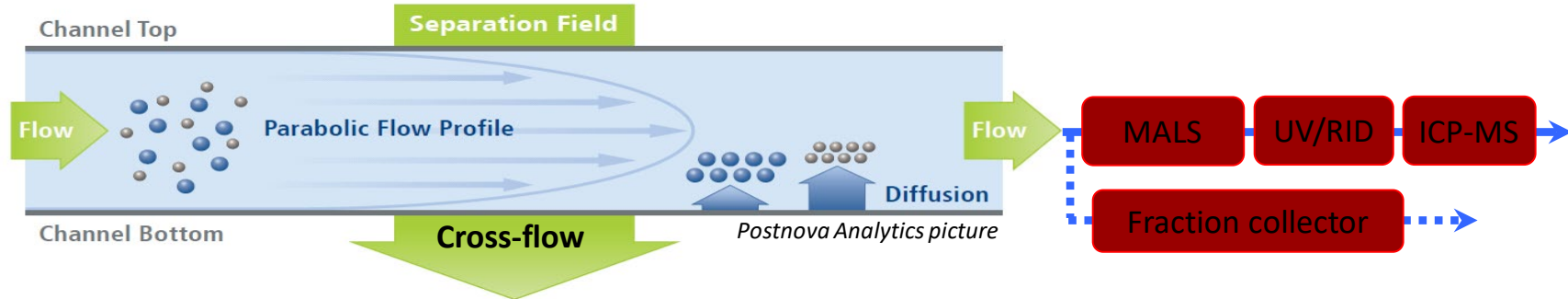
FOCUS ON FRACTIONATION TECHNIQUES IN PLASTIC TRACE



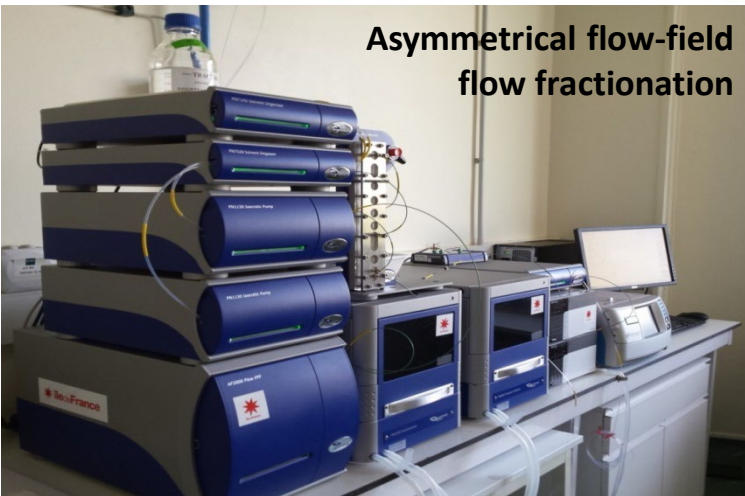
- Development of fractionation methods based on different FFF systems, **AF4 with Smart Stream Splitting (S3), CF3 and/or Gravitational SPLITT**, suitable for separation of mixtures of SMP/NP (<10 μm)
- The performance of FFF-based sample preparation strategies will be compared with **nanoscale filtration**:
 - silicon filters with pore sizes down to 1 μm
 - aluminium oxide filters with pore size down to less than 10 nm
- Development of correlative approaches, such as **AF4/MALS/PTA**, for potentially simultaneous multi-parameter characterization of SMPs/NPs (<10 μm)
- Development of **sample preparation methods for SMPs (<10 μm) and NPs (<0.1 μm) in food matrices** of an increasing complexity, preliminary to application of FFF methods
- Comparison with sample filtration strategy as an alternative to FFF



AF4-MD (multi-detector) platform



Asymmetrical flow-field
flow fractionation



✓ Coupled with different detectors, information on:

size, size distribution, shape, elemental composition and concentration...

✓ Coupled with fraction collector, possibility of off-line analyses with complementary techniques:

Microscopy (SEM, AFM, TEM), pyrolysis GC-MS/MS, spectroscopy (RAMAN, μ FT-IR), ICPMS, sp-ICPMS...

Information on : size, morphology, composition...



6.3 les applications en santé



EXEMPLE 1 : liposomes pour l'alpha thérapie

Exemples d'applications



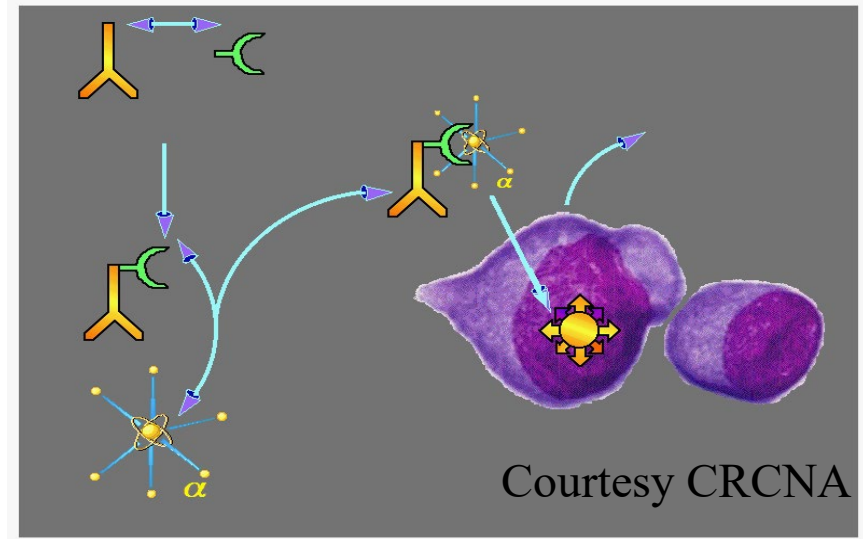
I. Scope and purpose

Nuclear Medicine: Field of medicine using radioactive isotopes for diagnosis and/ or therapy

Isotopes:

- Emitter γ : ^{99m}Tc , ^{201}Tl , ^{111}In , ...
- Emitter β^+ : ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{82}Rb , ^{68}Ga , ^{64}Cu ..
- Emitter β^- : ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ...
- Emitter α : ^{223}Ra , ^{213}Bi , ^{211}At , ...

Uses: cancerology, cardiology, neurology ...



Vectorization: target the cancerous cell either for imaging or therapy

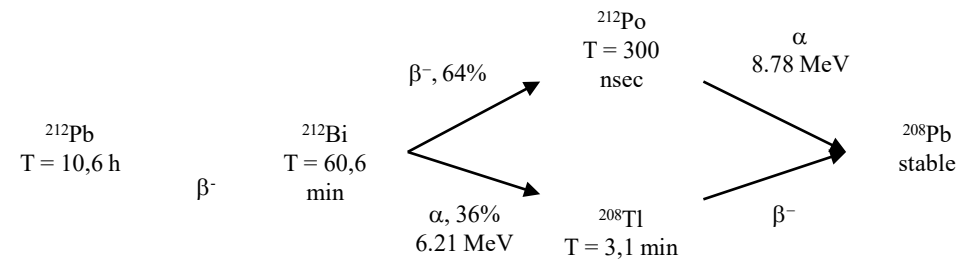
I. Scope and purpose

High toxicity: killing tumors which resist to γ / β^+ rays or chemotherapy !

High LET : allow to target micro-metastasis.

Suitable candidates :

potential candidates	Half-life	α Energy in MeV
^{212}Bi	60 min	6,207
^{225}Ac	10 d	5,935
^{213}Bi	45,6 min	5,982
^{223}Ra	11,4 d	5,979
^{256}Fm	20,1 h	7,027
^{211}At	7,21 h	5,982



^{212}Pb / ^{212}Bi generator

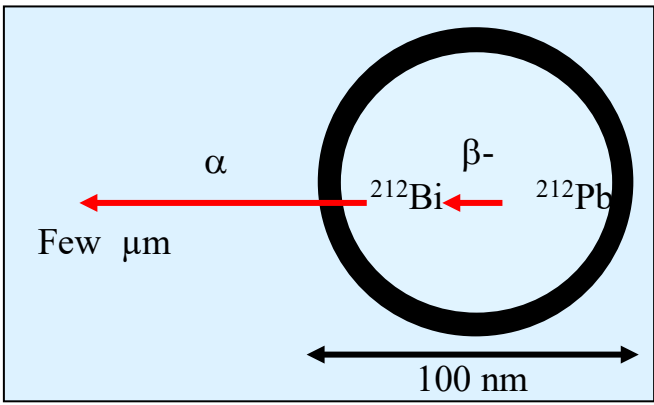
^{212}Bi = α emitter BUT short half life

Use of the father RN: ^{212}Pb ($T_{1/2} = 10.6\text{h}$)
decays *in vivo* to ^{212}Bi

II. Experimental set-up

vectorisation agents: liposomes

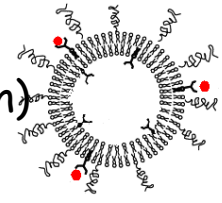
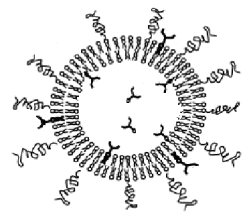
Interest : allows to retain ^{212}Bi after the radioactive decay



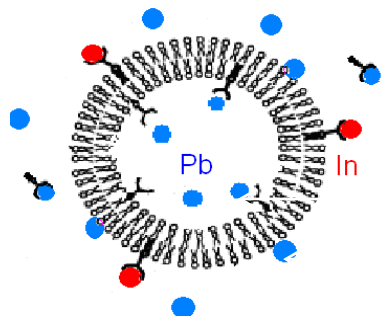
$E_{\text{recoil}} (\text{Pb/Bi}) = 1 \text{ eV}$
Recoil distance = 75 nm
Too low to eject Bi

Characteristics :

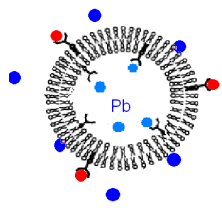
- size : 100 nm
- presence of organic ligands (DTPA) at the surface to complex Bi and Pb
- PEG (polyethylene glycol) chains at the surface to enhance *in vivo* circulation
- Surface labeling with In (antibody recognition)



II. Experimental set-up

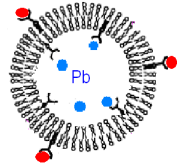


Free Pb
 complexe Pb-X
 Encapsulated Pb
 Pb adsorbed at the surface of liposomes



a. Active Encapsulation of Pb

b. Purification onto chelex

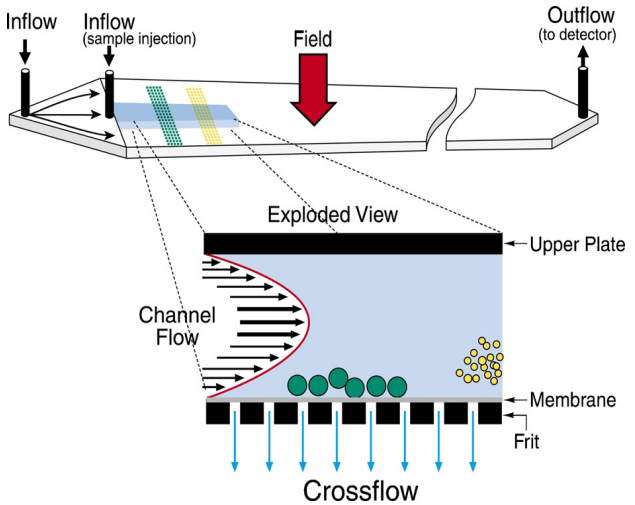


Encapsulation rate

In vitro stability study
 in serum by AF4



AF4



Size information (integrity)

γ detector

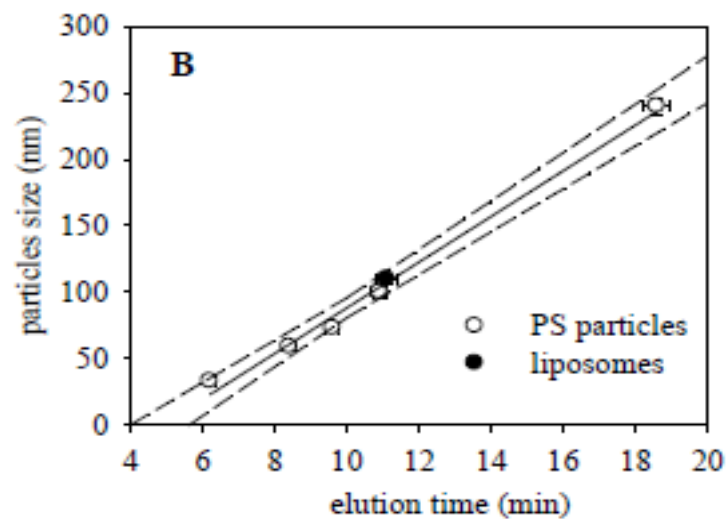
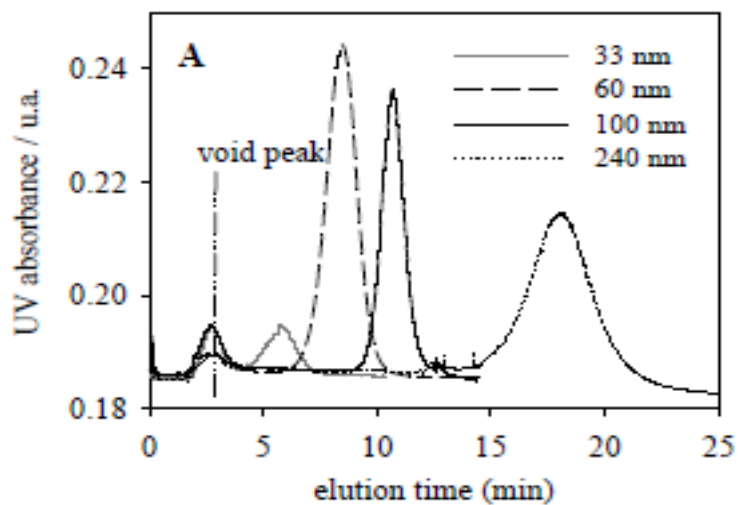


Radioactive information

- PS : DL and QL

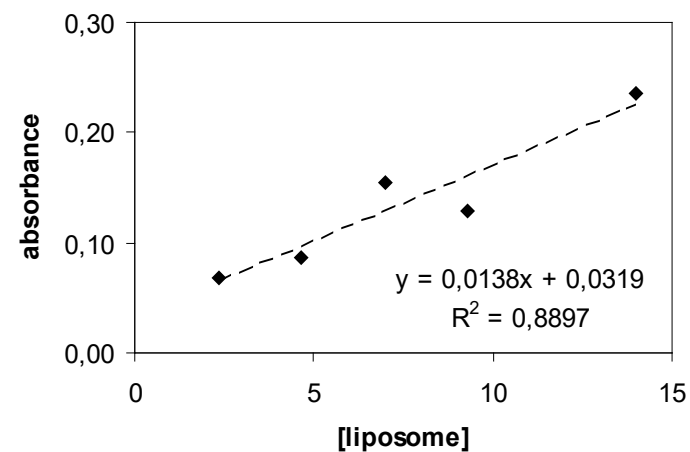
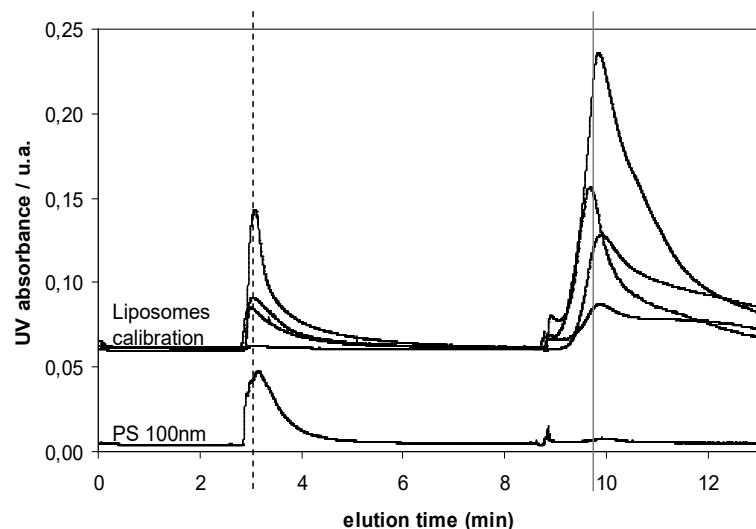
	DL ($\mu\text{g/mL}$)	QL ($\mu\text{g/mL}$)
PS 33	111,34	334,02
PS 73	88,89	266,66
PS 100	37,22	111,66
PS 240	15,45	46,35

- liposomes



From Moon et al. [*Journal of chromatography A*, 1998, 813, 91-100], the suitable ionic strength for liposomes elution should be 0.016 M.

Good agreement between the measured liposomes diameter and the the calculated diameter with equations of AF4



DL : 1 mmol/mL
QL : 5 mmol/mL

Liposomes recovery was determined by a measurement of the collected fraction of total organic carbone total (TOC VCSH Shimadzu).

Recovery of the liposomes > 85 % after AF4 analysis

III.2. Calibration of the γ detector

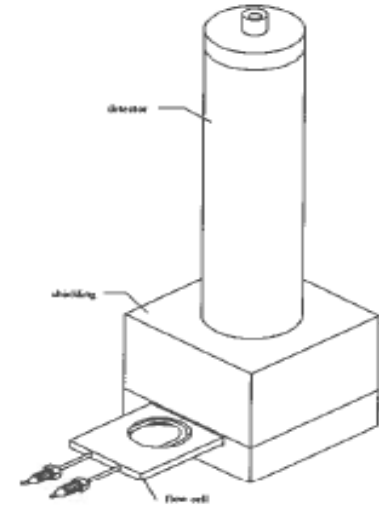
γ -detector GabiStar (Raytest, Germany) - NaI detector

2 detection cells available : 5 and 250 μL respectively

Simultaneous acquisition on 2 windows of energies

-one for ^{212}Pb ($E_\gamma = 238.6 \text{ keV}$, 43.6%)

-one for ^{212}Bi ($E_\gamma = 727.3 \text{ keV}$, 6.7%)



In our experiment , only 1 window: 80 keV - 2000keV

Cell chosen = 250 μL .

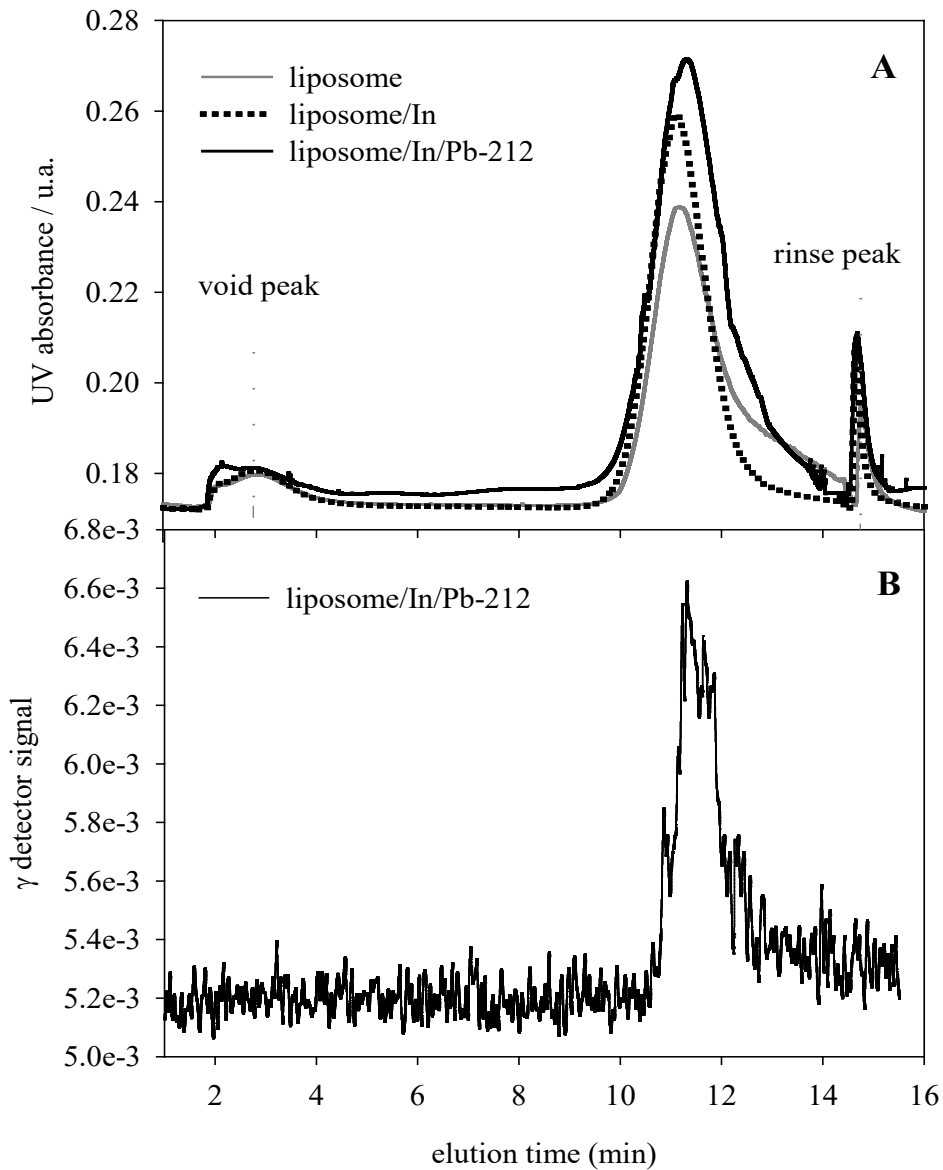
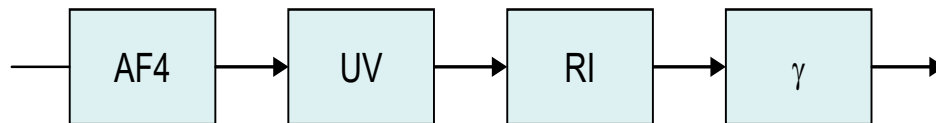
Activity = 100 Bq *i.e.* 10^{-15} mol Vs 1Bq/L with Ge detector

Activity used for the radiolabeling = 500 Bq

Injected activity for the patient 100 MBq

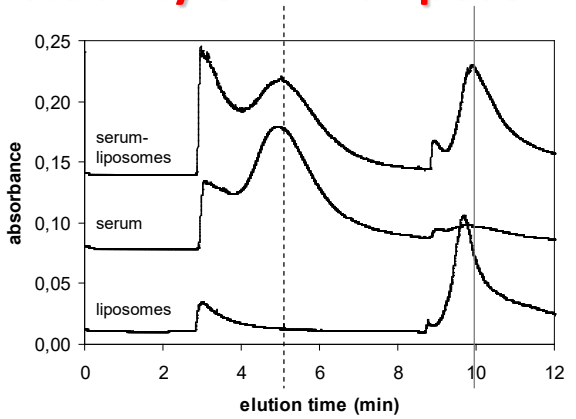
Nuclear Medicine

III. 3. Feasibility of the AF4- γ for ^{212}Pb -liposomes

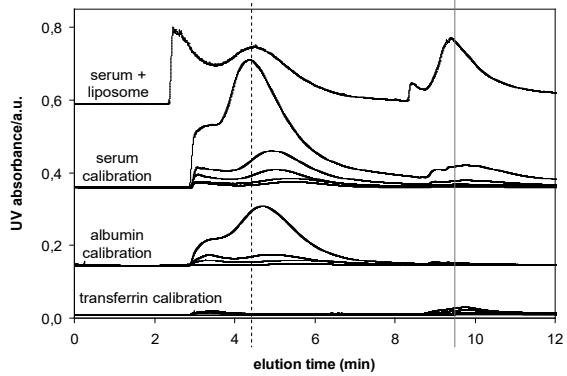


III. 4. Serum stability of ^{212}Pb -liposomes

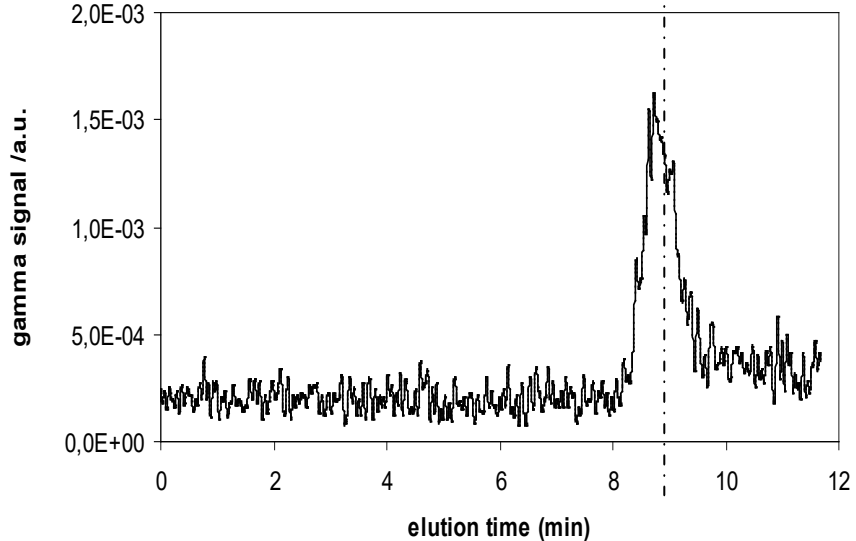
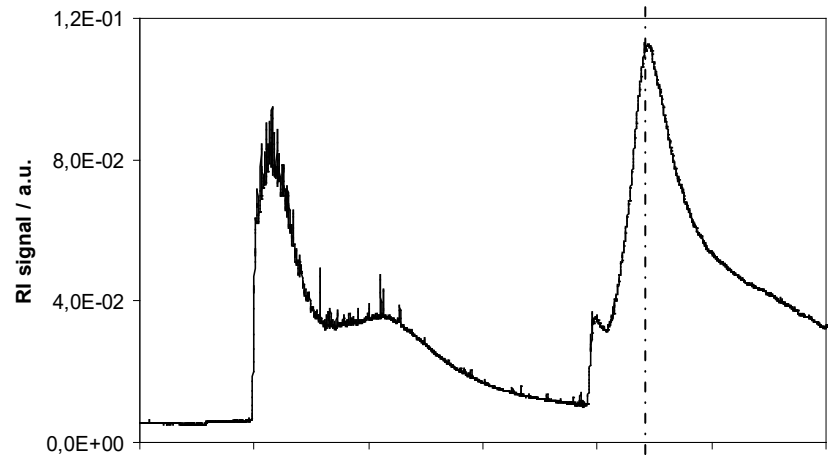
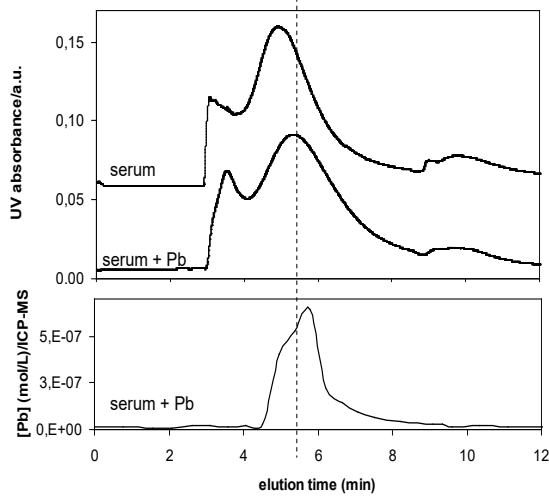
Serum vs liposomes



Serum calibration



shift to bigger sizes :
Agglomeration due to the metal



Liposomes are upright and ^{212}Pb is still inside of the vesicle

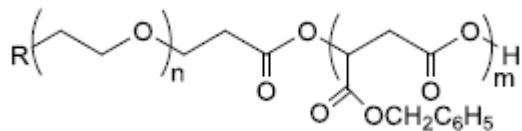


EXEMPLE 2 : liposomes pour la SPECT/CT

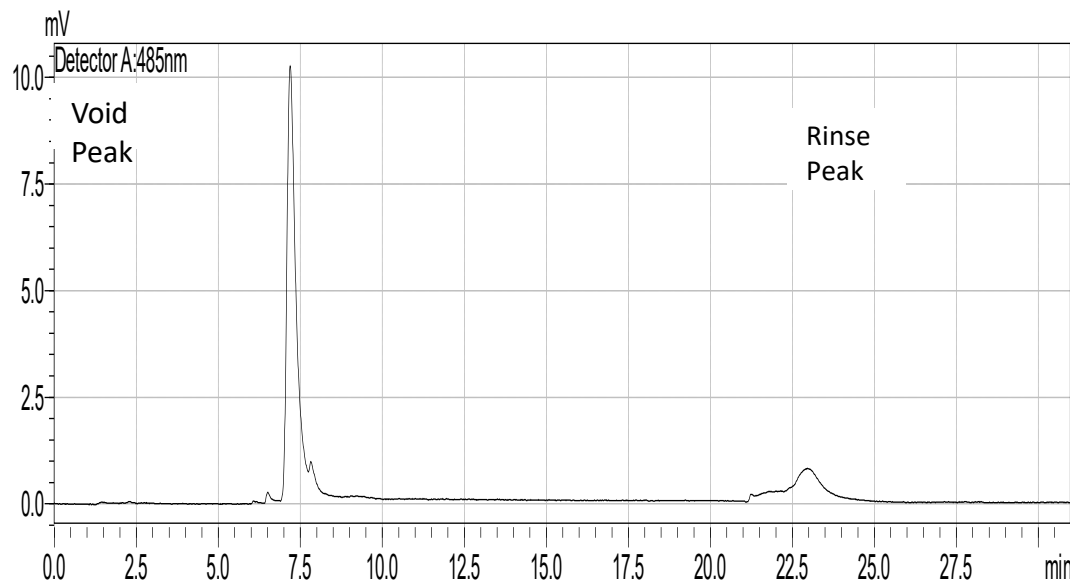
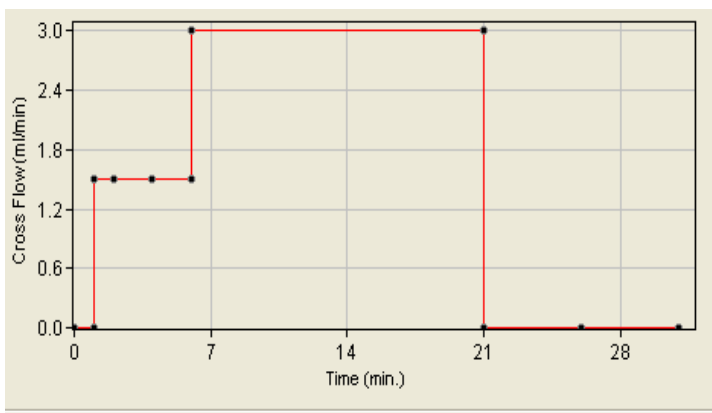
Exemples d'applications



^{99m}Tc-loaded functional polymeric nanoparticles



Collaboration with N. Lepareur (centre E. Marquis, Rennes)
And Sandrine Cammas-Marion (ENCS, Rennes)



fractogram : well-resolved peak

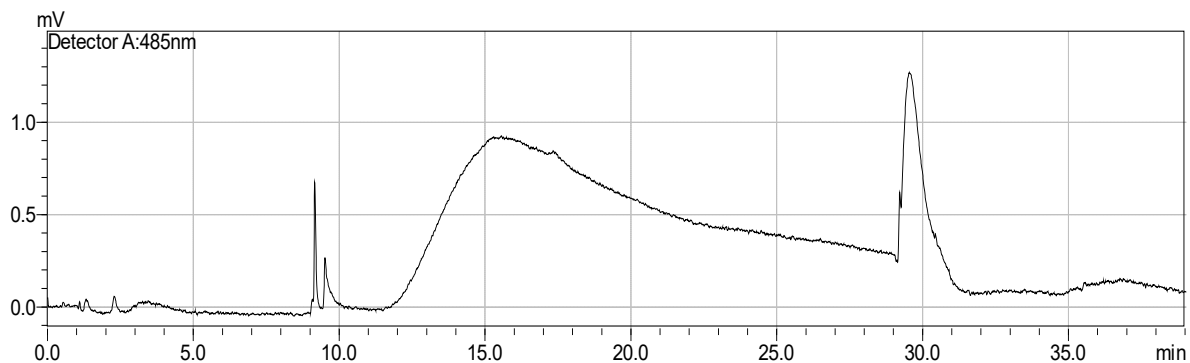
Good recovery = 80.5%

Fractionation of good quality.

Hydrodynamic diameter of 31 nm whereas
DLS in batch indicated 66-80 nm !

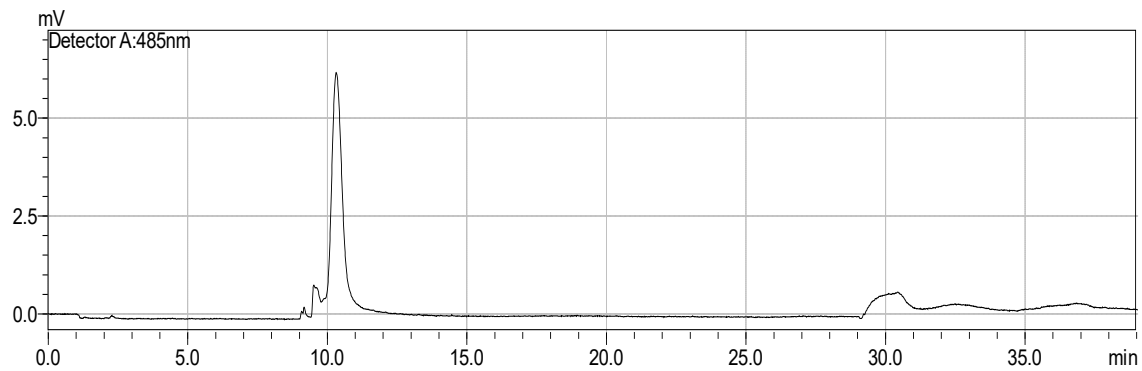
^{99m}Tc-loaded functional polymeric nanoparticles

Liposome PEG



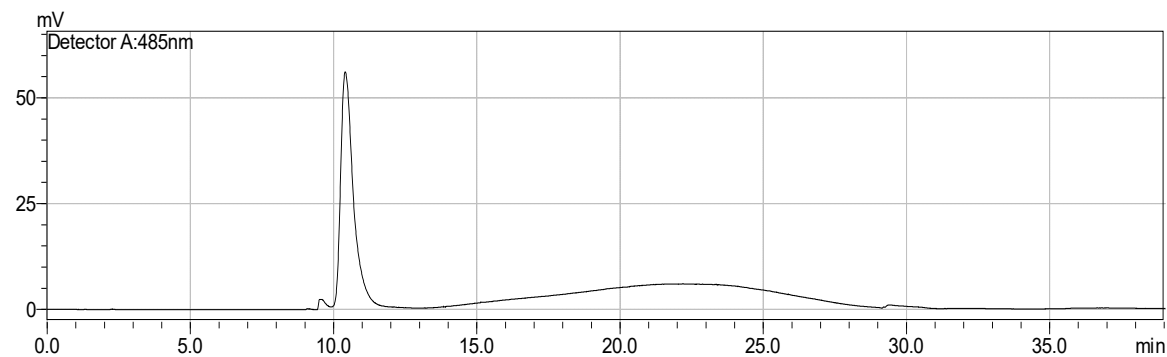
181 nm

Liposome + ^{186/188}Re



45 nm

Liposome PEG + ^{186/188}Re



48 nm



EXEMPLE 3 : nanoparticules pour la radiothérapie β

Exemples d'applications



NPs for therapy

Nanosystems are well fitted for
Drug
inaccessi
ble
cancer
i.e. brain
and
pancreas

Metasta
tic
cancer

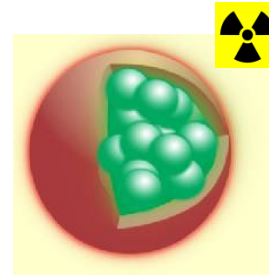
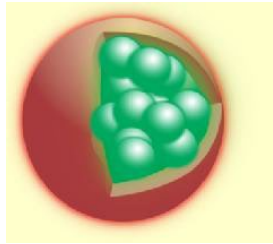
Drug
resist
cancer

Cancer
stem
cell



no tools for screening or detecting GBMs before clinical presentation

To treat GBM, brachytherapy could be envisaged



Irradiation

integrity

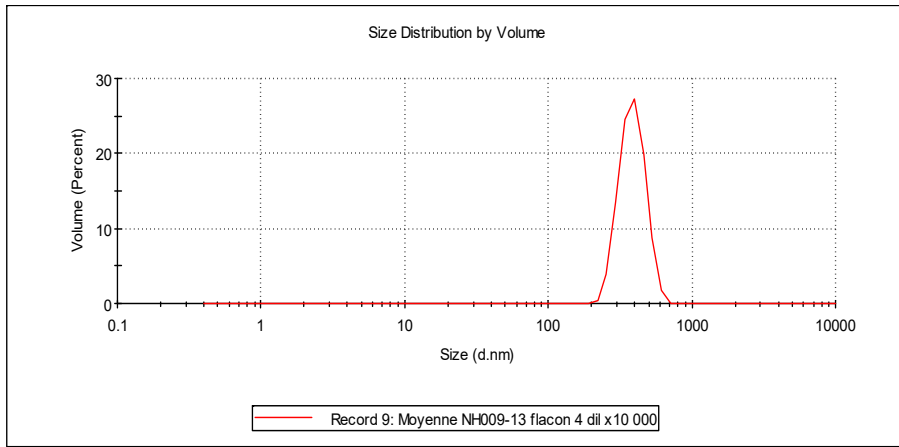
For AMM :

Perform necessary characterization tests to assess the feasibility of suspension activation

Set up the procedures for the characterization tests for irradiated products for QC

- Density
- Dry matter
- Metal content
- Viscosity
- Granulometry

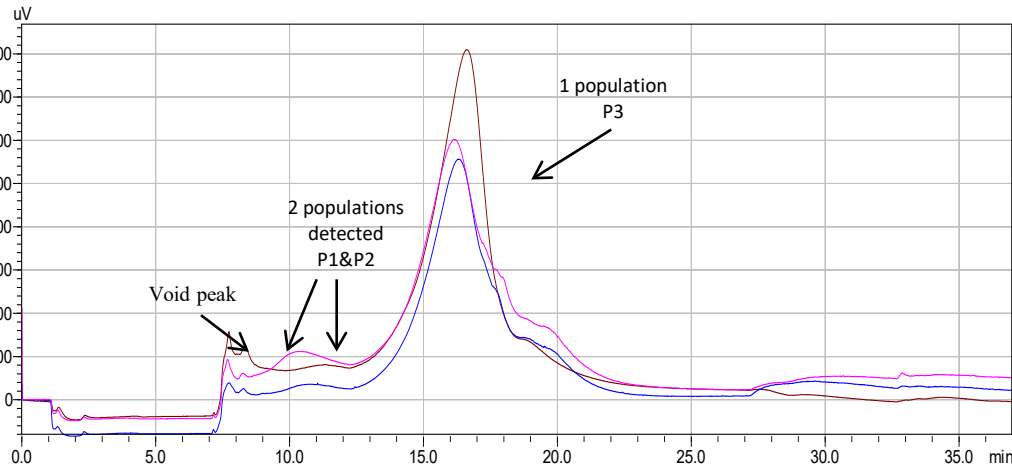
NPs for therapy



DLS

Average size: 406.7 nm

SIZE DISTRIBUTION: 300nm - 800 nm



Size < 200 nm

Different densities

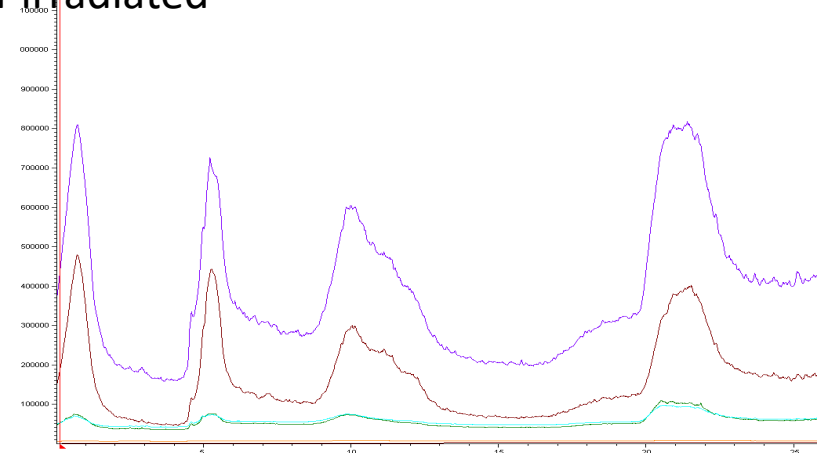
Size :200 -400 nm

polydisperse

Conditions:

- Membrane: PES 10 kDa, spacer: 350 μ m
- Eluant: pure water with 0.1% of tween 20
- Detector flow = 1mL/min
- Focus Flow: 1.5 mL/min for 1 min during focalization step
- Cross flow: from 2 mL/min to 0.1 mL/min during elution step

Non-irradiated



MALS signal: Additional information on size distribution are obtained. 2 populations could be distinguished at large angles corresponding to the smallest particles and are concentrated (from UV signal).

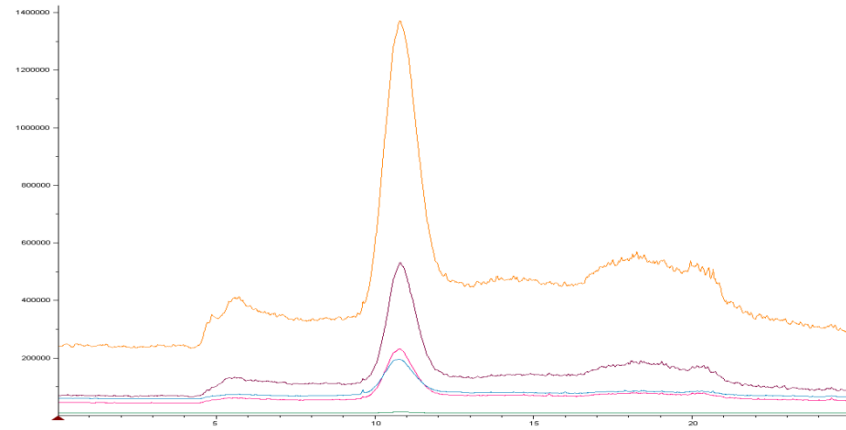
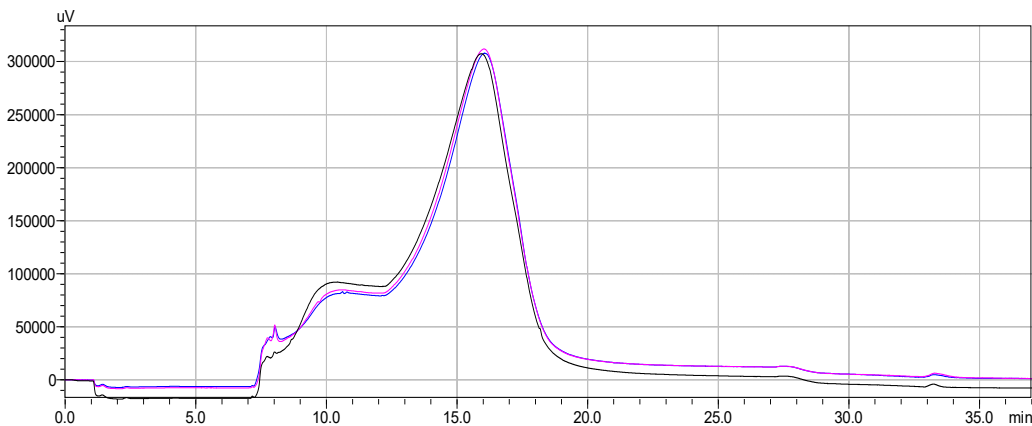
Another population is present corresponding to the bigger fraction but not detected by UV detector (i.e. less concentrated).

NPs for therapy

- Density
- Dry matter
- Metal content
- Viscosity
- Injectability

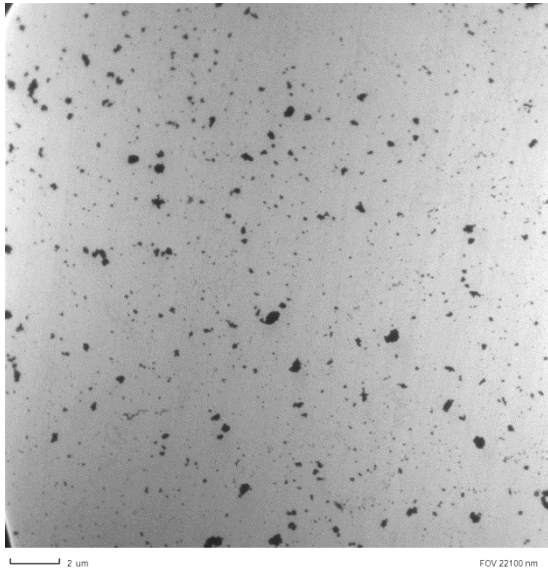
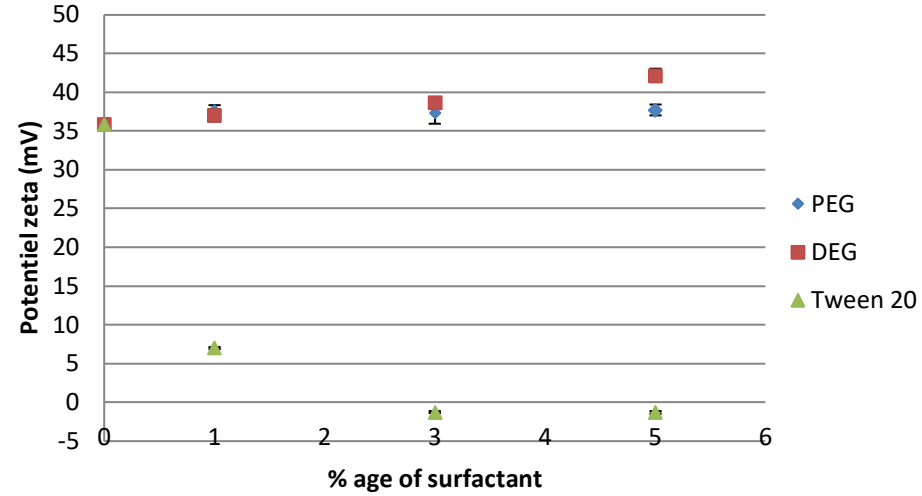
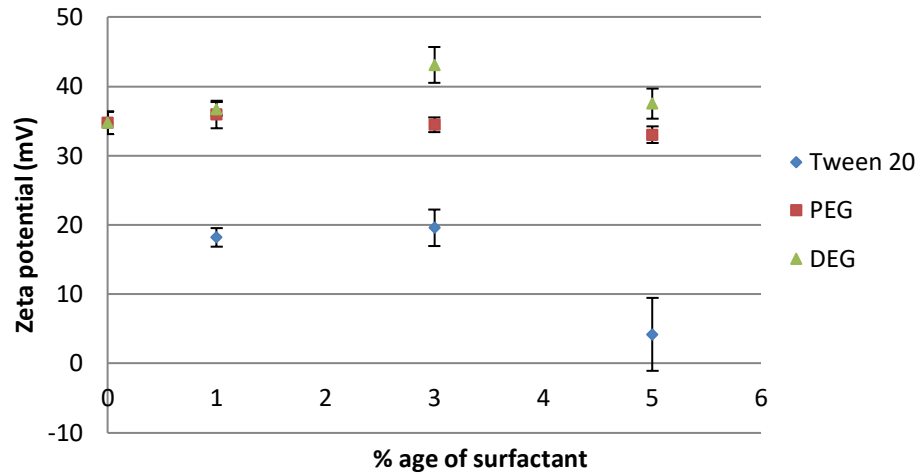
Are not modified with the activation

Irradiated (therapeutic dose)

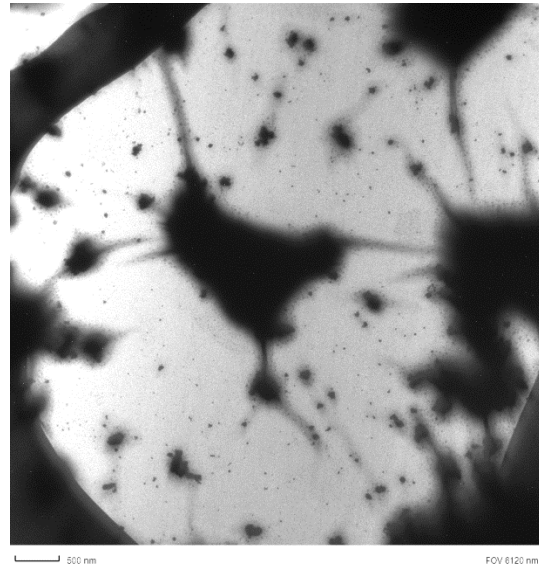


Higher interaction with the membrane compared to the non-irradiated fraction
=> Change in the surface charge ?

Evolution of zeta potential of microparticles as function of the surfactant



DEG



PEG



Tween



EXEMPLE 4 : nanohydrogels pour l'imagerie IRM

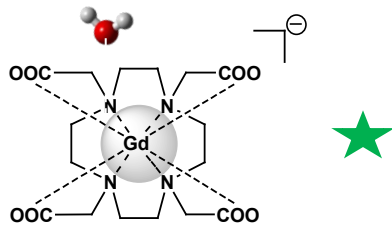
Exemples d'applications



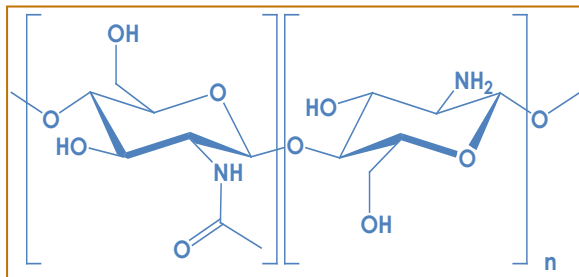
I – Synthesis of nanoprobes

Nanohydrogels for MRI

Ionic gelation

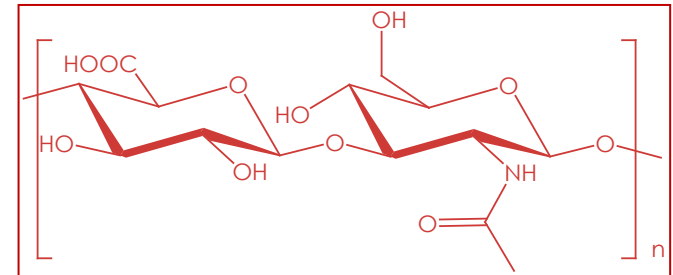
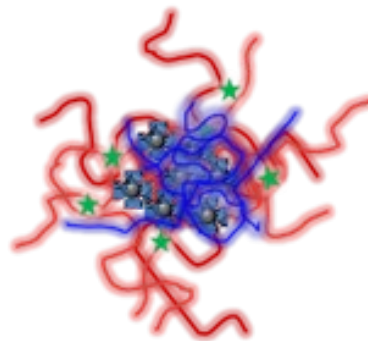


- GdCAs
- GdDOTA



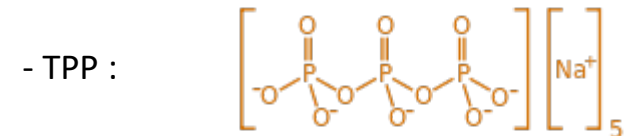
- Poly + : chitosan CH

Water pocket confined in a polymeric matrix



- Poly - : Hyaluronic acid HA

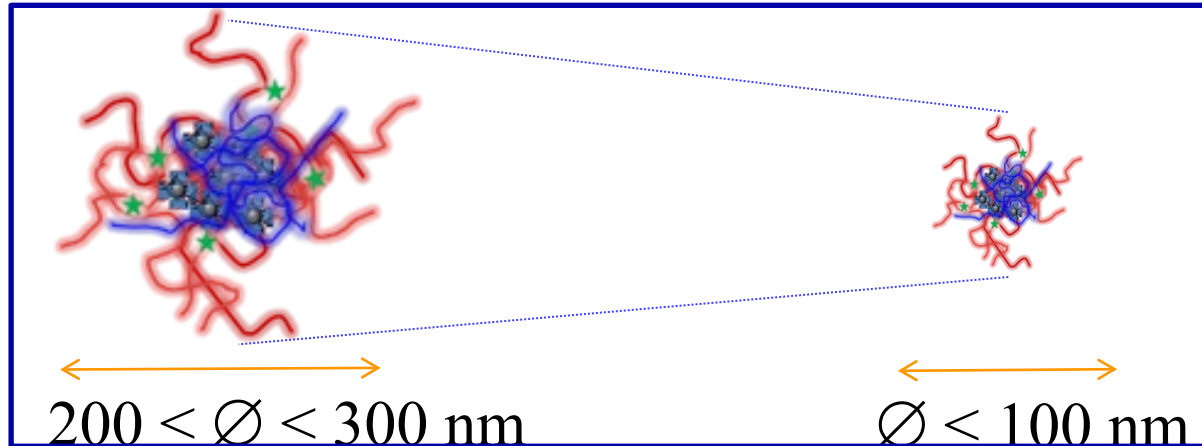
- Cross linker :



Size required for injection
D < 100 nm

I – Synthesis of nanoprobes

Size tuning : experimental parameters



To achieve this goal :

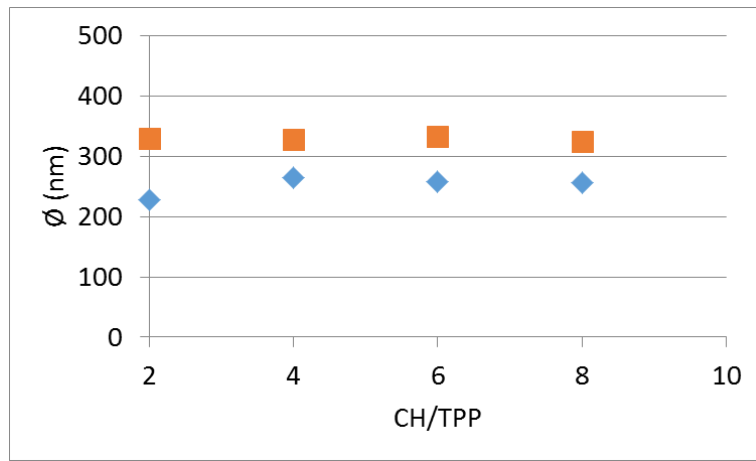
- Chitosan with decreasing $M_w \rightarrow M_w = 51 \text{ kDa}$ and 37 kDa
- Cross linking tuning by playing with:
 - different CH/TPP ratios : $2 < \text{CH} / \text{TPP} < 8$

→ the nature of the acidic phase (acetic vs citric)
Characterization with DLS / AFM / FFF

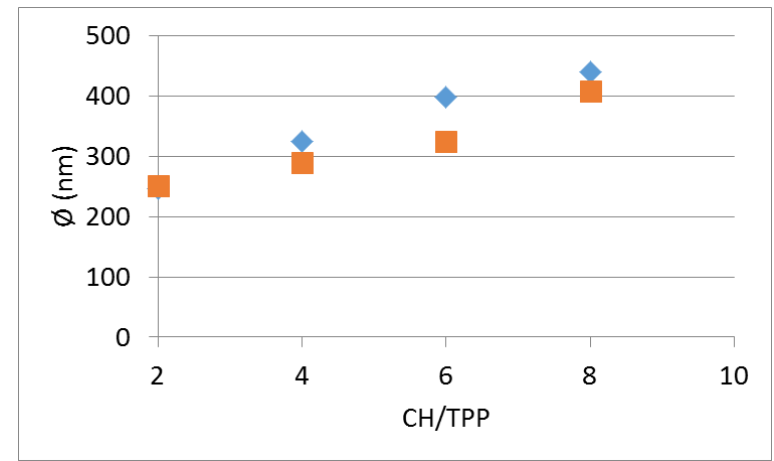
II – Characterization of nanogels

- DLS measurements - Size tuning f(M_w @ CH)

Citric acid



Acetic acid



Unloaded N

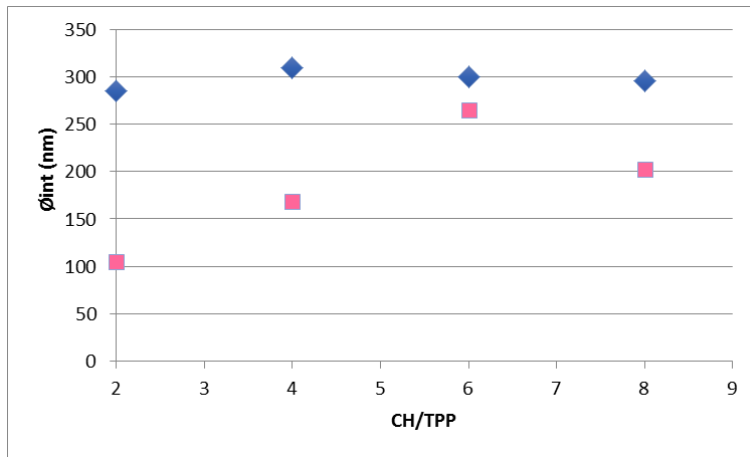
Chitosan:

- : $M_w = 37$ kDa
 - ◆ : $M_w = 51$ kDa
- M_w of chitosan does not affect object size
In citric acid: no influence of CH/TPP ratio on objects size
Smaller objects in citric acid for high CH/TPP ratio

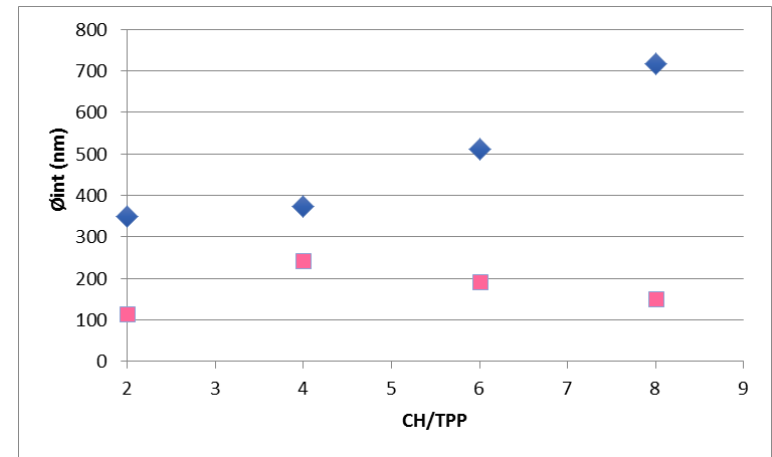
II – Characterization of nanogels

- DLS measurements - Size tuning f (intensity/number)

Citric acid



Acetic acid



Unloaded NF

Chitosan: $M_w = 51$ kDa

■ : ϕ (intensity)

◆ : ϕ (number)

$\phi_{intensity} \neq \phi_{number} \rightarrow$ aggregates

How to have glimpse on objects sizes?

II – Characterization of nanogels

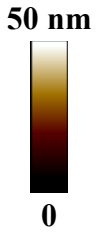
- AFM in liquid mode : direct method for size determination

Unloaded I

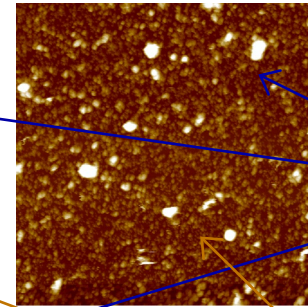
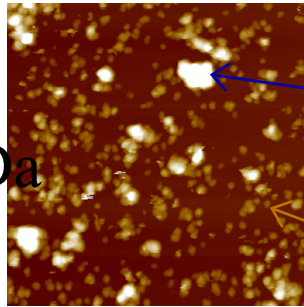
$CH/TPP = 2$

Citric acid

Acetic acid

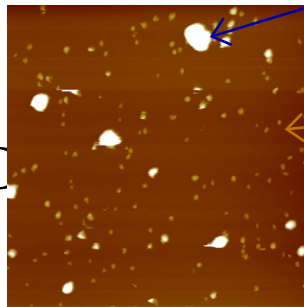


$CH : M_w = 51 \text{ kDa}$



Aggregates

$CH : M_w = 37 \text{ kDa}$



NPs

Presence of aggregates beside nanoparticles

II – Characterization of nanogels

- AFM in liquid mode : Size tuning — NPs mean size

Unloaded NPs

$M_w = 51$ kDa

Citric acid

Ø (nm)	43	57	57	59
--------	----	----	----	----

Acetic acid

Ø (nm)	51	46	33	44
--------	----	----	----	----

$M_w = 37$ kDa

Citric acid

CH/TPP	2	4	6	8
Ø (nm)	76	64	45	69

Whatever the formulation in ionic gelation between CH, HA in the presence of TPP led to nanoparticles of size smaller than 100 nm

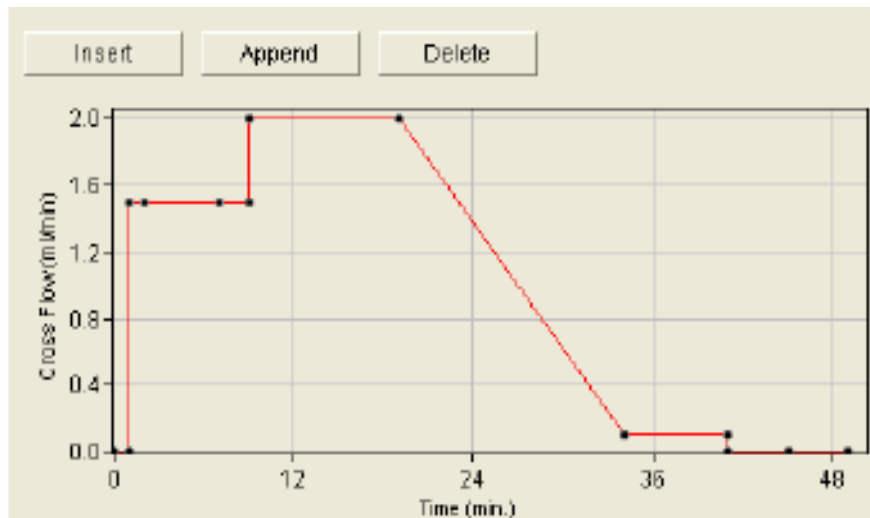
II – Characterization of nanogels

- Size tuning – new insights from AF4 experiments

DLS indicates ≈ 200 nm

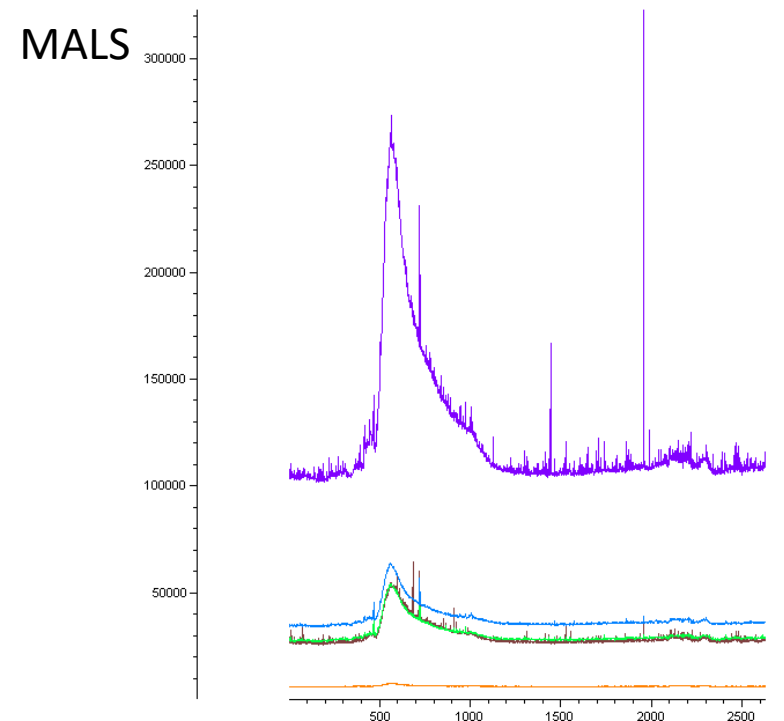
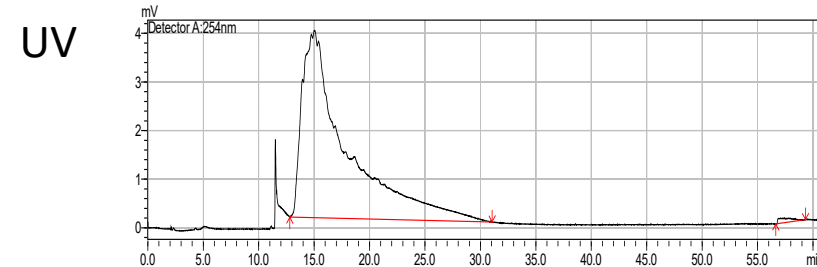
AFM indicates ≈ 70 nm

- Conditions:**
- Membrane: PES 10 kDa, spacer: 350 μ m
 - Eluant: pure water with 0.1% of tween 20
 - Detector flow = 1mL/min
 - Focus Flow: 1.5 mL/min for 1 min during focalization step
 - Cross flow: from 2 mL/min to 0.1 mL/min during elution step



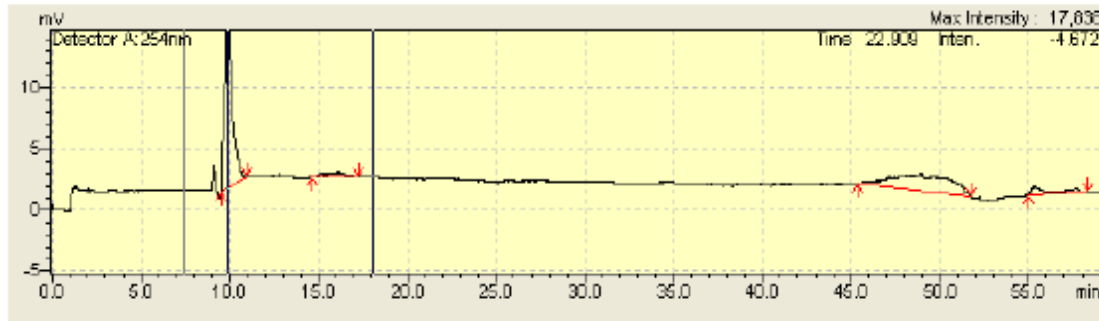
UV detection @ 254 nm
MALLS detection (8 angles)

Here AF4 indicates 1 population at 83 nm



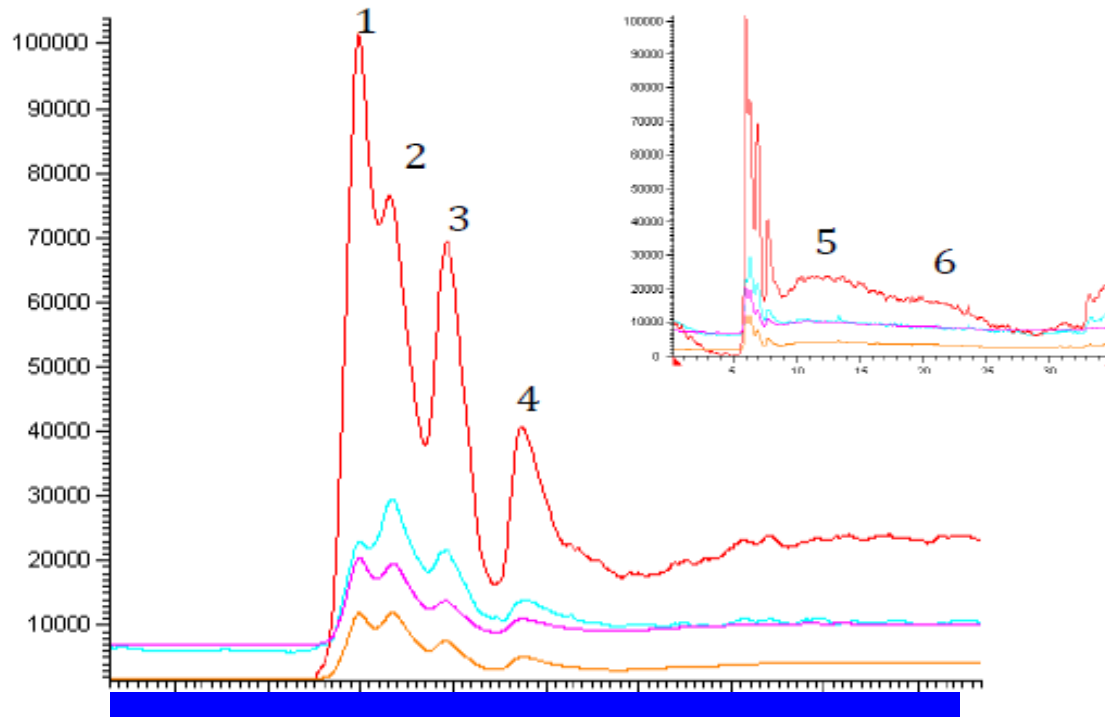
II – Characterization of nanogels

- Size tuning – new insights from AF4 experiments



CH 51kDa
CH/TPP = 4
Acetic acid

As indicated by AFM images, the protocol induced the formation of individual NPs and aggregates

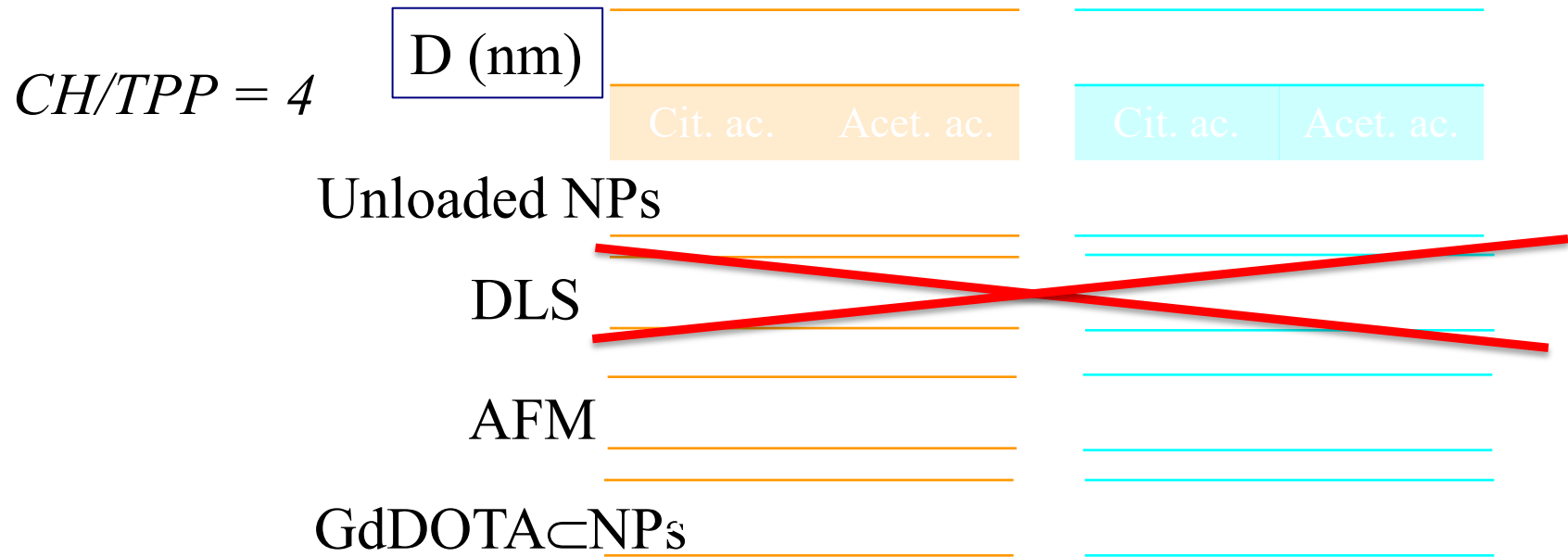


AF4-MALLS experiment in
that distribution is not mono
for individual NPs

For all samples, recovery yield
higher than 75% (mostly ran
between 85-95%)

II – Characterization of nanogels

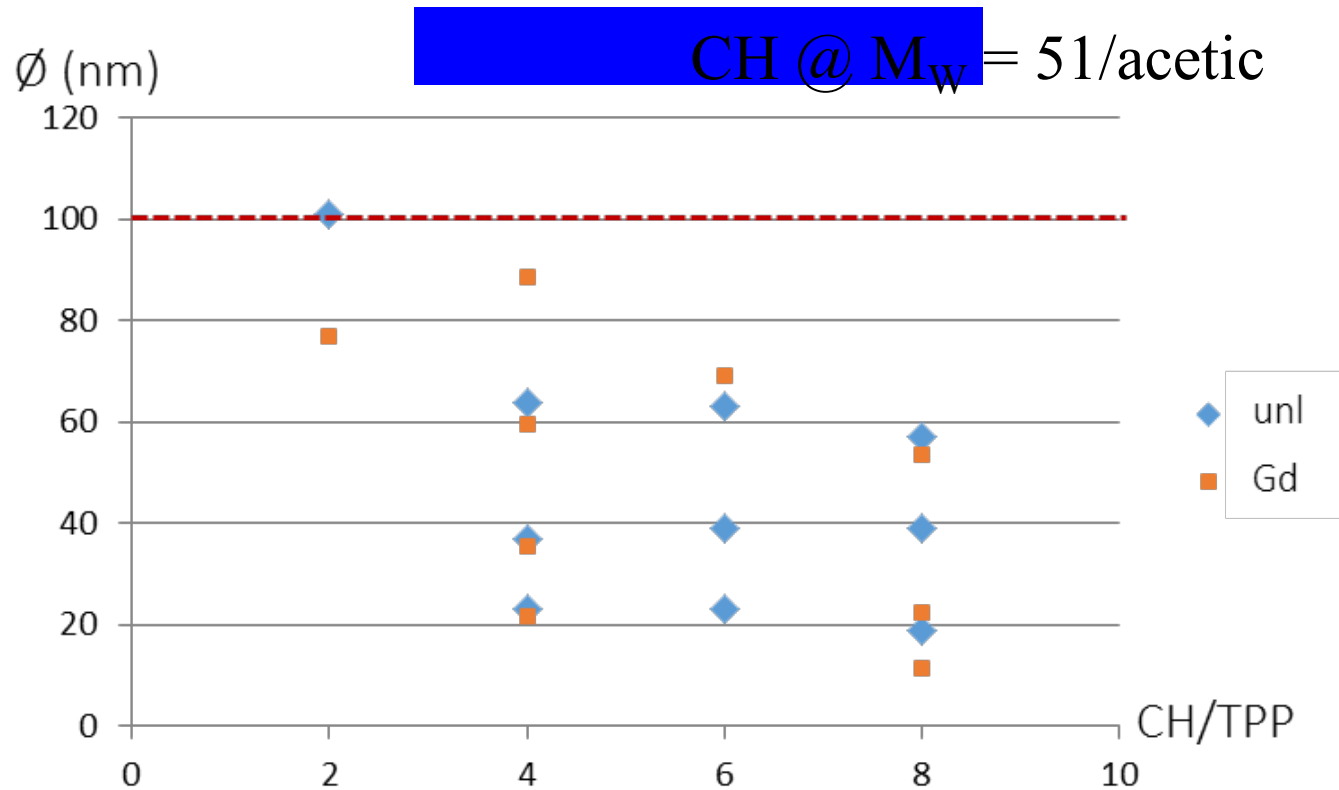
- Size tuning –individual NPs from AF4-MALLS



- AF4 experiments and AFM images give the same order of magnitude for size, whereas DLS is a way over !
- AF4 sizes were even smaller than those determined by AFM and provide additional information
- \emptyset (AFM) $>$ \emptyset (AF4) due to nanogel ‘pinching’ between the support and the nanogel
- AF4 allows to probably discriminate unloaded from Gd loaded NPs

II – Characterization of the nanogels

To obtain Gd nanogels for which $\emptyset < 100$ nm

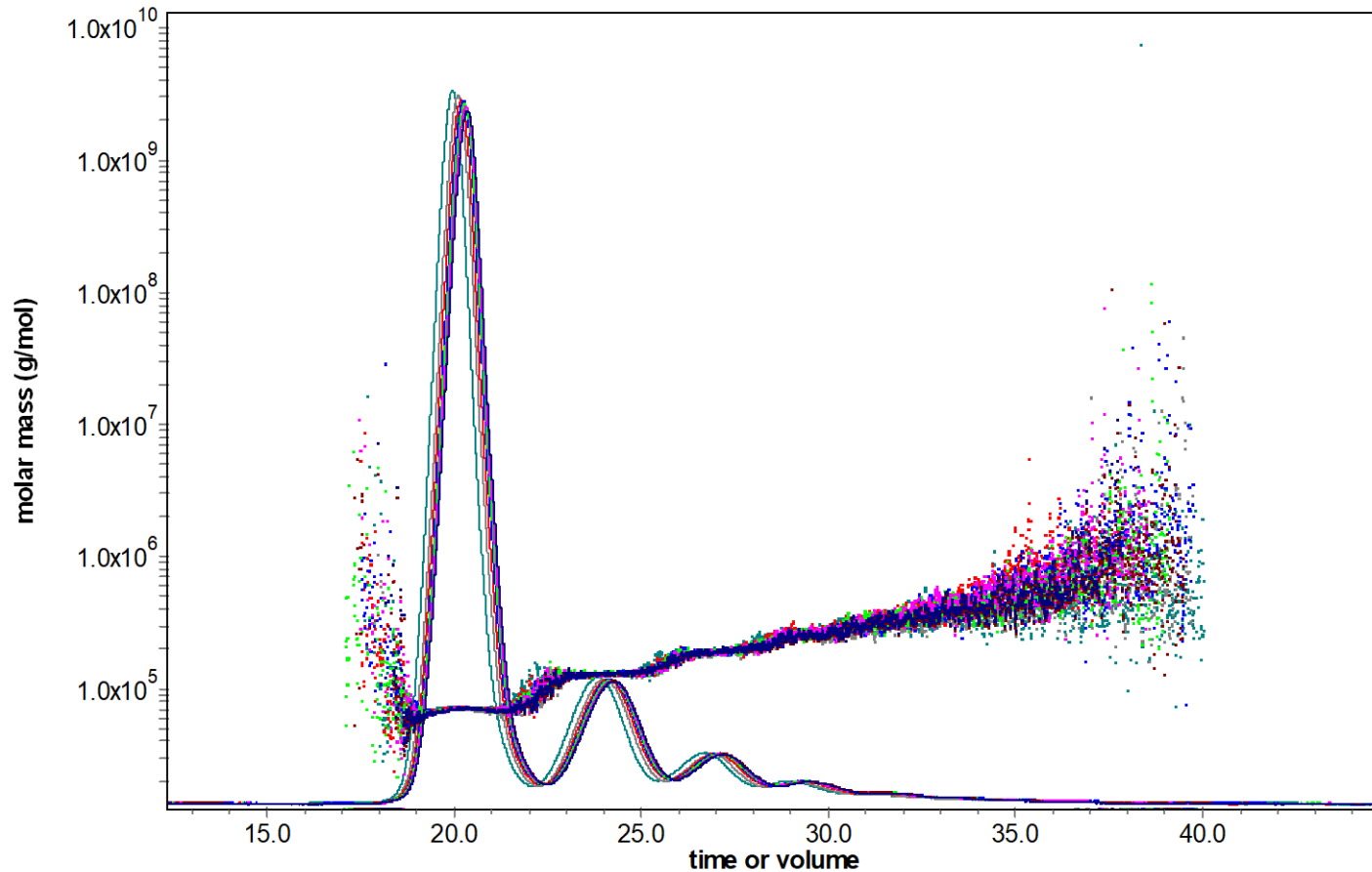


- For Gd nanogels, the best combination seems to be CH@ $M_w=51$ /acetic
 - \emptyset (nanogels) < 100 nm

Séparation de BSA par Flow FFF

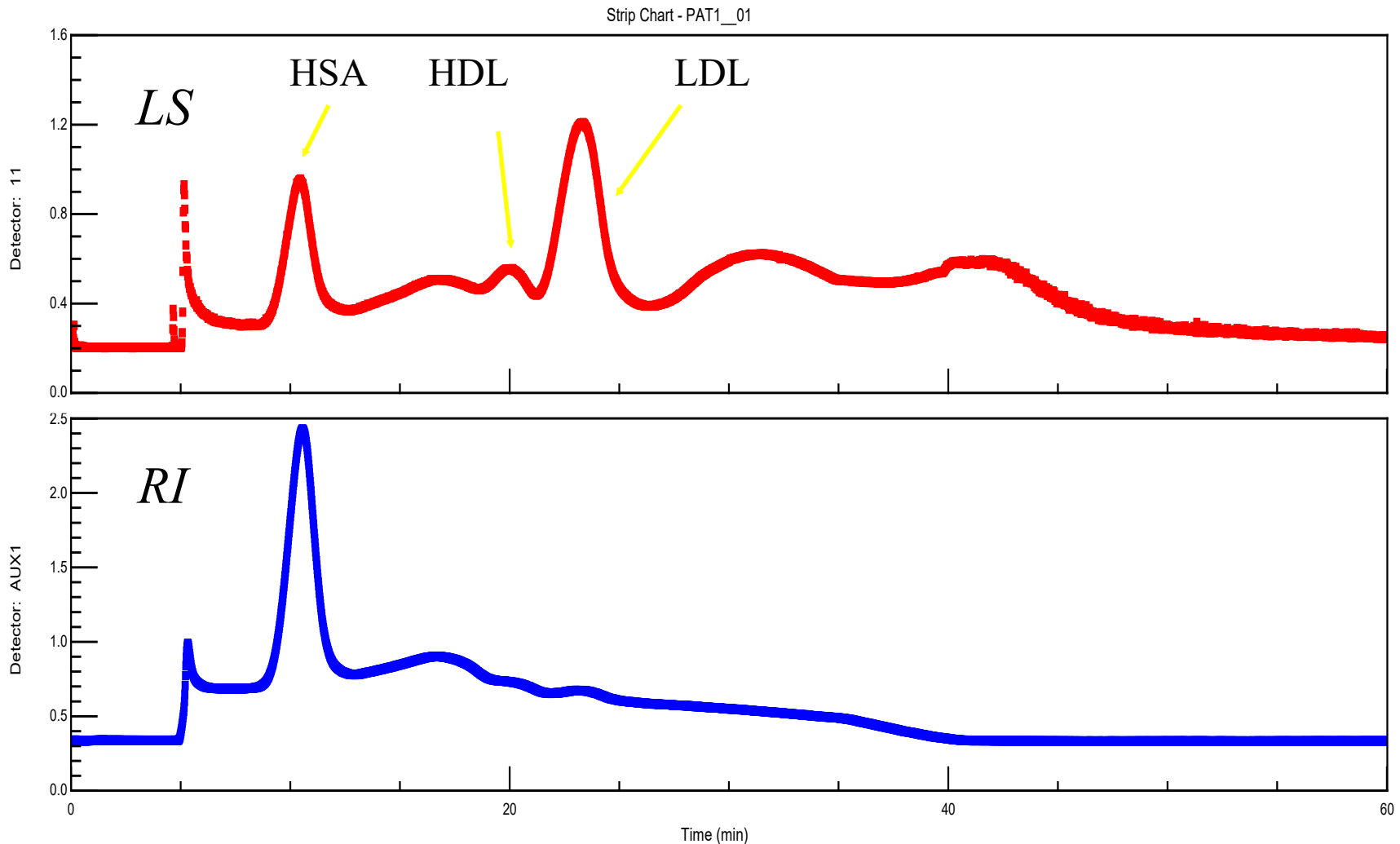
molar mass vs. time/volume

<input type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 05.vaf	<input checked="" type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 07.vaf	<input type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 08.vaf
<input checked="" type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 09.vaf	<input checked="" type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 10.vaf	<input checked="" type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 11.vaf
<input checked="" type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 12.vaf	<input checked="" type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 13.vaf	<input checked="" type="checkbox"/>	BSA 1mg/mL 60uL 490um 3zu1 14.vaf



■ Monomère, dimère, trimère, etc... Wyatt courtesy

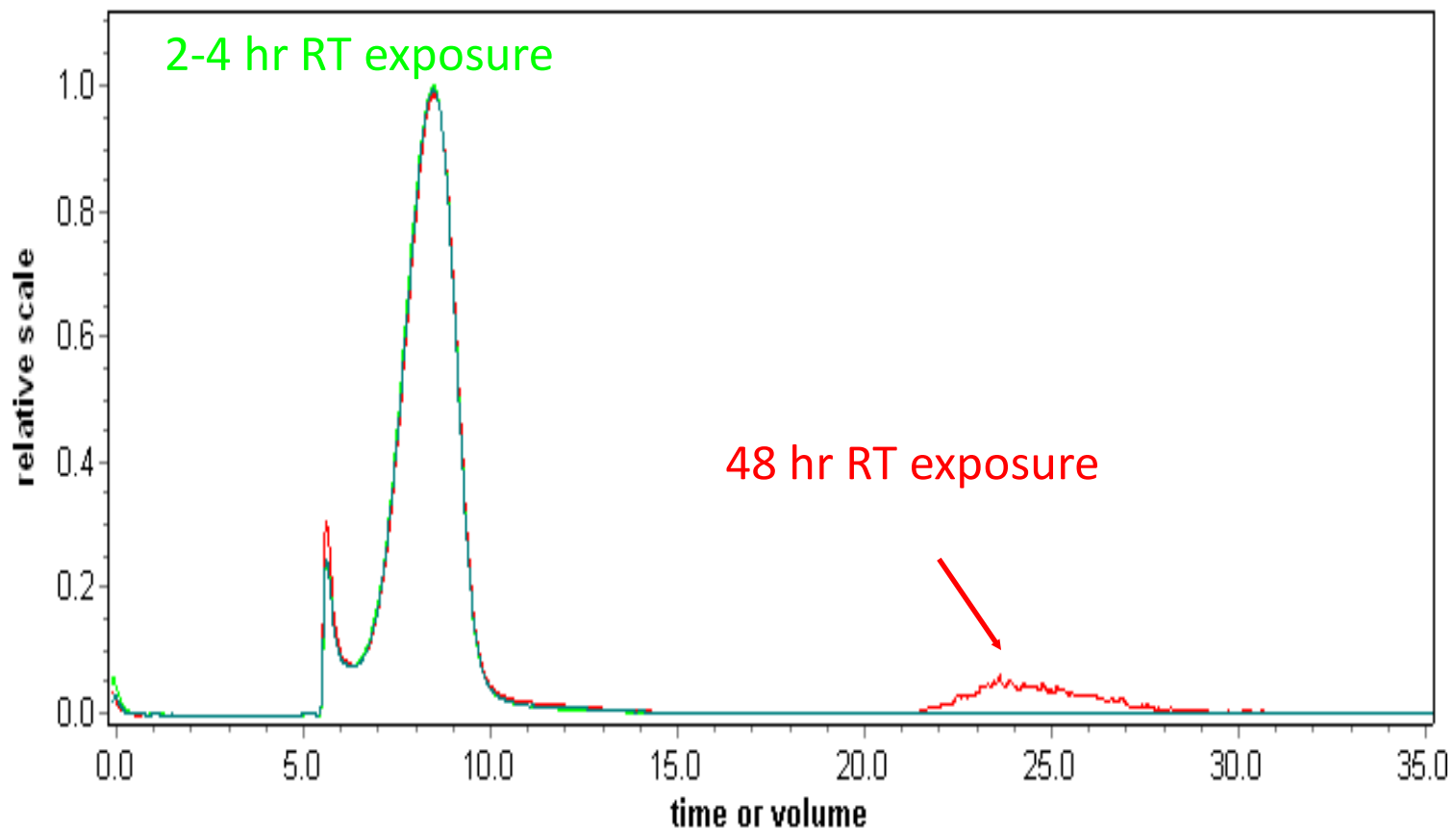
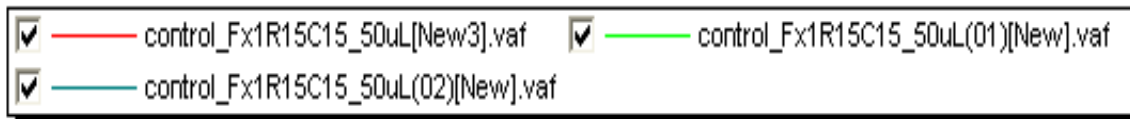
Séparation de sérum humain



■ Milieu complexe non purifié Wyatt courtesy

Etude de stabilité d'anticorps

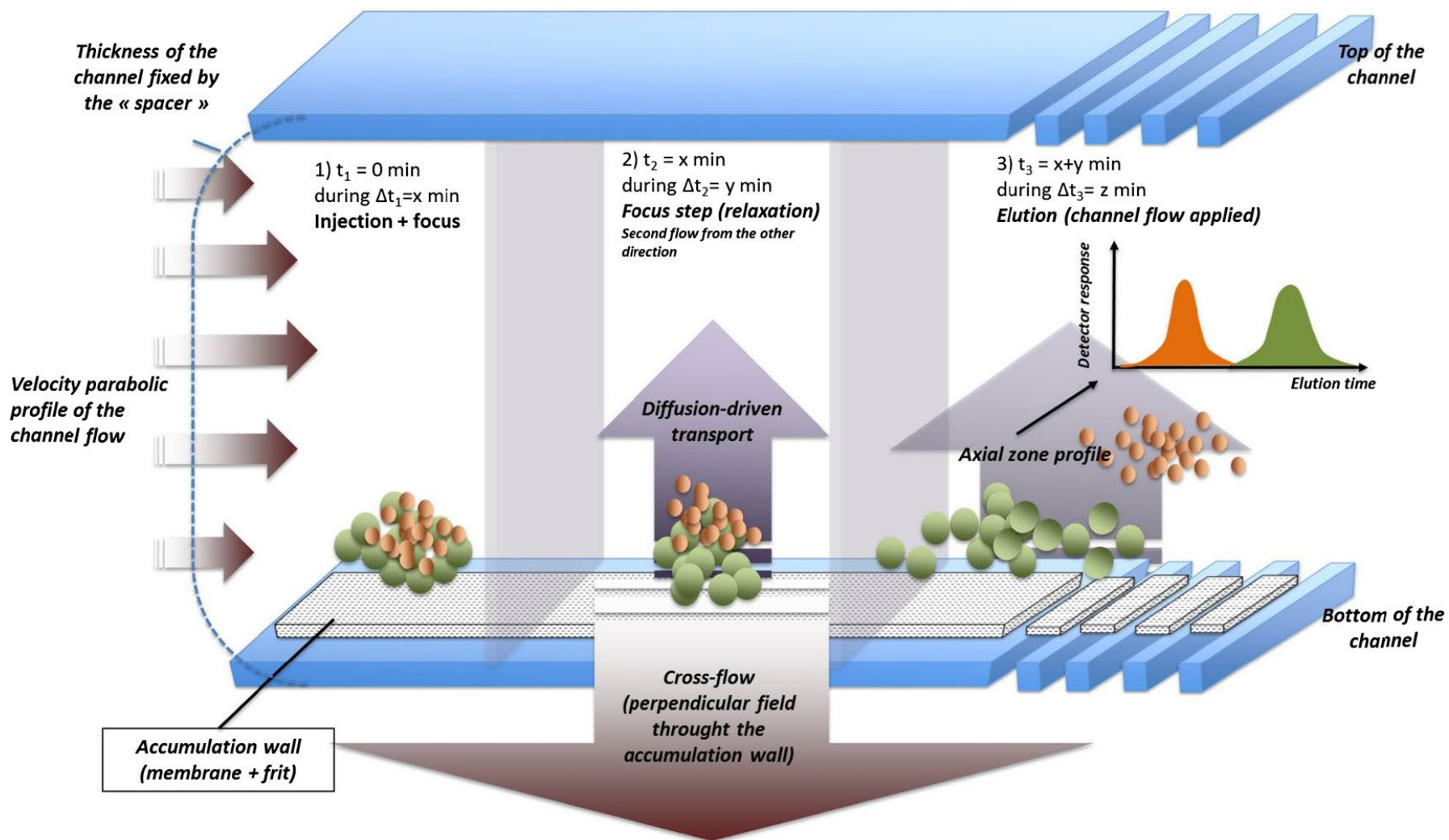
chromatograms



Application drug delivery

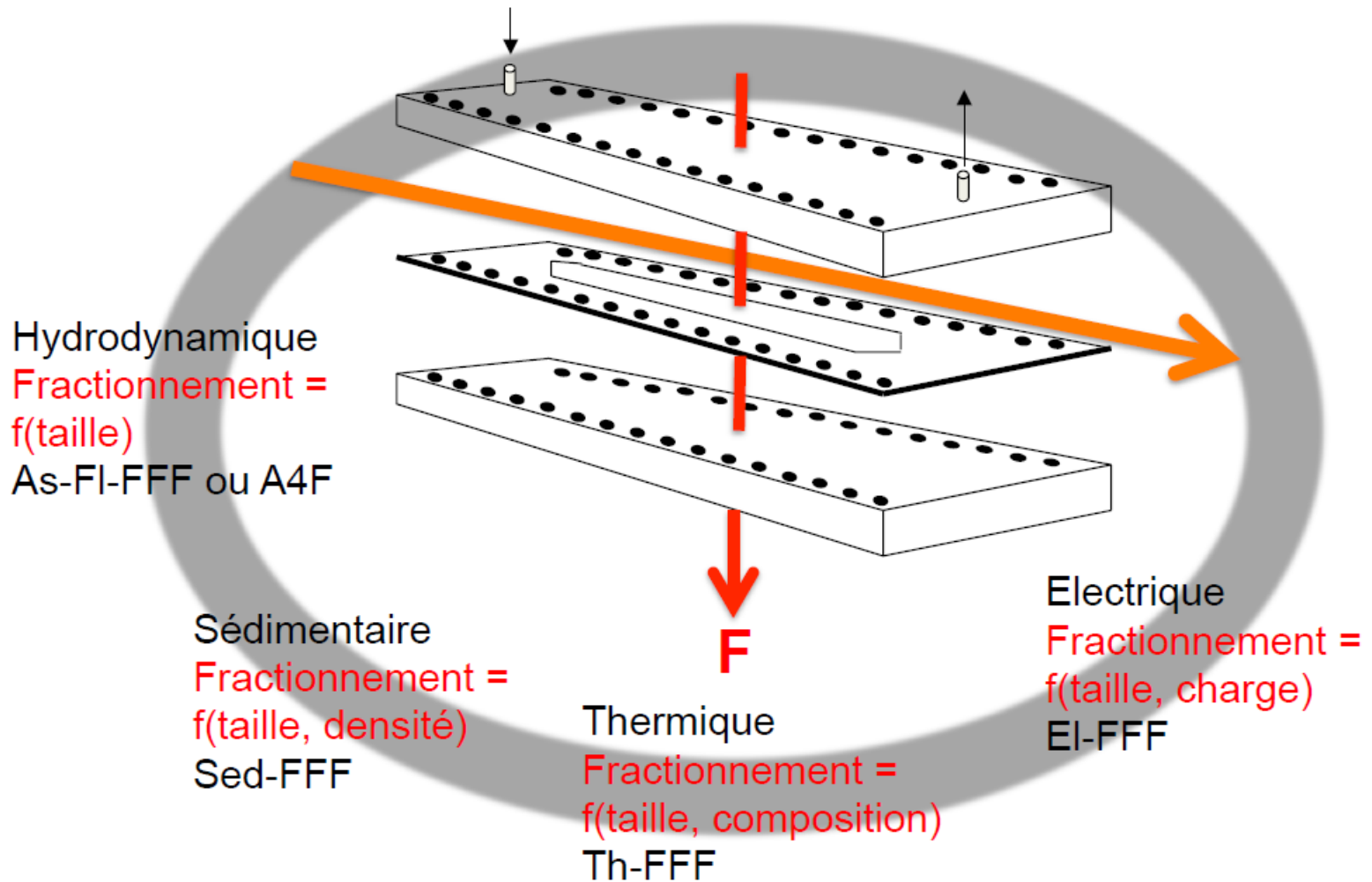
<https://www.youtube.com/watch?v=1S8Wa1WvXe4>

Flow FFF (FFFF)



J. Gigault et al. / Analytica Chimica Acta 809 (2014) 9–24

8. Conclusion



➔ Une approche **FFFs** peut aussi s'avérer utile pour une caractérisation exhaustive