



HAL
open science

Amélioration instrumentale de la chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules très polaires

Feriel Bouiche

► **To cite this version:**

Feriel Bouiche. Amélioration instrumentale de la chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules très polaires. Chimie analytique. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1003 . tel-01784638

HAL Id: tel-01784638

<https://theses.hal.science/tel-01784638>

Submitted on 3 May 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT 2018 LYSE 10-03

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

**Ecole Doctorale N°206
(Ecole doctorale de Chimie)**

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Chimie Analytique

Soutenue publiquement le 25/01/2018, par :
Feriel BOUICHE

Amélioration instrumentale de la chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules très polaires

Devant le jury composé de :

LEONARD, Didier	Professeur des Université/Université Lyon 1	Examineur
WAFFO-TEGUO, Pierre	Professeur des Universités/Université Bordeaux	Rapporteur
MENET Marie-Claude	Maître de conférence, HDR/Paris-Descartes	Rapporteur
BERTHOD, Alain	Professeur des universités/Université Lyon	Examineur
MICHEL, Thomas	Maître de conférence/ Université Nice	Examineur
FAURE, Karine	Chargée de recherche CNRS, HDR/Université Lyon	Directrice de thèse
REDAOUNIA, Souhila	Ingénieure chargée d'affaire/Kromaton-Rousselet Robotel	Invitée

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

En préambule de ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur soutien ainsi que leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Je remercie tout d'abord profondément ma directrice de thèse, Madame Karine Faure, qui m'a toujours soutenue pendant ce travail de thèse. Son grand humanisme, sa disponibilité, sa compréhension, m'ont aidée à persévérer dans les moments plus difficiles. Merci de m'avoir permis de réaliser ces trois années de thèse de manière agréable.

Je souhaiterais également remercier mon jury de thèse, Madame Marie-Claude Menet et Monsieur Pierre Waffo-Tegu, pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit et Messieurs Alain Berthod, Didier Leonard, et Thomas Michel, pour avoir consenti à examiner mes travaux de thèse.

Je remercie la société Rousselet-Robatel et plus particulièrement son directeur Monsieur Roger Michud pour m'avoir fait confiance en acceptant de financer ces travaux. Je remercie également Monsieur Frédéric Arnaud pour les échanges scientifiques qui ont permis de faire avancer ces travaux. Je tiens également à remercier tout particulièrement Madame Souhila Redaouania pour sa sympathie, son soutien et les échanges scientifiques tout au long de ma dernière année de thèse.

Un énorme merci à l'ensemble de mes collègues doctorants avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant ses trois ans qui ont permis de rendre chaque jour de la thèse meilleur : Audrey, Josiane, Elodie, Morgan, Marion, Léa, Marie. Merci pour tous les bons moments passés ensemble et votre soutien continu qui pousse à voir le meilleur de la recherche.

Merci également à l'ensemble de l'équipe de chromatographie et techniques couplées pour leur soutien Sabine Heinisch, mais également Florent Rouvière et Magalie Batteau pour son aide au quotidien qui m'a permis de faire face à tous les problèmes techniques et de mener cette thèse jusqu'au bout.

Une thèse dans un laboratoire, c'est aussi voir partir de nombreuses personnes, des étudiants ou des personnels et en arriver d'autres. Je souhaiterais remercier toutes ces personnes que j'ai croisées.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Hervé Delépine pour m'avoir orienté vers cette thèse.

Pour clôturer ces remerciements, je tiens à les adresser à ma famille et mes amis proches, Zineb (merci de ta présence et ton soutien sans faille tout au long de ces trois années), Myriam (merci d'avoir été là, à ta manière), Anne-Laure (la véritable amitié ce n'est pas d'être inséparable, c'est d'être séparé et que rien ne change).

Enfin, je souhaiterais remercier mes parents, mes sœurs et frère à qui je dédie cette thèse sans qui tout cela n'aurait pu être possible. Merci pour votre soutien tout au long de ces années, vos encouragements répétés et votre aide dans tout ce que j'ai entrepris, je ne vous remercierai jamais assez. Toujours présents et patients, quelle que soit mon humeur, je vous dois une grande partie de ma réussite. Ce travail vous est dédié.

Pour conclure, je voudrais dire qu'une thèse représente un investissement important et n'est pas toujours facile, je pense notamment aux différentes frustrations lorsque tout ne fonctionne pas comme on l'espérait. Cependant, le soutien de ses collègues, ses amis et ses proches en font une très belle aventure et on en ressort grandit avec plein de nouvelles perspectives de vie en tête !

TITRE en Français : Amélioration instrumentale de la Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules très polaires

RÉSUMÉ en Français :

L'objectif de cette thèse est de développer un nouvel instrument de chromatographie de partage centrifuge (CPC) dédié à la purification de molécules très polaires. La CPC est une technique préparative permettant la séparation des molécules grâce à l'utilisation d'un système solvant constitué de deux liquides non miscibles. Ce manuscrit expose dans un premier temps les différentes techniques de purification de protéines utilisées dans le cas d'un procédé industriel de production. Un focus est réalisé sur l'utilisation de systèmes biphasiques aqueux pour la purification des biomolécules, qui représente un réel avenir dans l'industrie du fait de son faible coût, de sa facilité de montée en échelle et surtout de l'environnement favorable qu'il fournit aux biomolécules. Ainsi en se basant sur les avantages de ces systèmes solvants dits Aqueous Two Phase Systems (ATPS), la CPC pourrait apporter une efficacité supplémentaire permettant de purifier les protéines à moindre coût. Pour pouvoir répondre à cet enjeu industriel, il est nécessaire de développer à la fois des méthodes chromatographiques innovantes et de nouveaux instruments dédiés. En effet, les instruments de CPC actuels ne sont pas compatibles avec les Bonnes Pratiques de Fabrication du fait de la présence de joints Téflon® qui empêchent la possibilité de stériliser les instruments. La fabrication d'un nouvel instrument monobloc entièrement en titane a été réalisée grâce à la technologie de l'impression 3D pour répondre à cette problématique. L'objet de cette thèse est l'évaluation poussée des performances de cette nouvelle colonne afin de déterminer son applicabilité à la purification des biomolécules. Un focus sera également apporté à l'injection de volumes très faibles d'échantillon afin de faciliter le développement de méthodes.

TITRE en anglais : Centrifugal partition chromatography : an improved instrument for highly polar molecule purification

RÉSUMÉ en anglais :

The aim of this thesis is to develop a new centrifugal partition chromatography (CPC) instrument in order to purify highly polar molecules. CPC is a preparative technique for the separation of molecules using a solvent system composed of two immiscible liquids. This manuscript describes the different protein purification techniques used in industrial production processes. A focus is made on the use of aqueous biphasic systems for the purification of biomolecules, which represents a real trend in the industry thanks to its low cost, scaling simplicity and especially the favorable environment that it provides to biomolecules. Thus, based on the advantages of these solvent systems known as Aqueous Two Phase Systems (ATPS), CPC could provide additional performances to purify proteins at lower cost. To respond to this industrial challenge, it is necessary to develop both innovative chromatographic methods and new devoted instruments. Indeed, current CPC instruments are not compatible with Good Manufacturing Practices due to the presence of Teflon® seals which prevents the possibility of sterilizing the instruments. The manufacture of a new monobloc instrument entirely made of titanium was achieved thanks to the 3D printing technology. The purpose of this thesis is the evaluation of this new column performance in order to determine its applicability to biomolecules purification. A special attention is also provided to the injection of very small sample volumes in order to facilitate method development.

DISCIPLINE : Chimie Analytique

MOTS-CLÉS : Chromatographie de partage centrifuge, purification, biomolécules, ATPS

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, UMR CNRS 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.

Abréviations

CCC : Chromatographie à Contre-Courant

CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge

LLC : Liquide-Liquide Chromatographie

S_f : Taux de phase stationnaire

K_d : Coefficient de partage

NC/TP : Nombre de Cellules par Plateau Théorique

HEMWat 0 ; Système biphasique constitué d'heptane, acétate d'éthyle, méthanol, eau en proportion 1/1/1/1 (v/v/v/v)

ATPS : Aqueous Two Phase System : Système biphasique aqueux

PEG : Polyéthylène glycol

BSA : Bovine Serum Albumine

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE	3
1. LA PURIFICATION DES PROTEINES	5
1.1. METHODES NON CHROMATOGRAPHIQUES : ETAPE DE PURIFICATION INTERMEDIAIRE	7
1.2. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	10
2. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE	14
2.1. HISTORIQUE	14
2.2. TERMINOLOGIE	15
2.3. INSTRUMENTATION DISPONIBLE	16
2.4. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE (LLC)	18
2.5. AVANTAGE DE LA LLC	19
3. LES SYSTEMES ATPS	20
3.1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES ATPS	21
3.2. APPLICATION DES ATPS A L'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE	23
4. UTILISATION DES ATPS EN LLC	27
4.1. UTILISATION DANS LES INSTRUMENTS HYDRODYNAMIQUES (CCC)	27
4.2. UTILISATION DES ATPS DANS LES INSTRUMENTS HYDROSTATIQUE (CPC)	29
5. OBJECTIF DE LA THESE	31
RÉFÉRENCES	32
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	41
1. INSTRUMENTATION	43
1.1. LES ROTORS CPC	43
1.2. PERIPHERIQUES	44
2. UTILISATION DE L'APPAREIL CPC	46
3. PREPARATION DES SYSTEMES SOLVANTS	46
3.1. PRODUITS CHIMIQUES	47
4. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR EVALUATION DES PERFORMANCES (CHAPITRE 3 A 5)	47
5. PREPARATION DES SOLUTIONS POUR TEST DE CONTAMINATION (CHAPITRE 6)	48
5.1. PRODUITS CHIMIQUES	48
5.2. PREPARATION DES SOLUTIONS	48
5.3. MISE EN PLACE DE METHODE DE CONTAMINATION DANS UN ROTOR CPC	49
CHAPITRE 3 : ETUDE DES PERFORMANCES D'UNE COLONNE CPC COMMERCIALE EN MILIEU BIPHASIQUE AQUEUX ET EN MILIEU HYDRO-ORGANIQUE	51
1. INTRODUCTION	53
2. RESULTATS ET DISCUSSION	59
2.1. INFLUENCE DES PARAMETRES DE LA CPC SUR LE TAUX DE PHASE STATIONNAIRE	60
2.2. ETUDE DE L'EFFICACITE	62
3. CAHIER DES CHARGES	64
RÉFÉRENCES	65

CHAPITRE 4 : MODIFICATION DU DESIGN DES CELLULES DES ROTORS DE CPC EN VUE DE L'AMELIORATION DES PERFORMANCES	68
1. INTRODUCTION	70
1. RESULTATS ET DISCUSSION	76
1.1. FABRICATION DE CELLULES SPHERIQUES	76
1.2. PERFORMANCE DU PREMIER ROTOR PROTOTYPE 3D EN ACIER	78
1.3. PROTOTYPE EN TITANE DE 428 CELLULES	86
2. CONCLUSION	96
RÉFÉRENCES	97
CHAPITRE 5 : ETUDE DE L'INSTRUMENTATION FINALE	98
INTRODUCTION	100
1. RESULTATS ET DISCUSSION	103
1.1. ETUDE DE LA VARIANCE EXTRA-COLONNE	103
1.2. DISPERSION CHROMATOGRAPHIQUE ET IMPACT DES CANAUX SUR LE ROTOR MINI-3D	107
1.3. ETUDE DU ROTOR MINI-3D DANS L'ENVIRONNEMENT BIPHASIQUE AQUEUX: 14% PEG- 14% K ₂ HPO ₄	109
1.4. EVALUATION DU NOUVEAU ROTOR DANS UN ENVIRONNEMENT HYDRO-ORGANIQUE	124
2. CONCLUSION	132
RÉFÉRENCES	134
CHAPITRE 6 : ETUDE DE LA CONTAMINATION DES ROTORS CPC	137
1. INTRODUCTION	139
3. RESULTATS ET DISCUSSION	142
3.1. CALIBRATION DU DETECTEUR	142
3.2. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE ADECA AU SEIN DES ROTORS CPC	143
3.3. APPLICATION DE LA METHODE ADECA SUR UN ROTOR MONOBLOC EN TITANE	150
4. CONCLUSION	154
RÉFÉRENCES	155
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	157

Introduction générale

L'intérêt des biomolécules se confirme depuis les dernières décennies notamment dans le domaine des nouvelles thérapies (anticorps) ou encore l'essor des neutraceutiques (probiotiques). Ces domaines requièrent la production de molécules de grande pureté, avec une activité biologique conservée, ce qui apporte des contraintes précises en termes de fabrication. Parmi celles-ci, la purification des biomolécules reste de nos jours un enjeu industriel majeur, notamment en raison des coûts extrêmement élevés des procédés et des échantillons.

La chromatographie de partage centrifuge (CPC), associée à l'utilisation de systèmes biphasiques aqueux peut être une technique de purification intéressante pour les biomolécules, en raison de son faible coût, de sa facilité de montée en échelle et surtout de l'environnement favorable que ce procédé fournit aux biomolécules.

Bien que la chromatographie de partage centrifuge soit une technique préparative qui présente un fort potentiel dans le domaine des biomolécules, l'utilisation de cette dernière n'est pas répandue, en raison de l'importante consommation d'échantillon constatée lors des études préliminaires de développement de la méthode de purification. De plus, l'utilisation de systèmes solvants purement aqueux représente également un challenge technologique puisque leur faible différence de densité se traduit très souvent par une rétention faible de la phase stationnaire dans les colonnes (par comparaison à des systèmes solvant hydro-organique). Enfin, la présence de joint en Téflon® dans les rotors actuellement commercialisés, gêne les procédures de nettoyage et de stérilisation indispensables au respect des Bonnes Pratiques de Fabrication appliquées dans les entreprises pharmaceutiques.

Ainsi, en vue d'ouvrir plus largement la technique CPC au domaine des biomolécules, l'objectif de cette thèse est d'optimiser l'instrumentation CPC. Pour cela une modification complète du design du rotor a été initiée.

Le chapitre 1 de ce mémoire présentera tout d'abord un historique des techniques de purification des biomolécules ainsi que la place de la technique CPC dans ce domaine et ses avantages à être introduite dans le milieu industriel.

Le chapitre 2 définira l'ensemble des outils et méthodes utilisés tout au long de cette thèse.

Le chapitre 3 portera sur l'étude des performances des rotors actuels dans le cadre de l'utilisation de systèmes biphasiques aqueux afin de disposer d'un point de référence lors de la modification de l'instrument. Cela permettra également de définir un cahier des charges précis.

Le chapitre 4 quant à lui montrera l'évolution des différents designs testés et les performances associées à ces rotors monobloc tridimensionnels créés pour les ATPS.

Les performances complètes du rotor final feront l'objet du chapitre 5 présentant une comparaison avec les rotors commercialisés actuellement par la société Rousselet-Robatel afin de vérifier son bon

fonctionnement et les améliorations observées grâce à la nouvelle technologie de fabrication. De plus une étude plus poussée portera sur la diminution du volume d'injection et son effet sur la sensibilité.

Pour terminer ces travaux de thèse, les aspects de contamination et de nettoyabilité seront abordés par l'évaluation d'une méthode de détection in-situ de la présence de protéines dans les rotors.

Chapitre 1

BIBLIOGRAPHIE

1. Purification des protéines

De nos jours, les macromolécules biologiques telles que les protéines représentent une classe de produits importante dans l'alimentation, la biotechnologie, la pharmaceutique et les cosmétiques. En effet, au cours des vingt dernières années une attention particulière est portée sur leur production et leur utilisation en tant que suppléments diététiques, leur potentiel de modification sur l'alimentation existante et enfin sous forme très pure leur application dans le domaine de la santé (1). Par exemple, le marché des protéines pharmaceutiques vaut aujourd'hui plus de 100 milliards de dollars ce qui représente près de 20% du marché pharmaceutique (2). De plus, les scientifiques tentent de comprendre de plus en plus au niveau moléculaire la biologie cellulaire. De ce fait, la biotechnologie cherche à développer de nouvelles applications à base de protéines ainsi que leur exploitation commerciale. Un besoin grandissant se fait donc ressentir pour développer des méthodes de purification de protéines rapides et efficaces.

La purification des protéines est réalisée depuis plus de 200 ans. En 1789, A. Fourcroy a essayé d'isoler des substances préparées à partir des plantes ayant des propriétés similaires à l'albumine du blanc d'œuf (3). Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, les seules technologies de séparation disponibles étaient des méthodes telles que la filtration, les précipitations et la cristallisation. Ainsi en 1840, Felix Hoppe-Seyler a préparé les premiers cristaux d'hémoglobine (4). Aujourd'hui différentes techniques existent dans le but de purifier les protéines. Dans ce chapitre un état de l'art sera réalisé pour décrire l'ensemble des techniques de purification des biomolécules.

La série de procédés de séparation utilisés pour purifier les produits biologiques peut être décrite collectivement par le terme « downstream processing » (DSP). Le DSP est généralement composé d'une séquence d'opérations de récupération et de purification dont l'objectif final est d'obtenir les protéines à un niveau de pureté désiré (5). L'objectif essentiel du développement et de l'optimisation du protocole de DSP est la production de produits de qualité avec une pureté suffisante tout en maintenant l'activité biologique quand celle-ci est essentielle. Les lignes directrices en matière de qualité et de sécurité pour les produits biotechnologiques sont de plus en plus strictes, c'est le cas de l'organisation internationale de normalisation (ISO) ou encore de la Food Drug Administration (FDA) et de la Pharmacopée Européenne. De ce fait, le DSP représente la partie la plus importante dans le milieu industriel. En effet ce dernier va définir la qualité du produit final mais également le coût de production. Le DSP représente aujourd'hui entre 50% et 80% du coût de production des protéines (6). Cela est dû aux critères de qualité rigoureux imposés aux produits protéiques, tels que la pureté, l'efficacité, la puissance, la stabilité, la toxicité définie, la toxicité.

La complexité des matériaux biologiques et les différences dans les propriétés des composants du mélange réactionnel posent des défis pour l'industrie des bioprocédés. En effet, les étapes de purifications et de fractionnement agissent directement sur l'activité biologique ainsi que sur le coût de production (7, 8). Les différentes opérations qui ont lieu au cours des DSP sont illustrées dans la figure 1.1

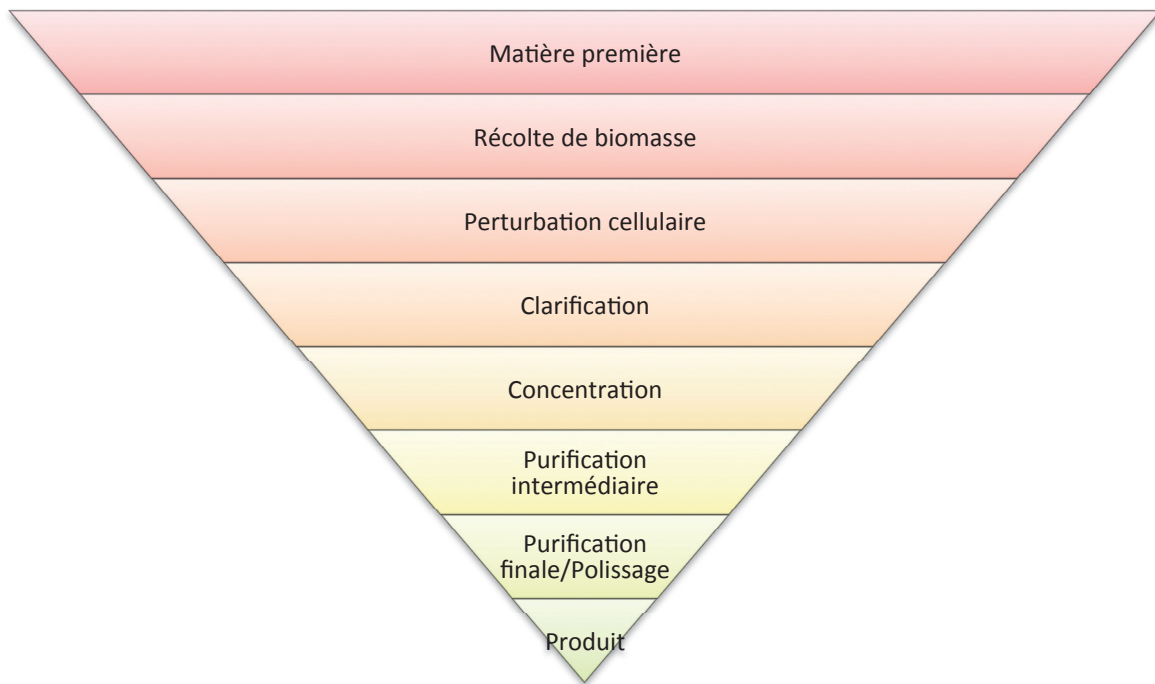


Figure 1.1 : Représentation des étapes qui ont lieu au cours du downstream processing (9)

Les trois premières étapes de la figure 1.1 représentent la production de la protéine qui peut être issue de culture cellulaire. La perturbation cellulaire consiste à libérer des molécules biologiques, les protéines et les enzymes en solution libre pour faciliter leur récupération (1). Il s'agit de ce que l'on appelle plus communément la lyse. Elle peut être réalisée soit par sonification, congélation/décongélation (10) ou par des moyens mécaniques tels qu'un homogénéisateur ou une presse. Suite à cela, la molécule d'intérêt se trouve alors en mélange avec des fragments de cellules et des molécules de toute sorte. Afin d'éliminer l'ensemble des suspensions, une étape de clarification est nécessaire. Elle est généralement constituée de filtration « Direct Flow filtration ». Cette technique consiste à filtrer l'ensemble du fluide grâce à l'application d'une pression dans une direction perpendiculaire à un filtre de surface. Les contaminants sont ainsi capturés grâce aux moyens de filtration ou s'accumulent en surface, ce qui entraîne une augmentation de la pression différentielle à travers le filtre. La filtration est achevée lorsque la pression différentielle du filtre a atteint son maximum de travail.

Une fois que les débris ont été éliminés, il faut purifier plus sélectivement la protéine désirée par différentes étapes de purifications intermédiaires et une purification finale appelée polissage. La purification intermédiaire permet d'éliminer l'ensemble des contaminants en vrac comme les virus ou autres contaminants. Lors de cette étape, diverses méthodes peuvent être utilisées, comme l'extraction liquide-liquide en milieu biphasique aqueux ou la chromatographie d'interaction hydrophobe. La dernière étape de purification des protéines pour l'obtention de composés pure est le polissage. Cette étape consiste en l'élimination des contaminants à l'état de trace et des impuretés

qui peuvent être sous la forme d'isoformes indésirables (11) . Cela correspond à une étape de haute sélectivité et qui est réalisée de manière générale par de la chromatographie d'affinité.

1.1. Méthodes non chromatographiques : étape de purification intermédiaire

Les besoins en pureté ne sont pas toujours élevés et dans certains cas, une étape de purification unique suffit pour obtenir la qualité souhaitée. Les techniques chromatographiques étant souvent limitées par une faible productivité et un faible rendement (12), les aspects économiques vont donc orienter le choix du procédé vers des techniques non chromatographiques. Comme documenté par Przybycien et al (13), trois techniques sont répandues dans le milieu industriel, à savoir la précipitation, la cristallisation et l'extraction liquide-liquide en milieu biphasique aqueux (ATPE).

1.1.1. Précipitation et cristallisation

La précipitation des protéines repose sur le principe qu'une solution de protéines est homogène seulement jusqu'à une certaine concentration de protéines au-delà de laquelle un précipité commence à apparaître. Ainsi la modification des conditions environnementales permet de dépasser la limite de solubilité permettant ainsi la formation du précipité (14). La méthode de précipitation est employée depuis des décennies pour la purification des protéines à l'échelle laboratoire (15). Historiquement la précipitation par l'éthanol était utilisée mais cela ne permettait qu'un recouvrement faible de l'ordre de 50%. Afin d'éviter la dénaturation des protéines, le processus est réalisé à 5°C. Aujourd'hui, l'utilisation principale se fait avec l'utilisation de la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. La technique de purification est appliquée à la purification de certains produits pharmaceutiques (16-18) essentiellement des anticorps monoclonaux avec un taux de pureté supérieur à 90% et un recouvrement compris entre 59% et 96%. Récemment une utilisation à l'échelle industrielle a été faite pour permettre la purification par précipitation sélective de la pectine avec un recouvrement de 50% (19). Mais cette utilisation souffre cependant d'un faible niveau de rendement et de pureté (20). De plus, il faut noter qu'il reste encore beaucoup à comprendre sur la technique de précipitation (14). Cette technique se prête à la purification de larges volumes mais n'est pas sélective comparée aux autres techniques. Les précipitations de protéines sont alors principalement utilisées pour des produits de faible valeur (21).

La cristallisation est une forme de précipitation dans laquelle le précipité est formé de manière ordonnée à partir de solutions sursaturées (22, 23). La cristallisation est une méthode qui peut parfois apporter des solutions de purification très performantes (24, 25). Des protéines purifiées par cristallisation sont actuellement commercialisées comme le lactose (26), l'ovalbumine (27) ou encore certains anticorps monoclonaux tels que IgG 1, IgG2s ou en encore le mAB IDEC-152 (25). Néanmoins, malgré son faible coût d'utilisation, l'utilisation de la cristallisation comme technique de purification reste, comme pour la précipitation, limitée. En effet, sa faible sélectivité la rend difficile en procédé unique (28). Son utilisation se fait de manière générale lors des toutes premières étapes de purification puisqu'elle peut être mise en œuvre sur de grands volumes (21).

Les techniques de cristallisation et de précipitation peuvent surmonter certains points sensibles des opérations actuelles de la DSP grâce à leur capacité à gérer un volume élevé et également permettent de concentrer l'échantillon pour diminuer par la suite le nombre d'étapes dans le DSP (25, 29).

1.1.2. L'extraction liquide-liquide utilisant des systèmes biphasiques aqueux

L'extraction liquide-liquide représente une technique alternative intéressante de purification car plusieurs caractéristiques des premières étapes de la DSP peuvent être combinées en une seule opération. L'extraction liquide-liquide est une technique qui consiste à l'utilisation de deux liquides non miscibles qui forment deux phases entre lesquelles il y a un partage sélectif des analytes par rapport aux contaminants (30). Ce processus est largement utilisé dans l'industrie chimique en raison de sa simplicité, de son faible coût et de sa facilité de montée en échelle (31). Il représente une technique prometteuse pour la purification des biomolécules (15).

L'application de cette technique à la purification des biomolécules résulte dans la découverte d'un nouveau système solvant par Beijeirick en 1896, qui se nomme ATPS pour Aqueous Two Phase System. Un système ATPS est formé par l'incompatibilité de deux polymères ou d'un polymère et d'un sel en solution aqueuse (32). La séparation spontanée des phases a lieu au-dessus d'une concentration critique des composés donnant lieu à deux phases enrichies en l'un des composants respectivement. Albertson les a exploités dès les années 50 et a démontré l'importance de l'utilisation des ATPS pour la séparation des biomolécules (33). Ainsi ces phases ont été utilisées avec succès dans le protocole de purification de l'acide nucléique : c'est la naissance de la technique ATPE (Aqueous Two Phase Extraction) (34). Ainsi la formation de deux phases aqueuses non miscibles a permis la partition de particules cellulaires. Il a poursuivi ses travaux avec des micro-organismes et différents types de particules cellulaires de plantes (35) et a constaté que le partage se fait de manière sélective entre les deux phases, les particules étant présentes dans l'une des deux phases ou à l'interface. La composition majoritaire de ce système biphasique étant l'eau, ces systèmes fournissent un environnement biocompatible aux biomolécules. Au cours des vingt années suivantes, Albertson et al ont ainsi développé et appliqué différents types de systèmes biphasiques aqueux pour séparer des virus, des cellules (34). Cette technique alternative vise à travailler de manière plus rapide et éviter les problèmes relatifs aux méthodes chromatographiques tels que le coût élevé, la capacité de charge limitée. L'ATPE a été utilisée pour différents types de protéines dont les anticorps (36) avec haut taux de production. De plus un modèle permettant la montée en échelle a été développé par Mao et al (37).

Malgré l'utilisation de cette technique pour la purification des protéines, l'implémentation de cette approche dans les industries est en retard. Cela peut s'expliquer par le fait que cette technique manque d'efficacité et s'avère peu sélective. En effet, la protéine d'intérêt peut aller dans une seule phase ou à l'interphase, de même pour les contaminants et dans le cas des protéines, ces dernières possèdent souvent des affinités proches les unes des autres et également par rapport aux non protéines rendant la séparation non possible avec cette technique (15).

Afin d'augmenter l'efficacité de partage de ce procédé liquide/liquide, une expérience utilisant la distribution à contre-courant (CCD) avec un système solvant composé de PEG/ dextran a été réalisée, ce qui a ouvert la voie à la purification des protéines par des techniques chromatographiques de contre-courant mettant en œuvre les ATPS (38). Nous reviendrons sur ce sujet dans le paragraphe 3.

1.2. Les techniques chromatographiques

Les bio-séparations utilisant les colonnes chromatographiques dominent les industries pharmaceutiques depuis des années 1980 (13). En effet, différentes techniques de chromatographie sont utilisées afin de permettre la purification de protéines. Parmi celles-ci, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC) ou encore la chromatographie d'affinité.

1.2.1. La chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions sépare les protéines en fonction de la différence de charges de surface ce qui confère une haute résolution de séparation (39). Cette technique se base sur le principe des interactions électrostatiques et de la différence des charges de surface nette des protéines à séparer (figure 1.2), c'est à dire sur la capacité de charge de la macromolécule biologiquement active. La séparation est basée sur des interactions électrostatiques réversibles entre les groupes ioniques de la phase stationnaire et les groupes ioniques de la surface de la protéine de charge opposée (40). Les colonnes chromatographiques sont constituées d'une matrice à laquelle est fixée un ligand chargé. Il existe donc différents types de matrice qui peuvent être de base dextran (sephadex), de base agarose (sepharose) ou encore de base cellulose réticulée (DEAE sephacel) (41). Les ligands quant à eux sont de deux types : échangeurs d'anions ou échangeurs de cations (tableau 1.1). Ces derniers peuvent être considéré comme échangeurs forts, c'est le cas des groupements SOO^{3-} et $-\text{OH}-\text{R}_3\text{N}^+$ ou échangeurs faibles comme pour les groupements COO^- et RN^+ .

Tableau 1.1 : Liste de phases stationnaires utilisées en chromatographie échanges d'ions

Echangeur d'anions	
Diethylaminoethyle (DEAE)	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
Quaternaire aminoethyle (QAE)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$
Ammonium quaternaire (Q)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Echangeur de cations	
Carboxymethyl (CM)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$
Sulfopropyl (SP)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
Methyl sulfonate (S)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

Les protéines sont introduites dans la colonne dans des conditions de pH pour lesquelles la charge des protéines est opposée à celle de la phase stationnaire. Les conditions altèrent ensuite cette liaison pour permettre l'élution différentielle des différentes protéines. L'élution est réalisée soit en augmentant la concentration en sel de la phase mobile soit en modifiant le pH (42, 43). De nombreux exemples dans la littérature utilisent cette technique pour purifier différentes protéines (44-47).

Les avantages de cette technique sont le faible coût de la phase stationnaire et la forte capacité de charge. À l'inverse, son exigence de chargement d'échantillons dans des tampons de faible force ionique rend la chromatographie d'échange d'ions une excellente deuxième étape de purification

après une Chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC) (48). La chromatographie d'échange d'ions, contrairement à d'autres méthodes de chromatographie, permet également des débits élevés, ce qui, dans certains cas, peut être crucial pour la récupération de protéines actives (46).

Malgré la haute résolution de cette technique de purification, le problème est l'élution avec de haute concentrations en sel ou le changement de pH entrainant parfois la dénaturation des biomolécules (49). De plus il peut y avoir formation d'agrégats entre des contaminants et la matrice possédant des charges similaires aux protéines d'intérêts. Un pH non contrôlé pendant la phase d'élution peut également avoir un effet sur la stabilité de la protéine et engendrer sa précipitation (50). En effet, les échangeurs d'ions faibles ont une dépendance au pH et de ce fait, ces résines perdent rapidement de la capacité de charge et de la résolution lorsqu'ils travaillent en dehors de leur gamme de pH optimale.

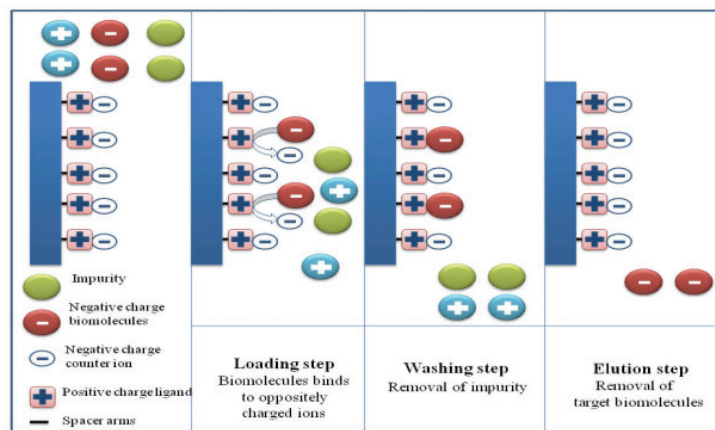


Figure 1.2: Schéma du principe de séparation de biomolécules chargées par chromatographie d'échange d'ions (49)

1.2.2. La chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC)

Une technique de chromatographie alternative est la chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC). La HIC sépare les protéines en fonction de leur hydrophobicité (figure 1.3). La séparation est basée sur l'adsorption de la région hydrophobe de la protéine sur la phase stationnaire faiblement hydrophobe (51). Cette interaction est renforcée par un tampon à haute force ionique, on parle alors de répulsion saline (salting out), ce qui permet à la HIC d'être une très bonne étape compatible après une chromatographie d'échange d'ions puisqu'elle fournit des échantillons riches en sel. Les échantillons sont la plupart du temps élués par un gradient décroissant en ammonium sulfate. Cette technique est utilisée lorsqu'une espèce de protéine a besoin d'être séparée de sa forme monomérique (52). Comme pour la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire est constituée d'une matrice à laquelle des ligands plus ou moins polaires sont fixés. Les supports les plus utilisés de type carbohydrates hydrophiles (comme l'agarose réticulée), la silice. Concernant les ligands, les plus courants sont des chaînes alcanes linéaires avec ou sans amine-terminal. Les noms commerciaux sont TSKgel, Phenyl-5PW ou encore Separon-HEMA, octyl-sepharose ou phényl-sepharose.

La technique est bien adaptée dans le cadre d'étape intermédiaire dans un protocole de purification. En effet cette technique vient généralement après une étape de précipitation ou avant une étape de chromatographie d'échange d'ions. En effet elle permet d'avoir une haute résolution tout en concentrant l'échantillon et également de disposer d'une haute capacité de charge de l'échantillon (49, 53) (54). Elle peut également être utilisée pour l'étape de polissage suivant la complexité de l'échantillon.

Le bénéfice de la HIC est une haute sélectivité, de ce fait des variants peuvent être séparés (52). Néanmoins, le besoin de haute concentration en sel peut causer des risques de dénaturation qui sont intensifiés à plus grande échelle de production (52).

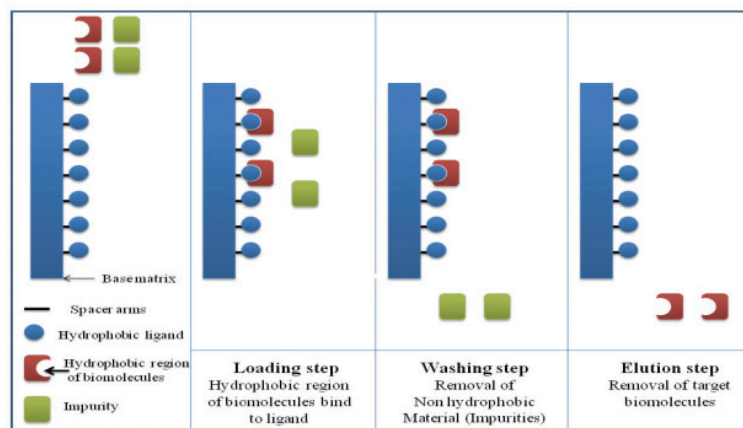


Figure 1.3 : Schéma du principe de séparation de biomolécules par chromatographie d'interaction hydrophobe (49)

1.2.3. La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité joue un rôle majeur dans les étapes de purification de protéines. En effet cette dernière est une technique la plus spécifique et la plus efficace (6, 55). Elle est basée sur le principe de la reconnaissance biomoléculaire (figure 1.4), c'est à dire sur la capacité de la protéine active à former un complexe spécifique et réversible avec un ligand (56). Les ligands comprennent des inhibiteurs enzymatiques, des enzymes des substrats, des coenzymes, des anticorps et certains colorants (57). La grande spécificité liée à la nature de la liaison entre le ligand et la protéine fait que cette technique est essentiellement appliquée aux anticorps du fait de leur haute valeur ajoutée (29, 58-60).

La phase stationnaire utilisée comme support de ligands dans ce type de chromatographie peut être de différentes natures. De type naturelle avec de l'agarose possédant le nom commercial de Sepharose, du dextran de nom Sephadex. De nature synthétique avec le polystyrène ou encore le polyméthacrylate (nom commercial Separon HEMA). Enfin de nature inorganique avec de la silice poreuse ou encore de l'oxyde de titane TiO_2 (55). Concernant les ligands, ils représentent les composants principaux d'une mise en œuvre réussie de la chromatographie d'affinité. Leurs qualités pour être utilisables comprennent la spécificité, la faisabilité d'immobilisation, la stabilité dans les

conditions de lavage sévères et la rétention de la liaison cible après fixation à la matrice (61). Ces ligands peuvent être classés en trois groupes : les ligands biospécifiques, les ligands pseudo-biospécifiques et les ligands synthétiques (55). Les ligands biospécifiques correspondent aux anticorps reliés aux protéines d'origine naturelle. C'est le cas par exemple des protéines A, G, et L qui sont les plus communément utilisées dans le cadre de la purification des anticorps. Pour exemple la protéine A est isolée de la paroi cellulaire du *Staphylococcus aureus* (62). Les ligands synthétiques sont générés en utilisant un modèle basé sur le design en considérant sa structure et son aspect fonctionnel (63). Néanmoins cette technique souffre d'un coût élevé de mise en œuvre. En effet les coûts de production notamment des ligands sont de l'ordre 10 000 \$ par gramme de protéines A, pour les anticorps monoclonaux 1200 \$ - 1500 \$ (1). Il faut également faire face à une faible stabilité chimique et biologique de l'adsorbant (6). La fabrication des ligands compatibles représente une partie importante de la recherche notamment pour déterminer son mode de fixation pour une séparation spécifique. De plus, les ligands utilisés doivent faire preuve d'une grande pureté. Enfin, l'inconvénient majoritaire est la faible capacité de charge de l'échantillon dans le cadre de production.

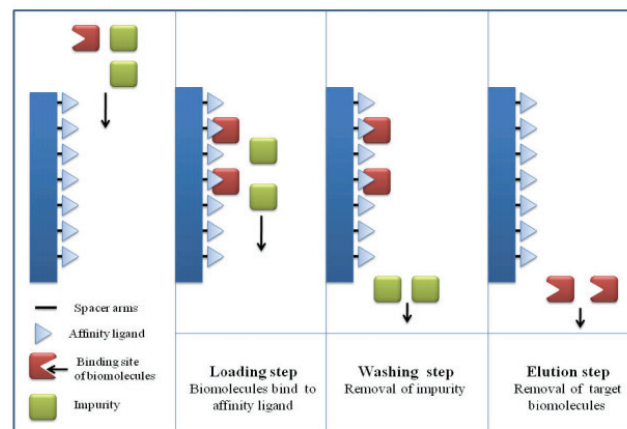


Figure 1.4 : Schéma du principe de séparation de biomolécules par chromatographie d'affinité (49)

La purification finale qui est réalisée en majorité par les techniques chromatographiques est indispensable pour assurer une qualité optimale des lots, mais comme nous avons pu le voir, elle est très onéreuse et traite de faibles volumes d'échantillon. Afin de diminuer les coûts de cette étape primordiale, il faut au préalable améliorer la pureté des échantillons arrivant à la dernière étape de purification. De plus, la réduction des étapes présentes dans la DSP permet de réduire les coûts en utilisant des méthodes alternatives. Afin de répondre à cette problématique, il est intéressant de regarder les avantages de la technique d'extraction liquide-liquide. Constatant que le gros désavantage de cette technique est le manque d'efficacité ainsi que le manque de sélectivité, nous pouvons améliorer ce procédé en apportant plus de plateaux et éviter les pertes d'échantillons entre les différentes extractions successives. Pour cela nous proposons d'introduire la chromatographie liquide-liquide ou chromatographie de partage centrifuge, dont le principe sera décrit dans le paragraphe suivant, comme technique alternative dans l'étape de purification intermédiaire du DSP.

2. La chromatographie liquide-liquide

La chromatographie liquide-liquide (LLC) est une technique préparative liquide-liquide permettant de séparer des solutés grâce à un système solvant biphasique composé de deux liquides non miscibles. La phase stationnaire est maintenue au sein de la colonne par application d'une force centrifuge tandis que la phase mobile est poussée au travers à l'aide d'une pompe.

Cette technique est très utilisée dans le cadre de la purification de produits naturels du fait de ses nombreux avantages tels que la grande diversité de systèmes solvants biphasiques utilisables, la capacité de charge importante, la récupération de l'échantillon en cas d'absorption irréversible (64-66).

2.1. Historique

Le point de départ du développement des techniques de chromatographie liquide-liquide a été la mise au point d'appareils basés sur le principe de la distribution à contre courant (DCC) par Craig et al (67) dans les années 50. Ces appareils sont composés d'unités en verre montées en série conçus de telle manière à ce que la phase lourde soit maintenue au sein du tube par force de gravitation et que la phase légère passe d'une unité à la suivante (figure 1.5), chaque ampoule pouvant être assimilée à une cellule de transfert de phase (extraction liquide-liquide à un étage).

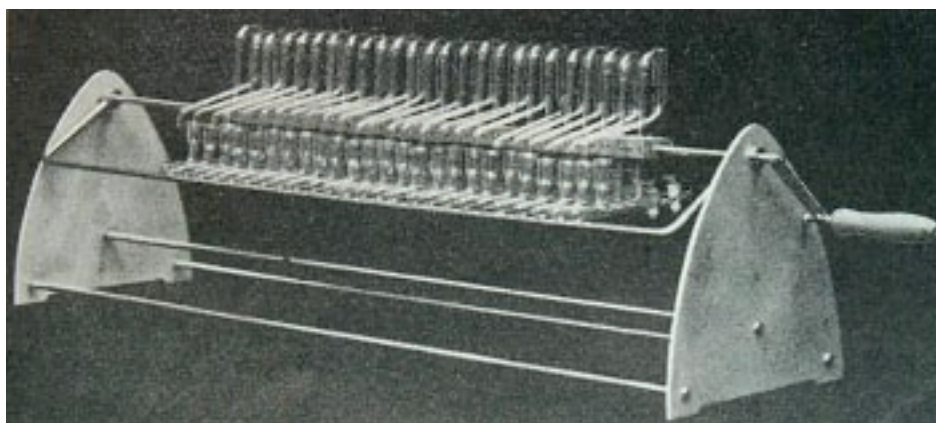


Figure 1.5 : Photographie de la machine de Craig (68)

Ce n'est qu'en 1966, qu'une équipe japonaise composée de Y.Ito (69) proposa pour la première fois l'utilisation de la force centrifuge pour maintenir une phase liquide au sein d'une colonne (au lieu de la gravitation). Il nomme ce concept la chromatographie à contre-courant (CCC). A partir de ce premier développement, deux technologies différentes découlent. La première développée par Ito est une gamme d'appareils appelés CCC ou appareils hydrodynamiques, une gamme basée sur la

variation de la force centrifuge produite par deux axes de rotation. La deuxième technologie, développée par Nunogaki et ses collaborateurs au Japon (70), se nomme chromatographie de partage centrifuge ou instruments hydrostatiques qui ne comportent qu'un seul axe de rotation et donc une force centrifuge constante.

2.2. Terminologie

L'utilisation du terme chromatographie à contre-courant est très discutée au sein de la communauté scientifique. En effet ce terme n'est pas encore un terme approuvé par l'IUPAC qui semble confondre le concept et l'instrumentation (71). Le défaut majeur dans cette appellation résulte dans le fait que l'ensemble des techniques actuelles ne comporte pas de contre-courant. Néanmoins, le terme contre-courant est utilisé depuis près de 70 ans. Par conséquent, le terme chromatographie liquide-liquide a été choisi dans ce manuscrit pour discuter de la technique de séparation chromatographique mettant en œuvre une phase stationnaire liquide et une phase mobile liquide. Se distingueront ensuite les deux appareillages hydrostatique (CPC) et hydrodynamique (CCC) (Figure 1.6).

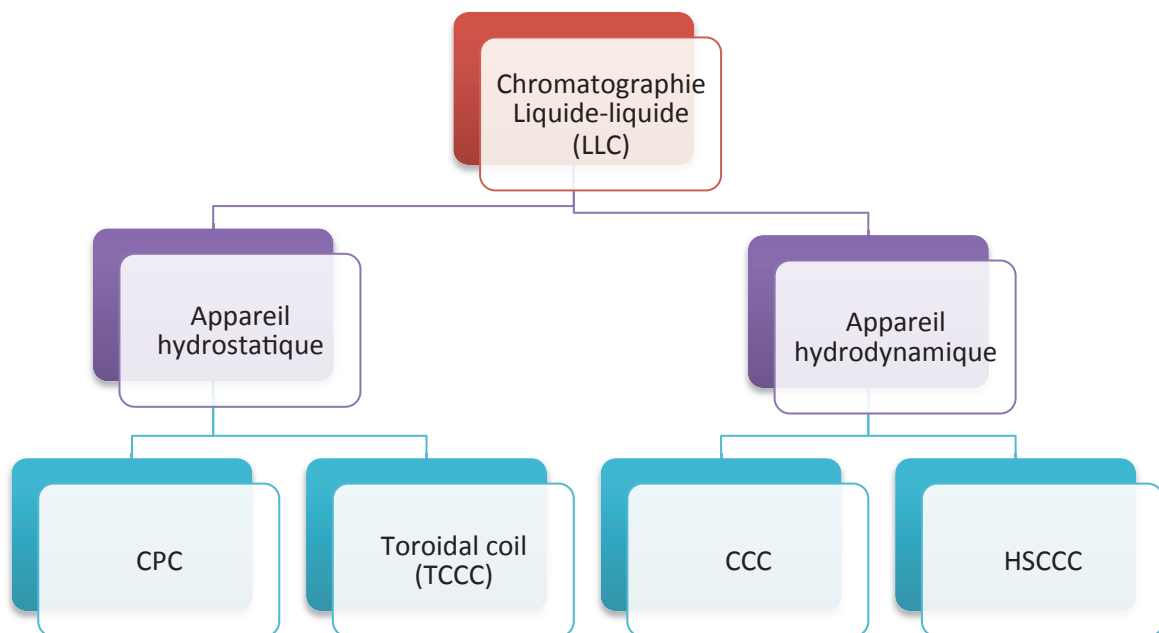


Figure 1.6 : Dénomination des différentes techniques de chromatographie liquide-liquide

2.3. Instrumentation disponible

2.3.1. Appareils hydrodynamiques

Les appareils hydrodynamiques sont composés de bobines de tube Téflon® (Fig.1.7 a) enroulées autour de deux axes de rotation. Un axe central et un axe planétaire générant une force centrifuge variable (figure 1.7 b). Il existe plusieurs types d'appareils hydrostatiques dont le J-type multi layer et le non-synchronous CCC. Un cycle continu de mélange, de décantation et de séparation se produit au sein de la colonne. Ainsi les échanges chromatographiques ont lieu au sein de ces zones de mélanges et de décantation formées par la variation de la force centrifuge (72).

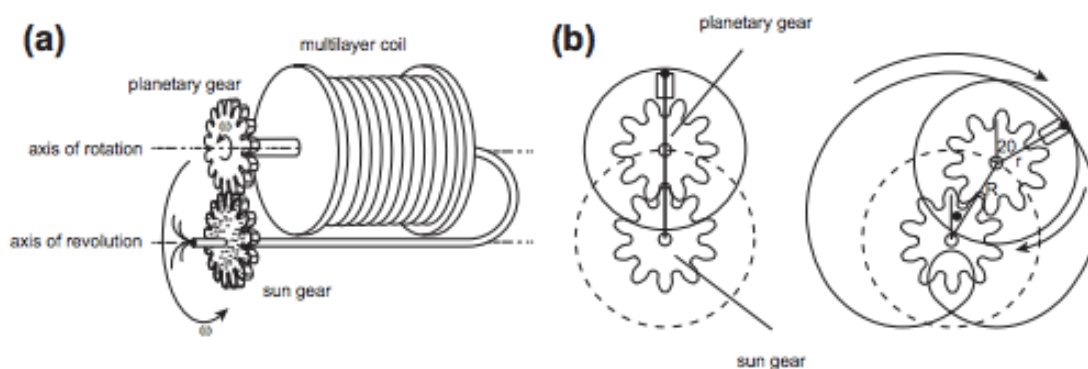


Figure 1.7 : Schéma représentant a) le design de l'appareil hydrodynamique b) le mouvement planétaire (73).

2.3.2. Appareils hydrostatiques

Les appareils hydrostatiques possèdent un design différent des appareils hydrodynamiques. En effet, ils sont constitués de disques en acier inoxydable empilés les uns sur les autres au sein desquels sont gravés des chambres et des canaux formant les cellules (figure 1.8). Entre chaque disque, un joint en Téflon® est interposé afin de permettre l'étanchéité de la colonne. L'ensemble forme ainsi ce que l'on appelle le rotor. Ces cellules peuvent être simples (figure 1.9 A) ou doubles (figure 9.B). Les cellules doubles contiennent donc deux chambres qui peuvent être rectangulaires, sphériques ou oblongs (figure 1.10).

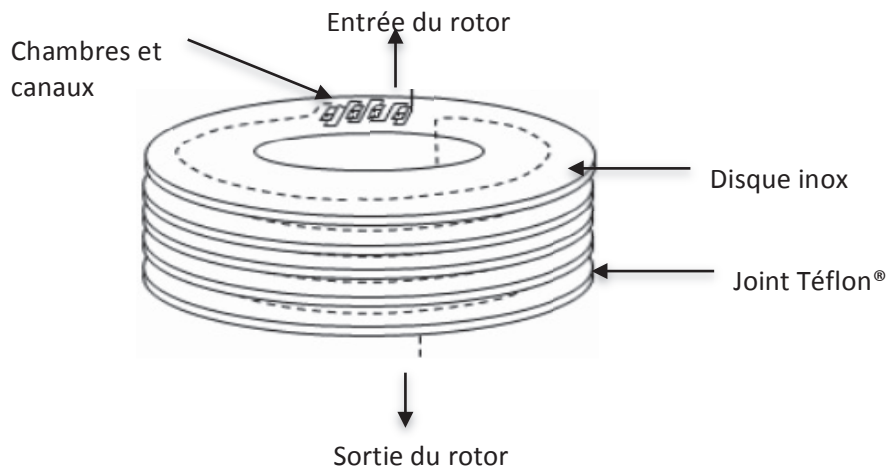


Figure 1.8 : Représentation d'un rotor de la technologie CPC



Figure 1.9 : Photographies de disques de rotors CPC commercialisés. A) Cellules Z ; B) Cellules twins



Figure 1.10 : Représentation de cellules doubles oblongs (gauche) et sphériques (droite) (74)

Le passage de la phase mobile au sein du rotor se fait par le passage à travers de deux joints rotatifs comportant une partie statique et une partie rotative. Un système de refroidissement est parfois mis en place afin de contrôler l'échauffement au sein du système créé par la rotation du rotor. Le risque d'un tel échauffement est la modification de l'équilibre des phases composant le système solvant ainsi qu'un changement des valeurs des coefficients de partage des composés au cours de l'opération. Une force gravitationnelle constante est produite par la présence d'un unique axe de rotation vertical. Ainsi, la phase stationnaire est piégée au sein des cellules. La phase mobile quant à

elle est pompée à travers la phase stationnaire, cellule par cellule. Ainsi les échanges chromatographiques ont lieu dans les chambres.

2.4. Principe de la chromatographie liquide-liquide (LLC)

Dans le cadre de la LLC, le mécanisme de rétention est généré par un partage liquide-liquide des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile (contrairement à la chromatographie liquide dont le mécanisme repose sur l'adsorption des solutés sur la phase stationnaire solide) qui est défini par le coefficient de partage K_D du soluté dans le système biphasique.

$$K_D = \frac{[\text{soluté}]_{\text{phase stationnaire}}}{[\text{soluté}]_{\text{phase mobile}}} \quad \text{Equation 1.1}$$

Expérimentalement, la rétention du soluté va dépendre du coefficient de partage ainsi que des volumes de phase mobile et de phase stationnaire respectivement (72)

$$V_R = V_M + K_D \times V_S \quad \text{Equation 1.2}$$

Avec V_M le volume mort de la colonne représentant le volume de phase mobile présent dans la colonne, K_D le coefficient de partage et V_S le volume de phase stationnaire contenu dans la colonne.

Le coefficient de partage est relié à l'affinité du soluté avec l'une ou l'autre des phases. Si la valeur du K_D est supérieure à 1, le soluté a une meilleure affinité pour la phase stationnaire, son volume de rétention sera alors supérieur au volume de la colonne et augmente avec la valeur du K_D ainsi qu'avec la valeur du taux de phase stationnaire. Au contraire si elle est inférieure à 1, le soluté a plus d'affinité pour la phase mobile et son volume de rétention est inférieur au volume de la colonne et il augmentera avec la diminution du taux de phase stationnaire. Enfin si le K_D est égal à 1, le soluté se partage de manière identique entre la phase mobile et la phase stationnaire. De ce fait le volume de rétention du soluté sera égal au volume de la colonne quel que soit le taux de phase stationnaire.

Afin de mettre en place une colonne chromatographique liquide-liquide, le rotor est dans un premier temps rempli entièrement en phase stationnaire. La force centrifuge est alors établie pour permettre la rétention de la phase stationnaire au sein de la colonne. Dès lors, la phase mobile est poussée à travers la phase stationnaire entraînant une perte de cette dernière jusqu'à l'établissement de l'équilibre au sein de la colonne. Le volume de phase stationnaire déplacé peut être mesuré en sortie de colonne à l'aide d'une éprouvette graduée. Ce volume correspondra au volume de phase mobile présent dans la colonne et donc au volume mort. Ainsi le taux de phase stationnaire contenu dans la colonne peut être déterminé par le calcul du rapport entre le volume de phase stationnaire et le volume de la colonne :

$$Sf = \frac{V_S}{V_C} \times 100 \quad \text{Equation 1.3}$$

À noter que ce taux de phase stationnaire pourra également être déterminé par l'injection d'un marqueur de temps mort (composé non retenu au sein de la colonne)

2.5. Avantages de la LLC

L'avantage principal de la technique LLC repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire liquide. Ainsi, il est possible d'utiliser l'une ou l'autre des phases du système solvant en tant que phase stationnaire (72). Il sera donc possible de travailler selon deux modes différents : le mode descendant et le mode ascendant. Le mode descendant consiste à travailler avec la phase légère (phase supérieure) comme phase stationnaire et la phase lourde (phase inférieure) comme phase mobile. Au contraire le mode ascendant consiste à l'utilisation de la phase lourde en tant que phase stationnaire et la phase légère en tant que phase mobile.

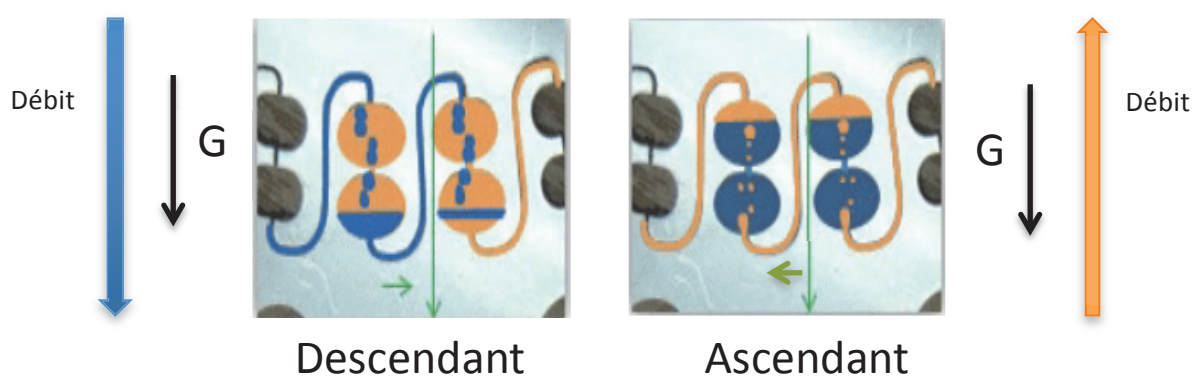


Figure 1.11 : Représentation du comportement du système solvant lors de l'utilisation des modes ascendant et descendant. La phase bleue représentant la phase inférieure et la phase orange la phase supérieure (75)

Un autre avantage est lié au faible risque de perte d'échantillon puisqu'un soluté ne pourra être adsorbé de manière définitive par la phase stationnaire. En effet, il est possible d'extruder aisément la phase stationnaire (76). Cela offre à la fois la possibilité de récupérer les composés trop retenus, ce qui est un avantage considérable pour la purification de composés à haute valeur ajoutée ; mais également la possibilité de bénéficier d'une phase stationnaire fraîche à chaque injection ce qui dans le cadre de la purification de biomolécules peut éviter des contaminations croisées.

En LLC, la capacité de charge est plus importante que celle observée en chromatographie liquide préparative. En effet la phase stationnaire étant liquide, les différents composés ont accès à l'ensemble du volume de la phase stationnaire (72). Ainsi, la surcharge de la phase stationnaire est un problème moindre pour la LLC que pour l'HPLC du fait du volume élevé de phase stationnaire disponible.

Enfin la LLC présente une sélectivité unique car la possibilité d'utilisation de systèmes solvants biphasiques est importante. En effet la nature des solvants utilisés et les proportions permettent ainsi d'établir un nombre incalculable de systèmes biphasiques. De plus du fait de l'utilisation de solvants, le coût de la phase stationnaire est donc moindre comparé à la phase stationnaire des

colonnes HPLC notamment à l'échelle préparative. Il est tout à fait envisageable de tester et/ou de disposer d'un grand nombre de phases stationnaires de chimie différente, contrairement aux coûteuses colonnes de silice greffée. Il est toutefois important de connaître les caractéristiques physico-chimiques des systèmes solvants utilisés afin de déterminer le partage adéquat des protéines ainsi que les conditions de manipulation et de travail de ces derniers.

Au sein de cette technologie, nous souhaitons mettre en œuvre des systèmes solvants biphasiques aqueux ATPS pour la purification des protéines. Avant de réaliser un tour d'horizon des expériences en ce sens, la section suivante offre une vue générale des caractéristiques physico-chimiques de ces systèmes biphasiques.

3. Systèmes ATPS

La capacité de deux solutions aqueuses à former deux phases non miscibles lorsqu'elles sont en équilibre à une certaine concentration est nommée « Aqueous Two Phase System » (ATPS). Elles nécessitent des polymères de structures différentes tels que le polyéthylène glycol (PEG) et le dextran ou un polymère et un sel comme le PEG et le phosphate. L'incompatibilité des différents polymères et sel utilisés permet ainsi de disposer de deux phases en solution (32). La séparation spontanée des phases a lieu au-dessus d'une concentration critique des composés donnant lieu à deux phases enrichies en l'un des composants respectivement.

Il existe différents types d'ATPS classés selon la nature chimique de leurs composants principaux tels que des polymères, des sels, des surfactants (77, 78). De manière générale on peut classer les ATPS selon deux grands groupes (79) :

- polymère/sel
- polymère/polymère

Les interactions chimiques impliquées dans la formation des phases en ATPS peuvent être de type hydrophobe, interactions électrostatiques ou de répulsions salines et sont fortement dépendantes des composants des ATPS, et ces propriétés peuvent être exploitées dans le cadre de la purification des protéines (paragraphe 2.4).

Une sélection d'exemples est présentée dans le tableau 1.2

Tableau 1.2 : Liste non exhaustive de systèmes solvants ATPS

Polymère	Polymère	Références
Polyéthylène glycol	Dextran	(80)
	Maltodextrine	(81)
Ethylène oxide propylène oxide	Dextran	(82)
	Maltodextrine	(83)
Polymère	Sel	Références
Polypropylène glycol	chlorure de sodium	(84)

Polyéthylène glycol	Phosphate de potassium	(85)
	Acide amino	(86)
	Sulfate d'ammonium	(87)
polyéthylène oxyde- polypropylène oxyde Ethylène	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(88)
oxyde propylène oxyde	NH_2PO_4	(89)

Plus récemment, une attention particulière a été apportée à l'utilisation de polymères thermo-sensibles tels que l'éthylène oxyde propylène oxyde (EOPO) (90) ou encore le polyéthylène oxyde-polypropylène oxyde (PEO-PPO) (88) dont la solubilité dans l'eau diminue à haute température, permettant le recyclage des composants du système par simple modification de la température.

3.1. Propriétés physico-chimiques des ATPS

Les premières études du comportement thermodynamique de ces systèmes ont été menées par C. Großmann et al (91). Les propriétés physiques et chimiques ont également été reportées, comme la tension interfaciale (92), la composition des phases, la viscosité et la densité (93). Chaque système ATPS en équilibre thermodynamique peut être caractérisé par son unique diagramme de phase (93). Des différents diagrammes de phases ont été obtenus dans la littérature (87, 94). Le diagramme de phase (figure 1.12) fournit les informations relatives à la composition des phases supérieures et inférieures formant le système solvant ainsi que le ratio du volume des phases. Le point C, représente le point critique pour lequel la composition et le volume des deux phases deviennent identiques. La zone A, correspond à la présence d'une seule phase homogène. Enfin les points X, Y et Z, représentent des compositions initiales d'ATPS différentes qui conduisent à des compositions de phase haute riche en PEG (point T) et des compositions de phase basse riche en sel (point B) identiques mais dans des rapports de volume différents.

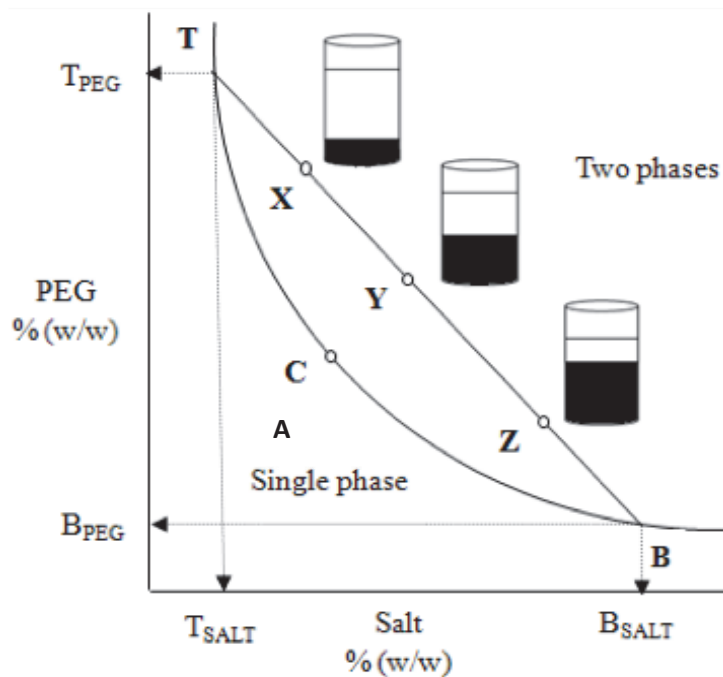


Figure 1.12 : Diagramme de phase théorique d'un système ATPS composé de polyéthylène glycol et d'un sel, issu de (7)

La composition des ATPS va ainsi dépendre du type de constituant du système, nature du polymère et nature du sel (ion et contre ion), de la masse moléculaire du polymère, du pH et de la température. Ces différents paramètres ont largement été décrits dans la littérature. En effet, il a été démontré que la masse du polymère déplace le diagramme de phase (32) et modifie les différences de viscosité et de densité de l'ATPS. Ainsi l'utilisation de PEG à haut poids moléculaire permet d'obtenir la séparation de phase à des concentrations plus faibles (95). L'influence de la nature du sel sur les propriétés physico-chimiques des ATPS a été démontrée dans le cas de systèmes dextran/sel (96). On note que le phosphate, sulfate ou encore le tartrate influence l'affinité des composés vers la phase inférieure. De même l'ajout de ces sels dans des systèmes PEG/dextran interfère de manière significative dans la composition et la position des tie-lines (97). L'effet du pH a été exploré pour le système PEG/phosphate (85). Ainsi il a été démontré que pour un pH variant de 6 à 9,2, les tie lines varient en direction de faibles concentrations en polymère et en sel. Enfin la température va modifier la composition chimique des deux phases composant le système solvant ATPS, ainsi que jouer sur les paramètres physico-chimiques que sont la viscosité et la densité (98, 99). Plus précisément, il a été rapporté que pour les systèmes solvants ATPS composés de deux polymères, les faibles températures favorisent la séparation de phases tandis que ce sont plutôt les hautes températures qui favorisent la séparation des phases pour un mélange polymère/sel (100).

3.2. Application des ATPS à l'extraction liquide-liquide

Les ATPS offrent des environnements chimiques et physiques différents permettant la partition des solutés tels que les protéines, les cellules, les particules cellulaires ou encore les acides nucléiques (101, 102). En effet, leur nature aqueuse permet de créer un environnement non dénaturant pour les biomolécules (comparé aux systèmes solvants organiques). La faible tension interfaciale minimise également la dénaturation permettant de conserver la structure et la fonction de la protéine et permet d'éviter le traitement sévère réalisé avec les systèmes traditionnels d'extraction (96). Dans le cadre d'un système solvant composé de PEG/dextran/ eau ou PEG/sels, les phases contiennent près de 80% à 99% d'eau et possèdent une très faible tension interfaciale de l'ordre de 10^{-7} N/cm. L'activité biologique y est maintenue pendant la séparation, contrairement aux systèmes possédant une haute tension interfaciale (10^{-4} N/cm) et une phase organique ne contenant que 40 à 50% d'eau, dont les conditions entraînent des problèmes de dénaturation et de précipitation des protéines (93).

Il est également possible de modifier les différents constituants des ATPS afin de modifier les coefficients de partage des biomolécules pour améliorer la sélectivité entre soluté d'intérêt et impuretés. Dans le cadre des systèmes solvant polymère/sel, le partage des biomolécules est généralement dirigé par l'effet du volume d'exclusion (phase riche en polymère) et par l'effet du salting out (phase riche en sel). De ce fait avec une haute concentration en polymère ou un haut poids moléculaire et de hautes concentrations en sel entraîneront un partage des biomolécules à l'interface dues aux deux effets mentionné précédemment (103). De manière générale, la modification du poids du polymère peut être très efficace pour jouer sur les coefficients de partage. Augmenter le poids du polymère entraîne un partage de la protéine majoritairement dirigé dans la phase opposée de celle enrichie en polymère. De plus, l'hydrophobie des ions ajoutés par l'intermédiaire du sel entraîne le passage de leurs contre ions vers la phase la plus hydrophobe et inversement (7). De manière générale, pour des protéines chargées positivement, le coefficient de partage augmente avec la série de sels suivante : sulfate>acétate>chlorure>ammonium. Néanmoins, il est important de noter que la concentration en sel trop élevée entraîne un risque de précipitation des protéines. L'ajout de sel neutre dans les systèmes solvants ATPS peut également être utilisé afin de modifier les coefficients de partage des biomolécules. En effet, la présence de sels neutres tels que le NaCl à une concentration supérieure à 1M peut modifier le diagramme de phase et de ce fait modifier le coefficient de partage des protéines. Ces deux effets sont ainsi illustrés par la figure 1.13.

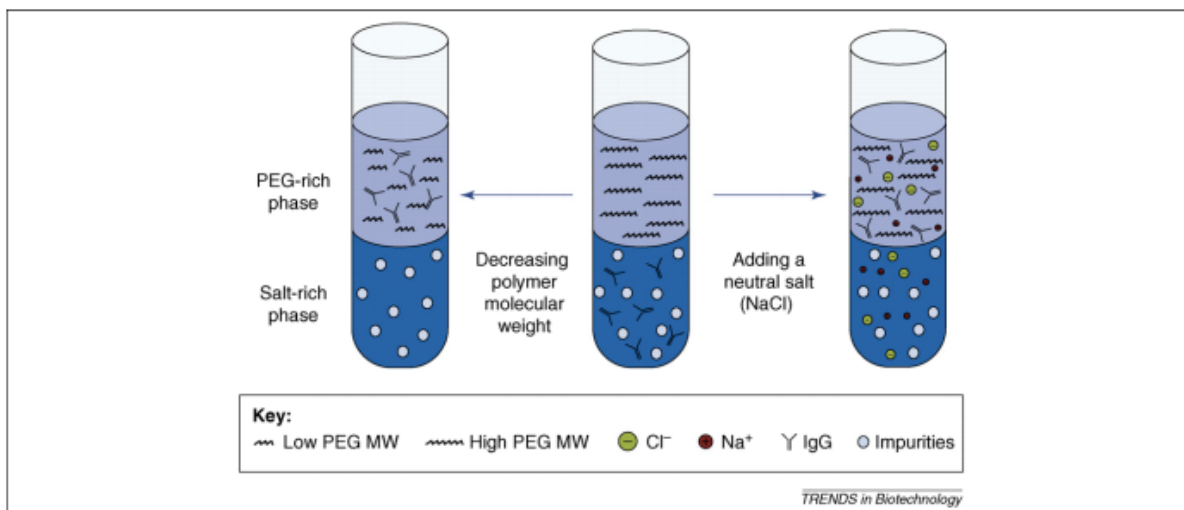


Figure 1.13 : Schéma illustrant le comportement de partage d'anticorps et d'impuretés dans un système ATPS PEG/sel avec l'augmentation de la masse molaire du polymère ou l'ajout de sels neutres, issus de (101)

Dans le cadre des systèmes polymère/sel, l'augmentation du coefficient de partage vers la phase supérieure pourra être obtenue par :

- la diminution de la masse moléculaire du PEG qui entraînera donc une tension interfaciale plus faible (104) ;
- l'augmentation de la concentration en sel qui provoquera l'augmentation de la force ionique dans la phase riche en sel ce qui améliorera le passage des biomolécules dans la phase supérieure par répulsion électrostatique ;
- la nature du sel.

Evidemment la température et le pH vont également influencer le partage de la protéine. Le pH des systèmes peut modifier le partage des composés car il altère la charge du composé ou encore le ratio de charge des molécules. En effet la charge nette des protéines est fonction de savoir si le pH est supérieur au point iso électrique (pI) soit négativement chargée, inférieure au pI c'est à dire positivement chargée ou encore égale à 0 soit de charge neutre. Plusieurs études ont révélé qu'à pH élevé, la molécule négativement chargée aura une préférence pour la phase supérieure. Cela peut s'expliquer par la présence des interactions électrostatiques entre la molécule et les unités de polymère. En ce qui concerne la température, lorsqu'un partage d'un soluté a lieu entre deux phases, la constante d'équilibre est définie (105) selon l'équation 1.4 :

$$K = e^{\frac{-\Delta G}{RT}} \quad \text{Equation 1.4}$$

Ainsi une simple modification de la température va modifier l'équilibre thermodynamique qui se tient dans le système solvant. Il a également été démontré que l'effet de la température modifie la composition du système solvant et de ce fait modifie le coefficient de partage des protéines.

Si les paramètres à optimiser sont nombreux, le comportement des biomolécules dans les systèmes ATPS n'est pas entièrement élucidé et la prédiction du partage reste encore délicate (106, 107). Les caractéristiques moléculaires et chimiques importantes dans le cadre du partage des protéines sont résumées dans la figure 1.14

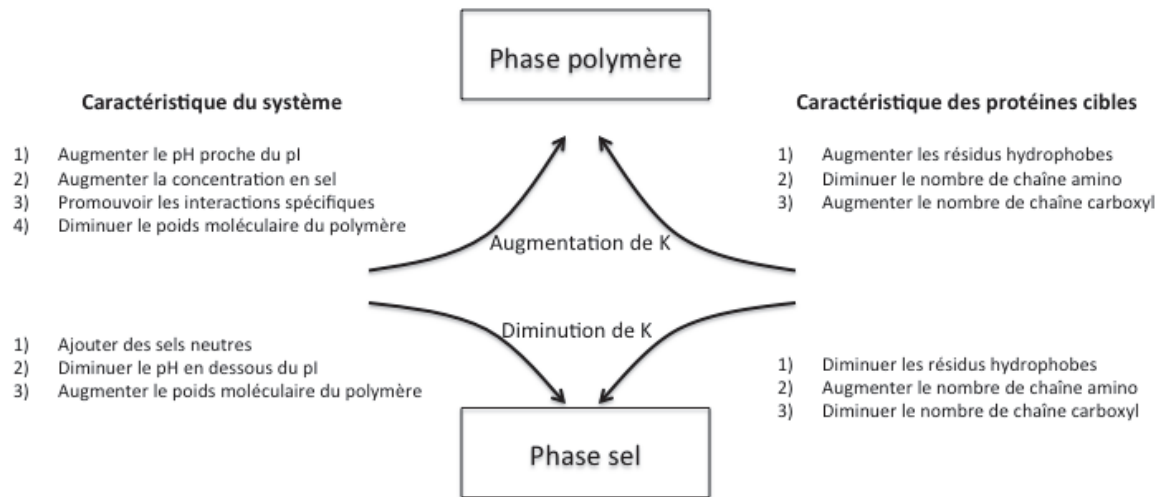


Figure 1.14 : Résumé des caractéristiques importantes pour les systèmes solvants polymère/sel (adapté de (108))

Ainsi les systèmes ATPS permettent la mise en œuvre de procédés d'extraction liquide-liquide pour la purification de protéines. Les différentes études ont également montré la possibilité de monter en échelle dans le cas d'un procédé de production. Ainsi en 1964, une montée en échelle a été réalisée pour la purification de l'ADN polymérase issue des cellules bactériennes grâce à un système solvant PEG/dextran (109). Le tableau 1.3 illustre quelques exemples de ces dernières années.

Tableau 1.3 : Quelques exemples des travaux récents portant sur l'extraction liquide-liquide de protéines à l'aide d'ATPS (les applications industrielles sont notées d'un symbole ★)

Systèmes solvants	Protéines	Références
14,08% PEG 400/ 16,28% Phosphate	Particules de type virus (VLP)	(110)
17,5 % PEG 400 / 15 % phosphate	Enzyme G6PDH	(111)
19,3% PEG 1000/ 12,4% phosphate	Xylose reductase	(112)
16,5% PEG 1000-3000/ 21,6% Phosphate	BSA IgG	(113)
29 % PEG 1000 / 9% Phosphate	B-Phycoerythrin	(114)
13,1 % PEG 1500/ 12,5 % Phosphate	Anticorps monoclonaux 2G12	(115, 116)

12% PEG 4000/ 11,9% Phosphate	a-Galactosidase	(8)
12% PEG 6000/10% Phosphate ★	Anticorps monoclonal IgG issus de l'ovaire d'hamster Chinois	(117)
6% PEG 6000/ 20% Phosphate ★	Lipases	(118)
16,5 % PEG 600/ 19% sodium citrate 17% PEG 600/ 22,5 % ammonium sulfate	ADN plasmidique	(119)
50 % PEG 1000-6000/40% citrate	Anticorps monoclonal IgG	(120)
PEG/ sodium citrate	Pénicilline acylase	(121)
22% PEG 8000/ 20 % citrate	Lectin	(122)
10 %PEG 3400 /13 % sodium sulfate ★	Protéines recombinantes du tabac transgénique	(123)
20,81% PEG 4000/ 20,95% MgSO ₄ ★	Protéine issue des eaux usées des tanneries	(124)
Dextran/PEG	B-carotène lutéine	(125)
15% Dextran T500/ 16% PEG 3350 ★	IgG (humain)	(126)

Les systèmes biphasiques aqueux offrent donc un environnement propice à la séparation des biomolécules. De ce fait leur utilisation au niveau industriel est plus qu'attrayante. En combinant la technique CPC avec les systèmes biphasiques aqueux, une efficacité supplémentaire et une meilleure résolution pourraient être apportées.

4. Utilisation des ATPS en LLC

L'utilisation de la technique de chromatographie liquide-liquide (LLC) avec les systèmes solvants biphasiques aqueux, ATPS, a déjà fait preuve d'intérêt, comme l'attestent les revues récentes (127-130). Des exemples y sont décrits, mettant en œuvre les ATPS dans les deux versions instrumentales hydrodynamiques et hydrostatiques précédemment présentées. Ces systèmes solvants ne sont cependant pas utilisés de manière courante par la communauté scientifique car leurs propriétés chimiques singulières, à savoir une tension interfaciale et une différence de densité très faible par rapport aux systèmes solvants dits hydro-organiques, soulèvent des challenges instrumentaux importants.

4.1. Utilisation dans les instruments hydrodynamiques (CCC)

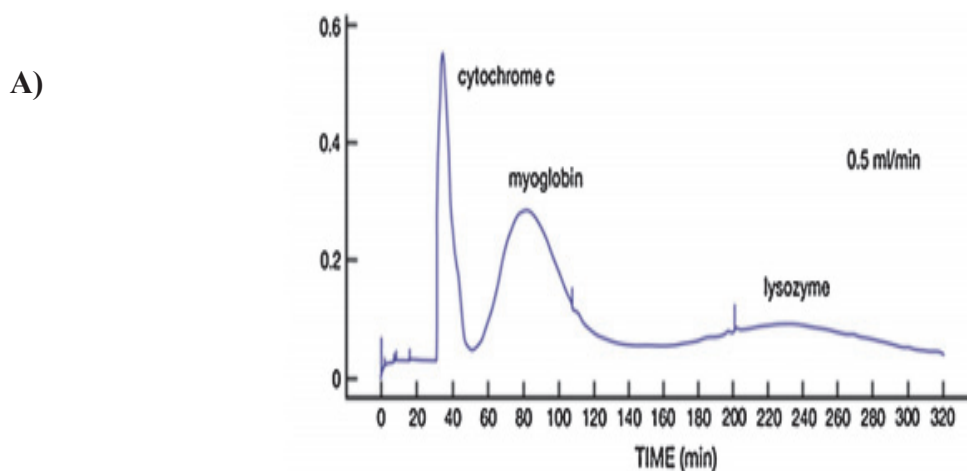
Les premiers travaux du domaine relatent l'utilisation des ATPS dans des instruments hydrodynamiques (CCC) et ce, depuis les années 90 (131-145). L'une des premières publications, réalisée par Ito et al (146) en 1987, montre une preuve de concept présentant la séparation de deux standards, le cytochrome C et la lysozyme grâce à un système solvant composé de 12,5% PEG-12,5% K_2HPO_4 . Toutefois, il faut noter que le cytochrome C dans les conditions d'analyse choisies, est un composé sortant au temps mort. De ce fait, seule la lysozyme est retenue par le système solvant avec un coefficient de partage de 4,8. Le taux de phase stationnaire est de 26% ce qui est faible (inférieur à 50%) compte tenu du débit de travail extrêmement faible (1 mL/min pour une colonne de 200 mL), conduisant à une séparation en 5h. D'autres travaux réalisés par la suite par Ito (134) ont étudié l'effet des conditions opératoires sur la tenue des phases stationnaires. Ainsi il a été démontré que le taux de phase stationnaire diminue de 32% à 10% pour un débit variant de 0,5 mL/min à 1,1 mL/min, à une vitesse de rotation de 800 rpm. Quelles que soient les conditions opératoires, le taux de phase stationnaire maintenue au sein de la colonne CCC est très faible puisque ce dernier ne dépasse pas 30% et ce malgré des débits inférieurs à 1 mL/min. Ces observations se retrouvent dans les publications relatant des applications avec échantillons réels (133, 137, 140, 143). Si ces travaux confirment la possibilité d'utiliser la CCC avec des systèmes biphasiques aqueux, le débit de travail reste néanmoins de l'ordre de 1 mL/min, et cela quelle que soit la taille de la colonne utilisée, ce qui confère des durées de séparation de 5h. De plus l'augmentation du débit conduit à une perte totale de la phase stationnaire, le taux de phase stationnaire observé étant au maximum de 30%. Les autres publications, non applicatives (132, 136, 139, 141, 144, 145), font référence à des tests d'amélioration du design des colonnes CCC en utilisant différentes tailles et longueurs de tubing, mais l'observation y est identique, c'est à dire que les taux de phase stationnaire sont inférieurs à 30%, et ce malgré des débits de travail inférieurs à 0,8 mL/min. Ainsi la technologie de tenue de phase stationnaire par l'application de champ centrifuge planétaire (instruments hydrodynamiques) ne semble pas adaptée à l'utilisation des systèmes biphasiques aqueux.

Tout récemment, en 2017, de nouveaux travaux ont été réalisés par Ding et al (147). Dans cette étude, un nouveau design de colonne CCC est présenté. Il s'agit d'une colonne CCC de forme conique

de volume de 68 mL. Ce nouveau design permet pour un débit compris entre 1 mL/min et 3 mL/min et une vitesse de 1000 rpm, une rétention des phases comprise entre 41% et 12% pour le système solvant composé de 14% PEG-14% K_2HPO_4 et comprise entre 47% et 36% pour le système composé de 12,5% PEG-12,5% K_2HPO_4 pour un débit allant de 1 mL/min à 1,5 mL/min. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues dans le cadre d'une CCC classique. La modification du design a donc permis d'augmenter le taux de phase stationnaire mais également le débit de travail. Concernant la séparation de protéines, un mélange standard a été utilisé constitué de la myoglobine et lysozyme. Une résolution supérieure à 1,5 a été obtenue avec le système constitué de 14% PEG-14% K_2HPO_4 , et ce uniquement pour les conditions de 1 mL/min, conduisant à une séparation en 140 minutes. Cette diminution du temps d'analyse peut s'expliquer par une taille de colonne plus petite, de 68 mL contre 200 mL pour les études citées précédemment.

Un design d'un autre type, la CPC toroïdale (148), se définit par l'assemblage de tubes Teflon® enroulés sous la forme d'un tore et mis en rotation autour de son axe de symétrie vertical. Son application dans le domaine des protéines a été démontrée par différents travaux (149-151). L'étude menée par Guan et al (149) a montré que le taux de phase stationnaire varie de 36% à 45% pour un débit allant de 0,4 mL/min à 1,25 mL/min appliqué sur une colonne de 51,7 mL tournant à 800 rpm. Ces valeurs de taux de phase stationnaire sont proches de ceux observées en CCC. Afin d'augmenter la résolution, les auteurs ont choisi d'augmenter la longueur, ce qui a un impact direct sur le nombre de plateaux théoriques. En effet, en passant d'une longueur de 25,8 mètres à 53,5 mètres, le taux de phase stationnaire reste à 45% et la résolution entre les deux molécules standards, myoglobine et lysozyme passe de 0,9 à 1,4, résultant en une séparation de près de 3h. Comme pour la CCC, ce design ne permet donc pas d'obtenir des séparations optimales de composés tests, en raison des faibles débits imposés par une difficulté à tenir la phase stationnaire.

La comparaison des différents designs de CCC cités précédemment peut être retranscrite graphiquement par la figure 1.15. Comme on peut le voir pour l'ensemble des designs CCC, le temps d'analyse est supérieur à 2h. Ces séparations démontrent que la CCC permet de tenir les phases stationnaires aqueuses mais leurs utilisations restent limitées en termes de débit ce qui conduit à la non-obtention de la séparation complète des composés.



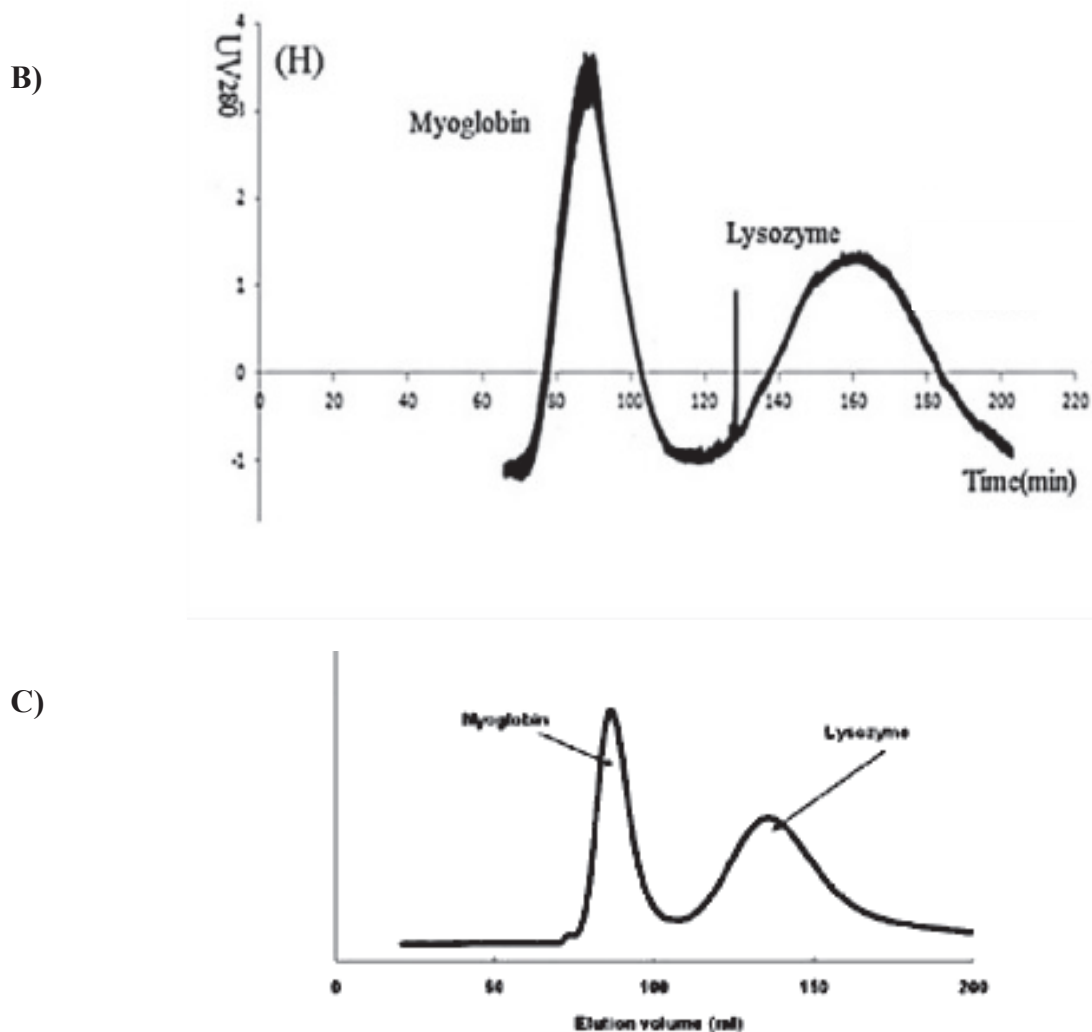


Figure 1.15 : Séparation du mélange standard myoglobine lysozyme avec le système ATPS 12,5% PEG-12,5% K_2HPO_4 , avec les instruments A) CCC conventionnel (134) B) CCC conique (147) C) CPC toroïdal (149).

4.2. Utilisation des ATPS dans les instruments hydrostatique (CPC)

Maintenant considérons la chromatographie de partage centrifuge qui met en œuvre un champ centrifuge mono-axial dans des instruments hydrostatiques possédant des cellules. Concernant cette technique le nombre de travaux utilisant les ATPS est plus restreint, puisque depuis 1990 seule une dizaine de publications a été recensée (150, 152-160). Si l'on regarde l'ensemble de ces diverses publications, on peut remarquer que le taux de phase stationnaire γ est nettement supérieur à ceux observés dans le cadre de l'instrumentation CCC. En effet la première publication réalisée par Foucault et al (161) utilisant la CPC pour des systèmes biphasiques aqueux a montré un taux de phase stationnaire de l'ordre de 55% et ce pour différentes natures de systèmes solvants biphasiques aqueux. Nous observons ici un premier avantage de l'instrumentation hydrostatique pour la tenue

des phases stationnaires extrêmement polaires. Cette meilleure tenue de phase stationnaire a été mise à profit pour la purification d'échantillons réels contenant des protéines. Ainsi, l'équipe de Schwienheer a travaillé sur la séparation de lipases (152) avec un système solvant composé de 13% PEG 3000- 6% K_2HPO_4 (m/m). Les conditions de travail sont une vitesse de rotation de 1000 rpm et un débit de 5 mL/min pour une colonne de CPC de 200 mL, tout ceci en mode descendant. Dans ces conditions le taux de phase stationnaire obtenu est égal à 70%. Ce haut taux de phase stationnaire peut s'expliquer par l'utilisation d'un PEG de haut poids moléculaire. De ce fait la stabilité du système solvant au sein du rotor est plus importante que dans le cas de polymère de faible poids moléculaire. Ces travaux ont montré le potentiel de la CPC à être utilisé dans le cadre de la séparation de composés actifs et ont confirmé les avantages de cette technique puisque les auteurs ont démontré que les forces de cisaillement et interfaciales dues aux conditions opératoires n'ont pas d'effet significatif sur l'activité enzymatique de leur échantillon, celui-ci conservant 80% de son activité. L'équipe d'Oelmeier a, quant à elle, travaillé à la purification d'anticorps monoclonaux par CPC (153, 154) pour lesquels l'activité a également été conservée. Dans ces études le système solvant utilisé est composé de 15% PEG 400- 17,1% K_2HPO_4 et les conditions de travail sont 2500 rpm et 5 mL/min. Ces travaux ont ainsi permis d'obtenir le composé d'intérêt avec un rendement de 98%. Ces travaux ont permis de mettre en avant l'usage de la CPC dans le cadre de purification d'échantillons sensibles à la dénaturation sans perte d'échantillon. A noter, les performances de ces différents travaux seront analysées plus en détail dans le chapitre 3.

5. Objectif de la thèse

Ces différentes applications montrent que la chromatographie de partage centrifuge représente une technique alternative intéressante pour la purification des protéines. Afin de permettre dans un premier temps l'implémentation de cette technique au niveau industriel, certaines évolutions instrumentales restent à développer, ce que nous tenterons de réaliser au cours de cette thèse.

En ce qui concerne la diminution du temps d'analyse, nous souhaitons travailler avec des débits plus élevés tout en conservant un taux de phase stationnaire suffisant pour réaliser la séparation souhaitée. De plus, l'objectif de ces travaux est de disposer d'un instrument à l'échelle laboratoire permettant le développement des méthodes de manière rapide avec des volumes d'échantillons réduits. Pour cela, nous souhaitons créer un instrument permettant l'injection de petits volumes. Pour pouvoir développer cette technique dans le milieu industriel, il convient également de se plier aux normes de Bonnes Pratiques de Fabrications (162) où l'aspect décontamination est crucial, et souvent réalisé par stérilisation à la vapeur pour désactiver et dénaturer les virus et les protéines. Or l'utilisation de cette pratique dans les rotors actuels est risquée puisque les joints en Téflon® risquent de gonfler avec la chaleur et de ce fait détériorer le rotor, tandis que la présence de joints favorise l'apparition de dépôts d'encrassement augmentant le risque de contamination croisée.

Nous proposons pour répondre à ces différents enjeux de développer un rotor monobloc permettant de travailler plus vite d'injecter des petits volumes d'échantillons dans le cadre des systèmes solvants ATPS, tout en conservant des performances en systèmes solvants hydro-organiques identiques à celles obtenues dans les rotors actuellement commercialisés.

Une étude approfondie des performances des rotors à disques actuels CPC fera donc l'objet du chapitre 3 de cette thèse. Les chapitres 4 et 5 seront consacrés à l'évolution instrumentale avec l'étude des performances des différents rotors monoblocs proposés. Enfin le dernier chapitre de cette thèse traitera du problème de contamination des protéines par la proposition d'une méthode de détection in-rotor.

Références

1. Brocklebank MP. Large Scale Separation and Isolation of Proteins. In: King RD, Cheetham PSJ, editors. Food Biotechnology—1. Dordrecht: Springer Netherlands; 1987. p. 139-92.
2. Berkowitz SA, Engen JR, Mazzeo JR, Jones GB. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(7):527-40.
3. Scopes R. Overview of protein purification and characterization. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 1995.
4. Healthcare G. Strategies for Protein Purification: Handbook. Uppsala GE Healthcare. 2010.
5. Lienqueo ME, Asenjo JA. Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes. *Computers & Chemical Engineering*. 2000;24(9):2339-50.
6. Labrou NE. Protein purification: an overview. *Protein Downstream Processing: Design, Development and Application of High and Low-Resolution Methods*. 2014:3-10.
7. Raja S, Murty VR, Thivaharan V, Rajasekar V, Ramesh V. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. *Science and Technology*. 2011;1(1):7-16.
8. Naganagouda K, Mulimani V. Aqueous two-phase extraction (ATPE): an attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. *Process Biochemistry*. 2008;43(11):1293-9.
9. Asenjo JA. Separation processes in biotechnology: CRC Press; 1990.
10. Joshi H, Jain V. Novel method to rapidly and efficiently lyse *Escherichia coli* for the isolation of recombinant protein. *Analytical Biochemistry*. 2017;528(Supplement C):1-6.
11. Najafpour G. Biochemical engineering and biotechnology: Elsevier; 2015.
12. Ongkudon CM, Kansil T, Wong C. Challenges and strategies in the preparation of large-volume polymer-based monolithic chromatography adsorbents. *Journal of separation science*. 2014;37(5):455-64.
13. Przybycien TM, Pujar NS, Steele LM. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004;15(5):469-78.
14. Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B. Precipitation of proteins: non specific and specific. *Isolation and purification of proteins* CRC Press, Boca Raton. 2003:225-76.
15. Cramer SM, Holstein MA. Downstream bioprocessing: recent advances and future promise. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2011;1(1):27-37.
16. Hammerschmidt N, Hobiger S, Jungbauer A. Continuous polyethylene glycol precipitation of recombinant antibodies: Sequential precipitation and resolubilization. *Process Biochemistry*. 2016;51(2):325-32.
17. Sim S-L, He T, Tscheliessnig A, Mueller M, Tan RBH, Jungbauer A. Protein precipitation by polyethylene glycol: A generalized model based on hydrodynamic radius. *Journal of Biotechnology*. 2012;157(2):315-9.
18. Sommer R, Satzer P, Tscheliessnig A, Schulz H, Helk B, Jungbauer A. Combined polyethylene glycol and CaCl₂ precipitation for the capture and purification of recombinant antibodies. *Process Biochemistry*. 2014;49(11):2001-9.
19. Nagel A, Winkler C, Carle R, Endress H-U, Rentschler C, Neidhart S. Processes involving selective precipitation for the recovery of purified pectins from mango peel. *Carbohydrate Polymers*. 2017;174(Supplement C):1144-55.
20. Wang L, Mah KZ, Ghosh R. Purification of human IgG using membrane based hybrid bioseparation technique and its variants: A comparative study. *Separation and Purification Technology*. 2009;66(2):242-7.

21. Gagnon P. Technology trends in antibody purification. *Journal of Chromatography A*. 2012;1221:57-70.
22. Etzel MR. Bulk protein crystallization-principles and methods. *Biotechnology and bioprocessing series*. 2007;31:159.
23. Gavira JA. Current trends in protein crystallization. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2016;602:3-11.
24. Zang Y, Kammerer B, Eisenkolb M, Lohr K, Kiefer H. Towards protein crystallization as a process step in downstream processing of therapeutic antibodies: screening and optimization at microbatch scale. *PLoS One*. 2011;6(9):e25282.
25. Smejkal B, Agrawal NJ, Helk B, Schulz H, Giffard M, Mechelke M, et al. Fast and scalable purification of a therapeutic full-length antibody based on process crystallization. *Biotechnology and bioengineering*. 2013;110(9):2452-61.
26. Commins dB, Hard R, Nickerson T. Recovery of lactose from aqueous solutions: precipitation with calcium hydroxide and sodium hydroxide. *Journal of Food Science*. 1980;45(2):362-6.
27. Judge RA, Johns MR, White ET. Protein purification by bulk crystallization: the recovery of ovalbumin. *Biotechnology and bioengineering*. 1995;48(4):316-23.
28. Low D, O'Leary R, Pujar NS. Future of antibody purification. *Journal of Chromatography B*. 2007;848(1):48-63.
29. Zhang C, Long AM, Swalm B, Charest K, Wang Y, Hu J, et al. Development of an automated mid-scale parallel protein purification system for antibody purification and affinity chromatography. *Protein expression and purification*. 2016;128:29-35.
30. Pratt TW. Liquid-liquid extraction. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1953;30(11):497-505.
31. Mazzola PG, Lopes AM, Hasmann FA, Jozala AF, Penna TC, Magalhaes PO, et al. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 2008;83(2):143-57.
32. Antov MG. Bioseparations in aqueous two-phase systems. *Acta Periodica Technologica*. 2005(36):145-54.
33. Ferreira IF, Azevedo AM, Rosa PA, Aires-Barros MR. Purification of human immunoglobulin G by thermoseparating aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*. 2008;1195(1):94-100.
34. Albertsson P-A, Frick G. Partition of virus particles in a liquid two-phase system. *Biochimica et biophysica acta*. 1960;37(2):230-7.
35. Albertsson P-A. Particle fractionation in liquid two-phase systems The composition of some phase systems and the behaviour of some model particles in them application to the isolation of cell walls from microorganisms. *Biochimica et biophysica acta*. 1958;27:378-95.
36. Rosa P, Azevedo A, Sommerfeld S, Mutter M, Aires-Barros M, Bäcker W. Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: a multi-stage approach. *Journal of biotechnology*. 2009;139(4):306-13.
37. Mao LN, Rogers JK, Westoby M, Conley L, Pieracci J. Downstream antibody purification using aqueous two-phase extraction. 2010;26(6):1662.
38. Albertsson P-A, Nyns EJ. Counter-current distribution of proteins in aqueous polymer phase systems. *Nature*. 1959;184(4697):1465-8.
39. Jungbauer A, Hahn R. Ion-exchange chromatography. *Methods in enzymology*. 2009;463:349-71.
40. Sandra K, Vandenheede I, Sandra P. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization. *Journal of Chromatography A*. 2014;1335:81-103.
41. Biotech Ap, editor. *Ion Exchange Chromatography:Principles and Methods*1999.

42. Harris RJ, Kabakoff B, Macchi FD, Shen FJ, Kwong M, Andya JD, et al. Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001;752(2):233-45.
43. Kim J, Jones L, Taylor L, Kannan G, Jackson F, Lau H, et al. Characterization of a unique IgG1 mAb CEX profile by limited Lys-C proteolysis/CEX separation coupled with mass spectrometry and structural analysis. *Journal of Chromatography B*. 2010;878(22):1973-81.
44. Koho T, Mäntylä T, Laurinmäki P, Huhti L, Butcher SJ, Vesikari T, et al. Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography. *Journal of virological methods*. 2012;181(1):6-11.
45. Strömberg P, Rotticci-Mulder J, Björnstedt R, Schmidt SR. Preparative parallel protein purification (P4). *Journal of Chromatography B*. 2005;818(1):11-8.
46. Lee HS, Kim Y-J, Yang J, Yoon HS, Kim ST, Kim K. Alternative purification method for recombinant measles viral nucleoprotein expressed in insect cells by ion-exchange chromatography. *Journal of virological methods*. 2014;197:55-62.
47. Freitag R, Horváth C. *Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids*: Springer; 1995. p. 17-59.
48. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*. 2014;5.
49. Ladole MR, Mevada JS, Holkar CR, Pandit AB. *Applications of Chromatography in Separation of Biomolecules*.
50. Ljunglöf A, Lacki KM, Mueller J, Harinarayan C, van Reis R, Fahrner R, et al. Ion exchange chromatography of antibody fragments. *Biotechnology and bioengineering*. 2007;96(3):515-24.
51. Fausnaugh J, Regnier F. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*. 1986;359:131-46.
52. McCue JT. Use and application of hydrophobic interaction chromatography for protein purification. *Methods in enzymology*. 2014;541:51-65.
53. Lienqueo ME, Mahn A, Vásquez L, Asenjo JA. Methodology for predicting the separation of proteins by hydrophobic interaction chromatography and its application to a cell extract. *Journal of Chromatography A*. 2003;1009(1):189-96.
54. Brykova NS, Gusarov DA, Sokolova IV, Gusarova VD, Vorobjeva TV, Bairamashvili DI. Development of the downstream process in the production of the recombinant histone H1. 3 variant. *Process biochemistry*. 2011;46(10):2036-43.
55. Arora S, Saxena V, Ayyar BV. *Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification*. *Methods*. 2016.
56. Roque ACA, Silva CSO, Taipa MÂ. Review: Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. 2007;1160(1):44.
57. Smith DM. *Protein separation and characterization procedures*. *Food analysis*: Springer; 2017. p. 431-53.
58. Ghose S, Hubbard B, Cramer SM. Evaluation and comparison of alternatives to Protein A chromatography: Mimetic and hydrophobic charge induction chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 2006;1122(1):144-52.
59. Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O'Kennedy R. *Affinity chromatography as a tool for antibody purification*. *Methods*. 2012;56(2):116-29.
60. Gu T, Hsu K-H, Syu M-J. Scale-up of affinity chromatography for purification of enzymes and other proteins. *Enzyme and microbial technology*. 2003;33(4):430-7.
61. Hage DS, Anguizola JA, Li R, Matsuda R, Papastavros E, Pfaunmiller E, et al. Chapter 12 - Affinity chromatography A2 - Fanali, Salvatore. In: Haddad PR, Poole CF, Riekkola M-L, editors. *Liquid Chromatography (Second Edition)*: Elsevier; 2017. p. 319-41.
62. Safarik I, Safarikova M. *Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides*. *BioMagnetic Research and Technology*. 2004;2(1):7.
63. Clonis YD. *Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop*. *Journal of Chromatography A*. 2006;1101(1):1-24.

64. Friesen JB, McAlpine JB, Chen S-N, Pauli GF. Countercurrent separation of natural products: an update. *Journal of natural products*. 2015;78(7):1765-96.
65. Marston A, Hostettmann K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A*. 2006;1112(1):181-94.
66. Foucault AP, Chevolut L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*. 1998;808(1):3-22.
67. Craig L. Partition chromatography and countercurrent distribution. *Analytical Chemistry*. 1950;22(11):1346-52.
68. Chollet S. Rationalisation des critères de dimensionnement d'une colonne de chromatographie de partage centrifuge. Thèse, Université de Nantes; 2013.
69. Ito Y, Bowman RL. Countercurrent Chromatography. *Analytical Chemistry*. 1971;43(13):69A-75A.
70. Murayama W, Kobayashi T, Kosuge Y, Yano H, Nunogaki Y, Nunogaki K. A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *Journal of Chromatography A*. 1982;239:643-9.
71. Conway WD. Counter-current chromatography: Simple process and confusing terminology. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(36):6015-23.
72. Berthod A, Maryutina T, Spivakov B, Shpigun O, Sutherland IA. COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY IN ANALYTICAL CHEMISTRY (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2009;81(2):355-87.
73. Rodrigues A. Simulated moving bed technology: principles, design and process applications: Butterworth-Heinemann; 2015.
74. Schwienheer C, Merz J, Schembecker G. Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *Journal of Chromatography A*. 2015;1390:39-49.
75. Kromaton. (www.kromaton.com, consulté le 09/09/2017)
76. Berthod A. Band broadening inside the chromatographic column: The interest of a liquid stationary phase. *Journal of Chromatography A*. 2006;1126(1-2):347-56.
77. Johansson H-O, Feitosa E, Junior AP. Phase diagrams of the aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate/salts. *Polymers*. 2011;3(1):587-601.
78. Molino JVD, Marques V, de Araújo D, Júnior AP, Mazzola PG, Gatti MSV. Different types of aqueous two-phase systems for biomolecule and bioparticle extraction and purification. *Biotechnology progress*. 2013;29(6):1343-53.
79. Fernando S. Monoclonal antibody (mAb) purification by counter current chromatography (CCC): Brunel University School of Engineering and Design PhD Theses; 2011.
80. Zhao Z, Li Q, Ji X, Dimova R, Lipowsky R, Liu Y. Molar mass fractionation in aqueous two-phase polymer solutions of dextran and poly(ethylene glycol). *Journal of Chromatography A*. 2016;1452:107-15.
81. Machado FLC, Coimbra JSdR, Zuniga ADG, da Costa AR, Martins JP. Equilibrium Data of Aqueous Two-Phase Systems Composed of Poly(ethylene glycol) and Maltodextrin. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2012;57(7):1984-90.
82. Kotland A, Chollet S, Diard C, Autret J-M, Meucci J, Renault J-H, et al. Industrial case study on alkaloids purification by pH-zone refining centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2016;1474:59-70.
83. Bolognese B, Nerli B, Picó G. Application of the aqueous two-phase systems of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for protein purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;814(2):347-53.
84. Cheluget EL, Gelinas S, Vera JH, Weber ME. Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly(propylene glycol) with sodium chloride. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 1994;39(1):127-30.

85. Lei X, Diamond AD, Hsu JT. Equilibrium phase behavior of the poly (ethylene glycol)/potassium phosphate/water two-phase system at 4. degree. C. Journal of chemical and engineering data. 1990;35(4):420-3.
86. Hsu JT. Separation of mixtures by aqueous two-phase systems. Google Patents; 1990.
87. Murari GF, Penido JA, Machado PAL, Lemos LRd, Lemes NHT, Virtuoso LS, et al. Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol+ammonium sulfate+water: equilibrium data and thermodynamic modeling. Fluid Phase Equilibria. 2015;406:61-9.
88. Li M, Peeples TL. Purification of hyperthermophilic archaeal amylolytic enzyme (MJA1) using thermoseparating aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B. 2004;807(1):69-74.
89. Wang Y, Hu X, Han J, Ni L, Tang X, Hu Y, et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer–salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. Food Chemistry. 2016;194:257-64.
90. Persson J, Johansson H-O, Tjerneld F. Purification of protein and recycling of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers. Journal of Chromatography A. 1999;864(1):31-48.
91. Großmann C, Tintinger R, Zhu J, Maurer G. Aqueous two-phase systems of poly (ethylene glycol) and dextran—experimental results and modeling of thermodynamic properties. Fluid Phase Equilibria. 1995;106(1-2):111-38.
92. Mishima K, Matsuyama K, Ezawa M, Taruta Y, Takarabe S, Nagatani M. Interfacial tension of aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and dipotassium hydrogenphosphate. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1998;711(1):313-8.
93. Snyder SM, Cole KD, Szlag DC. Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25. degree. C. Journal of Chemical and Engineering Data. 1992;37(2):268-74.
94. Quintão JC, Patrício PR, Veloso ACG, de Carvalho RMM, da Silva LHM, Hespanhol MC. Liquid-liquid equilibrium of the ternary ammonium salt + poly(propylene glycol) + water system. Fluid Phase Equilibria. 2017;442:96-103.
95. de Oliveira RM, Coimbra JSdR, Minim LA, da Silva LHM, Ferreira Fontes MP. Liquid–liquid equilibria of biphasic systems composed of sodium citrate+ polyethylene (glycol) 1500 or 4000 at different temperatures. Journal of Chemical & Engineering Data. 2008;53(4):895-9.
96. Diamond A, Hsu J. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. Bioseparation: Springer; 1992. p. 89-135.
97. Hatti-Kaul R. Aqueous two-phase systems. A general overview. Mol Biotechnol. 2001;19(3):269-77.
98. Grilo AL, Raquel Aires-Barros M, Azevedo AM. Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. Separation & Purification Reviews. 2016;45(1):68-80.
99. Chakraborty A, Sen K. Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems. Journal of Chromatography A. 2016;1433:41-55.
100. de Oliveira CsC, Coimbra JSIdR, Zuniga ADG, Martins JoP, Siqueira AMdO. Interfacial tension of aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and potassium phosphate. Journal of Chemical & Engineering Data. 2012;57(6):1648-52.
101. Azevedo AM, Rosa PA, Ferreira IF, Aires-Barros MR. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. Trends in biotechnology. 2009;27(4):240-7.
102. Ruiz-Ruiz F, Benavides J, Aguilar O, Rito-Palomares M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: current applications and trends. Journal of chromatography A. 2012;1244:1-13.
103. Babu BR, Rastogi N, Raghavarao K. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. Chemical Engineering and Processing: process intensification. 2008;47(1):83-9.
104. Johansson G. Aqueous two-phase systems in protein purification. Journal of Biotechnology. 1985;3(1):11-8.

105. Atkins P, De Paula J. Physical chemistry for the life sciences: Oxford University Press, USA; 2011.
106. Wu Z, Hu G, Wang K, Zaslavsky BY, Kurgan L, Uversky VN. What are the structural features that drive partitioning of proteins in aqueous two-phase systems? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2017;1865(1):113-20.
107. de Barros DPC, Campos SRR, Azevedo AM, Baptista AM, Aires-Barros MR. Predicting protein partition coefficients in aqueous two phase system. *Journal of Chromatography A*. 2016;1470:50-8.
108. Huddleston J, Veide A, Köhler K, Flanagan J, Enfors S-O, Lyddiatt A. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. *Trends in Biotechnology*. 1991;9(1):381-8.
109. Okazaki T, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XV. Purification and properties of a polymerase from bacillus subtilis. *J Biol Chem*. 1964;239:259-68.
110. Effio CL, Wenger L, Ötes O, Oelmeier SA, Kneusel R, Hubbuch J. Downstream processing of virus-like particles: Single-stage and multi-stage aqueous two-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2015;1383:35-46.
111. Ribeiro MZ, Silva DP, Vitolo M, Roberto IC, Pessoa-Jr A. Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase poly (ethyleneglycol)/phosphate systems. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007;38(1):78-83.
112. Mayerhoff ZD, Roberto IC, Franco TT. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2004;18(3):217-23.
113. Puthirasigamany M, Hamm I, van Winssen FA, Nikbin N, Kreis P, Gorak A, et al. Purification of biomolecules combining ATPS and membrane chromatography. *Food and Bioprocess Processing*. 2014;92(2):152-60.
114. Ruiz-Ruiz F, Benavides J, Rito-Palomares M. Scaling-up of a B-phycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: practical experiences. *Process Biochemistry*. 2013;48(4):738-45.
115. Platis D, Labrou NE. Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. *Biotechnology journal*. 2009;4(9):1320-7.
116. Platis D, Drossard J, Fischer R, Ma J-C, Labrou N. New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants. *Journal of Chromatography A*. 2008;1211(1):80-9.
117. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Aires-Barros MR. Optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. *Journal of Biotechnology*. 2007;132(2):209-17.
118. Ooi CW, Tey BT, Hii SL, Ariff A, Wu HS, Lan JCW, et al. Direct purification of *Burkholderia pseudomallei* lipase from fermentation broth using aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009;14(6):811-8.
119. Gomes GA, Azevedo AM, Aires-Barros MR, Prazeres DMF. Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Separation and Purification Technology*. 2009;65(1):22-30.
120. Azevedo AM, Gomes AG, Rosa PA, Ferreira IF, Pisco AM, Aires-Barros MR. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 2009;65(1):14-21.
121. Marcos JC, Fonseca LP, Ramalho MT, Cabral J. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly (ethylene glycol)–sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999;734(1):15-22.
122. Nascimento CO, Soares PAG, Porto TS, Costa RMPB, Lima CdA, de Lima Filho JL, et al. Aqueous two-phase systems: new strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. *Separation and Purification Technology*. 2013;116:154-61.
123. Balasubramaniam D, Wilkinson C, Van Cott K, Zhang C. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2003;989(1):119-29.

124. Saravanan S, Rao JR, Murugesan T, Nair BU, Ramasami T. Partition of tannery wastewater proteins in aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-magnesium sulfate systems: effects of molecular weights and pH. *Chemical engineering science*. 2007;62(4):969-78.
125. Chavez-Santoscoy A, Benavides J, Vermaas W, Rito-Palomares M. Application of Aqueous Two-Phase Systems for the Potential Extractive Fermentation of Cyanobacterial Products. *Chemical engineering & technology*. 2010;33(1):177-82.
126. Azevedo A, Rosa P, Ferreira I, Pisco A, De Vries J, Korporaal R, et al. Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction. *Separation and Purification Technology*. 2009;65(1):31-9.
127. Sutherland IA. Review of centrifugal liquid-liquid chromatography using aqueous two-phase solvent (ATPS) systems: its scale-up and prospects for the future production of high-value biologics. 2007.
128. Xu Z, Lin X, Lu Y. Separation of Peptides and Proteins by Countercurrent Chromatography. *Current Proteomics*. 2013;10(4):322-33.
129. Gao-Hong W, HUANG X-Y, Wen-Da D, Kai-Jun Q, Bing-Peng W, Rui-Na F, et al. Advances in Technology of Countercurrent Chromatography for Separation of Protein and Peptide. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2016;44(10):1600-8.
130. Mekaoui N, Faure K, Berthod A. Advances in countercurrent chromatography for protein separations. *Bioanalysis*. 2012;4(7):833-44.
131. Ma X, Ito Y. New analytical spiral tube assembly for separation of proteins by counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 2015;1405:193-6.
132. Shinomiya K, Menet J-M, Fales HM, Ito Y. Studies on a new cross-axis coil planet centrifuge for performing counter-current chromatography: I. Design of the apparatus, retention of the stationary phase, and efficiency in the separation of proteins with polymer phase systems. *Journal of Chromatography A*. 1993;644(2):215-29.
133. Shibusawa Y, Ino Y, Kinebuchi T, Shimizu M, Shindo H, Ito Y. Purification of single-strand DNA binding protein from an *Escherichia coli* lysate using counter-current chromatography, partition and precipitation. *Journal of Chromatography B*. 2003;793(2):275-9.
134. Ito Y. Spiral column configuration for protein separation by high-speed countercurrent chromatography. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2010;49(7):782-92.
135. Cao X, Hu G, Huo L, Zhu X, Li T, Powell J, et al. Stationary phase retention and preliminary application of a spiral disk assembly designed for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008;1188(2):164-70.
136. Guan Y, Bourton E, Hewitson P, Sutherland I, Fisher D. The importance of column design for protein separation using aqueous two-phase systems on J-type countercurrent chromatography. *Separation and Purification Technology*. 2009;65(1):79-85.
137. Shibusawa Y, Eriguchi Y, Ito Y. Purification of lactic acid dehydrogenase from bovine heart crude extract by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997;696(1):25-31.
138. Wade KL, Ito Y, Ramarathnam A, Holtzclaw WD, Fahey JW. Purification of Active Myrosinase from Plants by Aqueous Two-Phase Counter-Current Chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2015;26(1):47-53.
139. Shibusawa Y, Ito Y. Protein separation with aqueous—aqueous polymer systems by two types of counter-current chromatographs. *Journal of Chromatography A*. 1991;550:695-704.
140. Magri ML, Cabrera RB, Miranda MV, Fernández-Lahore HM, Cascone O. Performance of an aqueous two-phase-based countercurrent chromatographic system for horseradish peroxidase purification. *Journal of separation science*. 2003;26(18):1701-6.
141. Dasarathy D, Ito Y. An improved design of spiral tube assembly for separation of proteins by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015;1418:77-82.

142. Sutherland IA, Heywood-Waddington D, Ito Y. Counter-current chromatography: Applications to the separation of biopolymers, organelles and cells using either aqueous—organic or aqueous—aqueous phase systems. *Journal of Chromatography A*. 1987;384:197-207.
143. Shinomiya K, Kobayashi H, Motoyoshi N, Inokuchi N, Nakagomi K, Ito Y. Countercurrent chromatographic separation and purification of various ribonucleases using a small-scale cross-axis coil planet centrifuge with aqueous—aqueous polymer phase systems. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(10):955-60.
144. Gu D, Yang Y, Xin X, Aisa HA, Ito Y. Novel design for centrifugal counter-current chromatography: VI. Ellipsoid column. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2015;38(1):68-73.
145. Shinomiya K, Zaima K, Harikai N, Ito Y. Improved Separations of Proteins and Sugar Derivatives Using the Small-Scale Cross-Axis Coil Planet Centrifuge with Locular Multilayer Coiled Columns. *Separations*. 2016;3(4):29.
146. Ito Y, Oka H. Horizontal flow-through coil planet centrifuge equipped with a set of multilayer coils around the column holder: Counter-current chromatography of proteins with a polymer-phase system. *Journal of Chromatography A*. 1988;457:393-7.
147. Ding J, Li S, Zhao Y, Guan YH, Deng L, Deng Q. Properties of hydrodynamic J-type countercurrent chromatography for protein separation using aqueous two-phase systems: With special reference to constructing conical columns. *Journal of Chromatography A*. 2017;1499(Supplement C):101-10.
148. Sutherland I, Hewitson P, De Folter J. Toroidal coil chromatography: The effect of scale-up and “g” field on stage efficiency. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(36):6144-7.
149. Guan Y, Fisher D, Sutherland I. Protein separation using toroidal columns by type-J synchronous counter-current chromatography towards preparative separation. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(21):3525-30.
150. Sutherland I, Hewitson P, Siebers R, van den Heuvel R, Arbenz L, Kinkel J, et al. Scale-up of protein purifications using aqueous two-phase systems: Comparing multilayer toroidal coil chromatography with centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(32):5527-30.
151. Guan YH, Hewitson P, van den Heuvel RN, Zhao Y, Siebers RP, Zhuang Y-P, et al. Scale-up protein separation on stainless steel wide bore toroidal columns in the type-J counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015;1424:102-10.
152. Schwienheer C, Prinz A, Zeiner T, Merz J. Separation of active laccases from *Pleurotus sapidus* culture supernatant using aqueous two-phase systems in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2015;1002:1-7.
153. Oelmeier SA, Effio CL, Hubbuch J. High throughput screening based selection of phases for aqueous two-phase system-centrifugal partitioning chromatography of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*. 2012;1252:104-14.
154. Oelmeier SA, Ladd-Effio C, Hubbuch J. Alternative separation steps for monoclonal antibody purification: Combination of centrifugal partitioning chromatography and precipitation. *Journal of Chromatography A*. 2013;1319:118-26.
155. Sutherland IA, Audo G, Bourton E, Couillard F, Fisher D, Garrard I, et al. Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008;1190(1):57-62.
156. Faure K, Mekaoui N, Meucci J, Berthod A. Solvent selection in countercurrent chromatography using small-volume hydrostatic columns. *LCGC North America*. 2013;31(2):132-43.
157. Goll J, Audo G, Minceva M. Comparison of twin-cell centrifugal partition chromatographic columns with different cell volume. *Journal of Chromatography A*. 2015;1406:129-35.
158. Schwienheer C, Merz J, Schembecker G. Selection and Use of Poly Ethylene Glycol and Phosphate Based Aqueous Two-Phase Systems for the Separation of Proteins by Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2015;38(9):929-41.

159. Grudzień Ł, Madeira L, Fisher D, Ma J, Garrard I. Phase system selection with fractional factorial design for purification of recombinant cyanovirin-N from a hydroponic culture medium using centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2013;1285:57-68.
160. Margraff R, Intes O, Renault JH, Garret P. Partitron 25, a Multi-Purpose Industrial Centrifugal Partition Chromatograph: Rotor Design and Preliminary Results on Efficiency and Stationary Phase Retention. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2005;28(12-13):1893-902.
161. Foucault A, Nakanishi K. Comparison of Several Aqueous two Phase Solvent Systems (ATPS) for the Fractionation of Biopolymers by Centrifugal Partition Chromatography (CPC). *Journal of Liquid Chromatography*. 1990;13(12):2421-40.
162. FDA. Guide to Inspections of Validation of cleaning Processes. 1993.

Chapitre 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Ce chapitre détaille l'ensemble des méthodes expérimentales relatives à cette thèse, telles que les réactifs, les équipements ainsi que les protocoles expérimentaux utilisés.

1. Instrumentation

La chromatographie de partage centrifuge est une technique de chromatographie se caractérisant par l'emploi d'une phase stationnaire liquide. Comme toute technique chromatographique, sa mise en œuvre nécessite un certain nombre de périphériques assurant l'injection de l'échantillon, la mise en mouvement de la phase mobile par pompage et la détection. Pour une utilisation préparative, ces périphériques sont complétés par un collecteur de fraction. La spécificité de la CPC tient dans la colonne qui est constituée d'un rotor et qui nécessite donc la mise en rotation de cette colonne. Pour cela, des bâtis spécifiques viennent tenir le rotor en rotation sur un axe vertical, et assurer l'étanchéité entre la colonne tournant et le système de pompage fixe.

1.1. Les rotors CPC

Différent rotors ont été utilisés au cours de ces travaux de thèse. Les différentes caractéristiques des rotors sont définies ci-dessous ainsi que leur appellation utilisée dans ce manuscrit de thèse.

Tableau 2.1 : Récapitulatif des rotors utilisés

Appellation	Matériau	Caractéristiques du montage des cellules	Nombres de cellules	Volume motifs (cellule + canaux)	Volume mesuré du rotor	Diamètre sphère	Diamètre rotor	Largeur canal
Rotor-30 mL	Acier	A disques, twin	832	42,3 μ L	36,3 mL			0,4 mm
Rotor 3D-acier	Acier doux	Monobloc, twin sphériques	135	103 μ L	13,9 mL	4 mm	100 mm	1,8 mm
Rotor 3D-titane	Titane	Monobloc, twin sphériques	428	103 μ L	45,4 mL	4 mm	200 mm	1,8 mm
Rotor mini-3D	Titane	Monobloc, twin sphériques	600	41,6 μ L	25,1 mL	3 mm	200 mm	1 mm

Les différents rotors sont montés sur un bâti FCPC-A200 pouvant contenir des rotors interchangeables (excepté pour le mini-3D) équipé d'un système de refroidissement (Julabo F10-C) afin d'empêcher les variations de température dans la chambre du rotor (fig.2.1). Les joints rotatifs supérieur et inférieur assurent l'étanchéité pendant le passage de la phase mobile.

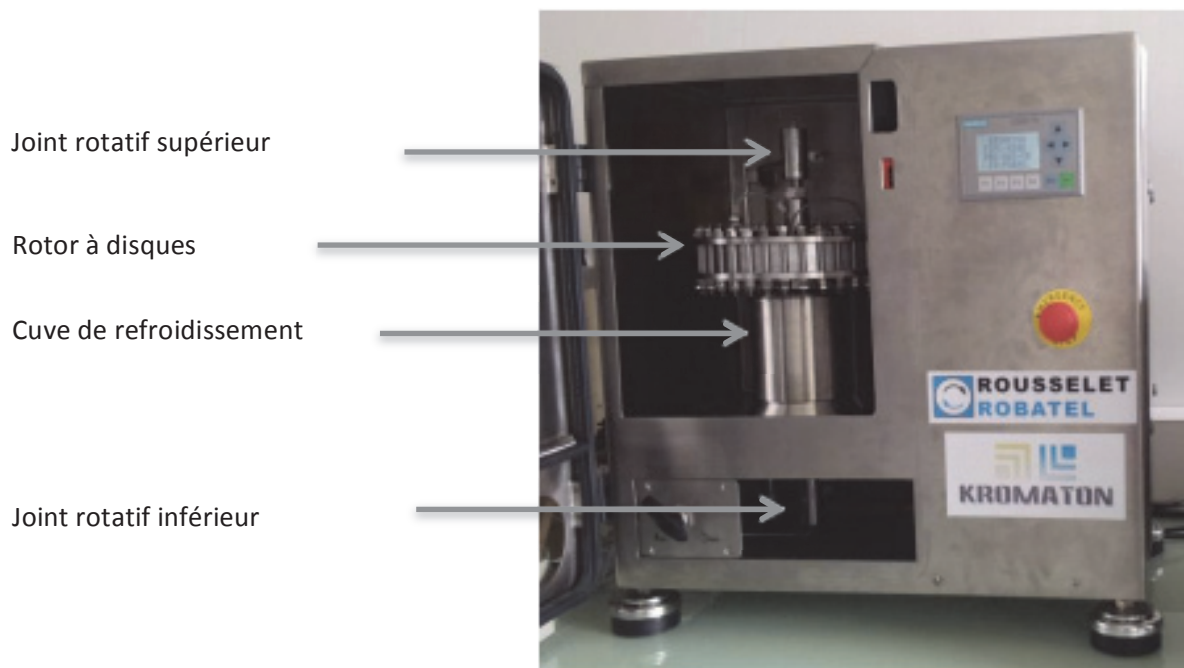


Figure 2.1 : FCPC-A Rousselet-Robatel-Kromaton monté d'un rotor à disques

1.2. Périphériques

Deux systèmes de périphériques ont été utilisés au cours de cette thèse. En effet dans un premier temps un système préparatif SpotPrep II Armen Instrument (Saint-Avé, France) (figure 2.2) a été utilisé dans le but d'être en situation similaire aux utilisateurs industriels. Il comprend une pompe quaternaire (débits applicables compris entre 1 et 250 mL/min). Le système est équipé d'une vanne d'injection automatique sur laquelle une boucle de 2 mL est montée. L'appareil est doté d'un système de détection UV composé d'une cellule de 70 μ L double longueur d'onde fixée à 254 nm ou 220 nm suivant les composés à analyser. Le contrôle de l'appareil et l'acquisition des données sont assurés par le logiciel Armen Glider Prep.

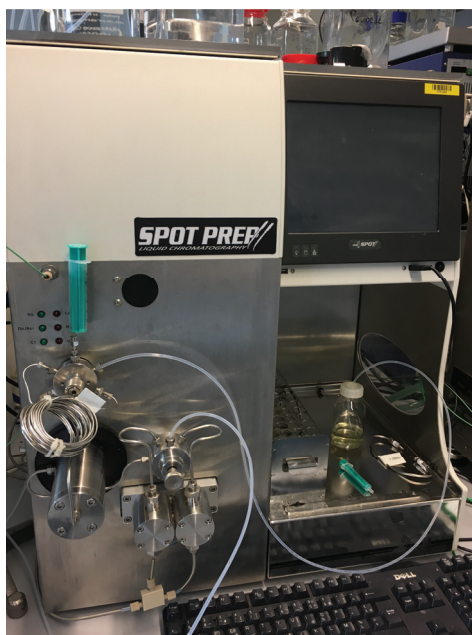


Figure 2.2 : Système préparatif Spot Prep

Dans les chapitres 3 et 5, le système de pompage est assuré par une pompe Shimadzu LC-20AP et la détection, quant à elle, est assurée par un détecteur UV Shimadzu SPD-20A (Marne la Vallée, France) équipé d'une cellule préparative (81 μ L) dont la longueur d'onde a été fixée à 254 nm ou 220 nm suivant les composés analysés (figure 2.3). L'acquisition des données est réalisée par le logiciel AZUR (Datalys, Grenoble). La boucle d'injection est une boucle manuelle Rheodyme dont des boucles allant de 1 μ L à 1 mL ont été utilisées. L'objectif est alors la réduction des volumes extra-colonnes afin de pouvoir diminuer le volume d'injection pour un usage plus adapté à un laboratoire de recherche.



Figure 2.3 : Système périphérique Shimadzu

2. Utilisation de l'appareil CPC

Avant toute expérience, le refroidisseur est mis en route afin de maintenir une température stable de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ au sein de l'appareil CPC.

Pour mettre en place une colonne, le rotor, quelque soit son volume, est rempli en phase stationnaire à 600 rpm à un débit de 10 mL/min. Ensuite la vitesse de rotation désirée est appliquée et la phase mobile est pompée à travers la phase stationnaire au débit qui sera ensuite utilisé pour l'élution.

Pendant cette phase d'équilibration, la phase stationnaire en excès est poussée par la phase mobile entrante. L'équilibre est considéré comme atteint lorsque la phase mobile sort de la colonne et que la ligne de base du détecteur est stable. La mesure du volume de phase stationnaire sorti permet de déterminer le taux de phase stationnaire (Sf) restant dans la colonne. Ce taux de phase stationnaire peut également être déterminé par l'injection d'un composé non retenu qui indiquera le volume de phase mobile dans la colonne. Dans le cadre des différents systèmes solvants utilisés dans ce chapitre, le taux de phase stationnaire sera déterminé, soit par le temps de passage d'un composé non retenu (new coccine red) dans le cadre du système solvant HEMWat; soit par la mesure du volume déplacé avec les système solvant ATPS du fait de l'absence d'un marqueur de temps mort.

L'ensemble des expériences menées est réalisé en mode descendant quel que soit le système solvant, c'est à dire que la phase légère constitue la phase stationnaire et que la phase lourde joue quant à elle le rôle de phase mobile.

3. Préparation des systèmes solvants

Le système solvant ATPS considéré dans cette thèse est composé de polyéthylène glycol (PEG) avec un poids moléculaire moyen de 1000 Da et de phosphate de potassium dibasique provenant de ThermoFisher (Karlsruhe, Allemagne), solubilisés par de l'eau déionisée (résistivité 18 m Ω). La composition chimique du système solvant ATPS est de 14/14/72 (w/w/w) PEG/ K₂HPO₄/ Eau.

Pour préparer ce système solvant, le polyéthylène glycol chauffé à 60°C est versé sous forme liquide dans l'eau chauffée également à 60°C. La présence d'eau permet d'éviter la recristallisation du PEG à température ambiante. On termine par la pesée du phosphate et son ajout au mélange précédent. Ce système solvant peut être conservé au réfrigérateur à 4°C pendant au maximum une semaine.

Avant utilisation, l'ensemble est agité vigoureusement pendant deux minutes. Le système solvant est ensuite placé dans une ampoule à décanter afin d'effectuer la séparation de la phase riche en PEG (phase supérieure) et de la phase riche en sel (phase inférieure). La phase inférieure est filtrée sur filtre 0,2 μm afin d'éliminer les éventuels cristaux non dissous. Cette étape de filtration est essentielle car la présence de cristaux risquerait d'entraîner la casse des joints rotatifs par rayure des céramiques.

Le système solvant hydro-organique utilisé comme référence au cours de cette thèse est le système HEMWat composé du mélange Heptane/Méthanol/Acétate d'éthyle/Eau dans différentes proportions. Les systèmes utilisés au cours de cette thèse sont les systèmes HEMWat 0 et HEMWat +1. Les proportions du système HemWat 0 et du HemWat 1 sont respectivement 1/1/1/1 et 5/6/5/6 (v/v/v/v). Ces systèmes solvants sont conservés une semaine à température ambiante.

Les différents solvants utilisés proviennent de la société ThermoFisher (Karlsruhe, Allemagne), avec une pureté supérieure à 99%.

3.1. Produits chimiques

Les composés utilisés en tant que modèles pour les expériences sont listés ci-dessous et proviennent de Sigma Aldrich (Isle d'Abeau, France)

Tableau 2.2 : Liste des standards utilisés au cours de la thèse

Produits	Numéros CAS	Pureté	Coefficient de partage
Méthylparabène	99-76-3	>99%	1,1
Ethylparabène	120-47-8	>99%	1,5
Propylparabène	94-13-3	>99%	2,5
Butylparabène	94-26-8	>99%	4,3
New coccine red	2611-82-7	75%	0
Coumarine	91-64-5	>99%	1,6
Myoglobine	100684-32-0	>90%	1,2
Lysozyme	12650-88-3	>99%	5,2

4. Préparation des échantillons pour évaluation des performances (chapitre 3 à 5)

Pour les systèmes hydro-organiques, deux mélanges d'échantillons ont été utilisés pour l'ensemble de l'étude. Pour le système solvant HEMWat 0 (chapitre 3 et 5) l'échantillon est constitué de 5 composés tests : le marqueur de temps morts (new-coccine red) et quatre parabènes (du méthylparabène au butylparabène). L'ensemble de ces composés est dissous dans la phase mobile du système solvant à une concentration égale à 0,5 g/L chacun.

Pour le chapitre 4, une solution composée d'un mélange de deux composés modèles, new coccine red à 0,5 mg/mL et coumarine à 2,3 mg/mL est préparée dans la phase mobile du système HEHMWat +1.

Les solutions préparées sont ensuite stockées au réfrigérateur.

Concernant le système ATPS PEG/K₂HPO₄, les standards utilisés sont la myoglobine et la lysozyme. Ces deux composés sont solubilisés dans la phase PEG du système solvant à une concentration de 4,3g/L pour la myoglobine et de 8,3g/L pour le lysozyme. Ces derniers sont mis en solution et passés aux ultrasons pendant 5 minutes pour faciliter leur solubilisation. La solution préparée est conservée au réfrigérateur pendant uniquement deux jours.

Le volume d'échantillon introduit dans les rotors CPC a été fixé à 1 mL dans le chapitre 4 et pour les chapitres 3 et 5, les volumes d'échantillons ont été fixés à 250 µL dans les études du taux de phase stationnaire et de l'efficacité de la colonne. Pour la détermination du volume d'injection minimal, les boucles d'injections montées varient de 1 µL à 1 mL (chapitre 5).

5. Préparation des solutions pour test de contamination (chapitre 6)

5.1. Produits chimiques

Les composés utilisés pour l'ensemble de l'étude de la contamination sont listés ci-dessous de Sigma Aldrich (Isle d'Abeau, France).

Tableau 2.3 : Liste des produits utilisés pour l'étude de la contamination

Produits	Numéros CAS	Pureté
Commassie Brilliant Blue CBB-G250	6104-58-1	>99%
Bovine Serum Albumine	9048-46-8	>96%
Tampon phosphate salin:PBS	/	96%
Acide acétique glacial	64-19-7	>99%
Bicarbonate de potassium	144-55-8	75%
Carbonate de potassium	584-08-7	>99,5%

5.2. Préparation des solutions

Afin de réaliser le test de contamination plusieurs solutions sont nécessaires. En effet l'étude de la contamination nécessite la mise en place de plusieurs étapes.

1^{ère} étape : L'étape de contamination

Des solutions contenant des quantités croissantes de BSA ont été utilisées. Pour les préparer, une solution de tampon phosphate salin a été préparée. Le tampon phosphate salin a été réalisé avec une concentration de 0,01 M de tampon phosphate, 0,0027 M de chlorure de potassium, de 0,137 M de chlorure de sodium. Ce tampon phosphate nommé PBS et possède un pH égal à 7,4.

Ensuite des solutions allant de 1 mg à 300 mg de BSA sont préparés dans 5 ml de tampon PBS.

2^{ème} étape : L'étape de fixation

La solution de colorant nécessaire pour l'étape de fixation sur les protéines est préparée en dissolvant 500 mg de CBB dans 100 mL d'éthanol et 50 mL d'acide acétique glacial. Une fois la dissolution complète de l'eau déionisée est rajoutée jusqu'à un volume final de 1 litre. La composition finale de la solution de fixation est de 0,05% (m/v) de CBB, 10% d'éthanol, 5% d'acide acétique et 85% d'eau (v/v).

3^{ème} étape : L'étape de rinçage

Le but de cette étape est d'éliminer l'excédent de la solution de fixation. La solution de rinçage est préparée avec 200 mL d'éthanol, 100 mL d'acide acétique glacial et de l'eau déionisée jusqu'à un volume de 2 litres. La composition finale de la solution de rinçage est de 10 % d'éthanol, 5% d'acide acétique.

4^{ème} étape : L'étape d'élution

La solution d'élution a été préparée en mélangeant 500 mL d'un tampon de carbonate 0,25 M à pH = 11,4 avec 500 mL d'éthanol. La composition finale de la solution d'élution est 50% (v / v) d'éthanol et 50% de tampon carbonate.

Toutes les solutions sont conservées au réfrigérateur pendant une semaine.

5.3. Mise en place de la méthode de contamination dans un rotor CPC

L'étape de contamination est réalisée en injectant 50-80-100-200-300 mg de BSA en solution dans le tampon phosphate PBS. Ensuite un pseudo-rinçage est effectué en laissant passer la solution de PBS pendant 10 minutes à 10 mL/min. De ce fait la différence entre la quantité injectée et la quantité éliminée nous permettra de déterminer la quantité de protéines restante dans le rotor.

A partir de cette étape de contamination, nous pouvons appliquer la méthode ADECA de la manière suivante. L'étape de fixation du bleu de coomassie est réalisée en pompant la solution à un débit de 10 mL/min pendant 15 minutes. Ensuite l'étape de rinçage de l'excédent est effectuée avec un débit de 10 mL/min pendant 18 minutes. Enfin l'étape finale d'élution se fait en pompant la solution d'élution à 10 mL/min pendant 15 minutes. Au cours des différentes étapes, le rotor n'a pas été mis en rotation et la détection a été effectuée à 259 nm ce qui correspond au maximum d'absorbance du colorant CBB dans la région UV.

Chapitre 3

ÉTUDE DES PERFORMANCES D'UNE COLONNE CPC COMMERCIALE EN MILIEU BIPHASIQUE AQUEUX ET EN MILIEU HYDRO-ORGANIQUE

1. Introduction

L'utilisation de la technique LLC est peu répandue dans le domaine des biomolécules comme l'atteste le nombre d'applications rapportées dans le chapitre 1. On peut se demander si les performances instrumentales sont la cause de ce manque d'engouement.

La qualité d'une séparation, en mode élution, est caractérisée par le fait que le composé d'intérêt présente une résolution suffisante par rapport à l'impureté la plus proche. Si la résolution est supérieure à 1.5, le composé peut être considéré comme pur. La résolution en CPC (équation 3.1) est liée au choix du système solvant qui va déterminer le coefficient de partage des molécules présente, mais également à la valeur du taux de phase stationnaire et à l'efficacité chromatographique fournis par le rotor dans les conditions opératoires auxquelles il est utilisé.

$$R_s = S_f \times \sqrt{\frac{N}{4}} \times \frac{K_{d2} - K_{d1}}{1 - S_f \times \left(1 - \left(\frac{K_{d2} - K_{d1}}{2}\right)\right)} \quad \text{Equation 3.1}$$

Avec R_s la résolution entre les pics 1 et 2, S_f le taux de phase stationnaire dans le rotor et K_d le coefficient de partage des composés 1 et 2.

Le taux de phase stationnaire est, en système hydro-organique, généralement impacté de manière inversement linéaire par le débit appliqué et, dans une moindre mesure, par la vitesse de rotation (1-3). L'efficacité de la colonne peut, quant à elle, s'exprimer en termes de nombre de plateaux N , hauteur d'unité de transfert ou encore par le nombre de cellules nécessaires pour atteindre un plateau théorique NC/TP (1). C'est cette dernière notion que nous utiliserons dans cette thèse car elle permet de s'affranchir de la longueur de la colonne, ce qui facilite les comparaisons. La variance due aux phénomènes extra-colonne est également un paramètre à ne pas négliger puisqu'elle impacte le nombre de plateaux effectifs.

Si l'influence des conditions opératoires sur ces critères de performances a été déjà étudiée en milieu hydro-organique, ce n'est pas le cas dans le cadre d'une utilisation avec des systèmes biphasiques aqueux. De plus, l'ensemble des performances des rotors en milieux biphasiques aqueux va fortement dépendre du design des cellules qui composent les rotors CPC utilisés.

La géométrie des cellules composant les rotors de CPC a largement été étudiée pour améliorer les performances chromatographiques des séparations utilisant les systèmes solvants hydro-organiques. Cela a conduit à une évolution depuis les cellules Z (fig.3.1a) utilisées dans les années 80 vers des cellules twins (fig.3.1b) commercialisées de nos jours. Plus précisément, comme l'ont démontré notamment les travaux de thèse de L. Marchal (4), le volume de la cellule Z n'est pas utilisé dans son intégralité lors du transfert de masse qui s'effectue entre la phase mobile entrant dans la cellule et la phase stationnaire. En effet cette équipe a montré que la forme Z génère des zones de phase stationnaire stagnante qui ne sont jamais traversées par la phase mobile et dans lesquelles les solutés vont diffuser lentement, ce qui conduit à des élargissements de pics néfastes à la séparation. L'apport du design « twin » permet par l'effet Coriolis de mettre en œuvre dans la cellule un mouvement de phase mobile de forme vortex qui va ainsi balayer l'intégralité du volume de phase stationnaire. Afin de comparer deux colonnes CPC possédant un design de cellule différent, il est

préférable d'utiliser la notion de NC/TP introduite par une étude récente réalisée par Fumat et al (1). Notion similaire à l'HETP en HPLC, cette notion permet ainsi de comparer deux colonnes indépendamment du nombre de cellules la constituant. De ce fait, si l'on compare les deux géométries de colonnes existantes, c'est à dire la forme Z et la forme twin, on constate d'après la figure 3.2 (résultats retraités à partir des références (1, 5)) que le transfert de masse en système solvant hydro-organique est meilleur dans les cellules twins et cela quel que soit le taux de phase stationnaire. C'est pourquoi aujourd'hui seul le design en cellules twins est commercialisé.



Figure 3.1 : Photographie des cellules des rotors CPC commercialisés. A) Cellules Z B) Cellules twins (6)

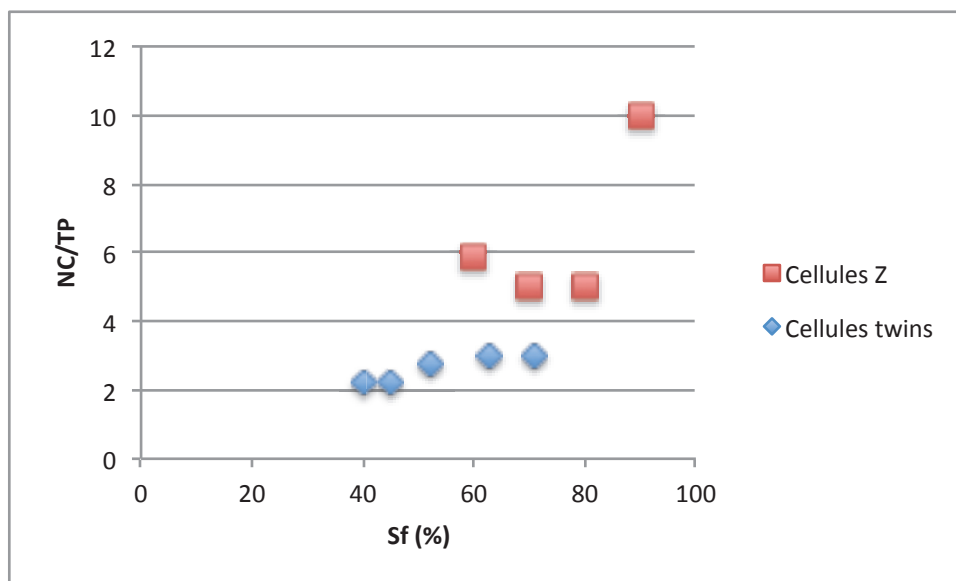


Figure 3.2 : Variation de NC/TP de la carvone dans un système solvant HEMWat 0 en fonction du taux de phase stationnaire pour des cellules twins (1) et des cellules Z (5).

Si on s'intéresse aux systèmes solvants biphasiques aqueux, les deux types de cellules ont déjà été employées. Ainsi, les exemples cités précédemment portant sur la purification d'échantillons réels utilisent des rotors possédant des cellules Z. Dans ces colonnes, le taux de phase stationnaire est important. En effet dans le cadre de la purification des lipases (7) tout comme dans celui de la purification d'anticorps monoclonaux (7, 8), le taux de phase stationnaire est supérieur à 60% dans les conditions utilisées, comme le montre le tableau 3.1. Dans ces deux exemples, les valeurs du taux

de phase stationnaire correspondent à des valeurs proches de celles obtenues dans le cadre de systèmes solvants hydro-organiques. Une étude plus théorique menée sur des rotors de type Z (5, 9) conforte ces résultats avec un taux de phase stationnaire supérieur à 60 % pour les différentes conditions testées. Néanmoins, dans cette étude, nous notons que malgré un taux de phase stationnaire élevé (supérieur à 50%), il n'y a pas de retour à la ligne de base entre les composés myoglobine et BSA constituant le mélange test de l'étude. Cette faible résolution peut s'expliquer par le fait que le design des cellules Z génère des zones de phase stationnaire stagnante, non mises en œuvre dans le transfert de masse. Tout cela conduit à une efficacité chromatographique moindre (NC/TP = 20) et donc une moindre qualité de séparation. Ces exemples soulèvent donc la question de l'importance de l'efficacité chromatographique, en dépit d'un taux de phase stationnaire élevé.

Tableau 3.1 : Résumé des résultats des performances pour différentes études menées sur des cellules Z.

	système solvant	Conditions opératoires	Colonnes	Sf (%)
Purification de lipase (10, 11)	13%(w/w) PEG 3000 6% (w/w) PO ₄ ³⁻ 2,5% (w/w) NaCl	1000 rpm 5 mL/min	200 mL 1320 chambres	70%
Purification d'anticorps (7, 8)	16,5% (w/w) PEG 400 17,45%(w/w) PO ₄	2500 rpm 5 mL/min	200 mL 1320 chambres	60%
	21,02% PEG 400 18,99% citrate	1500 rpm 5 mL/min	500 mL 1008 chambres	53%
Etude théorique (5, 9)	12,5%(w/w) PEG 1000 6,82% (w/w) PO ₄ ³⁻	2000 rpm 2 mL/min	200 mL 1320 chambre	Supérieur à 60 %

Intéressons-nous maintenant aux travaux impliquant des cellules de forme twins. Une thèse a été réalisée par l'université de Brunel en 2008 (12) portant sur la chromatographie à contre courant des protéines utilisant les systèmes ATPS dans laquelle un chapitre est consacré à la CPC. Dans ce travail, la colonne est un rotor à disques de 500 mL composé de cellules twins. Le taux de phase stationnaire obtenu après équilibre des deux phases varie de 14,7% à 1000 rpm et un débit de 10 mL/min à 35,2% à 3000 rpm pour ce même débit. Le meilleur taux de phase stationnaire est obtenu pour une vitesse de rotation de 2000 rpm et un débit de 5 mL/min avec une valeur de 44,8%. En ce qui concerne la résolution entre myoglobine et lysozyme, elle est supérieure à 1,5 pour l'ensemble des conditions opératoires citées précédemment excepté pour la rotation à 1000 rpm où la résolution est inférieure à 1. En effet à 1000 rpm, le taux de phase stationnaire (égal à 14,7%) n'est pas suffisant pour permettre la séparation.

L'étude la plus récente réalisée en 2013 par l'équipe d'A. Berthod porte sur l'avantage d'un petit rotor en CPC (13). La colonne utilisée est un rotor à disques de 33 mL composé de 832 cellules twins.

Dans ces travaux, trois débits (2-4-6 mL/min) ont été testés à 2000 rpm avec le système solvant 14%PEG-14%K₂HPO₄ (w/w) pour la séparation d'un mélange test composé de myoglobine et de lysozyme. Le taux de phase stationnaire du système ATPS PEG-1000-K₂HPO₄ est passé de 47% à 14%, ce qui est proche de ce qui a été réalisé dans l'étude de l'université de Brunel. L'avantage principal illustré dans cette publication est le temps d'analyse qui est de l'ordre de 15 minutes au lieu des 3h. Ces travaux mettent donc en avant une petite colonne CPC permettant de réaliser des tests rapides dans le cadre des systèmes solvants aqueux. Dans ce chapitre, nous utiliserons cette colonne qui, depuis la publication de 2013, a été commercialisée, afin d'étudier les performances en ATPS.

Dans un premier temps, afin de comparer l'ensemble des colonnes existantes (forme Z et forme twin), il est nécessaire de travailler à partir de modèles et de systèmes solvants standardisés. En effet, la littérature révèle que plusieurs travaux de recherche ont employé des systèmes solvants très similaires en termes de composition de phases. Les systèmes solvants utilisés étaient composés essentiellement d'un polymère, le polyéthylène glycol, et d'un sel le phosphate de potassium avec une composition massique du système solvant de 12,5% PEG1000-12,5%K₂HPO₄. Les échantillons, quant à eux, sont constitués de protéines modèles tels que la myoglobine, le lysozyme (et la bovine sérum albumine (7, 14-18).

Comme pour les systèmes solvants hydro-organiques nous pouvons comparer les performances déjà publiées des deux géométries de colonnes twin/ Z dans le cadre de l'utilisation des ATPS (9, 17) au travers de la figure 3.3. La myoglobine présente dans ces conditions de système solvant un coefficient de partage d'environ 1,6. Le nombre de résultats dans la littérature étant restreint uniquement deux points ont pu être répertoriés. A nombre de cellules équivalent, une colonne donnera une résolution d'autant plus importante qu'elle présentera un taux de phase stationnaire maximal ainsi qu'une faible valeur de NC/TP (et donc une meilleure efficacité), ce qui correspond à une position en bas à droite dans la Figure 3.3. D'après la Figure 3.3, nous avons décidé de sélectionner des cellules twins qui permettent d'obtenir de meilleures efficacités que les cellules Z et à partir de là nous allons tenter au cours de cette thèse d'améliorer la rétention des phases stationnaires aqueuses dans ces cellules twins.

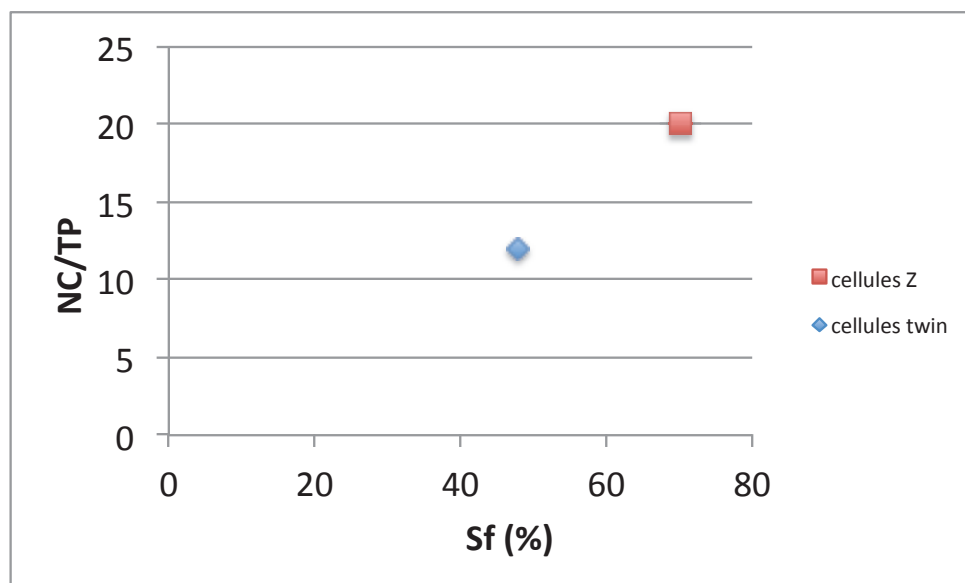


Figure 3.3 : Variation de NC/TP pour la myoglobine en fonction du taux de phase stationnaires pour des cellules twins et des cellules Z. Système solvant ATPS 12,5% PEG- 12,5 K₂HPO₄ Mode descendant. 2000 rpm F= 2mL/min. Données issues des publications (9, 13)

En plus de l'influence des conditions opératoires, des études ont porté sur l'impact de la nature du système solvant sur le taux de phase stationnaire. C'est le cas de la publication issue de l'équipe de Dortmund (9). Dans cette publication, l'objectif est d'étudier l'effet de la composition chimique du système solvant ATPS sur les performances de la colonne. Les différents systèmes solvant étudiés sont composés de PEG 1000, PEG 2000 ou PEG 3000 mélangé à du phosphate. Ainsi il a été constaté que plus le poids moléculaire du polymère est élevé meilleur est le taux de phase stationnaire. Cette amélioration s'explique par le fait que la tension interfaciale entre la phase PEG et la phase phosphate augmente passant de 0,06 mN/m pour le système solvant composé de 12,5% de PEG 1000 et 12,5% de K₂HPO₄ à 0,3 mN/m pour le système 12,5% de PEG 2000 et 12,5% de K₂HPO₄, rendant le système solvant plus stable dans la colonne CPC. Néanmoins, en augmentant le poids moléculaire le risque est d'obtenir des systèmes solvant très visqueux et de ce fait augmenter la pression au sein des colonnes ce qui génère un risque mécanique sur les joints rotatifs. À noter que la pression maximale supportable des joints est, pour les deux fournisseurs français (Kromaton et Armen), de 80 bars.

Enfin un dernier aspect qui n'a été que peu évoqué dans l'ensemble des travaux cités précédemment est l'aspect répétabilité et robustesse des séparations réalisées avec les systèmes solvants ATPS. En effet seuls les travaux publiés par Goll et al (19) sur une colonne CPC possédant des cellules twins mettent en évidence la difficulté de retenir les phases stationnaires aqueuses sur de longues périodes puisque l'auteur souligne qu'aux débits les plus faibles (2 mL/min pour un colonne de 250 ml), la perte de phase stationnaire est continue, conduisant à une rétention de la phase polymère en mode descendant nulle. Cela est surprenant sachant que ce système solvant a déjà été largement étudié dans ces conditions-là. Cette différence de comportement peut éventuellement être expliquée par une différence de source du polymère utilisé. Le polyéthylène glycol utilisé a une masse moyenne de 1000 Da, dont la distribution peut varier d'un fournisseur à un autre. Nous avons constaté au cours de cette thèse que le changement de source affecte les caractéristiques physicochimiques des systèmes solvants préparés et donc les résultats obtenus. Une autre cause

possible de non répétabilité peut être une évolution de la température de travail qui n'est pas indiquée dans la publication de Goll. En effet la température joue un rôle primordial dans l'équilibre des phases stationnaires aqueuses (20, 21). Ce problème reste encore peu discuté dans la littérature scientifique, mais il nous semble essentiel de thermostatier des systèmes solvants aussi sensibles.

Ainsi, afin de mettre en lumière la nécessité d'améliorer les performances instrumentales des colonnes CPC dans le cadre de l'utilisation des solvants ATPS, il est important d'établir un constat approfondi des performances des colonnes actuelles (la modification du design sera le propos des chapitres 4 et 5 de la thèse). Pour cela, une étude complète a été réalisée sur le maintien des phases stationnaires et l'efficacité obtenus lors de l'utilisation d'ATPS au sein du plus petit rotor CPC commercialisé par la société Rousselet Robatel et mis au regard des performances en systèmes solvants hydro-organiques.

2. Résultats et discussion

Le rotor 30 mL commercialisé par Kromaton-Rousselet Robatel est actuellement le plus petit rotor CPC disponible sur le marché. Il est reconnu pour ses performances en milieu hydro-organique (1, 17). Ses performances en milieu ATPS sont encore peu exploitées. Une étude comparative a donc été réalisée sur une large gamme de conditions opératoires afin de déterminer la tenue de phase stationnaire et l'efficacité dans ces deux systèmes solvants, dont les caractéristiques physicochimiques sont rappelées dans le tableau 3.2.

Pour la réalisation de l'étude des performances avec un système solvant hydro-organique, les solutés tests choisis appartiennent à la famille des parabènes. Ces derniers ont été choisis afin de disposer d'une famille d'homologues. Concernant le choix du système solvant, le point de comparaison est établi avec le système solvant hydro-organique HEMWat 0, c'est-à-dire heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau en proportions volumiques égales (1/1/1/1). Ce dernier est choisi car il correspond à la position médiane des systèmes solvants HEMWat, représentant les colonnes les plus utilisées actuellement sur le marché car adaptées à la séparation de molécules moyennement polaires présentes dans les extraits naturels comme les polyphénols par exemple (22, 23).

Tout au long de cette thèse, une composition unique d'ATPS sera étudiée. Il s'agit du système solvant composé de 14% PEG/ 14% K₂HPO₄ et 72% d'eau (pourcentage massique) qui a déjà fait ses preuves au sein de notre laboratoire, c'est à dire qui a permis la rétention de la phase stationnaire aqueuse. Les standards utilisés étant ceux répandus dans l'ensemble de la littérature, à savoir la myoglobine et la lysozyme.

Tableau 3.2 Caractéristiques physico-chimiques (à 25°C) des systèmes solvants HEMWat et ATPS sélectionnés

	HEMWat 0	ATPS
Différence de densité (23)	146 kg/m ³	73,7 kg/m ³
Viscosité phase mobile	0,72 Pa.s	1 Pa.s
Composition phase haute	50% Eau 34,4% Ethyl Acétate 62,5% Heptane 2,6% Méthanol (v/v/v/v)	34,6% PEG 4,4% K ₂ HPO ₄ 61% Eau (w/w/w)
Composition phase basse	41,7% Eau 18,3% Ethyl Acétate 0,1% Heptane 39,9% Méthanol	3,2% PEG 19,5% K ₂ HPO ₄ 77,3% Eau (w/w/w)

2.1. Influence des paramètres de la CPC sur le taux de phase stationnaire

Il est reconnu qu'un champ centrifuge élevé permet de disposer du taux de phase stationnaire le plus important ainsi que d'une bonne efficacité chromatographique (2). Cependant, la vitesse de rotation a un impact négatif sur la pression (équation 3.2).

$$\Delta P = a.Sf.\Delta\rho.\omega^2 + b.\eta.F \quad (\text{Equation 3.2})$$

$\Delta\rho$ représente la différence de densité entre la phase mobile et la phase stationnaire, ω^2 la vitesse angulaire du rotor, η la viscosité de la phase mobile. Enfin a et b sont des constantes reliées à la géométrie du rotor. Le terme hydrostatique de cette équation indique que pour les systèmes solvant présentant une différence de densité supérieure à 100 kg/m³ entre la phase haute et la phase basse, comme c'est le cas dans les systèmes solvants hydro-organiques, une vitesse de rotation élevée génère très vite de la pression. Ainsi à 2500 rpm et à Sf=30%, le terme hydrostatique atteint une valeur de 52,1bars en HEMWat 0 et de 32 bars en ATPS. Le terme hydrodynamique reste relativement faible pour les deux systèmes solvants, la viscosité de la phase mobile η étant faible dans les deux cas en mode descendant. A noter que cela ne serait pas vrai pour un système solvant ATPS utilisé en mode ascendant, pour lequel la phase mobile à base de PEG est très visqueuse.

La pression maximale de notre instrumentation étant fixée à 80 bars, la vitesse de rotation maximale atteignable est de 2500 rpm en système HEMWat 0. A cette même vitesse de rotation, le système ATPS en mode descendant génère environ 40 bars en raison d'une différence de densité plus faible entre les deux phases.

Nous nous sommes placés dans un premier temps à une vitesse de rotation identique en ATPS et en système solvant HEMWat 0, c'est-à-dire 2500 rpm, pour permettre la comparaison du taux de phase stationnaire dans des conditions de force centrifuge identique. Ainsi, le taux de phase stationnaire (Sf) a été évalué à différents débits (Figure 3.4).

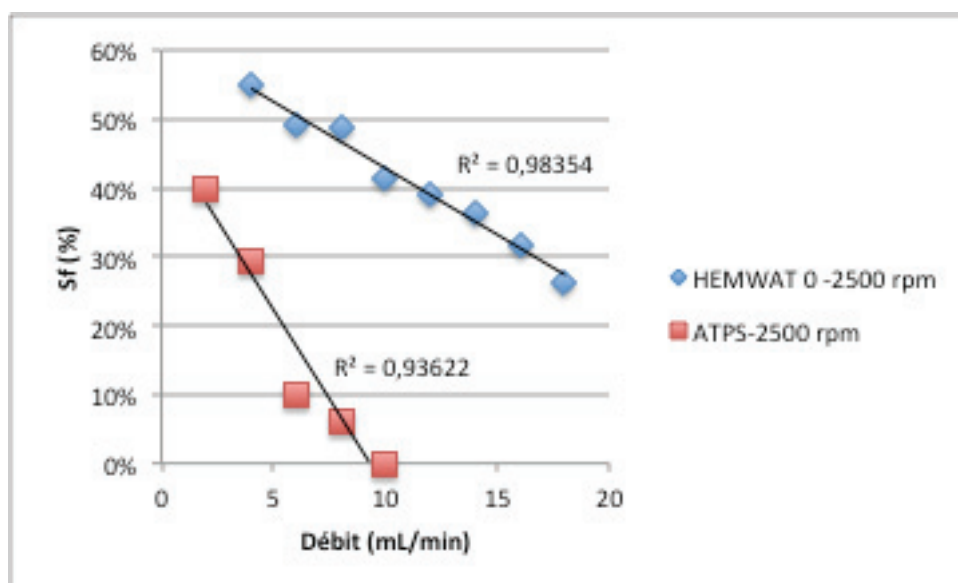


Figure 3.4 : Evolution du taux de phase stationnaire des systèmes HEMWat 0 et ATPS 14%PEG-14% K_2HPO_4 en fonction du débit de la phase mobile. Mode descendant. 2500 rpm.

D'après la figure 3.4, le taux de phase stationnaire diminue linéairement lorsque le débit augmente, et cela pour les deux systèmes solvants ($r^2 > 0,9$), en cohérence avec les études menées par Foucault et al (24) et Fumat et al (1). Le taux de phase stationnaire varie de 57% à 28 % pour un débit variant de 4 mL/min à 18 mL/min pour le système solvant HEMWat 0, alors qu'il varie de 40% à 0% pour des débits compris entre 2 mL/min et 10mL/min pour les ATPS. D'après ces données, on constate donc comme dans les observations de la littérature, que la plage d'utilisation des ATPS est très réduite si on considère qu'il faut a minima 30% de taux de phase stationnaire pour obtenir une résolution convenable. L'augmentation du débit est un paramètre des plus influents dans le cadre des systèmes solvants ATPS. En effet, les ATPS sont caractérisés par une faible tension interfaciale, ce qui va allonger les temps de décantation, ainsi que par une faible différence de densité entre les deux phases (25), ce qui rend leur rétention au sein des colonnes CPC difficile. Ainsi les caractéristiques physicochimiques de ce système solvant biphasique offre une zone limitée de débit de travail (2 à 4 mL/min) contrairement au système solvant hydro-organique (2 à 16 mL/min).

Ayant observé l'effet important du débit sur les systèmes solvants ATPS, il convient maintenant de déterminer la vitesse de rotation optimale pour ce système ATPS. En effet, contrairement au système solvant HEMWat 0 qui génère de la pression, il est possible d'augmenter la vitesse de rotation au-delà de 2500 rpm pour les systèmes solvants ATPS. Les résultats de l'effet de la rotation sur le taux de phase stationnaire sont présentés dans la figure 3.5. Nous avons déterminé que la vitesse de rotation maximale atteignable est de 2800 rpm, vitesse pour laquelle la pression obtenue est de 63 bars. De plus, une étude ayant été réalisée dans la littérature à 2000 rpm sur ce rotor (13), cette vitesse de rotation a également été testée pour vérifier si la vitesse de rotation avait un rôle sur le taux de phase stationnaire plus important pour l'ATPS que pour le système solvant HEMWat.

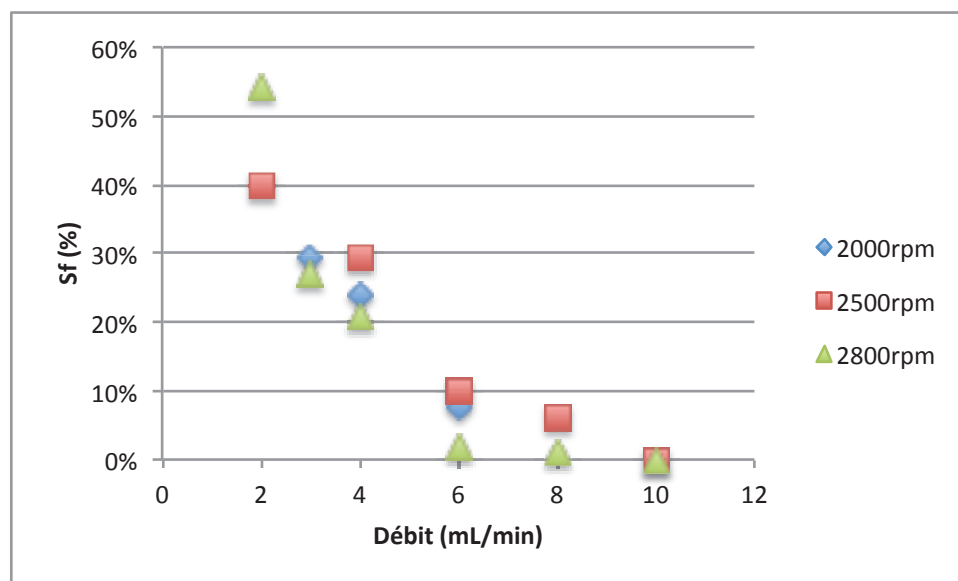


Figure 3.5 : Evolution du taux de phase stationnaire du système ATPS 14%PEG-14% K_2PO_4 en fonction du débit de phase mobile, à différentes vitesses de rotation. Mode descendant.

D'après la figure 3.5, l'effet de la vitesse de rotation sur le taux de phase stationnaire n'est pas significatif excepté au débit le plus faible à 2 mL/min pour lequel le taux de phase stationnaire est de 52% pour 2800 rpm alors qu'il est de 40% pour 2000 rpm et 2500 rpm. Ces observations rejoignent les études précédemment menées sur l'effet de la vitesse de rotation en système solvant hydro-organique (12, 24, 26) qui constatent qu'au-delà de 800 rpm la rotation n'a que peu d'influence sur le taux de phase stationnaire en système solvant hydro-organique.

Ainsi, pour les systèmes solvants ATPS, l'évolution du taux de phase stationnaire est conforme à la théorie qui stipule que le taux de phase stationnaire d'un système solvant dépend majoritairement du débit de la phase mobile et peu de la vitesse de rotation, comme observé pour les systèmes solvants hydro-organiques.

2.2. Etude de l'efficacité

Afin d'évaluer les capacités de transfert de masse des systèmes solvants ATPS toujours en comparaison avec le système solvant HEMWat 0, l'efficacité des pics chromatographiques a été mesurée pour chacun des débits étudiés. Pour cela les composés choisis sont, pour le système solvant HEMWat 0, l'ethyl-parabène possédant un coefficient de partage égal à 1,1 et pour le système solvant ATPS, la myoglobine avec un coefficient de partage égal à 1,2. Nous avons choisi de comparer ces deux composés car ces derniers possèdent des coefficients de partage relativement proches. Les résultats sont présentés dans la figure 3.6.

Pour l'ensemble des mesures que ce soit sous le système solvant ATPS ou sous le système hydro-organique, la variance extra-colonne a été mesurée et est considérée comme négligeable, de ce fait les valeurs de nombre de plateaux mesurés correspondent aux valeurs relatives aux rotors.

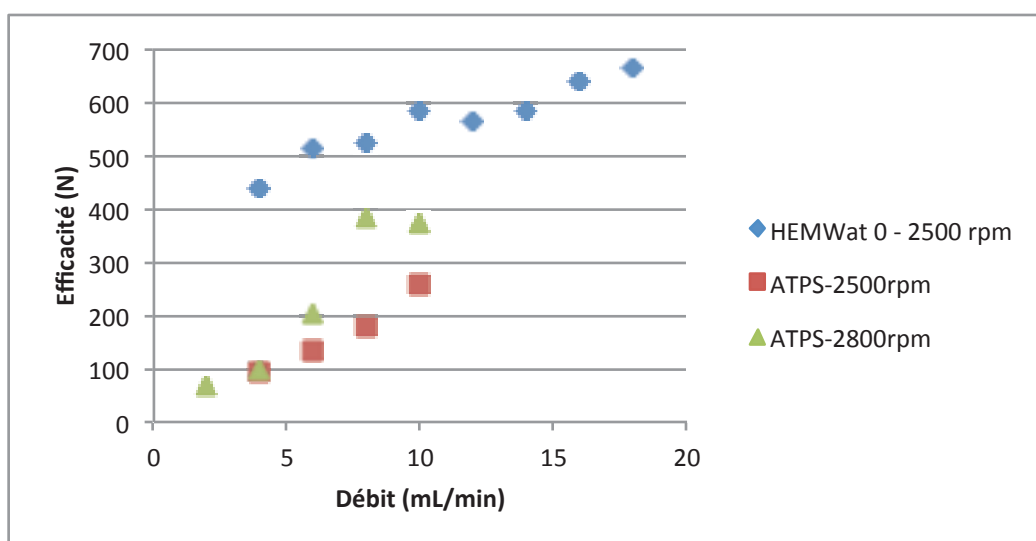


Figure 3.6 : Efficacité expérimentale des pics de composés ayant un coefficient de partage proche de 1, en fonction du débit de phase mobile. Système HEMWat 0 à 2500 rpm, mode descendant, soluté= ethyl parabène (K_d 1,1) et système ATPS 14%PEG-14% K_2HPO_4 à 2500 rpm et 2800 rpm, mode descendant, soluté = myoglobine (K_d 1,2).

Pour les deux systèmes solvant, l'efficacité des composés augmente avec le débit. Cette tendance s'explique par le fait que l'augmentation du débit à haute vitesse de rotation permet d'atteindre le mode spray de la phase mobile décrit par Marchal (3, 27). Le mode spray correspond à un nuage de gouttelettes de phase mobile situé à l'entrée de la cellule. Ce spray occupe ainsi de façon homogène l'ensemble de la cellule, ce qui permet un transfert de masse uniforme au sein de la cellule, un échange entre les deux phases optimales et donc des efficacités meilleures. Plus précisément, la force de Coriolis couplée à un débit élevé de phase mobile permet une meilleure dispersion des gouttelettes au sein des cellules, ce qui induit un meilleur transfert de masse et donc une meilleure efficacité.

On constate cependant que l'efficacité des systèmes solvants ATPS est largement inférieure à celle obtenue pour le système solvant hydro-organique et cela quelle que soit la vitesse de rotation testée. En effet, dans le système solvant HEMWat 0, les valeurs de nombres de plateaux augmentent de 420 plateaux théoriques à 680 plateaux théoriques alors que pour l'ATPS les ordres de grandeurs sont nettement inférieurs avec une efficacité qui évolue de 99 à 284 plateaux pour une vitesse de rotation identique de 2500 rpm. Cette différence peut s'expliquer par le fait que dans le cadre des ATPS la surface d'échange entre la phase stationnaire et la phase mobile est plus faible que dans le cadre du système HEMWat 0. En effet, la phase mobile du système solvant ATPS possède une viscosité plus importante que la phase mobile du système HEMWat 0, ce qui entraîne une augmentation de l'épaisseur du film de phase mobile contre la paroi (4). De ce fait, l'écoulement obtenu est alors un film épais qui se traduit par la présence de gouttelettes plus grosses entraînant un nombre d'échanges chromatographiques moins importants dans le cadre des systèmes solvant ATPS qu'hydro-organique. De plus, la vitesse de décantation des systèmes ATPS étant plus lente que celle des systèmes hydro-organiques, la phase mobile traversant la phase stationnaire n'a pas le temps de réaliser un nombre d'échanges équivalents aux systèmes hydro-organique.

Concernant l'effet de la vitesse de rotation dans le cadre des ATPS, l'augmentation de cette dernière à 2800 rpm donne lieu à une efficacité significativement différente à partir de 6 mL/min. Cela signifie que la faible efficacité issue des ATPS pourrait être compensée par une augmentation de la vitesse de rotation. Il sera donc préférable de travailler à une vitesse de rotation égale ou supérieure à 2800 rpm et à un débit supérieur à 4 mL/min afin de disposer des meilleures conditions opératoires de travail en termes d'efficacité avec des valeurs de 300 plateaux au mieux.

L'ensemble de ces résultats confirme donc que pour des systèmes ATPS, les rotors actuels ne sont pas optimisés. Tandis qu'un débit élevé garantira de meilleures efficacités, le maintien de la phase stationnaire à des hauts débits n'est pas possible (supérieur à 4 mL/min). Une modification du design des cellules peut sembler nécessaire.

3. Cahier des charges

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude préliminaire nous permet de définir un cahier des charges dans le but d'améliorer les performances des colonnes CPC lorsqu'elles sont utilisées avec les systèmes solvant ATPS, tout en conservant les performances actuelles dans le cadre des solvants hydro-organiques.

La première modification suggérée par les résultats est d'améliorer le mélange entre la phase mobile et la phase stationnaire au sein d'une cellule. D'après Chollet et Marchal (28, 29), l'efficacité d'une cellule est fonction du temps de décantation des deux phases d'un système solvant. Or ce temps de décantation est fonction de la taille et de la géométrie des cellules, du débit de la phase mobile ainsi que de la vitesse de rotation. L'effet du débit de phase mobile ainsi que de la vitesse de rotation ayant été constaté, il est intéressant de modifier la géométrie des cellules. Les études réalisées dans la littérature montrent que les cellules favorisant mélange et décantation sont des cellules possédant une hauteur et une largeur de taille identique (28, 29). Partant de ce principe, un rapport de forme proche de 1 est préconisé.

Afin de valoriser la technique CPC dans les milieux biochimiques où les échantillons sont à très haute valeur ajoutée, il est important d'injecter des échantillons de taille réduite, et pour cela, la variance de la colonne doit être réduite. Ainsi l'idéal serait de disposer d'un rotor de faible volume et d'efficacité améliorée dans lequel les volumes des échantillons à injecter représentent maximum 1% du volume du rotor. Pour permettre cette amélioration, les dimensions des cellules devront être réduites au maximum. Afin de diminuer la dispersion non chromatographique éventuelle qui a lieu dans les canaux qui relient les cellules entre elles, le rapport volume des canaux sur volume des cellules devrait être le plus petit possible, ce qui représente un challenge également en termes de fabrication.

Références

1. Fumat N, Berthod A, Faure K. Effect of operating parameters on a centrifugal partition chromatography separation. *Journal of Chromatography A*. 2016;1474:47-58.
2. Adelman S, Schembecker G. Influence of physical properties and operating parameters on hydrodynamics in Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(32):5401-13.
3. Marchal L, Foucault A, Patissier G, Rosant JM, Legrand J. Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A*. 2000;869(1-2):339-52.
4. Marchal L. Contribution à la théorie et au développement de la chromatographie de partage centrifuge : Etude de l'hydrodynamique des phases et du transfert de matière 2001.
5. Schwienheer C, Merz J, Schembecker G. Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *Journal of Chromatography A*. 2015;1390:39-49.
6. Kromaton. (www.kromaton.com, consulté le 09/09/2017) [
7. Oelmeier SA, Effio CL, Hubbuch J. High throughput screening based selection of phases for aqueous two-phase system-centrifugal partitioning chromatography of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*. 2012;1252:104-14.
8. Oelmeier SA, Ladd-Effio C, Hubbuch J. Alternative separation steps for monoclonal antibody purification: Combination of centrifugal partitioning chromatography and precipitation. *Journal of Chromatography A*. 2013;1319:118-26.
9. Schwienheer C, Merz J, Schembecker G. Selection and Use of Poly Ethylene Glycol and Phosphate Based Aqueous Two-Phase Systems for the Separation of Proteins by Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2015;38(9):929-41.
10. Shibusawa Y, Ino Y, Kinebuchi T, Shimizu M, Shindo H, Ito Y. Purification of single-strand DNA binding protein from an Escherichia coli lysate using counter-current chromatography, partition and precipitation. *Journal of Chromatography B*. 2003;793(2):275-9.
11. Schwienheer C, Prinz A, Zeiner T, Merz J. Separation of active laccases from *Pleurotus sapidus* culture supernatant using aqueous two-phase systems in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2015;1002:1-7.
12. Bourton EC. Countercurrent chromatography of proteins using aqueous two-phase systems: Brunel University School of Engineering and Design PhD Theses; 2008.
13. Berthod A, Ignatova S, Sutherland IA. Advantages of a small-volume counter-current chromatography column. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(19):4169-75.
14. Sutherland IA. Review of centrifugal liquid-liquid chromatography using aqueous two-phase solvent (ATPS) systems: its scale-up and prospects for the future production of high-value biologics. 2007.
15. Sutherland IA, Audo G, Bourton E, Couillard F, Fisher D, Garrard I, et al. Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008;1190(1):57-62.
16. Grudzień Ł, Madeira L, Fisher D, Ma J, Garrard I. Phase system selection with fractional factorial design for purification of recombinant cyanovirin-N from a hydroponic culture medium using centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2013;1285:57-68.
17. Faure K, Mekaoui N, Meucci J, Berthod A. Solvent selection in countercurrent chromatography using small-volume hydrostatic columns. *LCGC North America*. 2013;31(2):132-43.
18. Mekaoui N, Faure K, Berthod A. Advances in countercurrent chromatography for protein separations. *Bioanalysis*. 2012;4(7):833-44.
19. Goll J, Audo G, Minceva M. Comparison of twin-cell centrifugal partition chromatographic columns with different cell volume. *Journal of Chromatography A*. 2015;1406:129-35.

20. Chakraborty A, Sen K. Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems. *Journal of Chromatography A*. 2016;1433:41-55.
21. Ratanapongleka K. Recovery of biological products in aqueous two phase systems. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2010;1(2):191.
22. Maver M, Queiroz EF, Wolfender J-L, Hostettmann K. Flavonoids from the Stem of *Eriophorum s cheuchzeri*. *Journal of natural products*. 2005;68(7):1094-8.
23. Berthod A, Hassoun M, Ruiz-Angel M. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005;383(2):327-40.
24. Foucault A, Frias EC, Bordier C, Goffic FL. Centrifugal Partition Chromatography: Stability of Various Biphasic Systems and Pertinence of the "Stoke's Model" to Describe the Influence of the Centrifugal Field Upon the Efficiency. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 1994;17(1):1-17.
25. Toribio A, Boudesocque L, Richard B, Nuzillard J-M, Renault J-H. Preparative isolation of glucosinolates from various edible plants by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography. *Separation and purification technology*. 2011;83:15-22.
26. Foucault A, Bousquet O, Goffic FL, Cazes J. Countercurrent chromatography with a new centrifugal partition chromatographic system. *Journal of liquid chromatography*. 1992;15(15-16):2721-33.
27. Marchal L, Legrand J, Foucault A. Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography. *AIChE journal*. 2002;48(8):1692-704.
28. Chollet S. Rationalisation des critères de dimensionnement d'une colonne de chromatographie de partage centrifuge. Thèse, Université de Nantes; 2013.
29. Chollet S, Marchal L, Meucci J, Renault J-H, Legrand J, Foucault A. Methodology for optimally sized centrifugal partition chromatography columns. *Journal of Chromatography A*. 2015;1388:174-83.

Chapitre 4

MODIFICATION DU DESIGN DES CELLULES DES ROTORS DE CPC EN VUE DE L'AMÉLIORATION DES PERFORMANCES

1. Introduction

L'étude approfondie des performances, réalisée au cours du chapitre précédent, a permis de mettre en évidence la nécessité de modifier le design des colonnes CPC actuelles. Les colonnes CPC à doubles cellules permettent dans le cadre des systèmes solvants biphasiques aqueux ou hydro-organiques, d'avoir des meilleures efficacités par cellule en comparaison avec les rotors possédant des cellules simples (1). En revanche, ces colonnes ne permettent pas de retenir suffisamment les systèmes solvants biphasiques aqueux, limitant le travail à une plage de débit restreinte (de 2 mL/min à 4 mL/min). Ainsi dans le cadre de ce chapitre le but est d'étudier différents designs de colonne afin d'améliorer l'hydrodynamique des systèmes ATPS au sein des cellules tout en conservant les performances actuelles (taux de phase stationnaire, efficacité dans le cadre des systèmes solvant hydro-organiques).

Le comportement hydrodynamique des systèmes solvant biphasiques au sein de la colonne est caractérisé par le contact entre la phase stationnaire et la phase mobile ainsi que la circulation de la phase stationnaire elle-même au sein des cellules. La compréhension de la dynamique des fluides est essentielle car elle influence directement l'efficacité des séparations en CPC. Si la diffusion des solutés dans chacune des phases joue un rôle sur la dispersion chromatographique, l'efficacité de séparation est majoritairement influencée par le transfert de masse entre les deux phases du système solvant. La connaissance de ce comportement hydrodynamique facilite le choix de conditions opératoires offrant les performances optimales. Ainsi, des études fluidiques portant sur ce point ont donné lieu à de nombreuses publications (1-8). Ces études ont permis de mettre en évidence les paramètres influençant les performances. Ainsi, Marchal et al (8) indique que le comportement hydrodynamique est influencé par :

- Les propriétés physico-chimiques des systèmes solvants (densité, viscosité, tension interfaciale)
- Les conditions opératoires telles que la vitesse de rotation, le débit de la phase mobile et le mode de travail (ascendant, descendant).
- Les paramètres des cellules composant les colonnes tels que la forme, la taille, le volume et le matériau.

Afin d'étudier la mécanique des fluides au sein des colonnes CPC, Foucault et al (9) avaient suggéré de visualiser directement les écoulements des phases pour identifier les caractéristiques favorables à l'efficacité de l'instrument, en terme de taux de phase stationnaire, et de ce fait optimiser les formes des cellules. Le principe de la visualisation consiste en l'utilisation d'un rotor possédant un disque unique percé de cellules à la forme étudiée, et fermé dans sa partie inférieure et supérieure par des parois transparentes en verre, le tout associé à un montage de vidéo stroboscopique ainsi qu'un système d'acquisition des distributions des temps de séjour (figure 4.1). Ce montage expérimental permet de visualiser les écoulements à l'intérieur des canaux et des cellules d'un disque CPC.

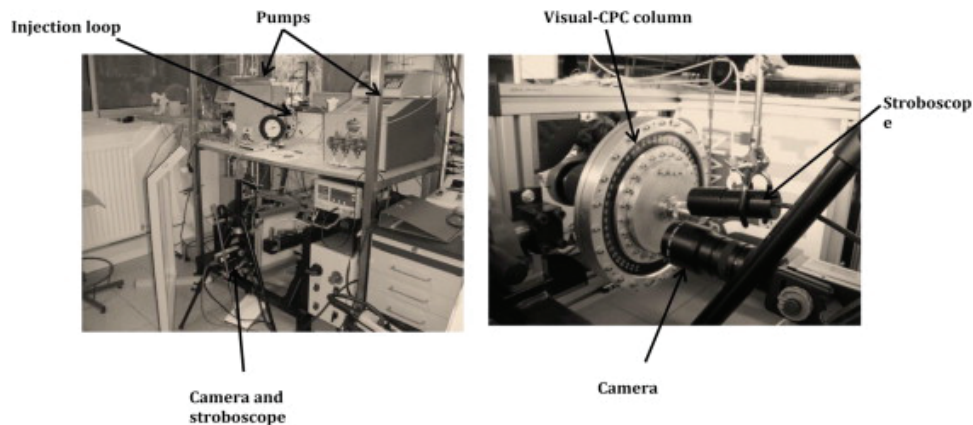


Figure 4.1 : Schéma du montage expérimental comprenant le système de visualisation à gauche, le rotor visuel au centre ainsi que le système chromatographique à droite (10)

La première étude basée sur le principe de visualisation a été réalisée par Von Buel et al (11) en 1998. Des premières images de visualisation ont été obtenues sur le système solvant hexane/eau pour différentes vitesses de rotation ainsi que différents débits. Cette expérience a mis en évidence quatre différents types d'état du flux de phase mobile au sein de la phase stationnaire : de larges gouttelettes, un jet de phase mobile contre la paroi des cellules, un jet dévié ainsi qu'une atomisation. De plus, elle a mis en évidence l'existence de la force de Coriolis qui modifie la trajectoire de jet de phase mobile arrivant dans la cellule. Cette force entraîne une déviation de la phase mobile sur les parois des cellules et de ce fait diminue la surface de contact entre la phase stationnaire et la phase mobile, ce qui impacte l'efficacité de la colonne.

Après ces premiers résultats, les travaux menés dans le cadre de la thèse de L. Marchal (6-8) ont démontré que l'écoulement de la phase mobile se faisait selon trois étapes :

- Injection de la phase mobile dans la phase stationnaire à l'entrée de la cellule
- Elution qui correspond à la période de contact entre les deux phases
- Coalescence qui correspond à la disparition de l'interface au moment du passage de la phase mobile dans la cellule suivante

La visualisation du schéma d'écoulement des phases a démontré qu'un meilleur transfert de masse entre les deux phases permet d'obtenir de meilleures efficacités. Grâce à l'étude de différents systèmes solvant, trois régimes fluidiques différents (film, gouttelettes, spray) ont ainsi été démontrés en fonction du débit et de la vitesse de rotation. Dans des cellules de taille 10x4x5 mm, le passage de la phase mobile se fait sous forme de film contre paroi pour des débits modérés (< 15 mL/min) et de faibles vitesses de rotations (400 rpm- 700 rpm). L'augmentation de la vitesse de rotation entraîne l'instabilité du film qui voit sa longueur diminuer et mène ainsi à la formation de gouttelettes. Un spray de gouttelettes se forme à l'entrée de la cellule. La vitesse de rotation ainsi que le débit de phase mobile ont un effet positif sur la formation, la stabilité de ce spray et la dispersion de la phase mobile dans la phase stationnaire. L'ensemble de ces travaux indique que les conditions opératoires résultant en l'obtention de la forme spray de la phase mobile au sein des cellules permettent l'amélioration du transfert de masse et par conséquent l'amélioration de la résolution. De ce fait, pour avoir des séparations performantes en CPC, c'est-à-dire une résolution

suffisante, il est recommandé de travailler à haute vitesse de rotation et à un débit permettant de conserver un taux de phase stationnaire suffisant tout en étant assez élevé pour atteindre la configuration hydrodynamique de spray de phase mobile.

Il est important de noter que la zone de développement du jet de la phase mobile dans la phase stationnaire est restreinte par la forme de la cellule par l'existence d'effet de parois. De ce fait, des études comparatives de cellules avec des designs différents ont été menées afin de définir une forme de cellule idéale. Toutes ces études ont été réalisées avec des systèmes solvants hydro-organiques afin d'avoir des points de comparaison avec les études précédentes. Les phases ATPS n'ont quant à elles jamais fait l'objet d'une telle étude.

Parmi ces travaux, les premiers ont été réalisés par L. Marchal en 2001 (7). Dans cette étude deux géométries de cellules différentes sont comparées : une cellule rectangulaire (R) composée d'une chambre simple et une cellule twin (T) constituée de deux compartiments symétriques, comme montré dans la figure 4.2. Le fait d'être passé à des cellules T avait pour but de diminuer les effets de paroi observés lors de l'entrée de la phase mobile dans la cellule et d'allonger la trajectoire des écoulements.

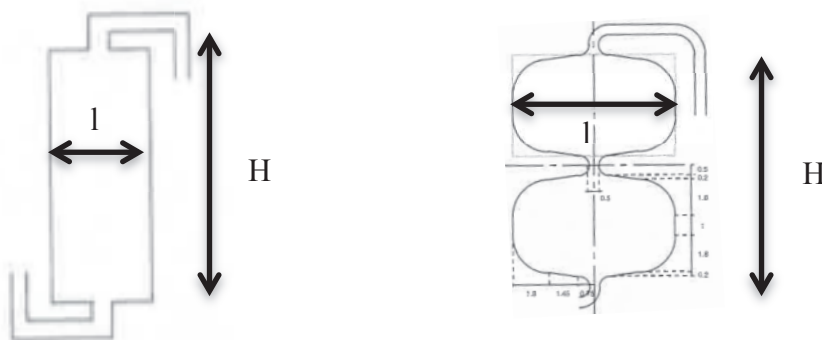


Figure 4.2 : Représentation des cellules rectangulaires (à gauche) et twins (à droite) étudiées dans la thèse de L. Marchal (7)

Afin de permettre la formation des cellules twin, la largeur des cellules a été également augmentée. Ce changement de design des cellules a ainsi permis de gagner en taux de phase stationnaire avec des gains compris entre 5% et 28% pour différents systèmes solvants hydro-organiques. Un gain de 28% est obtenu dans le cas de l'utilisation d'un système solvant composé d'heptane et de méthanol avec les cellules twin. Cette amélioration s'explique par le fait que la vitesse linéaire au sein des différentes cellules est du même ordre de grandeur (10-12 cm/s) alors que la section a augmenté. Le régime d'écoulement dans les deux parties de la cellule double est identique. L'obtention d'une augmentation du taux de phase stationnaire pour les cellules twin avec l'utilisation de système solvant composé d'heptane/chloroforme/propanol/méthanol/eau, heptane/méthanol/eau et butanol/acide acétique/eau s'explique par le fait que la présence d'une couche d'émulsion dans la deuxième partie de la cellule fait chuter la vitesse phasique moyenne dans l'ensemble de la double cellule. Ainsi la fraction de phase mobile au sein de la cellule diminue. Concernant l'efficacité des cellules, Luc Marchal a choisi de l'exprimer en hauteur d'unité de transfert (HUT). Le HUT est relié au

nombre de cellules nécessaires pour obtenir un équilibre de partage liquide-liquide. Plus ce nombre est petit, plus la cellule est efficace. Pour les deux types de cellules, le HUT décroît rapidement lorsque la force centrifuge augmente. L'augmentation de la vitesse de rotation mène plus rapidement à la dispersion de l'écoulement, c'est à dire au mode spray, la phase mobile se disperse au sein de la phase stationnaire avec des gouttelettes de plus en plus fines, améliorant le transfert de masse. Egalement liée à la force centrifuge, l'accélération de Coriolis provoque une déviation de la trajectoire du jet de phase mobile. Dans des cellules plus larges, cette accélération tend à rallonger la trajectoire de la phase mobile au sein de la phase stationnaire. Cette augmentation de la durée de trajet de phase mobile permet ainsi d'augmenter la surface d'échange entre la phase stationnaire et la phase mobile se traduisant par un transfert de masse plus important et par conséquent des efficacités plus importantes.

Néanmoins l'amélioration de l'efficacité reste très dépendante des systèmes solvants. En effet dans le cadre de l'utilisation du système solvant butanol-acide acétique-eau, la hauteur d'unité de transfert est meilleure pour la cellule à double chambre (cellule twin, figure 4.2) alors que dans le cadre du système solvant hexane-méthanol, les HUT sont équivalents dans les deux formes de cellules. Cette différence de comportement semble indiquer qu'une géométrie de cellules n'est pas forcément optimale pour tous les types de systèmes solvant. De ce fait, au cours de ce chapitre, les modifications de design seront mises au regard de deux systèmes solvants, un système biphasique aqueux (PEG/phosphate 14/14 %w) ainsi qu'un système solvant hydro-organique (HEMWat 0), afin de définir un design adéquat à la séparation des protéines tout en étant relativement performant dans une utilisation plus conventionnelle.

Les travaux de L. Marchal ont été poursuivis dans la même équipe par S. Chollet dont la thèse a porté sur la caractérisation et la modélisation des écoulements fluidiques dans les cellules à double chambre (2) et a permis de définir dans le cadre de la fabrication des colonnes CPC les paramètres géométriques à optimiser. Suite à des observations sur Visual CPC et des simulations, il a recommandé de travailler avec des cellules possédant un rapport hauteur sur largeur compris entre 0,9 et 1,3 afin de favoriser la trajectoire du jet de phase mobile selon la diagonale de la cellule. Il propose également de disposer de cellules possédant un rapport largeur sur épaisseur compris entre 0,7 et 1,3 et idéalement le plus proche de 1. De cette manière le transfert de masse est amélioré par l'augmentation du temps de contact entre la phase stationnaire et la phase mobile au sein de d'une cellule. Une partie des travaux a également porté sur l'évaluation de cellules asymétriques. Le passage à des cellules asymétriques a donné lieu à des taux de phases stationnaire et des efficacités identiques en comparaison avec les cellules twins symétriques.

Plus récemment, l'équipe de C.Schwienheer (1) a comparé quatre formes de cellules différentes (figure 4.3). Parmi ces formes des cellules, deux se différencient par la position du point d'arrivée du canal dans la cellule. Pour la cellule nommée FCPC, le canal arrive de façon axiale tandis que pour la cellule TU-Dortmund le canal arrive de manière longitudinale. Les deux autres formes correspondent à des cellules twins se différenciant par une largeur et une hauteur différentes.

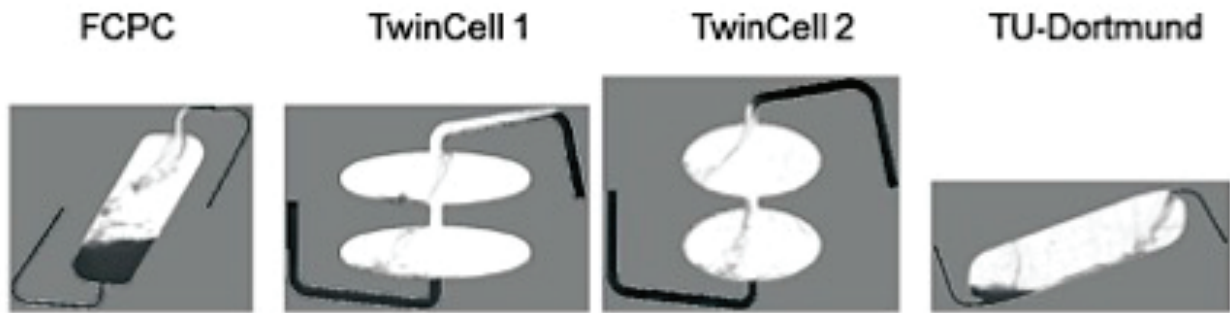


Figure 4.3 : Ensemble des cellules étudiées par C.Schwienheer (1) .

La visualisation de la trajectoire du jet de phase mobile au sein des différentes cellules à différents débits et vitesses de rotation ont confirmé les observations de L. Marchal (6), à savoir qu'à faible vitesse de rotation, la dispersion de la phase mobile dans les cellules est faible. L'augmentation de la vitesse de rotation permet d'obtenir le régime de spray de la phase mobile dans les différentes géométries. L'obtention de ce régime semble donc indépendante de la géométrie de la colonne. Concernant les performances des colonnes de géométries différentes, il a été observé que pour une même vitesse de rotation de 2000 rpm, le taux de phase stationnaire est similaire pour toutes les cellules twin cells, de 80% jusqu'à 60% pour un débit de 27 mL/min. Pour les cellules TU-Dortmund, le taux de phase stationnaire est plus élevé pour un débit inférieur à 10 mL/min, avec une valeur proche de 90% contre 80% pour les cellules doubles. En revanche les cellules FCPC ne permettent pas une bonne rétention de la phase stationnaire puisque cette dernière diminue plus rapidement en fonction du débit passant de 80% à 20% à 27 mL/min. La différence de taux de phase stationnaire s'explique par le fait que dans le cas des cellules TU-Dortmund, le jet de phase mobile touche la paroi de la chambre après avoir traversé seulement 1/3 de la profondeur de la cellule, ce qui entraîne une dispersion de la phase mobile dans la phase stationnaire plus faible pour ce design.

Concernant l'efficacité des cellules, l'équipe de Dortmund a fait le choix de l'exprimer en efficacité de chambre Ch_{eff} , correspondant au nombre de plateaux théorique observé par unité de cellule. Les cellules les plus efficaces correspondent aux cellules doubles les moins larges (design TwinCell 2). En effet, les cellules doubles plus larges ainsi que le design TU-Dortmund donnent lieu à des zones dites mortes. Ces zones où la phase mobile n'atteint pas la phase stationnaire, génèrent une absence de transfert de masse. Cet effet est d'autant plus important pour les cellules TU-Dortmund qui possèdent un volume important de phase stationnaire non balayée par la phase mobile. Ainsi, le taux de phase stationnaire dans ce design TU-Dortmund est très important mais inutilisé. Cette étude a ainsi démontré que les performances de la CPC (taux de phase stationnaire, efficacité des cellules) sont majoritairement influencées par le temps de séparation des phases stationnaire et mobile à la sortie des cellules ainsi que du temps de résidence de la phase mobile au sein des chambres.

Si l'on s'intéresse maintenant uniquement aux cellules twins, les cellules Twincells 1 se différencient uniquement par une largeur de cellules moins importante que pour les twincells 2. Il a été démontré que dans le cadre des cellules twincells 1, la phase mobile ne balaye que partiellement la cellule. Dans le cadre des cellules twincells 2, le vortex qui s'établit au sein de la cellule se fait de manière similaire au sein des deux chambres contrairement aux twincells 1, ainsi le jet de phase mobile s'établit au milieu de la chambre d'entrée permettant un meilleur transfert de masse. De ce fait, un design de cellules doubles possédant une largeur inférieure à la hauteur est privilégié dans ce cas. La

conclusion de cette étude propose de réaliser des cellules complètement sphériques, afin d'éviter les zones de coalescences et de limiter les perturbations dues à l'accumulation de la phase mobile pénétrant dans cette zone.

En se basant sur l'ensemble de ces observations, le design idéal, permettant des performances optimales c'est à dire combinant une rétention de la phase stationnaire et une efficacité maximales, semble consister à disposer d'un rotor possédant des cellules doubles twins sphériques avec un rapport de forme proche de 1. Malgré les simulations, aucun rotor n'a jusqu'à présent reçu ce type de design. Au cours de ce chapitre, nous allons comparer des colonnes possédant des cellules de designs différents, dans le cadre des systèmes solvants ATPS, avec pour volonté de se rapprocher de ce cas idéal afin d'obtenir les performances les plus adéquates. Une comparaison sera également réalisée avec des systèmes solvant hydro-organiques afin de vérifier la conservation des performances actuelles (décrites dans le chapitre 3). A noter, l'étude de la fluidique au sein des cellules par la méthode de visualisation ne fera pas l'objet de ce chapitre, le mode spray étant toujours atteint en travaillant à des champs centrifuges élevés. Le taux de phase stationnaire et l'efficacité du transfert de masse seront étudiés via les performances chromatographiques que ces paramètres génèrent.

2. Résultats et discussion

L'étude de la fluidique réalisée sur les rotors conventionnels et par simulation a montré qu'afin de disposer de rotor permettant de donner lieu à des performances optimales le rapport de forme des cellules devait être égal à 1. Disposer d'un rapport de forme égal à 1 signifie avoir des rotors composés de cellules complètement sphériques. Afin de vérifier si la modification de ce rapport de forme permet une amélioration de la tenue des systèmes solvants biphasique aqueux, la production d'un rotor composé de cellules sphériques tridimensionnelles est entreprise dans le cadre de ma thèse.

2.1. Fabrication de cellules sphériques

Les rotors actuellement commercialisés sont fabriqués par l'assemblage de disques (cf. chapitre 1 section 3.2) dans lesquels les cellules sont gravées à partir d'une découpe par jet d'eau ou par laser selon le volume du rotor sur une plaque d'acier inoxydable. La fabrication de structures 3D ne pouvant pas se faire par la technologie des disques, une modification drastique du mode de confection s'impose donc. La technique de l'impression 3D nous a semblé une option mécaniquement viable pour l'élaboration d'une structure tridimensionnelle. Cette technique est apparue dans les années 80 afin d'imprimer de manière tridimensionnelle des structures plastiques (12, 13). Très utilisée et abordable, cette technologie plastique permet aujourd'hui de fabriquer à bas coût des structures complexes présentant une grande résolution de conception, comme des maquettes d'architecture ou bien encore des prothèses médicales. Le matériau plastique étant cependant incompatible avec les solvants utilisés en CPC, il est nécessaire de se tourner vers des technologies encore peu utilisées d'impression 3D sur métal. Nous avons sélectionné une technologie basée sur la fusion laser de particules de matière (14). La fusion sur lit de poudre métallique fait appel à un laser de haute puissance pour fondre de fines poudres métalliques et créer des pièces 3D fonctionnelles. Plus précisément, une fine couche homogène de poudre métallique est déposée sur le plateau de production puis les zones sélectionnées de la poudre sont fondues avec précision par le laser, celui-ci permettant à la température locale d'atteindre 1600°C. Ce procédé est ensuite répété couche par couche jusqu'à ce que la production soit terminée. La structure 3D repose ainsi sur la superposition des fines couches de matière. La présence de lits de particules non fusionnées permet d'asseoir une structure fermée, permettant au « plafond sphérique » de la cellule d'être refermé sans problème. La poudre non fusionnée est ensuite enlevée par le biais des canaux.

En fabricant des cellules sphériques, nous espérons ainsi fournir une surface de contact non plane mais tridimensionnelle. Dans les cellules à disques, le spray de phase mobile est dirigé de manière rectiligne le long de la diagonale des cellules. Une partie de ce spray va rapidement toucher les parois hautes et basses de la cellule. En passant à des cellules sphériques 3D, nous espérons augmenter la surface spécifique de diffusion du spray au sein de la phase stationnaire avant de rencontrer les parois de la cellule. L'augmentation de la surface de contact permettra ainsi d'augmenter la durée de vie des gouttelettes au sein des cellules et ainsi l'efficacité

chromatographique. Par ailleurs, la surface de décantation (illustrée sur le schéma figure 4.4) est égale au produit largeur x épaisseur pour les cellules à disques, soit $1,5 \text{ mm} \times 4,3 \text{ mm} = 6,45 \text{ mm}^2$ pour le petit rotor commercial. Si pour une largeur sensiblement identique de 4 mm, les cellules sont sphériques, cela va grandement augmenter la surface de décantation ($\frac{4^2}{4}\pi = 12,6 \text{ mm}^2$), ce qui sera sans doute favorable à la décantation de la phase mobile et donc à la tenue de phase stationnaire des ATPS.

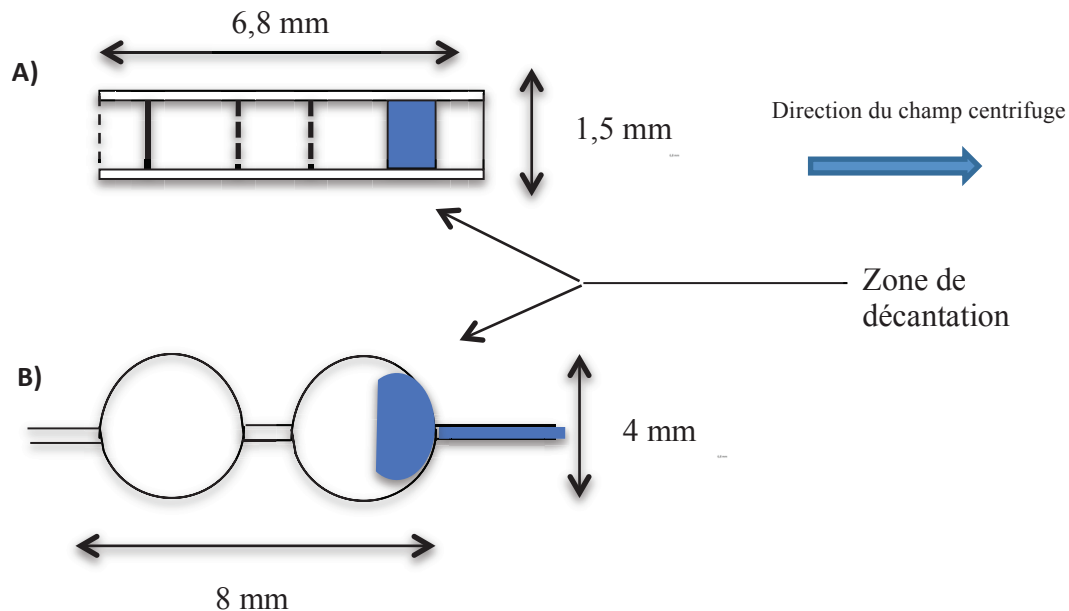


Figure 4.4 : Vue en coupe parallèle à l'axe de champ centrifuge, d'une cellule twin A) d'un rotor à disques et B) d'un rotor 3D

La fabrication de prototypes métalliques étant coûteuse, nous avons procédé par étapes successives afin de valider notre stratégie. La fabrication du 1^{er} rotor CPC 3D cherche à entériner le procédé de fabrication et à obtenir une estimation des performances afin de valider la preuve de concept. Pour cela le matériau utilisé est l'acier doux, facile à fondre (température de fusion 500°C) et qui peut être fritté par couche de 40 μm . L'acier doux est inexploitable en CPC du fait de son incompatibilité avec tous les systèmes solvants et notamment l'eau (il s'oxyde). Cependant, en concevant avec un très faible volume (14 mL) ce nouveau rotor, nous démontrons la preuve de concept de la fusion métallique et construisons le plus petit rotor CPC existant à ce jour.

Ce rotor étant imprimé en 3D, il n'est plus composé de disques et de joint en Téflon® (figure 4.5), ce qui lui confère également de nombreux avantages. En effet sa structure monobloc permet d'éviter les problèmes de fuite et de vieillissement des joints. De plus cela permet également de nettoyer le rotor à haute pression et d'éviter la contamination possible de solutés entre les joints. Les caractéristiques du rotor sont présentées dans le tableau 4.1.



Figure 4.5 : Photographie du premier prototype d'un rotor CPC en acier obtenu par impression 3D (partie en gris foncé, les parties brillantes étant un support pour lester ce rotor dans le bâti)

Tableau 4.1 : Caractéristique du rotor 3D de 14 mL

Nombre de disque	Monobloc
Matière	Acier doux
Nombre de cellules totales	135
Rapport volume canaux/cellules	0,59
Diamètre sphère	4 mm
Diamètre du rotor	100 mm
Volume du rotor	13,9 mL
Volume motif	103 μ L

2.2. Performance du premier rotor prototype 3D en acier

2.2.1. Utilisation d'un système solvant biphasique aqueux

Les différentes performances ont été étudiées et comparées au rotor à disques de 36,3 mL (évalué au cours du chapitre 3). A noter que les cellules tridimensionnelles fabriquées ici présentent un volume trois fois plus grand que les cellules de rotor à disques étudié au chapitre 3.

Dans un premier temps, nous nous intéressons au taux de phase stationnaire pour le système solvant ATPS 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 . Les résultats sont présentés dans la figure 4.6. Les études ont été

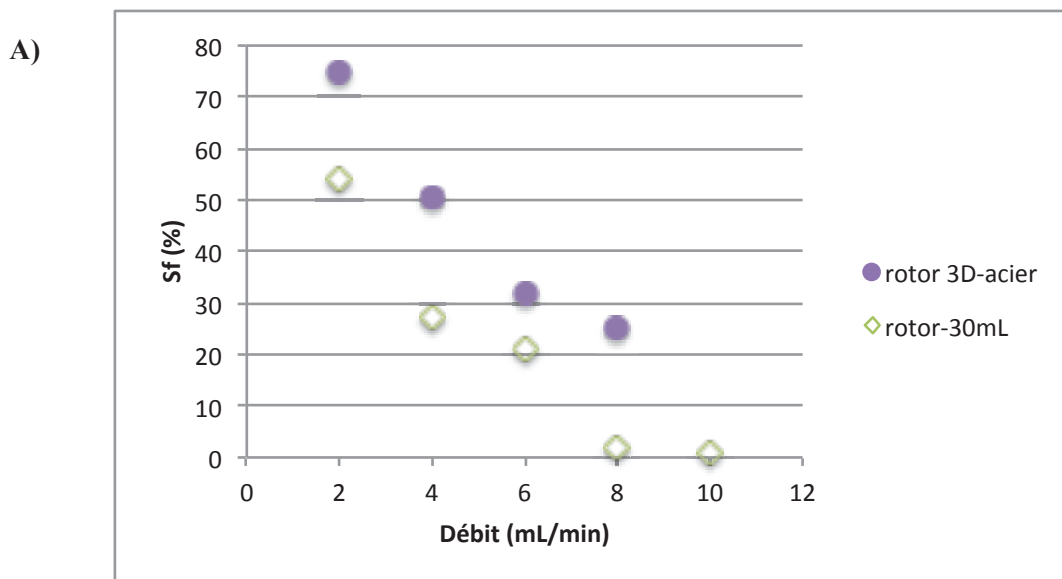
menées à 2800 rpm pour le rotor-30mL et à 3000 rpm pour le rotor 3D-acier, afin de s'assurer que le taux de phase stationnaire soit maximal notamment pour les débits les plus faibles (comme observé au chapitre 3, le taux de phase stationnaire était plus élevé à 2800 rpm)

Le comparatif de deux rotors peut se faire de différentes manières. En effet les deux rotors possédant un design et une taille de cellules différentes, la comparaison en termes de débit ne pourra être effective. Pour, dans un premier temps, s'affranchir du volume de la colonne nous allons définir la vitesse linéaire de phase mobile. Cette dernière est définie selon l'équation 4.1

$$u = \frac{F}{A_c \times (1 - sf)} \quad \text{Equation 4.1}$$

Avec A_c la section moyenne du rotor. Dans le cadre du rotor 3D-acier, A_c est égale à $4,53 \text{ mm}^2$ et pour le rotor 30 mL elle est égale à $1,80 \text{ mm}^2$. L'expression du taux de phase stationnaire en fonction de la vitesse linéaire permet ainsi de s'affranchir de la longueur de la colonne.

Les résultats relatifs à cette comparaison entre le premier prototype 3D en acier et le rotor commercial à disques sont présentés dans les figures 4.6 a et b.



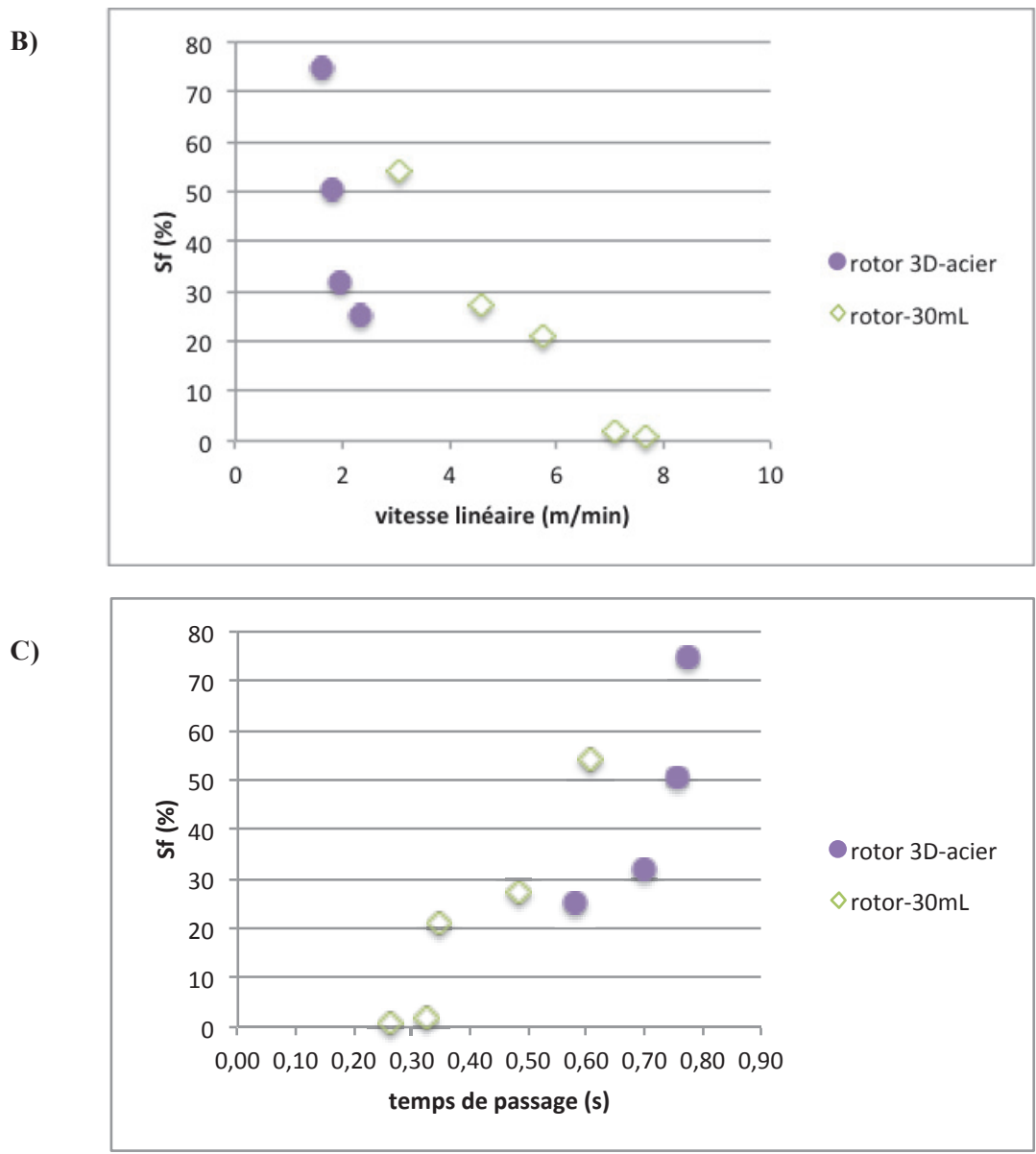


Figure 4.6 : Taux de phase stationnaire du système ATPS 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 , pour une vitesse de rotation de 3000 rpm pour le rotor 3D-acier et de 2800 rpm pour le rotor à disques en fonction **A)** du débit de phase mobile **B)** la vitesse linéaire de phase mobile **C)** du temps de passage de la phase mobile.

Comme on peut le constater, le Sf passe de 73% à 26% pour un débit compris entre 2 mL/min et 8 mL/min pour le rotor 3D-acier alors qu'il varie de 52% à 9% pour le rotor-30 mL. La modification de la géométrie des cellules a permis d'améliorer la rétention des phases stationnaires aqueuses. On peut noter ici que les valeurs de taux de phase stationnaire obtenues sont proches de celles observées en rotor à disques dans le cadre des systèmes solvants hydro-organiques. Nous constatons ici l'effet bénéfique de la modification du design des cellules du rotor par rapport au rotor à disques pour la tenue des ATPS.

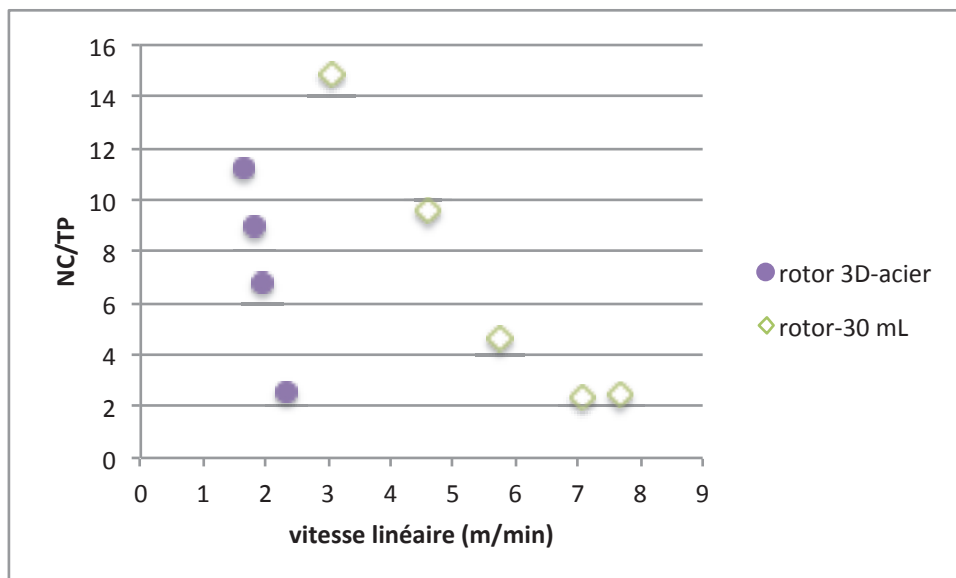
On considère maintenant la vitesse linéaire, on constate que la vitesse de travail maximale atteinte par le rotor 3D-acier est de 2,5 m/min. Avec le rotor 3D-acier, nous travaillons à des vitesses linéaires

plus faibles que pour le rotor-30 mL (à débit équivalent). La faible vitesse linéaire s'explique par le fait que le volume des cellules du rotor 3D-acier est trois fois plus gros. En effet ce dernier permet de travailler jusqu'à une vitesse linéaire de 4,8 m/min. Le rotor 3D-acier est donc un rotor permettant de travailler à de faibles vitesses linéaires qui ne sont pas atteignables avec le rotor commercial. En revanche, la tendance relative au rotor 3D-acier laisse penser à un phénomène d'engorgement qui est atteint assez rapidement. Il aurait donc fallu travailler à des vitesses linéaires encore plus faibles (débit inférieur à 2 mL/min), ce qui n'a pas été réalisable.

Le rotor 3D répond donc aux exigences de rétention des systèmes solvants biphasiques aqueux.

Avec un taux de phase stationnaire ATPS aussi élevé que celui observé dans les rotors à cellules Z, il fallait s'assurer de l'amélioration de l'efficacité des cellules qui était l'un des points négatifs remontés précédemment. L'efficacité du pic correspondant à la myoglobine ($K_d = 1,2$) a été déterminée pour les différentes vitesses linéaires correspondantes à différents débits de travail (figure 4.7).

A)



B)

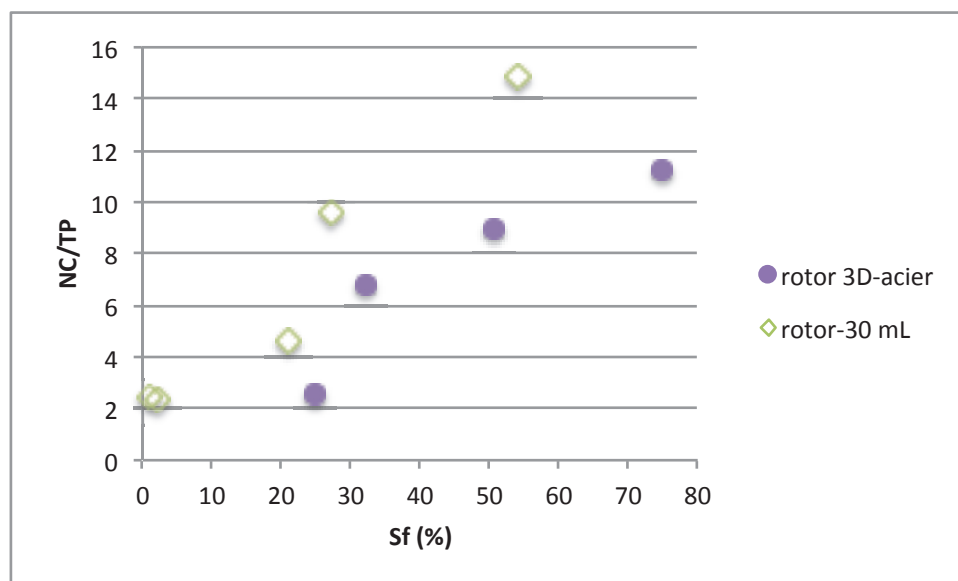


Figure 4.7 : NC/TP de la myoglobine dans le système solvant 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 , pour une vitesse de rotation de 3000 rpm pour le rotor 3D-acier et de 2800 rpm pour le rotor à disques fins en fonction A) de la vitesse linéaire de la phase mobile B) du taux de phase stationnaire.

Le NC/TP de la myoglobine varie entre 11 et 2 pour une vitesse linéaire (u) comprise entre 1 et 2,5 m/min pour le rotor 3D-acier, ce qui correspond à un taux de phase stationnaire de 70% à 25%. Le NC/TP est quant à lui compris entre 15 et 2 pour une vitesse linéaire comprise entre 3 m/min et 8 m/min pour le rotor-30 mL. Pour des vitesses linéaires plus faibles, nous obtenons des NC/TP proches entre les deux rotors. La forme relative à la courbe des NC/TP en fonction de la vitesse linéaire semble reliée à la diffusion moléculaire du soluté dans la colonne CPC. En effet, par analogie avec la courbe de Van Deemter, nous nous situons sur la branche relative au terme B de l'équation de Van Deemter traduisant la dispersion des molécules par diffusion.

Le soluté diffusant également dans la phase stationnaire liquide, plus le taux de phase stationnaire est élevé, plus les efficacités sont faibles et donc le nombre de cellules par plateau théorique NC/TP est important. En comparant les deux rotors à un même taux de phase stationnaire (50%), on confirme bien que le nouveau design tridimensionnel des cellules a permis d'améliorer le transfert de masse améliorant ainsi l'efficacité d'une cellule. Pour rappel, le design en Z génère un NC/TP de 20 pour un taux de phase stationnaire d'environ 70% (15) alors qu'ici, le rotor 3D acier génère pour ce même taux de phase stationnaire un NC/TP d'environ 10, soit 2 fois plus de plateaux chromatographiques pour un même nombre de cellules.

La figure 4.8 montre la séparation des protéines modèles sur le rotor 3D possédant uniquement 135 cellules. On remarque que malgré un nombre de plateaux limité (20 plateaux théoriques), la résolution est suffisante pour séparer la myoglobine et la lysozyme en 12 minutes en raison du taux de phase stationnaire important.

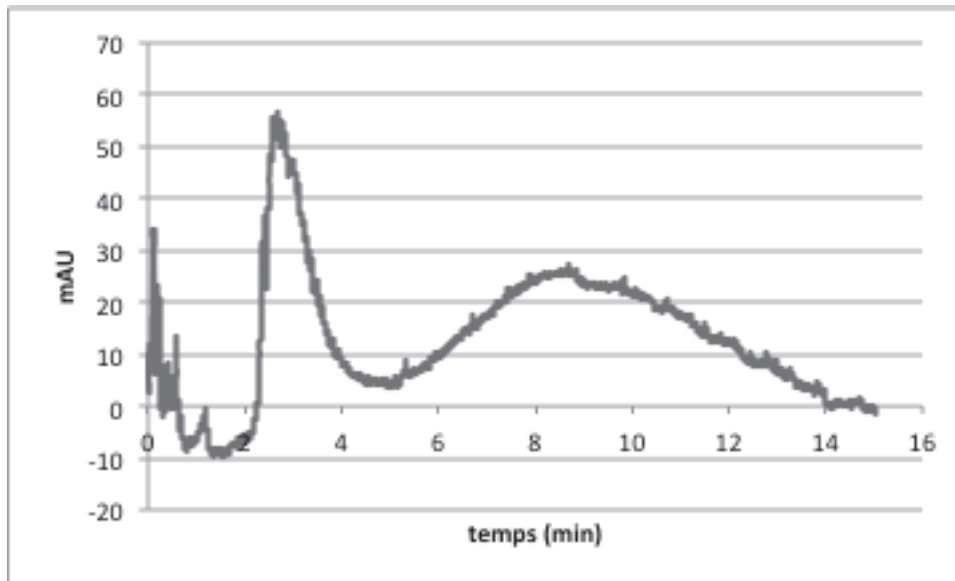


Figure 4.8 : Chromatogramme du mélange myoglobine et lysozyme séparé avec le système solvant ATPS 14% PEG/14% K_2HPO_4 en mode descendant. $V_{inj}=0,5mL$. 3000rpm- débit = 4mL/min $S_f=32\%$, 12bars $\lambda = 220 nm$. Rotor 3D-acier, cellules twins sphériques. $R_s = 1,4$

En conclusion la structure 3D du rotor acier a donc permis d'obtenir des taux de phase stationnaire corrects même si les vitesses linéaires restent très faibles. Il a permis également d'améliorer le transfert de masse avec des valeurs de NC/TP plus faibles pour des taux de phases stationnaires équivalents. Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons donc valider une structure de cellule tridimensionnelle dans le cadre de l'amélioration du transfert de masse des systèmes solvants biphasique aqueux. Le design des cellules étant choisi, nous pouvons maintenant fabriquer une colonne possédant un plus grand nombre de cellules. L'augmentation du nombre de cellules permet d'augmenter le nombre de plateaux, tout en conservant pour un débit donné le même taux de phase stationnaire. La résolution en sera donc augmentée (équation 4.1). De plus un nombre de cellules équivalentes permettra de faire des comparaisons globales avec les rotors existants possédant entre 400 et 800 cellules et surtout de l'utiliser pour des applications réelles.

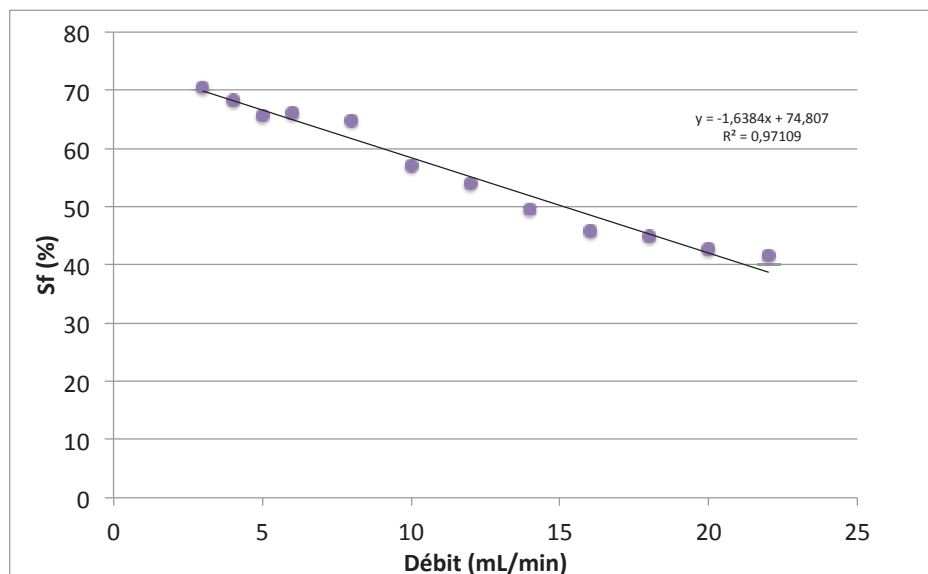
2.2.2. Performances sous système solvant hydro-organique

Les performances étant validées dans le cadre des systèmes solvants biphasiques aqueux, la forme tridimensionnelle répond à nos attentes. Néanmoins, en plus de cette amélioration, nous souhaitons pouvoir conserver les performances des colonnes dans le cadre de l'utilisation de système solvant hydro-organique. Pour cela, l'ensemble de l'étude a également été menée sous système solvant HEMWat+1 (rapport volumique des solvants 5/6/5/6) pour des facilités de comparaison de rotor interne à Rousselet-Robatel. En effet, l'ensemble des rotors fabriqués par Rousselet-Robatel est habituellement testé avec ce système solvant du fait de sa position médiane dans la liste de l'ensemble des systèmes solvants HEMWat existants (16). La différence en terme de polarité entre le

système solvant HEMWat 0 utilisé dans le chapitre 3 et HEMWat+1 est faible. Cela ne devrait pas générer de différences majeures en termes de tenue de phase stationnaire et d'efficacité, la différence de densité et la tension interfaciale étant peu modifiées.

Comme pour les études précédentes, plusieurs débits ont été testés afin d'évaluer la capacité de séparation ainsi que le taux de phase stationnaire qui reste dans le rotor. La vitesse de rotation a été choisie de manière à disposer des performances optimales (6, 8). Ce rotor étant constitué d'un nombre limité de cellules, il génère peu de pression (de l'ordre de 20 bars). Une rotation de 3000 rpm est alors atteignable. La figure 4.9.A montre l'évolution du taux de phase stationnaire en fonction du débit de phase mobile. Le taux de phase stationnaire diminue linéairement en fonction du débit, de 70% à 20% pour un débit allant de 3 mL/min à 28 mL/min. Dans cette gamme de débits on peut constater l'absence de phénomène d'engorgement. Un éventuel changement de pente semble apparaître vers 24 mL/min mais n'est pas clairement identifié. De plus, l'ordonnée à l'origine indique un taux de phase stationnaire à débit nul de 77%, ce qui est supérieur au rapport du volume des chambres sur le volume du rotor qui est estimé à 63%. Cela signifie qu'une partie des canaux peut être remplie par de la phase stationnaire. Cette notion théorique se vérifie à faible débit (inférieur à 5 mL/min) où l'on observe déjà un taux de phase stationnaire supérieur au taux de phase stationnaire maximal théorique.

A)



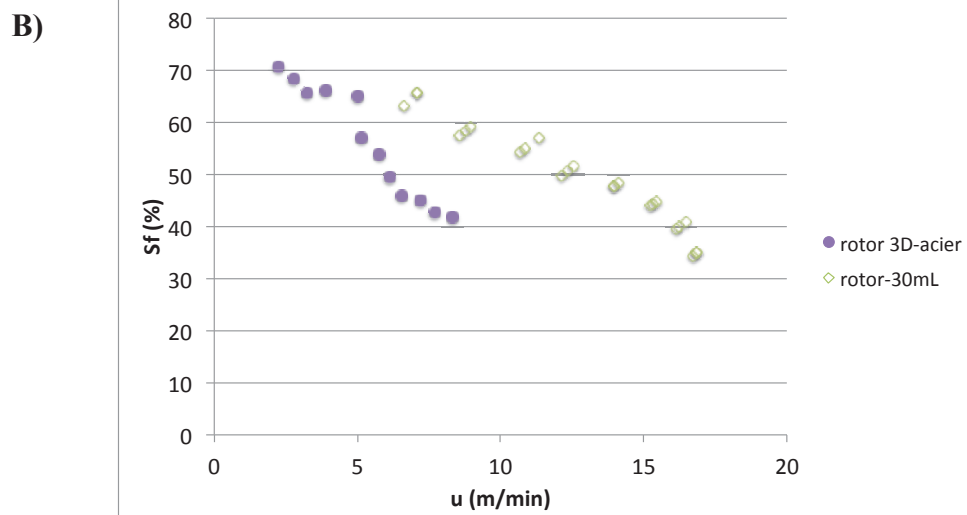


Figure 4.9 : Taux de phase stationnaire du système HEMWat+1 à 3000 rpm en mode descendant pour le rotor 3D-14mL **A)** en fonction du débit de la phase mobile **B)** en fonction de la vitesse linéaire

Afin de s'affranchir de la taille de la colonne et des cellules, le taux de phase stationnaire a été représenté en fonction de la vitesse linéaire de phase mobile en figure 4.9.B. On peut observer l'absence d'engorgement de la phase mobile. De plus la vitesse maximale d'utilisation, définie par le constructeur comme la vitesse à laquelle le taux de phase stationnaire devient inférieur à 30 %, n'a pas été atteinte. Comme pour les ATPS, l'utilisation du rotor 3D-acier est possible à faibles vitesses linéaires avec des taux de phase stationnaire supérieurs à 60%. Pour des vitesses supérieures à 5 m/min, le taux de phases stationnaire est plus élevé dans le rotor-30 mL. La structure tridimensionnelle permet donc également la rétention de système solvant biphasique hydro-organique.

L'efficacité mesurée comme le nombre de cellules nécessaires à l'obtention d'un plateau théorique (NC/TP) pour le pic de coumarine ($K_d=1,6$) est observée à 3000 rpm (fig. 4.10). Le NC/TP est compris entre 1,6 et 2,5 pour un débit variant de 2 mL/min à 24 mL/min. De plus, comme nous pouvons le constater, les valeurs de NC/TP sont inférieures à 2 pour des débits compris entre 10 mL/min et 20 mL/min (vitesse linéaire comprise entre 6 et 8 m/min).

Si on compare avec le rotor-30 mL dont les expériences ont été réalisés avec le système solvant HEMWat 0, ce dernier présentait des NC/TP compris entre 1 et 2 pour des vitesses linéaires comprises entre 2 et 16 m/min. Pour une même vitesse linéaire, on constate que les valeurs de NC/TP sont équivalentes au rotor commercial. Un rotor 3D permet un transfert de masse efficace tout comme les rotors à disques commercialisés.

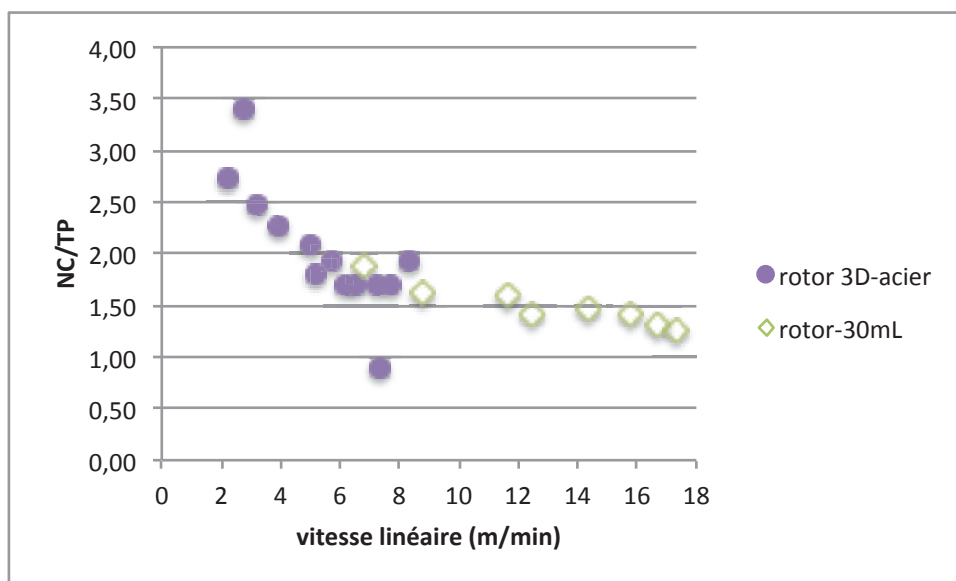


Figure 4.10 : NC/TP de la coumarine ($K_d=1,6$) dans le système solvant HEMWat+1 en fonction de la vitesse linéaire de phase mobile pour le rotor 3D-acier (3000 rpm) et NC/TP de l'éthyl-parabène ($K_d = 1,2$) dans le système solvant HEMWat 0 pour une vitesse de rotation de 2800 rpm. Mode descendant.

Le tout premier prototype de rotor CPC imprimé en 3D a ainsi permis de démontrer que la structure tridimensionnelle permettait la rétention des systèmes solvants biphasiques utilisés en CPC. A présent afin de disposer d'un rotor utilisable en laboratoire, il est nécessaire d'augmenter le nombre de cellules.

2.3. Prototype en titane de 428 cellules

Afin de disposer d'une colonne offrant une meilleure résolution, nous avons donc décidé d'augmenter le nombre de cellules imprimées dans un rotor 3D. De ce fait, un nouveau rotor 3D possédant 436 doubles cellules a été fabriqué. Le nombre de cellules est encore inférieur au nombre contenu dans les rotors à disques (836 cellules) mais ce nombre a été choisi afin de disposer d'un rotor possédant un volume colonne de moins de 50 mL, ici 45,2 mL, afin de pouvoir travailler dans des temps d'analyses raisonnables pour une étude de laboratoire et éviter une consommation importante de solvant. Les caractéristiques de ce rotor sont résumées dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Caractéristique du rotor 3D de 46 mL

Nombre de disque	Monobloc
Matière	Titane
Nombre de cellules totales	428
Rapport volume canaux/cellules	0,59
Diamètre sphère	4 mm
Diamètre du rotor	200 mm
Volume du rotor	45,4 mL
Volume motif	103 µL

La différence majeure entre ce rotor et le premier prototype de 14 mL réside ici dans le matériau utilisé par la fabrication. Le rotor précédent en acier doux n'était pas résistant au changement de pH, et n'est pas compatible avec une utilisation répétée en eau en raison du risque de corrosion de la colonne. L'acier inoxydable (utilisé pour les rotors à disques) ne peut pas être imprimé facilement en 3D. Le matériau titane a été choisi pour sa bio-compatibilité idéale pour l'étude des biomolécules, sa résistance aux pHs extrêmes, ce qui offre un grand avantage lors du nettoyage des rotors par des solutions extrêmement basiques (le nettoyage sera abordé au cours du chapitre 6 de cette thèse). De plus, les études de S.Chollet (2), L. Marchal (7) ont démontré que les propriétés des matériaux utilisés dans la fabrication des colonnes CPC avaient leur importance. En effet, les propriétés de mouillabilité du matériau ont un rôle important pour le passage d'un ménisque à un film ou le détachement dans le canal de la phase mobile d'une paroi pour laisser la place à la phase stationnaire. Le titane est un matériau considéré comme très hydrophile et donc facilement mouillable par les phases aqueuses.

2.3.1. Performances du rotor utilisant le système solvant ATPS

Le but de cette étude est de vérifier que le passage du matériau acier vers le titane ne modifie en rien les performances du rotor 3D. Dans un premier temps, le taux de phase stationnaire a été étudié en observant l'influence du débit à deux vitesses de rotation différentes. La vitesse de rotation du rotor titane de 2120 rpm correspond à une force centrifuge de 530 G qui est identique à la force centrifuge de travail pour le rotor 3D-acier lorsque l'on applique une vitesse de rotation de 3000 rpm. La variation du taux de phase stationnaire en fonction du débit de phase mobile est présentée dans la figure 4.11.

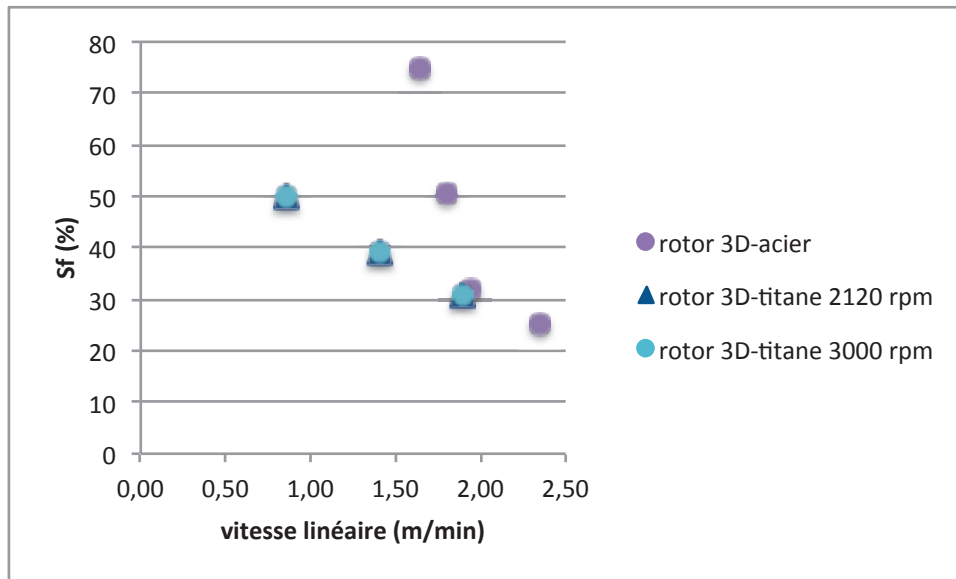


Figure 4.11 : Taux de phase stationnaire du système ATPS 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 en fonction de la vitesse linéaire de phase mobile pour le rotor 3D-titane (vitesse de rotation 2120 rpm et 3000 rpm) et le rotor 3D-acier (vitesse de rotation 2800 rpm). Mode descendant

Pour une force centrifuge identique au rotor de 3D-acier, les valeurs de taux de phase stationnaire sont équivalentes pour une vitesse linéaire identique égale à 2m/min. En revanche pour de plus faibles vitesses linéaires, on constate que le rotor 3D-acier permet une meilleure rétention du taux de phase stationnaire. Cette différence peut être due à la rugosité du matériau qui est différente ou à une évacuation de la chaleur, par le matériau titane, différente qui peut engendrer une variation de la température. En effet, la température peut jouer un rôle primordial dans l'équilibre du système solvant biphasique (17-19). De ce fait, une simple modification de la température en modifiant l'équilibre entraîne une perte de phase stationnaire puisque l'équilibre des phases n'est plus assuré.

De manière générale, le taux de phase stationnaire décroît lentement avec le débit et varie de 50% à 30% pour un débit compris entre 2 mL/min et 6 mL/min. Cette expérience a également été réalisée à une vitesse de rotation plus élevée (3000 rpm). L'effet de la vitesse de rotation n'a que peu d'influence sur la tenue de phase stationnaire. Ceci est conforme à la théorie observé en système solvant hydro-organique (9, 20). Si on extrapole le taux de phase stationnaire à débit nul, les valeurs (57%) sont proches du Sf théorique qui est de 63%. Cela signifie que ce rotor permet une bonne rétention de ce système solvant et que tout l'espace disponible du rotor peut être occupé par le système solvant correspondant. En revanche les valeurs du taux de phase stationnaire obtenues pour le rotor 3D-titane restent proches de celles obtenues pour le rotor-30 mL. Les résultats du rotor 3D-titane sont obtenus pour des vitesses linéaires plus faibles par rapport au rotor-30-mL comme il a été observé pour le rotor 3D-acier.

Nous allons nous intéresser maintenant à l'efficacité des cellules de ce rotor. La taille des cellules étant identiques par rapport au premier rotor 3D en acier, l'augmentation du nombre de cellules ne devrait pas modifier les valeurs de NC/TP. Le NC/TP de la myoglobine ($K_d=1,2$) représenté dans la figure 4.12 est compris entre 4 et 12 ce qui est en accord avec qui a été observé pour le rotor 3D-acier pour lequel on avait observé des NC/TP compris entre 6 et 12 dans la même gamme de vitesse linéaire. Néanmoins on constate une légère amélioration des valeurs de NC/TP, ce peut s'expliquer

par le fait que le taux de phase stationnaire au sein de la colonne étant moindre, le soluté disperse moins au sein de la phase stationnaire. Les valeurs étant similaires au rotor 3D-acier, le rotor 3D-titane permet donc également un meilleur transfert de masse que le rotor-30 mL à disques. La modification du matériau n'a en rien modifié les performances des rotors 3D.

L'augmentation du nombre de cellules permet d'améliorer la résolution de la séparation des protéines modèles jusqu'à obtenir un retour à la ligne de base ($R_s = 1,5$) pour un débit de 4 ml/min (fig. 4.13).

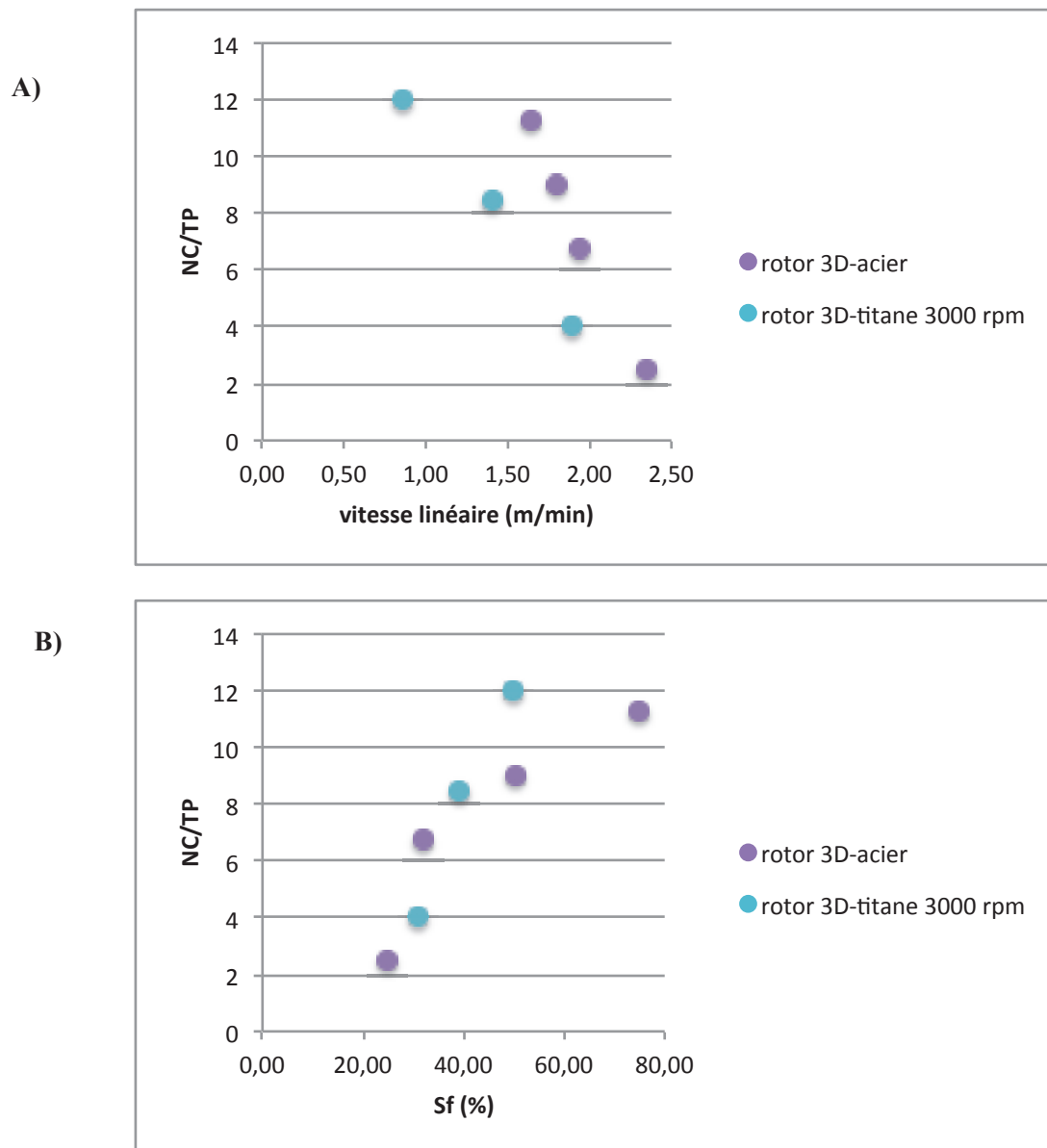


Figure 4.12 : NC/TP de la myoglobine pour le système ATPS 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile pour une vitesse de rotation de 3000 rpm pour les rotors 3D-titane et 3D-acier.

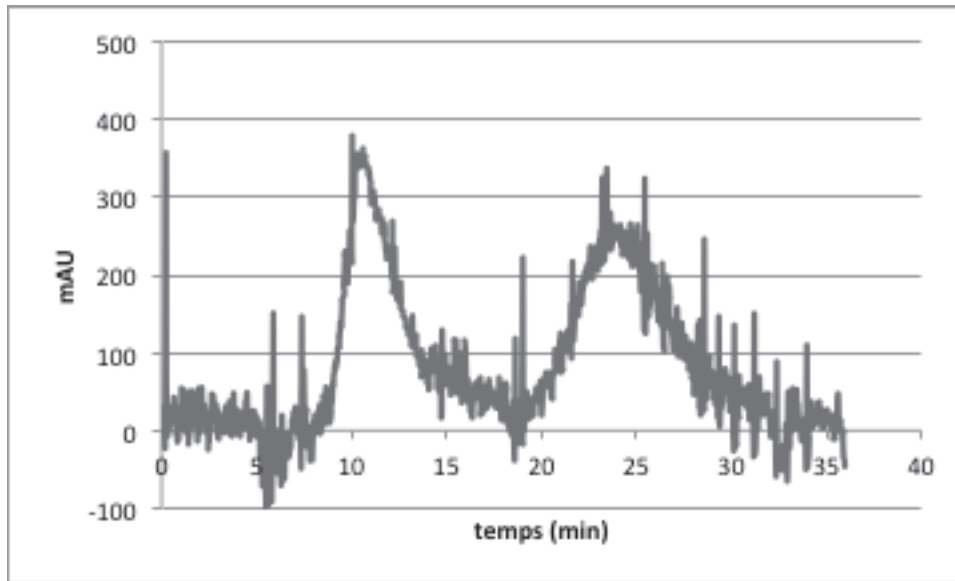


Figure 4.13 : Chromatogramme du mélange myoglobine (4,3 g/L) et lysozyme (8,3 g/L) séparé avec le système solvant ATPS 14% PEG/14% K₂HPO₄ en mode descendant. Rotor 3D-46mL. Vinj 1 mL. 3000rpm- débit 4mL/min, Sf 39%, 12 bars, λ 220 nm. $R_s = 1,5$

Si on compare le chromatogramme de la figure 4.13 avec le chromatogramme obtenu grâce au rotor 3D-acier (fig. 4.8), on constate que l'on observe une amélioration de l'efficacité avec l'obtention d'une efficacité de 60 plateaux en 30 minutes pour le rotor 3D-titane alors que le rotor 3D-acier a permis d'obtenir 12 plateaux en 12 minutes. L'augmentation du nombre de cellules a donc permis l'amélioration de l'efficacité comme démontré par la théorie.

2.3.2. Vérification des performances sous le système solvant hydro-organique

De la même manière que précédemment, nous vérifions ici que la modification de la nature du matériau n'a en aucun cas modifié les performances obtenues avec le premier rotor 3D. Pour cela, avant de commencer une étude poussée sur ce nouveau rotor, il a semblé utile de comparer les performances à même condition opératoire entre les deux rotors obtenus par impression 3D qui se distinguent par un nombre de cellules différent. Nous avons comparé dans des conditions de débit et de force centrifuge identiques, tous les paramètres rentrant en jeu en CPC qui sont susceptibles d'être influencés. La séparation du new coccine red et de la coumarine a donc été réalisée à 12 mL/min pour une force centrifuge de 530 G pour ce nouveau rotor. Le débit de 12 mL/min a été choisi car cela correspond au débit pour lequel la résolution minimale de 1,5 a été atteinte pour le rotor 3D-acier. Au-delà de ce débit, la séparation des deux composés n'était plus totale (résolution inférieure à 1,5). L'ensemble des performances a été répertorié dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Comparaison des performances entre le rotor 3D-14mL et le rotor 3D-46mL- Système solvant HEMWat+1

Rotor 3D	Vitesse de rotation (rpm)	Force centrifuge (g)	Débit (mL/min)	Sf (%)	Pression (bars)	Nmax (coumarine)	NC/TP apparent	NC/TP rotor
Acier 135 cellules	3000	530	20	43	19	80	1,70	1,58
Titane 428 cellules	2120	530	20	31	25	288	1,51	1,45

Le nombre de cellules ayant été augmenté d'un facteur de 3,2 entre le rotor de 14 mL et celui de 46 mL, les paramètres décrits dans le tableau 4 doivent donc justifier de cette augmentation. Ainsi, l'efficacité maximale obtenue dans les mêmes conditions d'analyse est multipliée par 3,6. En termes d'efficacité le rotor est donc conforme à nos attentes. En revanche concernant le taux de phase stationnaire, une diminution est observée lors de l'augmentation du nombre de cellules alors que pour des conditions identiques le taux de phase stationnaire dans une cellule de taille identique devrait être constant. Cette différence peut avoir plusieurs causes. La rugosité du matériau peut en être une. En effet avec l'utilisation du titane comme matériau de fabrication, nous modifions les propriétés de mouillabilité de la colonne qui joue un rôle dans le cadre de l'écoulement des phases au sein des cellules (7). Le fait d'avoir modifié le matériau a donc eu un effet négatif sur la rétention des phases stationnaires organiques (ici principalement heptane et acétate d'éthyle). Cela peut peut-être s'expliquer par le caractère « super-hydrophile » du matériau titane.

Une autre cause peut être l'effet de la température qui a un impact plus important sur le rotor 3D de 46 mL. Le matériau utilisé étant le titane, ce dernier présente une conductivité thermique deux fois moins importante que l'acier doux. Plus cette valeur est faible plus le matériau est isolant, de ce fait

le titane n'évacue pas la chaleur émise par la mise en rotation du rotor. Or, la température joue sur la composition chimique des deux phases composant le système solvant, ainsi que sur les paramètres physico-chimiques que sont la viscosité et la densité (18) ce qui peut donc avoir pour effet une variation du taux de phase stationnaire car ce sont ces paramètres qui définissent un système solvant.

On constate également que la variation de la pression ne suit pas l'augmentation du nombre de cellules. En effet, pour le rotor 3D-acier, le rapport $\Delta P/n$ (n nombre de cellules) est égal à 0,14 alors qu'il est égal à 0,06 pour le rotor 3D-titane. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le taux de phase stationnaire est plus faible dans la colonne 3D-titane. En effet, en CPC la pression est fonction du taux de phase stationnaire comme le montre l'équation 4.4

$$\Delta P = a.Sf.\Delta\rho.\omega^2 + b.\eta.F \text{ équation 4.4}$$

Enfin le NC/TP est légèrement supérieur pour le rotor 3D-acier. Cela peut s'expliquer par le fait que le rotor 3D acier possède un taux de phase stationnaire supérieure au rotor 3D-titane. En effet, plus le taux de phase stationnaire est élevé, plus les solutés diffusent dans la phase stationnaire, ce qui entraîne un élargissement des pics donc des NC/TP plus élevés.

Au vu de l'ensemble de ces données, le rotor 3D-titane possède des performances correspondant aux attentes. Nous allons à présent étudier de manière plus approfondie ces performances et notamment la gamme de conditions opératoires.

Dans le cadre de système hydro-organique, afin de déterminer les performances finales de ce rotor, le taux de phase stationnaire ainsi que l'efficacité des cellules ont été évalués pour différentes vitesses de rotations et débit différents. Les résultats sont présentés dans la figure 4.15. Différentes vitesses de rotation ont été testées car nous nous sommes placés dans un premier temps à la force centrifuge employée sur le rotor 3D-acier afin de vérifier l'obtention de performances similaires. La pression à 530 G étant uniquement de 40 bars, il a été par la suite possible d'augmenter la vitesse de rotation jusqu'à la vitesse maximale atteignable par le bâti (3000 rpm) sans atteindre la pression limite de 80 bars.

Le taux de phase stationnaire décroît linéairement avec le débit de manière similaire quelle que soit la vitesse de rotation (Fig.4.15). La vitesse de rotation n'a que peu d'influence sur le taux de phase stationnaire. De plus on n'observe pas d'effet d'engorgement dans la gamme de débits étudiée, tout comme cela a été observé pour le rotor 3D-acier.

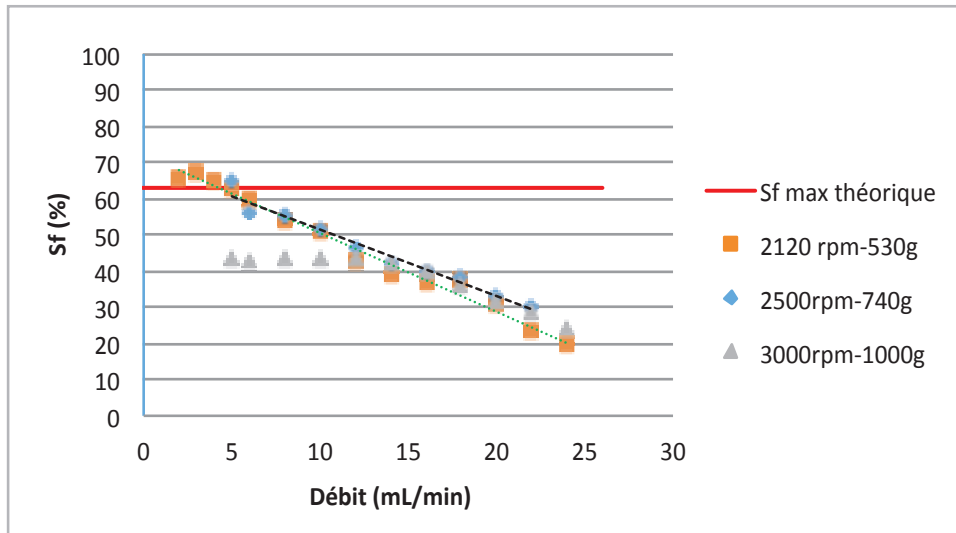


Figure 4.15 : Taux de phase stationnaire du système HEMWat +1 en fonction du débit de la phase mobile pour des vitesses de rotation de 3000 rpm, 2500 rpm, 2120 rpm. Mode descendant.

Concernant l'étude à 3000 rpm, on constate que pour des débits allant de 5 à 10 mL/min, le taux de phase stationnaire est nettement inférieur par rapport à celui obtenu aux vitesses de rotations plus faibles. Cette constatation peut peut-être s'expliquer par une variation de température. En effet, à 3000 rpm, la chaleur générée par les joints rotatifs n'est pas assez évacuée malgré la mise en route du refroidissement. En revanche, à partir de 10 mL/min, le débit étant plus important il est possible de refroidir l'intérieur du rotor et ainsi d'évacuer la chaleur émise par la rotation. Lors de notre étude précédente (chapitre 3), nous n'avions pas remarqué de différence de tenue de la phase stationnaire à rotation élevée dans le rotor à disques. Le titane possède une valeur de diffusivité thermique faible en comparaison à l'acier, ce qui induit une atteinte de l'équilibre thermique beaucoup plus lente. De plus, la conductibilité thermique du titane étant comprise entre 16 et 6,7 W/m.K, fait que ce matériau est un mauvais conducteur. De ce fait, la chaleur générée lors de la mise en mouvement de la rotation n'est pas évacuée correctement.

Afin d'éliminer ces risques potentiels d'effet de la température, nous nous intéresserons uniquement aux résultats à partir de 10 mL/min.

Si on compare le taux de phase stationnaire en fonction de la vitesse linéaire de phase mobile des deux rotors 3D dans les conditions de rotations optimales, soit 2500 rpm pour le rotor 3D-titane et 3000 rpm pour le rotor 3D-acier, on constate que le rotor 3D-titane possède un taux de phase stationnaire nettement inférieur au rotor acier (figure 4.16). Cette différence peut être due comme précisé précédemment à la température mais aussi par l'effet du matériau. En effet le titane possède un caractère « super-hydrophile ». De ce fait, la phase stationnaire dans les systèmes HEMWat étant hydrophobe, cette dernière mouille moins le matériau que dans le cadre de l'acier. Mais ceci ne reste qu'une hypothèse. Malgré la baisse du taux de phase stationnaire, ce rotor 3D en titane possède un taux de phase stationnaire correct équivalent au rotor commercial.

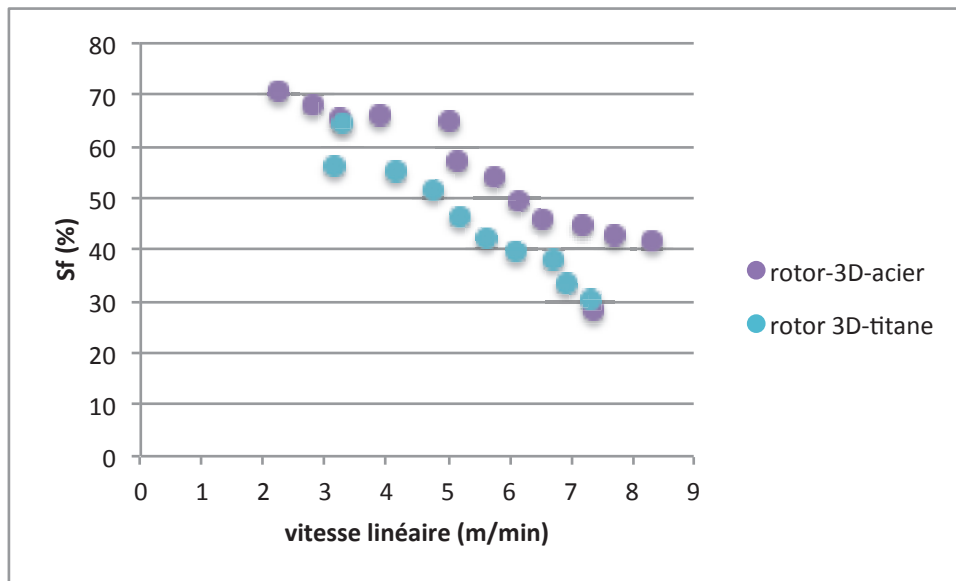


Figure 4.16 : Taux de phase stationnaire du système HEMWat +1 en fonction de la vitesse de la phase mobile pour le rotor 3D-acier (3000 rpm) et le rotor 3D-titane (2500 rpm). Mode descendant

Si nous nous intéressons à l'efficacité, le profil d'évolution du NC/TP, illustré par la figure 4.17, est similaire pour les trois forces centrifuges. Le transfert se fait donc de manière identique dans l'ensemble de la gamme de débit. Plus précisément, les NC/TP varient quasi linéairement en fonction du débit. On constate que plus la vitesse de rotation est élevée plus le NC/TP est amélioré. Ceci rejoint le fait que dans ces conditions la dispersion de la phase mobile au sein de la phase stationnaire est maximale, le mode spray est atteint à partir de 2500 rpm (2, 6, 8). Entre 2500 rpm et 3000 rpm, nous pouvons constater qu'il n'y a plus d'amélioration de l'efficacité de la cellule.

Le NC/TP est compris entre 1 et 2 dans la gamme de débit étudiée, alors qu'il était compris entre 1,5 et 3 pour l'ensemble des rotors testés précédemment. Ces résultats confirment donc que la forme 3D des cellules a amélioré de manière significative les performances de la colonne dans le cadre des systèmes solvants hydro-organiques.

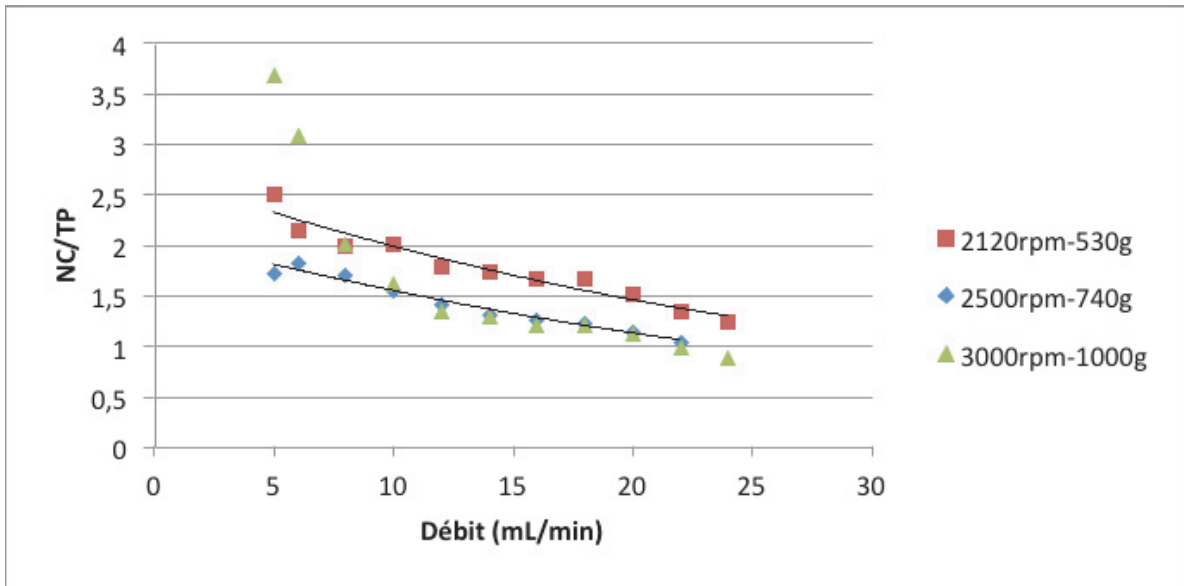


Figure 4.17 : NC/TP de la coumarine (2,3 g/L) dans le système solvant HEMWat-1 en fonction du débit de phase mobile pour 2120 rpm, 2500 rpm et 3000 rpm.

Le taux de phase stationnaire et l'efficacité optimale permettent de conserver une résolution supérieure à 1,5 jusqu'à un débit de 22 mL/min pour une vitesse de rotation de 3000 rpm. Le chromatogramme obtenu dans ces conditions de séparations optimales en conservant une résolution de 1,5 entre les deux composés tests est présenté dans la figure 4.18. Ce rotor est alors tout à fait intéressant si on souhaite effectuer des séparations par CPC très rapides (ici, moins de 3 min avec une bonne résolution).

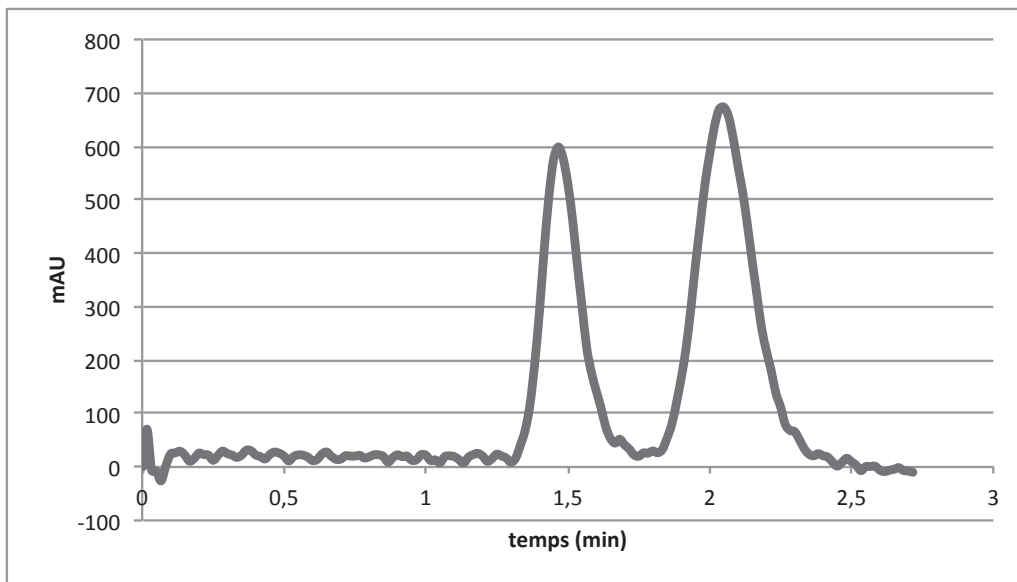


Figure 4.18 : Chromatogramme du mélange new coccine red ($K=0$) et coumarine ($K=1,6$) séparé avec le système solvant HEMWat +1 en mode descendant. $V_{inj}=1$ mL. 3000rpm- débit = 22 mL/min $S_f=28$ %, 42bars $\lambda = 254$ nm. Rotor 3D-titane.

3. Conclusion

Au cours de ce chapitre, un tout nouveau design de colonne a été élaboré afin d'améliorer la tenue des phases stationnaires des systèmes solvants biphasiques aqueux. L'innovation technologique actuelle a permis de fabriquer des colonnes 3D monobloc à cellules sphériques. Dans un premier temps afin de valider la technologie de fabrication par fusion laser métallique, la plus petite colonne CPC existante a été fabriquée présentant un volume de 14 mL avec 135 cellules en acier doux. Ce rotor a ainsi démontré que l'augmentation tridimensionnelle de la surface de contact entre la phase stationnaire et la phase mobile améliore les performances des colonnes CPC. En effet dans le cadre des systèmes solvants hydro-organiques, ainsi que pour les ATPS, une amélioration de la tenue des phases stationnaires a été observée. Plus précisément, pour la phase stationnaire aqueuse un taux de phase stationnaire de 30% a été observé pour un débit de 4 mL/min alors qu'il était de 20% pour le rotor commercial actuel. De plus, une amélioration du transfert de masse au sein de la colonne entre la phase stationnaire et la phase mobile a également été constatée. De ce fait la production de rotor 3D à plus grande échelle a été initiée afin de disposer d'un nombre de cellules correct (supérieur à 400). Nous nous sommes alors tournés vers un matériau titane afin de fabriquer un nouveau rotor possédant 428 cellules.

Les conséquences de l'augmentation du nombre de cellules suivent les règles de la théorie dans le cadre des systèmes solvant hydro-organiques avec l'augmentation proportionnelle de l'efficacité, les performances intrinsèques à la cellule (Sf, NC/TP) étant constantes. En revanche, dans le cadre des ATPS, l'augmentation du nombre de cellules ne se traduit pas par l'augmentation proportionnelle de l'efficacité des pics. Aujourd'hui nous ne pouvons expliquer cette observation. Nous constatons dans ce cas précis la difficulté de l'utilisation des systèmes ATPS qui nécessitent donc une étude plus approfondie en termes d'hydrodynamique. Néanmoins, la modification du matériau a eu un effet bénéfique sur la tenue de la phase stationnaire aqueuse. Pour conclure, l'obtention de la séparation des molécules modèles myoglobine et lysozyme a permis de valider ce design de colonne.

Nous avons cependant identifié un risque de difficulté à évacuer la chaleur et maîtriser la température générée par ces nouveaux rotors. De ce fait, nous proposons que le bâti final dispose d'un système de refroidissement plus performant. De plus, afin de disposer d'un nombre de cellules équivalent au nombre de cellules des rotors commerciaux (entre 600 et 800), ce nombre devra être augmenté. Enfin, un autre point abordé lors du chapitre 1 est la réduction de la consommation d'échantillon. Pour cela, les dimensions des cellules et des canaux seront revues à la baisse. La présentation de l'instrument (rotor et bâti) finalisé fera l'objet du chapitre 5

Références

1. Schwienheer C, Merz J, Schembecker G. Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *Journal of Chromatography A*. 2015;1390:39-49.
2. Chollet S. Rationalisation des critères de dimensionnement d'une colonne de chromatographie de partage centrifuge 2013.
3. Adelman S, Schwienheer C, Schembecker G. Multiphase flow modeling in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(36):6092-101.
4. Adelman S, Schembecker G. Influence of physical properties and operating parameters on hydrodynamics in Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(32):5401-13.
5. Adelman S, Baldhoff T, Koepcke B, Schembecker G. Selection of operating parameters on the basis of hydrodynamics in centrifugal partition chromatography for the purification of nybomycin derivatives. *Journal of Chromatography A*. 2013;1274:54-64.
6. Marchal L, Foucault A, Patissier G, Rosant JM, Legrand J. Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A*. 2000;869(1-2):339-52.
7. Marchal L. Contribution à la théorie et au développement de la chromatographie de partage centrifuge : Etude de l'hydrodynamique des phases et du transfert de matière. Thèse. Université de Nantes, 2001.
8. Marchal L, Legrand J, Foucault A. Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography. *AIChE journal*. 2002;48(8):1692-704.
9. Foucault A, Frias EC, Bordier C, Goffic FL. Centrifugal Partition Chromatography: Stability of Various Biphasic Systems and Pertinence of the "Stoke's Model" to Describe the Influence of the Centrifugal Field Upon the Efficiency. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 1994;17(1):1-17.
10. Amarouche N, Boudesocque L, Sayagh C, Giraud M, McGarrity J, Butte A, et al. Purification of a modified cyclosporine A by co-current centrifugal partition chromatography: process development and intensification. *Journal of Chromatography A*. 2013;1311:72-8.
11. Van Buel M, Van Halsema F, Van der Wielen L, Luyben K. Flow regimes in centrifugal partition chromatography. *AIChE journal*. 1998;44(6):1356-62.
12. Bird J. Exploring the 3D printing opportunity. *The Financial Times* Retrieved. 2012:08-30.
13. Marolia B. 3D Printing and Its Applications. *Contemporary Literary Review India*. 2016;3(3):70-3.
14. Deckard CR. Apparatus for producing parts by selective sintering. Google Patents; 1997.
15. Schwienheer C, Merz J, Schembecker G. Selection and use of poly ethylene glycol and phosphate based aqueous two-phase systems for the separation of proteins by centrifugal partition chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2015;38(9):929-41.
16. Berthod A, Hassoun M, Ruiz-Angel M. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005;383(2):327-40.
17. Chakraborty A, Sen K. Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems. *Journal of Chromatography A*. 2016;1433:41-55.
18. Grilo AL, Raquel Aires-Barros M, Azevedo AM. Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. *Separation & Purification Reviews*. 2016;45(1):68-80.
19. de Oliveira CsC, Coimbra JSIdR, Zuniga ADG, Martins JoP, Siqueira AMdO. Interfacial tension of aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and potassium phosphate. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2012;57(6):1648-52.
20. Fumat N, Berthod A, Faure K. Effect of operating parameters on a centrifugal partition chromatography separation. *Journal of Chromatography A*. 2016;1474:47-5

Chapitre 5

ÉTUDE DE L'INSTRUMENTATION FINALE

1. Introduction

La diminution du volume du rotor génère un risque sur les performances chromatographiques lié aux volumes extra-colonnes associés qui deviennent significatifs dans la dispersion des composés analysés. De ce fait l'élargissement des pics chromatographiques inhérent à la présence de volumes extra-colonne entraîne une limitation du potentiel de séparation. En effet en chromatographie, l'effet de la variance extra-colonne sur l'efficacité de séparation est bien documenté et a prouvé être significatif (1-5). Le concept de l'élargissement des pics en chromatographie liquide par le volume extra-colonne a été démontré théoriquement en 1975 et investigué pratiquement les années suivantes, pour la contribution du système d'injection, du détecteur et des connectiques. Ainsi Guiochon et al (4, 6) ont caractérisé à travers des études théoriques et expérimentales la variance extra-colonne provenant des différents composants des instruments HPLC. Il en est ressorti que pour diminuer ce volume extra-colonne, il faut diminuer le volume de l'échantillon, les diamètres internes de la boucle d'injection et des tubes capillaires, diminuer le volume de la cellule du détecteur et optimiser la réponse du détecteur. Dans le cadre de ce chapitre une importance particulière sera donc apportée sur l'étude de la variance apportée par les périphériques. Cela permettra de disposer des meilleures conditions de travail afin de valoriser au mieux les performances chromatographiques issues du rotor en lui-même.

Par ailleurs la CPC étant une technique préparative, elle a pour but de purifier des échantillons de grande valeur. La consommation de l'échantillon lors des étapes de développement est alors une véritable problématique. Tandis que les instruments de production industrielle ont des volumes de l'ordre de 1 à 10 litres, les équipementiers ont développé une colonne de 37,6 mL pour un développement et une optimisation de méthode plus rapides avec une moindre consommation de solvants et d'échantillons (7-9). Ce rotor est déjà disponible sur le marché où il est utilisé pour des échantillons naturels comme les plantes (10-13) qui ont l'avantage d'être abondants. En ce qui concerne les domaines protéiques, l'accès aux échantillons est plus limité en raison de leur faible quantité et du coût élevé, la CPC n'est pas vraiment développée (14-16). Aujourd'hui dans le cadre des ATPS, le scale-up a été démontré avec succès en augmentant l'échelle de production c'est à dire en passant d'une colonne de 500 mL à des colonnes de 6,25 L (15) permettant ainsi la production de 40 g de protéines par jour. A présent le défi consiste à traiter une quantité limitée d'échantillons à haute valeur ajoutée. De ce fait le développement d'un instrument CPC de taille laboratoire capable de traiter de très petits volumes d'échantillons permettrait d'une part d'explorer plus de conditions pour un même volume d'échantillon. Cela assurerait également une consommation minimale d'échantillon lors du développement de méthode, étape relativement longue qui est hélas de rigueur pour les échantillons dont les modèles de rétention sont peu connus.

Il faut savoir que dans le cadre de la technologie hydrodynamique, la taille des instruments a été réduite en diminuant le diamètre du tube Teflon®. Par exemple, Chen et al. (17) a rapporté l'utilisation d'une bobine de 18 ml pour le développement de la méthode de purification de l'honokiol. Dans ce travail, des injections de volume aussi petit que 50 µL sont réalisées, ce qui représente 0,3% de volume de colonne. Une bobine CCC encore plus petite a été développée à des fins analytiques par l'équipe de Sutherland en 2003 (18), présentant un volume de 4,6 ml. Il n'y a cependant aucune indication dans la publication du volume d'échantillon, de sorte que nous pouvons

seulement supposer qu'il est inférieur à 50 μ L. La miniaturisation de la technologie hydrostatique, à savoir la chromatographie de partage centrifuge (CPC) n'est pas aussi simple car la réduction des cellules qui composent le rotor est habituellement limitée par un processus de fabrication en acier inoxydable. Le plus petit rotor commercialisé a un volume de 35 mL dans lequel une injection de 0,5 à 1 mL est habituellement effectuée (7). Lorsque nous concentrons notre recherche sur la littérature sur la purification des biomolécules, ce manque d'instruments à l'échelle de laboratoire est encore plus frappant, étant donné que la technologie CPC est la seule option pour maintenir des phases stationnaires hautement polaires. Les biomolécules sont habituellement fractionnées à mi-échelle, dans 200 à 500 mL de rotors, avec des volumes d'injection de 10-20 mL (19-22), soit un volume d'échantillon compris entre 5% et 10 % du volume de la colonne. Ces volumes représentent des quantités trop importantes d'échantillons notamment au niveau recherche amont où les biomolécules qu'elles soient extraites ou synthétisées, ne sont encore disponibles qu'en quantité très limitée.

Diminuer considérablement le volume requis lors des premières étapes de l'évaluation de la technologie CPC augmenterait certainement la motivation des chercheurs à utiliser la CPC pour leurs précieux échantillons, d'abord à l'échelle de laboratoire, puis à des échelles plus importantes. La stratégie que nous proposons ici est de suivre et de réduire toute dispersion. Par conséquent, une nouvelle configuration instrumentale peut offrir une dispersion externe minimale tandis qu'une nouvelle conception de rotor peut offrir une meilleure efficacité de mélange dans des cellules plus petites pour réduire la dispersion chromatographique.

Le rotor est donc monté au sein d'un bâti dédié, entouré d'une double enveloppe refroidissante afin de disposer d'une stabilité optimale de la température (Figure 5.1). Cette stabilité sera définie par une lecture directe de la température au sein du rotor grâce à la présence d'un capteur intégré.

Pour permettre une résolution comparable aux rotors mis sur le marché, un rotor en titane possédant 800 cellules a été envisagé, avec pour objectif de revenir vers des tailles de cellules plus proches de celles du rotor commercial (42,3 μ L par motif), la taille minimale des motifs étant limitée par l'impression 3D. Chaque cellule possède alors un diamètre de 3 mm et les canaux d'un diamètre de 1 mm, donc des dimensions réduites par rapport aux prototypes titane précédents. Pour faciliter la conception d'un si grand nombre de cellules, la fabrication du rotor se fait par impression 3D de modules contenant chacun 200 cellules, connectés ensuite entre eux. Cependant les 800 cellules souhaitées initialement n'ont pas pu être fabriquées du fait de la complexité de fabrication de canaux de si faible diamètre entraînant le bouchage de ces derniers par la poudre de titane. Ainsi un rotor comprenant seulement 600 cellules (3 modules) a été fabriqué.

Le but de cette thèse étant d'améliorer les performances des colonnes CPC lors de l'utilisation de système solvant biphasique aqueux, une étude comparative des performances entre le rotor commercial actuel de 36,5 mL et ce nouveau rotor a été réalisée. En plus de l'étude des systèmes solvants ATPS, l'étude des systèmes solvants hydro-organiques reste essentielle. En effet nous souhaitons disposer d'un rotor qui reste aussi performant que les rotors actuels sur les marchés afin de permettre de réaliser différents travaux de recherche dans différents domaines d'application.

Double enveloppe de refroidissement

Lecture directe de la température à l'intérieur du bâti



Figure 5.1 : FCPC- C_m C Rousselet-Robatel-Kromaton modifié contenant le rotor mini-3D

2. Résultats et discussion

2.1. Etude de la variance extra-colonne

Les améliorations des performances chromatographiques d'une colonne, par une nouvelle conception ou des conditions opératoires optimisées, ne peuvent être dissociées d'une attention particulière apportée à son environnement. En effet, la résolution et la sensibilité sont liées à la largeur du pic qui n'est que la traduction visible de l'élargissement de la bande passante du point d'injection au point de détection. L'amélioration de l'efficacité de colonne, c'est-à-dire la réduction de sa variance chromatographique σ^2_{column} serait inutile si la variance extra-colonne σ^2_{ec} est trop importante.

Dans le cadre de l'étude de la variance extra-colonne, la décomposition de l'ensemble du système de chromatographie est nécessaire. La figure 5.2 représente les composants successifs impliqués dans la migration d'une bande de soluté en chromatographie de partage centrifuge, de la boucle d'injection à la cellule de détection et provoquant sa dispersion extra-colonne. La variance extra-colonne est due à l'effet cumulatif de l'injection, des tubes et de la détection. Par rapport au système HPLC, la contribution extra-colonne peut être divisée en deux sections, celle du système périphérique de chromatographie (injection, tube externe et détection) et celle du bâti qui maintient le rotor en rotation (tube interne, vanne ascendante/descendante et joints rotatifs).

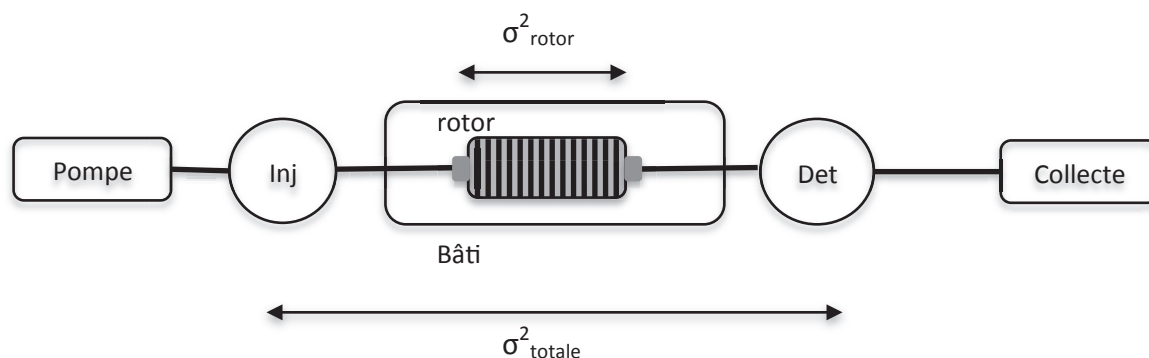


Figure 5.2 : Schéma de l'instrumentation de chromatographie de partage centrifuge à l'origine de la dispersion.

A noter qu'il est recommandé que la variance extra-colonne représente moins de 25% de la variance de la colonne. Cela étant, le nombre de plateaux générés dans la colonne est de 80% du nombre de plateaux réel de la colonne. En assumant que toutes les contributions à la variance des pics sont indépendantes, la variance totale du pic est la somme de toutes ces contributions :

$$\sigma^2_{v,\text{total}} = (\sigma^2_{v,\text{rotor}} + \sigma^2_{v,\text{bâti}}) + (\sigma^2_{v,\text{connexion}} + \sigma^2_{v,\text{injection}} + \sigma^2_{v,\text{detection}}) \quad \text{Equation 5.1}$$

2.1.1. Détermination de la variance due au système de détection et d'injection

Deux périphériques ont été évalués : le système Puriflash 7100 (Interchim, MonHugor, Fr) et le système Shimadzu LC 20 AP (Shimadzu, Marne La Vallée, Fr). Pour cela, ces systèmes ont été déconnectés des instruments de CPC et reliés entre l'injection et la détection par une union sans volume mort. La mesure de variance s'est faite grâce à l'injection du composé new coccine red (0,5 g/L) pour un débit de 2 mL/min. Le volume d'injection a été fixé à 250 µL. La détermination du temps de rétention a permis de déterminer les volumes relatifs à ces deux systèmes. Le système Puriflash dispose d'un volume interne de 3,7 mL entre l'injection et la détection. Le système Shimadzu quant à lui présente un volume de 0,7 mL. La différence est due au fait que le système Puriflash est configuré pour être connecté de manière permanente avec des instruments CPC ou des colonnes LC préparatives, ce qui induit l'ajout d'une valve de sélection placée après le point d'injection introduisant un volume supplémentaire.

La contribution de chaque système à la dispersion externe a été déterminée dans un premier temps par mesure du temps d'élution et de la variance du pic pour un composé non retenu élué dans la phase mobile. Les résultats donnant des pics non gaussiens avec une asymétrie comprise entre 1,2 et 4, la mesure de la variance a été réalisée en utilisant le moment d'ordre 2 défini par Foley et Dorsey (23) (équation 5.2).

$$M_2 = \frac{w_{0,1}^2}{1,764 A_S^2 - 11,15 A_S + 28} = \sigma^2_{v,pic} \quad \text{Equation 5.2}$$

Les figures 5.3A et 5.3B rassemblent les résultats expérimentaux obtenus pour les deux phases mobiles utilisées dans cette thèse, la phase inférieure, riche en eau, du système solvant hydro-organique HEMWat 0 et la phase inférieure riche en sel du système solvant ATPS respectivement. On observe une différence significative entre le système Puriflash et le système Shimadzu. Le système Puriflash entraîne une dispersion des pics plus importante. Cela s'explique par le fait que le trajet parcouru à l'extérieur de la colonne par les composés est plus long avec le Puriflash ($V_{\text{extra}} = 3,7$ mL) que pour le Shimadzu ($V_{\text{extra}} = 0,7$ mL). La dispersion des composés est générée par le profil parabolique du flot qui génère une dispersion de Taylor (24). Le parcours étant plus long, les composés sont donc plus sujets à se disperser par diffusion dans les tubes de connexion et différentes vannes, ce qui induit une variance plus importante des pics. Cette dispersion due au profil de distribution du composé dans le parcours extra-colonne est en général débit-dépendant (4). Cependant, dans le cas de nos deux systèmes périphérique, l'influence du débit est négligeable.

On observe que la viscosité de la phase mobile, de 0,7 Pa.s pour la phase mobile HEMWat 0 et de 1 Pa.s pour la phase mobile ATPS (Cf. Tableau 3.2 du chapitre 3), a un impact non significatif sur la variance extra-colonne.

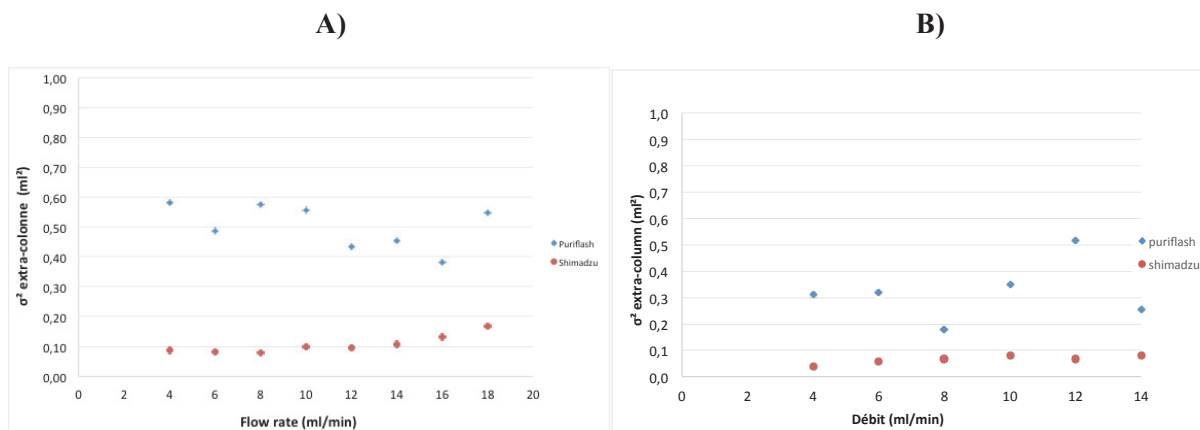


Figure 5.3 : Evolution de la variance extra-colonne en fonction du débit **A)** avec une phase mobile hydro-organique. **B)** avec une phase mobile sel.

Ces résultats démontrent qu'une simple modification des instruments périphériques (utiliser des connectiques avec des diamètres plus petits et éviter la présence de vannes n'ayant pas d'utilité), peut considérablement réduire l'élargissement extra-colonne. Ainsi pour l'ensemble du chapitre le système Shimadzu sera utilisé car ce dernier génère moins de dispersion extra-colonne.

2.1.2. Evaluation de la variance extra-colonne issue des différents bâtis CPC

L'utilisation d'une phase stationnaire liquide présente de nombreux avantages. Néanmoins cela nécessite de disposer d'une instrumentation spécifique pour tenir la phase stationnaire en place. Cette instrumentation consiste donc en la présence de joints rotatifs permettant la rotation de la colonne. Une vanne à deux positions permet de modifier le mode de travail (ascendant/descendant). Entre les différents bâtis, la dimension des joints et le diamètre des tubes de connexion sont identiques. La vanne de position est manuelle sur le bâti FCPC- C_m et automatisée avec capteur de pression sur le bâti FCPC A. La longueur des tubings permettant de relier la vanne aux joints et les joints aux différents points d'entrée du rotor est également différente.

Dans le but de vérifier que cette source de dispersion n'affectera pas l'efficacité des colonnes, la variance a été mesurée dans une gamme de débit compris entre 2 mL/min et 18 mL/min pour le bâti FCPC A (volume interne de 2,4 mL) et le bâti FCPC- C_m (volume interne de 1,9 mL). La contribution exacte est déduite par la différence entre la variance du pic de marqueur mesurée avec l'union sans volume mort placée à la place du rotor (entre les deux joints rotatifs) et la mesure réalisée lorsque l'union mis à la place du bâti. Une vitesse de rotation a été appliquée afin de refléter les conditions opératoires en utilisation chromatographique. Cette rotation est égale à 2800 rpm pour le bâti FCPC C_m pour les systèmes solvants HEMWat 0 et ATPS. Pour le bâti FCPC A, la vitesse de rotation est fixée à 2500 rpm pour la phase mobile hydro-organique et à 2800 rpm pour la phase mobile aqueuse. Les résultats sont présentés dans les figures 5.4A et 5.4B.

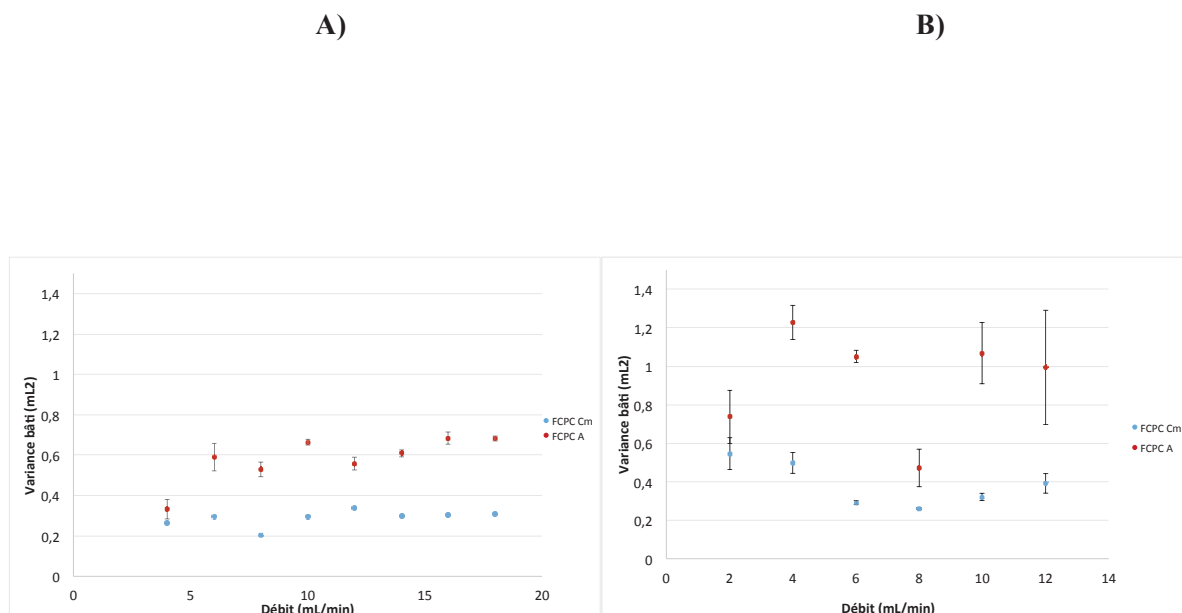


Figure 5.4 : Evolution de la variance extra-colonne du bâti FCPC A et du bâti FCPC-C_m en fonction du débit **A)** avec une phase mobile hydro-organique avec une vitesse de rotation de 2800 rpm (FCPC C_m) et de 2500 rpm (FCPC A) **B)** avec une phase mobile sel pour une vitesse de rotation de 2800 rpm (FCPC C_m et FCPC A)

Quel que soit le système solvant observé, le bâti FCPC-C_m possède une variance inférieure au bâti FCPC-A. Cela s'explique par le fait que les tubings présents à l'intérieur des différents bâtis sont plus importants pour le FCPC-A (2,4 mL contre 1,7 mL pour le FCPC-C_m).

Dans le cas du système solvant hydro-organique (Fig 5.4A) , la variance varie très peu avec le débit et les mesures sont répétables (n=3) avec des écarts types relativement faibles (inférieurs à 5%).

Concernant l'utilisation d'une phase mobile aqueuse saline (Fig 5. B), il semble que le bâti FCPC-A disperse beaucoup plus que le bâti FCPC-C_m, et que l'écart-type des valeurs est beaucoup plus important dans le bâti commercial. Cette différence dans la répétabilité ne peut pas être due à la configuration mécanique car il s'agit des mêmes joints rotatifs et diamètre de tubes. La seule différence pourrait être un moindre contrôle de la température dans le bâti FCPC-A, dans lequel la température peut varier de quelques degrés au cours des expériences, cette variation ayant un rôle plus prépondérant sur la viscosité d'une phase saline à 19,5% en poids. Cette variabilité est notable, mais comme nous le verrons par la suite, les variances chromatographiques étant de l'ordre de 5 à 15 mL², une variation de ±0,3 mL² est négligeable.

2.2. Dispersion chromatographique et impact des canaux sur le rotor mini-3D

En chromatographie liquide sur phase stationnaire solide (HPLC), le soluté qui entre dans la colonne se retrouve en permanence en contact avec la phase stationnaire et la phase mobile. La contribution de la colonne sur la variance totale du pic s'écrit alors comme il s'en suit :

$$\sigma_{v,chromatographie}^2 = \frac{(V_M + k \times V_S)^2}{N} \quad \text{Equation 5.3}$$

Avec V_M le volume mort de la colonne, V_S le volume de phase stationnaire, N l'efficacité et k le facteur de rétention de l'échantillon. Dans le cas de la chromatographie de partage centrifuge, la variance de la colonne peut se décomposer entre variance dans les cellules, lieu d'échange chromatographique, et variance dans les canaux, lieu de transfert sans échange chromatographique (Equation 5.4).

$$\sigma_{v,colonne}^2 = \sigma_{v,cellules}^2 + \sigma_{v,canaux}^2 = \frac{(Vr_{cellules})^2}{N_{cellules}} + \sigma_{v,canaux}^2 \quad \text{Equation 5.4}$$

Afin de déterminer si la contribution de la variance des canaux dans les colonnes CPC est négligeable, la variance du rotor a été déterminée pour quatre parabènes : le méthyl-parabène ($K_d = 0,9$), l'éthyl-parabène ($K_d = 1,5$), le propyl-parabène ($K_d = 2,5$) et le butyl-parabène ($K_d = 4,1$). Ces composés ont été choisis afin de disposer de composés homologues. A noter que ces composés sont identiques à ceux utilisés au chapitre 3 pour la définition des performances de référence. Dans l'ensemble de cette étude, il est émis l'hypothèse que la phase stationnaire est présente uniquement dans les cellules et non dans les canaux.

Le système solvant utilisé est le système HEMWat 0 et la vitesse de rotation de la CPC a été fixée à 2800 rpm pour le rotor mini-3D et 2500 rpm pour le rotor-30 mL correspondant à la vitesse maximale atteignable sans dépasser la pression limite des joints rotatifs de 80 bars. La figure 5.5 montre la variance du rotor $\sigma_{v,colonne}^2$ (variance totale à laquelle nous avons retranché la variance du système de pompage et du bâti déterminées au préalable) en fonction du carré du volume de rétention dans les cellules (volume de rétention total auquel on a retranché le volume mort des canaux) pour différents débits de travail. La réponse est linéaire entre la variance totale et les coefficients de partage avec un r^2 supérieur à 0,998 quels que soient le débit utilisé et le rotor étudié. En effet selon l'équation 5.4, la variance de la colonne est linéairement reliée à la variance due à la cellule et à celle des canaux. La variance de la cellule est reliée au coefficient de partage au sein des cellules alors que le coefficient de partage n'a aucun effet dans les canaux car l'ensemble des effets chromatographiques a lieu dans les cellules. Si on extrapole à Vr^2 égal à zéro, l'ordonnée à l'origine indique la variance des canaux.

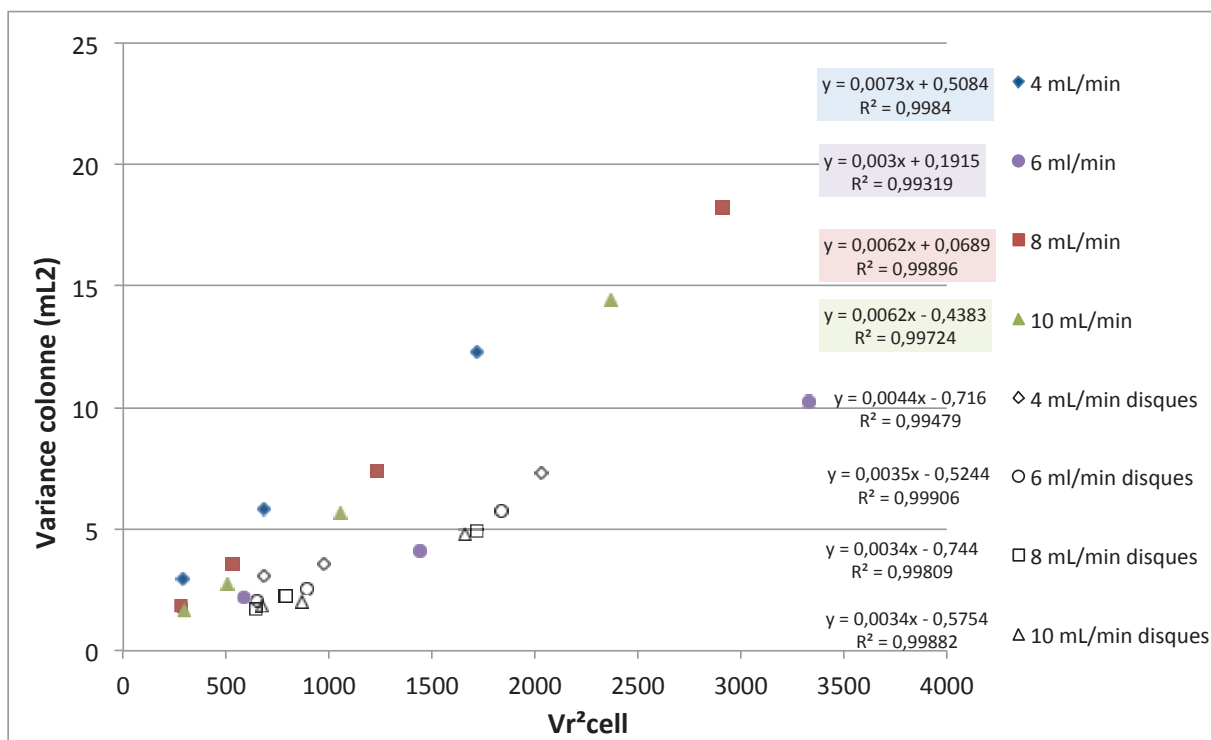


Figure 5.5 : Evolution de la variance du rotor mini-3D et du rotor-30 mL en fonction du volume de rétention dans les cellules à différents débits.

Comme on peut le constater, pour le rotor mini-3D, la variance des canaux est inférieure ou égale à 0,5 mL² quel que soit le débit. Dans le cas le plus défavorable, c'est-à-dire pour 4 mL/min, l'ordonnée à l'origine est de 0,5 mL², tandis que pour les composés ayant une faible affinité avec la phase stationnaire (Kd inférieur à 1, volume de rétention très faible), la variance du rotor est égale à 2,95 mL². Dans ce cas, la variance des canaux représente 16% de la variance du rotor. Pour les Kd supérieurs à 1,5, les canaux représentent moins de 10% de la dispersion.

Si on s'intéresse maintenant au rotor commercial, on constate que quel que soit le débit la variance des canaux est inférieure à 0 ce qui n'est pas possible. De ce fait l'hypothèse de départ qui était que la phase stationnaire est uniquement présente dans les cellules n'est peut-être pas vraie. Ou alors la variance des canaux est négligeable et la valeur négative est due à l'approximation des mesures dont l'écart type n'a pas été mesuré.

La détermination de la variance des canaux a été réalisée uniquement avec le système solvant HEMWat 0 et non pas avec le système ATPS car cette étude pour être fiable nécessite l'utilisation d'espèces homologues possédant des coefficients de partage différents, ce dont nous ne disposons pas en ATPS.

2.3. Etude du rotor mini-3D dans l'environnement biphasique aqueux: 14% PEG- 14% K_2HPO_4

2.3.1. Etude du taux de phase stationnaire

Dans le chapitre précédent, nous avons pu démontrer que les cellules de forme tridimensionnelle permettaient une amélioration de la tenue du taux de phase stationnaire de ces systèmes solvants au sein des colonnes CPC. Dans un premier temps une étude approfondie sur la tenue de la phase stationnaire aqueuse a été réalisée. Cette dernière sera comparée aux résultats obtenus pour le rotor 3D titane afin d'étudier l'impact de la diminution des dimensions. Une comparaison finale sera également réalisée avec le rotor commercial à disques possédant une taille de cellules équivalente afin de démontrer l'amélioration finale obtenue au cours de l'ensemble de ces travaux de thèse.

La figure 5.6A représente le taux de phase stationnaire en fonction de la vitesse linéaire pour le rotor commercial à disques, le rotor 3D-titane et le rotor mini-3D. On constate en comparant rotor 3D titane et rotor mini 3D que le fait d'avoir diminué la taille des cellules a permis de travailler à des vitesses linéaires plus élevées, sans dégrader les performances de tenue des phases stationnaires aqueuses. Les deux rotors permettent la rétention de 50% de phase stationnaire ATPS. En comparaison, le rotor-30 mL affiche un phénomène d'engorgement pour une vitesse linéaire de 5 m/min, alors que les cellules du rotor 30ml et du rotor mini3D font le même volume.

Les deux rotors ayant des tailles de cellules identiques, nous pouvons les comparer directement en fonction du débit de travail (Figure 5.6B). Pour le rotor mini 3D, le taux de phase stationnaire varie linéairement entre 58% et 0 % pour un débit compris entre 2 mL/min et 14 mL/min. Si l'on se place au débit identique de 4 mL/min, nous pouvons constater une amélioration de la tenue de la phase stationnaire aqueuse avec un taux de phase stationnaire de 38% pour le rotor-30 mL et de 50% pour le mini-3D. Une configuration sphérique plus restreinte a donc permis de mieux retenir les systèmes solvants aqueux. La position d'arrivée des canaux au centre de la cellule a été modifiée par rapport au rotor-30 mL, ce qui peut être également un point bénéfique pour la tenue de la phase stationnaire.

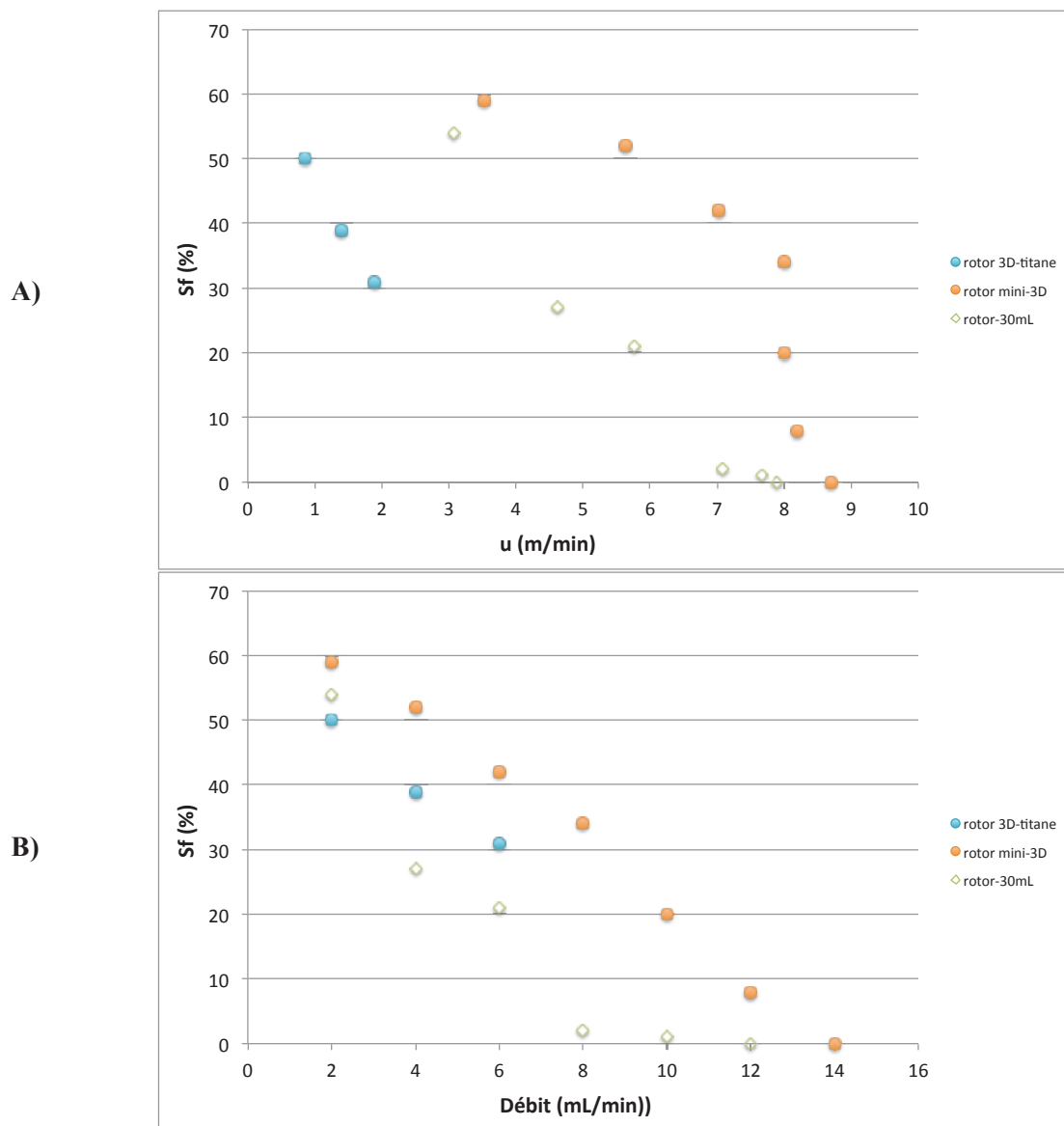


Figure 5.6 : Evolution du taux de phase stationnaire du système solvant ATPS 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 pour le rotor commercial, le rotor 3D-titane et le mini-3D en fonction de **A)** la vitesse linéaire de phase mobile **B)** du débit de phase mobile

Ces résultats confirment les hypothèses des chapitres précédents, à savoir que dans des cellules sphériques de même volume que des cellules planes, les tenues de phases stationnaires sont meilleures et ce, à des vitesses linéaires plus hautes.

Les valeurs de taux de phase stationnaire obtenues pour le rotor mini-3D sont comparables à celles obtenues pour les systèmes solvants hydro-organiques pour lesquels les vitesses linéaires maximales d'utilisation sont de l'ordre de 10-12 m/min. Ce rotor prototype répond donc tout à fait aux exigences de tenue de phase stationnaire.

Si maintenant on s'intéresse à l'efficacité chromatographique, la figure 5.7 montre les NC/TP de la myoglobine en fonction de la vitesse linéaire de phase mobile pour le rotor mini-3D. On observe que le NC/TP de la myoglobine varie entre 9 et 2 pour une vitesse linéaire comprise entre 4 m/min et 8 m/min. Ces valeurs sont élevées en comparaison avec les valeurs obtenues pour des systèmes solvants hydro-organiques. Ces résultats confirment les hypothèses des chapitres précédents. En effet, avec les systèmes solvants biphasiques aqueux, le temps de mélange est plus long, la phase mobile se disperse moins dans la phase stationnaire au sein des cellules. De ce fait le nombre d'échanges chromatographiques n'est pas suffisant pour permettre des bonnes valeurs de NC/TP. Ce phénomène avait déjà été observé sur les valeurs obtenues dans le rotor commercial.

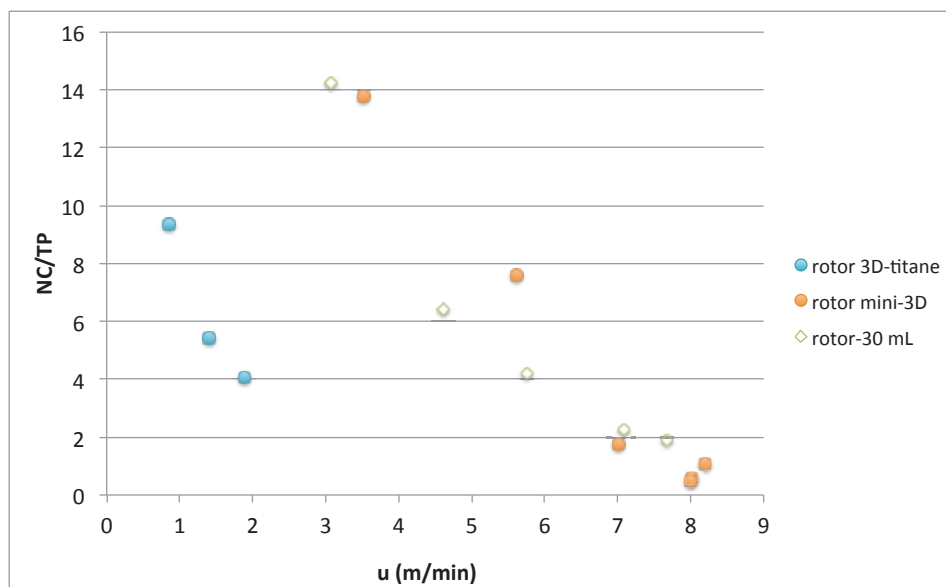


Figure 5.7 : Variation du nombre de cellules par plateau théorique (NC/TP) en fonction de la vitesse linéaire pour la myoglobine pour différents rotors utilisés dans cette thèse. Système solvant 14% PEG/14% K_2PO_4 . Vitesse de rotation 2800 rpm. Mode descendant.

L'augmentation de la vitesse de phase mobile améliore le NC/TP jusqu'à une valeur limite qui est atteinte à partir de 6 m/min. Au-dessus de cette vitesse limite, l'augmentation de la vitesse de phase mobile n'a plus d'effet sur le NC/TP. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'à haute vitesse linéaire (débit supérieur à 8 mL/min), la perte de phase stationnaire a plus d'importance que l'augmentation de l'efficacité. Ces résultats confirment l'importance de la rétention du taux de phase stationnaire. En ce qui concerne le rotor 3D-titane précédent, le NC/TP de la myoglobine était compris entre 2 et 10 pour des vitesses linéaires plus faibles (comprises entre 2 et 2,5 /min). La diminution de la taille des cellules n'a pas entraîné la réduction de l'efficacité, puisque le nouveau rotor possède également des NC/TP entre 2 et 10 comme observé à l'aide des points bleus et orange de la figure 5.7. La réduction de l'espace disponible à l'échange chromatographique n'a donc pas entraîné la formation d'effet de paroi, phénomène qui avait été observé dans la thèse de S. Chollet lors de la diminution de la taille des cellules dans un design à disques (25).

Si l'on compare maintenant avec le rotor commercial possédant une taille de cellules équivalentes, nous verrons ici l'influence de la forme de la cellule. Les résultats sont illustrés par les points blancs et orange de la figure 5.7. Pour une même gamme de vitesse linéaire, les valeurs de NC/TP sont semblables. La sphéricité des cellules ne permet donc pas de disposer d'un meilleur transfert de masse. De ce fait, malgré des différences de taux de phase stationnaire observées précédemment, les NC/TP sont identiques.

Les différentes améliorations instrumentales poursuivies tout au long de cette thèse ont ainsi conduit à un rotor adapté à l'utilisation des systèmes solvants biphasiques aqueux. Cette innovation est illustrée ici par la séparation des standards de myoglobine et lysozyme (chromatogramme relatif à cette séparation présenté figure 5.8) avec une résolution de 1,5 entre les composés et un temps d'analyse de 6 minutes pour un débit de 8 mL/min. Cela correspond à un temps d'analyse divisé par 2 par rapport à l'étude faite par A. Berthod et al sur le rotor commercial (9), ce qui en fait la séparation la plus rapide jamais obtenue pour cet échantillon et ce système solvant souvent plébiscités par la communauté scientifique (9, 26, 27).

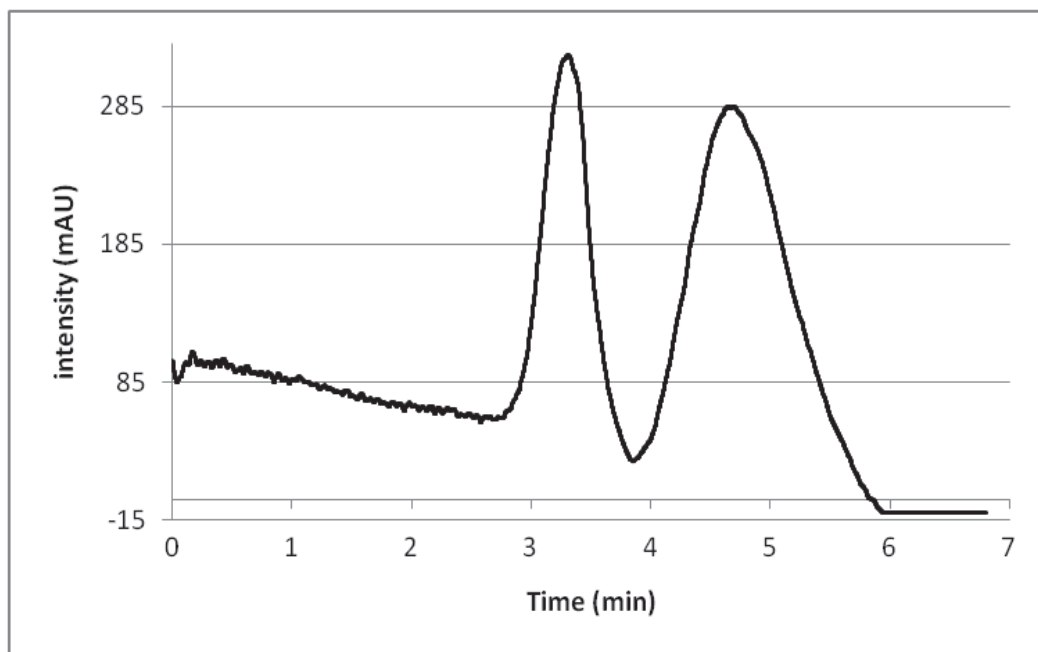


Figure 5.8 : Chromatogramme du mélange myoglobine (4,3 g/L) et lysozyme (8,3 g/L) séparé avec le système solvant ATPS 14% PEG/14% K_2HPO_4 en mode descendant. Rotor mini-3D $V_{inj}=250\mu L$. 2800rpm- débit = 8mL/min, $S_f=32\%$, 40bars, $\lambda = 220\text{ nm}$

2.3.2. Etude de la résolution

En chromatographie préparative, un retour à la ligne de base se traduit par une pureté des composés très élevée, et une résolution supérieure à 1,5 (bandes non adjacentes) par une possibilité de charger davantage l'injection (charge en concentration ou charge en volume). En chromatographie de partage centrifuge, la résolution est fonction du taux de phase stationnaire et de l'efficacité comme le montre l'équation 5.6.

$$R_s = \frac{Sf}{4} \times \frac{K_{D2} - K_{D1}}{1 - Sf \left(1 - \left(\frac{K_{D2} - K_{D1}}{2}\right)\right)} \times \sqrt{\frac{n_c}{NC/TP}} \quad \text{Equation 5.6}$$

Un fort taux de phase stationnaire combiné à une faible valeur de NC/TP doit induire une valeur de résolution élevée. La comparaison des rotors actuels se fait essentiellement par la comparaison des rétentions des phases stationnaires d'un côté et les valeurs d'efficacité de l'autre, en fonction de la vitesse de phase mobile (28). En traçant le NC/TP en fonction du taux de phase stationnaire, cela nous donnera une idée du rotor permettant de disposer de la meilleure résolution. Combiner les deux critères de performances dans un même graphe apporte une nouvelle méthodologie permettant de s'affranchir du nombre de cellules et permet de visualiser plus aisément les comparaisons inter-rotor pour trouver la géométrie adéquate ou le meilleur compromis.

La figure 5.9 illustre les valeurs de NC/TP obtenues en fonction du taux de phase stationnaire pour les différents rotors testés au cours de cette thèse. Comme on peut le constater, l'ensemble des rotors testés possède la même tangente dans la zone allant de 25% à 50% de taux de phase stationnaire. Une même tendance se dessine entre les différents rotors. Il semblerait donc que les rotors aient à peu près le même pouvoir résolutif.

Si l'on regarde plus en détail, on peut constater que le rotor mini-3D possède des valeurs de NC/TP inférieures au rotor 30-mL pour une même valeur de Sf. De manière générale, c'est le cas pour l'ensemble des cellules sphériques comparées aux cellules twins à disques. On peut donc conclure que la structure tridimensionnelle a permis d'améliorer le transfert de masse au sein des cellules entre la phase stationnaire et la phase mobile aqueuse pour un même taux de phase stationnaire. Néanmoins, cette légère amélioration n'aura pas d'effet significatif sur la résolution. En effet, dans la formule de l'équation 5.6, la contribution du NC/TP est de l'ordre de la racine carrée

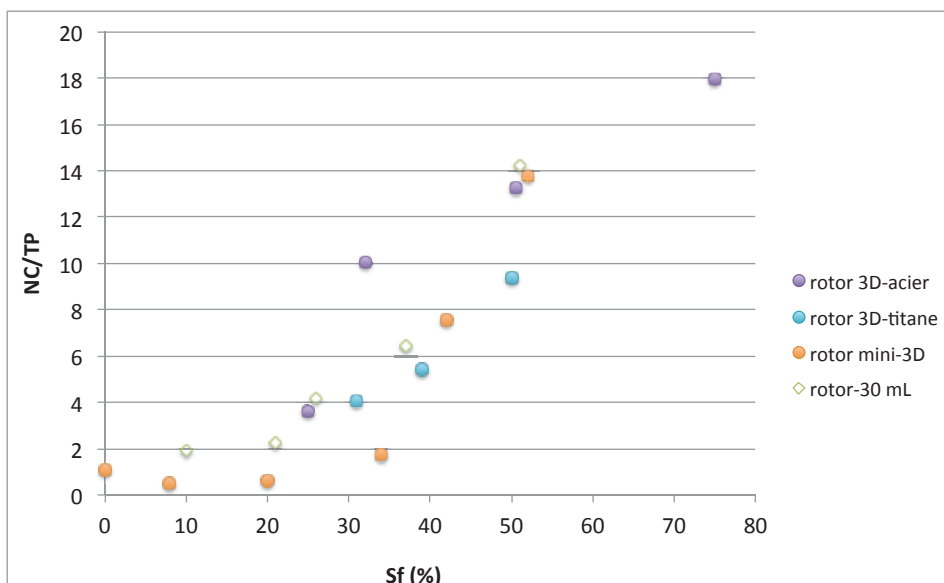


Figure 5.9 : Evolution NC/TP de la myoglobine ($K_d=1,2$) en fonction du taux de phase stationnaire pour l'ensemble des rotors utilisés au cours de cette thèse

Si nous traçons, désormais, la résolution actuelle obtenue pour la séparation des molécules modèles (myoglobine et lysozyme) en fonction du taux de phase stationnaire, en tenant compte que le nombre de cellules des rotors n_c est différent selon les rotors, les résultats sont présentés par la figure 5.10.

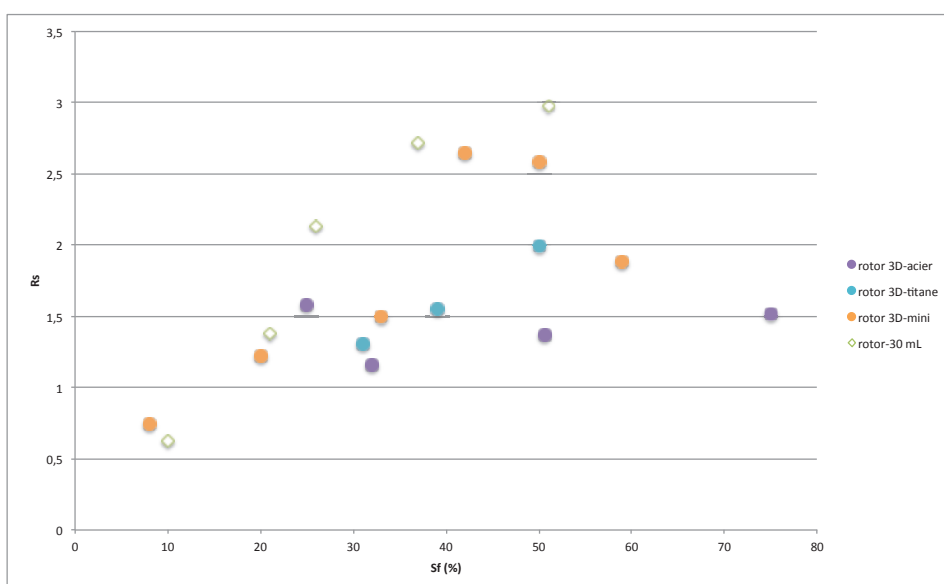


Figure 5.10 : Résolution entre la myoglobine ($K_d=1,2$) et la lysozyme ($K_d= 5,2$) en fonction du taux de phase stationnaire pour l'ensemble des rotors utilisés au cours de cette thèse

Pour l'ensemble des rotors excepté le rotor 3D-acier, on constate que pour un taux de phase stationnaire de 30 % une résolution supérieure ou égale à 1,5 est obtenue. De ce fait malgré un nombre de cellules limité à 400, il est possible de pouvoir séparer des composés avec une sélectivité de l'ordre de 5.

La résolution étant dépendante du nombre de cellules, nous pouvons réaliser des simulations dans lesquelles nous rapportons la résolution que nous aurions entre deux composés dans des rotors présentant un nombre de cellules de 832. La figure 5.11 A) montre les résultats pour une séparation relativement simple, avec une sélectivité de 5 et la figure 5.11 B) pour une séparation plus délicate avec une sélectivité de 2.

Pour une séparation de composés possédant des coefficients de partage assez éloignés, tous les rotors permettent la séparation dès 20% de taux de phase stationnaire. En revanche dans le cadre de composés très proches, la résolution est inférieure à 1,5 et ce quelque soit le taux de phase stationnaire. Dans ce cas –là, seule la modification du système solvant pour augmenter la sélectivité permettra d'obtenir la résolution souhaitée.

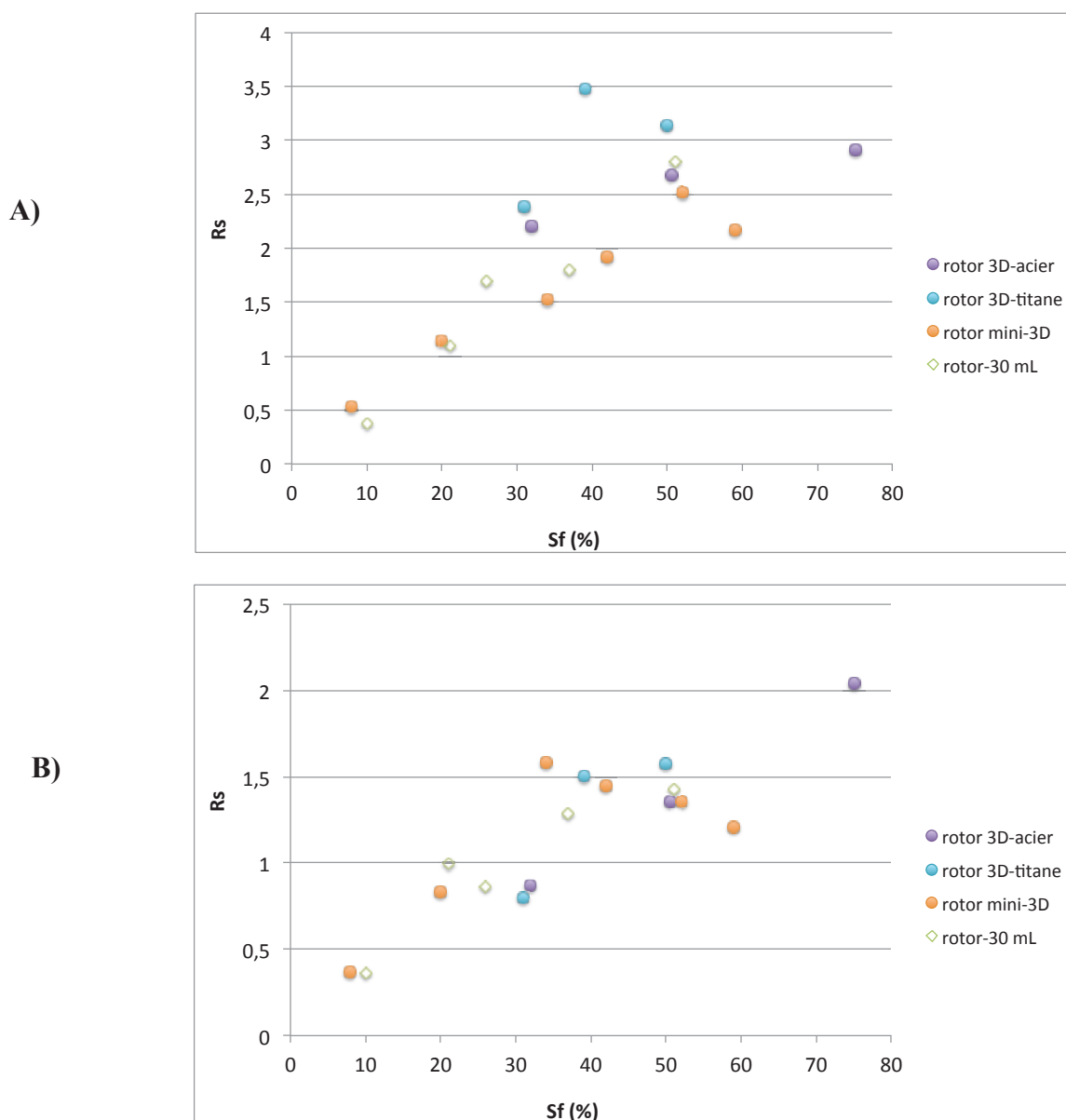


Figure 5.11 : Valeur simulée pour 832 cellules de la résolution en fonction du taux de phase stationnaire pour l'ensemble des rotors utilisés au cours de cette thèse **A)** deux composés ayant des $K_d = 1$ et 5 **B)** $K_d = 1$ et $K_d = 2$

L'ensemble de l'étude menée sur la résolution pour les différents rotors a permis démontrer que les rotors quelques soit leur forme tridimensionnelle ou non sont tous équivalents. De ce fait malgré une amélioration du taux de phase stationnaire observée, la forme tridimensionnelle ne permet pas d'améliorer de manière significative la résolution, l'efficacité étant sensiblement identique entre les rotors. Les valeurs de NC/TP ne varient pas de manière significative. Mais l'avantage noté dans l'ensemble de l'étude menée sur les systèmes biphasiques aqueux permet de travailler à des vitesses de phase mobile plus élevées et donc un débit de phase mobile plus élevé tout en conservant un taux de phase stationnaire supérieur à 30 %.

2.3.3. Etude de la sensibilité

Les travaux de laboratoire de recherche nécessitent souvent la préparation de fractions purifiées et concentrées, afin de mener une identification structurale, d'améliorer les performances d'analyse ou pour produire de nouvelles substances de référence. Le défi repose sur les quantités limitées d'échantillons disponibles. Le développement d'un instrument CPC miniaturisé capable de traiter de très petits volumes d'échantillons permettrait d'explorer plus de conditions chromatographiques pour un volume d'échantillon. Néanmoins, il est important de noter ici que malgré une littérature riche en exemples d'application avec des volumes injectés de l'ordre de 10%-20% du volume colonne, on constate que personne n'a jamais cherché à réduire les volumes injectés. De ce fait une étude sur le volume d'injection a été réalisée. Vouloir diminuer les quantités introduites peut conduire à la non-détection des composés, le processus chromatographique étant un processus dilutif. Dans le cadre d'objectifs préparatifs, cela signifie que la molécule d'intérêt présente en très faible concentration en sortie de colonne risque de ne pas être collectée correctement, avec des taux de récupération très faibles.

La théorie de la chromatographie indique que la hauteur du pic est proportionnelle au volume injecté, mais également dépend des performances de la colonne et des variances extra-colonnes, comme le montre l'équation 5.7. Nous considérerons dans notre étude que les dispersions extra-colonnes non négligeables se limitent au processus d'injection.

$$h = \frac{S \times C_i \times V_{inj}}{(2\pi)^{\frac{1}{2}} \times \sigma_c \times (1 + \frac{\sigma_i^2}{\sigma_c^2})^{1/2}} \quad \text{Equation 5.7}$$

avec h hauteur du pic chromatographique, S, sensibilité du détecteur, C_i la concentration du soluté, V_{inj} le volume injecté, σ_c² la variance de la colonne et σ_i² la variance due à l'injection.

La formule montre que pour améliorer la sensibilité d'une méthode, différents paramètres peuvent être modifiés. Premièrement pour disposer de la meilleure sensibilité le volume d'injection et la concentration de l'échantillon peuvent être augmentés. Néanmoins le but ici est d'obtenir la meilleure sensibilité sans augmenter la consommation d'échantillon. De ce fait, seule la variance de la colonne aura un effet sur la sensibilité puisque tous les autres paramètres sont constants.

De manière plus approfondie, la hauteur d'un pic en CPC peut s'exprimer d'une manière différente comme le montre la formule 5.8, où l'on fait apparaître les contributions spécifiques à la technique CPC (phase stationnaire et NC/TP variables).

$$h = \frac{S \times Ci}{\sqrt{2\pi}} \times \frac{V_{inj}}{V_{motif}} \times \frac{1}{\sqrt{nc}} \times \frac{1}{\sqrt{NC/TP (1-Sf + K \times Sf)}} \quad \text{Equation 5.8}$$

Ainsi la hauteur d'un pic en CPC est fonction de trois contributions majoritaires (le premier terme étant une constante liée à l'instrumentation et à l'échantillon à purifier) :

- La contribution à l'injection exprimée par le second terme
- La contribution liée à la longueur de la colonne exprimée par le nombre de cellules
- La contribution des performances de chacune des cellules exprimée par le dernier terme

De ce fait, afin d'étudier la sensibilité sur le rotor commercial de 30 mL et le nouveau rotor mini-3D, nous nous positionnerons dans deux cas différents, à savoir soit à un taux de phase stationnaire identique entre les deux rotors, soit dans les conditions opératoires offrant les meilleures performances pour chacun des rotors. Il est important de noter que les deux premiers termes de l'équation sont fixes (même échantillon, même détecteur, même volume de motif).

a) A taux de phase stationnaire identique.

Pour se placer à taux de phase stationnaire identique, les conditions opératoires définies sont pour le rotor mini-3D, 2800 rpm et 6 mL /min avec un temps d'analyse de 8 minutes et pour le rotor 30 mL, 2800 rpm et 4 mL /min avec un temps d'analyse de 35 minutes. Ces conditions permettent la séparation avec retour à la ligne de base de nos composés d'intérêt. Le taux de phase stationnaire est égal à 45% pour les deux rotors. Dans ces conditions, des volumes allant de 50 µL à 250 µL ont été injectés. La hauteur a ainsi été mesurée pour la myoglobine et la lysozyme. Afin de permettre la comparaison des deux rotors, la hauteur du pic a été tracée en fonction du volume d'injection sur le volume du motif afin de s'affranchir de la taille des différentes colonnes (nombre de cellules différent). Les résultats sont montrés dans la figure 5.12.

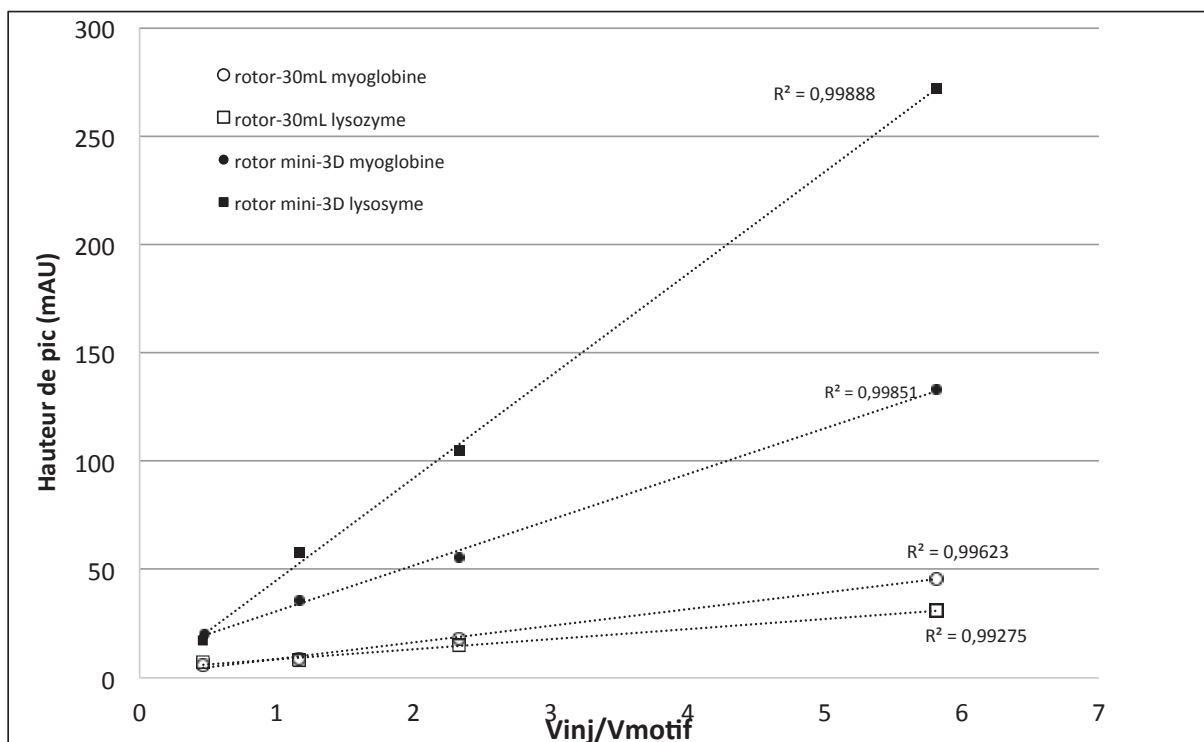
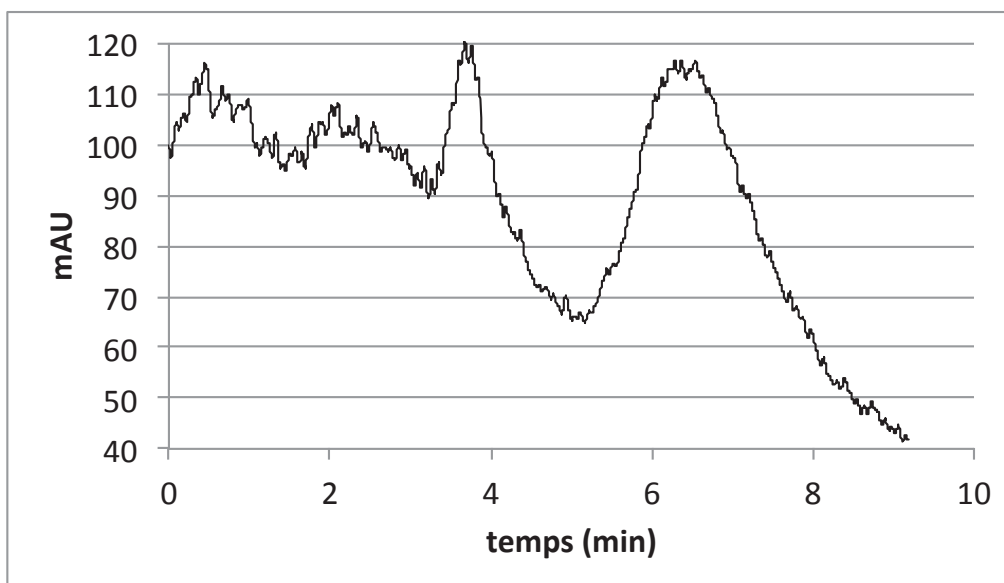


Figure 5.12 : Variation de la hauteur des pics de myoglobine et lysozyme en système solvant ATPS 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 en fonction du rapport volume injecté sur volume du motif pour les rotors mini-3D (2800 rpm, 6 mL/min, $S_f=45\%$) et rotor-30 mL (2800 rpm, 4 mL/min, $S_f=47\%$)

D'après les résultats, on constate que pour chacun des rotors, la hauteur du pic est linéaire en fonction du volume injecté avec des $r^2 > 0,996$. Cela est en conformité avec la théorie de la chromatographie stipulant que la hauteur des pics est proportionnelle au volume injecté tant que la variance due à l'injection est négligeable devant la variance due à la colonne (équation 5.8).

Le volume d'injection minimal a été déterminé à 50 μL pour les deux rotors, c'est-à-dire $V_i/V_{motif} = 1,18$. Le chromatogramme obtenu sur chacun des instruments pour ce volume d'injection est présenté par la figure 5.13.

A)



B)

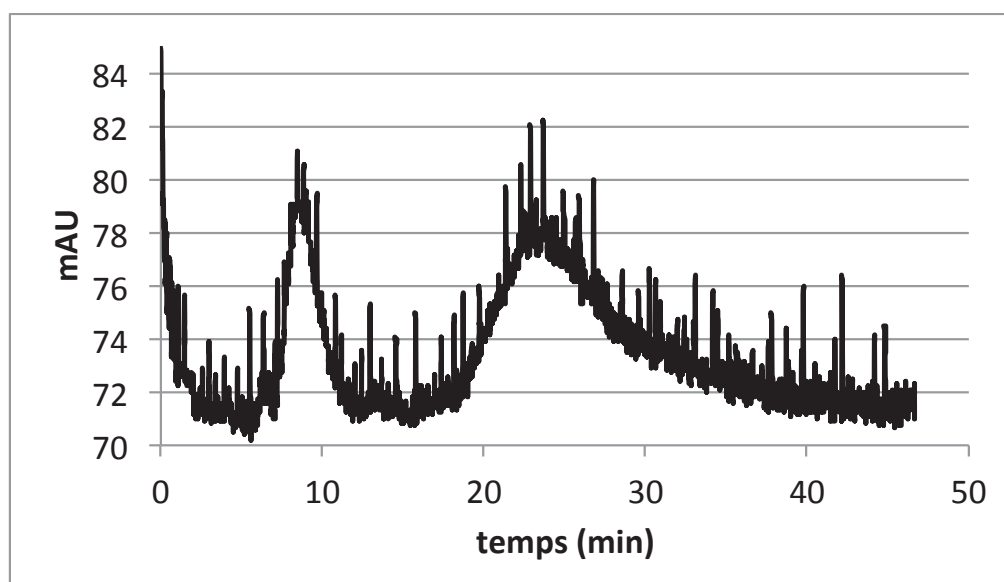


Figure 5.13 : Chromatogramme de la séparation de ma myoglobine (K=1,2) et de la lysozyme (K=5,2) **A)** rotor mini-3D 2800 rpm, 6mL/min, $S_f = 44\%$ et **B)** rotor-30 mL 2800 rpm, 4 mL/min, $S_f = 46\%$. $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$

Si l'on regarde la valeur des hauteurs de pic, quel que soit le composé, la séparation obtenue sur le rotor mini-3D est plus sensible que celle sur le rotor à disques. Nous pouvons éventuellement expliquer cette différence par le fait que le nombre de cellules du rotor mini-3D étant plus faible, les composés passent moins de temps dans la colonne et de ce fait se dispersent moins et possèdent donc une hauteur de pic plus importante (contribution liée à la longueur de colonne dans l'équation 5.8).

Afin de s'affranchir du nombre de cellules, nous pouvons simuler la hauteur de pic dans le cas où le rotor mini-3D posséderait 832 cellules. En effet en augmentant uniquement le nombre de cellules,

tous les autres paramètres entrant en jeu dans la cellule sont constants. Ainsi le passage de 600 cellules à 832 cellules se traduit par le rapport suivant :

$$h_{832} = h_{600} \times \frac{\sqrt{600}}{\sqrt{832}} \quad \text{Equation 5.9}$$

Cette simulation a été intégrée au graphique de la figure 5.14.

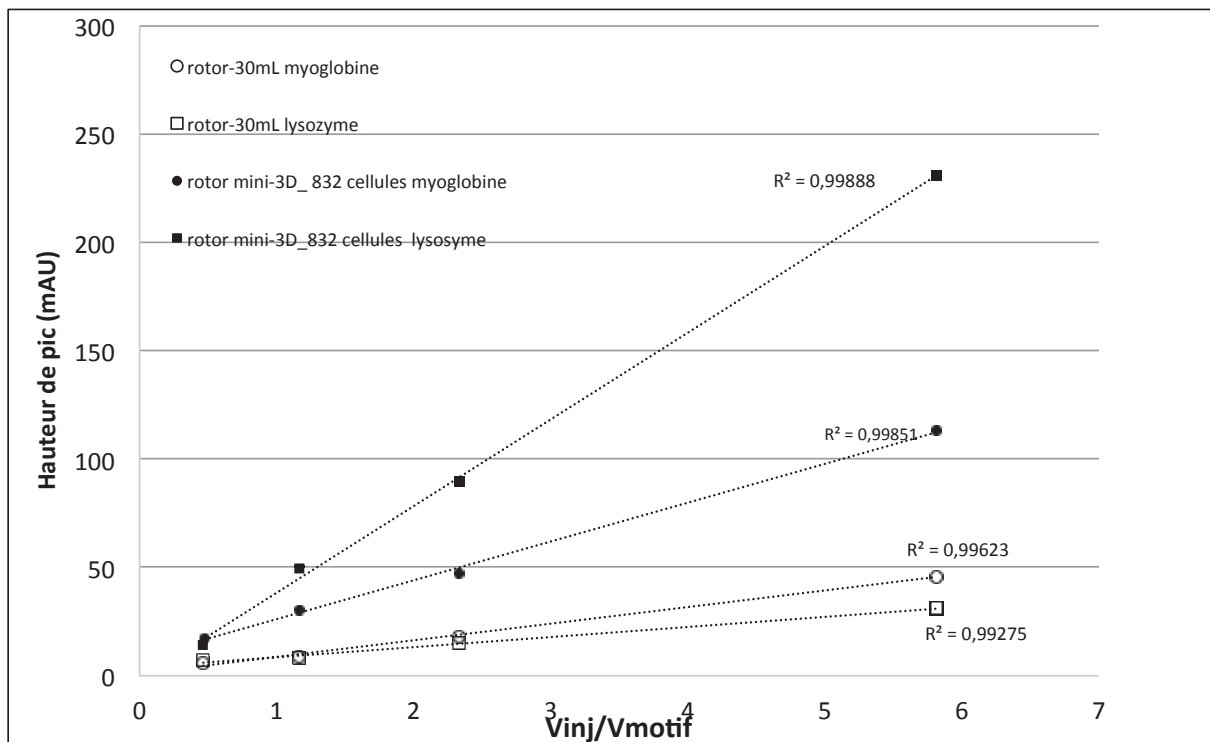


Figure 5.14 : Variation normalisée de la hauteur des pics de myoglobine et lysozyme sous système solvant ATPS 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 en fonction du rapport volume injecté sur le volume du motif pour les rotors mini-3D (2800 rpm, 6 mL/min, Sf =45%) et rotor-30 mL (2800 rpm, 4 mL/min, Sf =47%).

Comme on peut le constater malgré une diminution de la sensibilité, cette dernière reste supérieure pour le rotor mini-3D par rapport au rotor-30 mL. Cela s'explique par le fait que pour un taux de phase stationnaire identique, le nombre de cellules nécessaire pour atteindre 1 plateau théorique (NC/TP) était inférieur dans le rotor mini 3D, conduisant à une moindre dispersion du pic. La légère amélioration du transfert de masse constatée précédemment dans le nouveau rotor à structure tridimensionnelle a permis d'améliorer de manière significative la sensibilité dans ces conditions de taux de phase stationnaire identique.

b) Dans les meilleures conditions opératoires

Une remarque peut être émise à partir de l'étude précédente. En effet est-ce que les conditions de travail précédentes correspondent aux conditions optimales des performances des rotors ? C'est-à-dire les conditions permettant la variance la plus faible pour chacun des deux rotors. Pour cela, la variance par cellule a été calculée pour la myoglobine et tracée en fonction du débit pour chacun des rotors. La figure 5.15 illustre les résultats. Dans ces conditions il faut noter que la séparation de nos deux molécules modèles n'est pas possible, la résolution étant trop faible. Les mesures sont réalisées uniquement pour la myoglobine.

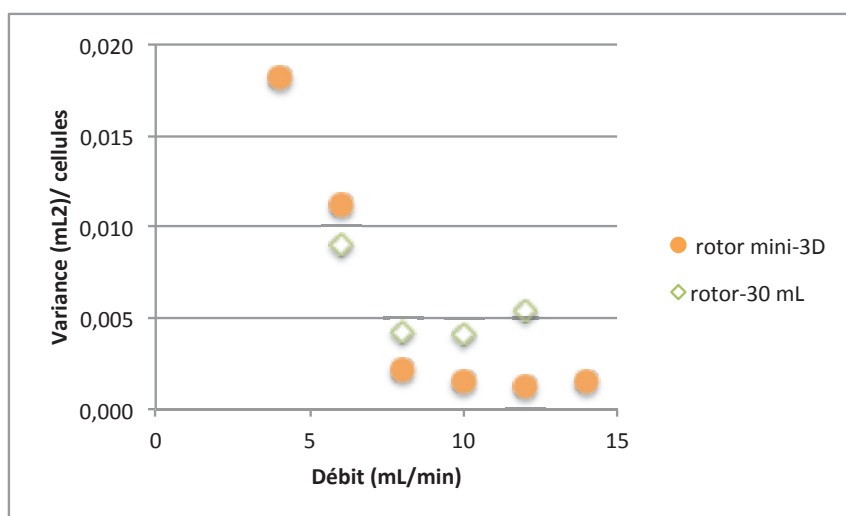


Figure 5.15 : Variation de la variance par cellule du pic de la myoglobine en fonction du débit de phase mobile pour le rotor mini-3D et le rotor 30 mL

Dans les conditions de travail précédentes, nous nous étions placés à un débit de 4 mL/min pour le rotor-30 mL, soit dans des conditions favorisant le taux de phase stationnaire au détriment de la dispersion. Dès lors, si maintenant on se place dans les conditions optimales, cela correspond au débit de 8 mL/min pour le rotor-30 mL et 10 mL/min pour le rotor mini-3D.

Ainsi la nouvelle valeur de la variance permet de simuler la nouvelle hauteur de pic dans ces conditions, cela en utilisant l'équation 5.7 et en considérant qu'il n'y a pas de dispersion extra-colonne. La formule appliquée est alors la suivante (équation 5.10).

$$h_{conditions\ optimales} = h_{mesurée} \times \frac{\sigma_{conditions\ optimales}}{\sigma_{mesurée}} \quad \text{Equation 5.10}$$

Avec $\sigma_{mesurée}$ correspondant à l'écart du pic de la myoglobine obtenu lors de la réalisation des expériences dans les conditions de taux de phase stationnaire constant.

La figure 5.16 illustre la hauteur de pic simulée de la myoglobine pour les nouvelles conditions de travail, pour les rotors actuels, et également pour le rotor mini-3D ramené à un nombre simulé de 832 cellules.

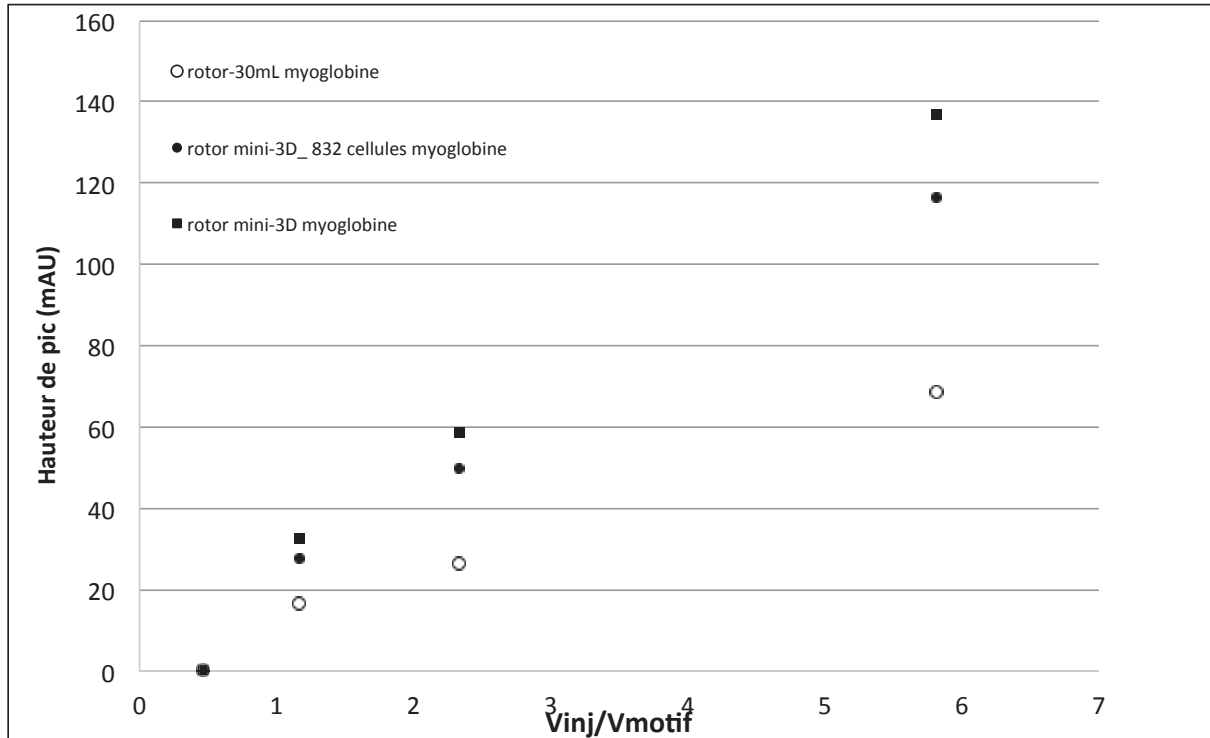


Figure 5.16 : Hauteur normalisée des pics de myoglobine solvant ATPS 14% PEG/ 14% K_2HPO_4 en fonction du rapport volume injecté sur le volume du motif pour les rotors mini-3D (2800 rpm, 10 mL/min $Sf = 20\%$) et rotor-30 mL (2800 rpm, 8 mL/min, $Sf = 21\%$)

Même dans les conditions optimales pour chacun des rotors, le rotor mini-3D permet une meilleure sensibilité que le rotor commercial. De ce fait nous pouvons affirmer ici que la structure tridimensionnelle permet d'améliorer la sensibilité.

Par cette amélioration, le volume d'injection peut être diminué. Ainsi, pour obtenir une hauteur de pic de 50 mAU, 80 μ L d'échantillon sont nécessaires dans le rotor mini-3D alors que pour le rotor-30 mL, un volume de d'injection de plus de 250 μ L est requis.

Ces résultats montrent donc que dans le cadre des protéines, le rotor 3D est plus adapté. En effet ce dernier permet de réduire la consommation d'échantillon tout en obtenant une sensibilité comparable. La structure tridimensionnelle montre ici tout son intérêt.

2.4. Evaluation du nouveau rotor dans un environnement hydro-organique

2.4.1. Rétenition de la phase stationnaire organique

Ayant démontré l'intérêt de la structure tridimensionnelle dans le cadre des systèmes solvants biphasiques aqueux en termes de rétention des phases, nous allons maintenant nous intéresser au système solvant hydro-organique. En effet, dans ce chapitre, la modification de la taille de la cellule a pu modifier les performances du rotor obtenu sur le rotor 3D-titane. Les cellules étant moins larges le risque d'effet de paroi pressenti au chapitre précédent pourrait être plus présent.

La rétention de la phase organique de la phase supérieure du système solvant HEMWat 0 a été déterminée à différents débits de phase mobile (fig.5.17). La vitesse de rotation a été choisie afin de disposer du plus haut taux de phase stationnaire durant l'analyse ainsi d'une efficacité chromatographique la plus élevée (29). La vitesse maximale atteignable est de 2800 rpm.

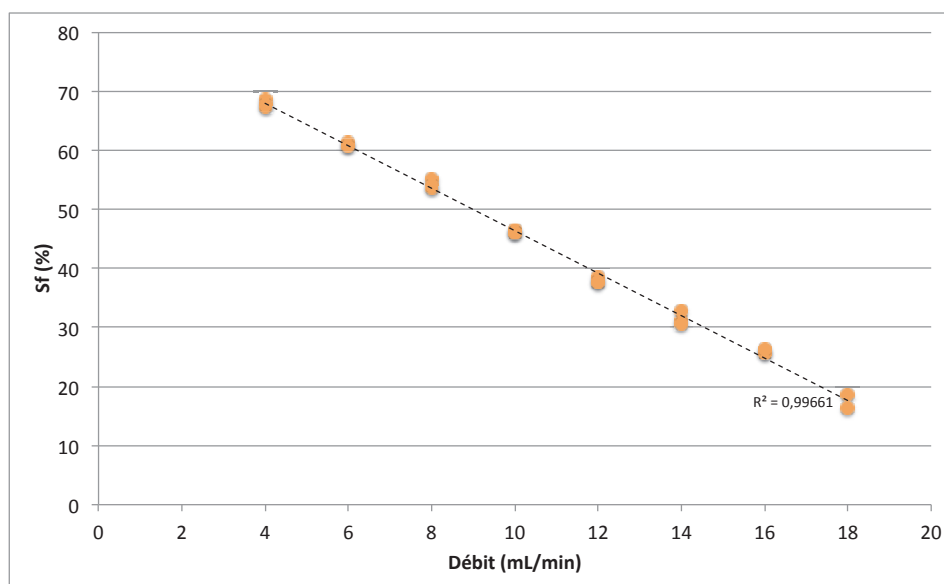


Figure 5.17 : Evolution du taux de phase stationnaire du système solvant HEMWat 0 pour le rotor mini-3D en fonction du débit de phase mobile, à 2800 rpm.

Comme attendu, le taux de phase stationnaire décroît linéairement avec le débit comme décrit lors d'études précédentes (29, 30). Si nous parlons en termes de vitesse linéaire pour comparer les rotors 3D-titane et mini-3D (figure 5.18), on constate qu'à vitesse linéaire identique le taux de phase stationnaire est supérieur pour le rotor mini-3D. La diminution des tailles des cellules et des canaux a donc permis d'améliorer la rétention du taux de phase stationnaire passant de 30% à 60% à 7 m/min par exemple. Un phénomène d'engorgement du rotor mini 3D est cependant visible à vitesse linéaire élevée (Figure 5.18), alors qu'il n'y avait pas d'engorgement dans les cellules tridimensionnelles de plus grande taille (Chapitre 4). La comparaison avec le rotor-30 mL possédant des cellules de taille identique montre que pour des vitesses linéaires comprises entre 6 et 11 m/min, le taux de phase

stationnaire entre ces deux rotors est sensiblement identique avec un taux de phase stationnaire compris entre 68% et 55%. En revanche pour des vitesses linéaires supérieures à 12 m/min, la différence devient significative.

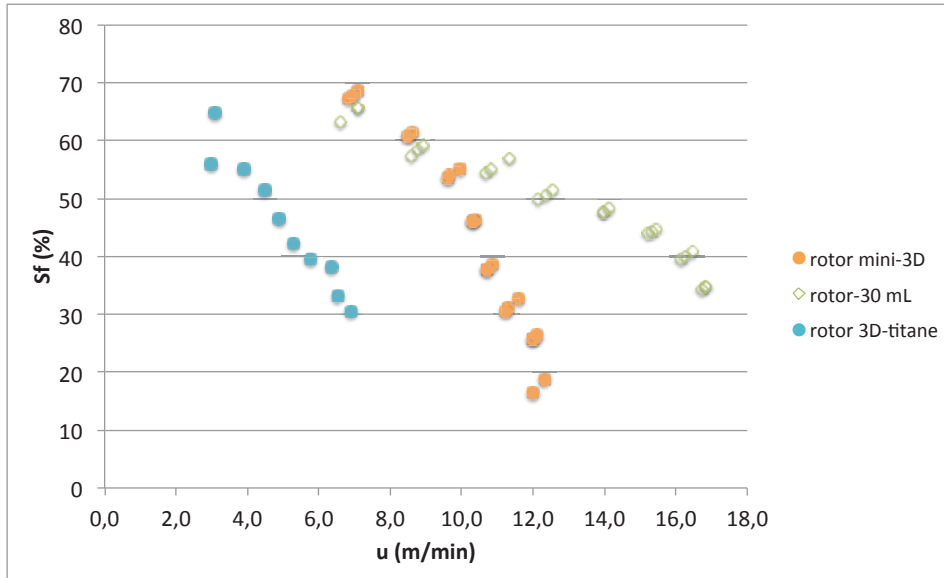


Figure 5.18 : Evolution du taux de phase stationnaire du système solvant HEMWat 0 pour le rotor mini-3D. Mode descendant. Vitesse de rotation = 2800 rpm. En fonction **A)** du débit de phase mobile **B)** de la vitesse linéaire de phase mobile.

Les volumes des cellules entre le rotor mini-3D et le rotor-30 mL étant identiques, nous pouvons supposer que le matériau a un effet sur la rétention du taux de phase stationnaire. En effet, la rugosité du matériau titane étant différente de l'acier, cela peut entraîner à haute vitesse linéaire des micro perturbations entraînant le décrochage de la phase stationnaire qui peut également être facilité par le fait que le titane soit un matériau super hydrophile, et que de ce fait, la phase stationnaire organique mouille moins la surface et se décroche de manière plus aisée. Ainsi, la vitesse maximale d'utilisation est en dessous de 12 m/min pour le mini-3D alors qu'elle est de l'ordre de 16 m/min pour le rotor-30 mL. Toutefois, à vitesse linéaire inférieure à 12 m/min, les performances des deux rotors sont comparables. Nous pouvons donc valider ce prototype en termes de tenue de phase stationnaire.

La figure 5.19 montre l'efficacité exprimée en nombre de cellules équivalent à un plateau théorique (NC/TP) pour un composé possédant un coefficient de partage de 1,2 en fonction du taux de phase stationnaire, pour les rotors mini-3D, titane-3D et 30 mL. On observe qu'entre les rotors de géométrie tridimensionnelle, les valeurs de NC/TP sont meilleures pour le rotor 3D-titane pour un même taux de phase stationnaire. La réduction de la taille de la cellule a donc entraîné une dégradation de l'efficacité de la colonne. La trajectoire du jet étant moins importante dans les cellules de petite taille et les effets de bord et de coalescence aux parois étant plus susceptibles d'arriver, la surface d'échange entre les deux liquides peut avoir diminué et donc le transfert de masse est moins favorisé que dans les cellules de volume plus important.

En comparant avec le rotor commercial possédant un volume de cellule similaire au rotor mini-3D, on constate également que le comportement est différent. Nous pouvons donc supposer une influence du matériau sur le transfert de masse. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait fabriquer un rotor possédant des disques en titane. Toutefois les valeurs de NC/TP obtenues restent correctes puisque ces dernières sont comprises entre 1,5 et 2,5, le critère idéal étant fixé à 1. Dans le cadre du rotor mini-3D, les valeurs des NC/TP varient de manière plus importante en fonction du taux de phase stationnaire que dans le cadre des autres rotors testés. Ainsi selon la sélectivité entre les composés, la question du besoin d'un taux phase stationnaire élevé ou non de se posera.

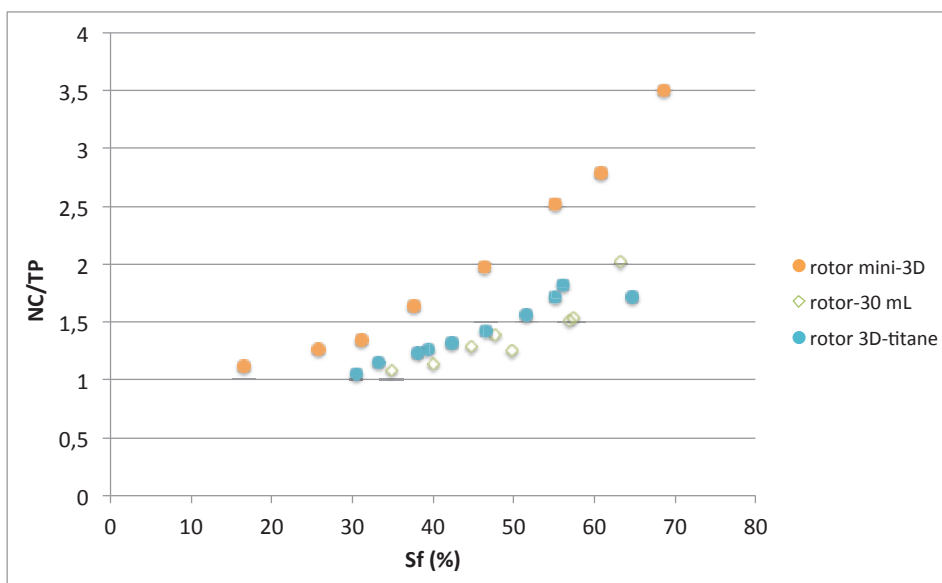


Figure 5.19 : Evolution des NC/TP de l'éthyl-parabène ($k_d=1,2$) pour le rotor mini-3D et pour le rotor-30 mL et des NC/TP pour de la coumarine pour le rotor 3D-titane. Système solvant HEMWat 0 (mini-3D, 30 mL) et HEMWat +1 (3D-titane). Mode descendant. En fonction du taux de phase stationnaire.

2.4.2. Etude de la résolution

De la même manière que dans le cadre des systèmes solvants biphasique aqueux, nous avons étudié l'influence de la structure tridimensionnelle sur la résolution. Dans un premier temps, dans les conditions réelles d'utilisations, la résolution a été déterminée dans le cadre de la séparation de deux composés possédant un coefficient de partage de 1,6 et 2,5 correspondant à l'éthyl-parabène et le propyl-parabène. Les résultats présentés dans la figure 5.20 reprennent l'ensemble des rotors étudiés. Comme on peut le constater, avec ses 146 cellules, le rotor 3D-acier ne permet la séparation avec une résolution à la ligne de base que pour des valeurs de Sf supérieures à 55%, alors que les trois autres rotors permettent la séparation avec des taux de phase stationnaire aussi bas que 30%. La perte de phase stationnaire est donc compensée par le nombre de cellules plus élevé.

De plus, comme nous pouvons l'observer la résolution est identique entre le rotor 3D-titane possédant de grosses cellules sphériques (120 μL) et le rotor mini-3D avec les petites cellules (43 μL). D'après la formule définie par l'équation 5.3, cela signifie donc que le rotor à 400 cellules permet

d'avoir la même efficacité que le rotor à 600 cellules de taille plus petite. On peut donc se poser la question de ce qui est préférable, soit disposer d'un rotor avec un faible nombre de cellules de taille importante soit un rotor possédant plus de cellules de taille plus petite.

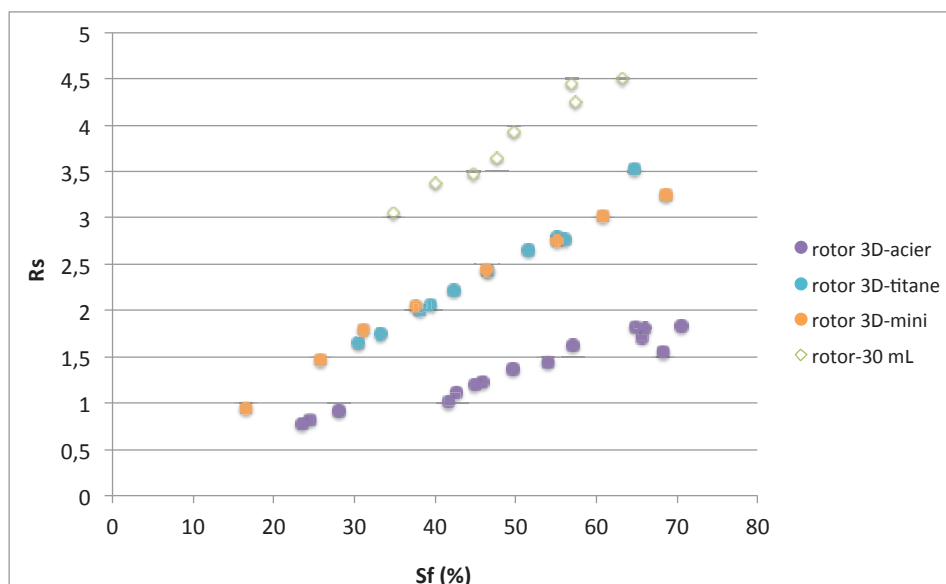


Figure 5.20 : Valeur calculée de la résolution entre l'éthyl-parabène ($K_d=1,6$) et le propyl-parabène ($K_d= 2,5$) en fonction du taux de phase stationnaire pour l'ensemble des rotors utilisés au cours de cette thèse

En revanche, si l'on ramène les rotors à un nombre de cellules équivalent, c'est à dire à 832 cellules (figure 5.21), on constate que la résolution est identique quelles que soient la géométrie et la taille des cellules.

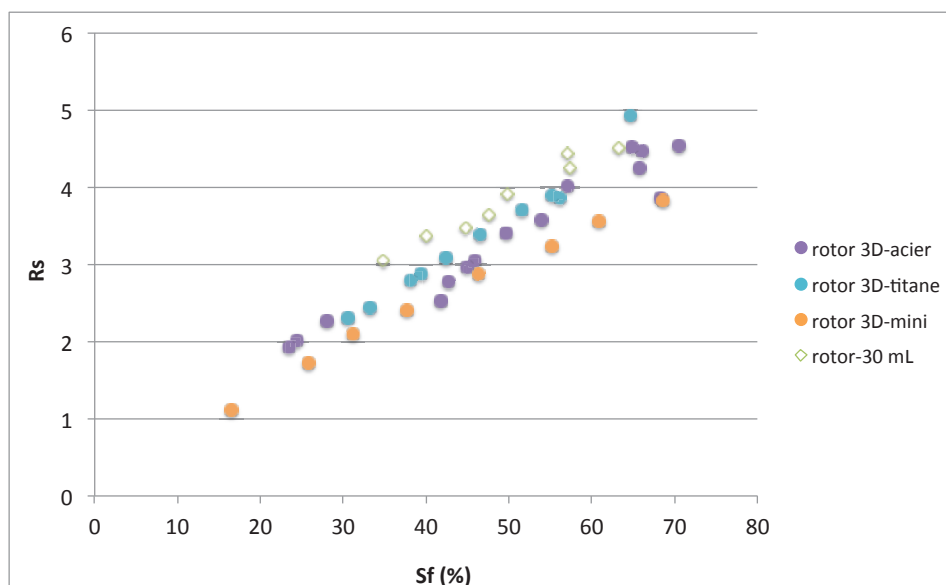


Figure 5.21 : Valeur simulée pour 832 cellules de la résolution entre le méthylparabène ($k_d=1,6$) et l'éthylparabène ($K_d=2,5$) en fonction du taux de phase stationnaire pour l'ensemble des rotors utilisés au cours de cette thèse.

Dans le cadre des systèmes solvant hydro-organiques, la structure tridimensionnelle ne permet donc pas d'améliorer la résolution. Les trois types de rotors, à disques, 3D petite cellule et 3D grosse cellule permettent, à nombre de cellules équivalent, de séparer de manière similaire les différents composés.

2.4.3. Etude de la sensibilité

Afin de déterminer le volume d'injection minimal sur le rotor mini-3D, la sensibilité a également été étudiée de la même manière que pour le système solvant ATPS. Dans un premier temps l'étude comparative a été réalisée à taux de phase stationnaire équivalent. Les résultats sont présentés dans la figure 5.22. Les conditions de travail fixées sont 2800 rpm et 10 mL/min pour le rotor mini-3D avec un taux de phase stationnaire de 32% et 2500 rpm pour le rotor-30 mL avec un taux de phase stationnaire égale à 38%. L'échantillon injecté est composé de new coccine red, d'éthyl-parabène et de butyl-parabène à 0,5 mg/mL (notés respectivement P2 et P4).

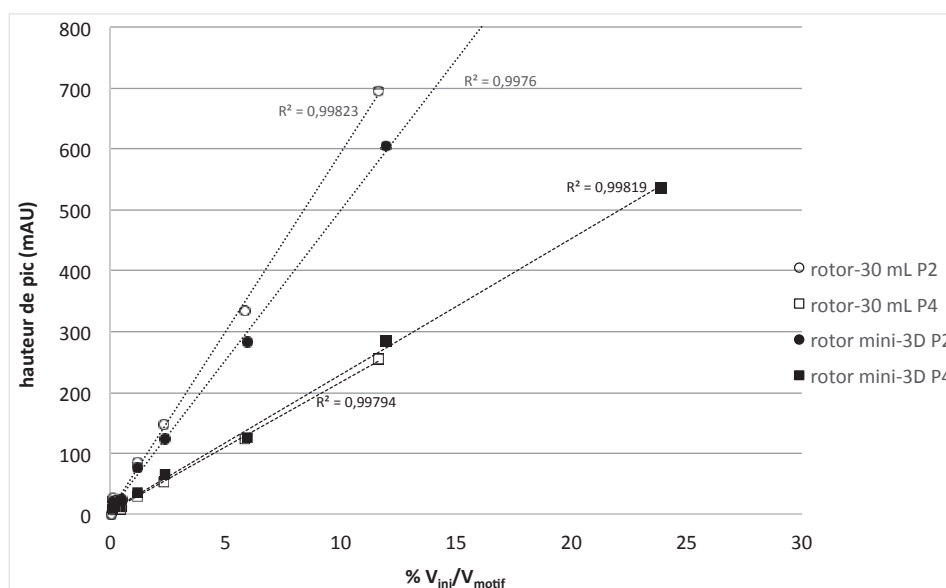


Figure 5.22 : Variation de la hauteur des pics de l'éthyl-parabène (P2) et du butyl-parabène (P4) sous système solvant HEMWat 0 en fonction du rapport volume injecté sur volume du motif pour les rotors mini-3D (2800 rpm, 10 mL/min, $S_f=34\%$) et rotor-30 mL (2500 rpm, 10 mL/min, $S_f=38\%$)

Dans le cadre des systèmes solvants hydro-organiques, le rotor-30 mL permet d'obtenir une hauteur de pic légèrement supérieure pour un composé possédant un coefficient de partage de 2 alors que pour un coefficient de partage plus élevé ($K_d=3,9$), le rotor mini-3D et le rotor-30 mL possèdent une sensibilité équivalente. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à taux de phase stationnaire équivalent, le rotor-30 mL possède des valeurs de NC/TP à peine plus faibles, se traduisant par un plus faible

élargissement des pics. Dans le système solvant HEMWat 0, les composés dispersent de manière similaire dans les deux géométries de rotors.

Il est important de noter que dans les deux rotors nous pouvons injecter des volumes aussi faibles que 1 μL , ce qui n'a jamais été expérimenté dans la littérature. Cette valeur est du même ordre de grandeur que ce que l'on peut injecter dans le cadre de la chromatographie liquide haute performance. L'injection de quelques dizaines ou centaines de μL correspond bien au besoin des utilisateurs de CPC en laboratoire de recherche. Les chromatogrammes sont représentés dans la figure 5.23.

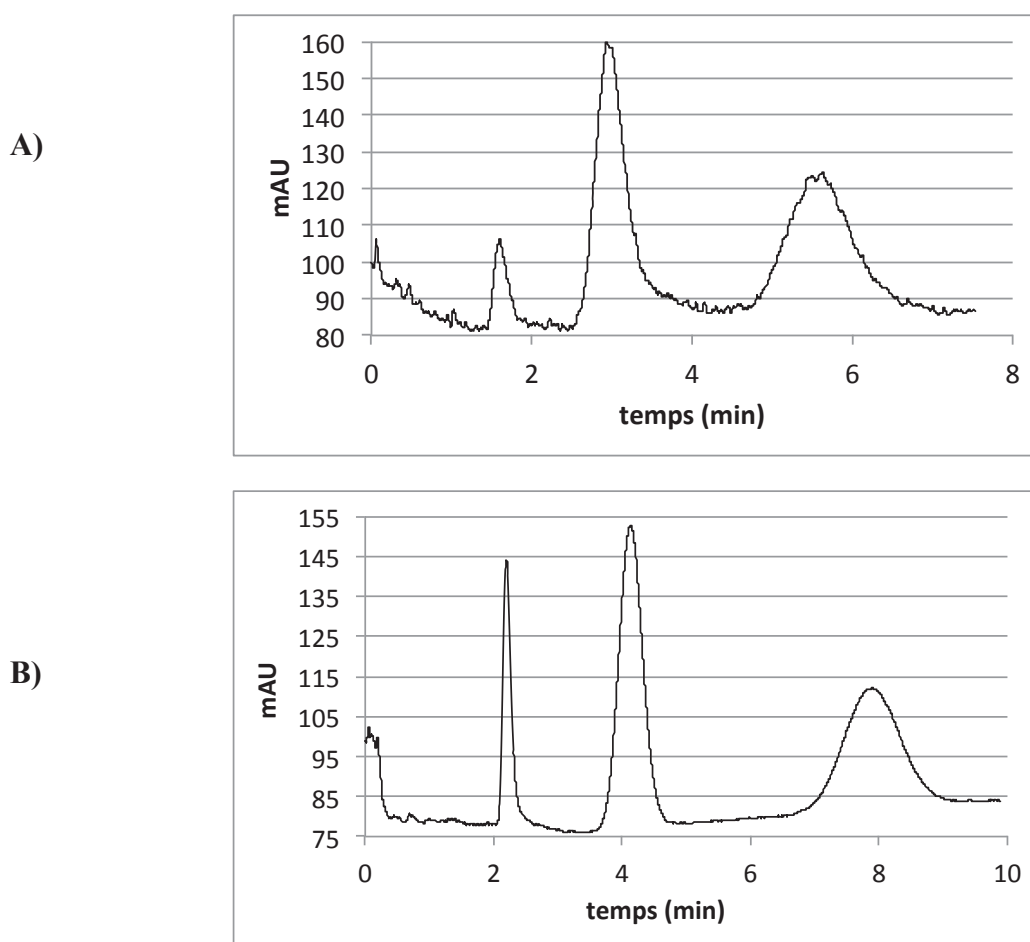


Figure 5.23: Chromatogramme du mélange new coccine-red, ethyl-parabène, butyl-parabène (0,5 g/L) séparés avec le système solvant HEMWat 0 en mode descendant. $\lambda=254$ nm, V_{inj} 1 μL , débit 10 mL/min; **A)** Rotor mini-3D, 2800 rpm, Sf 32%, 70 bars **B)** Rotor-30 mL, 2500 rpm, Sf 38%, 72 bars

Nous nous plaçons maintenant dans le cas où la dispersion est la plus faible pour les deux rotors, c'est à dire dans les meilleures conditions pour les deux rotors. Pour cela, la variance par cellule a été déterminée. D'après les résultats de la figure 5.24, on constate qu'au débit utilisé précédemment de 10 mL/min, nous étions placés dans les meilleures conditions pour le rotor-30mL alors qu'il ne

s'agissait pas des conditions optimales pour le rotor mini-3D, ce qui pourrait expliquer le fait que la sensibilité soit meilleure pour le rotor-30 mL par rapport au rotor mini-3D à ce débit.

En revanche à partir de 12 mL/min, la variance par cellule étant identique, la sensibilité devrait donc être proche. Cela correspond à un taux de phase stationnaire de 27% pour le rotor mini-3D et de 40% pour le rotor à disque. Ainsi si l'on se place donc dans ces conditions, la nouvelle hauteur calculée pour chacun des rotors est illustrée par la figure 5.25.

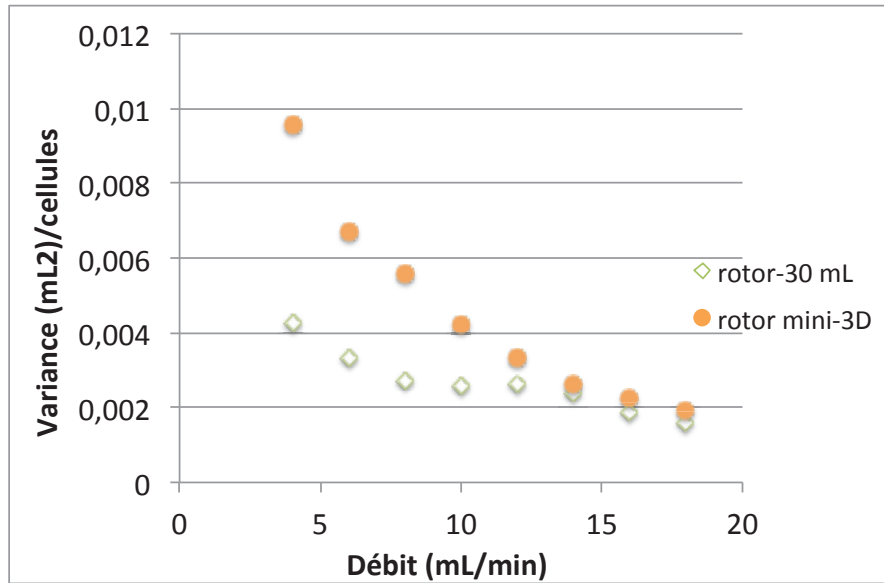


Figure 5.24 : Variation de la variance par cellule du pic de l'ethyl-parabène en fonction du débit de phase mobile pour le rotor mini-3D et le rotor 30 mL

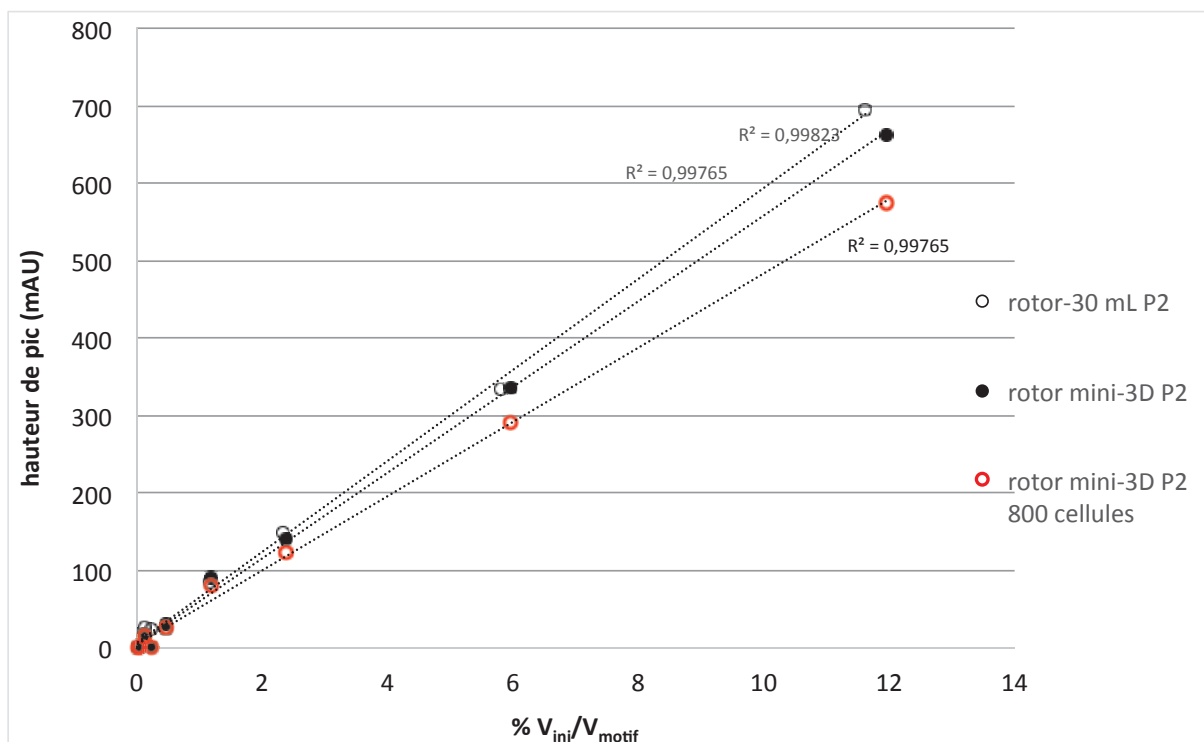


Figure 5.25 : Variation normalisée de la hauteur des pics de l'ethyl-parabène en fonction du rapport volume injecté sur le volume du motif pour les rotors mini-3D (2800 rpm, 12 mL/min, $S_f = 27\%$) et rotor-30 mL (2800 rpm, 12 mL/min, $S_f = 40\%$).

Pour conclure sur l'ensemble de l'étude portant sur le système solvant hydro-organique, le choix entre le rotor commercial et le mini-3D n'est pas trivial et dépend des composés à séparer. En effet dans le cadre de faible sélectivité entre les composés, il est nécessaire de disposer d'un taux de phase stationnaire élevé, ce qui donnera une résolution identique sur les deux rotors mais la sensibilité sera meilleure avec le rotor commercial. En revanche dans le cadre d'une sélectivité élevée entre des composés, un faible taux de phase stationnaire sera suffisant pour les séparer, avec une résolution identique pour les deux rotors, et dans ce cas précis, la sensibilité sera similaire avec les deux rotors.

3. Conclusion

Après avoir constaté l'amélioration des performances par la fabrication d'un rotor 3D composé de cellules twins sphériques, une question essentielle s'est posée sur la consommation d'échantillons à haute valeur ajoutée. En effet, la consommation actuelle des échantillons quelle que soit leur nature est de l'ordre au minimum du millilitre par injection dans un instrument de CPC. Or cela représente une quantité bien trop importante si nous devons travailler avec des composés à haute valeur ajoutée. Ainsi afin de diminuer au maximum cette quantité d'échantillon consommé tout en ayant une colonne possédant un nombre de cellules suffisantes pour permettre la séparation de nombreux mélanges, la diminution des dimensions des rotors titane 3D a été envisagée. De ce fait, le rotor mini-3D a vu le jour. Ce dernier se caractérise par un diamètre des canaux et de cellules se rapprochant des dimensions du plus petit rotor à disques commercialisé actuellement. Le dimensionnement de ce rotor a été limité par la technologie de l'impression 3D.

Ayant modifié la géométrie des cellules et des canaux, une modification des performances CPC était à craindre. L'étude de ces performances a permis de démontrer, dans le cadre des systèmes solvants biphasiques aqueux, la capacité de ce nouveau prototype à retenir les phases stationnaires aqueuses. En effet, grâce au design tridimensionnel, le taux de phase stationnaire pour cette colonne varie entre 58% et 30% pour un débit compris entre 2 mL/min et 10 mL/min. Cette structure maintient donc les phases stationnaires aqueuses même à débits très élevés. L'augmentation de la gamme de travail a permis ainsi d'obtenir la séparation de la myoglobine et la lysozyme, avec une résolution de 1,5, la plus rapide jamais obtenue avec un temps d'analyse de 6 minutes. Le temps d'analyse a ainsi pu être divisé par 2 en comparaison avec les derniers travaux réalisés sur ce sujet (7) en CPC et par un facteur 20 en comparaison avec la CCC (31).

En ce qui concerne les systèmes solvants hydro-organiques, une vitesse maximale d'utilisation de 12 m/min, a été déterminée correspondant au phénomène d'engorgement, ce qui n'avait pas été observé dans le cadre du rotor 3D-titane à larges cellules. La diminution des dimensions a donc donné lieu à une modification de l'écoulement de la phase mobile au sein des cellules. De plus, un impact du matériau est suspecté du fait d'une rugosité de surface différente et également une nature plus hydrophile du titane par rapport à l'acier. Néanmoins les résultats restent cohérents avec le rotor commercial à disques. Ce rotor prototype répond aux exigences fixées qui étaient de conserver les performances en comparatif avec ce qui est commercialisé aujourd'hui par la société Rousselet-Robatel dans le cadre des systèmes solvants hydro-organiques.

Les performances du mini-3D en termes de taux de phase stationnaire et d'efficacité ayant été validées par ce nouveau rotor que ce soit avec des systèmes solvant hydro-organique ou biphasiques aqueux, l'étude de la diminution du volume d'injection a pu être réalisée. Il a été démontré que des études de développement peuvent être réalisées avec des volumes d'injection proches de ceux utilisés en chromatographie liquide haute performance. Pour la première fois, nous montrons qu'il est possible d'injecter des volumes de quelques dizaines de microlitres d'échantillon dans une colonne CPC. La structure tridimensionnelle a permis d'améliorer considérablement la sensibilité permettant ainsi de diminuer le volume d'injection dans le cadre des systèmes solvants biphasiques aqueux. En revanche dans le cadre des systèmes solvants hydro-organiques, suivant les conditions de travail, la sensibilité est soit identique, soit inférieure à celle obtenue avec un rotor commercial à disque.

Le rotor mini-3D représente désormais un nouvel instrument utilisable dans les laboratoires de CPC avec la possibilité d'obtenir des séparations équivalentes au rotor commercialisé actuellement mais avec une diminution du volume d'injection dans le cadre de l'utilisation des systèmes solvants ATPS permettant ainsi de travailler avec des échantillons à haute valeur ajoutée. Ceci est une avancée majeure qui, nous l'espérons, va modifier le comportement des utilisateurs de CPC, notamment lors de l'étape longue et actuellement coûteuse en échantillon qu'est le développement de méthode.

Références

1. Prüß A, Kempter C, Gysler J, Jira T. Extracolumn band broadening in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2003;1016(2):129-41.
2. Aggarwal P, Liu K, Sharma S, Lawson JS, Tolley HD, Lee ML. Flow rate dependent extra-column variance from injection in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015;1380:38-44.
3. Schultze-Jena A, Boon M, Bussmann PT, Janssen A, van der Padt A. The counterintuitive role of extra-column volume in the determination of column efficiency and scaling of chromatographic processes. *Journal of Chromatography A*. 2017;1493:49-56.
4. Gritti F, Felinger A, Guiochon G. Influence of the errors made in the measurement of the extra-column volume on the accuracies of estimates of the column efficiency and the mass transfer kinetics parameters. *Journal of Chromatography A*. 2006;1136(1):57-72.
5. Gritti F, Guiochon G. Accurate measurements of peak variances: Importance of this accuracy in the determination of the true corrected plate heights of chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(28):4452-61.
6. Gritti F, Guiochon G. On the extra-column band-broadening contributions of modern, very high pressure liquid chromatographs using 2.1 mm ID columns packed with sub-2µm particles. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(49):7677-89.
7. Faure K, Mekaoui N, Meucci J, Berthod A. Solvent selection in countercurrent chromatography using small-volume hydrostatic columns. *LCGC North America*. 2013;31(2):132-43.
8. Bouju E, Berthod A, Faure K. Scale-up in centrifugal partition chromatography: The “free-space between peaks” method. *Journal of Chromatography A*. 2015;1409:70-8.
9. Berthod A, Ignatova S, Sutherland IA. Advantages of a small-volume counter-current chromatography column. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(19):4169-75.
10. Ye H, Chen L, Li Y, Peng A, Fu A, Song H, et al. Preparative isolation and purification of three rotenoids and one isoflavone from the seeds of *Millettia pachycarpa* Benth by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008;1178(1-2):101-7.
11. Toribio A, Boudesocque L, Richard B, Nuzillard J-M, Renault J-H. Preparative isolation of glucosinolates from various edible plants by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography. *Separation and purification technology*. 2011;83:15-22.
12. Yoon KD, Chin Y-W, Kim J. Centrifugal partition chromatography: application to natural products in 1994–2009. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2010;33(9-12):1208-54.
13. Kedzierski B, Kukuła-Koch W, Głowniak K. Application of CPC and related methods for the isolation of natural substances--a review. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2013;71(2):223-7.
14. Xu Z, Lin X, Lu Y. Separation of Peptides and Proteins by Countercurrent Chromatography. *Current Proteomics*. 2013;10(4):322-33.
15. Sutherland IA, Audo G, Bourton E, Couillard F, Fisher D, Garrard I, et al. Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008;1190(1):57-62.
16. Mekaoui N, Faure K, Berthod A. Advances in countercurrent chromatography for protein separations. *Bioanalysis*. 2012;4(7):833-44.
17. Chen L, Zhang Q, Yang G, Fan L, Tang J, Garrard I, et al. Rapid purification and scale-up of honokiol and magnolol using high-capacity high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007;1142(2):115-22.
18. Janaway L, Hawes D, Ignatova S, Wood P, Sutherland IA. A New Small Coil-Volume CCC Instrument for Direct Interfacing with MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2003;26(9-10):1345-54.

19. Boudesocque L, Lameiras P, Amarouche N, Giraud M, Quattrini F, Mc Garrity J, et al. Ion-exchange centrifugal partition chromatography: A methodological approach for peptide separation. *Journal of Chromatography A*. 2012;1236:115-22.
20. Oelmeier SA, Ladd-Effio C, Hubbuch J. Alternative separation steps for monoclonal antibody purification: Combination of centrifugal partitioning chromatography and precipitation. *Journal of Chromatography A*. 2013;1319:118-26.
21. Oelmeier SA, Effio CL, Hubbuch J. High throughput screening based selection of phases for aqueous two-phase system-centrifugal partitioning chromatography of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*. 2012;1252:104-14.
22. Grudzień Ł, Madeira L, Fisher D, Ma J, Garrard I. Phase system selection with fractional factorial design for purification of recombinant cyanovirin-N from a hydroponic culture medium using centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2013;1285:57-68.
23. Foley JP, Dorsey JG. Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks. *Analytical Chemistry*. 1983;55(4):730-7.
24. Aris R, editor *On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube*. Proceedings of the Royal Society of London A: mathematical, physical and engineering sciences; 1956: The Royal Society.
25. Chollet S. *Rationalisation des critères de dimensionnement d'une colonne de chromatographie de partage centrifuge*: Nantes; 2013.
26. Sutherland IA. Review of centrifugal liquid-liquid chromatography using aqueous two-phase solvent (ATPS) systems: its scale-up and prospects for the future production of high-value biologics. 2007.
27. Dasarathy D, Ito Y. An improved design of spiral tube assembly for separation of proteins by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015;1418:77-82.
28. Schwienheer C, Merz J, Schembecker G. Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *Journal of Chromatography A*. 2015;1390:39-49.
29. Adelman S, Schembecker G. Influence of physical properties and operating parameters on hydrodynamics in Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(32):5401-13.
30. Fumat N, Berthod A, Faure K. Effect of operating parameters on a centrifugal partition chromatography separation. *Journal of Chromatography A*. 2016;1474:47-58.
31. Ma X, Ito Y. New analytical spiral tube assembly for separation of proteins by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015;1405:193-6.

Chapitre 6

ÉTUDE DE LA CONTAMINATION DES ROTORS CPC

1. Introduction

La chromatographie de partage centrifuge étant une technique préparative à visée industrielle dans le domaine de la pharmaceutique mais également de la cosmétique et de l'agroalimentaire, la détermination des risques potentiels de contamination et la mise en place d'une procédure de nettoyage est essentielle afin de permettre l'implémentation de cette technique au sein des procédés.

Dans le cas de la purification de protéines par chromatographie de partage centrifuge, le risque de contamination des lots de production est réel. En effet, l'adhésion des protéines sur les surfaces solides peut se produire et causer des problèmes dans le milieu industriel (1). Les protéines peuvent s'adsorber et former une couche d'encrassement à la surface des équipements de travail (2, 3). De ce fait, des risques de contaminations croisées sont possibles. Même une très faible quantité de contaminants peut provoquer de sérieux problèmes de qualité de la production, tels que le risque d'allergènes non déclarés (4). De ce fait tout fabricant se doit de minimiser le risque de contamination croisée par un nettoyage suffisant (5).

Aujourd'hui au sein des zones pilotes de la production, il existe différentes méthodes de nettoyage des cuves entrant en jeu lors de la production d'éléments de produits pharmaceutiques ou pour l'agroalimentaire avec la mise en place d'un système de Nettoyage-En-Place (NEP ou CIP en anglais). Ces systèmes permettent le nettoyage des équipements par la circulation de fluides nettoyants, par actions chimiques et mécaniques (6). Le NEP est une technique largement répandue pour le nettoyage des systèmes fermés. Les trois méthodes existantes sont la méthode manuelle, semi-automatique et automatique (7). La méthode manuelle est dépendante de l'opérateur et n'est réalisable que sur des appareils faciles d'accès. C'est le cas par exemple du nettoyage d'une cuve au Karcher. Cette méthode est définie par une procédure stricte. La méthode semi-automatique nécessite l'intervention d'un opérateur pour lancer le nettoyage ou piloter l'enchaînement des étapes de lavage. Enfin le nettoyage automatique est quant à lui réalisé par un automate (8).

Une méthode de nettoyage pour les biomolécules est la combinaison d'une succession de diffusion d'étapes de nettoyage avec le plus souvent l'utilisation de solutions basique et acide avec entre temps un rinçage à l'eau (9). Le nettoyage d'une ligne industrielle sera conditionné par la nature et la force d'adhésion des souillures. Une méthode de nettoyage pourra être contrôlée par une méthode de stérilisation qui permettra de s'assurer la destruction de toute forme de vie microbienne (10). Ces étapes sont cruciales pour éliminer le risque de contamination surtout à l'échelle industrielle (1).

Dans le cadre des instruments de chromatographie de partage centrifuge, l'étude des risques potentiels de contamination n'a fait l'objet d'aucune recherche. Néanmoins une méthode de nettoyage de rotors contaminés à 2,6 g de protéines a été développée par S.Chollet (11). Cette méthode consiste en la succession d'étapes de lavage à la soude 0,5M, à l'acide chlorhydrique 0,1 M et à l'eau. La durée de ce nettoyage est de l'ordre de 80 minutes avec près de un litre et demi de solvant utilisé pour une colonne de 200 mL. L'utilisation sur le long terme de solutions à pH extrême risque de corroder l'acier inoxydable utilisé dans la fabrication des rotors à disques. Par ailleurs, la méthode décrite implique également une étape de vérification de la qualité du nettoyage qui n'est accessible que par l'équipementier puisqu'elle requiert l'ouverture du rotor (désassemblage des différents disques) afin de vérifier visuellement l'absence de contaminants.

Si l'on s'intéresse maintenant à la conception des équipements industriels en vue d'une moindre contamination, certaines normes regroupent des recommandations portant à la fois sur les matériaux utilisés et leur géométrie, dont la Directive 2006/42/EC au niveau européen (12) ou le guide de l'EHEDG (European Hygienic Engineering and Design Group) (13). Des documents décrivent les différents paramètres à prendre en compte afin de disposer d'un équipement répondant aux normes de sécurité. Les principes de ces recommandations sont définis ci-dessous :

- Les surfaces de l'équipement doivent être conçues de manière à éviter l'accumulation de souillures, bactéries notamment par la présence de surfaces lisses et facilement nettoyables.
- Les joints doivent être conçus pour éviter l'accumulation de produits entre ces derniers et doivent être résistants aux agressions mécaniques, thermiques et chimiques
- Les équipements ne doivent pas présenter de zones mortes, c'est-à-dire de zones de non circulation des fluides.

Les rotors actuels de CPC étant constitués de la superposition de disques et de joints représentent donc un risque supplémentaire d'encrassement du rotor. De plus, pour la stérilisation, les méthodes utilisées sont en général l'utilisation de la vapeur à haute température ainsi que de la vapeur sèche (14). L'avantage de cette technique de nettoyage est qu'elle est non-toxique et respecte l'environnement. De plus le temps de cycle est rapide (env 1 h). L'utilisation d'une telle technique doit donc être compatible avec l'instrument de travail. Dans le cas des rotors de CPC actuels, les joints en Téflon® sont soumis au risque de déformation sous hautes températures entraînant donc la détérioration de l'instrument.

L'utilisation du titane en tant que matériau présente un avantage majeur car il est résistant aux hautes températures ainsi qu'aux pHs acides et basiques (15). De ce fait, le rotor monobloc tridimensionnel développé au cours de cette thèse semble être un instrument adéquat répondant aux différentes spécificités requises dans le cadre de l'hygiène des instruments industriels.

L'inconvénient de systèmes de production entièrement clos comme les rotors monoblocs proposés ici est qu'il est impossible de vérifier le bon déroulement du nettoyage et de déterminer l'état d'encrassement de l'instrument. La méthode d'écouvillonnage, méthode utilisée dans les industries pharmaceutiques pour s'assurer du nettoyage complet du système de production avant le passage à un autre lot de production (9), n'est pas possible dans un système hermétiquement fermé. De ce fait disposer d'une méthode de détection in-situ de la contamination peut être une solution à cette limite.

Au cours de ce chapitre, nous proposons un travail préliminaire portant sur le développement d'une méthode pour permettre de qualifier de manière in-situ la présence ou non de contaminant dans le cadre de la purification des protéines.

La méthode développée est dérivée d'une technique existante utilisée pour déterminer la présence d'amine greffée sur support solide (16). Cette méthode nommée ADECA est basée sur l'affinité d'une sonde colorée, le bleu de Coomassie (CBB) (figure 6.1), avec les groupes amines.

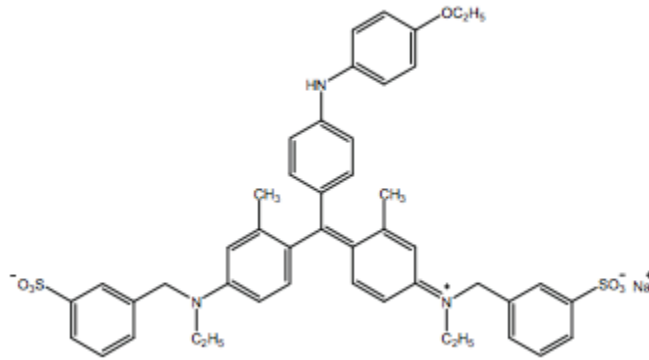


Figure 6.1 : Structure moléculaire du CBB G-250 (17)

Nous souhaitons ici la mettre en œuvre pour détecter la présence de groupements amine présents à la surface des protéines contaminantes. La méthode ADECA se compose de trois étapes (figure 6.2). La première étape correspond à la fixation de la sonde CBB aux groupes amino des protéines éventuellement présentes dans le rotor. Cette fixation a lieu par interaction entre les groupements sulfonique du bleu de coomassie (structure fig 6.1) et les amines protonées éventuellement présentes. Cette interaction est favorisée à pH acide. Lors de la deuxième étape, l'excès de colorant ainsi que les interactions non spécifiques du colorant sur la surface du rotor sont éliminés par une solution à pH acide. Enfin la sonde liée spécifiquement aux protéines est éluée par modification du pH en passant d'un pH acide à pH basique, ce qui a pour effet de neutraliser le groupement amine et de rompre l'interaction. La quantité de colorant éluée au cours de cette dernière étape sera ainsi reliée directement à la quantité d'amines et donc de protéines présentes dans le rotor CPC.

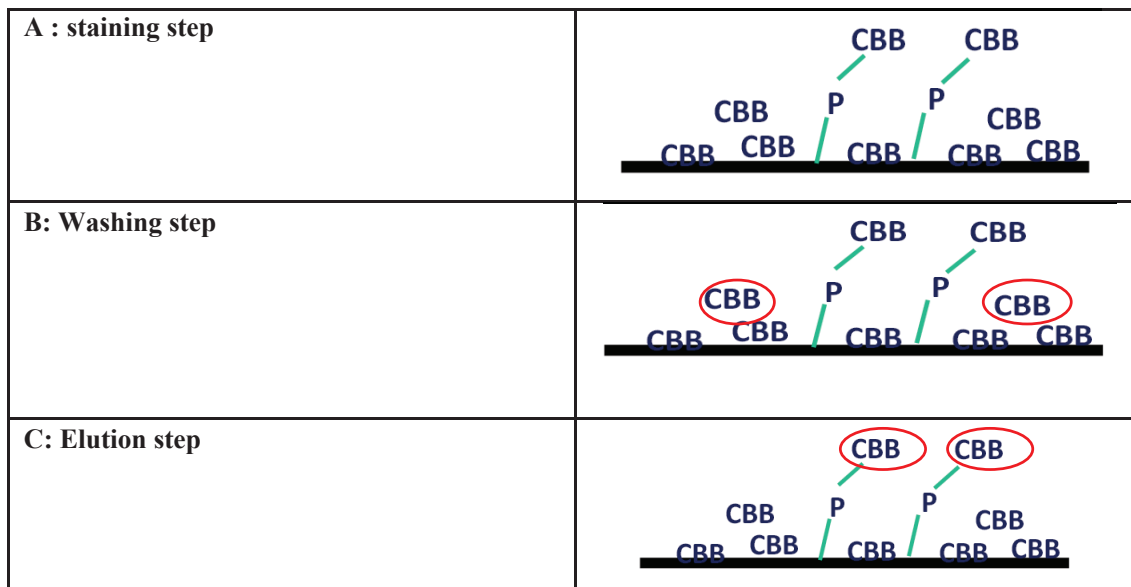


Figure 6.2 : Illustration schématique du protocole ADECA. P : protéine, CBB : bleu de coomassie. La méthode est divisée en trois étapes. Étape A: coloration du groupe N + protoné des protéines avec CBB; Étape B: lavage de l'excès de CBB avec maintien d'interactions spécifiques N + -CBB; Étape C: élution de CBB spécifiquement liée au groupe protoné.

2. Résultats et discussion

Comme évoqué précédemment, le risque de contamination est fonction du matériau de la surface en contact avec les protéines. Ce travail a donc été effectué sur un rotor en acier inoxydable composé de joints Téflon® et sur un rotor en monobloc en titane. Dans un premier temps, nous avons volontairement contaminé les rotors avec de l'albumine bovine (BSA) puis nous avons cherché à déterminer grâce à ce test ADECA l'étendue de la contamination ainsi que la linéarité de notre test. Les résultats sont présentés sous formes de publication pour deux rotors à disques, l'un de 25 mL (rotor qui a fait l'objet de l'étude du chapitre 3 de cette thèse) et l'autre de 80 ml présentant des disques plus épais et par conséquent des cellules de volumes plus importants. Les résultats supplémentaires concernant le rotor obtenu par impression 3D sur titane seront commentés par la suite.

2.1. Calibration du détecteur

Afin de connaître l'étendue de la contamination des protéines, il a été nécessaire de calibrer le détecteur du Spotprep II en fonction de la protéine utilisée. Pour cela une quantité croissante de BSA est injectée uniquement dans la partie périphérique avec un volume fixé de 1,08 mL. Chaque injection a été réalisée trois fois. Les limites de détection et de quantification du détecteur ont également pu être déterminées. La courbe de calibration est ainsi présentée par la figure 6.3

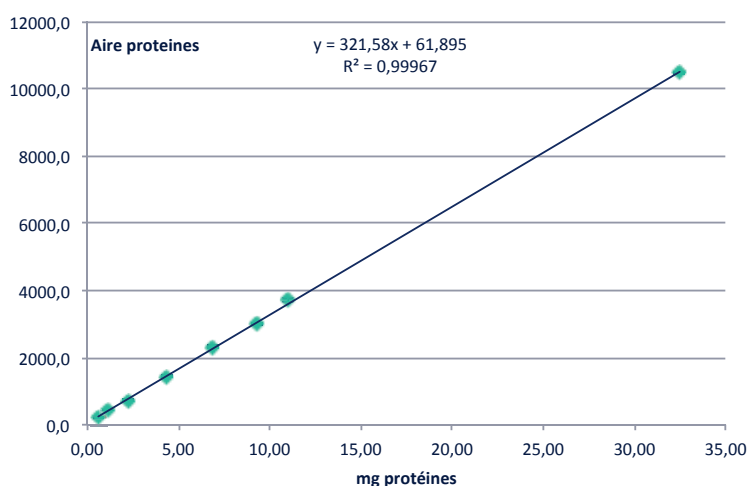


Figure 6.3 : Droite de calibration du détecteur exprimant la quantité de protéines injectée en fonction de l'aire sous le pic. Longueur d'onde 280 nm. Détecteur Spotprep II (Volume cellule de détection= 55 μ L),

Afin de déterminer les limites de détection et de quantification du détecteur les équations 6.1 et 6.2 ont été utilisées. La limite de détection a été déterminée à 0,3 mg de protéines et la limite quantification a été calculée à 0,9 mg de protéines.

$$LOD = \frac{3 \times \sqrt{\frac{\sum(y-y_{exp})^2}{n-2}}}{a} \quad \text{Equation 6.1}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sqrt{\frac{\sum(y-y_{exp})^2}{n-2}}}{a} \quad \text{Equation 6.2}$$

2.2. Développement de la méthode ADECA au sein des rotors CPC

L'étude de la mise en œuvre de la méthode de détection de la contamination est présentée sous forme d'une publication. Cette dernière illustre uniquement les résultats obtenus sur les rotors en acier de 25 mL et de 80 mL.



In-situ protein determination to monitor contamination in a centrifugal partition chromatograph



Feriel Bouiche ^{a, b}, Karine Faure ^{a, *}

^a Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Ens Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

^b Kromaton Sarl, Groupe Roussellet-Robatel, 45 Avenue Rhin et Danube, 07100 Annonay, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 November 2016

Received in revised form

20 February 2017

Accepted 22 February 2017

Available online 24 February 2017

Keywords:

Centrifugal partition chromatography

Countercurrent chromatography

Proteins contamination

Coomassie brilliant blue

Bovine serum albumin

ABSTRACT

Centrifugal partition chromatography (CPC) works with biphasic liquid systems including aqueous two-phase systems. Metallic rotors are able to retain an aqueous stationary phase able to purify proteins. But the adhesion of proteins to solid surface may pose a cross-contamination risk during downstream processes. So it is of utmost importance to ensure the cleanliness of the equipment and detect possible protein contamination in a timely manner. Thereby, a direct method that allows the determination of the effective presence of proteins and the extent of contamination in the metallic CPC rotors was developed. This in-situ method is derived from the Amino Density Estimation by Colorimetric Assay (ADECA) which is based on the affinity of a dye, Coomassie Brilliant Blue (CBB), with protonated N⁺ groups of the proteins. In this paper, the ADECA method was developed dynamically, on a 25 mL stainless-steel rotor with various extents of protein contaminations using bovine serum albumin (BSA) as a fouling model. The eluted CBB dye was quantified and found to respond linearly to BSA contamination up to 70 mg injected. Limits of detection and quantification were recorded as 0.9 mg and 3.1 mg, respectively. While the non-specific interactions between the dye and the rotor cannot currently be neglected, this method allows for in situ determination of proteins contamination and should contribute to the development of CPC as a separation tool in protein purification processes.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Centrifugal liquid-liquid chromatography, including countercurrent chromatography (CCC) and centrifugal partition chromatography (CPC), is a chromatographic separation technique based on the partition of solutes between two immiscible liquid phases with no solid support [1–3]. One of the two immiscible phases is retained in the column by centrifugal force fields; it is called the stationary phase. The other phase is the mobile phase; it percolates through the stationary one. CCC and CPC have numerous advantages such as a high loading capacity and no loss of solute since it is always possible to recover any material trapped in a liquid phase.

These advantages were used over the past years to purify biomolecules, especially proteins, by CCC and CPC modes [4,5]. Aqueous Two Phase Systems (ATPS) were found very efficient for protein purification [6,7]. As their name says, ATPSs are composed by two immiscible aqueous phases. This is obtained either dissolving two polymers in water or dissolving a polymer and a salt or an ionic liquid and a salt. ATPSs combine a high biocompatibility and selectivity for biomolecules [8]. These solvent systems were proved effective in biopurification due to their high water content and low interfacial tension, which make them gentle towards proteins [9,10]. However, CCC was found unable to retain efficiently an aqueous liquid stationary phase likely due to the low ATPS interfacial tension [3]. CPC, with its constant centrifugal field and its rotor of interconnected chambers was able to retain ATPSs allowing for protein purification [1–3].

One of the issues when working with proteins is the risk of contamination of the CPC equipment. Indeed proteins can easily adsorb on the rotor material. Adhesion of proteins to solid surface can occur under various conditions and cause problems for biotechnology manufacturers. For example, in case of food

Abbreviations: CPC, Centrifugal partition Chromatography; BSA, Bovin Serum Albumin; ADECA, Amino Density Estimation by Colorimetric assay; PBS, Phosphate Buffer Salin; CBB, Coomassie Brilliant Blue; FDA, Food Drug Administration; pI, Isoelectric point.

* Corresponding author. Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Ens Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France.

E-mail address: karine.faure@isa-lyon.fr (K. Faure).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2017.02.015>

0003-2697/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

manufacturing, proteins can form a fouling which is an unwanted deposit on the equipment surface [11]. Thereby, an insufficient cleaning may result in the development of bacteria and biofilm formation [12]. Moreover, the adherent proteins may pose a cross-contamination risk [13]. For these safety reasons, the cross-contamination risks are strictly controlled through governmental organizations, such as the U.S Food and Drugs Administration (FDA). These Agency documents clearly establish the required expectation for cleaning procedure validation [14]. CPC is no exception. So, one of the most important issues for its development in the protein industry is to ensure the cleanliness of the equipment after a purification in order to avoid cross-contamination and hence to be able to detect protein contamination.

A cleaning method was specifically developed by Chollet [15] for CPC rotors. This method consists in alternate rinsing steps of water, 0.5M sodium hydroxide solution and sulfuric acid solution at 2.10^{-5} M, repeated twice. While it follows the FDA standards and the Good Manufacturing Practice (GMP), this method is only available in French. The validity of the cleaning procedure is controlled either by visual criterion opening the rotor and swiping the disks surface, or by the protein determination in the various rinse solutions via the Bradford method [16]. Unfortunately, the ultimate rinsing solutions are highly diluted, and their analysis requires a highly sensitive detection system. Although the validation of the cleaning protocol by swiping is soundproof, it is only accessible to instrument suppliers, as it requires the mechanical opening of the rotor. The industrial users do not have the facilities to tighten disks and to equilibrate weights after closure of this rotating device.

In the present work we propose an in-situ strategy to determine the state of protein contamination inside the rotor without opening the machine. This in-situ method derived from the Amino Density Estimation by Colorimetric Assay (ADECA) method [17]. This method was established to rapidly quantify grafted proteins on a solid support such as 96-well plates. It is based on the affinity of a dye, the Coomassie Brilliant Blue (CBB), with protonated amino groups. The ADECA method consists in three steps: first a fixation step (or staining) ensures that the dye is bound to the surface material by an N^+ -dye complex formation. Next a washing step removes any unbound dye. Last, the dye bounded to proteins is eluted by a pH switch which breaks the N^+ -dye complex and the quantification of grafted protonated groups is directly related to the amount of released CBB dye. Thereby, this method should accurately indicate if any traces of proteins remain in a rotor after a full cleaning. The CBB dye would stick to such traces and any blue color seen during the acid wash would point remaining proteins. To set up this method in CPC instruments, we applied the ADECA protocol to a commercial 25 mL stainless steel rotor and the optimal conditions were determined. A graduated range of protein contamination was simulated using bovine serum albumin.

2. Experimental

2.1. Materials

The dye Coomassie Brilliant Blue CBB-G250 (CBB, >99%, $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$, MW = 854 g/mol, a triphenylmethane dye with two benzene-sulfonic acid and three amine groups), potassium carbonate (>99.5%; MW = 138.2 g/mol), potassium bicarbonate (>99.5%; MW = 100.12 g/mol) and phosphate buffer saline (PBS) as well as the protein bovine serum albumin (BSA 96%, MW = 66463, pI = 4.7) were from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ethanol absolute was from ThermoFisher (Villebon-sur-Yvette, France).

The pH measurements are performed in the overall hydro-organic solution. The effective hydrogen activity in aqueous/

organic solutions can be only estimated using water calibrated pHmeter and will be stated as “apparent pH”.

2.2. Instrumentation

The CPC instrument is a hydrostatic apparatus model, FCPC-A from Kromaton Rousselet-Robatel (Annonay, France) with interchangeable rotors. A stainless steel 316 rotor with a volume of 25 mL was mainly used in this study. For comparative assays, two prototype rotors were assessed: a stainless steel 316 rotor with a volume of 80 mL and a titanium rotor with a volume of 46 mL. The internal surface was calculated thanks to the cell and channel dimensions provided by the manufacturer and was evaluated at 0.38 m² for the 25 mL rotor, 0.61 m² for the 80 mL rotor and 0.31 m² for the 46 mL titanium rotor.

A Spot Prep II integrated system from Armen Instruments (Saint-Avé, France, Gilson USA) was used. This equipment is the assembly of a quaternary pump, an automatic loop injection valve fitted with a 1 mL sample loop, a UV/Vis spectrophotometer dual wavelength set up at 259 nm and 280 nm and a fraction collector.

2.3. Rotor cleaning procedure

After protein impregnation and/or ADECA implementation, the used rotors were fully cleaned according to Common Industrial Protocol, i.e. alkaline solution pH 14, for the equivalent of 3 column volumes.

2.4. Preparation of solutions

Solutions for the staining step were prepared by dissolving 500 mg of CBB in 100 mL of ethanol and 50 mL of glacial acetic acid (CH_3COOH) and stirred. After complete dissolution, deionized water was added up to a final volume of 1 L. The final composition of the staining solution was 0.05% (w/v) CBB, 10% ethanol, 5% CH_3COOH and 85% H_2O (v/v). The apparent pH is 2.4.

The composition of the washing solution was the same as that of the staining solution, i.e. 10% ethanol, 5% CH_3COOH and 85% H_2O (v/v) but with no CBB. For pH studies in the range 2.4–12, acetic acid or potassium carbonate was added until the desired target pH was reached.

The composition of the elution solution was 50% (v/v) EtOH and 50% carbonate buffer pH 12.

2.5. Extent of proteins contamination in various rotors

Five BSA proteins standard solutions were prepared in the range of 0 mg/mL to 200 mg/mL in phosphate buffer saline (PBS) pH = 7.4 or in carbonate buffer pH = 9 and pH = 12. The simulated contaminations were performed on a clean rotor by injecting 1 mL of protein solution in the rotor using the chromatographic system then rinsing by the buffer solution. It was previously checked that no significant adsorption happens in PEEK tubings and in the injection device. Blanks were performed by injecting phosphate buffer without protein.

2.6. Implementation of a dynamic ADECA method in a CPC rotor

The ADECA method developed to quantify the amount of grafted proteins on a surface contains three different steps. To transfer this static method performed in 96-well plates to a dynamic method in CPC rotor, the three ADECA steps were adapted as follows: **A-The staining step** was carried out pumping the staining solution at 10 mL/min during 15 min; i.e. a volume of 150 mL staining solution; **B-The washing step** was achieved with a flow rate of 10 mL/min

during 18 min unless stated otherwise. **C-The elution step** was realized by pumping the elution solution at 10 mL/min during 15 min through the rotor.

During all these different steps the rotor was not set in rotation and detection was performed at 259 nm which corresponds to the maximum of the dye absorbance in the UV region.

2.7. Detector calibration

To relate the CBB peak area to the amount of proteins to which CBB molecules were bound, a calibration of the UV detector is necessary. First of all the detector was calibrated with different proteins solutions with an increasing concentration of CBB in the range 0.6–200 mg/mL injecting 1 mL each time. Then it was calibrated by the CBB solution in the range 0.1–13.5 mg/mL in the acidic blue form (pH 2.4, 10% ethanol/5% acetic acid) and in the range 0.1–25 mg/mL in its basic redish form (pH 12, carbonate/ethanol (50/50 v/v) in order to determine the linearity range of the detector for these solutions. Each injection was repeated three times.

3. Results and discussions

3.1. Extent of proteins contamination

Protein adsorption occurs when a protein solution comes in contact with a solid surface [18]. Centrifugal partition chromatography is a preparative downstream process, handling very concentrated protein solutions (g/L to hundredth of g/L range). During method developments, rotor contaminations by proteins were noted by users. To check these observations, a 25 mL commercially available rotor made of stainless steel was intentionally stained by proteins at different pHs. The surface contamination can be linked to solid surface properties, solution conditions and proteins properties [19]. Stainless steel surfaces are known to form an oxide layer covered by hydroxyl groups whose charge may strongly affects adsorption properties. According to the literature [20], the stainless steel surface has positive charge above pH 8.5 and is neutral above this value. In order to study the pH effect of the surface nature on the extent of protein contamination, different amounts of BSA were introduced at different pHs from 7.4 (physiological pH) to 12. Fig. 1 shows the quantity of residual proteins (ADECA method) inside the 25 mL stainless steel rotor in regards to the quantity of injected proteins at different pH values.

The residual protein quantity was determined by subtracting the amount of proteins eluting from the rotor after washing with one column volume. The contamination is linearly related to the amount of injected proteins (Fig. 1). Surprisingly, saturation of the surface is not attained with the BSA protein reaching density values as high as 100 mg BSA/m², while for the same 316 stainless steel it was said that saturation occurred around 3 mg BSA/m² stainless steel [20]. What is more surprising is that the adsorption lines have a slope around 0.19 that does not depend on pH (Fig. 1). The BSA isoelectric point being 4.7, the protein is overall negatively charged for all experiments. At pH 7.4, the stainless steel surface is positively charged and BSA would be supposed to adsorb through charge-charge interactions through carboxyl groups. However, at pH 9 and 12, the stainless steel surface has a zero charge density, thus proteins contamination should be lesser. Since no difference was observed, it confirms that the binding between stainless steel and proteins is not only controlled by the stainless steel surface charge but also through dipole-dipole interactions, hydrogen bonding and coordination bonding.

All these results show that contamination of CPC rotors with BSA is indeed happening. Therefore a method to detect proteins

contamination should be welcome by users. For further study, the BSA staining was done at pH 7.4 which corresponds to the physiological pH.

3.2. ADECA based on the N⁺-dye interaction

The three steps of the ADECA method have to be optimized to ensure a reproducible protocol. The staining solution should maximize the CBB-protein interaction. The dye CBB exists under three different forms: cationic form at pH below 3, neutral form at pH between 3 and 12 and anionic form at pH above 12 [21,22]. In order to allow the N⁺-CBB interaction, the protein net charge should be positive and the CBB sulfonic acid groups should be negatively charged. The first condition is better fulfilled for pH below 4.7 (BSA isoelectric point). In order to quantitatively relate the amount of CBB to the amount of proteins, the pH condition was selected so that only one site NH⁺ is bounded to the CBB molecule. This is possible at pH below 3, so staining was achieved at pH 2.4 [17]. Besides, for staining to be complete, the dye was injected in excess and solubilized in 10% ethanol.

The washing step must remove the dye located in the void volume and also the background staining due to nonspecific binding on native rotor material. The free dye must be highly soluble in the washing solution that should not disrupt the N⁺-CBB interactions on rotor material. In order to maintain N⁺-CBB interactions, the pH of the washing solution should be the same as that of the staining step, i.e. pH 2.4.

The elution step must dissociate quantitatively the N⁺-CBB interactions. To allow this dissociation, the charge of the CBB or of the proteins has to be modified. At pH 12.4, both BSA and CBB become negatively charged, which generates ionic repulsion. However the pink basic CBB form is less soluble than the blue form [23]. Thereby to avoid any CBB precipitation, the ethanol percentage was increased. According to Coussot [17] the maximum usable percentage of ethanol is 50% because the dye can also precipitate above this value.

4. Application of a dynamic ADECA method in a stainless steel CPC rotor

In order to simulate a protein contamination in a CPC rotor, an injection of 300 mg of BSA at pH 7.4 was performed in a commercial 25 mL stainless steel rotor and a subsequent ADECA protocol was performed to quantify the BSA staining. Fig. 2 represents the UV detection signal at 259 nm that was recorded during the experiment. After the protein injection, a one-column volume of

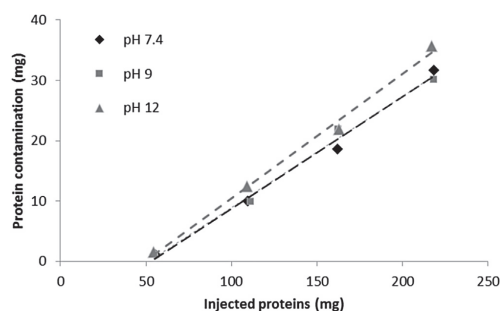


Fig. 1. Relationship between the quantity of proteins injected in the stainless steel rotor and the remaining proteins after a one-column buffer rinse at various pHs.

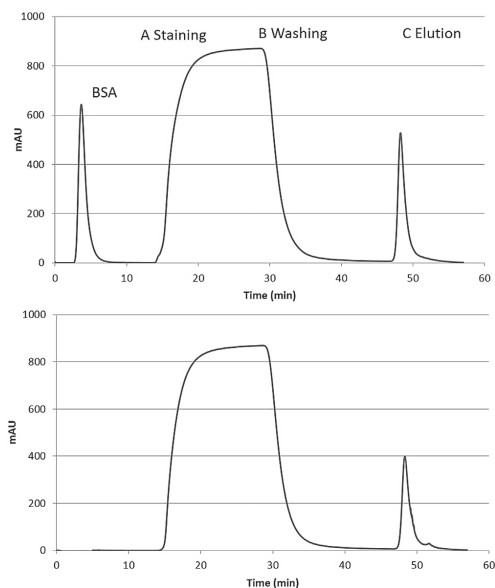


Fig. 2. UV signal of the different ADECA steps on a 25 mL stainless steel rotor, (top) contaminated with BSA protein and (bottom) the 25 mL clean rotor with no protein contamination (top) at 0 min, injection of 300 mg BSA pH 7.4 and one-column volume rinse by phosphate buffer saline solution pH 7.4; (both) A-between 15 and 30 min, staining step with 0.05% CBB, 10% ethanol, pH 2.4; B-between 30 and 45 min, washing step with 10% ethanol pH 2.4; C- at 45 min, CBB elution step 50% ethanol pH 12. Every dynamic step is performed at 10 mL/min 0 rpm. Detection 259 nm.

phosphate buffer saline is introduced at 10 mL/min, removing the non-adsorbed proteins. This elution out of the rotor produces a UV signal as a Gaussian peak, the shape being due to the Poiseuil dispersion through the column. As the detector was calibrated with known amounts of proteins in the same operating conditions, the eluting BSA can be quantitated and it can be deduced by subtraction that, after this phosphate buffer rinse step, a 67 mg amount of BSA or 22% of the 300 mg injected remains adsorbed in the rotor. In order to in-situ quantitate the extent of contamination, the dynamic ADECA method is implemented. The staining step corresponds to the introduction of the CBB dye in the 25 mL rotor at a concentration of 500 mg/L. A fixed volume of 150 mL (15 min elution at 10 mL/min) of staining solution allowed the saturation of the interacting sites. The excess dye that does not interact with N⁺ elutes out of the rotor, which is translated to an increase of the UV signal at 259 nm (part A in Fig. 2). The staining step was optimized both in terms of thermodynamic aspects (concentration of the dye and its overall quantity) and on the kinetic aspects (contact time, flow rate of introduction). The flow rate had no effect on the quantity of bounded CBB.

The washing step must remove any CBB molecule that is not bound to BSA, without breaking the N⁺-dye interaction. As the rotor is filled with the staining solution containing CBB dye, introducing a solution without any absorbing molecule results in a decrease of UV signal (part B in Fig. 2). The baseline return ensures that all unbound dye has been washed off. This extensive washing corresponds to 10 times the volume of the rotor.

Finally the elution step is performed by the introduction of a pH 12 organic-carbonate solution which breaks the interaction

between CBB and N⁺. The CBB release is almost instantaneous as pH changes. This result in a CBB peak that moves at the elution solution velocity (part C in Fig. 2). The peak area is related to the amount of released CBB, hence to the amount of stainless steel bound BSA.

In order to check if the peak signal from step C is not due to some protein release after the basic pH switch, a blank experiment was performed injecting 100 mg of proteins in the 25 mL stainless steel rotor followed by the ADECA protocol without any CBB dye. Since no UV absorption was observed in the elution step, it means that, to the extent of our detection level, no protein was released at that stage and hence the quantification of peak C relates only to CBB eluting molecules.

The ADECA method was also implemented in a clean rotor, that is to say, in a rotor onto which no protein was injected and after an extensive CIP cleaning procedure. The results are shown in Fig. 2b. During the elution step C, a peak is present, suggesting the presence of either CBB fouling in dead volumes or non-specific interactions. In order to make sure that the retained CBB dyes are not just hold in any dead volume, the operating parameters of CPC rotor, i.e. flow rate and rotation speed, were studied to evaluate their impact on the non-specific peak present in the step C. Indeed, in CPC rotor, the flow path is governed by hydrodynamic [24,25]. Thereby to create a powerful mobile phase spray that can extensively reach any part of the cell chamber, the rotation speed was set at 1800 rpm and the flow rate up to 35 mL/min during washing step. This did not affect the presence of the released CBB peak on blank experiments. Hence, the main cause of the background staining is due to the nonspecific CBB binding with native materials. Indeed, the staining step taking place at pH 2.4, the stainless steel rotor has a positive charge at its outer layer surface while the CBB is negatively charged. Thereby, ionic interactions are generated between the rotor surface and the CBB during staining step (step A) and maintained during washing step (step B, same pH 2.4). The basic switch in elution step (step C, pH 12) releases CBB by changing the material charge density, explaining the presence of an elution peak in a clean rotor.

The non-specific interaction between CBB and the stainless steel surface can be strongly reduced by controlling the charge density of the surface (Fig. 3A). When the washing step was performed at pH 2.4, 10% ethanol, the dye density due to non-specific interactions is estimated to be 9.0 ± 0.4 mg/m². Introducing washing solutions with higher pHs does not significantly improve the situation, till the pH reaches the value of 8.6. At this value, the stainless steel hydroxide layer becomes neutral and hence the interaction with the anionic CBB becomes weaker. The density of CBB was measured to be only 1.2 ± 0.3 mg/m². A further increase of pH up to 12 did not change the extent of non-specific interactions.

Because CBB is soluble in ethanol, we tried to further decrease the background staining by increasing the ethanol content in the washing solution. As shown in Fig. 3B, this had a significant effect on reducing the non-specific interactions: a washing solution with 30% ethanol and pH 8.6 lead to the complete elimination of CBB-metal interaction.

Unfortunately, when implementing the ADECA protocol with a 30% ethanol, pH 8.6 washing step on a soiled rotor, the results showed that the specific CBB-protein binding was affected and hence the quantification was no longer reliable. This was also the case with a 10% ethanol, pH 8.6 washing solution. Indeed, at pH 8.6, the BSA is negatively charged and we suspect that ionic repulsion may occur between the negative dye and the protein.

Hence the accurate determination of protein fouling in a CPC rotor has to be performed with a pH switch from 2.4 to 12 and the background staining has to be taken into account.

Linearity, repeatability, quantification and limit of detection were studied under these conditions by creating a range of controlled

stainings on the 25 mL stainless steel rotor. Five proteins standard solutions were prepared in phosphate buffer solution in the range of 0–200 mg/mL and 1 mL injected led to a fouling extent in the range 0–70 mg (Fig. 1), i.e. a protein density on the stainless steel surface in the range 0–180 mg/m². After each contamination, the ADECA protocol was conducted and the released CBB peak area was monitored (Fig. 4). The rotor was then extensively washed before the next contamination. The linearity between the quantity of residual proteins in the column and the area of released CBB molecules was verified in the studied range with $r^2 > 0.965$. The limits of detection and quantification were 0.9 mg and 3.1 mg respectively.

The same experiment was also set in a larger stainless steel rotor in order to study the influence of the available surface. A 80 mL prototype rotor from Kromaton, with cells four times larger than the commercialized 25 mL rotor, but made of the same 316 stainless steel quality, was submitted to the very same controlled contamination. The calculated internal surface is 0.61 m², to be compared to the 0.38 m² of the commercialized 25 mL rotor. Surprisingly, the limits of detection and quantification were respectively 0.9 mg and 3.1 mg, the same as those of the 25 mL rotor. It is possible that the significant background staining plays an important role in these elevated values.

4.1. Application of a dynamic ADECA method in a prototype titanium CPC rotor

Titanium is a favored material in biotechnology because it is

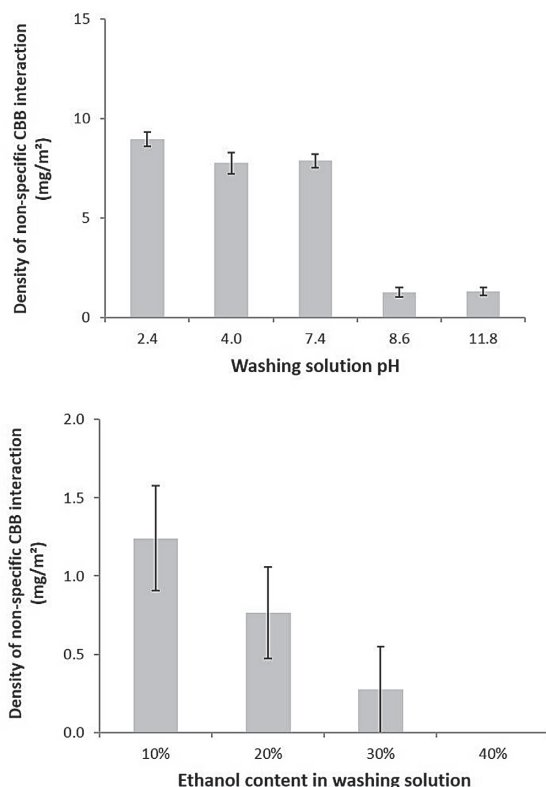


Fig. 3. Evaluation of the non-specific CBB interaction expressed as the amount of CBB released after the washing step done with (top) various pHs and 10% EtOH, (bottom) various ethanol contents at pH 8.6.

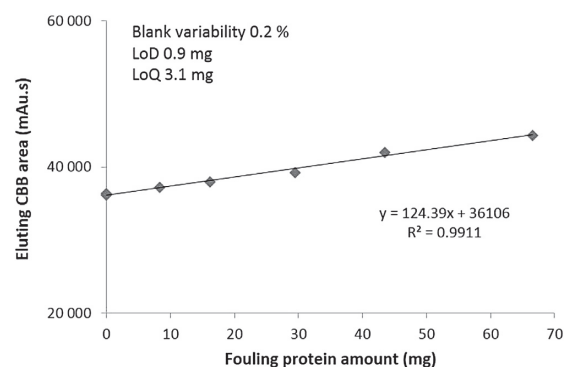


Fig. 4. Calibration curve relating the amount of proteins in the stainless steel rotor and the CBB dye area during elution step. Protocol as described in Fig. 2 caption.

known to be easily cleaned at high pHs compared to stainless steel [20]. Using a very similar BSA staining process, the possibility to implement the ADECA procedure in a 46 mL titanium prototype rotor was investigated to assess the in-situ extent of contamination. However, the preliminary results showed that the titanium rotor was unexpectedly prone to protein adsorption. Titanium exhibits an isoelectric point of 4.5. The existence of this electric point suggests that the surface could be positively charged below pH 4.5 and negatively charged above pH 4.5 ($-\text{Ti}_2\text{O}^-$). Ionic interactions between titanium surface charges and protonated amino groups on amino acid residues have already been observed [19]. Working at pH 7.4, the net BSA charge is weakly negative, so a large number of amino sites are available for interactions. Fouling is close to linear in regards to the injected amounts and the slope is similar to the one observed for contamination on stainless steel. Nonetheless, when calculating the fouling density, the values were out of range and saturation was reached at 160 mg/m², which value does not match at all the reported value of 4 mg/m² [20]. Hence we suspect that the manufacturing process for rotor engraving that differs from stainless steel, generates a rough surface and/or a high specific area, as confirmed by a noted ruggedness of the rotor titanium surface. The calculated 0.31 m² surface of the 46 mL rotor is likely largely underestimated, while the effective internal surface of this titanium rotor is unfortunately not accessible.

The ADECA profiles for cleaned and contaminated titanium rotor were highly similar as the ones observed on stainless steel (Fig. 2) and are not reproduced here. However, the non-specific interactions of CBB molecules on titanium surface were found much higher than on stainless steel with a much less accurate quantification.

5. Conclusion

A method has been developed for the in-situ determination of protein fouling inside metallic CPC rotors, based on the interaction between proteins and Coomassie Brilliant Blue dye as initially introduced as the ADECA method. This method is linear for stainless steel rotor up to a 70 mg BSA fouling concentration. Its limit of detection is around 1 mg. This makes the method suitable for contamination warning at a preparative scale. However, a significant CBB interaction with metal surface was noted, so other protein dyes should be investigated in regards of non-specific interactions with metals. The method showed that there was a significant background staining of CPC rotors. This needs to be drastically reduced for this CPC purification method to be suitable in an industrial validation environment.

Acknowledgements

KF and FB wish to deeply thank Prof. Alain Berthod for linguistic improvement of this manuscript and his continuous support.

References

- [1] W.D. Conway, *Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory, and Applications*, VCH, 1990.
- [2] Y. Ito, W.D. Conway, *High-speed Countercurrent Chromatography*, 1986.
- [3] Berthod Alain, *Countercurrent Chromatography: the Support-free Liquid Stationary*, 2002.
- [4] Z. Xu, X. Lin, Y. Lu, Separation of peptides and proteins by countercurrent chromatography, *Curr. Proteom.* 10 (4) (2013) 322–333.
- [5] N. Mekaoui, K. Faure, A. Berthod, Advances in countercurrent chromatography for protein separations, *Bioanalysis* 4 (7) (2012) 833–844.
- [6] R. Hatti-Kaul, Aqueous two-phase systems. A general overview, *Mol. Biotechnol.* 19 (3) (2001) 269–277.
- [7] S. Raja, V.R. Murty, V. Thivaharan, V. Rajasekar, V. Ramesh, Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review, *Sci. Technol.* 1 (1) (2011) 7–16.
- [8] P. Rosa, A. Azevedo, S. Sommerfeld, W. Bäcker, M. Aires-Barros, Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability, *Biotechnol. Adv.* 29 (6) (2011) 559–567.
- [9] Madeira L. Grudzień Ł., D. Fisher, J. Ma, I. Garrard, Phase system selection with fractional factorial design for purification of recombinant cyanovirin-N from a hydroponic culture medium using centrifugal partition chromatography, *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 57–68.
- [10] S.A. Oelmeier, C.L. Effio, J. Hubbuch, High throughput screening based selection of phases for aqueous two-phase system-centrifugal partitioning chromatography of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. A* 1252 (2012) 104–114.
- [11] E. Wallhäuser, M. Hussein, T. Becker, Detection methods of fouling in heat exchangers in the food industry, *Food Control* 27 (1) (2012) 1–10.
- [12] N.M. Dat, D. Hamanaka, F. Tanaka, T. Uchino, Surface conditioning of stainless steel coupons with skim milk solutions at different pH values and its effect on bacterial adherence, *Food Control* 21 (12, Supplement) (2010) 1769–1773.
- [13] T. Sakiyama, K. Sato, S. Tsuda, H. Sugiyama, T. Hagiwara, Citric acid pre-treatment for suppressing adhesion of major egg allergens to a stainless steel surface, *Food Control* 32 (2) (2013) 702–706.
- [14] FDA, *Guide to Inspections of Validation of Cleaning Processes*, 1993.
- [15] S. Chollet, Rationalisation des critères de dimensionnement d'une colonne de chromatographie de partage centrifuge, 2013.
- [16] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1–2) (1976) 248–254.
- [17] G. Coussot, C. Perrin, T. Moreau, M. Dobrijevic, A. Le Postollec, O. Vandenebeele-Trambouze, A rapid and reversible colorimetric assay for the characterization of aminated solid surfaces, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (3) (2011) 1061–1069.
- [18] H. Urano, S. Fukuzaki, Kinetic study of desorption of two species of bovine serum albumin from alumina during alkali elution process, *J. Colloid Interface Sci.* 252 (2) (2002) 284–289.
- [19] R.A. Brizzolara, Adsorption of alginate acid to titanium investigated using x-ray photoelectron spectroscopy and atomic force microscopy, *Surf. Interface Analysis* 33 (4) (2002) 351–360.
- [20] K. Takahashi, S. Fukuzaki, Cleanability of titanium and stainless steel particles in relation to surface charge aspects, *Biocontrol Sci.* 13 (1) (2008) 9–16.
- [21] C.D. Georgiou, K. Grintzalis, G. Zervoudakis, I. Papapostolou, Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (1) (2008) 391–403.
- [22] H. Chial, A. Splittgerber, A comparison of the binding of Coomassie Brilliant Blue to proteins at low and neutral pH, *Anal. Biochem.* 213 (2) (1993) 362–369.
- [23] H. Chial, H. Thompson, A. Splittgerber, A spectral study of the charge forms of Coomassie blue G, *Anal. Biochem.* 209 (2) (1993) 258–266.
- [24] C. Schwienheer, J. Merz, G. Schembecker, Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments, *J. Chromatogr. A* 1390 (2015) 39–49.
- [25] L. Marchal, J. Legrand, A. Foucault, Mass transport and flow regimes in centrifugal partition chromatography, *AIChE J.* 48 (8) (2002) 1692–1704.

2.3. Application de la méthode ADECA sur un rotor monobloc en titane

La même stratégie de développement a été appliquée sur le rotor 3D-titane. Pour évaluer le degré de contamination possible, une quantité croissante de BSA allant de 50 mg à 100 mg a été injectée. Différentes phases mobiles à des pH différents ont été utilisées comme milieu de contamination. La phase initiale était une solution saline de tampon phosphate à pH 7,4 pour être dans les conditions physiologiques qui sont majoritairement utilisées dans le cadre des purifications de protéines, puis le pH a été augmenté par ajout de soude, à pH 9 et pH 12.

Grâce à la calibration du détecteur qui a été réalisée au préalable, il est possible de quantifier la quantité de protéines sortant du rotor et la quantité de protéines restante dans le rotor a donc pu être déterminée par différence. Les résultats de contamination volontaire à la BSA du rotor titane sont présentés dans la figure 6.4.

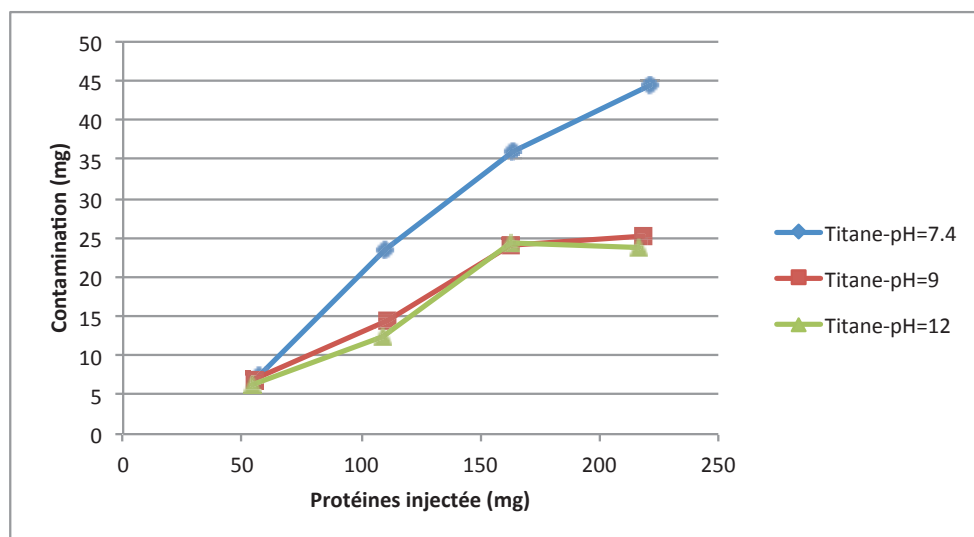


Figure 6.4: Profil de contamination du rotor monobloc en titane

D'après les résultats de la figure 6.4, on constate que la contamination du rotor en titane par l'injection des protéines existe bien après l'injection au minimum de 50 mg de protéines. Plus la quantité injectée augmente plus la contamination augmente en conséquence.

De plus, on constate qu'il existe un effet pH contrairement à ce qu'il avait été observé pour le rotor en acier inoxydable (Cf. publication). En effet la contamination est maximale à pH 7,4 correspondant au pH physiologique avec une contamination variant de 5 mg à 45 mg. Cette valeur de pH est proche du pI de la BSA qui est de 5,4. Or il a été montré qu'il existait un maximum d'adsorption de la BSA sur tout type de surface pour un environnement proche de son pI (12). En effet, par contraction de la molécule, la répulsion électrostatique est réduite, ce qui entraîne un maximum d'adsorption (14).

En revanche pour les pHs plus élevés, la contamination est moindre et la saturation de la surface du rotor a été atteinte. Cette saturation correspond à un taux de 160 mg BSA /m². Dans les trois valeurs de pH étudiées, nous nous trouvons au-dessus du pI du titane dont la valeur est de 4,5. Le titane est donc chargé négativement tout au long de l'étude. Nous sommes également au-dessus du point isoélectrique de la protéine BSA qui se trouve donc dans un état de charge légèrement négative. De ce fait il y a des interactions répulsives entre la BSA et le titane ce qui explique des valeurs de contamination plus faibles.

Si l'on compare ces valeurs à celles obtenues dans le cadre du rotor en acier inoxydable, on constate qu'en termes de densité de contamination, les protéines s'adsorbent plus sur le titane. Cela peut s'expliquer par le fait que le titane étant de nature hydrophile, les protéines ont une plus grande propension à s'adsorber sur ce dernier. De plus la surface et la rugosité du matériau, générées par le procédé d'impression 3D peuvent jouer un rôle important dans le cas de l'adsorption des protéines (15). En effet des études ont démontré que la rugosité de surface du titane peut affecter les interactions initiales entre la protéine et la surface en modifiant les propriétés de mouillabilité du matériau (16). Il a également été démontré qu'une quantité plus élevée de protéines se liait à une surface plus rugueuse en comparaison avec une surface lisse (17).

Comme indiqué dans la publication, la mise en place d'ADECA dans le rotor de titane a été mise en difficulté par l'importance des interactions non spécifiques entre la sonde CBB et la surface titane. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le titane présentant une rugosité de surface plus importante que l'acier, le colorant peut donc plus facilement rester adsorbé sur à la surface.

Nous avons essayé de réduire les interactions non-spécifiques titane – CBB en faisant varier dans un premier temps le pH puis le pourcentage d'éthanol de la solution utilisé à l'étape B de rinçage. Comme pour le rotor en acier inoxydable, le pH de transition est égal à 8,6 (figure 6.5 A). A ce pH, la surface en titane présente une charge négative tandis que le CBB quant à lui contient deux charges négatives, de ce fait des interactions répulsives se produisent se traduisant par une forte diminution de la liaison CBB-métal. Ainsi ce pH a été choisi pour étudier l'effet du pourcentage d'éthanol. Un pourcentage variant de 10% à 50% a ensuite été appliqué lors de l'étape de rinçage (figure 6.5 B). Et il a été constaté que 50% d'éthanol permettait d'éliminer l'ensemble des interactions non spécifiques CBB-métal. Or comme démontré précédemment avec le rotor en acier inoxydable, la solution de rinçage à pH 8,6 et 50% d'éthanol entraînait la perte de l'interaction spécifique CBB-protéines.

Ainsi, il n'a pas été possible de réduire les interactions non spécifiques sans détruire les interactions spécifiques du test. La suite de l'étude va donc tenter d'utiliser le test ADECA sur rotor titane contaminé, avec des interactions non spécifiques fortement présentes et impactant le résultat.

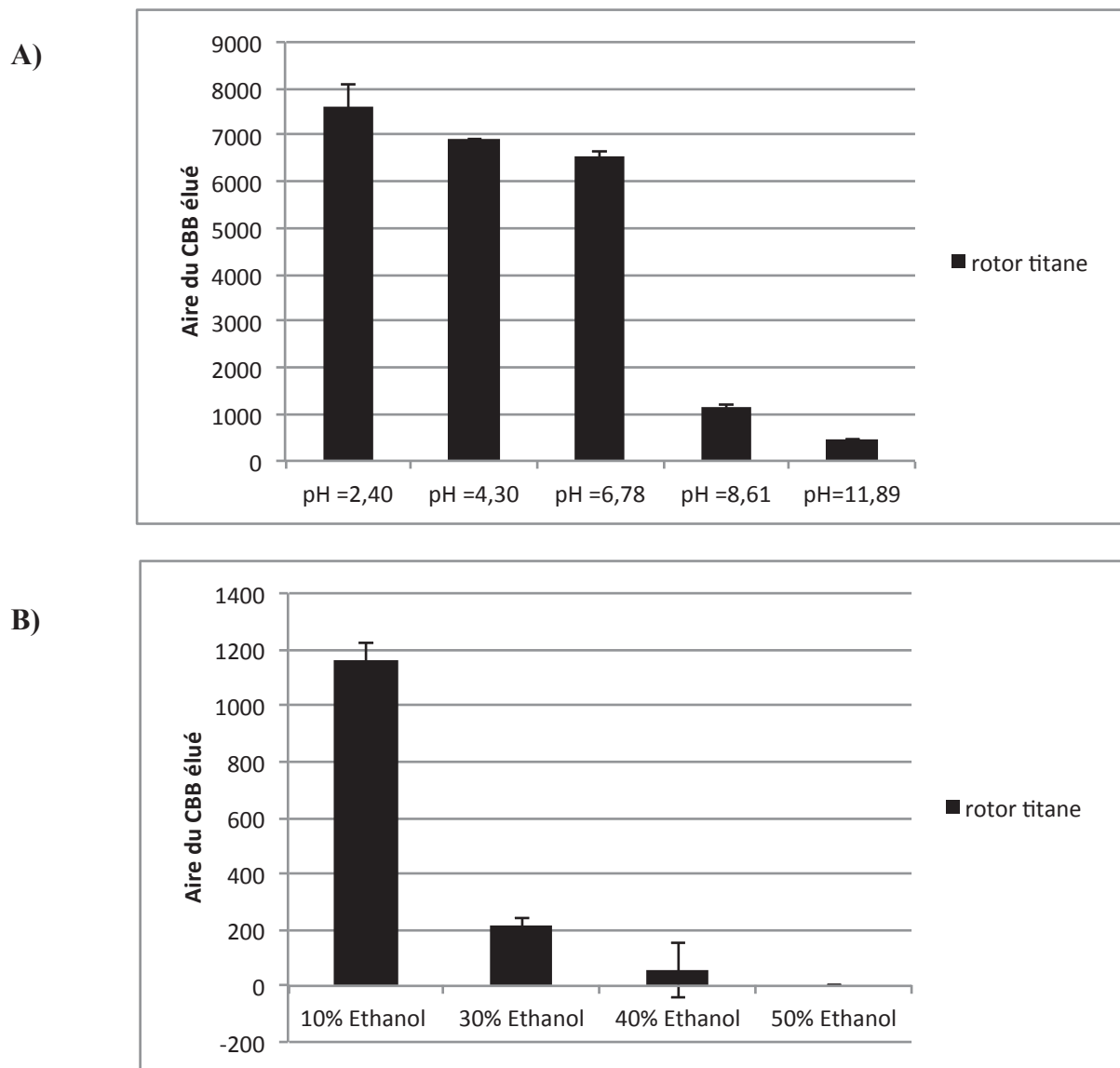


Figure 6.5 : Evaluation des interactions non spécifiques exprimées en aire de CBB après l'étape de rinçage avec A) différents pHs et 10% d'éthanol et B) différents pourcentages d'éthanol à pH 8,6

La méthode appliquée est donc constituée des trois étapes de :

- 1) Fixation avec la solution à 10 % d'éthanol pH2,4 contenant la sonde CBB à une concentration de 0,5 M
- 2) Rinçage avec la solution à 10% d'éthanol pH2,4
- 3) Elution avec la solution à 50% d'éthanol pH12

La droite de calibration obtenue est présentée dans la figure 6.6. Le coefficient de corrélation est de 0,965. Il y a donc une relation linéaire entre l'aire de CBB obtenue après élution et la quantité de protéines restantes dans le rotor.

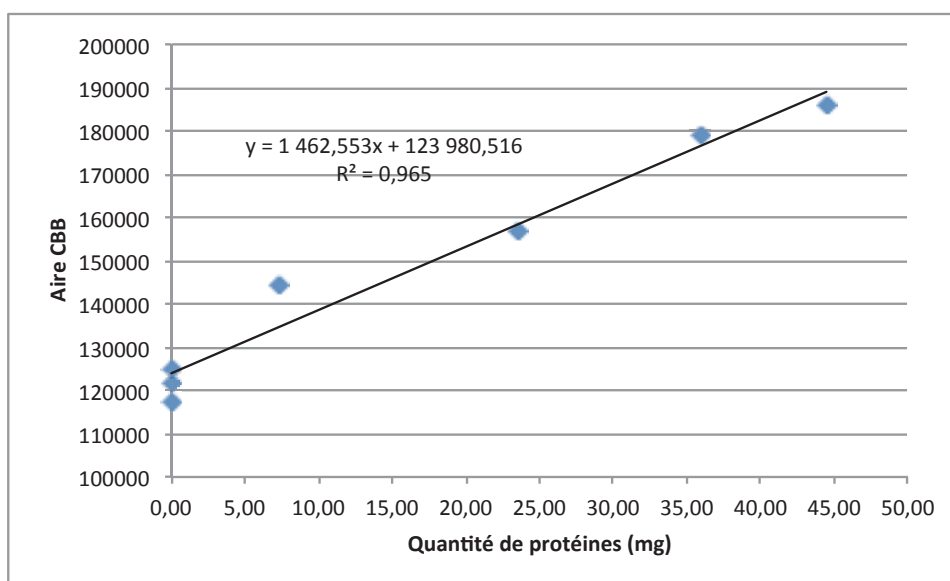


Figure 6.6 : Droite d'étalonnage représentant la quantité de protéines contaminant le rotor titane et l'aire du pic de CBB pendant l'étape d'élution. Protocole comme décrit dans la publication fig.2

Les limites de détection et de quantification sont de 3,1 mg et 13,0 mg respectivement. On constate que cela est trois fois plus élevé qu'observé dans le cadre des rotors en acier inoxydable. Cette différence peut s'expliquer par le fait que le blanc représentatif des interactions non spécifiques entre CBB et matériau de rotor, a une valeur trois fois plus élevée sur le rotor titane que sur le rotor acier, du fait de la rugosité de la surface de titane. De plus, il a été constaté que l'écart-type du blanc entrant en jeu dans le calcul de la limite de détection et de quantification était affecté de manière importante avec un coefficient de variation de près de 5% alors qu'il était uniquement de 1% pour les rotors en acier inoxydable. Nous ne pouvons expliquer aujourd'hui pourquoi une telle variation du blanc est observée.

De ce fait dans le cadre du rotor en titane la méthode ADECA ne semble pas assez sensible pour permettre une détermination in-situ de l'état de contamination du rotor par des protéines.

3. Conclusion

Au cours de ce chapitre une méthode de détection de la contamination a été développée. Cela a permis dans un premier temps de mettre en évidence l'existence de risque potentiel de contamination par des solutions de protéines quel que soit le rotor utilisé. De ce fait une méthode de nettoyage appropriée doit donc être appliquée. Cela peut être combiné à un nettoyage à la vapeur sèche pour éliminer toutes bactéries susceptibles d'être présentes dans le cadre du rotor monobloc.

La méthode de détection in-situ de la présence de protéines au sein des rotors mise en place au cours de ce chapitre n'est adaptée que pour des quantités de plus de 1 mg de protéines présentes au sein des rotors en acier inoxydable et plus de 3 mg pour le rotor en titane. Aujourd'hui les valeurs de LOD et LOQ sont élevées et non compatibles dans le cadre d'une industrie pharmaceutique. En effet avoir des limites de détections de l'ordre du milligramme est bien trop important et cela entraînera donc un risque de contamination croisée élevé. Cette méthode devra donc être améliorée. Ces améliorations pourraient venir d'un changement de sonde d'interaction. Il faut sélectionner une sonde qui génère moins d'interactions non spécifiques avec le matériau et qui répond plus au niveau du détecteur pour permettre d'avoir des limites de détection plus basses. Une sonde fluorescente avec une interaction sonde-protéine basée sur une interaction hydrophobe pourrait peut-être être une solution. Une autre modification peut être liée à l'outil de détection. En effet, la cellule de détection utilisée aujourd'hui est une cellule de détection préparative dont la limite de détection de la BSA à 280 nm a été déterminée à 0,9 mg. De ce fait en passant à une cellule analytique, on peut sûrement réduire cette limite de détection et de quantification. Le détecteur actuel, monté sur les périphériques préparatifs, n'est pas adapté pour rechercher des traces de protéines ou de sonde.

Références

1. Nerín C, Aznar M, Carrizo D. Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;48:63-8.
2. De Jong P. Impact and control of fouling in milk processing. *Trends in Food Science & Technology*. 1997;8(12):401-5.
3. Chandrasekaran N, Dimartino S, Fee CJ. Study of the adsorption of proteins on stainless steel surfaces using QCM-D. *Chemical Engineering Research and Design*. 2013;91(9):1674-83.
4. Sakiyama T, Sato K, Tsuda S, Sugiyama H, Hagiwara T. Citric acid pretreatment for suppressing adhesion of major egg allergens to a stainless steel surface. *Food Control*. 2013;32(2):702-6.
5. One2One. Cross-Contamination in Drug Manufacturing: the regulatory trends. 2014.
6. Sylla Y. Nettoyage en place des lignes agro-industrielles: Etude Cinétique d'élimination des biofilms négatifs au sein des installations fermées dans les industries agroalimentaires: AgroParisTech; 2011.
7. Chollet S. Rationalisation des critères de dimensionnement d'une colonne de chromatographie de partage centrifug, Thèse, Université de Nantes; 2013.
8. Wallonie Spd. Les installations CIP, cahier technique n°6. 2008.
9. Storgårds E. Process hygiene control in beer production and dispensing. 2000.
10. de Zoysa H, Morecroft E. Cleaning, disinfection and sterilization of equipment. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2007;8(11):453-6.
11. Chollet S. Rationalisation des critères de dimensionnement d'une colonne de chromatographie de partage centrifuge: Thèse, Université de Nantes; 2013.
12. 2006/42/EC D. <http://eur-lex.europa.eu> (consulté le 24/08/2017)
13. EHEDG. (www.ehedg.fr consulté le 24/08/2017).
14. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection, sterilization, and antisepsis: An overview. *American journal of infection control*. 2016;44(5):e1-e6.
15. Takahashi K, Fukuzaki S. Cleanability of titanium and stainless steel particles in relation to surface charge aspects. *Biocontrol science*. 2008;13(1):9-16.
16. Coussot G, Perrin C, Moreau T, Dobrijevic M, Le Postollec A, Vandenabeele-Trambouze O. A rapid and reversible colorimetric assay for the characterization of aminated solid surfaces. *Anal Bioanal Chem*. 2011;399(3):1061-9.
17. Li Y-S, Ge Y-S, Zhang Y, Zhang A-Q, Sun S-F, Jiang F-L, et al. Interaction of coomassie brilliant blue G250 with human serum albumin: Probing of the binding mechanism and binding site by spectroscopic and molecular modeling methods. *Journal of Molecular Structure*. 2010;968(1):24-31.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.

Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse ont permis d'aborder de manière théorique l'influence de l'instrumentation à travers l'étude de différents designs rotor de chromatographie de partage centrifuge donnant lieu à la fabrication d'un nouveau type de rotor adapté à l'utilisation de biomolécules.

Ainsi un nouveau rotor de CPC a été fabriqué par la technologie de l'impression 3D. Cette technologie consiste à utiliser la fusion de particules. Cette fusion sur lit de poudre métallique fait appel à un laser de haute puissance pour faire fondre de fines poudres métalliques et créer des pièces 3D fonctionnelles. De cette manière, différents rotors ont été fabriqués faisant l'objet des différents chapitres.

Au cours cette thèse a été abordée une partie sur le développement instrumental. Afin de développer un nouveau type de rotors, plusieurs étapes ont été nécessaires. En effet dans un premier une preuve de concept a été réalisée grâce à la production d'un petit rotor de 135 doubles cellules sphériques. Il s'agit d'ici du tout premier prototype réalisé par impression 3D. Cette fabrication s'est réalisée avec de l'acier doux. Ce prototype ayant montré le potentiel de la structure tridimensionnelle, la fabrication d'un rotor utilisable en laboratoire a donc été réalisée. En effet l'acier doux n'est pas un matériau compatible à l'utilisation de divers solvants et phases aqueuses et de pH extrêmes. Pour répondre aux exigences industrielles, le titane est un matériau semble plus adapté, notamment en contact avec des biomolécules du fait de son caractère biocompatible. Un premier rotor en titane a donc été fabriqué, possédant des cellules relativement volumineuses, identiques au premier prototype 3D en acier doux, afin d'évaluer l'impact du matériau sur les performances obtenues précédemment. Le nombre de cellules a cependant été augmenté afin de disposer d'un rotor utilisable. L'étude des performances a alors montré que le matériau titane n'a pas d'influence sur les caractéristiques de séparation que sont le taux de phase stationnaire et l'efficacité. Cela nous a permis de valider le matériau titane dans la production de rotor 3D en chromatographie de partage centrifuge.

L'un des objectifs de la thèse étant de diminuer le volume injecté, il a été nécessaire de réduire les dimensions des rotors précédents afin de revenir à des taille semblables à ce qui existe actuellement sur le marché. De ce fait le rotor mini-3D a été fabriqué avec 600 cellules. Une étude approfondie des performances a été réalisé sur ce rotor ce qui a permis également de comparer l'ensemble des rotors.

Il en est ressorti que ce rotor-3D permet de travailler à haute vitesse linéaire tout en conservant une rétention des phases stationnaires aqueuses très satisfaisante. Le débit maximal de travail pour maintenir un taux de 30% de phase stationnaire ayant été augmenté à 8 mL/min au lieu de 4 mL/min. De ce fait, la structure tridimensionnelle permet de travailler plus vite. En ce qui concerne l'efficacité cette dernière reste identique au rotor commercial de la société Rousselet-Robatel. Ainsi la séparation des molécules standards de la myoglobine et la lysozyme a pu être obtenue en seulement 6 minutes tout en conservant une résolution de 1,5, ce qui représente la séparation la plus rapide jamais réalisée en chromatographie de partage centrifuge.

Une nouvelle méthodologie de comparaison a également été développée ce qui a permis de comparer les rotors indépendamment de leur taille et leur forme. Ainsi il a été possible d'obtenir des simulations de résolution en fonction des coefficients de partage des composés. De ce fait, dans le cas des systèmes solvant biphasiques les différents rotors ramenés à nombres de cellules identiques sont équivalents en termes de performances de séparation. En effet que ce soit des petites cellules ou des grosses, de forme tridimensionnelle ou non, les rotors donnent la même résolution. Les limites du design de cellules twins semblent donc atteintes.

L'utilisation de la technologie d'impression 3D a donc permis de fabriquer des rotors monobloc tridimensionnels présentant ainsi des performances identiques que les rotors actuels à disque que ce soit dans le cadre des systèmes solvant biphasiques aqueux ou hydro-organique. Néanmoins dans le cadre du rotor mini-3D, l'utilisation des systèmes biphasique aqueux peut se faire à plus grand débit.

Enfin, un travail important a été mené sur la réduction du volume injecté. Pour cela, la sensibilité a été déterminée pour les deux rotors présentant de petites cellules. Il a ainsi été démontré que ces deux rotors permettaient l'injection de quelques dizaines de microlitres d'échantillons comme c'est déjà le cas pour la chromatographie liquide analytique.

Le développement de cette technique dans le DSP de la production des protéines est séduisant pour son faible coût et sa grande sélectivité. La possibilité d'utiliser un rotor monobloc permet également d'être conforme aux pratiques GMP. De plus, la démonstration de l'injection de faibles quantités d'échantillons ouvre la possibilité de développer de nouveaux types d'ATPS afin de disposer d'une échelle de sélectivité large comme l'utilisation des polymères recyclables ou encore de sucres.

TITRE en Français : Amélioration instrumentale de la Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules très polaires

RÉSUMÉ en Français :

L'objectif de cette thèse est de développer un nouvel instrument de chromatographie de partage centrifuge (CPC) dédié à la purification de molécules très polaires. La CPC est une technique préparative permettant la séparation des molécules grâce à l'utilisation d'un système solvant constitué de deux liquides non miscibles. Ce manuscrit expose dans un premier temps les différentes techniques de purification de protéines utilisées dans le cas d'un procédé industriel de production. Un focus est réalisé sur l'utilisation de systèmes biphasiques aqueux pour la purification des biomolécules, qui représente un réel avenir dans l'industrie du fait de son faible coût, de sa facilité de montée en échelle et surtout de l'environnement favorable qu'il fournit aux biomolécules. Ainsi en se basant sur les avantages de ces systèmes solvants dits Aqueous Two Phase Systems (ATPS), la CPC pourrait apporter une efficacité supplémentaire permettant de purifier les protéines à moindre coût. Pour pouvoir répondre à cet enjeu industriel, il est nécessaire de développer à la fois des méthodes chromatographiques innovantes et de nouveaux instruments dédiés. En effet, les instruments de CPC actuels ne sont pas compatibles avec les Bonnes Pratiques de Fabrication du fait de la présence de joints Téflon® qui empêche la possibilité de stériliser les instruments. La fabrication d'un nouvel instrument monobloc entièrement en titane a été réalisée grâce à la technologie de l'impression 3D pour répondre à cette problématique. L'objet de cette thèse est l'évaluation poussée des performances de cette nouvelle colonne afin de déterminer son applicabilité à la purification des biomolécules. Un focus sera également apporté à l'injection de volumes très faibles d'échantillon afin de faciliter le développement de méthodes.

TITRE en anglais : Centrifugal partition chromatography : an improved instrument for highly polar molecule purification

RÉSUMÉ en anglais :

The aim of this thesis is to develop a new centrifugal partition chromatography (CPC) instrument in order to purify highly polar molecules. CPC is a preparative technique for the separation of molecules using a solvent system composed of two immiscible liquids. This manuscript describes the different protein purification techniques used in industrial production process. A focus is made on the use of aqueous biphasic systems for the purification of biomolecules, which represents a real trend in the industry thanks to its low cost, scaling simplicity and especially the favorable environment that it provides to biomolecules. Thus, based on the advantages of these solvent systems known as Aqueous Two Phase Systems (ATPS), CPC could provide additional performances to purify proteins at lower cost. To respond to this industrial challenge, it is necessary to develop both innovative chromatographic methods and new devoted instruments. Indeed, current CPC instruments are not compatible with Good Manufacturing Practices due to the presence of Teflon® seals which prevents the possibility of sterilizing the instruments. The manufacture of a new monobloc instrument entirely made of titanium was achieved thanks to the 3D printing technology. The purpose of this thesis is the evaluation of this new column performance in order to determine its applicability to biomolecules purification. A special attention is also provided to the injection of very small sample volumes in order to facilitate method development.

DISCIPLINE : Chimie Analytique

MOTS-CLÉS : Chromatographie de partage centrifuge, purification, biomolécules, ATPS

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, UMR CNRS 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.
