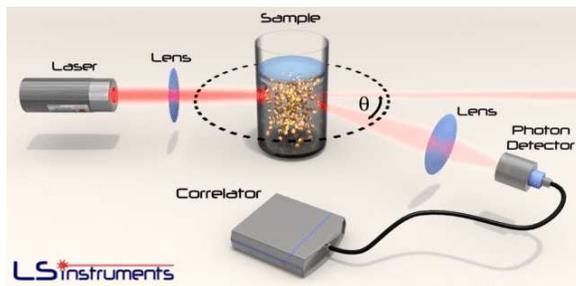


# Diffusion de rayonnement (lumière statique et dynamique) Application à l'étude de macromolécules en solution



Master 2 Polymères et surfaces

Université Rouen Normandie



Luc Picton

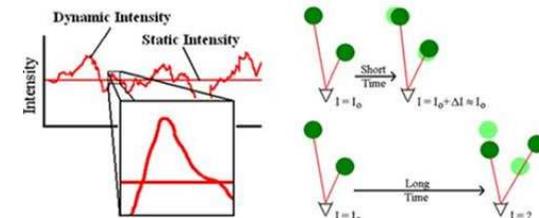
Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces  
UMR6270 CNRS Université Rouen Normandie



Batiment Dulong, Mont Saint Aignan

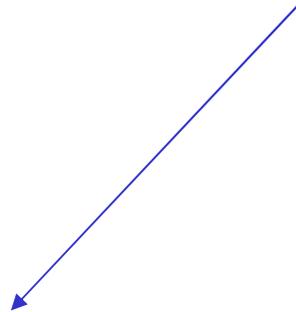
@ luc.picton@univ-rouen.fr

02 35 14 00 71



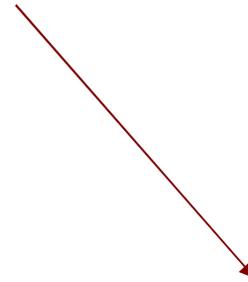
**Diffusion de rayonnement  
(lumière statique et dynamique)  
Application à l'étude de macromolécules en solution**

Que nous apportent les expériences de diffusion de rayonnement?



*Propriétés statiques*

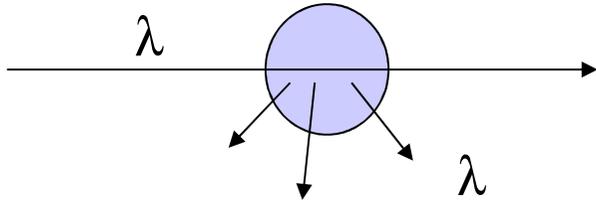
*Occupation de l'espace  
Masse molaire  
rayons de giration  
conformation, structure  
interactions*



*Propriétés dynamiques*

*Mouvements des molécules  
Coefficient de diffusion  
rayons hydrodynamiques*

## Les techniques de diffusion de rayonnement sont basées sur les interactions électromagnétiques - matière



### **3 cas à envisager :**

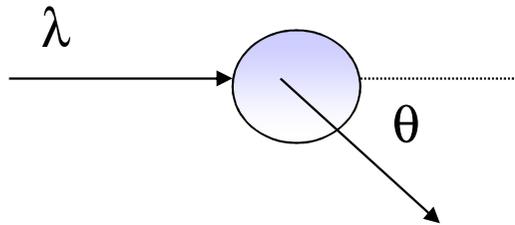
- Pas d'interaction : transmission
- Absorption d'énergie  
chaleur,  
réaction chimique,  
ré émission (fluorescence, phosphorescence)
- **Diffusion élastique à la même  $\lambda$   
dans toutes les directions de l'espace**

Impossible de décrire le mouvement de chaque particule par la mécanique classique.

Le mouvement d'une particule donnée est imprévisible.

D'un point de vue macroscopique, les propriétés peuvent être décrites par des lois statistiques

## Intérêt de la diffusion



L'intensité diffusée dépend

- de  $\lambda$  et de  $\theta$
- de la taille et de la structure des particules diffusantes

### La diffusion statique de la lumière (static light scattering SLS)

moyenne dans le temps l'intensité diffusée  
sur toutes les conformations possibles et les mouvements de fluctuations

### Multi Angle Laser Light Scattering (MALLS)

En faisant varier l'angle et la concentration  
on peut alors accéder

- à la masse molaire moyenne en poids
- au facteur de forme
- aux rayons de giration (dans certains cas)
- au paramètre thermodynamique de solvation

## Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering DLS)

Quasi-Elastic Light Scattering (QELS)

Photon Correlation Spectroscopie (PCS)

Les fluctuations de l'intensité diffusée dues aux mouvements locaux (mouvements Browniens) de particules diffusantes dans le temps peuvent être corrélées à courtes distances (ou sur des temps courts).

La fonction d'auto-corrélation de ces fluctuations temporelles de l'intensité diffusée peut alors être reliée au

- **Coefficient de diffusion,**
- **lui même relié au rayon hydrodynamique ( $R_h$ ).**

*Remarque : les techniques de diffusion de rayonnement sont différentes selon les sources de rayonnement : lumière (polarisabilité des molécules),*

*RX (nuages électroniques), neutrons..*

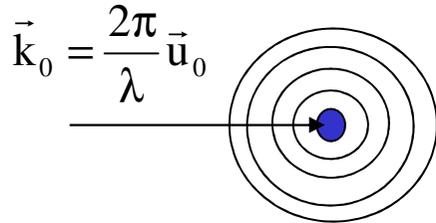
*Mais elles répondent toutes aux mêmes formalismes*

# Diffusion Statique de la Lumière

## I- Propriétés et principes

Si on considère une onde plane monochromatique de longueur d'onde  $\lambda$ .

L'équation de propagation s'écrit :



$$\Psi(\mathbf{x}, t) = \Psi_0 \cdot e^{i(\omega t - \mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{x})}$$

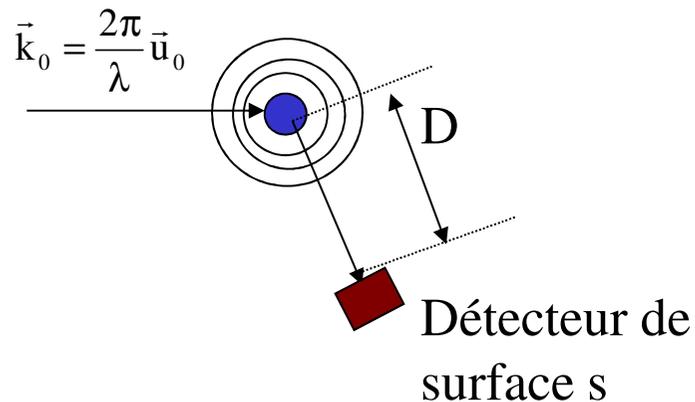
$k_0 = 2\pi/\lambda$  la norme du vecteur d'onde  
 $\omega = 2\pi c/\lambda$  la pulsation

Cette onde peut être vue comme un ensemble de particules (faisceau de photons ou de neutrons) se déplaçant à la même vitesse et dans des directions parallèles.

Quand cette onde interagit avec un centre diffusant quelconque, elle est diffusée dans toutes les directions de l'espace. L'onde diffusée est **sphérique**.

L'hypothèse de diffusion **élastique** suppose que les particules ne perdent pas d'énergie lorsqu'elles sont diffusées

## I-1 longueur de diffusion (b) pour un centre diffusant



● Centre diffusant

D : distance échantillon-détecteur

*Remarque : l'onde diffuse avec une symétrie sphérique et la diffusion est élastique (même  $\lambda$ )*

La probabilité que les photons soient réémis dépend de la surface des particules diffusantes : on définit alors la section efficace de diffusion (*surface de la particule diffusante « vue » par le rayonnement*)

$\sigma = (\text{nombre de particules diffusées}) / (\text{nombre de particules incidentes : flux})$

$$\sigma = \frac{I_{\text{diff}}}{\Phi} = 4\pi b^2$$

**b** : longueur de diffusion, intrinsèque à la particule diffusante (interaction de rayonnement)

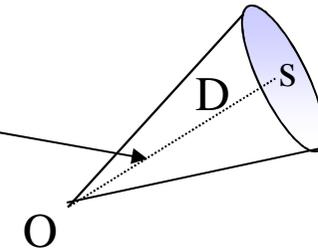
## Intensité sur le détecteur

Si l'intensité totale diffusée dans toutes les directions est indépendante de  $D$   
 par contre l'intensité recueillie par le détecteur  $D$   
 est proportionnelle au rapport des aires ( $\Omega$ )

$$I_{\text{détecteur}} = I_{\text{diffusée}} \cdot \Omega$$

$$\Omega = \frac{s}{4\pi D^2}$$

$\Omega$ , l'angle solide  
 $s$  la surface du détecteur  
 $D$  la distance échantillon-détecteur



$$I_{\text{détecteur}} = I_{\text{diffusée}} \cdot \frac{s}{4\pi D^2} \cdot \left(\frac{b^2}{b^2}\right)$$

$$\sigma = \frac{I_{\text{diff}}}{\Phi} = 4\pi b^2 \longrightarrow I_{\text{diffusée}} \cdot \frac{1}{4\pi b^2} = \Phi$$

$$I_{\text{détecteur}} = \Phi \cdot s \cdot \left(\frac{b}{D}\right)^2$$

On peut alors exprimer la fonction d'onde  
 par rapport à l'angle solide, donc par rapport à  $D$

$$\Psi(D, t) = \Psi_0 \cdot \left(\frac{b}{D}\right) \cdot e^{i(\omega t - kD)}$$

## Longueur de diffusion en fonction du rayonnement

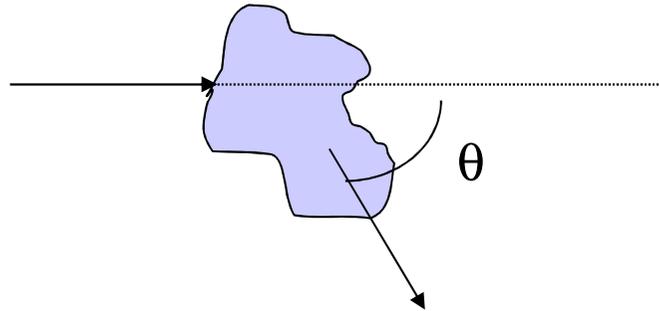
Lumière :  $b = (k_0 \cdot n)^2 \cdot \alpha$

avec  $b > 0$ ,  $n$  : indice de réfraction et  $\alpha$  : polarisabilité

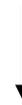
RX :  $b = Z \cdot r_e$   
avec  $Z$  : numéro atomique,  $r_e = 0,282 \cdot 10^{-12} \text{cm}$  (rayon de l'  $e^-$ )

Neutrons  $b$  lié aux interactions nucléaires  
expérimental ( $>$  ou  $< 0$ )

## I-2 Diffusion pour un ensemble de centres diffusants



Chaque particule va diffuser la lumière  
mais tous ces rayonnements émis  
vont interférer entre eux



Ces interférences vont permettre de déterminer  
la structure du composé diffusant

Si  $N$  particules diffusent  
 $i = (1, 2, \dots, N)$

l'onde diffusée par la particule 1, au point  $O$  est :

$$\Psi_1 = \Psi_0 \cdot \left(\frac{b_1}{D}\right) \cdot e^{i(\omega t - kD)}$$

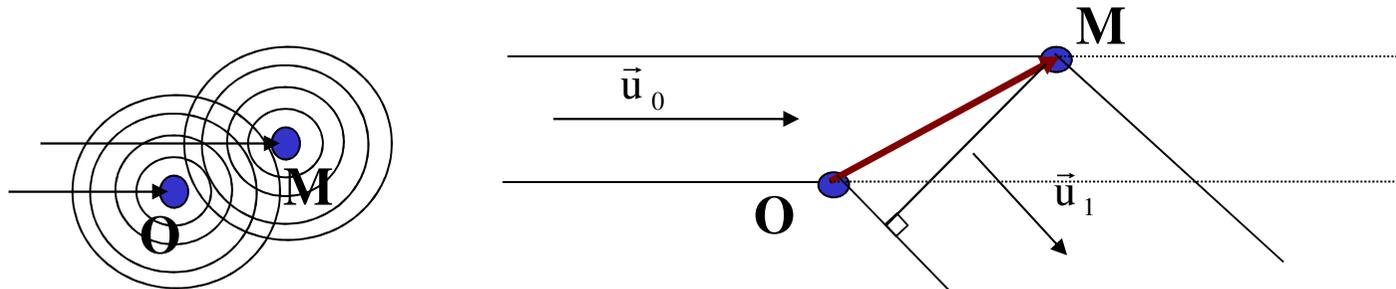
l'onde diffusée par la particule  $i$  au point  $M$  est :

$$\Psi_i = \Psi_0 \cdot \left(\frac{b_i}{D}\right) \cdot e^{i(\omega t - kD - \varphi_i)}$$

Il apparaît  
une différence de phase  
entre ces 2 ondes de  
déphasage :  $\varphi_i$

## Vecteur de diffusion ou fonction d'onde : $q$

Les ondes diffusées par différentes particules vont interférer.  
 Pour calculer ces interférences, il faut calculer les différences de marche  
 des ondes diffusées dans une direction donnée définie par exemple  
 par un vecteur unitaire  $\vec{u}_1$

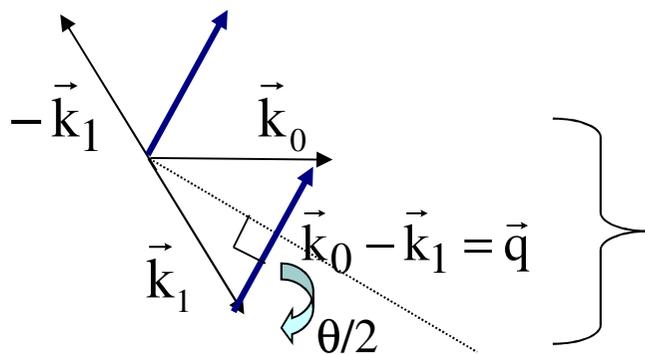


Différence de marche :  $\Delta x_i = \vec{r}_i \cdot \vec{u}_0 - \vec{r}_i \cdot \vec{u}_1 = \vec{r}_i \cdot (\vec{u}_0 - \vec{u}_1)$

Différence de phase  
 des ondes diffusées

$$\Delta \varphi_i = \vec{r}_i \cdot (\vec{k}_0 - \vec{k}_1) = \vec{r}_i \cdot \vec{q}$$

avec  $k_0 = k_1 = \frac{2\pi}{\lambda}$



$$\sin(\theta/2) = \frac{q/2}{k}$$

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Si  $\varphi(x, t)$  est l'onde diffusée  
 par une origine O, l'onde  
 diffusée par un point M,  
 tel que  $\vec{OM} = \vec{r}$ , est  
 $\varphi(x, t) \cdot e^{iqr}$

## Ordre de grandeur du vecteur de diffusion (fonction d'onde) $q$

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

$q$  est un paramètre très important de la diffusion  
il permet d'étudier la structure et la conformation des particules  
diffusantes en fonction de l'échelle d'observation  
(fonction de  $\lambda$  et de  $\theta$ )  
 $q$  est homogène à l'inverse d'une longueur d'onde  
donc à l'inverse d'une longueur.

$q^{-1}$  est l'ordre de grandeur de la taille d'observation  
 **$q$  représente en fait l'inverse de l'échelle d'observation**  
**quand  $q \nearrow$ , on  $\nearrow$  le « grossissement » de notre observation**

Lumière :	$300\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$ $10^\circ < \theta < 150^\circ$	$0,002 < q < 0,05$ objet de 500nm à 20nm
Neutrons	$0.3\text{nm} < \lambda < 1,5\text{nm}$ $0,3^\circ < \theta < 20^\circ$	$0,02 < q < 5$ objet de 50nm à 0,2nm
RX	$0,1\text{nm} < \lambda < 1,5\text{nm}$ $0,1^\circ < \theta < 10^\circ$	$0,006 < q < 10$ objet de 160nm à 0,1 <sup>12</sup> nm

## Expression de la fonction d'onde d'une particule i

$$\Psi_i = \frac{\Psi_0}{D} \cdot e^{i(\omega t - kD)} \cdot b_i \cdot e^{-iqr_i} \quad q.r \text{ est le déphasage } \phi_i$$

Si on considère le cas général de la diffusion par un échantillon constitué de N atomes identiques, l'onde diffusée est la somme des ondes diffusées par chaque atome :

$$\Psi_{\text{totale}} = \Psi = \sum_{i=1}^N \Psi_i = \frac{\Psi_0}{D} \cdot e^{i(\omega t - kD)} \cdot \sum_{i=1}^N b_i \cdot e^{-iqr_i}$$

L'intensité diffusée est égale au carré du module de l'onde.

C'est à dire la moyenne dans le temps et sur toutes les orientations et conformations des centres diffusants

$$\langle I_{\text{diff}} \rangle = \langle \Psi \cdot \Psi^* \rangle$$

$$I_{\text{diff}} = I_q = \left\langle \frac{\Psi_0^2}{D^2} \cdot \left( \sum_i b_i e^{-iqr_i} \right) \cdot \left( \sum_j b_j e^{+iqr_j} \right) \right\rangle$$

$$I_{\text{diff}} = I_q = \left\langle \frac{\Psi_0^2}{D^2} \cdot \sum_i \sum_j b_i b_j e^{iq(r_j - r_i)} \right\rangle$$

Expression générale de l'intensité diffusée

Pour s'affranchir de la distance échantillon-détecteur ( $D$ )  
et de l'intensité incidente ( $I_0$ ), on exprime la  
section efficace différentielle de diffusion de l'échantillon :  $I'(q)$

$$I'_q = I_0 \cdot \left( \frac{D^2}{I_0} \right) = \left\langle \sum_i \sum_j b_i b_j e^{iq(r_j - r_i)} \right\rangle$$

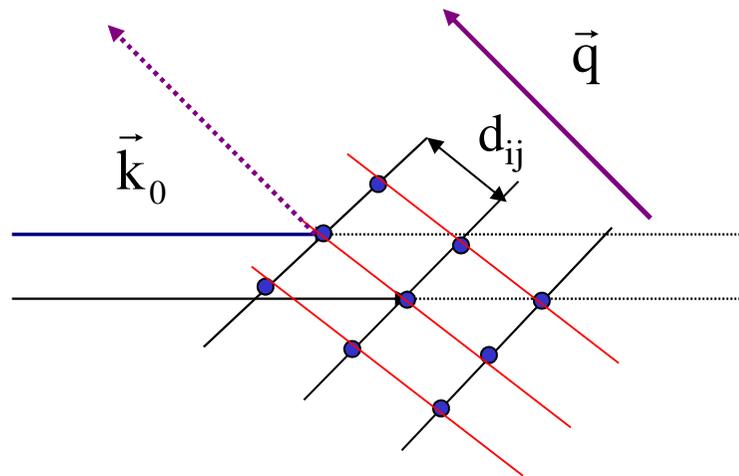
Si les centres diffusants sont identiques alors  $b_i = b_j$

$$I'_q = \left\langle b^2 \cdot \sum_i \sum_j e^{iq(r_j - r_i)} \right\rangle$$

Les vecteurs  $r_i$  et  $r_j$  sont en permanence variables.  
C'est la raison pour laquelle on doit exprimer l'intensité diffusée  
sous la forme d'une moyenne statistique.

## Diffusion par un milieu homogène : différence entre diffusion et diffraction

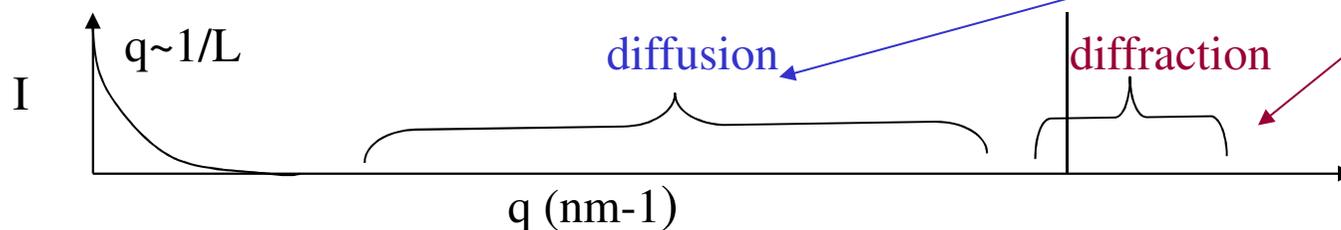
On considère la diffusion par des éléments de volume  $dV$  d'un échantillon. Si la diffusion est homogène, la longueur de diffusion ( $b$ ) d'un élément de volume est alors constante dans tout l'échantillon, la section efficace différentielle est :  $I'_q = \left\langle b^2 \cdot \sum_i \sum_j e^{-iq(r_{ij})} \right\rangle$



Si l'échantillon est un cristal parfait, il existe des vecteurs  $d_{ij}$  privilégiés qui se retrouvent dans tout le cristal et pour lesquels **les ondes diffusées sont en phase** :  $q \cdot d_{ij} = n \cdot 2\pi$   
 cette relation est la loi de Bragg, elle donne les directions des maximum d'interférence (pic de Bragg) on a alors un phénomène de diffraction.

Pour un milieu homogène, on peut observer de la **diffraction sur une très petite échelle**.

Mais à plus grande échelle, il existe toujours (à la différence d'un cristal parfait), **une différence de phase** (même très petite) qui de proche en proche va annuler l'onde résultante par interférence en opposition de phase, on entre dans le **régime de diffusion**.



**En fait, à une certaine échelle de  $q$ , un milieu dit « homogène » ne l'est plus.**

## Expression de $I_q$ en fonction de la densité de particule (autre formulation)

Il peut être utile pour l'exploitation et le développement expérimental des techniques de diffusion, d'exprimer l'intensité diffusée en fonction de la densité de particule  $P(r)$  dans un volume  $dr$ .

Si les centres diffusants sont identiques ( $b_i=b_j$ )

$$I'_q = \left\langle b^2 \iint_V P(\vec{r}).P(\vec{r}').e^{-iq(r-r')} d\vec{r}.d\vec{r}' \right\rangle$$

*Rq : il n'y a pas de diffusion si  $q=0$  : transmission*

La diffusion est due aux fluctuations des centres diffusant, donc aux fluctuations de densité notamment en raison des changements d'orientation des centres diffusants (mouvements browniens).

On exprime ces fluctuations par la variation entre la densité et la densité moyenne

### I-3 Intérêt de la diffusion quand $q \rightarrow 0$ ( $\theta \rightarrow 0$ )

Quand  $q \rightarrow 0$  ( $\theta \rightarrow 0$ ) :  $e^{-iq(\vec{r}-\vec{r}')} \rightarrow 1$

$$I'_q \rightarrow I'_0 = \left\langle b^2 \iint_v P(\vec{r}).P(\vec{r}').d\vec{r}.d\vec{r}' \right\rangle$$

$$I'_q \rightarrow I'_0 = b^2 \left\langle \iint_v P(\vec{r}).P(\vec{r}').d\vec{r}.d\vec{r}' \right\rangle$$

$$I'_q = b^2 \overline{\Delta P}^2 \quad \text{Relation d'Einstein (1910)}$$

$\overline{\Delta P}^2$  Carré moyen des fluctuations du nombre de particules diffusantes

Concrètement, ce sont les mesures de la densité de particules ( $\Delta P$ ) qui seront atteintes par l'expérience en fonction notamment des variations de

- concentration en soluté (C)
- angle d'observation ( $\theta$ )

Dans un milieu solvant/soluté incompressible, les fluctuations de concentrations entraînent des variations de la pression osmotique ( $\pi$ ) et de l'intensité diffusée ( $I'_q$ ) qui peuvent être exprimées en fonction

- de la masse molaire du soluté (M)
- d'un développement du Viriel de la concentration (C)

Exemple : en osmométrie  $\frac{\pi}{C} = RT.(\frac{1}{M} + A_2C + A_3C^2 + \dots)$

*A<sub>2</sub> est le second coefficient du Viriel, il traduit les interactions thermodynamiques de solvation entre le soluté et le solvant*

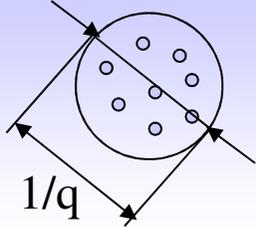
Quand	C → 0	$\pi \approx RT. \frac{C}{M}$	→	<b>Osmométrie sensible aux faibles masses</b>
Quand et	C → 0 q → 0	$I'_{(q \rightarrow 0)} \approx k.C.M$	→	<b>Diffusion sensible aux fortes masses (adaptée aux polymères)</b>

*Conséquence : la diffusion de la lumière est aussi très sensible à toute présence de poussières et/ou d'agrégats qui sont sources de sur diffusion par rapport aux solutés (polymère)*

## I-4 Diffusion à un angle quelconque : variation de $q$

Nous avons déjà évoqué que  $1/q$  est l'échelle de longueur de ce que l'on observe :  
idéalement  $1/q \sim R$ , avec  $R$  dimension de l'objet observé

**$q$  faible :  $R \ll 1/q$**

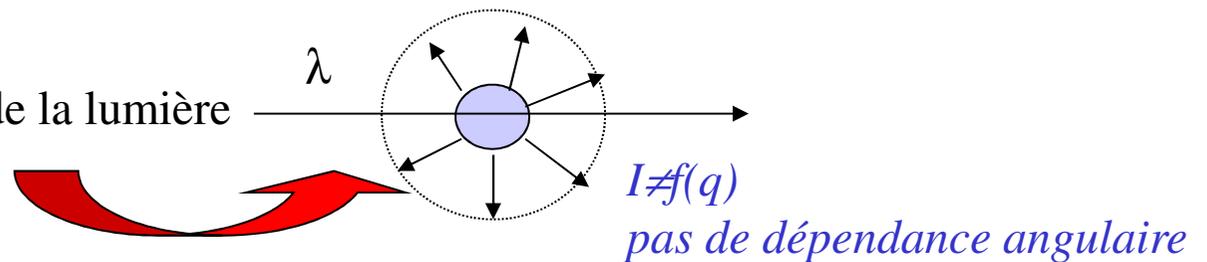


○ Objet observé de dimension  $R$

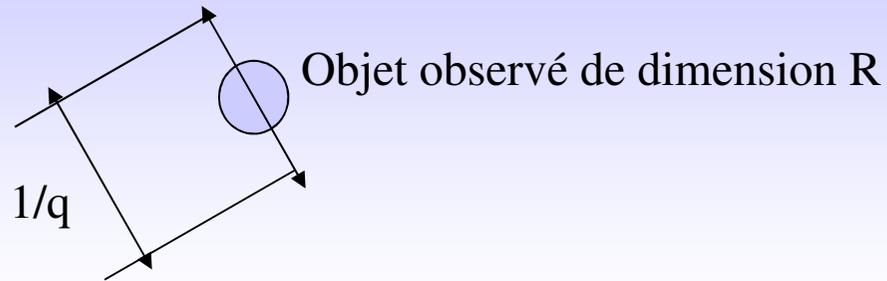
On ne peut pas distinguer la structure interne des molécules ou des macromolécules  
on sonde à une **échelle trop grande par rapport aux dimensions de l'objet**

**Ce cas est rencontré pour**

- de très faibles valeurs de  $q$  (ou de  $\theta$ ) :  
diffusion de la lumière à petit angle
- de très faibles valeurs de  $R$  :  
diffusion isotrope de la lumière



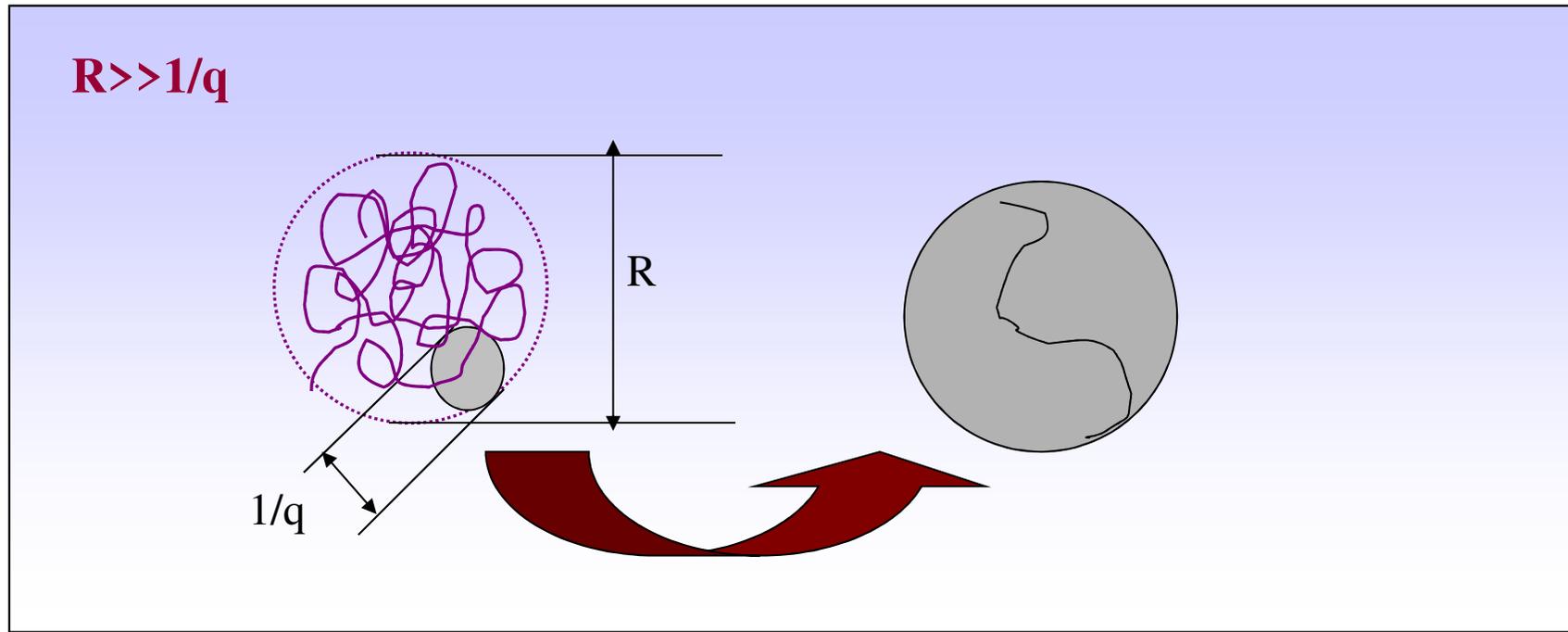
## $R < 1/q$ (mais du même ordre de grandeur) : domaine de Guinier



**La diffusion dépend de  $q$**  donc de la dépendance angulaire, l'intensité diffusée est sensible aux dimensions de l'objet sondé en fonction de  $q$ . On peut alors accéder au **rayon de giration ( $R_g$ )** en solution diluée afin de s'affranchir des interactions à courtes distances.

*$R_g$  est le rayon de la sphère (creuse) qui aurait le même moment d'inertie.*

*$c$  est la moyenne des distances des segments au centre de gravité de la sphère équivalente*



- **On ne « voit » qu'une partie de l'objet :**  
on ne peut donc pas accéder aux dimensions de l'objet  
mais on peut accéder aux dimensions interne de la particule diffusante  
(souvent un polymère)

*Remarque : Dans ce régime de diffusion, l'intensité diffusée n'est plus sensible aux interactions*

**Comme nous l'avons déjà mentionné  
l'échelle d'observation d'un objet de dimension R  
dépend de q**

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

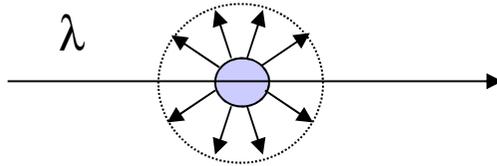
Donc l'échelle d'observation dépend de

- \*  $\lambda$ , la longueur d'onde c'est à dire le type de rayonnement
- \*  $\theta$ , l'angle de diffusion

Lumière :	$300\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$ $10^\circ < \theta < 150^\circ$	$0,002 < q < 0,05$ objet de 500nm à 20nm
Neutrons	$0.3\text{nm} < \lambda < 1,5\text{nm}$ $0,3^\circ < \theta < 20^\circ$	$0,02 < q < 5$ objet de 50nm à 0,2nm
RX	$0,1\text{nm} < \lambda < 1,5\text{nm}$ $0,1^\circ < \theta < 10^\circ$	$0,006 < q < 10$ objet de 160nm à 0,1nm

## I-5 Facteur de forme P(q) ou P(θ)

En régime dilué pour s'affranchir des interactions

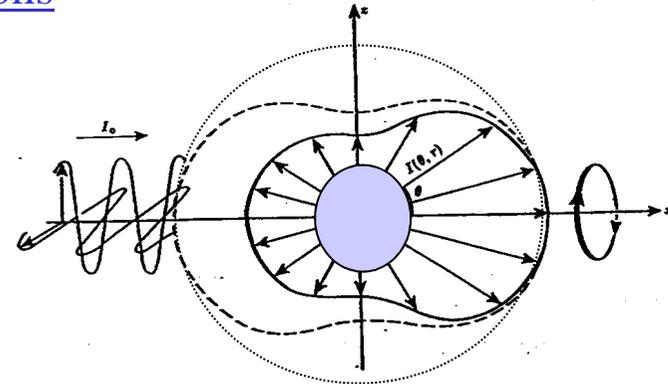


### Diffusion isotrope

l'intensité diffusée est indépendante de l'angle d'observation.

$$qR \ll 1$$

$$Rg < \lambda/20$$



### Diffusion anisotrope

l'intensité diffusée est dépendante de l'angle d'observation.

$$qR \leq 1$$

$$Rg > \lambda/20$$

$$P(q) = \frac{I_q}{I_0} \quad \text{Avec } P(q \rightarrow 0) = 1$$

P(q), le facteur de forme, peut être considéré comme le ratio entre l'intensité diffusée à q et l'intensité diffusée à q=0. Il est fonction de Rg et de la conformation de la macromolécule

$$I'_q = b^2 \left\langle \sum_i \sum_j e^{-iq(r_{ij})} \right\rangle \quad \text{On montre que :} \quad P(q) = \frac{1}{N^2} \left\langle \sum_i \sum_j e^{-iq(r_{ij})} \right\rangle$$

Une moyenne sur toutes les orientations donne 
$$P(q) = \frac{1}{N^2} \left\langle \sum_i \sum_j \frac{\sin(q.r_{ij})}{q.r_{ij}} \right\rangle$$

N : nombre de centres diffusants dans la particules (macromolécules)

q : norme du vecteur d'onde

r : norme du vecteur reliant 2 centres diffusants i et j

**Aux petits angles (faible valeurs de q) :**

$$\frac{\sin(q.r_{ij})}{q.r_{ij}} = 1 - \frac{q^2.r^2}{6} + \frac{q^4.r^4}{5!}$$

Développement limité du 2<sup>ème</sup> ordre

→ 0 quand q → 0

$$P(q) = 1 - \underbrace{\frac{q^2}{3} \frac{1}{2} \frac{1}{N^2} \sum_i \sum_j r_{ij}^2}_{\text{Rayon de giration}} + \frac{q^4}{5!} \frac{1}{N^2} \sum_i \sum_j r_{ij}^4 = 1 - \frac{q^2}{3} Rg^2 + \dots = P(q)$$

**Expression générale du facteur de forme**

$$Rg^2 = \frac{1}{2N^2} \sum_i \sum_j \bar{r}_{ij}^2$$

**Rayon de giration : distance moyenne des centres diffusant par rapport au centre de masse (barycentre)**

En fonction de la **conformation de la particule**  
 (le plus souvent du polymère en solution),  
 les distances moyennes par rapport au barycentre de masse  
 sont reliées aux dimensions réelles de l'objet par des relations différentes.

**Rg ne traduit donc pas le volume réellement occupé par  
 l'objet observé**

- **Pour une sphère de rayon réel R**

$$Rg^2 = \frac{3}{5} R^2$$

(alors  $Rg < R$ )

- **Pour un bâtonnet de longueur L et de section b**

$$Rg^2 = \frac{L^2}{12} + \frac{b^2}{2}$$

- bâtonnet fin ( $b \sim 0$ )  $Rg^2 = \frac{L^2}{12}$

- disque très fin ( $L \sim 0$ )  $Rg^2 = \frac{b^2}{2}$

- **Chaîne gaussienne (dans les conditions  $\Theta$ )  
 (pelote statistique)**

$$Rg^2 = \frac{Nl^2}{6}$$

Avec l : longueur des segments

## Variations du facteur de forme $P(q)$ aux grands angles (grands $q$ )

*Rappelons que  $P(q)$  varie proportionnellement à l'intensité diffusée :  $P(q) \sim I(q)$*

### **Bâtonnet fin**

(Rod Like)

**si  $qL \gg 1$**

$P(q)$  varie en  $q^{-1}$

l'intensité diffusée est inversement proportionnelle à  $q$

### **Pelote statistique**

(Random Coil)

**si  $qRg \gg 1$**

$P(q)$  varie en  $q^{-2}$

### **Sphère rigide**

$P(q)$  varie en  $q^{-4}$

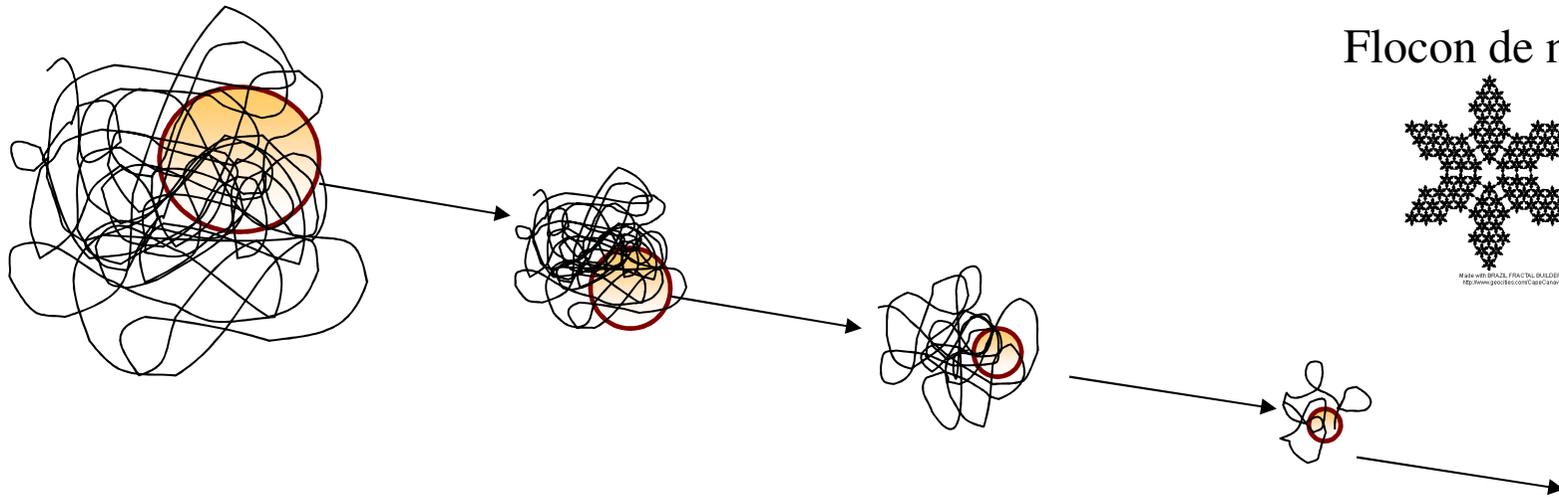
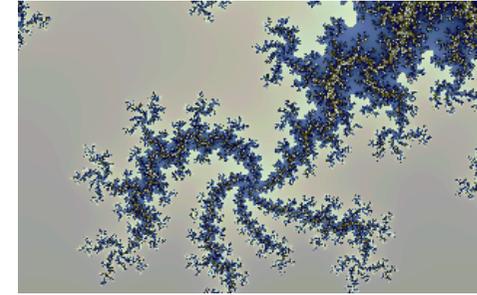
**si  $qR \gg 1$**

## I-6 Dimensions fractales

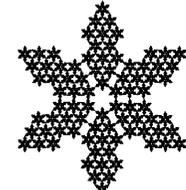
Il apparaît que  $I(q)$  ou  $P(q)$  sont proportionnels à  $q^{-D_f}$

$D_f$  peut être la dimension fractale de l'objet.

$D_f$  représente l'auto-similarité quelque soit l'échelle d'observation



Flocon de neige



MADE WITH BRUCE FRAC TAL BUILDER - FREEWARE  
http://www.geocities.com/CapeCruiser/1481187/

On retrouve les dimensions fractales dans de nombreux exemples naturels

Formes du chou-fleurs!

Formes des cotes de Bretagne

Forme des dépôts de neige

en fonction de l'altitude sur une montagne



Fougères

# Évolution Rayon-Masse

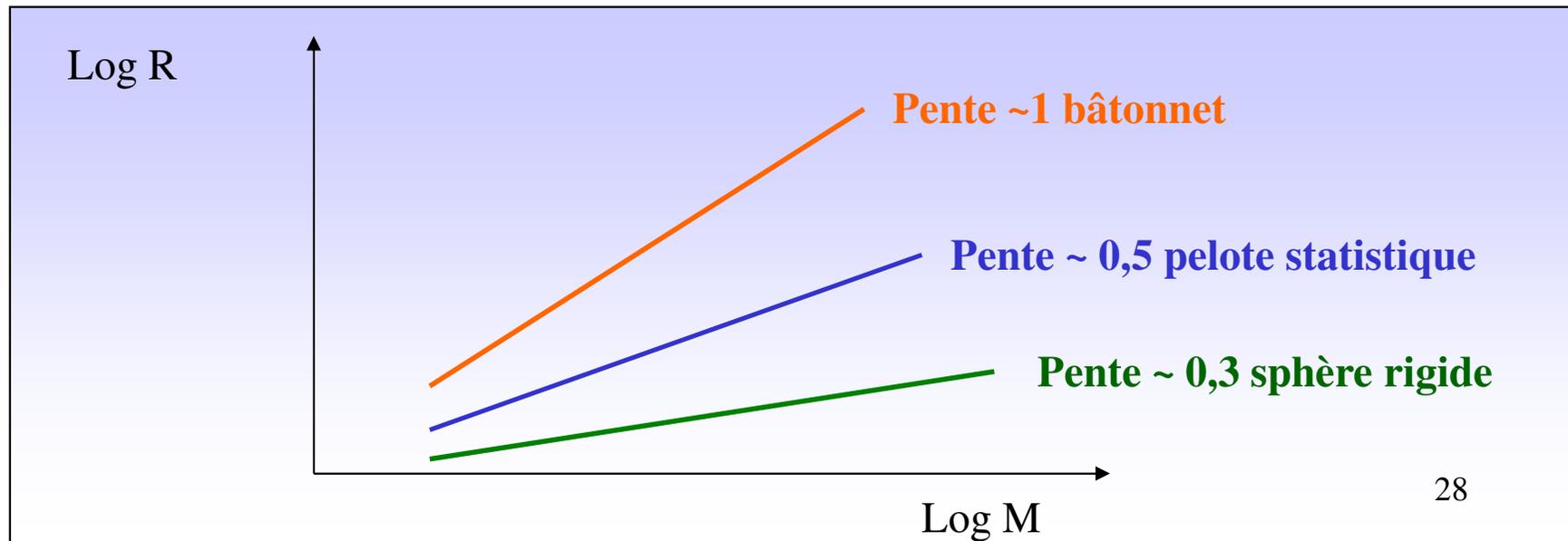
<b>Pelote statistique</b>	en solvant $\Theta$ $M \sim R^2$ ou $R \sim M^{1/2}$	$D_f = 2$	en bon solvant $D_f = 5/3$
---------------------------	--	-----------	-------------------------------

<b>Bâtonnet</b>	$M \sim R$ $R \sim M$	$D_f = 1$
-----------------	--------------------------	-----------

**Sphère rigide** Attention, une telle conformation ne répond pas à une loi fractale

$$M \sim R^3$$
$$R \sim M^{1/3}$$

↓  
 $P(q) \sim q^{-4}$



## Intérêt d'accéder aux dimensions fractales

Si l'on ne peut pas observer l'objet dans son échelle de dimension, mais que l'on peut, aux grands angles et selon le rayonnement utilisé, accéder à une échelle  $x$  plus petite telle que  $x \ll R$

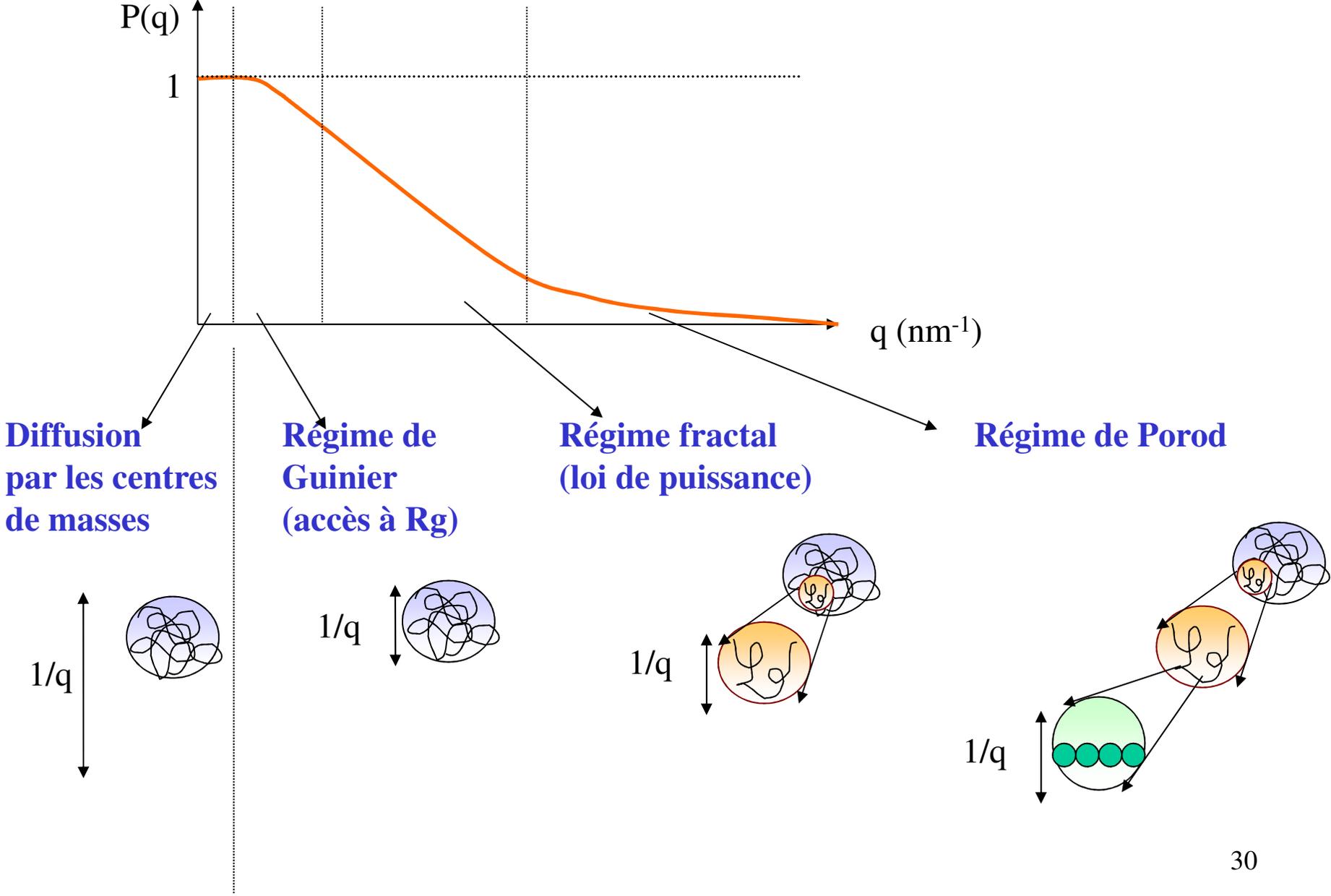
$$\text{Et comme } M \sim x^{-D_f}$$

La structure interne de l'objet peut alors renseigner sur la structure à plus grande échelle

### Restrictions

- Les importantes distributions de tailles au sein d'un ensemble d'objet (polydispersité) peuvent largement fausser la détermination de  $D_f$
- Les grandes valeurs de  $q$  ne peuvent plus être atteintes dans le régime de Porod

# Conclusions sur le facteur de forme



## Diffusion en régime concentré

*La diffusion s'opère généralement en régime dilué afin de s'affranchir des interactions entre les objets diffusant*

On peut aussi utiliser la diffusion en régime concentré si **on utilise les grands angles (grandes valeurs de  $q$ )** de façon à sonder des **zones d'échelle très petite** « à l'intérieur » du système (enchevêtré par exemple dans le cas des polymères)

Ainsi à très petite échelle, la diffusion n'est plus sensible aux interactions. On doit alors travailler avec les dimensions fractales

Il faut toutefois éviter le régime de Porod

## I-7 facteur de contraste en diffusion de la lumière

$$K = b_{\text{app}}^2 \cdot \frac{N_a}{M^2} \quad \text{Le facteur de contraste en DDL}$$

$$b_{\text{app}} = b - b_0 \frac{V}{V_0}$$

$b_{\text{app}}$  : la longueur de diffusion apparente  
où  $V$  est le volume occupé par le soluté  
 $V_0$ , le volume occupé par le solvant  
 $b$ , la longueur de diffusion du soluté  
 $b_0$ , la longueur de diffusion du solvant

$M$  : la masse molaire du centre (motif) diffusant

$N_a$  : nombre d'Avogadro

En diffusion de la lumière :  $b_{\text{app}} = \left( \frac{2\pi n_0}{\lambda_0} \right)^2 \cdot \Delta\alpha$

Avec  $\Delta\alpha$  : polarisabilité  $\Delta\alpha = \frac{1}{2\pi n_0} \cdot \left( \frac{dn}{dC} \right) \cdot \frac{M}{N_a}$

$n_0$  : indice de réfraction du milieu

$(dn/dC)$  : incrément d'indice de réfraction du soluté dans le solvant

En introduisant  $b_{app}$  et  $\Delta\alpha$  dans l'expression de  $K$  on obtient :

$$K = b_{app}^2 \cdot \frac{Na}{M^2}$$

$$\text{avec } b_{app} = \left( \frac{2\pi n_0}{\lambda_0} \right)^2 \cdot \Delta\alpha = \left( \frac{2\pi n_0}{\lambda_0} \right)^2 \cdot \frac{1}{2\pi n_0} \cdot \left( \frac{dn}{dC} \right) \cdot \frac{M}{Na}$$

$$K = b_{app}^2 \cdot \frac{Na}{M^2} = \left( \frac{2\pi n_0}{\lambda_0} \right)^4 \cdot \frac{1}{4\pi^2 n_0^2} \cdot \left( \frac{dn}{dC} \right)^2 \cdot \frac{M^2}{Na^2} \cdot \frac{Na}{M^2}$$

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4} \cdot \left( \frac{dn}{dC} \right)^2 \cdot \frac{1}{Na}$$

*Remarque :*

- si  $dn/dC \nearrow$ , le contraste  $\nearrow$
- $K \sim 1/\lambda^4$  la longueur d'ondes du rayonnement influence beaucoup le contraste

## Facteur de contraste pour les autres techniques de diffusion de rayonnement

**RX** 
$$K_{\text{RX}} = r_e^2 \cdot (\rho_e - \rho_{e,0})^2 \cdot v \cdot \frac{N_A}{M^2}$$

Avec les densités électroniques  $\rho_e = \frac{Z}{v}$  du soluté  
et  $\rho_{e,0} = \frac{Z_0}{v_0}$  du solvant

Le contraste est donc fonction de la différence de densité électronique entre le soluté et le solvant

**Neutrons** : on fixe les longueur de diffusion expérimentalement

- le contraste est souvent bien supérieur à celui obtenu en diffusion de la lumière ou de RX
- mais le flux est bien inférieur à celui obtenu en diffusion de la lumière

Intérêt : il est possible d'éteindre le facteur de contraste d'une partie d'un mélange : « Quenching » avec du deutérium par exemple

## II- Approche expérimentale en diffusion de la lumière

On définit  $\Delta I = I_{\text{solution}} - I_{\text{solvant}}$

L'intensité diffusée par le soluté en régime dilué

**A concentration faible (développement limité de  $P(q)$ )**

$$\frac{KC}{\Delta R(q)} = \frac{1}{M_w \cdot P(q)} + 2A_2 C + \dots$$

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4} \cdot \left( \frac{dn}{dC} \right)^2 \cdot \frac{1}{N_A} \quad q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

$\Delta R(q)$  : Rapport de Rayleigh ( $\sim I_{\text{diffusée}}$ ), normalisé par rapport à une référence (souvent le benzène)

$$\frac{1}{P(q)} = 1 + \frac{q^2}{3} R_g^2 + \dots$$

$A_2$  : 2ème coefficient du Viriel

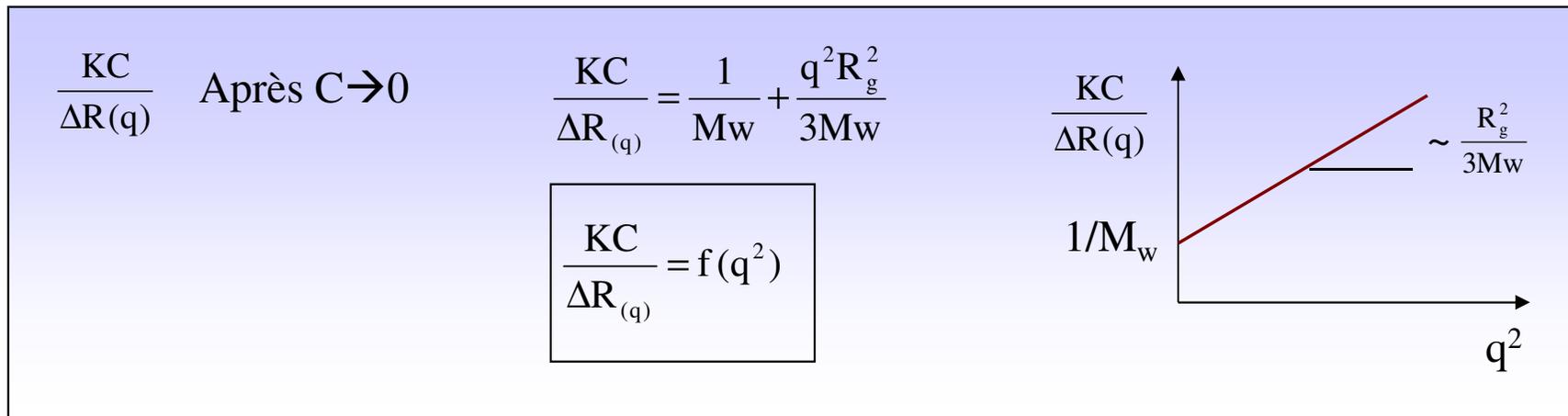
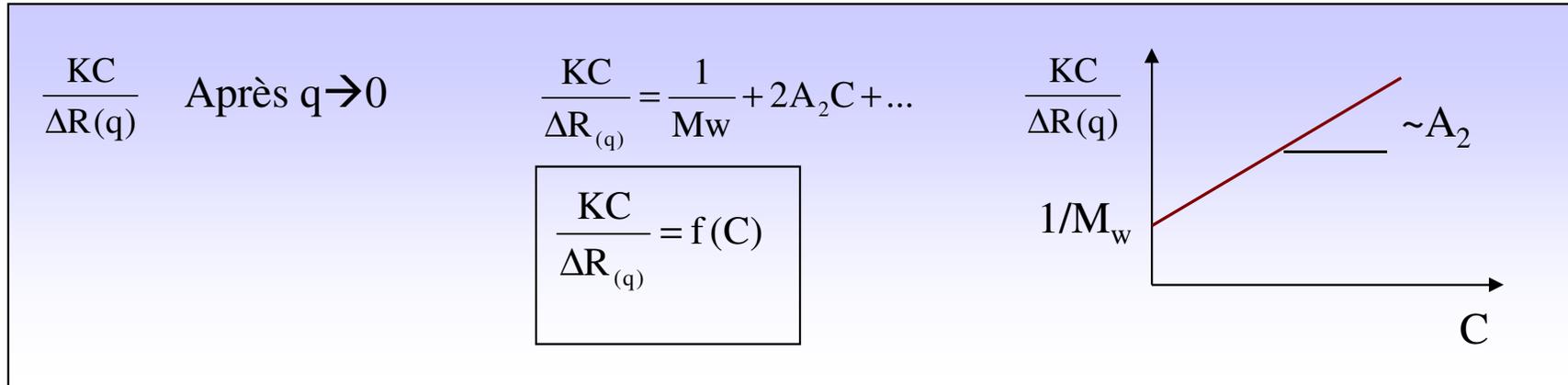
$C$  : concentration en soluté

$$\frac{KC}{\Delta R(q)} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{q^2}{3} R_g^2 + \dots \right) + 2A_2 C + \dots$$

**Expression de la diffusion de la lumière**



## Accès à Rg, Mw et A<sub>2</sub>



## Diagramme de Zimm

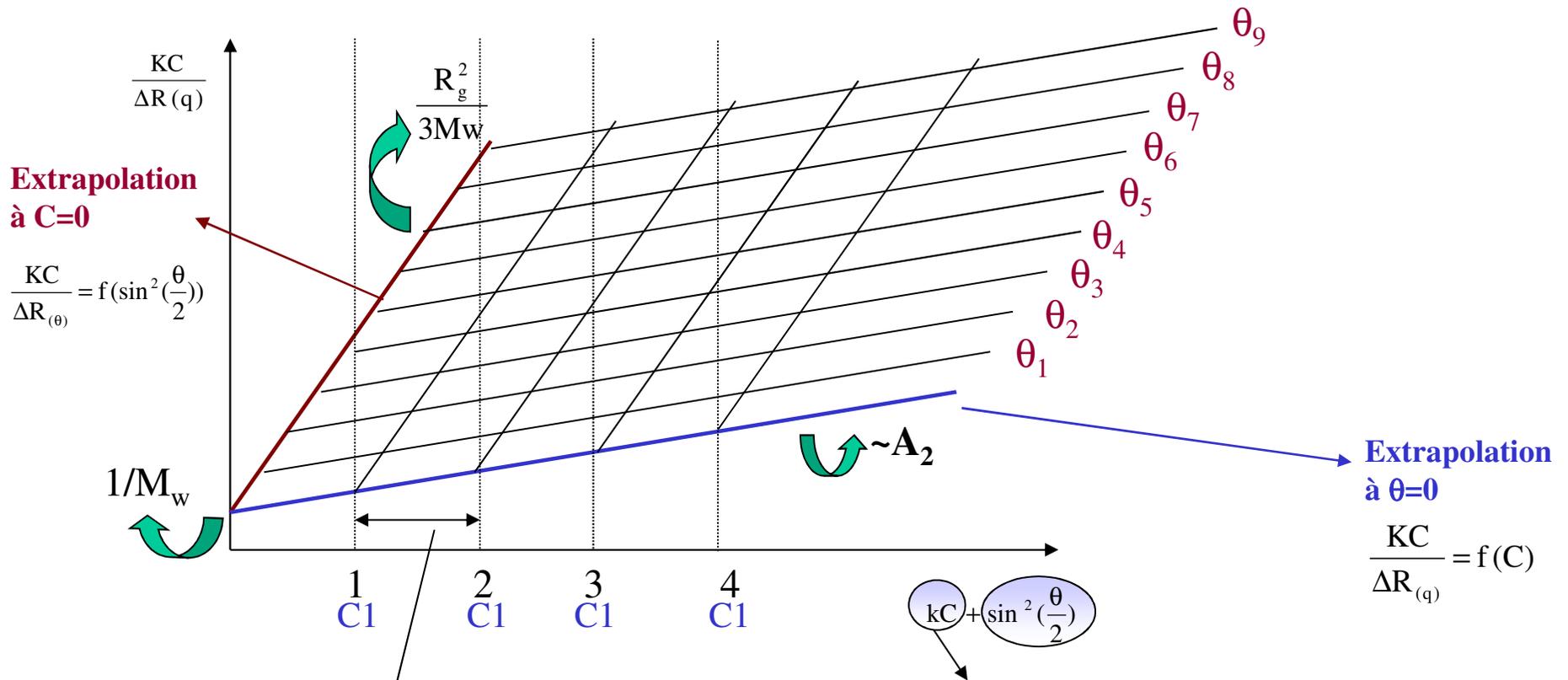
On exprime l'équation de diffusion de la lumière en fonction de  $\theta$  et non de  $q$

$q$  est remplacé dans la relation générale de diffusion  
par son expression en fonction de  $\sin^2(\theta/2)$

$$q^2 = \left(\frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)\right)^2 = \frac{16\pi^2}{\lambda^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} R_g^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + \dots\right) + 2A_2C + \dots$$

**Expression de la diffusion de la lumière en fonction de  $\theta$**



Pour la concentration  $C_1$ , on fait varier  $\theta$  de  $\theta_1$  à  $\theta_9$  (par exemple) en reportant  $kC + \sin^2(\frac{\theta_i}{2})$

$k$  : constante arbitraire telle que  $k(C/4)=1, k(C/2)=2..$  par exemple.

## Remarque sur le tracé du Zimm-plot

Les petits angles sont souvent source de surdiffusion

- \* soit à cause de poussières : nécessité de travailler avec des solutions très bien filtrées
- \* soit à cause de la présence d'agrégats

Les grands angles sont parfois à éliminer en raison du facteur de forme  $qR_g$ , sortie du régime de Guinier

Quand  $R_g$  est trop grand

et/ou quand la conformation est particulièrement rigide

Attention aux masses molaires très élevées :

$M_w$  est donnée par l'inverse de l'ordonnée à l'origine. Dans le cas de forte  $M_w$  ( $1/M_w$  faible), une petite variation de  $1/M_w$  entraîne une forte variation de  $M_w$  donc une grande incertitude.

Conséquence dans le cas de forte  $M_w$ , le  $A_2$  doit être connu avec une grande précision

$(dn/dc)$  et la concentration sont des paramètres à connaître avec beaucoup de précision

## Concrètement de façon expérimentale

Il faut mesurer le rapport de Rayleigh  $\Delta R(q)$  ou  $\Delta R(\theta)$

On mesure :

$$\Delta R(\theta_{\text{soluté}}) = \Delta R(\theta_{\text{solution}}) - \Delta R(\theta_{\text{solvant}})$$

Le rapport de Rayleigh est un rapport entre l'intensité diffusée mesurée et l'intensité diffusée par une référence connue (Benzène, Toluène...)

$$\Delta I = \frac{I_0}{D^2} \cdot V(\theta) \cdot \Delta R(\theta)$$

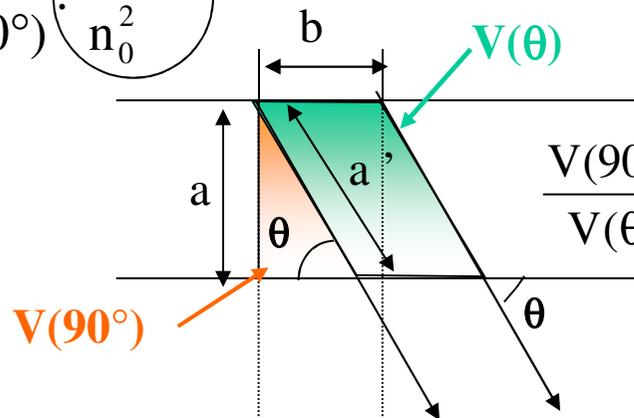
$$I_{\text{réf}} = \frac{I_0}{D^2} \cdot V(90^\circ) \cdot R_{\text{ref}}(90^\circ)$$

V: Volume diffusant à  $q$  et à  $90^\circ$

$$\frac{\Delta I}{I_{\text{ref}}} = \frac{V(\theta)}{V(90^\circ)} \cdot R_{\text{ref}}(90^\circ) \cdot \frac{n_{\text{ref}}^2}{n_0^2}$$

Correction de la convergence  
du faisceau entre la référence  
et la solution

$$\frac{V(\theta)}{V(90^\circ)} = \frac{1}{\sin \theta}$$



$$\frac{V(90^\circ)}{V(\theta)} = \frac{abc}{a'bc} = \frac{a}{a'} = \sin \theta = \alpha$$

c : profondeur du volume

$$\Delta R(\theta) = \alpha \cdot \frac{\Delta I(\theta)}{I_{\text{ref}}(90^\circ)} \cdot \frac{n_0^2}{n_{\text{ref}}^2} \cdot R_{\text{ref}}(90^\circ)$$

Avec  $\alpha = \sin \theta$

## Limites expérimentales

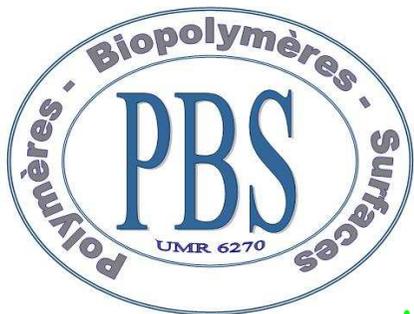
**Diffusion isotrope :** accès à  $M_w$  et  $A_2$ ,  $R_g$  inaccessible (si  $R_g < \lambda/20$ )  
**Diffusion anisotrope :** accès à  $M_w$ ,  $A_2$  et  $R_g$  (si  $R_g > \lambda/20$ )

**Limites sur les  $M_w$  :**  $10^4$  à  $10^7$  g.mol<sup>-1</sup>  
modulées suivant  
les conditions de concentration  
le  $dn/dc$   
la sensibilité de l'appareil :  $\lambda$  et puissance laser

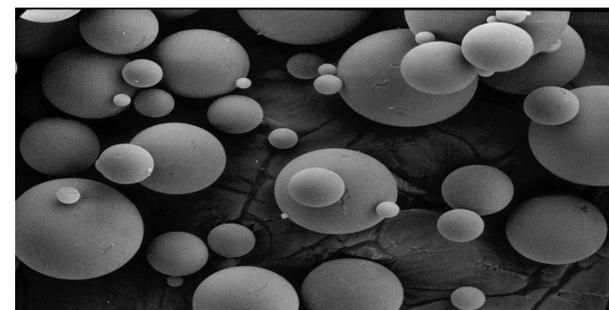
**Limites sur les  $R_g$  :**  $R_g$  minimum : ~15nm (limite d'anisotropie)  
 $R_g$  maximum : ~300nm (limite du régime de Guinier)

**Limites de concentration :**  $I_{\text{diffusée}} \text{ solution} \sim 2 \text{ à } 5 \text{ fois } I_{\text{diffusée}} \text{ solvant}$   
(5 à 10 si le solvant diffuse peu)

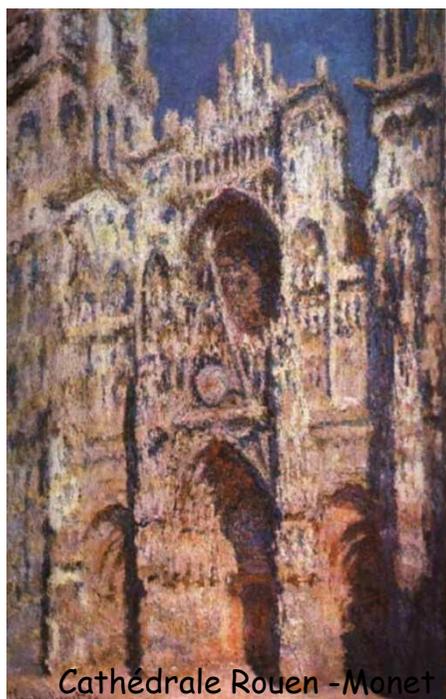
Comme 
$$\Delta I_{\text{dif}} \approx C.M_w.\left(\frac{dn}{dC}\right)^2 \longrightarrow C \approx \frac{5}{M_w 4\left(\frac{dn}{dC}\right)^2}$$



Institut Normand de Chimie  
Moléculaire, Macromoléculaire et Médicinale  
(INC3M)



Systèmes Colloïdaux Complexes



Cathédrale Rouen - Monet

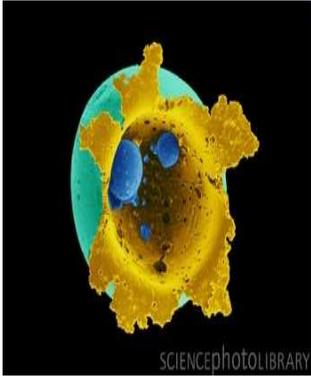


## SEC ou F4 couplée MALLS/QELS/viscosimétrie : application à la caractérisation des polysaccharides

Luc Picton



Journée des Jeunes Polyméristes Lyonnais  
17 septembre 2010



## Problématique :

La caractérisation des polymères en solution notamment des **polysaccharides** est primordiale

### Relation structure/propriétés des polymères

- Fonctionnalisation de polymères  
Pour leur conférer des propriétés spécifiques  
(Associative, stimuli ré pondante, vectorisation...)
- Contrôle des formulations en milieux aqueux

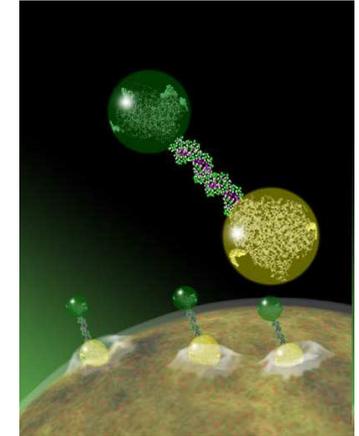
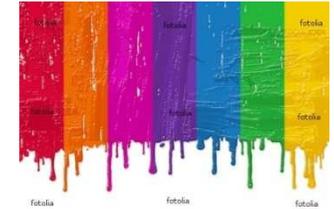


Photo : Pétrole jaillissant naturellement de la roche réservoir sous l'effet de la pression.



### Propriétés visées

Contrôle rhéologique (texture : viscosifiant, gélifiant...)  
 Contrôle des interfaces (émulsions, dispersions...)  
 Système haute technologie : 'smart polymers'



### Applications

Agroalimentaire, cosmétique, forage pétrolier, galénique ('drug delivery'), industrie papetière, peinture...



# Polysaccharides



Déjà intéressant intrinsèquement

Squelette semi-rigide

Forte masse molaire

Neutre ou polyélectrolyte

parfois Auto associatif

Parfois émulsifiant



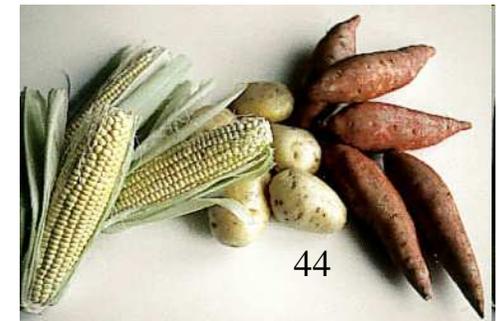
Agent de contrôle  
rhéologique  
(épaississant, gélifiant  
émulsifiant)



Bio ressources (renouvelable)  
Bonne biodégradabilité  
souvent abondant  
Bonne biocompatibilité

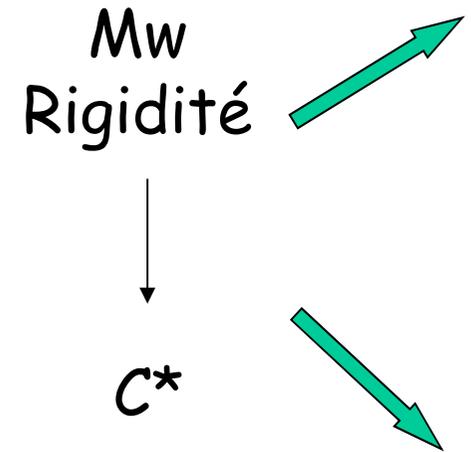
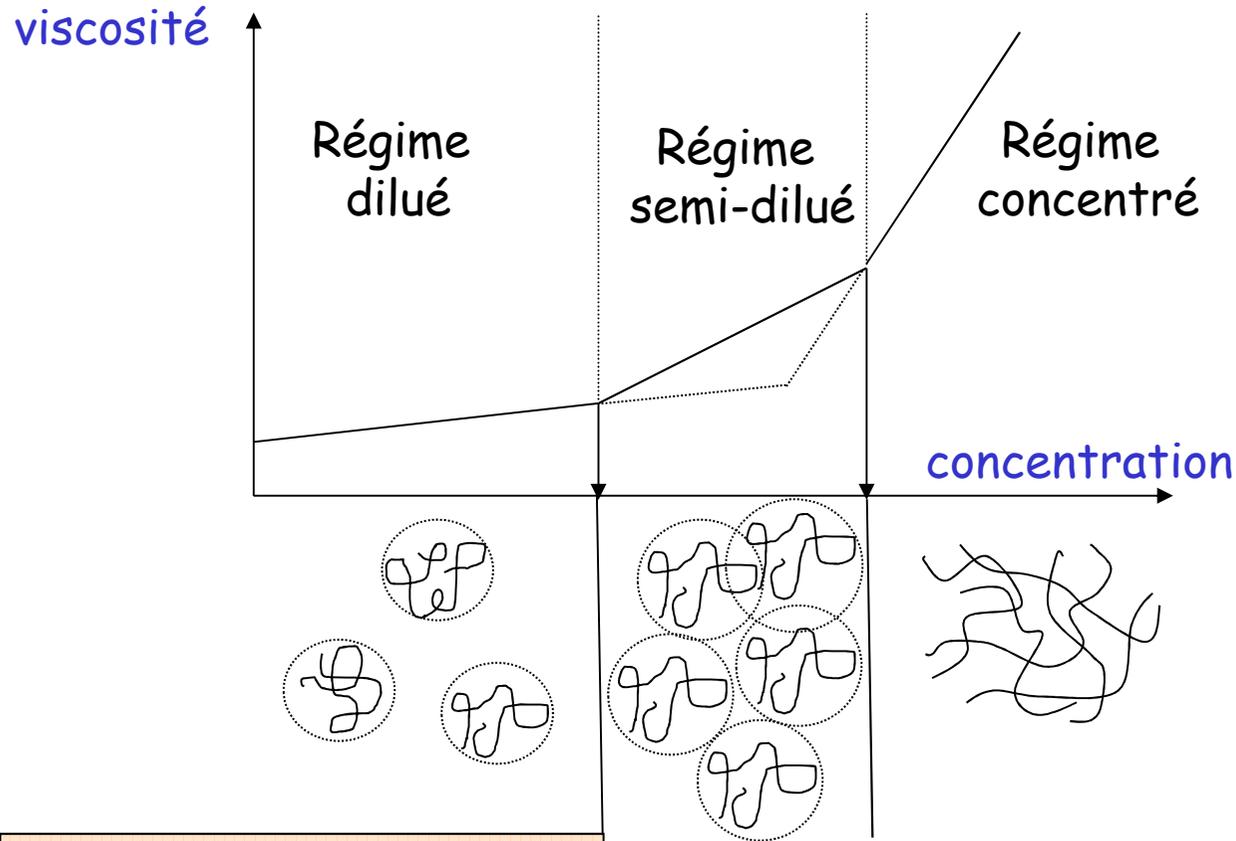


**Bon candidat pour développer**  
**- des 'smart polymers' ou polymères 'intelligents'**  
**- des additifs de formulation 'verts'**



# Exemple : propriétés rhéologiques :

Transition entre régime dilué et semi dilué



en dilué  
Molécule isolée  
Accès à une caractérisation  
intrinsèque  
du couple polymère/solvant



Applications les plus courantes

Quelles sont ces caractéristiques intrinsèques aux polymères en solution?

Les masses molaires moyennes en nombre ( $M_n$ ) ou en poids ( $M_p$  ou ' $M_w$ ')

$$\overline{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad \overline{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

L'indice de polymolécularité ( $I_p$ ) :  $I_p = M_w/M_n$

Les dimensions :

$R_g$  : le rayon de giration

(distances statistiques des éléments  $i$  de la chaîne au barycentre de masse)

$R_h$  : le rayon hydrodynamique

(Rayon de la sphère dure ayant un coefficient de diffusion équivalent)

La viscosité intrinsèque  $[\eta]$

également reliée aux dimensions par la relation de Flory-Fox

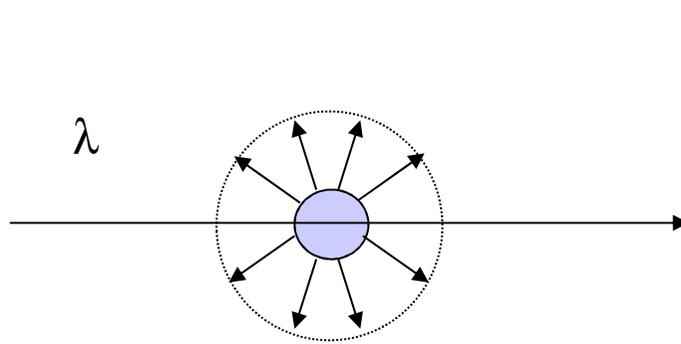
$$[\eta].M \sim V_h$$

# La diffusion de la lumière statique multi angles : MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering)



Basée sur la mesure de l'intensité diffusée par un objet (macromolécule en solution) à différents angles :  $I_\theta$

$I_\theta \sim$  Masse molaire ET de la concentration



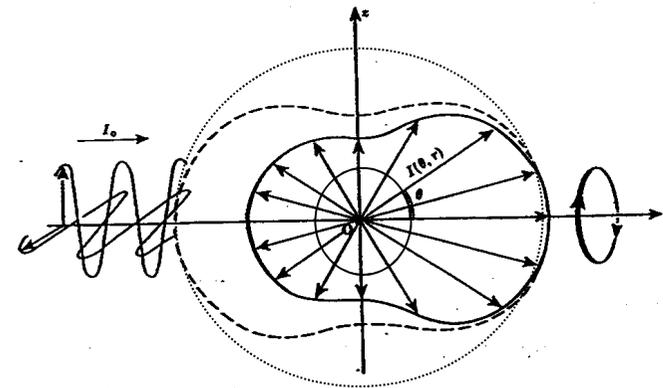
## Diffusion isotrope

l'intensité diffusée est indépendante de l'angle d'observation.

$$qR_g \ll 1$$

$$R_g < \lambda/20$$

Accès Mw mais par  $R_g$



## Diffusion anisotrope

l'intensité diffusée est indépendante de l'angle d'observation.

$$qR_g \leq 1$$

$$R_g > \lambda/20$$

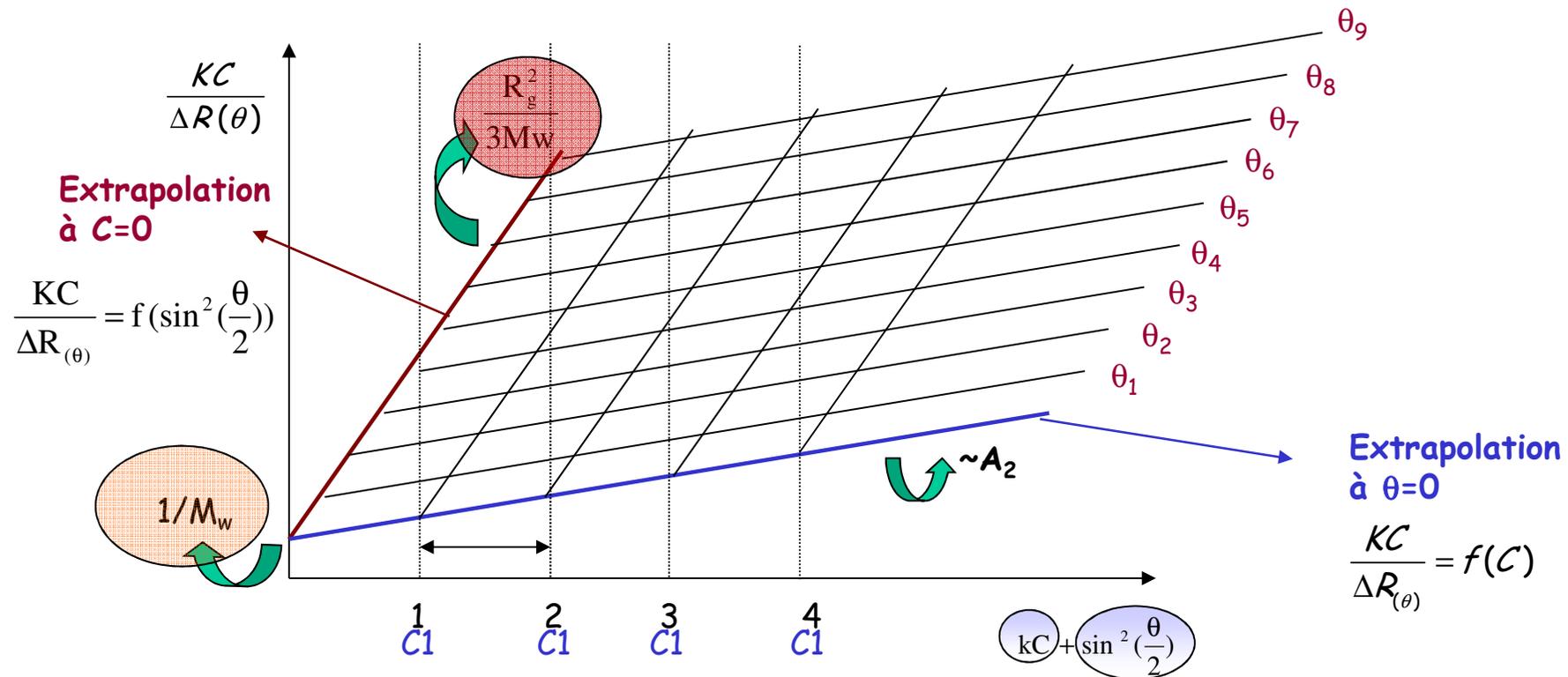
Accès Mw et  $R_g$

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

## Zimm-plot

La quantité de lumière diffusée est directement proportionnelle au produit de la **masse molaire** et de la **concentration** (UV et/ou RI).

La variation d'intensité de lumière diffusée en fonction de l'angle de mesure est proportionnelle à la **taille** des molécules.



$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} R_g^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + \dots \right) + 2A_2 C + \dots$$

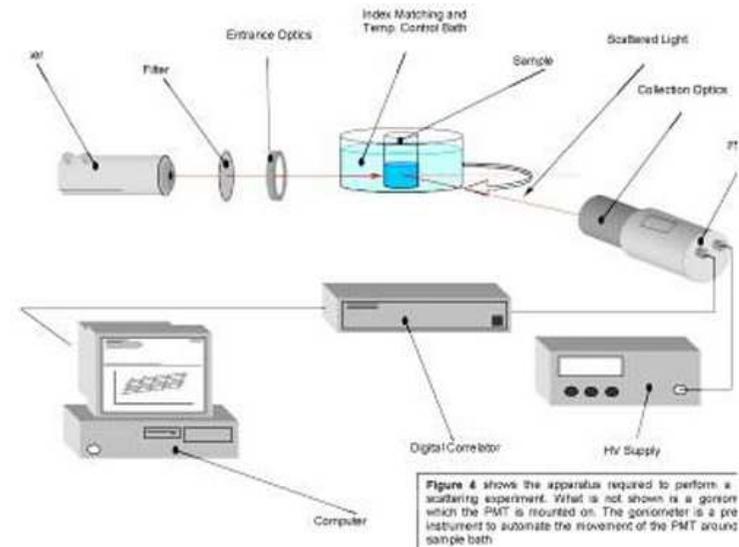
Expression de la diffusion de la lumière en fonction de  $\theta$

# Diffusion de la lumière - MALLS en 'Batch'

**Intérêt** : Accès  $M_w$ ,  $A_2$  et parfois  $R_g$   
(si taille  $> 20-30\text{nm}$ )

Bien adaptée aux polymères  
car sensibilité  $\uparrow$  quand  $M \uparrow$

**Limites** : surtout en milieux aqueux



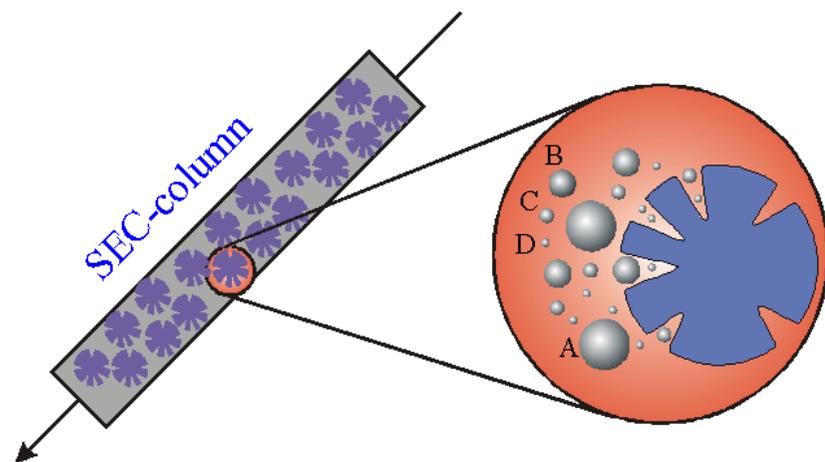
diffusion très sensible surtout aux petits angles

- Poussières : nécessité de toujours filtrer (mini sur  $0,45\mu\text{m}$ )
- Présence d'agrégats qui faussent le résultat final  
surestimation de  $M_w$
- Impossibilité de quantifier en quantité et en  $M_w$  les éventuels agrégats ou la présence d'autres composés macromoléculaires
- Impossibilité d'accéder à  $M_n$  donc pas d'info sur la polymolécularité



**Solution : couplage MALLS  
avec une technique de séparation stérique  
SEC ou Size Exclusion Chromatography**

SEC seule :

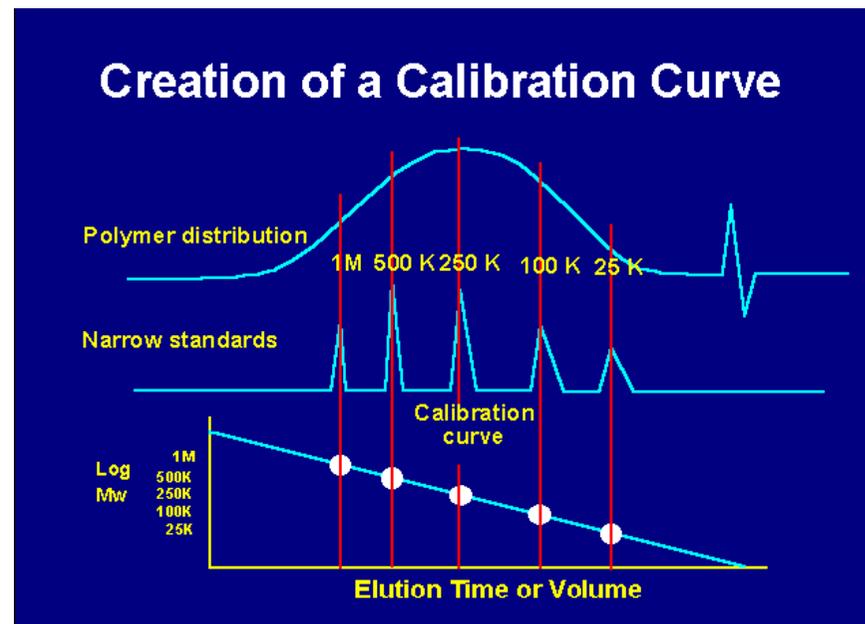


Si séparation gaussienne :

On applique

$$\overline{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad \overline{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

Ip, distribution des espèces



**Il faut affecter à chaque Volume d'éluion  
(i.e. un volume hydrodynamique du polymère)  
Une masse molaire**



**Nécessite un étalonnage - source d'erreur**

## SEC seule :

**Limites** : - choix des colonnes (limite d'exclusion, phase stationnaire, hautes pressions)

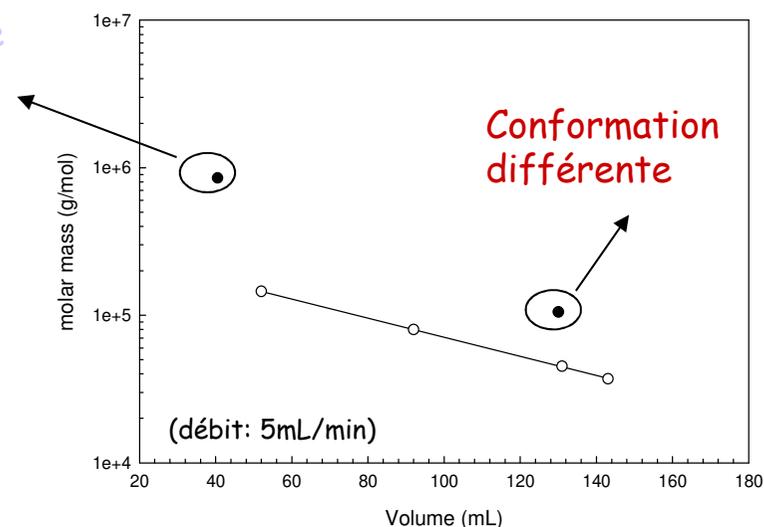
- choix des étalons utilisés pour la calibration

### Exemple

temps de rétention sur gel Séphadex™ de protéines dont on connaît M.

	M (g/mol)	T rétention (min)
Thyroglobuline	850 000	8.1
Aldolase	145 000	10.4
Porine	105 000	26
Phosphatase alcaline	80 000	18.4
Ovalbumine	45 000	26.2
lactoglobuline	37 100	28,6

Hors gamme stérique



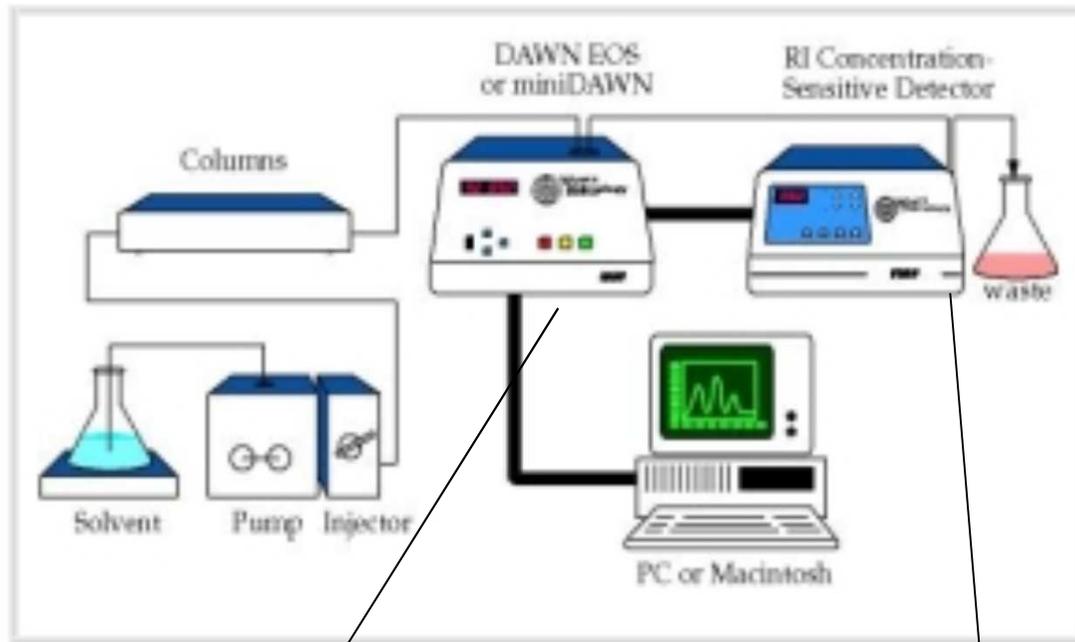
Conclusion : les étalons et le composé à analyser doivent **IMPERATIVEMENT**  
Avoir la même conformation pour pouvoir associer  
Volume d'élution ~ masse molaire

SEC intéressante du point de vue de la séparation  
MALLS intéressante du point de vue de l'analyse

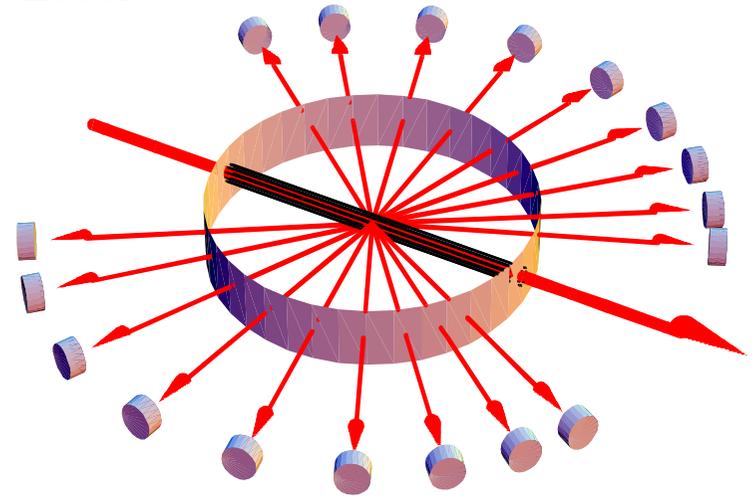


Couplage SEC/MALLS

# Couplage SEC/MALLS/DRI



Laser

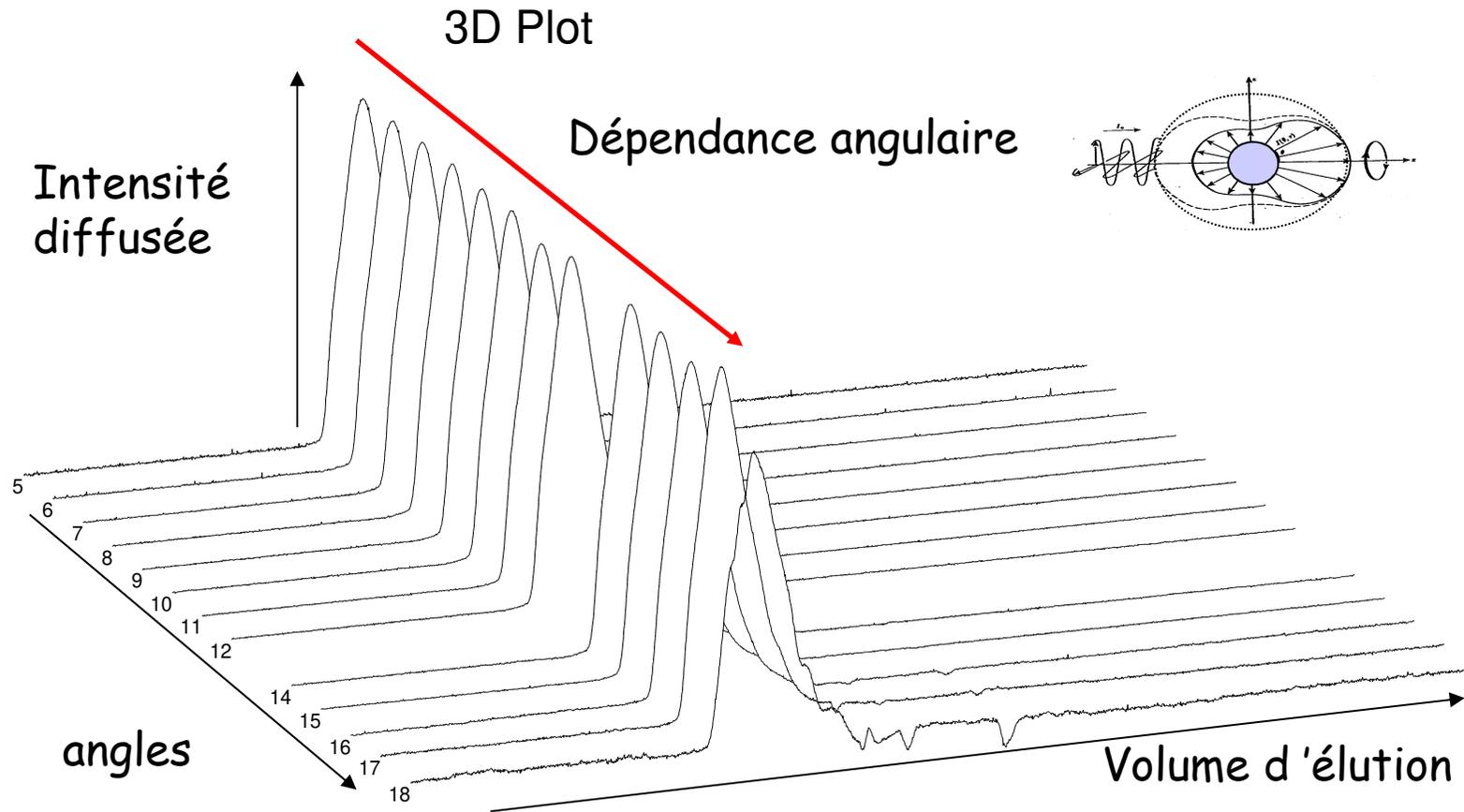


$$\frac{KC}{\Delta R(q)} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{q^2}{3} R_g^2 + \dots \right) + 2A_2 C + \dots$$

**Expression de la diffusion de la lumière**

Avec K, la constante optique  $K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4} \cdot \left( \frac{dn}{dC} \right)^2 \cdot \frac{1}{N_A}$  et q, la fonction d'onde  $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$

# Couplage SEC/MALLS/DRI



# Couplage SEC/MALLS/DRI

## Exemple sur une gomme arabique

polysaccharide exsudat de l'acacia Sénégal : agent émulsifiant, stabilisant E414



Crème Cuisine Amande (200ml) -- ECOMIL

**Composition:** Eau, huile d'amande\*, amandes\*7%, sirop d'agave\*, lécithine de tournesol, gomme de xanthane, gomme arabique, sel marin, arôme d'amande\*.



## 2 populations :

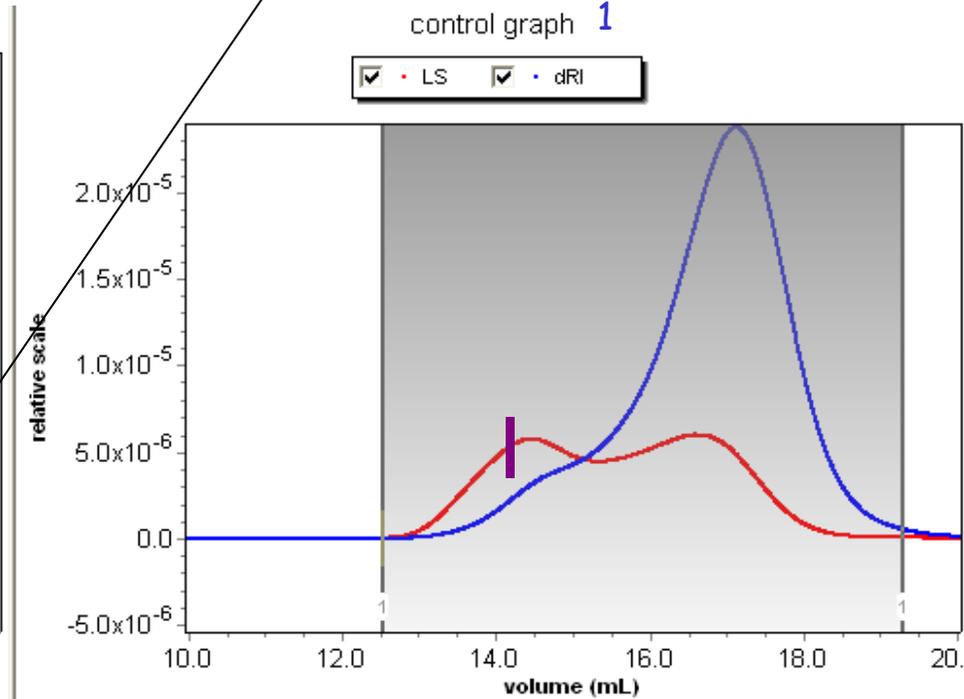
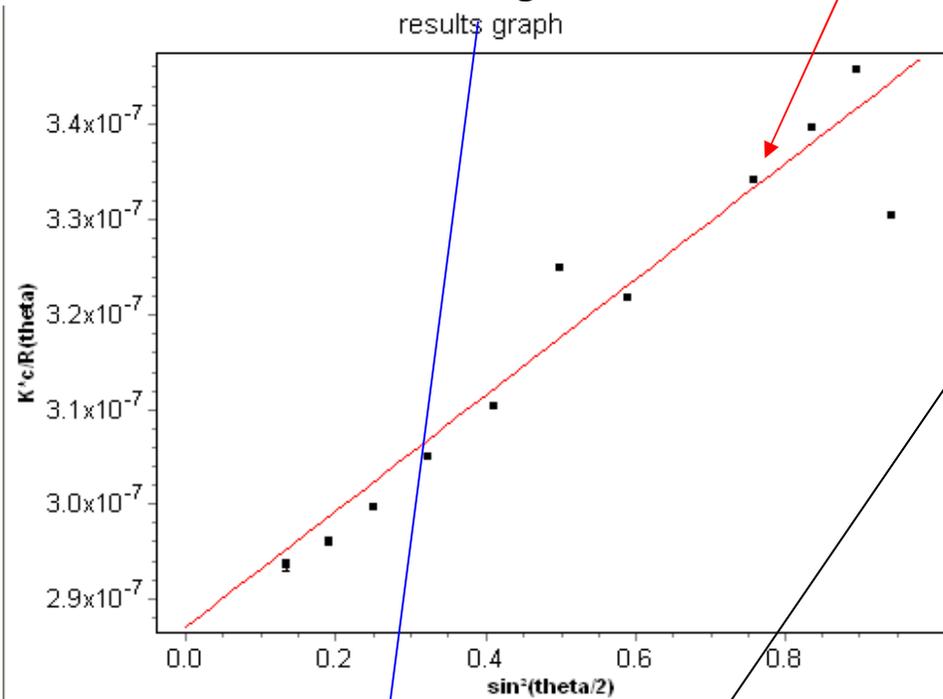
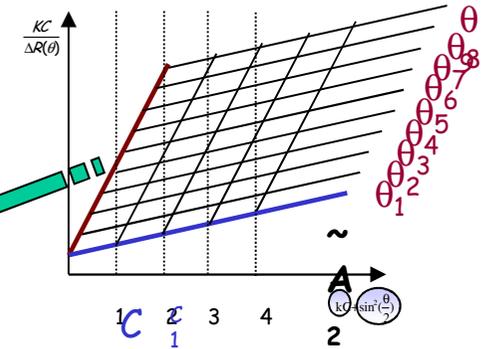
- 1- arabino-galactanes (polysaccharides très ramifiés et chargés négativement)
- 2- arabino-galactanes / protéines ou AGP (glyco-protéines amphiphiles ~ émulsifiant)

# Couplage SEC/MALLS/DRI

En entrée de pic

Chaque fraction éluée correspond à une concentration très faible

Le Zimm-plot donne directement la dépendance angulaire à  $C \sim 0$  :  
on obtient alors  $M$  et  $R_g$

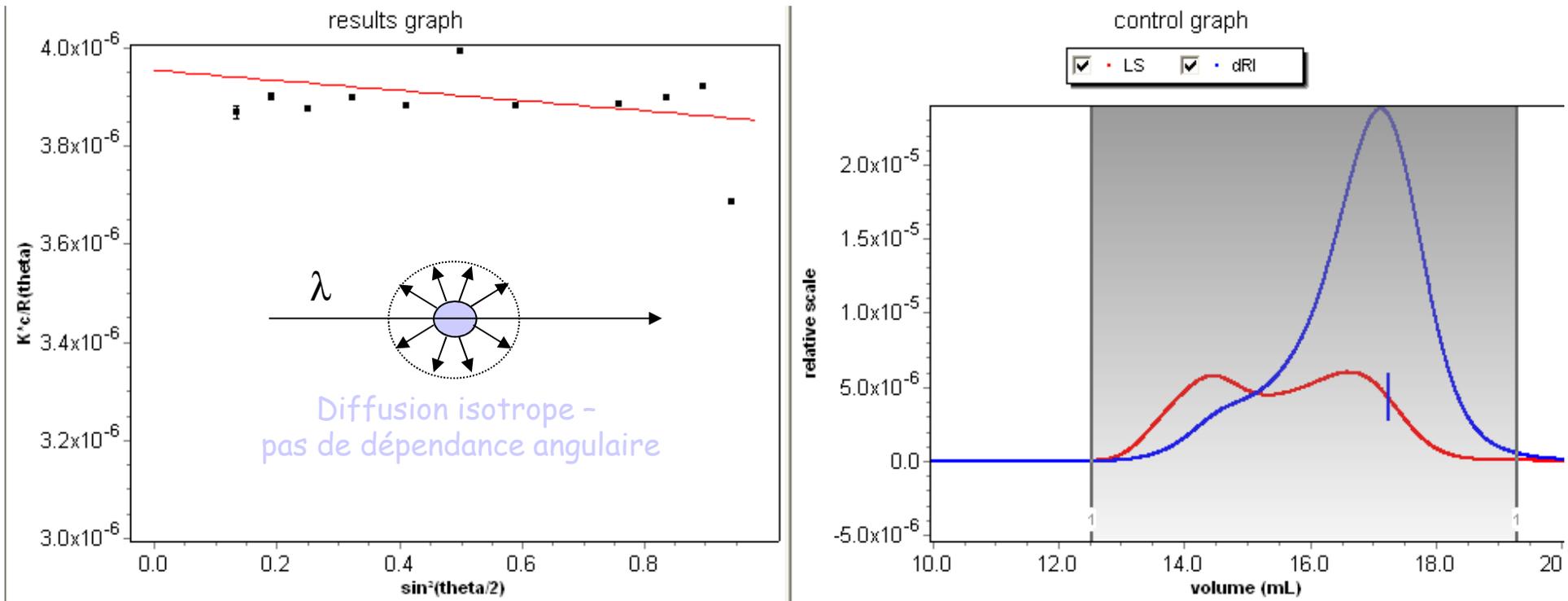


	Value
Molar Mass	$(3.526 \pm 0.052) \times 10^6$ g/mol
rms radius	$33.0 \pm 1.9$ nm
Peak Number	1
Slice Index	1113
Model	Zimm
Fit Degree	1
Abscissa Position	14.267 mL
Concentration	$(1.747 \pm 0.010) \times 10^{-5}$ g/mL
dn/dc	0.141 mL/g

Faible volume élution, fort  $V_h$  : dépendance angulaire  
 $R_g = 33 \pm 2$  nm  
 $M = 3,5M \text{ g.mol}^{-1}$   
 $C_i = 1,7 \cdot 10^{-5} \text{ g.mL}^{-1}$

# Couplage SEC/MALLS/DRI

Gomme arabique  
en sortie de pic ...

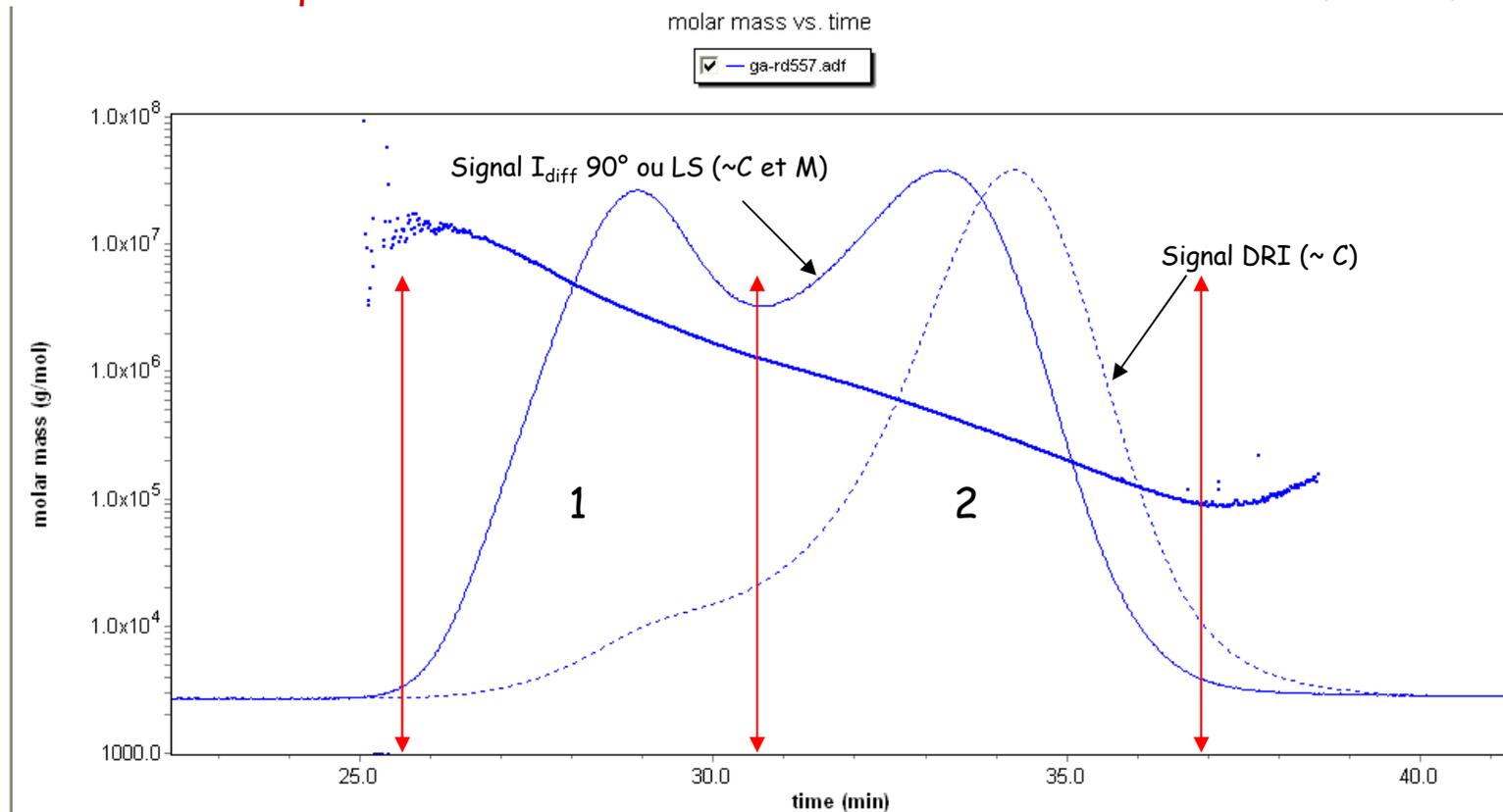


	Value
Molar Mass	$(2.550 \pm 0.038) \text{ e}+5 \text{ g/mol}$
rms radius	$0.0 \pm 0.0 \text{ nm}$
Peak Number	1
Slice Index	1471
Model	Zimm
Fit Degree	1
Abscissa Position	17.250 mL
Concentration	$(1.658 \pm 0.001) \text{ e-4 g/mL}$
dn/dc	0.141 mL/g

Fort volume d'élution, faible  $V_h$   
Plus de dépendance angulaire : pas de  $R_g$  possible  
 $M = 250\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

# Couplage SEC/MALLS/DRI

## Gomme Arabique : distribution des masses molaires et accès aux Mn et Mw



Confirme les 2 populations :

1 AGP : faible signal DRI (donc faible C)  
+ fort signal LS (~ C et M : donc fortes masses molaires )

2 AG : Fort signal DRI (donc forte C)  
Signal LS ~ signal LS de la population 1 : donc plus faibles masses molaires

# Couplage SEC/MALLS/DRI

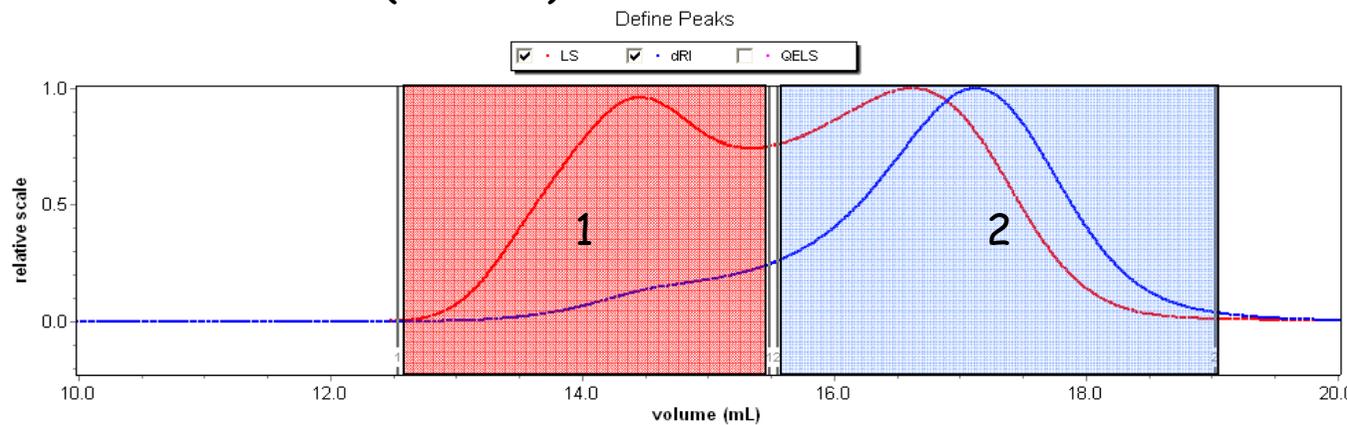
## Gomme Arabique : expressions des résultats Mn et Mw

Sur chaque fraction éluée i  
 DRI donne Ci donc ni  
 LS donne Mi

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad \bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad \text{Et } I_p = M_w / M_n$$

En intégrant sur chaque population (1 et/ou 2)

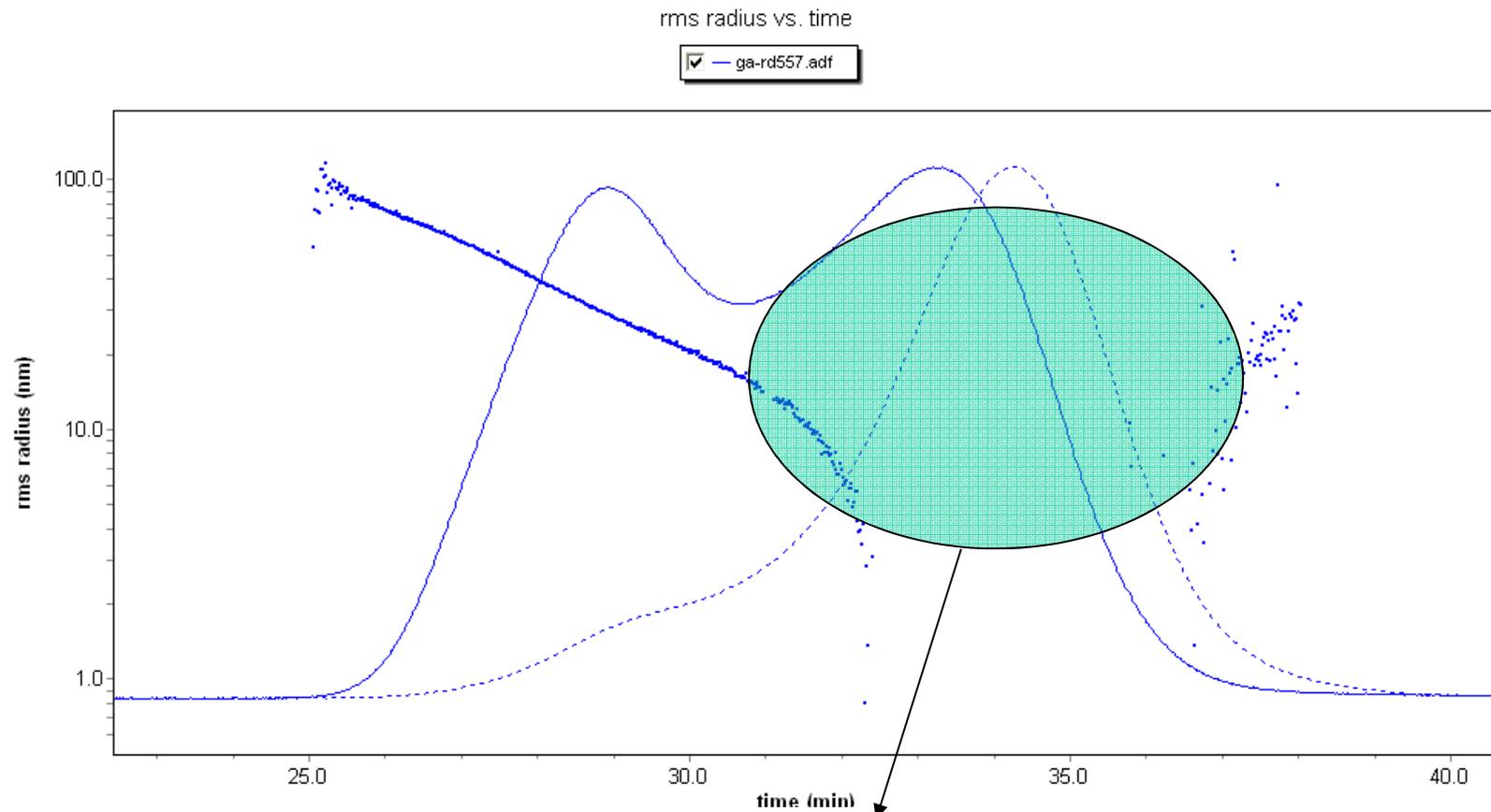
- ⇒ Mn et Mw
- ⇒ % en concentration (via DRI)



	Mn g.mol <sup>-1</sup>	Mw g.mol <sup>-1</sup>	Ip	%
1+2	280 000	650 000	2.3	100
1 AGP	1 900 000	2 600 000	« 1.3 »	12
2 AG	250 000	370 000	« 1.4 »	88

# Couplage SEC/MALLS/DRI

## Gomme arabique : Distribution des dimensions - Rayon de giration



Diffusion isotrope - Pas de dépendance angulaire à partir de 20nm ( $< \lambda/20$ )

Conséquence :  
Accès impossible aux  $R_g$  moyen

Sauf sur la population 1 :  $R_{g_w} \sim 27\text{nm}$

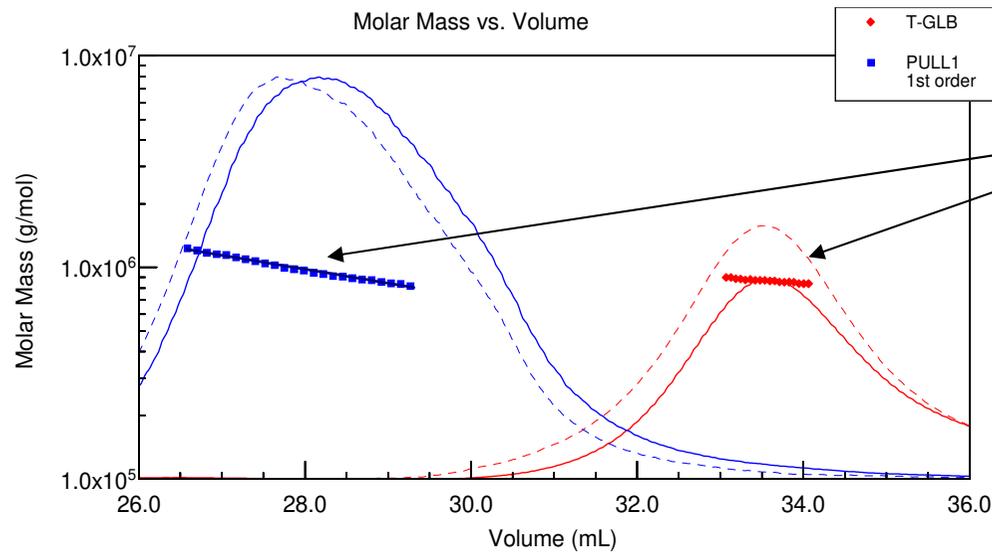
# Importance de la diffusion de la lumière (MALLS) couplée à la SEC - pas d'étalonnage

Exemple : 2 échantillons :

**pullulane** : polysaccharide en **pelote statistique**

**thyroglobuline** : protéine plutôt **compacte**

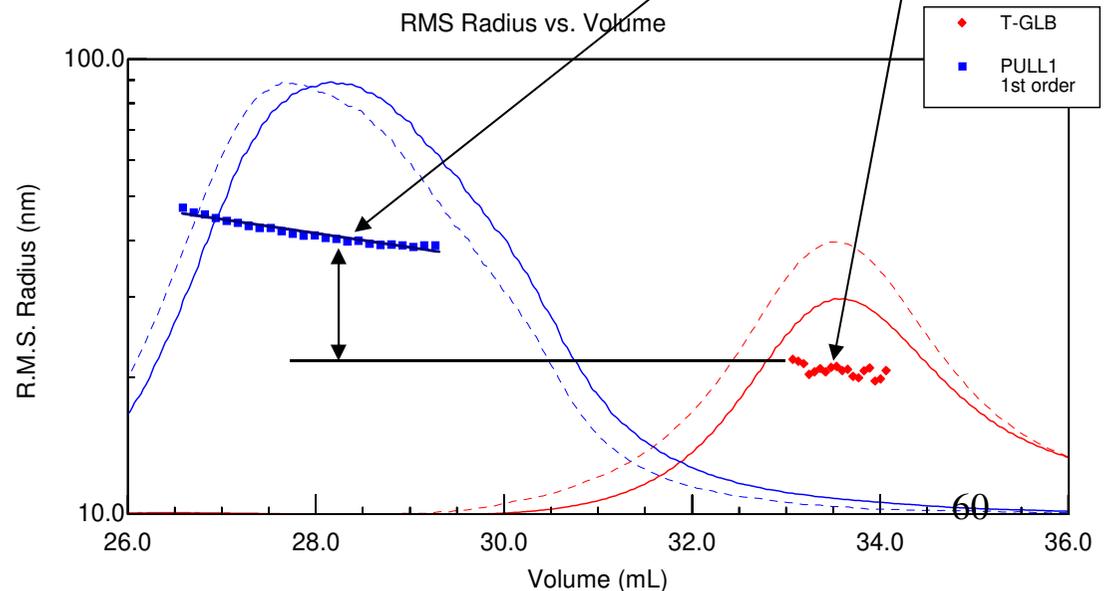
Même masse molaire  $\sim 1\text{M g.mol}^{-1}$



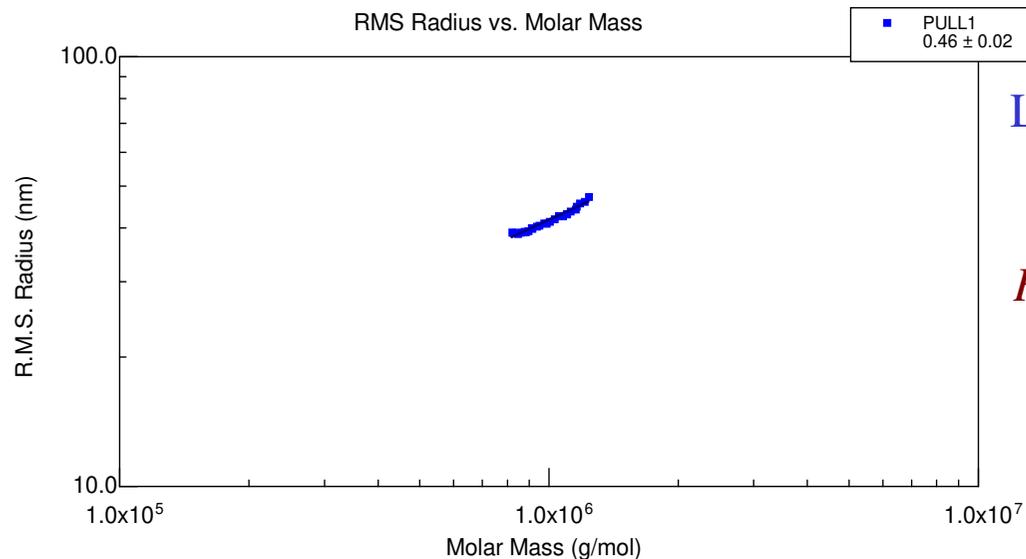
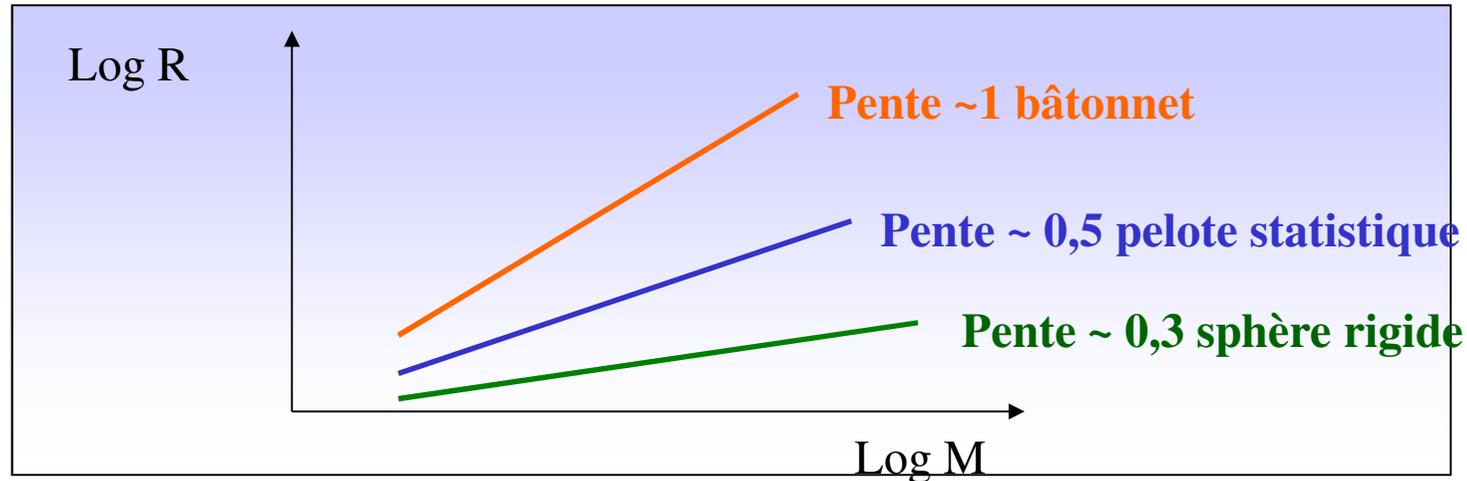
Même masse molaire  
Volume d'éluion  $\neq$   
donc Volume Hydrodynamique  $\neq$

**A masse molaire égale  
le pullulane est plus volumineux  
que la thyroglobuline**

**Le couplage permet  
de bien caractériser un mélange  
contenant les 2 macromolécules**



L'information concernant la conformation est accessible en traçant  $R_g = f(M)$  en échelle bi logarithmique

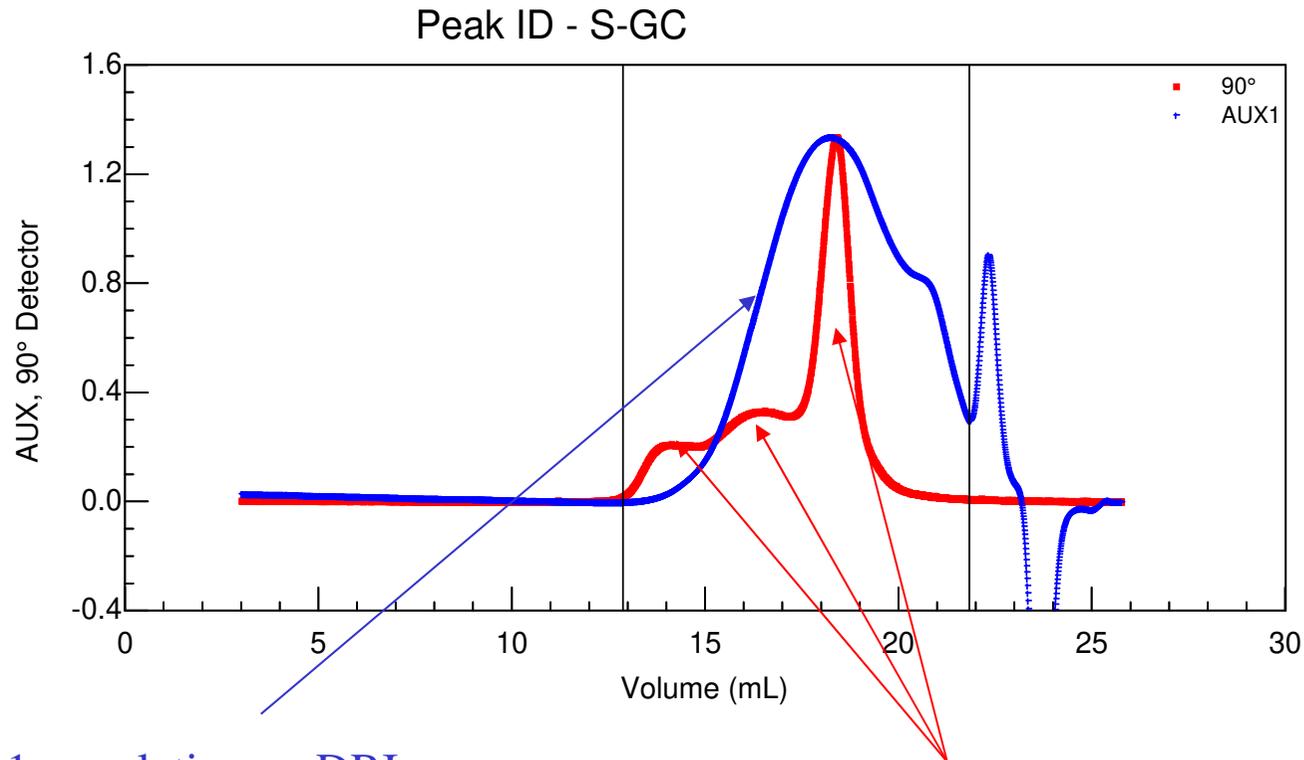


Le pullulane présente bien une conformation de type pelote statistique

*Rq : Pour la thyroglobuline il est impossible d'accéder à cette information car il n'y a pas de polymolécularité pour une protéine (Masse molaire définie par le nombre d'acides aminés)*

## Exemple d 'application : Analyse SEC/MALLS d'un extrait végétal

contenant essentiellement des arabino-xylanes (polysaccharides) et dans lequel on sait qu 'il co-existe une protéine en faible quantité.

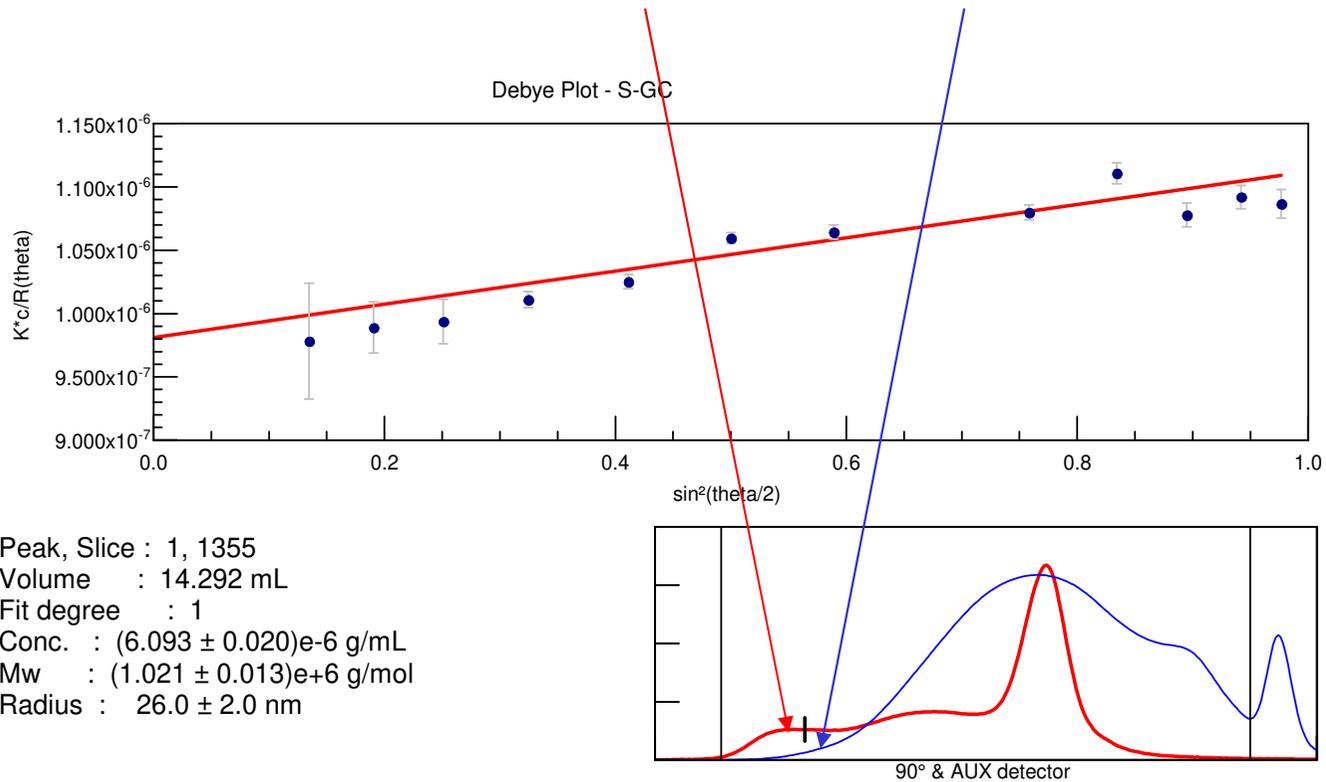


1 population en DRI  
(2 avec le léger épaulement en sortie de pic)

3 populations en DDL  
(la 3ème (19mL) très fine,  
diffuse beaucoup)

# 1<sup>ère</sup> population DDL (exemple fraction 1355)

Signal DDL quantifiable, signal DRI quasi nul :



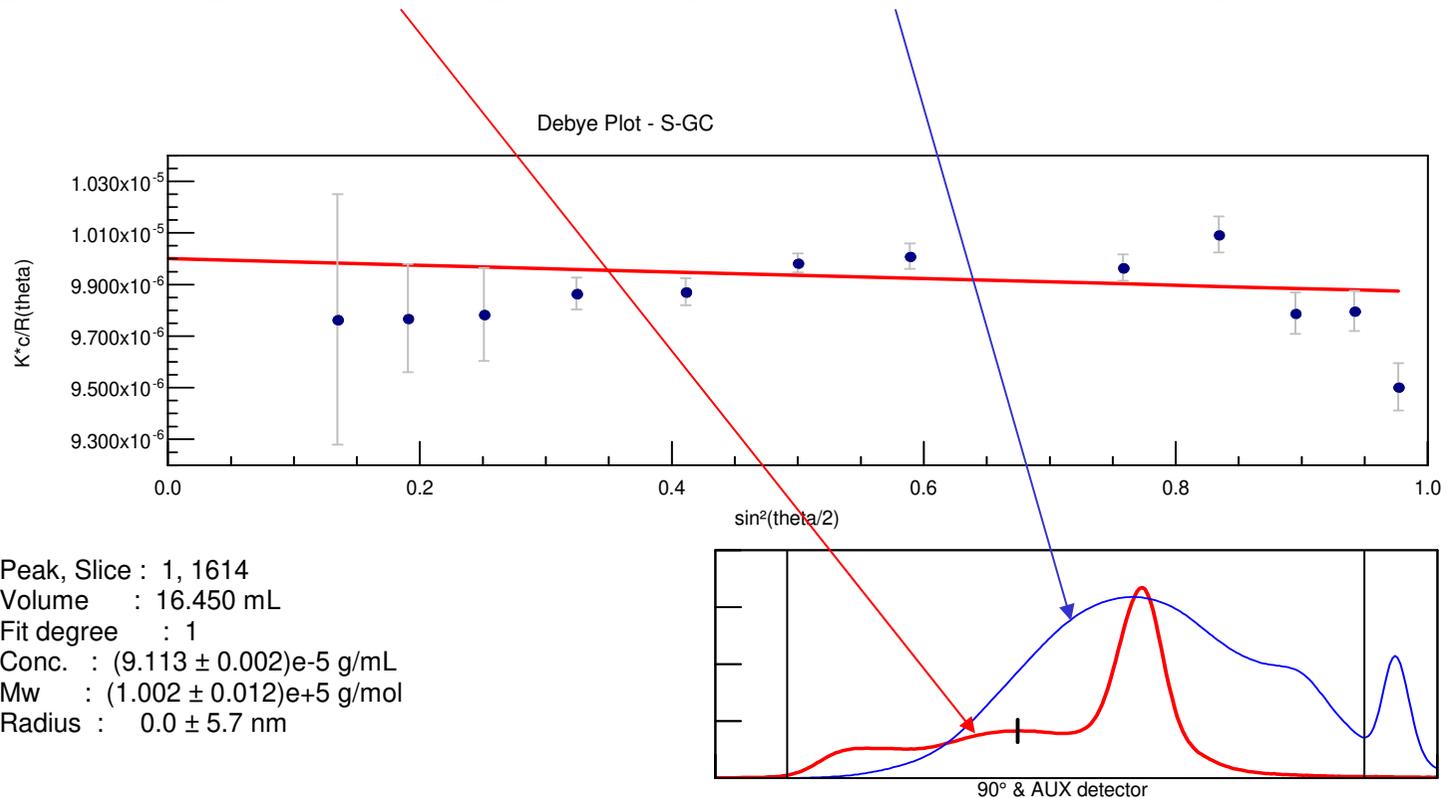
objet de très forte masse présent en quantité très faible (agregats d'arabino-xylan?)

sur cette fraction :

Masse molaire  $M=1M$  g.mol<sup>-1</sup>,  $R_g \sim 26$ nm

## 2<sup>ème</sup> population DDL (exemple fraction 1614)

Signal DDL quantifiable, signal DRI quantifiable mais très étalé (polymoléculaire)



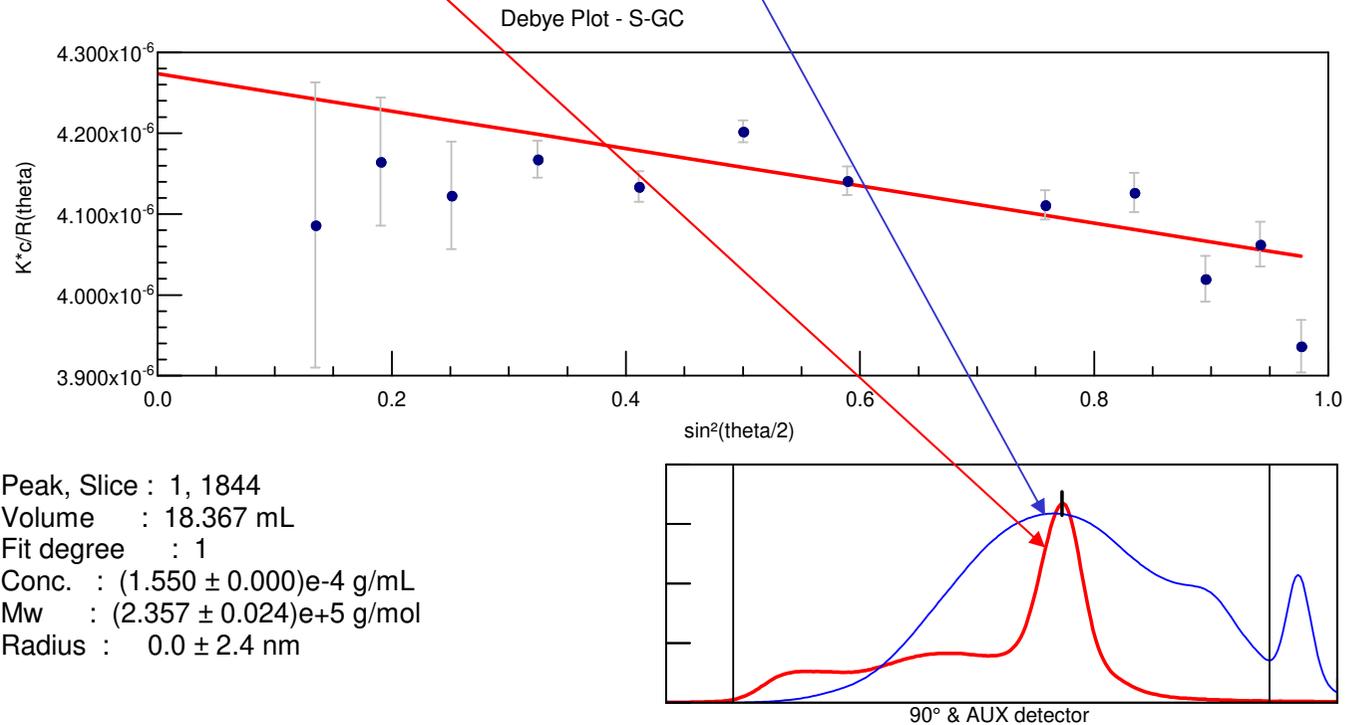
objet très polymoléculaire, présent en quantité très importante (arabino-xylan)

sur cette fraction :

Masse molaire  $M=100\,000$  g.mol<sup>-1</sup>,  $R_g$ ~inaccessible (trop petit diffusion isotrope)

### 3<sup>ème</sup> population DDL (exemple fraction 1844)

Signal DDL très important, signal DRI « noyé » dans le signal de la population 2



Cette espèce surdiffusante est très probablement **la protéine** :  
elle sort au milieu de polysaccharides de masse  $< 100\,000$  g.mol<sup>-1</sup>  
bien qu'elle soit sans aucun doute de masse très  $>$  à  $100\,000$ g.mol<sup>-1</sup>  
Cl : sa conformation est beaucoup plus compacte que celle du polysaccharide

*Rq : la masse molaire de la protéine est fautive car la concentration de la protéine est polluée de la concentration du polysaccharide (dn/dc différent)*

## Problèmes rencontrés dans le couplage SEC/MALLS

Venant du MALLS :

\* Masse molaire trop importante

Le régime de concentration doit être dilué ( $C < C^*$ )

Si  $C^*$  est très petit (masse forte), le signal DRI est alors trop faible

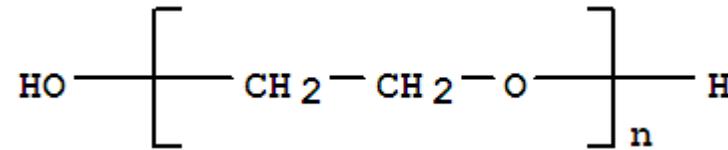
\* Le rayon de giration est aussi trop important

en conséquence les grands angles deviennent inexploitable

(domaine de Guinier)

ou bien ils entraînent une forte incertitude sur les masses calculées  
(rappelons que  $M$  est donnée par l'inverse de l'ordonnée à l'origine)

Exemple POE ( $\sim 4\text{M g.mol}^{-1}$ )



1-très forte masse :

difficulté du choix du nombre d'angles  
(dépendance angulaire)

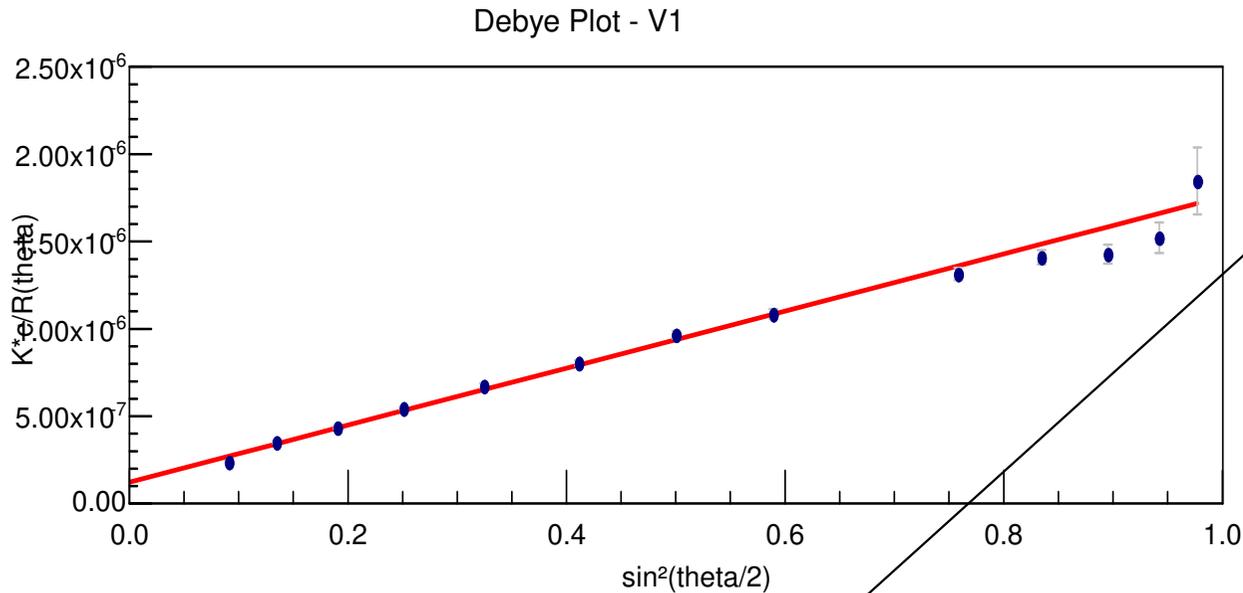
2-très faible concentration (100ppm) :

sensibilité limite en DRI et en DDL

induit une mauvaise précision en entrée et en sortie de pic  
(dépend des conditions de « propreté » de la cellule)

# Influence de la dépendance angulaire pour une fraction de forte masse molaire

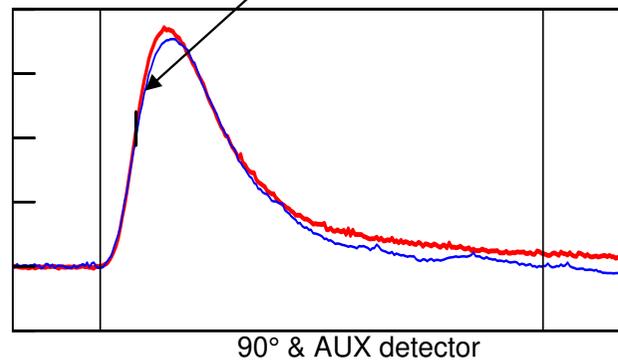
Analyse entre 35° et 162°

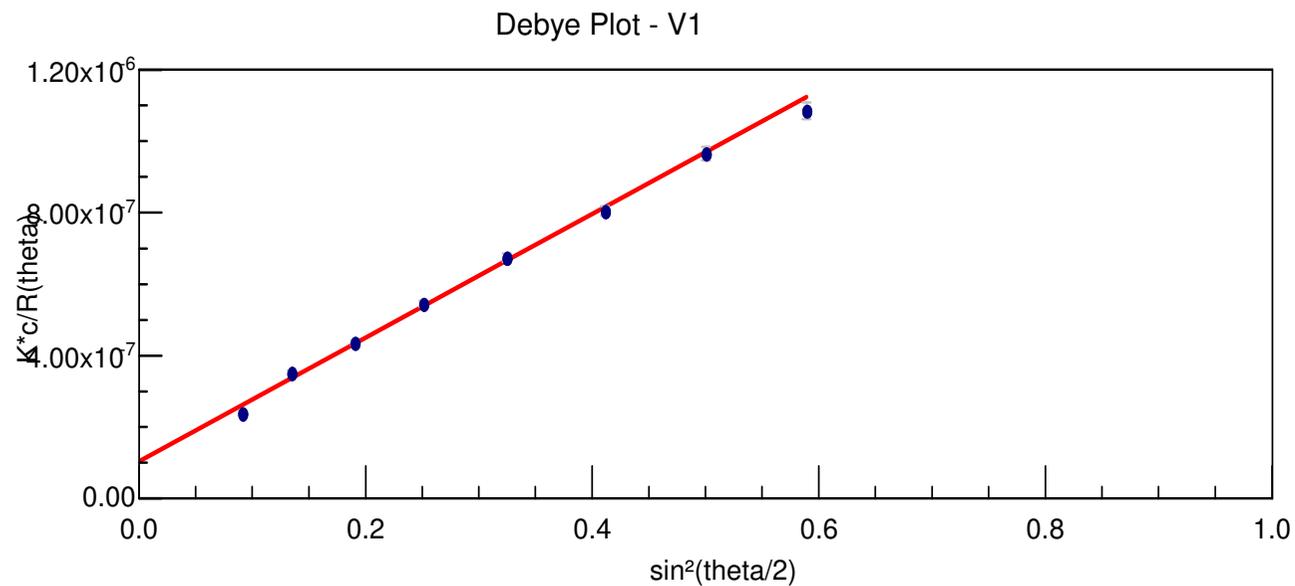


Fraction 830  
M=8,3M g/mol

M<sub>w</sub>=5,6M  
M<sub>n</sub>=4.8M

Peak, Slice : 1, 830  
Volume : 11.917 mL  
Fit degree : 1  
Conc. : (2.454 ± 0.029)e-6 g/mL  
M<sub>w</sub> : (8.292 ± 0.856)e+6 g/mol  
Radius : 262.0 ± 3.8 nm

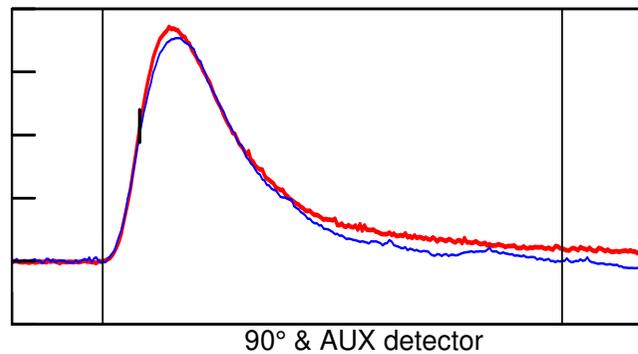




Analyse entre  
35° et 100°

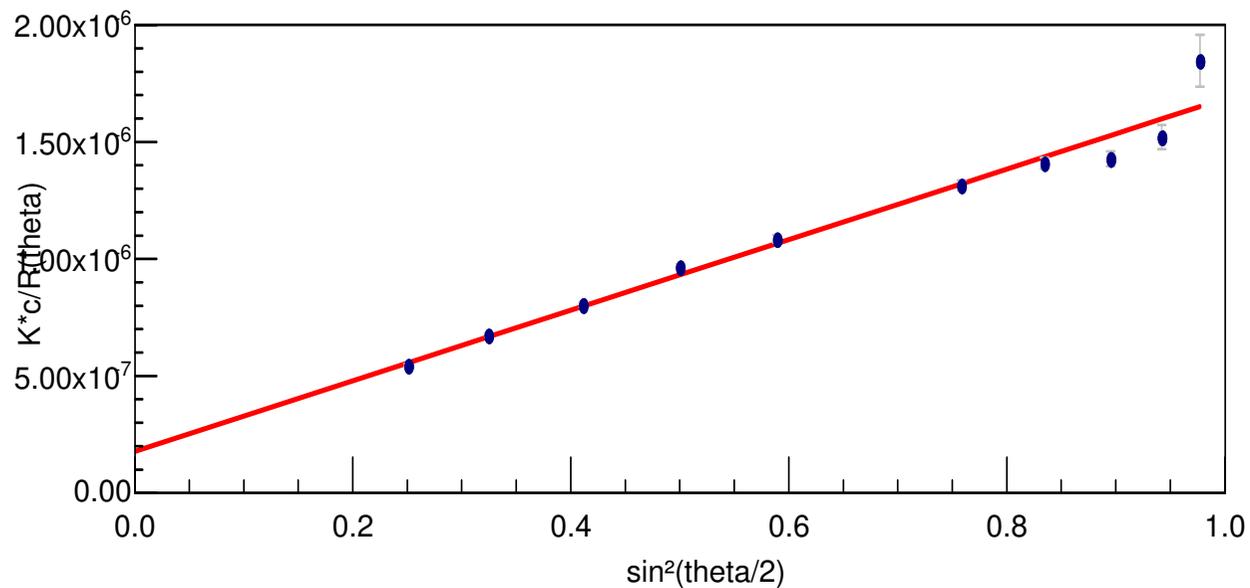
Fraction 830  
M=9,7 g/mol

Peak, Slice : 1, 830  
Volume : 11.917 mL  
Fit degree : 1  
Conc. :  $(2.454 \pm 0.029)e-6$  g/mL  
Mw :  $(9.755 \pm 1.168)e+6$  g/mol  
Radius :  $292.7 \pm 4.5$  nm



Mw=7,4M  
Mn=5,9M

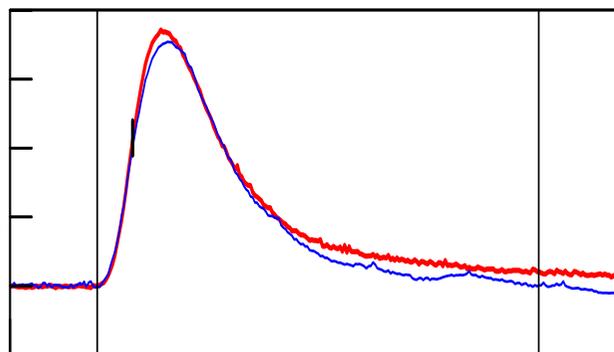
Debye Plot - V1



Analyse entre  
60° et 162°

Fraction 830  
M=5,6 g/mol

Peak, Slice : 1, 830  
Volume : 11.917 mL  
Fit degree : 1  
Conc. :  $(2.454 \pm 0.029)e-6$  g/mL  
Mw :  $(5.655 \pm 0.563)e+6$  g/mo  
Radius :  $207.8 \pm 3.0$  nm



Mw=3.8M  
Mn=3,3M

Les résultats en masses molaires moyennes peuvent varier de façon très sensible en fonction des angles utilisés

pour les polymères de grands volumes hydrodynamiques (grandes masses), il est recommandé d'utiliser plutôt les petits angles ( en théorie  $qR_g < 1$ )

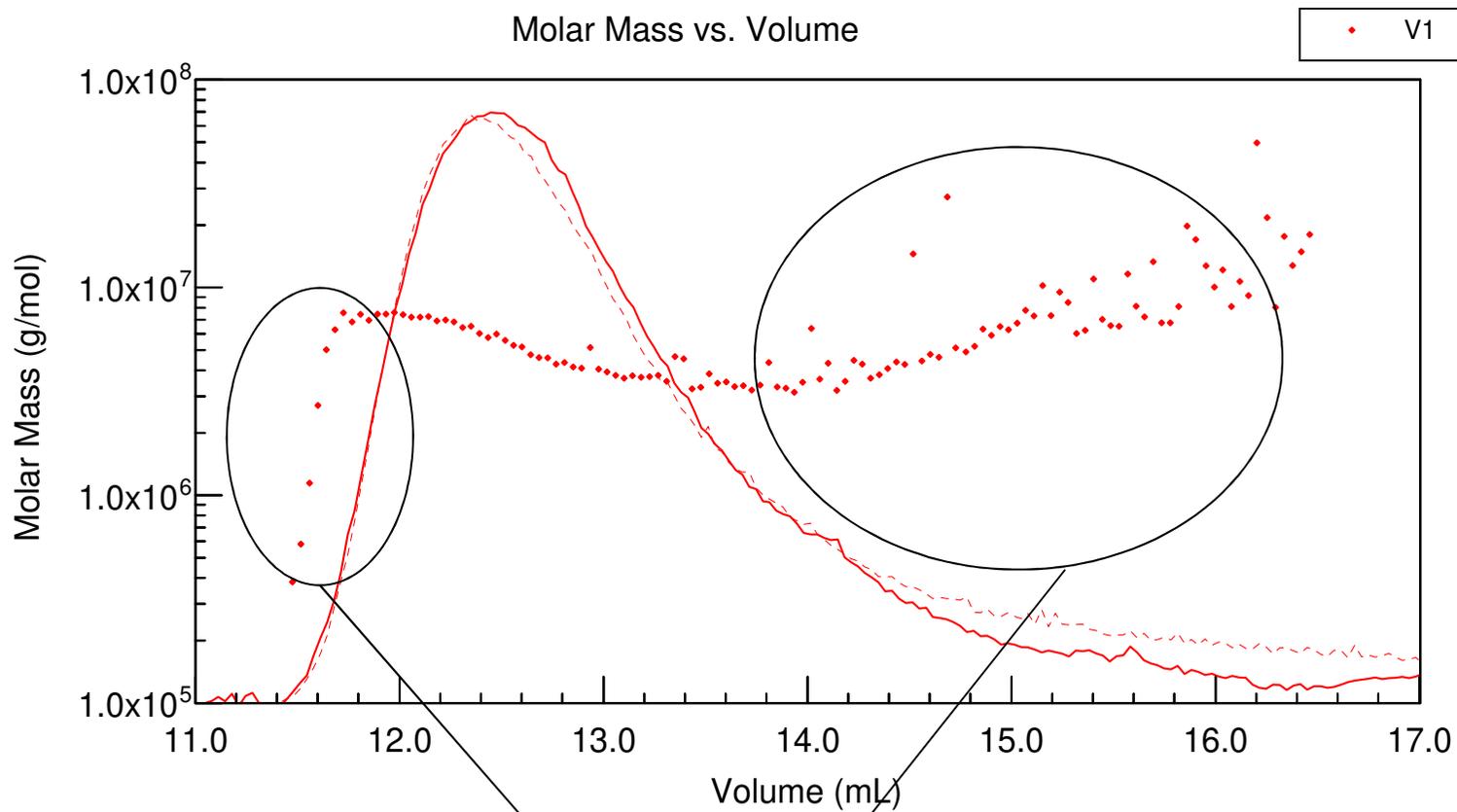
$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Vecteur d'onde}$$

Exemple : avec un  $R_g$  de 100nm environ (ordre de grandeur du POE)

on obtient un angle max de  $70^\circ$  environ

**Problème : pour les petits angles, le bruit de fond augmente beaucoup et le rapport signal/bruit est faible pour des solutions à 100ppm : donc il faut augmenter la concentration**

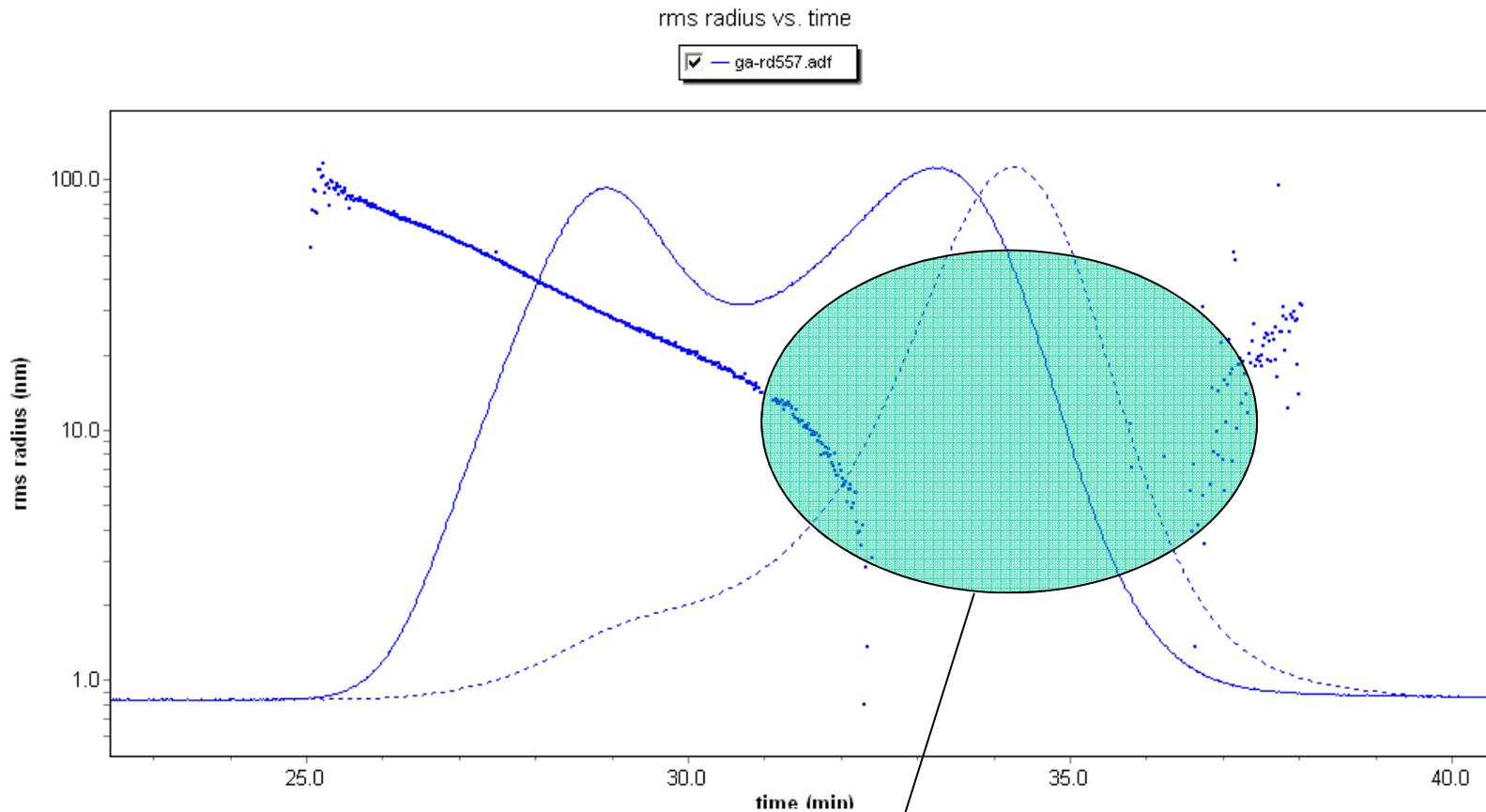
sensibilité en DRI et DDL faible  
surtout en entrée et en sortie de pic



Pas assez de signal DRI et DDL

# Couplage SEC/MALLS/DRI

## Gomme arabique : Distribution des dimensions - Rayon de giration



Diffusion isotrope - Pas de dépendance angulaire à partir de 20nm ( $< \lambda/20$ )

Conséquence :  
Accès impossible aux  $R_g$  moyen

Sauf sur la population 1 :  $R_{g_w} \sim 27\text{nm}$

Quelle solution?

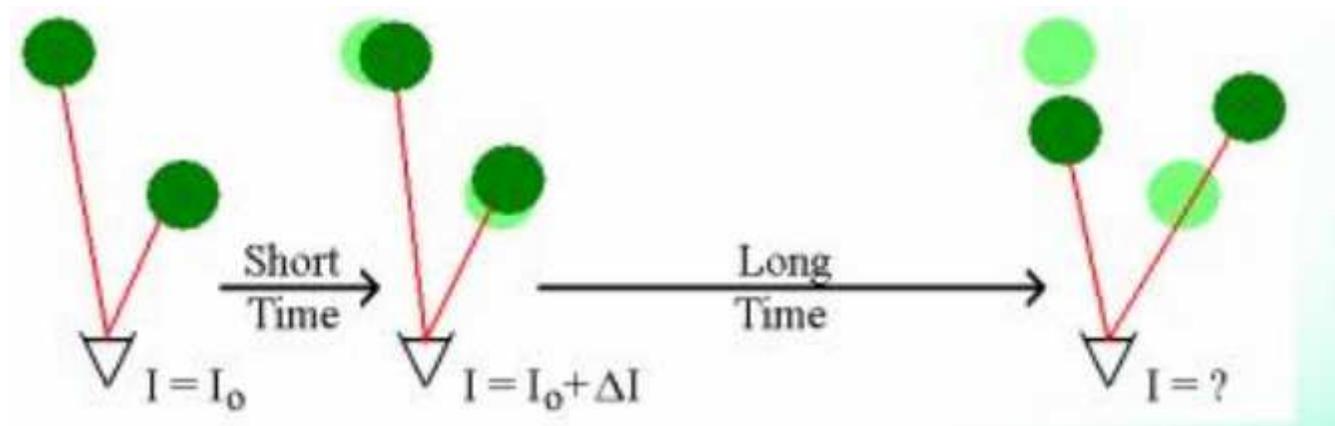
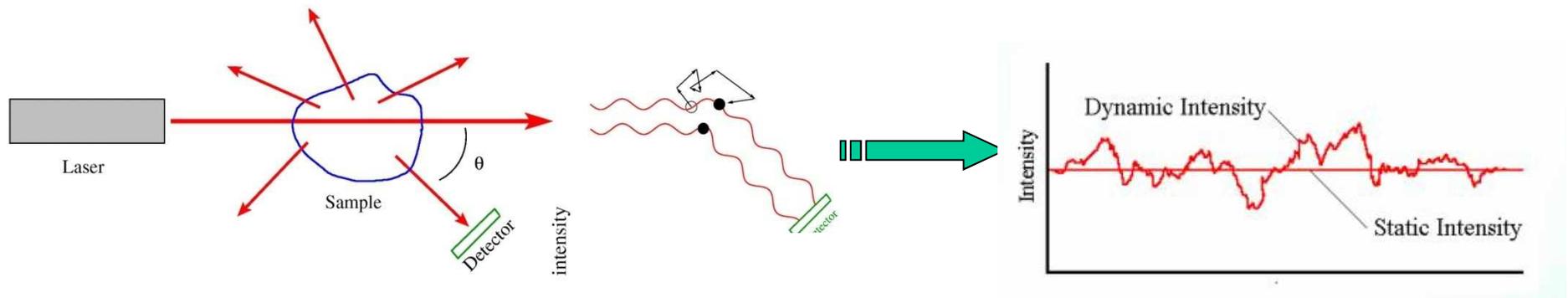
-QELS- 73

## Accès aux tailles petites en cas de diffusion isotrope :

Diffusion Quasi Elastique de la lumière (QELS ou Quasi Elastic Light Scattering)

Principe :

on analyse les **fluctuations temporelles de l'intensité diffusée** à un angle  $\theta$  donné, provoquées par **les mouvements browniens** de la particule diffusante



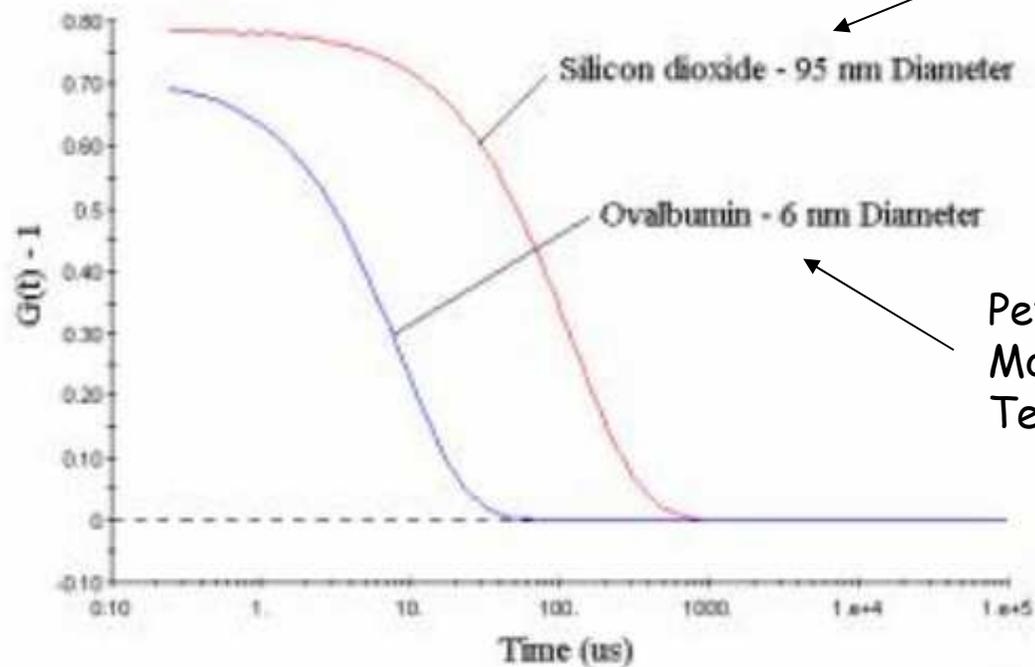
Au temps courts,  
on accède aux fluctuations

Aux temps longs, on retrouve  
une intensité diffusée statistique  
équivalente à  $I_{\text{diff}}$  en statique<sup>71</sup>

## QELS - Batch

On en déduit une fonction d'auto corrélation du 2<sup>ème</sup> ordre

$$G(\tau) = \frac{I(t_0)I(t_0 + \tau)}{I(t_\infty)^2}$$



Grosses particules ( $\text{SiO}_2$ )  
Mouvements browniens lents  
Temps longs

Petites particules (Ovalbumine)  
Mouvements browniens rapides  
Temps courts

La fonction d'auto corrélation est reliée au coefficient de diffusion  $Dt$   
de la particule diffusante

# QELS - Batch

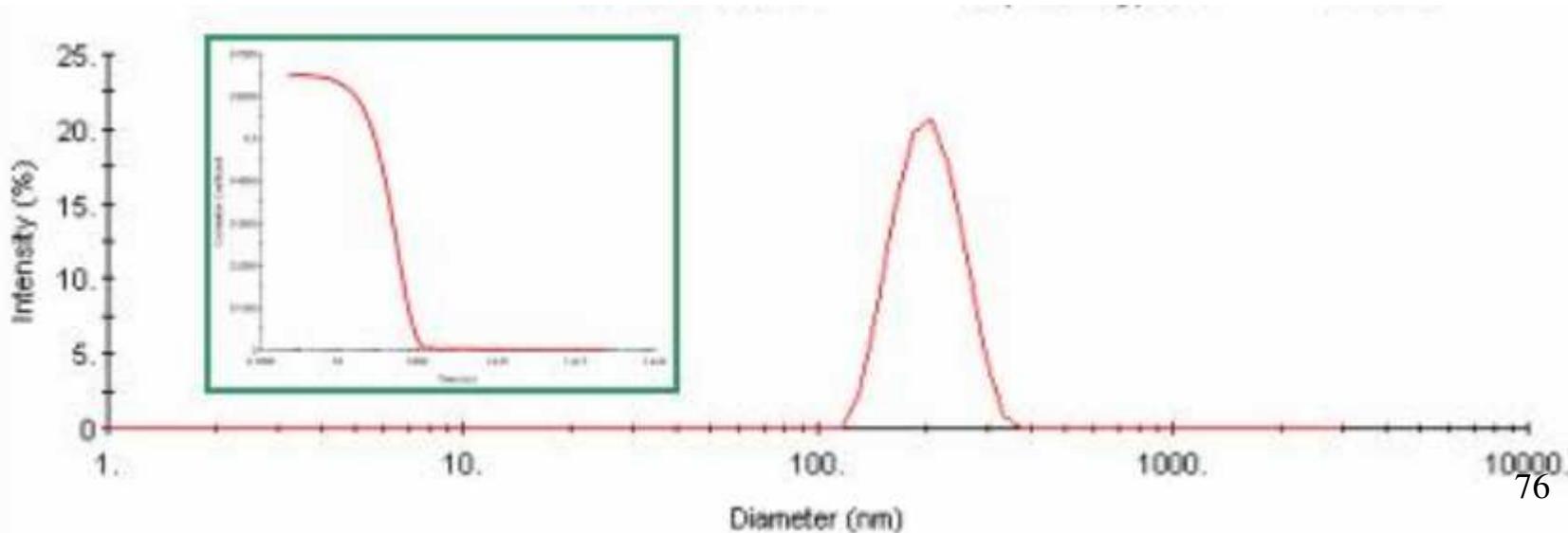
$$G(\tau) = \frac{I(t_0) I(t_0 + \tau)}{I(t_\infty)^2} = B + A e^{-2q^2 D \tau}$$

- A amplitude à t
- B amplitude ligne de base
- q : fonction d'onde  $\longrightarrow q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$
- $D\tau$  : **coefficient de diffusion**

On lisse la courbe expérimentale avec une équation modèle permettant l'accès au **coefficient de diffusion** ( $D\tau$ ) lui même relié au **rayon hydrodynamique** ( $R_H$ ) par la relation de Stokes-Einstein

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

- K : constante de Boltzmann
- T : température
- $\eta$  : viscosité du milieu solvant
- D : coefficient de diffusion
- **Rh rayon hydrodynamique**



# QELS en Batch

## Avantage :

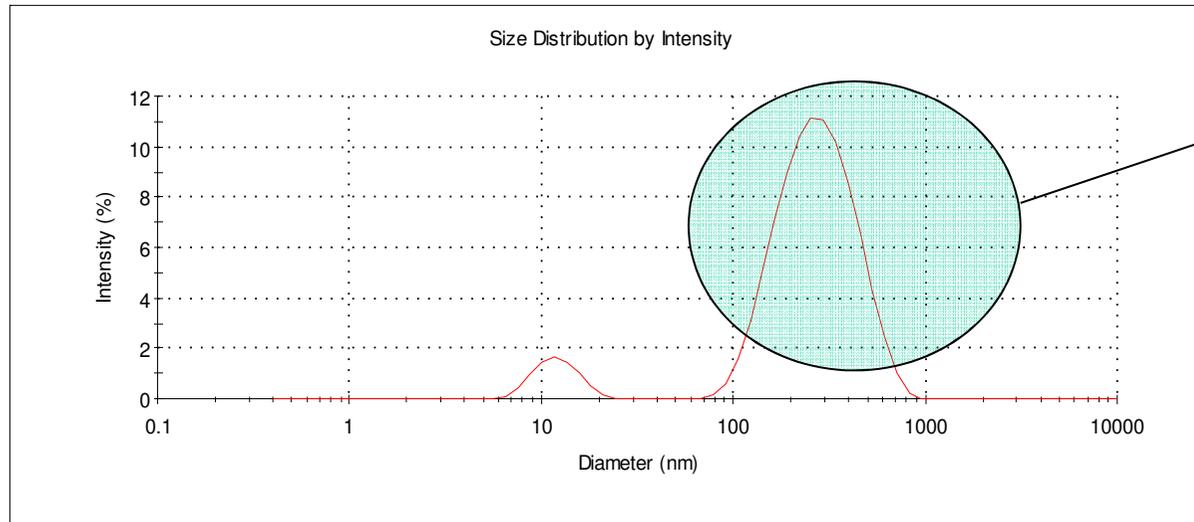
- ne dépend pas de la dépendance angulaire mais des fluctuations temporelles de  $I_{diff}$
- accès à des tailles de l'ordre du nanomètre

## Inconvénients liés à :

- la polymolécularité potentielle de l'échantillon  
les fluctuations mesurées traduisent, en même temps,  
les mouvements browniens de particules ayant des tailles différentes
- la présence de gros objets entraîne une diffusion importante pouvant  
masquer les plus petits objets!

## Exemple :

Polysaccharide agrégatif



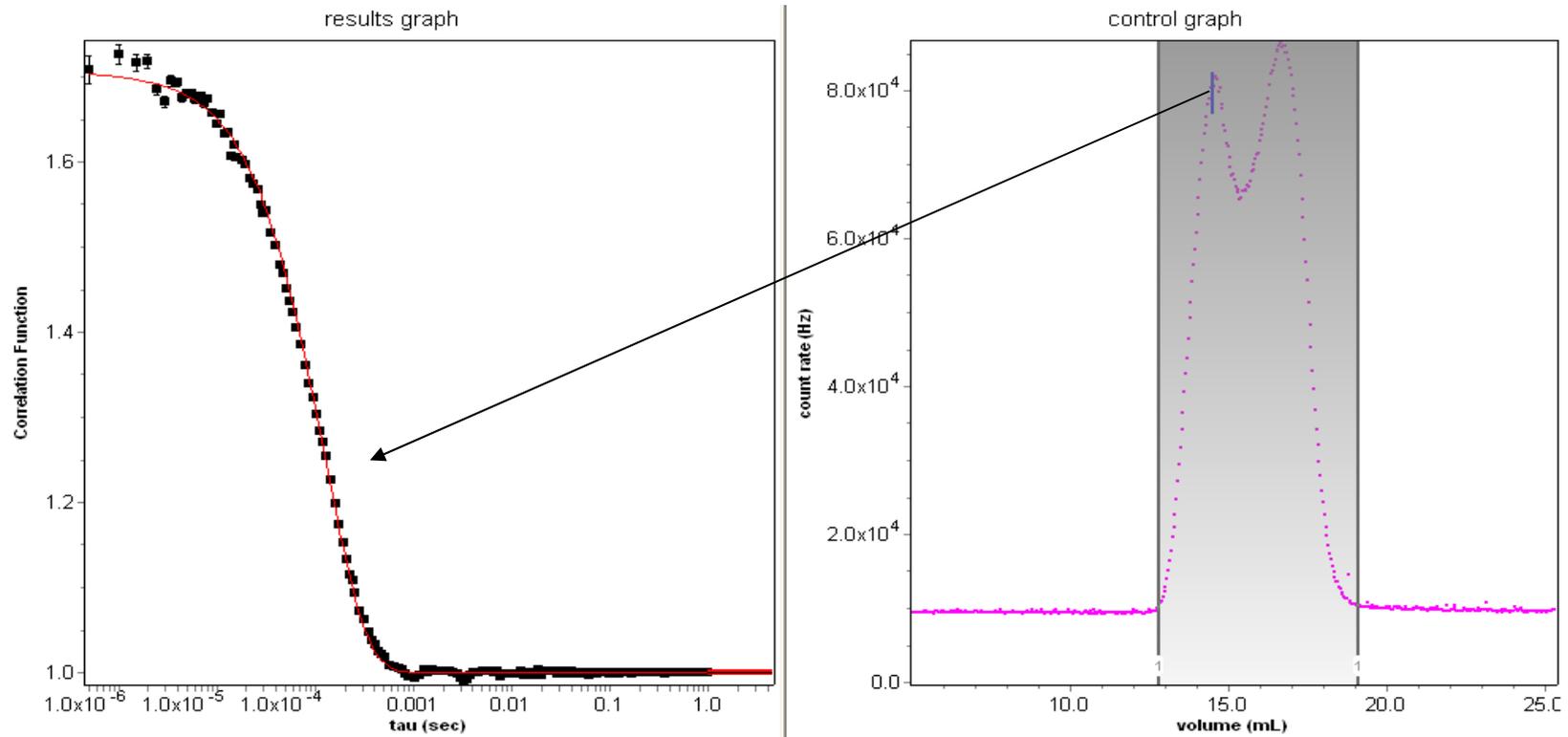
Quelle est la contribution réelle de cette diffusion traduite en  $Dt$  puis en  $R_h$  au sein de l'échantillon?

Il faut séparer stériquement avant la QELS:  
QELS en ligne

# QELS en ligne couplée SEC

**Intérêt** : Analyse de fraction isomoléculaire après fractionnement stérique (SEC)

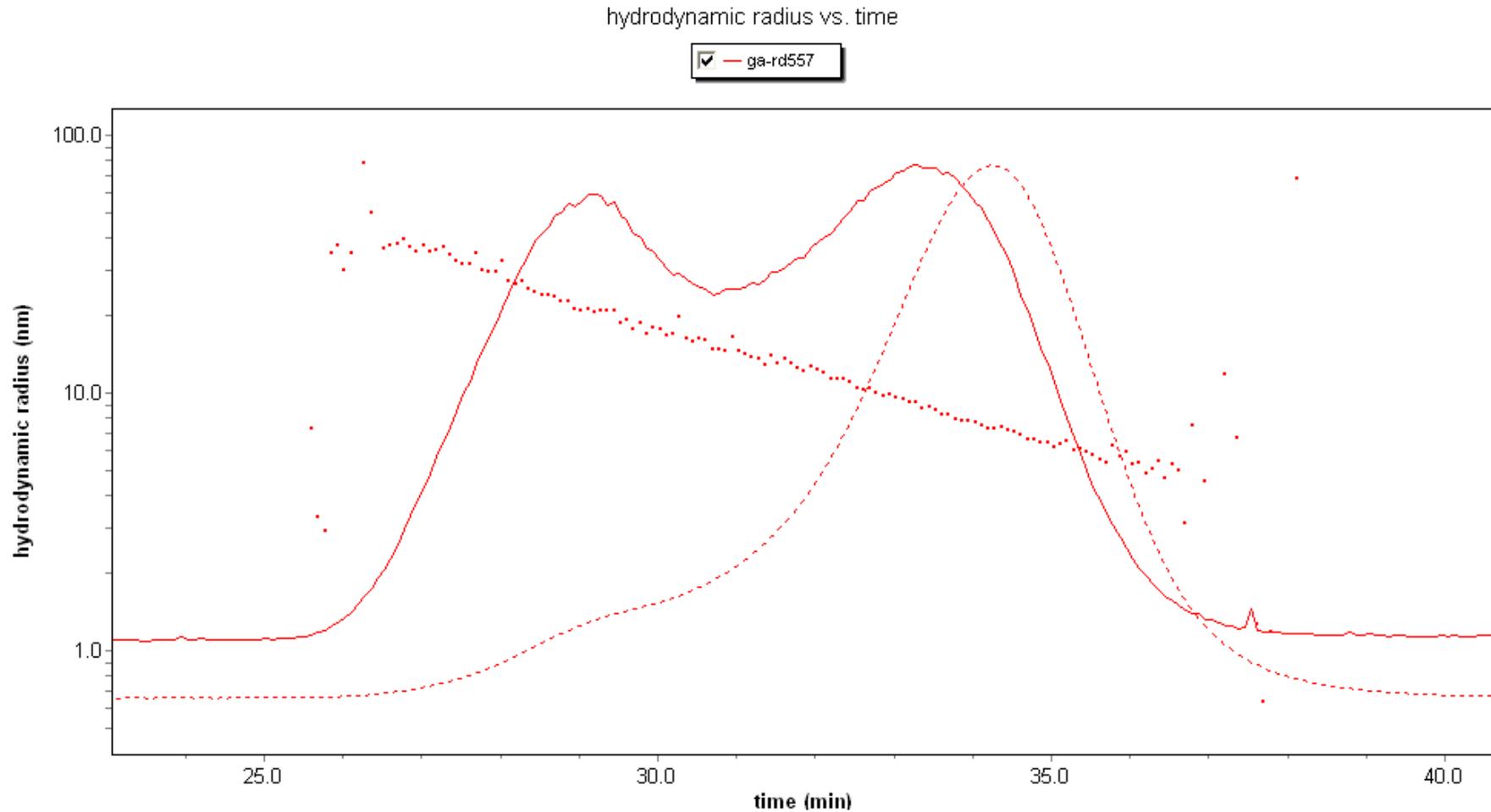
Exemple : revenons à la gomme arabique



	Value
Peak Number	1
QELS Slice Index	226
Abscissa Position	14.474 mL
Rh	21.26 ± 0.23 nm
Dt	(1.03 ± 0.01) e-7 cm <sup>2</sup> /sec

Sur cette fraction éluée : Rh~21nm (avec une bonne précision)

## Couplage SEC/QELS : distribution des Rh



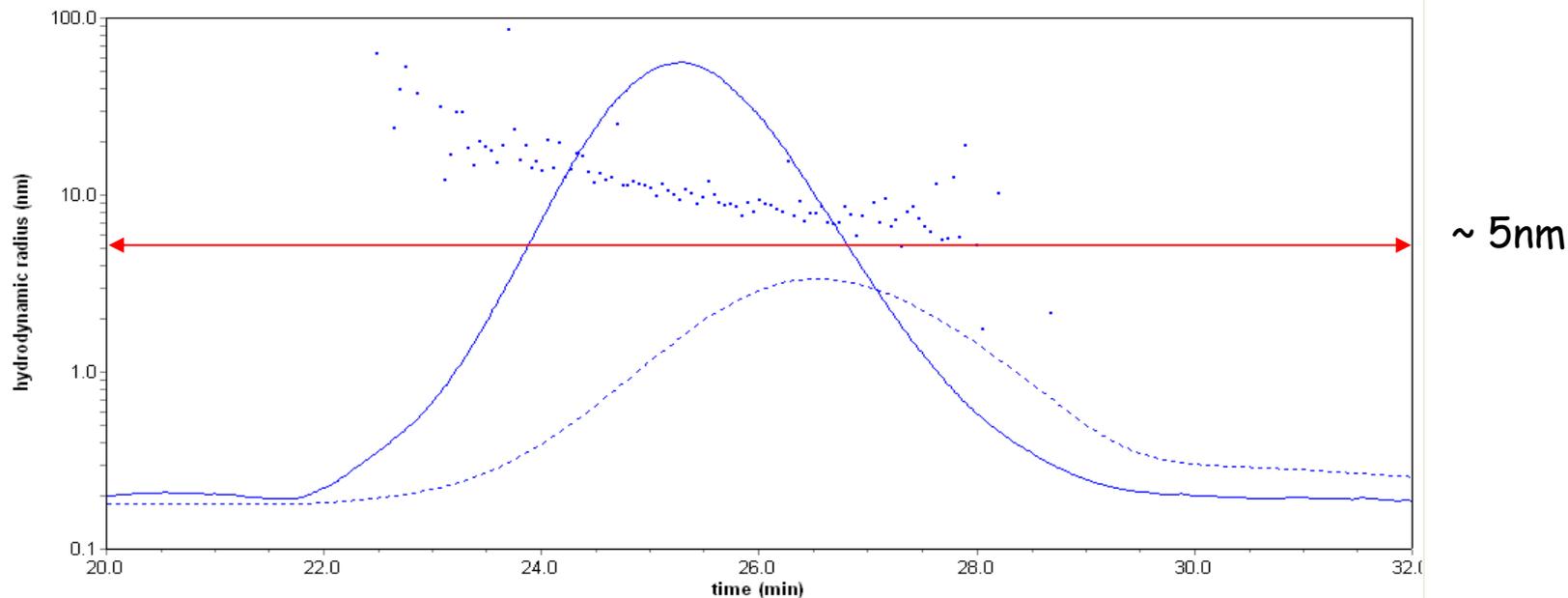
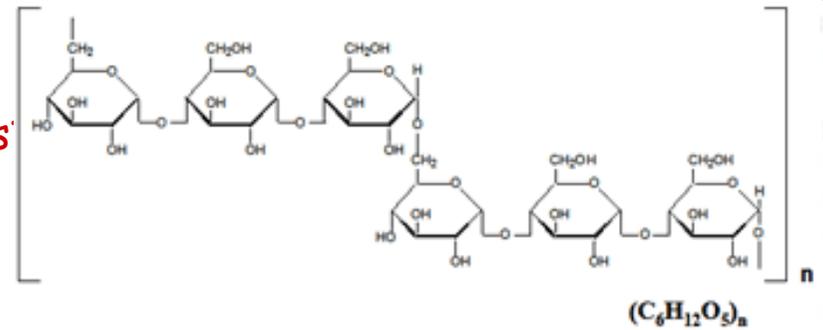
La QELS permet bien de descendre largement en dessous de 10nm

contrairement à la MALLS (diffusion statique multi angles) qui limite vers 20-30nm en raison de l'isotropie de diffusion

# Couplage SEC/QELS : distribution des Rh

Qu'en est il pour des petits volumes hydrodynamiques

Exemple : pullulane (polysaccharide)  
dégradé enzymatiquement



La QELS donne de bons résultats mais la limite se situe vers de 5nm (pas assez de réponse en LS)

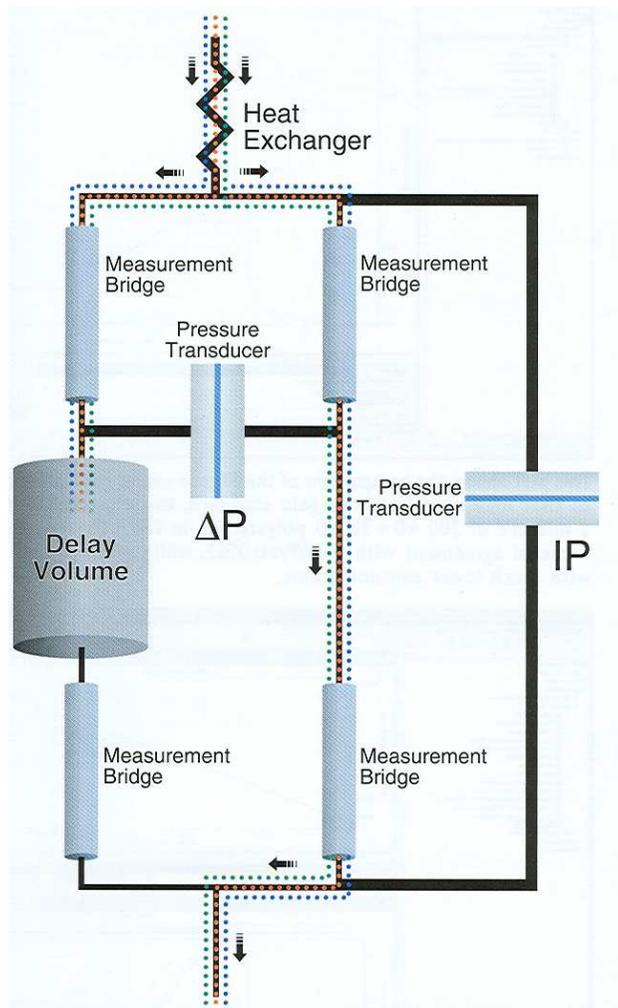
Il faut - soit ↗ la concentration en polymère (plus de diffusion)  
- changer de technique



Viscosimètre en ligne <sup>80</sup>

## Couplage SEC/Visco

**Principe** : 4 capillaires en pont de Wheastone - mesure d'une différence de pression



$\Delta P$  = différence de pression à travers le 'pont'

IP = correction de pression entrée/sortie du pont

$$\eta_{sp} = \frac{4\Delta P}{IP - 2\Delta P}$$

$\eta_{sp} = \eta - \eta_0 / \eta_0$  avec  $\eta_0$  viscosité du solvant

Et  $\eta_{\text{réd}} = \eta_{sp} / C$  avec  $C$  concentration en polymère

On remonte à la **viscosité intrinsèque**  $[\eta] \sim Vh$   
Par la relation de Huggins

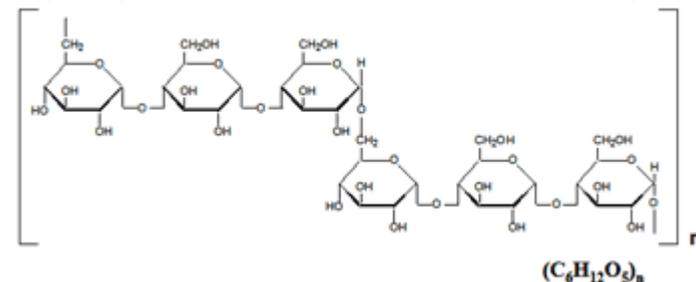
$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$$

Avec  $C \sim 0$  sur chaque fraction éluee en SEC :

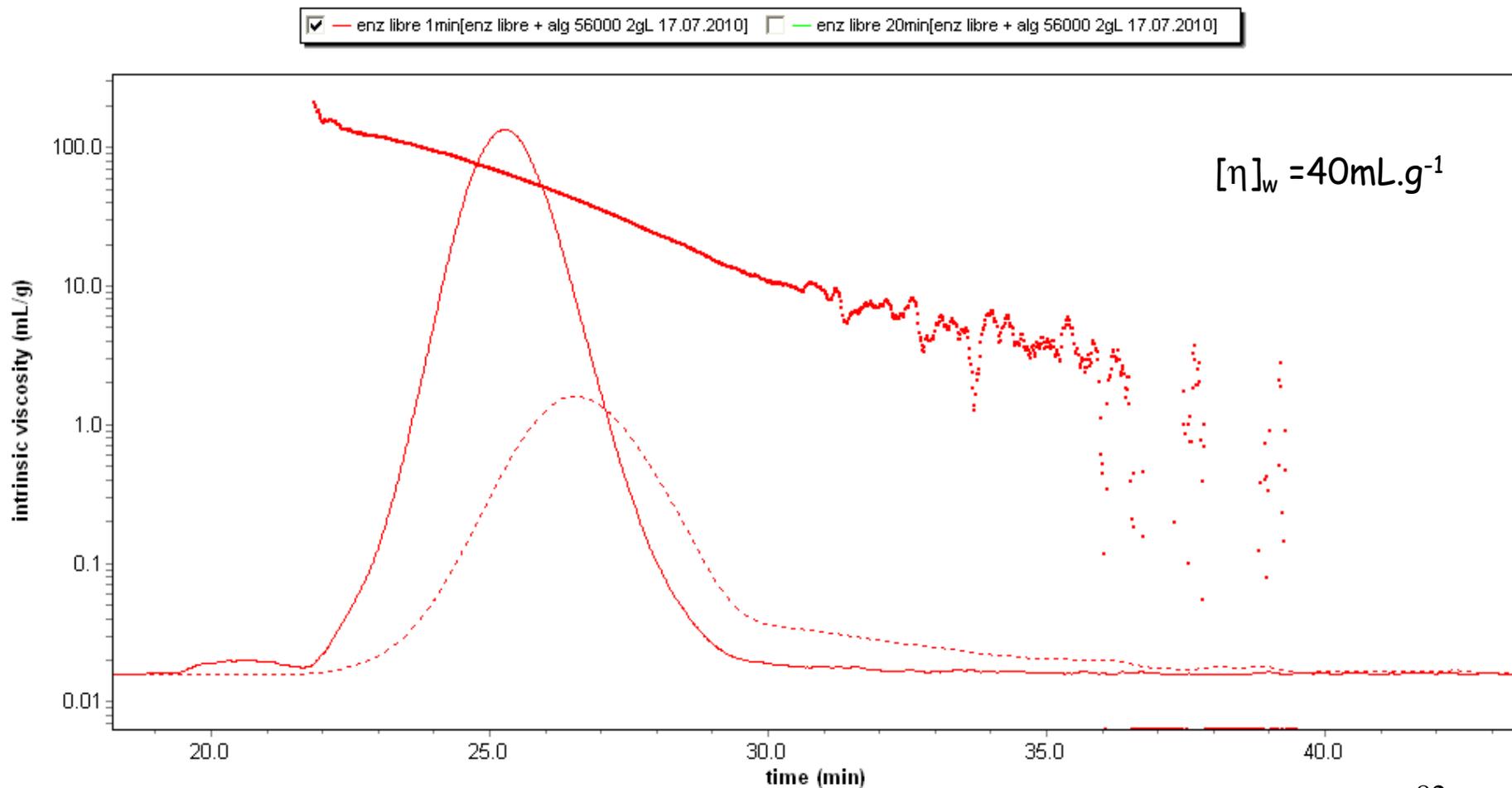
$$\eta_{sp} / C \sim [\eta]$$

# Couplage SEC/Visco

Exemple sur un pullulane dégradé :



intrinsic viscosity vs. time



Que peut-on exploiter à partir de cette distribution de viscosité intrinsèque? 82

# Couplage SEC/Visco

## Accès à Rh

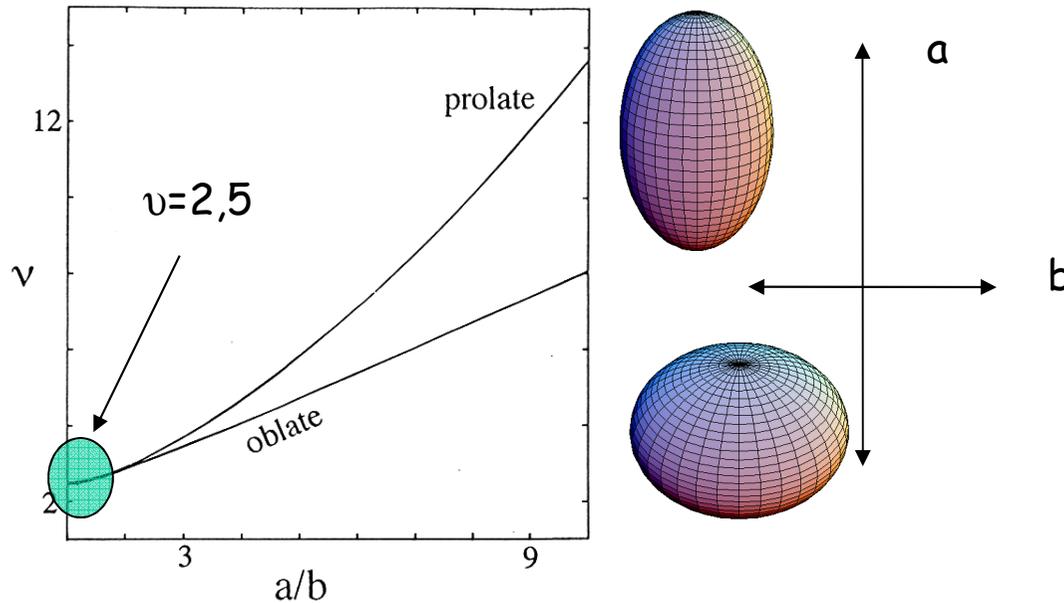
$[\eta]$  est relié au volume hydrodynamique par  
L'équation d'Einstein-Simha

$$V_h = \frac{[\eta] M}{\nu N_A}$$

Relation simple quand la particule est sphérique :  $\nu=2,5$   
( $V_h$  est le volume de la sphère équivalente )

$$R_h = \left( \frac{3[\eta] M}{4\pi 2.5 N_A} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Dans le cas d'une particule non sphérique,  
ça se complique !!!

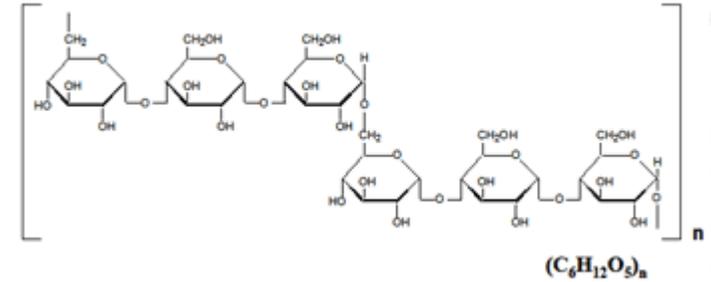


**Intérêt :**

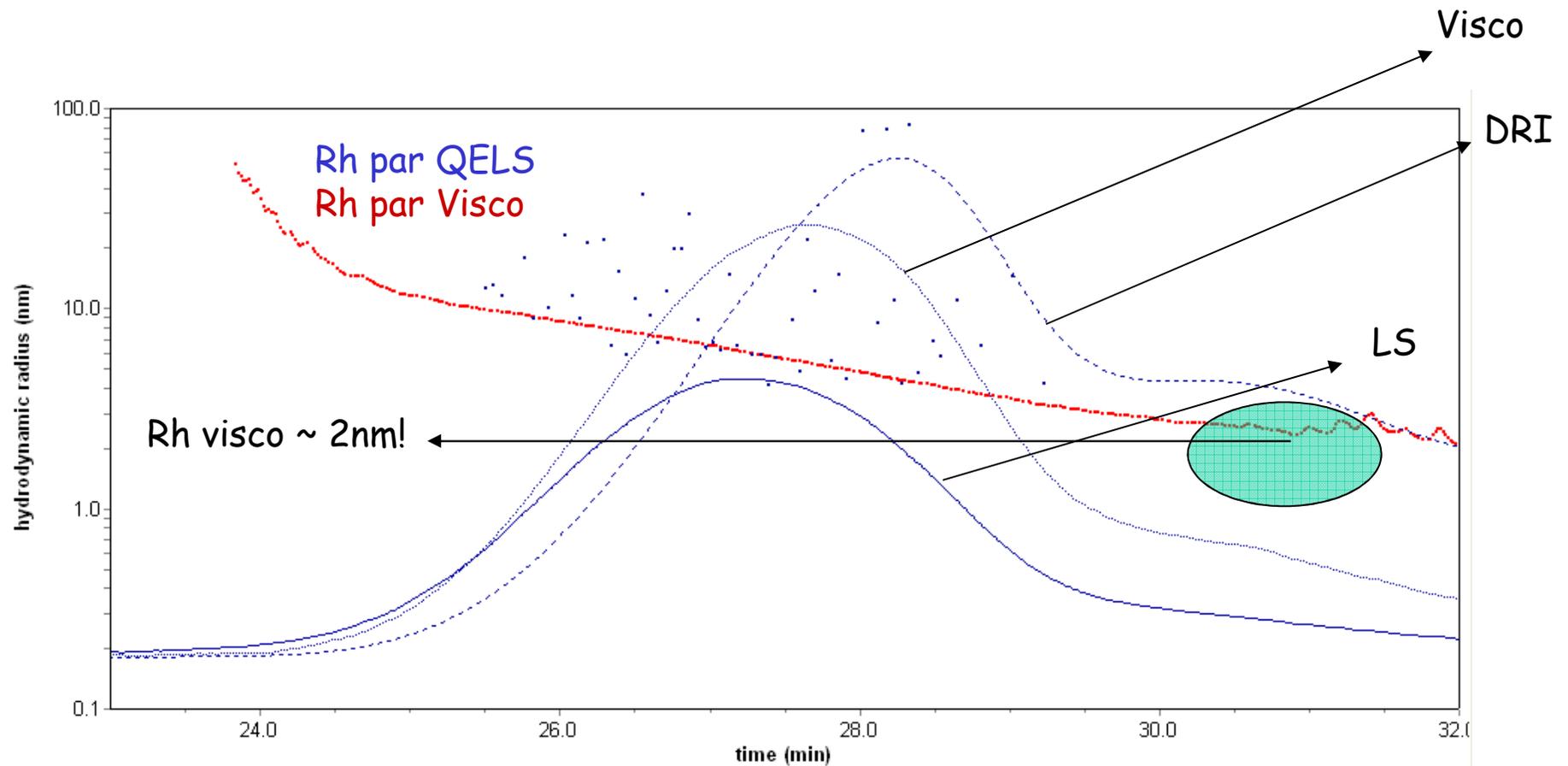
**Accès aux Rh avec  
une meilleure sensibilité  
que par la QELS??**

# Couplage SEC/Visco

Intérêt : Grande sensibilité comparée à la QELS



Exemple pullulane très dégradé ( $M_n < 2000g.mol^{-1}$ )



Quand la taille de la particule diffusante est trop faible, l'intensité diffusée devient inexploitable

**MAIS** la sensibilité du détecteur de pression (visco) permet la mesure

## Couplage SEC/MALLS/ Visco : Relation du Mark-Houwink - aspect conformationnel -

Relation de Mark-Houwink relie Masse molaire et viscosité intrinsèque :

$$[\eta] = KM^a \quad (\text{K n'a pas de signification physique particulière})$$

Très utilisée pour déterminer les masses molaires à partir de mesures de Viscosité intrinsèque en capillaire (peu coûteux et facile de mise en œuvre)

Relation fastidieuse à obtenir avant l'arrivée du couplage SEC/MALLS/QELS

Pour des polymères en solution (pelote statistique ± gonflée de solvant)  
On distingue les valeurs de  $a$  suivantes :

$a = 0.5$  : pelote en solvant Thêta ( $\Theta$  random coil)

$a \sim 0.5-0.8$  pelote statistique en bon solvant (random coil)

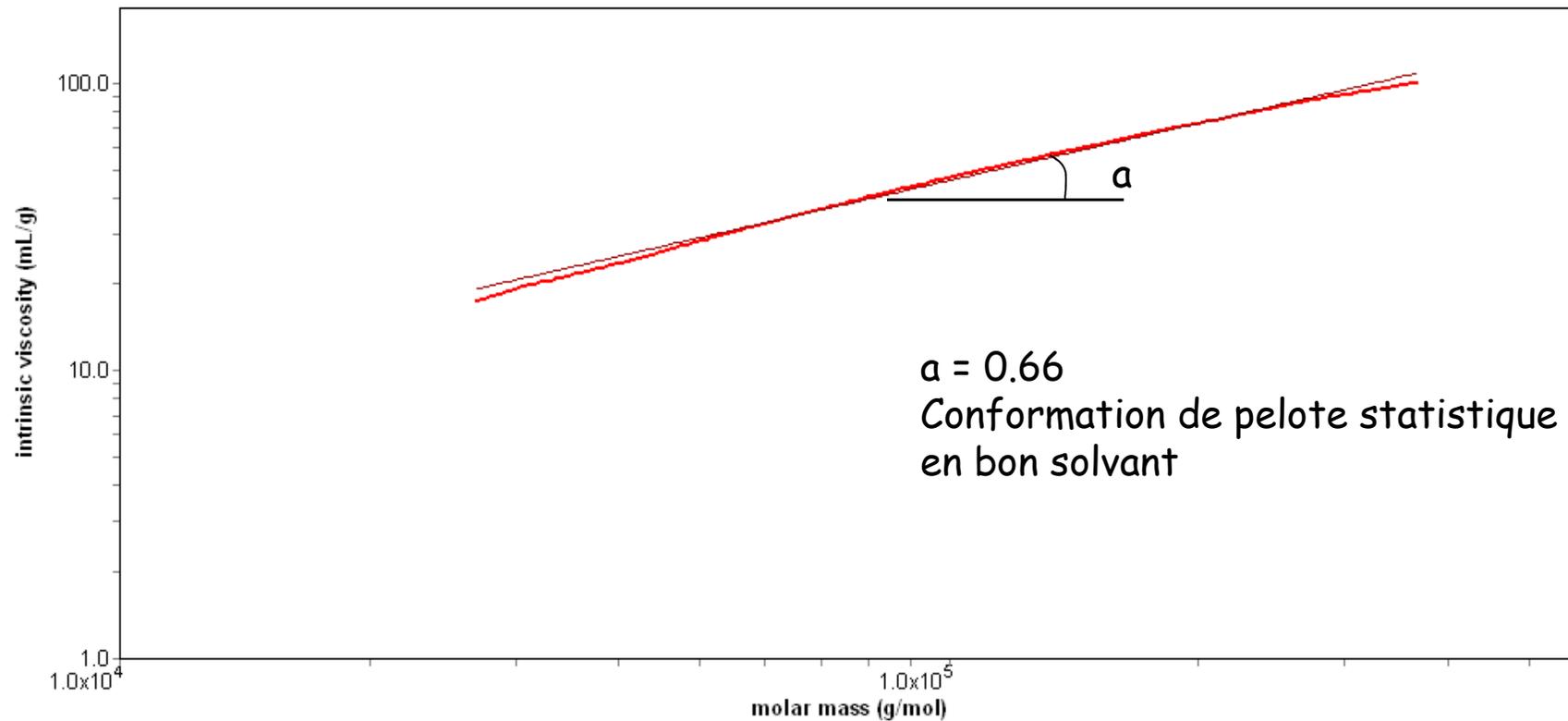
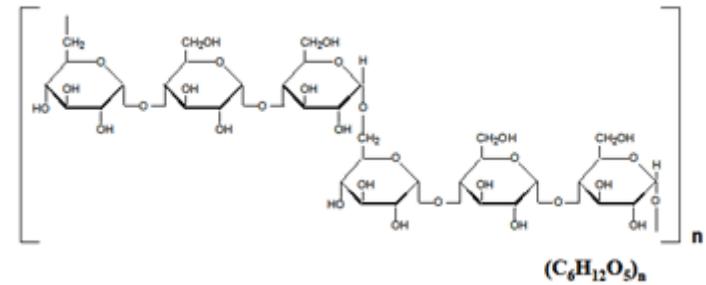
$a > 1$  conformation en bâtonnet rigide (rod like)

Pour des colloïdes en conformation de sphère dures

Ou des polymères ultra-branchés :  $a \sim 0-0.5$

# Couplage SEC/MALLS/ Visco : Relation du Mark-Houwink - aspect conformationnel -

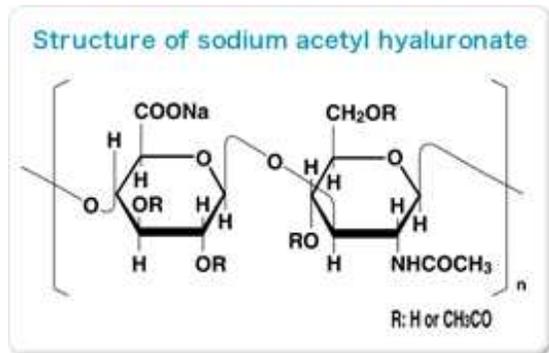
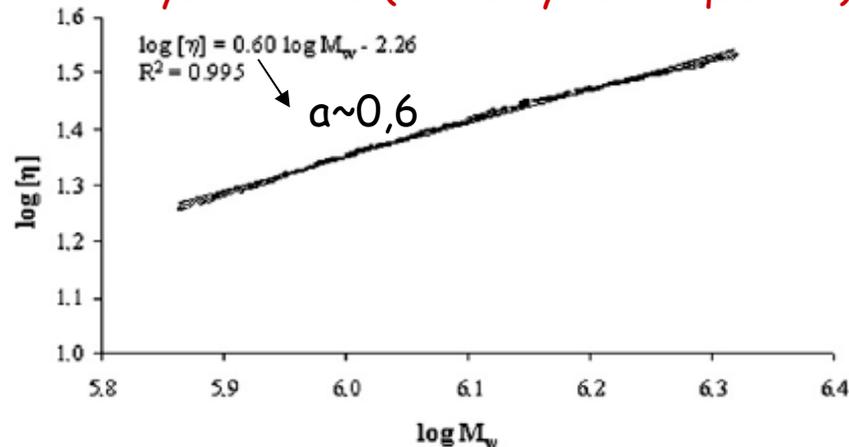
Exemple sur un pullulane non dégradé



# Couplage SEC/MALLS/ Visco : Relation du Mark-Houwink - aspect conformationnel -

Exemple sur un Hyaluronane (acide hyaluronique HA)

B



C

$M_w$ (kDa)	$M_n$ (kDa)	$M_w/M_n$	$[\eta]$ (dl/g)	$R_h$ (nm)	$a$	$\log k$
1430 ± 40	1020 ± 20	1.4 ± 0.1	25.0 ± 1.0	81 ± 1	0.60 ± 0.01	-2.27 ± 0.05

Complete HA hydrodynamic characterization / A. La Gatta et al. / Anal. Biochem. 404 (2010) 21–29

Table 1

Values of weight average molar mass ( $M_w$ ), numeric average molar mass ( $M_n$ ), polydispersity index ( $M_w/M_n$ ), intrinsic viscosity ( $[\eta]$ ), hydrodynamic radius ( $R_h$ ), and Mark-Houwink constants  $a$  and  $\log k$  for HA fragments produced at increasing incubation times with BTH at 0.5 U/ml, as obtained by SEC-TDA analyses.

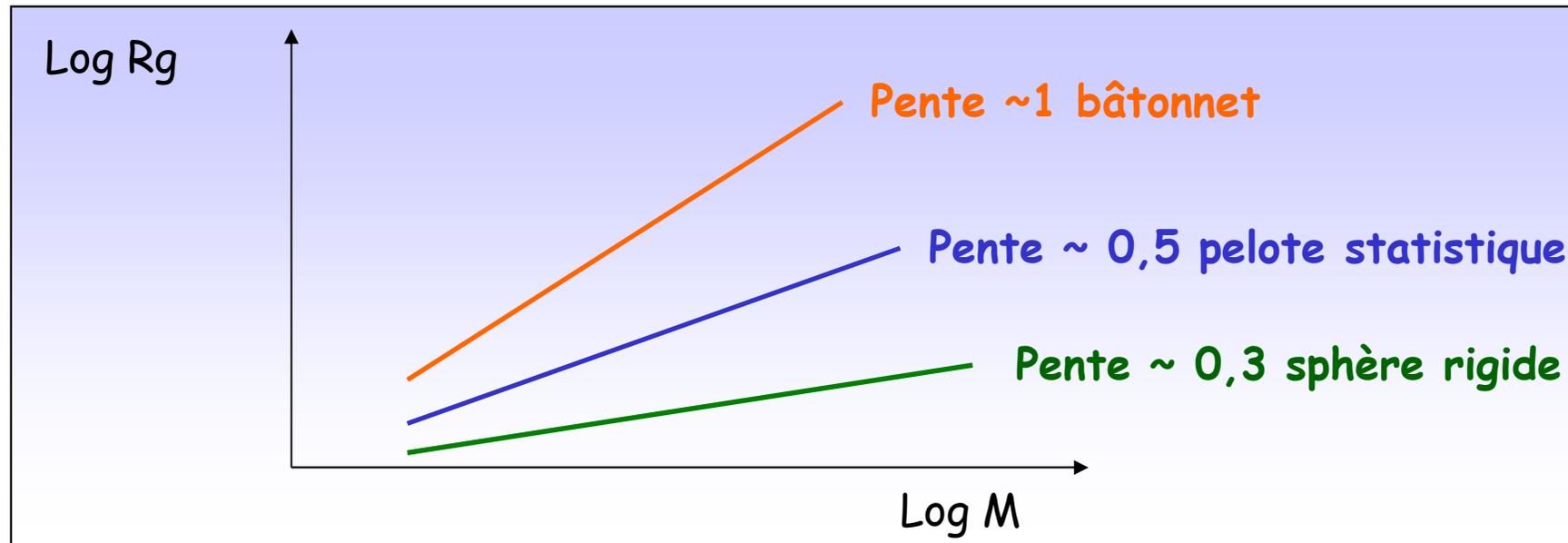
$t$ (min)	$M_w$ (kDa)	$M_n$ (kDa)	$M_w/M_n$	$[\eta]$ (dl/g)	$R_h$ (nm)	$a$	$\log k$
0	1430 ± 40	1020 ± 20	1.4 ± 0.1	25.0 ± 1.0	81 ± 1	0.60 ± 0.01	-2.27 ± 0.05
10	1333 ± 20	889 ± 30	1.5 ± 0.1	22.0 ± 1.0	74 ± 1	0.62 ± 0.01	-2.30 ± 0.05
30	1165 ± 40	728 ± 40	1.6 ± 0.1	19.7 ± 1.0	66 ± 1	0.64 ± 0.01	-2.34 ± 0.05
45	1026 ± 20	641 ± 20	1.6 ± 0.1	18.6 ± 1.0	63 ± 1	0.66 ± 0.01	-2.47 ± 0.05
60	986 ± 40	580 ± 70	1.7 ± 0.1	18.0 ± 2.0	60 ± 3	0.67 ± 0.02	-2.63 ± 0.09
90	800 ± 20	469 ± 40	1.7 ± 0.1	16.0 ± 2.0	56 ± 1	0.67 ± 0.01	-2.70 ± 0.06
120	673 ± 20	396 ± 40	1.7 ± 0.1	15.0 ± 1.0	51 ± 2	0.69 ± 0.01	-2.86 ± 0.05
150	593 ± 30	345 ± 20	1.7 ± 0.1	14.1 ± 2.0	48 ± 2	0.70 ± 0.01	-2.89 ± 0.10
180	517 ± 10	304 ± 10	1.7 ± 0.1	13.0 ± 0.1	46 ± 1	0.71 ± 0.01	-2.93 ± 0.05
240	450 ± 20	270 ± 30	1.7 ± 0.1	11.9 ± 0.5	42 ± 1	0.72 ± 0.01	-3.07 ± 0.10
300	390 ± 20	240 ± 20	1.7 ± 0.1	10.8 ± 0.5	39 ± 1	0.75 ± 0.01	-3.18 ± 0.05
360	350 ± 20	200 ± 10	1.7 ± 0.1	9.9 ± 0.3	36 ± 1	0.75 ± 0.01	-3.18 ± 0.05
900	250 ± 10	140 ± 10	1.7 ± 0.1	7.0 ± 0.3	28 ± 1	0.79 ± 0.01	-3.50 ± 0.05
1440	160 ± 7	104 ± 3	1.6 ± 0.1	4.9 ± 0.3	22 ± 1	0.83 ± 0.03	-3.72 ± 0.23

$a \nearrow$  quand  $M_w \searrow$

Traduit la rigidité du polysaccharide quand la masse molaire diminue

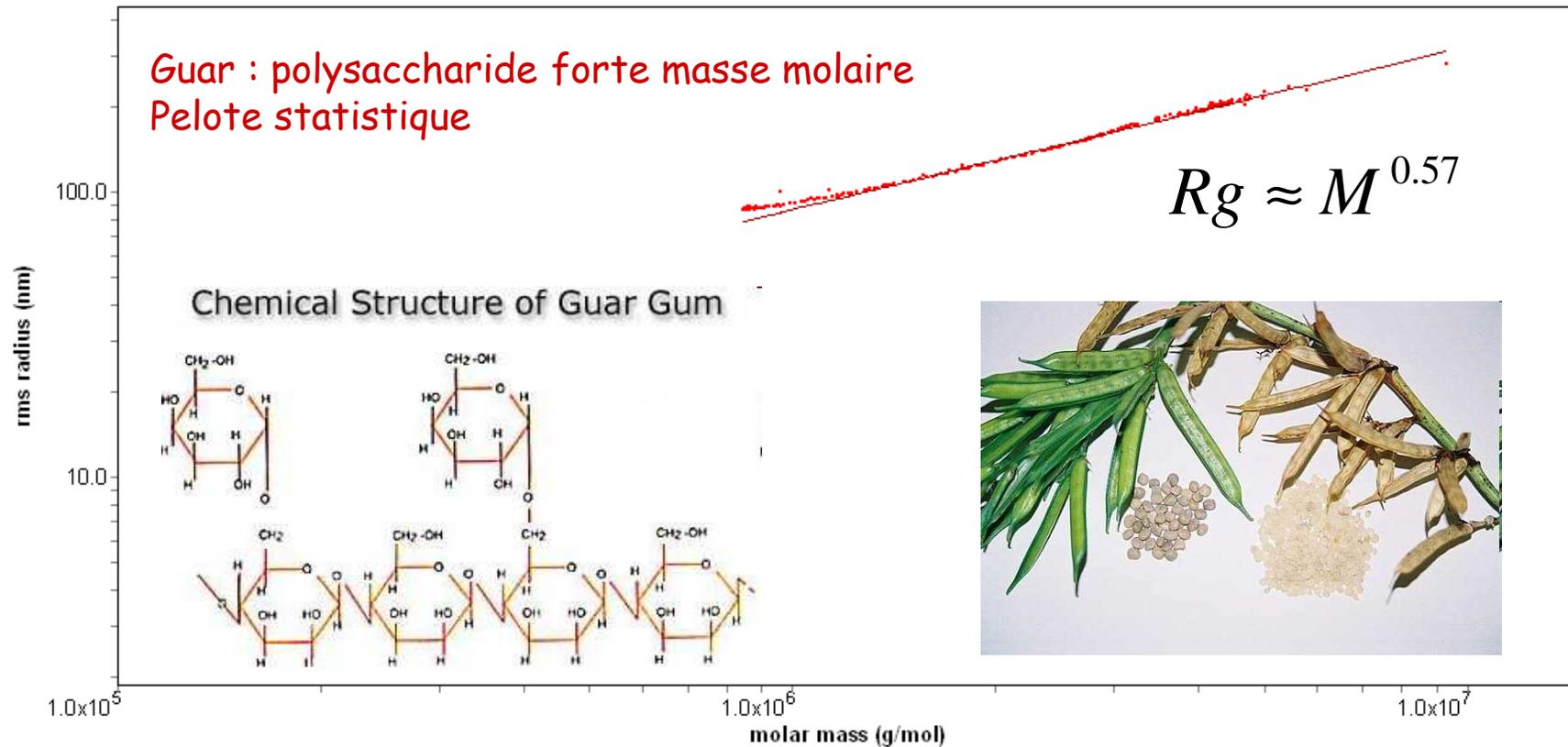
## Couplage SEC/MALLS : aspect conformationnel

Pour accéder à la conformation : relation  $R_g$  vs.  $M$  (proche la relation de MH)



# Couplage SEC/MALLS : aspect conformationnel

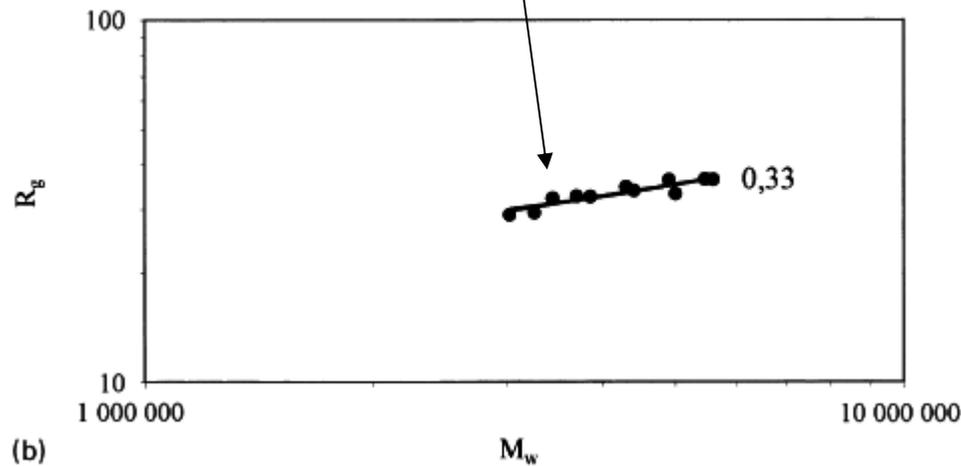
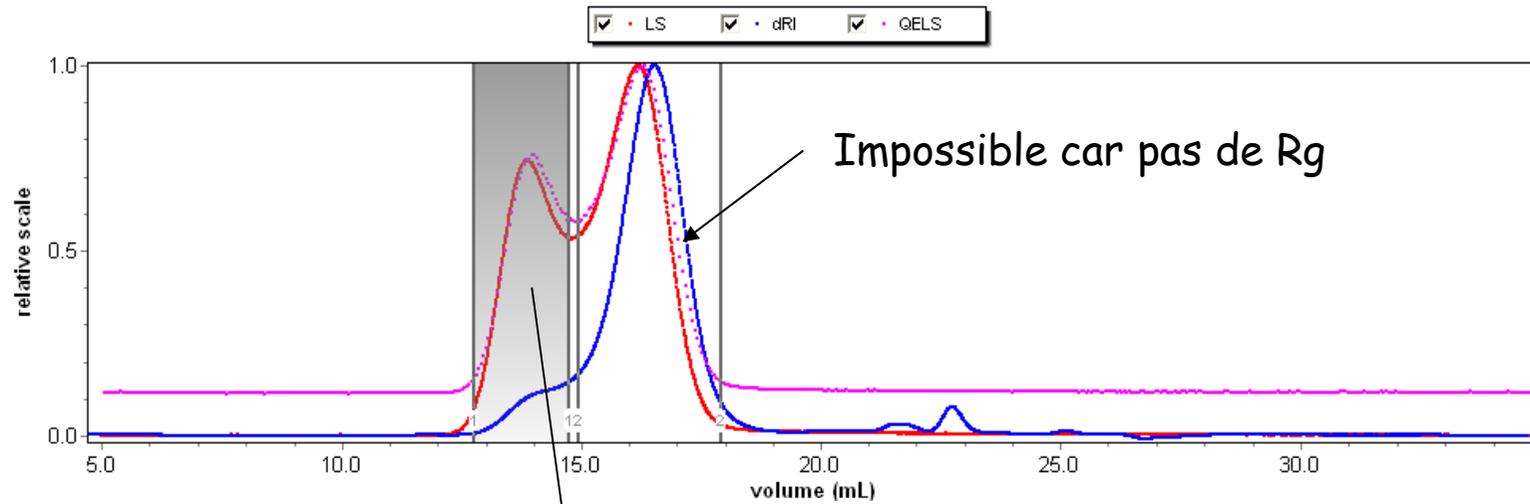
Pour accéder à la conformation : relation  $R_g$  vs.  $M$  (proche la relation de MH)



# Couplage SEC/MALLS : aspect conformationnel

Pour accéder à la conformation : relation  $R_g$  vs.  $M$  (proche la relation de MH)

Exemple : Gomme arabique (population 1)



$$R_g \approx M^{0.33}$$

Conformation plus compacte

Traduit le fort  
Degré de ramification des  
AGP

**Conclusion ; le couplage SEC multi-détection  
Permet d'atteindre un grand nombre d'information**

### **MALLS**

Mn, Mw et leurs distribution

Rg et la distribution (si diffusion anisotrope, objet suffisamment grand devant  $l_\theta$ )

### **QELS**

Rh et la distribution par QELS si suffisamment d'intensité diffusée

### **Visco**

$[\eta]$  et la distribution

Rh si conformation globalement sphérique avec + de précision que QELS

### **Conformation**

Rg vs M

Rh vs M

$[\eta]$  vs M

---

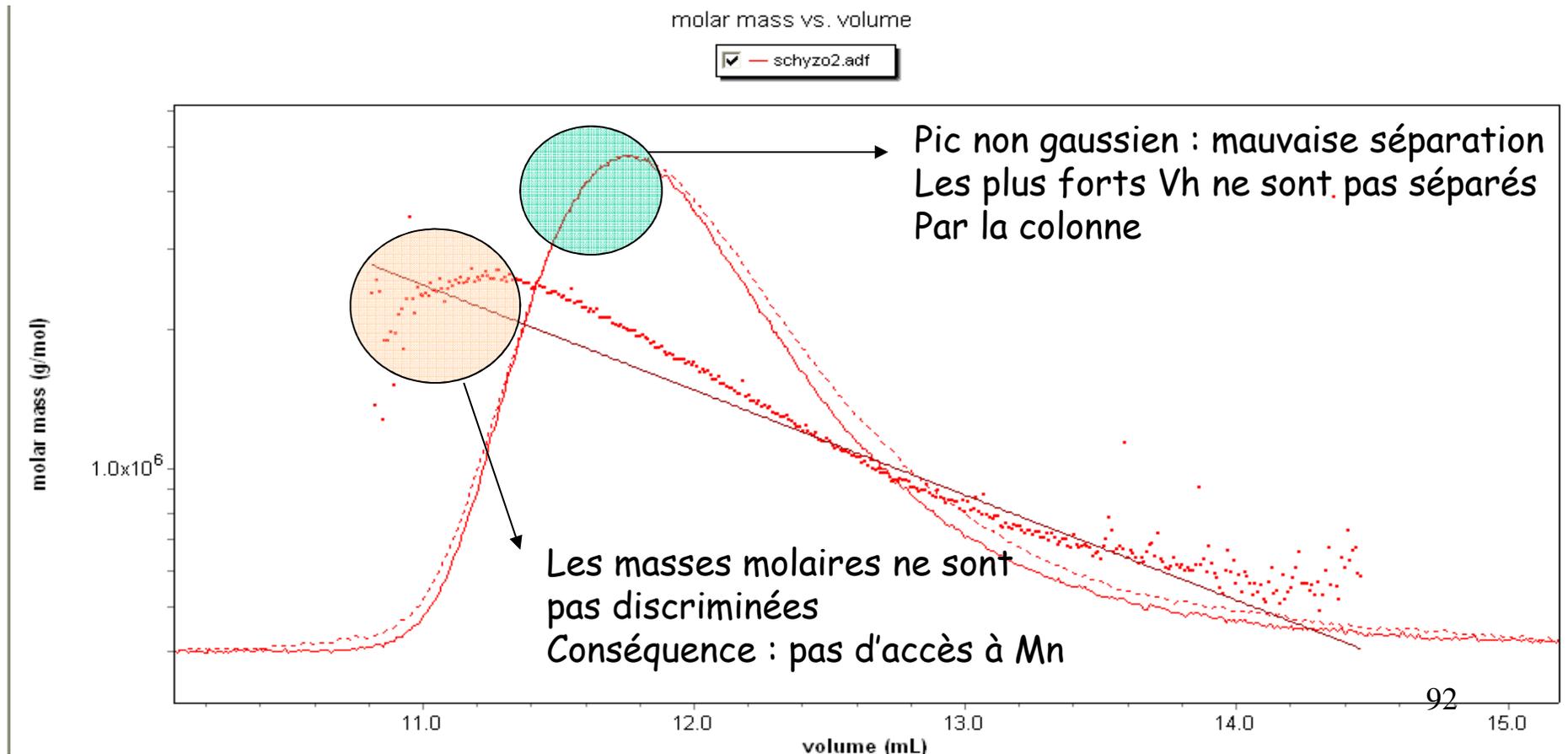
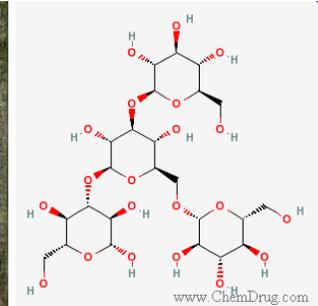
**MAIS DANS CERTAINS CAS LA SEC NE PERMET PLUS  
UNE BONNE SEPARATION STERIQUE**

Polymère trop gros : Hors gamme d'exclusion

Objets trop fragiles (liposomes) : rupture sous l'action des forts cisaillement dans la SEC HP  
Polymères en interactions avec la phase stationnaire de la colonne

# Limites de la SEC : Grande taille hors limite d'exclusion

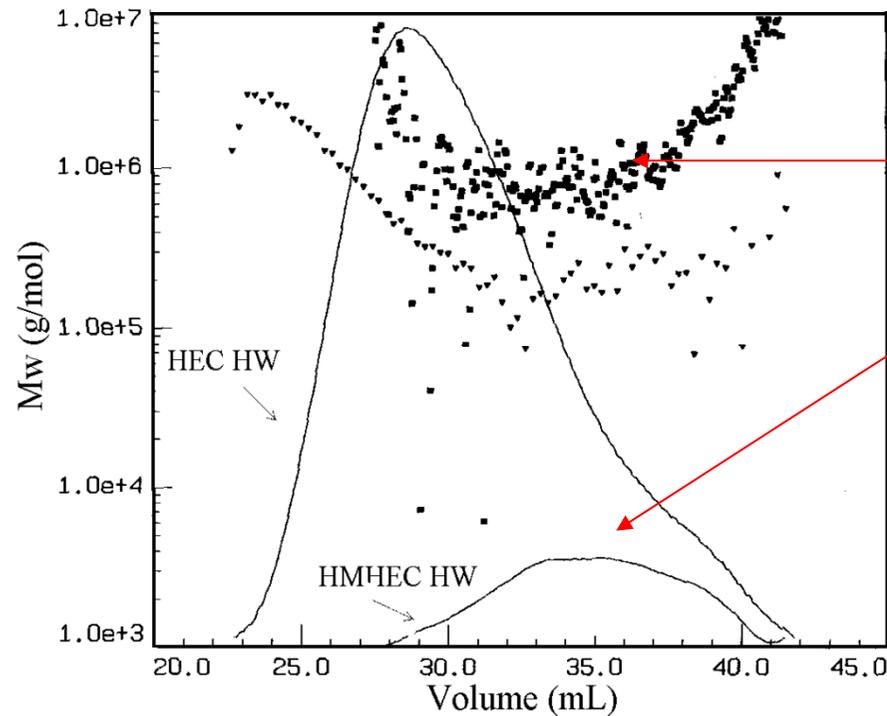
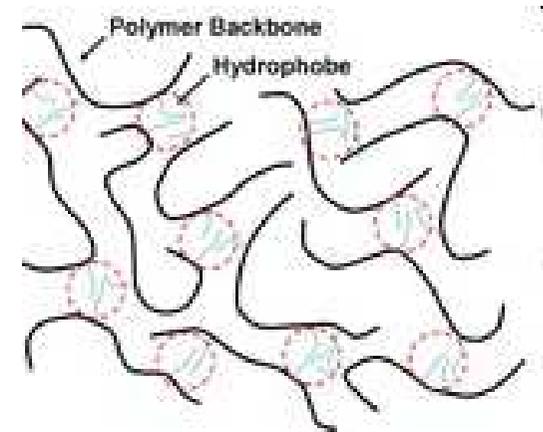
Exemple :  
Schizophylane, polysaccharide très rigide  
(triple hélice) de très forte masse molaire



Limite liée à une rétention non stérique dans les colonnes :  
 Problème d'affinité polymère/phase stationnaire

Exemple : polysaccharides associatifs (amphiphile)

HydroxyEthyl Cellulose Hydrophobiquement Modifié  
 (HMHEC avec 0.6% de chaînes alkyle en C16)

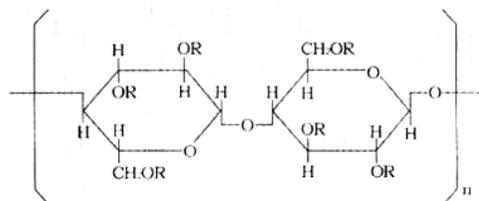


Polymère amphiphile  
 (HMHEC)

Les polymères s'adsorbent plus ou moins temporairement sur la phase stationnaire de la colonne

- on endommage la colonne
- on ne fractionne plus uniquement sur critère stérique

\*on n'analyse pas la totalité de l'échantillon  
 (perte sur la colonne)

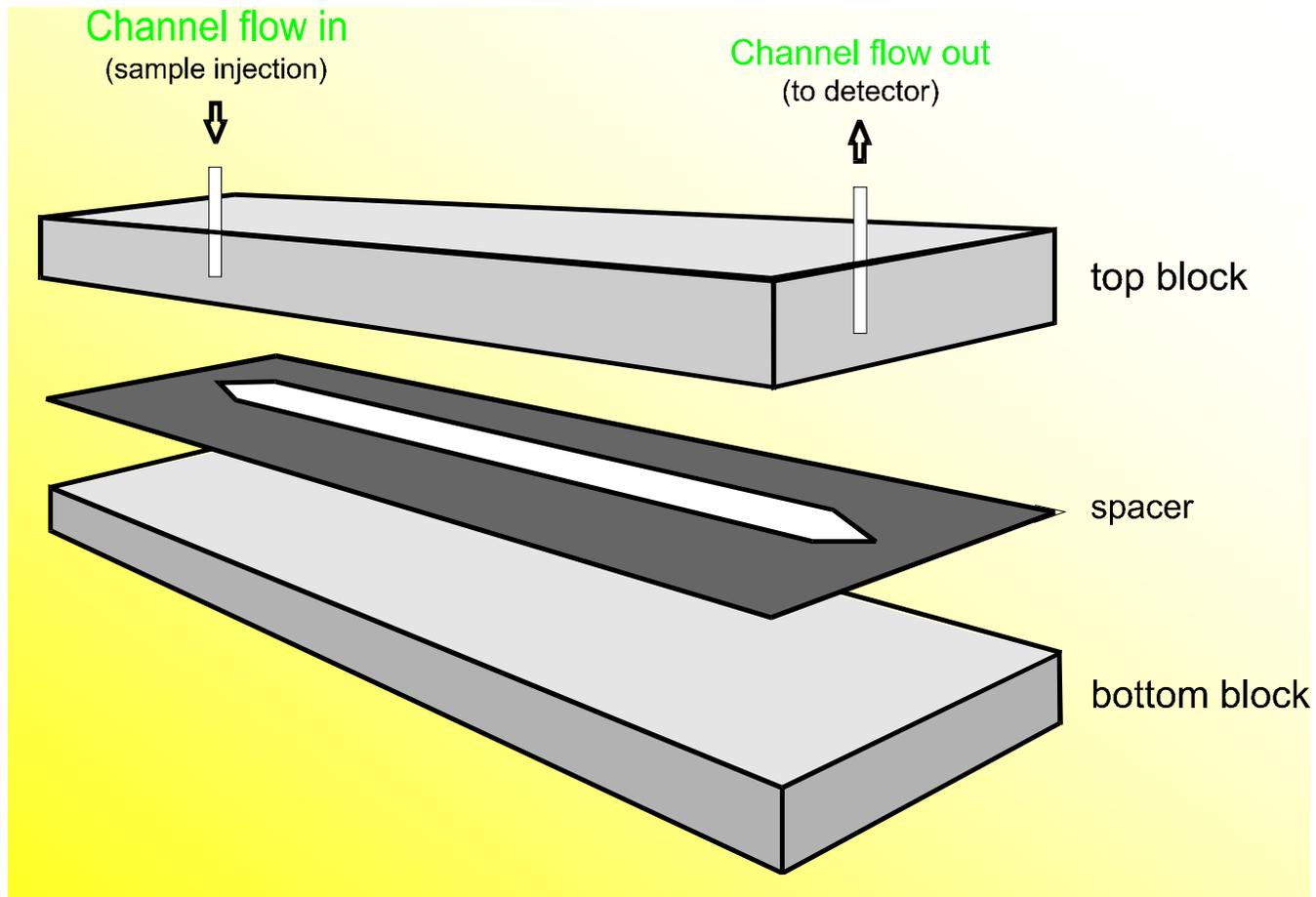


HMHEC - R=C<sub>16</sub>, 0.6%

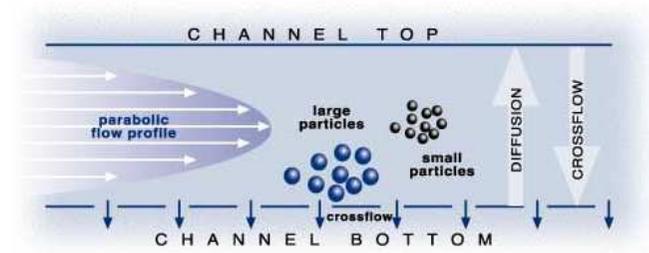
n=polymer degree, R=-H, or -(CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>))O-xH

La solution passe par l'utilisation d'une autre technique de fractionnement stérique

## La séparation par flux force ou Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



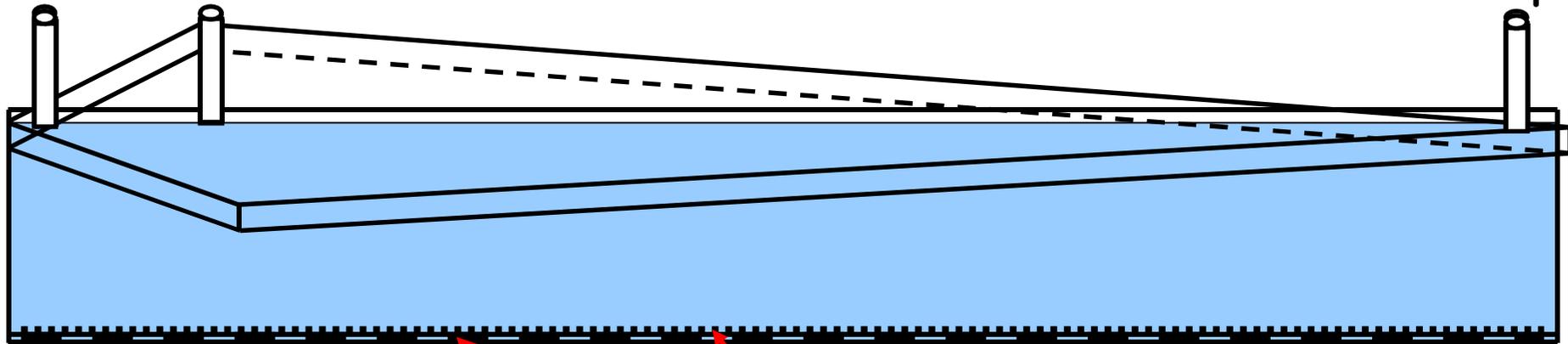
# Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



Entrée  
Solvant Port  
Tampon D'injection

Vue de haut  
Vue de coté

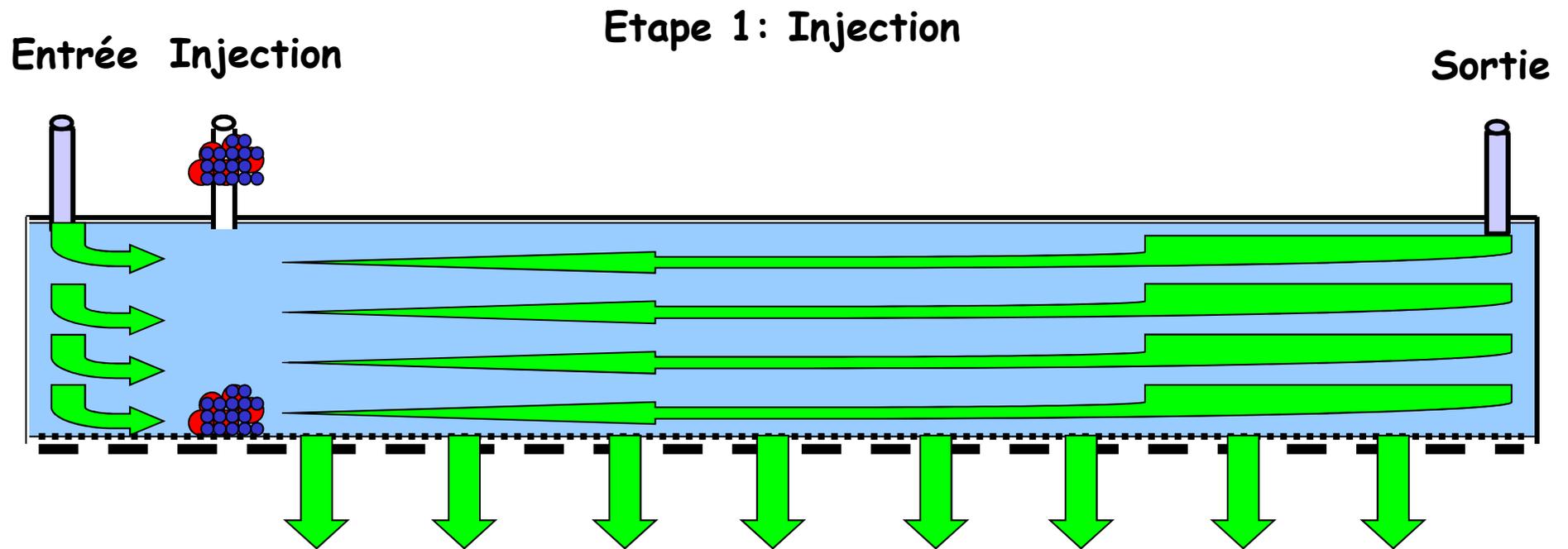
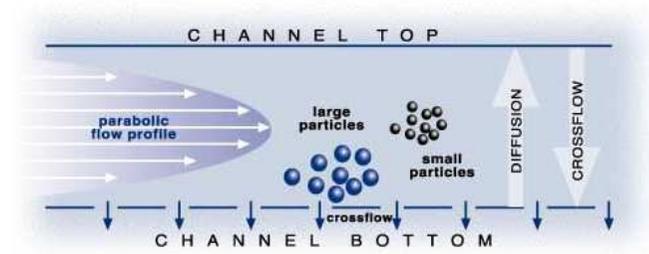
Sortie  
Solvant  
Tampon



Fritté

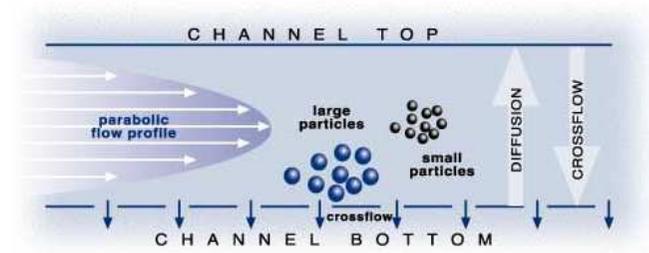
Membrane  
(Type ultrafiltration)

# Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



Champ de force - fuite de solvant

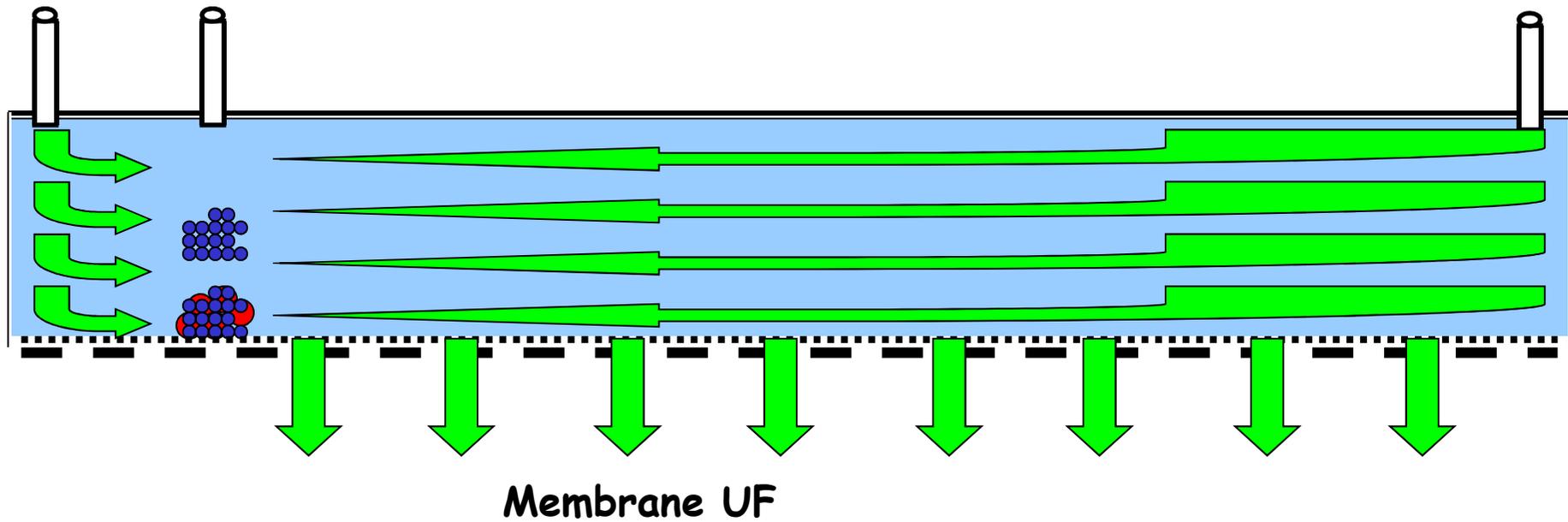
# Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



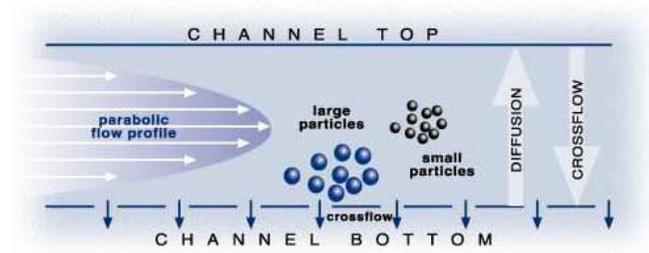
Entrée Injection

Etape 2: Relaxation

Sortie



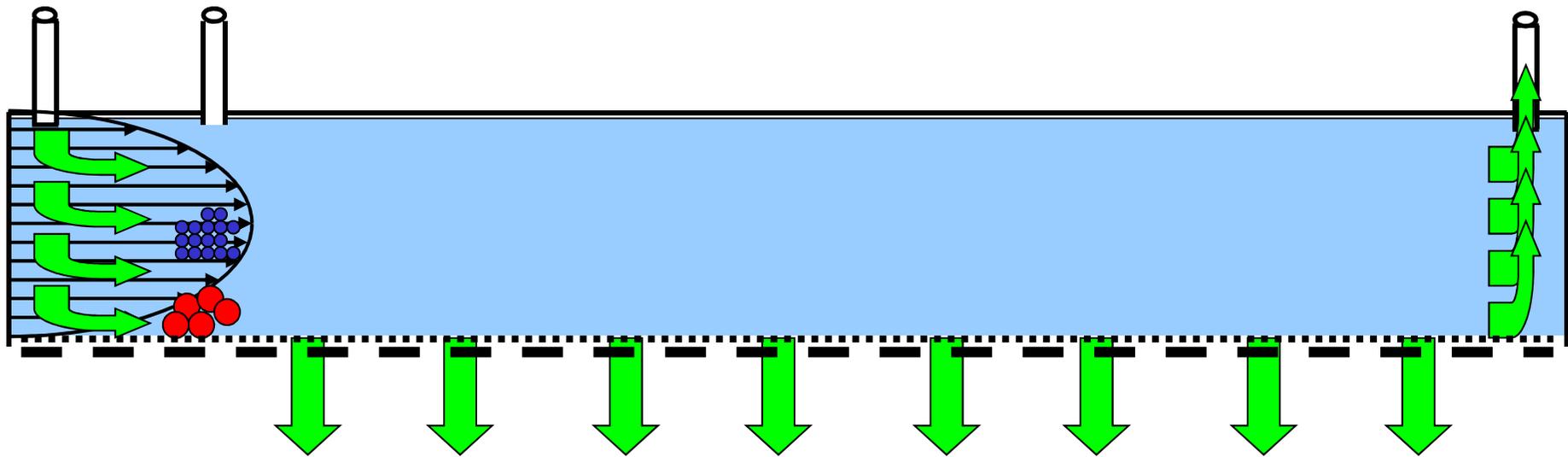
# Flow Field Flow Fractionation (FFFF ou F4)



## Etape 3: Elution

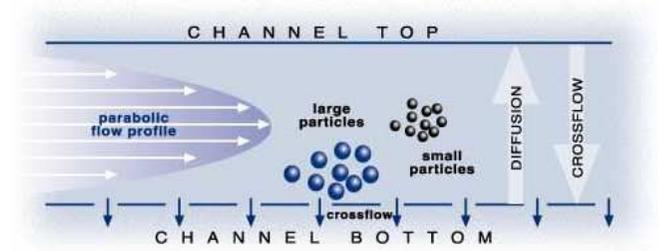
Entrée Injection

Sortie



Membrane UF

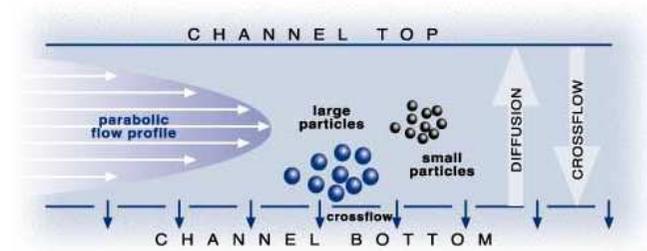
Le profil parabolique d'élution entraîne plus vite les particules au centre du canal : celles de petites tailles



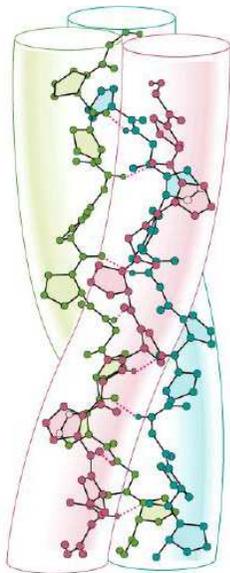
## Si on reprend les problèmes rencontrés en SEC

- limites d'exclusion  
Résolu puisque les conditions d'élution sont fixées par l'opérateur  
les limites de taille supérieures sont voisines de 500nm
- affinité polymère/phase stationnaire  
Résolu puisque les surface d'échanges sont limitées à la surface de la membrane (bien < à la surface d'échange des grains poreux)
- fragilité au cisaillement  
Résolu puisque la seule source de cisaillement est limitée au débit dans un canal de 250 $\mu$ m (bien < aux cisaillements exercés entre des grains poreux)

# Application au couplage F4/MALLS : Cas des forts Vh

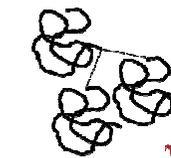


Exemple : protéine de type gélatine  
(Thèse de Khalid RHBII, Université de Toulouse, École d'agronomie de Purpan -2010)



Tropocollagène

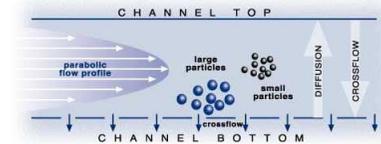
$\Delta T$



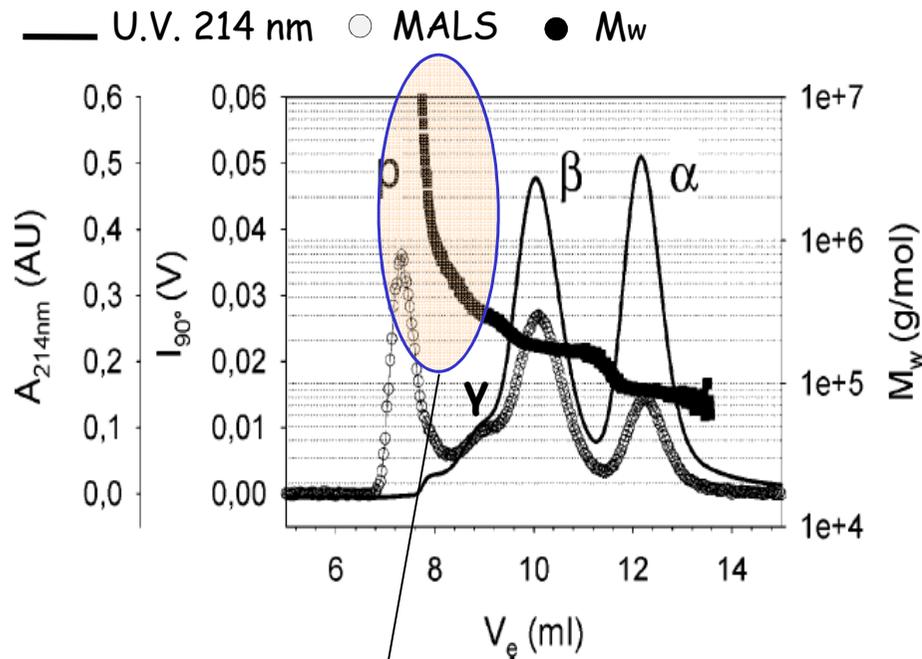
Gélatine

Le collagène est une protéine  
fibreuse formant des triples  
hélices

La dénaturation des triples hélices de collagène  
produit des chaînes en conformation pelote  
statistique

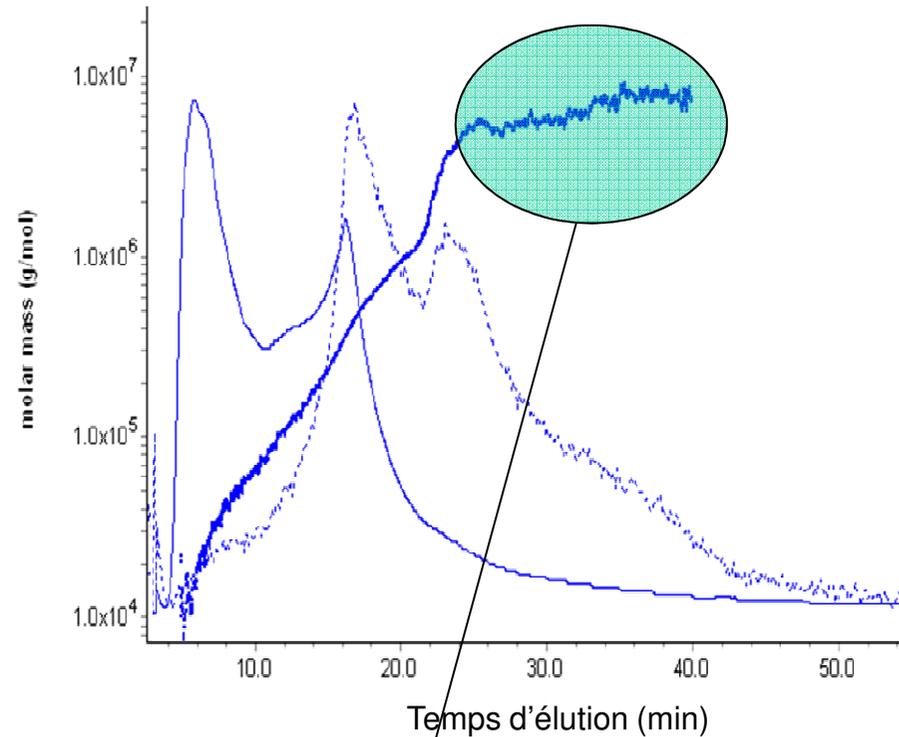


## SEC-MALLS Gélatine



Particules de très hauts poids moléculaires éluées dans le volume mort

## AF4/MALLS : Gélatine

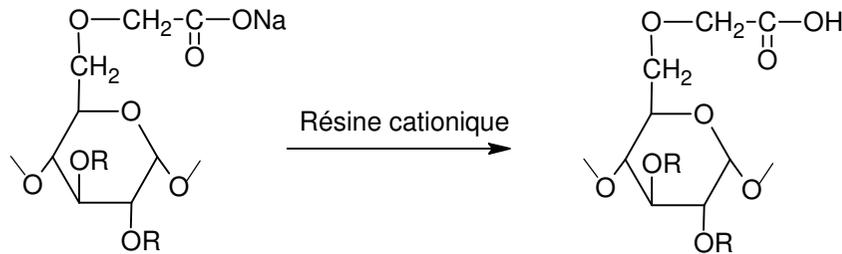


Particules de très hauts poids moléculaires séparées

# Application au couplage F4/MALLS :

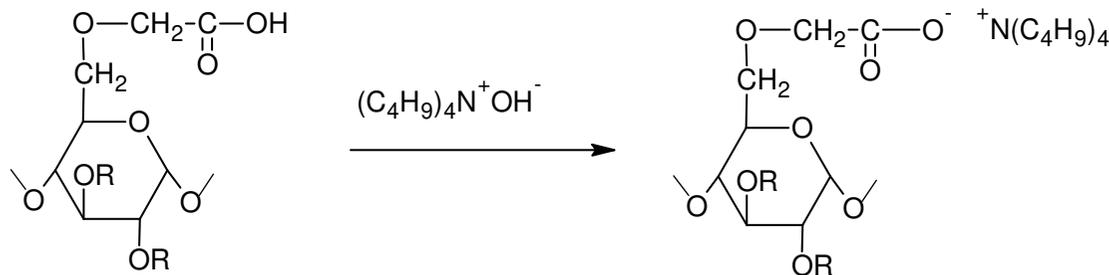
## Cas des interactions polymère/phase stationnaire

### Synthèse du HMCMP (hydrophobically modified CMP) par voie ESTER

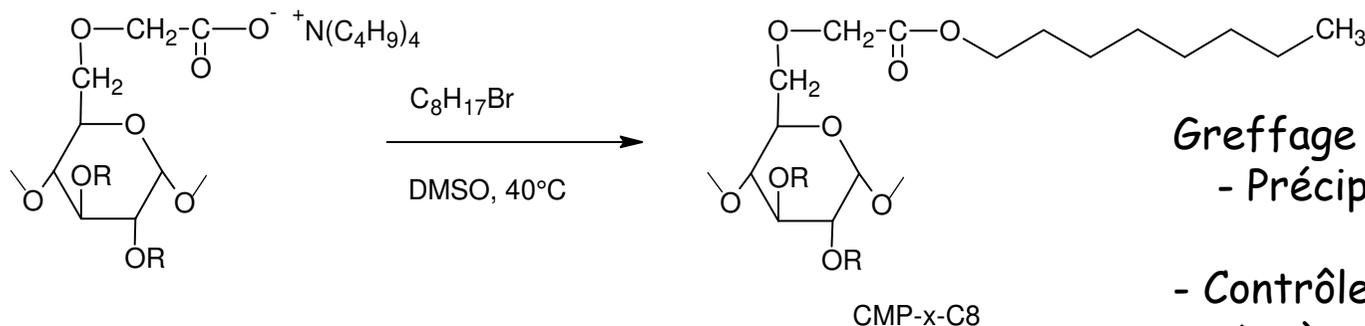


Passage du CMP sur résine pour obtenir la forme acide

R=H ou CH<sub>2</sub>COONa



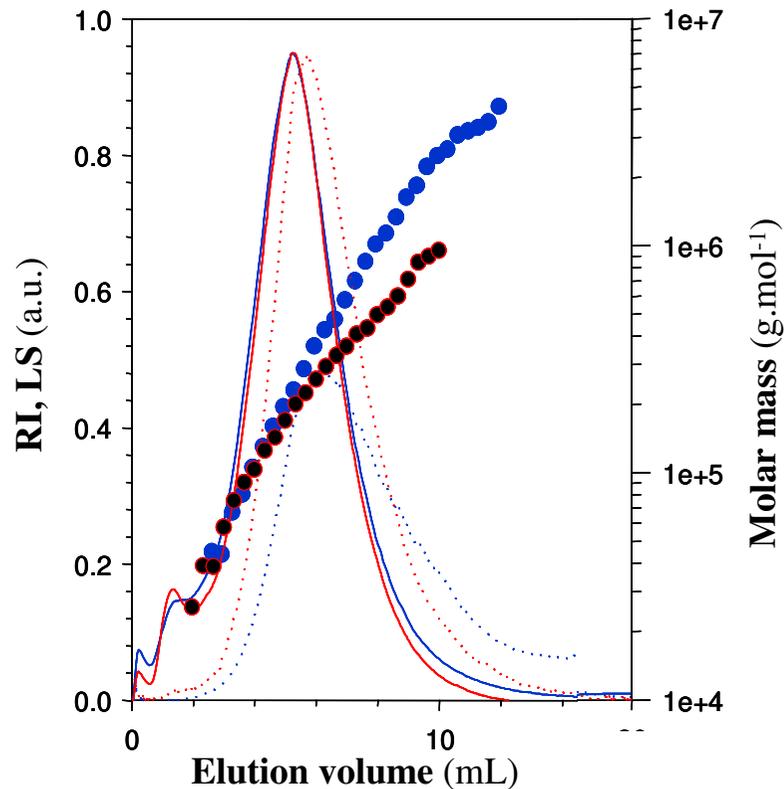
Transformation du CMP acide en sel de tertio butyl ammonium  
But : rendre le polymère soluble dans le DMSO (solvant mixte)



Greffage du bromoalcane (ici C<sub>8</sub>)  
- Précipitation dans NaCl 1M  
- Dialyse  
- Contrôle du taux de C<sub>n</sub> par GPC  
Après saponification des C<sub>n</sub>

Application au couplage F4/MALLS :  
 Cas des interactions polymère/phase stationnaire

CMP / CMP-7-C<sub>8</sub>



$$V_e \text{ CMP-7-C}_8 \approx V_e \text{ CMP}$$

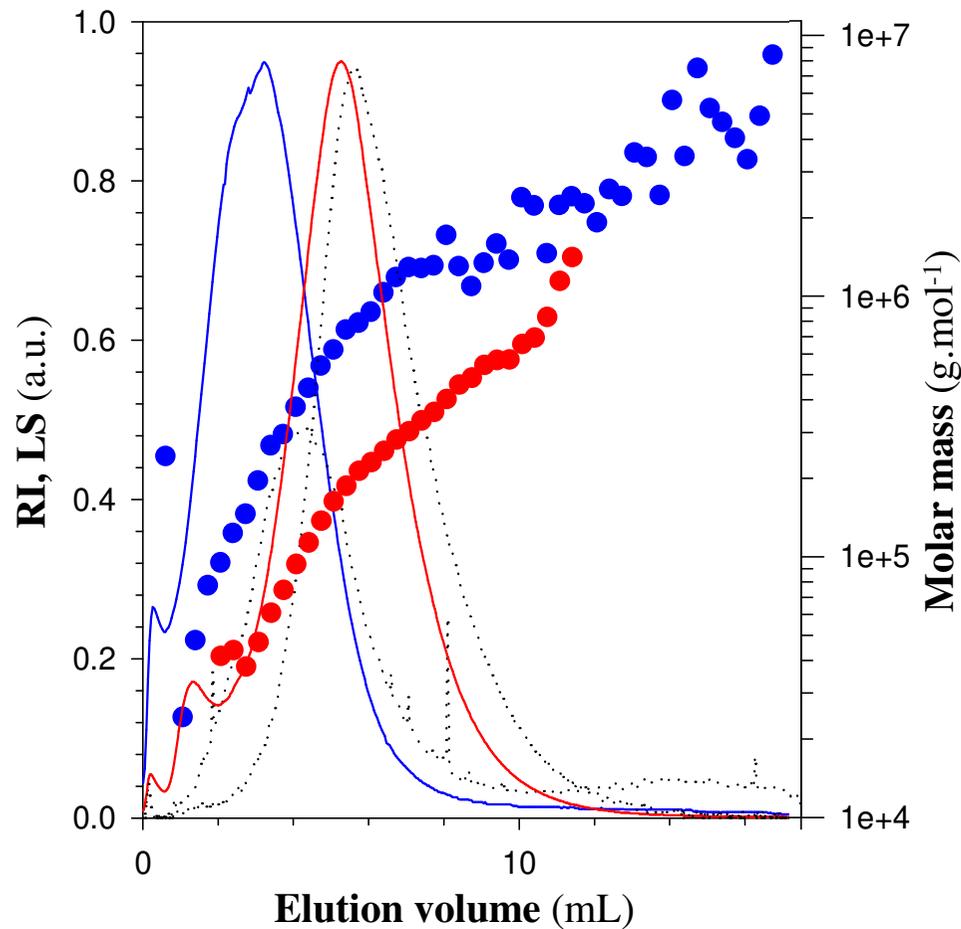
$$R_H \text{ CMP-7-C}_8 \approx R_H \text{ CMP}$$

$$LS \text{ CMP-7-C}_8 \approx LS \text{ CMP}$$

	CMP	CMP-7-C <sub>8</sub>
$\overline{M}_n$ (g.mol <sup>-1</sup> )	145 000	160 000
$\overline{M}_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	280 000	470 000
$\overline{DP}_n$	600	640
I	1.8	3

Chaînes isolées - conformation  
 proche du précurseur + quelques  
 agrégats augmentant Mw et Ip

# CMP / CMP-45-C<sub>8</sub>



## CMP-45-C<sub>8</sub>

$V_e$  CMP-45-C<sub>8</sub> <  $V_e$  HM-CMP

$R_H$  CMP-45-C<sub>8</sub> <  $R_H$  HM-CMP

	HM-CMP	CMP-45-C <sub>8</sub>
$\overline{M}_n$ (g.mol <sup>-1</sup> )	145 000	155 000
$\overline{DP}_n$	600	550
I	1.8	2.1

Chaînes isolées compactes

Associations hydrophobes intramoléculaires

Disparition des agrégats