

UNIVERSITÉ DE NANTES

U.F.R. D'ODONTOLOGIE

École doctorale de Biologie - Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANTES

Discipline : Sciences et génie des matériaux

Spécialité : Biomatériaux

Ahmed FATIMI

**Comportement rhéologique de biomatériaux pour l'ingénierie
ostéoarticulaire et dentaire : matrices extracellulaires synthétiques et
suspensions phosphocalciques**

Présentée et soutenue publiquement le 27 octobre 2008

devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Mme Nadia EL KISSI

Chargé de Recherche, CNRS (Grenoble, France)

M. Didier LETOURNEUR

Directeur de Recherche, CNRS (Paris, France)

Examineurs :

M. Jean-François TASSIN

Professeur des Universités, Université du Maine (Le Mans, France)

M. Marc BOHNER

Chargé de Recherche, Fondation RMS (Bettlach, Suisse)

Professeur Associé, Université de Sherbrooke (Sherbrooke, Canada)

Directeurs de thèse :

Mme Monique A. V. AXELOS

Directeur de Recherche, INRA (Nantes, France)

M. Pierre WEISS

Professeur des Universités, Université de Nantes (Nantes, France)

Membre invité :

Mme Claire VINATIER

Ingénieur R&D, Société GRAFTYS (Aix-en-Provence, France)

“Le futur appartient à ceux qui croient à la beauté de leurs rêves”

“The future belongs to those who believe in the beauty of their dreams”

Anna Eleanor Roosevelt (1884-1962)

Par délibération en date du 6 Décembre 1972, le Conseil de la
Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises
dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs et qu’il n’entend leur
donner aucune approbation, ni improbation.

PLAN DE LA THÈSE

AVANT-PROPOS

LISTE DES PUBLICATIONS

GLOSSAIRE

RÉSUMÉ

ABSTRACT

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Préambule
2. Les biomatériaux et le concept de biocompatibilité
3. Les hydrogels et l'ingénierie tissulaire
4. Les substituts osseux injectables
5. Généralités sur la rhéologie et la viscoélasticité

CHAPITRE 2 : LES MATRICES EXTRACELLULAIRES SYNTHÉTIQUES

1. Problématique
2. Les propriétés rhéologiques d'une matrice d'HPMC-Si utilisée en ingénierie tissulaire
3. Analyse viscosimétrique et étude de la gélification d'une solution d'HPMC-Si
4. Discussion

CHAPITRE 3 : LES SUSPENSIONS PHOSPHOCALCIQUES INJECTABLES

1. Problématique
2. Mécanisme de stabilité d'une suspension de céramique de phosphate de calcium
3. Caractérisation rhéologique et modélisation de l'injection d'une suspension de céramique phosphocalcique injectable
4. Discussion

CONCLUSION GÉNÉRALE - PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ANNEXES

A V A N T - P R O P O S

De nos jours, l'impact financier des biomatériaux est devenu important. Le marché annuel mondial des biomatériaux (implants orthopédiques et équipements ancillaires) représente à lui seul 21,9 milliards de dollars américains (2004) et connaît une croissance annuelle de plus de 10%. Ce marché est caractérisé par une forte domination des Etats-Unis (62%) suivie par l'Europe (20%) où la France occupe la deuxième place derrière l'Allemagne.

Plus de 5% de la population mondiale est concernée par les matériaux utilisés dans la réparation corporelle. Environ un million de prothèses sont posées chaque année à travers le monde. Si on considère toutes les autres applications thérapeutiques des biomatériaux qui ne cessent de croître, on peut facilement imaginer la part de marché que peuvent prendre de tels systèmes implantables. Chaque année aux Etats-Unis, jusqu'à 35 millions d'interventions chirurgicales nécessitent l'utilisation d'un système implantable en tout genre.

Pour les vingt prochaines années, avec l'utilisation croissante de ces biomatériaux, il faudra s'efforcer d'améliorer leur biocompatibilité et leurs propriétés tout en restant dans un contexte d'économie de marché omniprésente. La solution sera de réévaluer les matériaux existants et de les modifier avec les connaissances actuelles en ingénierie chimique et biologique. Ainsi s'est fait sentir le besoin de maintenir un contact permanent entre les ingénieurs dans les matériaux à la fine pointe de la technologie et les biologistes et/ou cliniciens en recherche, dans les hôpitaux ou en industrie. En effet, la plupart du temps, les cliniciens ne sont conscients ni de la complexité d'un tel système implantable, ni des caractéristiques des matériaux utilisés pour le fabriquer. La recherche en biomatériaux impliquera de plus en plus un échange de connaissances entre les chimistes, les ingénieurs, les biologistes et les cliniciens.

Les biomatériaux injectables constituent un domaine particulier d'utilisation par voie percutanée des biomatériaux. Cela leur impose certaines propriétés rhéologiques lors de leur mise en œuvre. C'est pour cela qu'au cours de ces travaux de recherche j'ai été mené à évaluer les propriétés rhéologiques de deux biomatériaux injectables utilisés en ingénierie ostéoarticulaire et dentaire. Ce projet de recherche m'a permis avant tout de découvrir un nouveau monde qui est celui des biomatériaux.

Ce travail a été mené au sein du Laboratoire d'Ingénierie Ostéoarticulaire et Dentaire (LIOAD, INSERM U 791, Université de Nantes) à Nantes en collaboration avec le Laboratoire Polymères Colloïdes Interfaces (LPCI, CNRS UMR 6120, Université du Maine) au Mans et l'unité Biopolymères Interactions Assemblages (BIA, INRA UR 1268) à Nantes.

LISTE DES PUBLICATIONS

Journaux internationaux indexés SCI :

A. Fatimi, J. F. Tassin, S. Quillard, M. A. V. Axelos, P. Weiss. The rheological properties of silylated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* 2008;29(5):533-543.

A. Fatimi, J. F. Tassin, J. Bosco, R. Deterre, M. A. V. Axelos, P. Weiss. Rheological characterisation and injectability modelling of an injectable calcium phosphate ceramic suspension. *Biomaterials* (soumis).

A. Fatimi, J. F. Tassin, R. Turczyn, M. A. V. Axelos, P. Weiss. Gelation studies of a silylated hydroxypropylmethylcellulose solution: influence of pH and sterilization. *Biomacromolecules* (soumis).

A. Fatimi, J. F. Tassin, M. A. V. Axelos, P. Weiss. The stability mechanisms of an injectable calcium phosphate ceramic suspension. *Acta Biomaterialia* (soumis).

C. Vinatier, O. Gauthier, **A. Fatimi**, C. Merceron, M. Masson, A. Moreau, *et al.* An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnology and Bioengineering* (accepté, sous presse).

S. Laïb, B. H. Fellah, **A. Fatimi**, S. Quillard, C. Vinatier, O. Gauthier, *et al.* X-ray fluorescence investigation of the *in vivo* degradation of a ruthenium labelled polysaccharide-based hydrogel for bone tissue engineering. *Biomaterials* (soumis).

S. Laïb, M. Petit, E. Bodio, **A. Fatimi**, P. Weiss, B. Bujoli. Labeling of a self-hardening bone substitute using ruthenium trisbipyridine complexes, for the analysis of its *in vivo* metabolism. *Comptes Rendus Chimie* 2008;11(6-7):641-649.

Journaux internationaux non indexés SCI :

A. Fatimi, M. A. V. Axelos, J. F. Tassin, P. Weiss. Rheological characterization of self-hardening hydrogel for tissue engineering applications: gel point determination and viscoelastic properties. *Macromolecular Symposia* 2008;266(1):12-16.

A. Fatimi, J. F. Tassin, M. A. V. Axelos, P. Weiss. Sedimentation study of biphasic calcium phosphate particles. *Key Engineering Materials* 2008;361-363(1):365-368.

J. Bosco, **A. Fatimi**, S. Quillard, J. M. Bouler, P. Weiss. Rheological properties of an injectable bioactive calcium phosphate material. *Key Engineering Materials* 2007;330-332(1):847-850.

P. Weiss, C. Vinatier, J. Sohier, **A. Fatimi**, P. Layrolle, V. Demais, *et al.* Self-hardening hydrogel for cartilage and bone tissue engineering. *Macromolecular Symposia* 2007;266(1):30-35.

G L O S S A I R E

ACP	Phosphate de calcium amorphe (<i>amorphous calcium phosphate</i>)
BCP	Céramique phosphocalcique biphasé (<i>biphasic calcium phosphate</i>)
BMP-2	Protéine de morphogénèse osseuse 2 (<i>bone morphogenetic protein 2</i>)
Ca/P	Rapport atomique calcium/phosphate (<i>calcium/phosphate atomic ratio</i>)
CDA	Apatite déficiente en calcium (<i>calcium deficient apatite</i>)
CMC	Carboxyméthylcellulose (<i>carboxymethylcellulose</i>)
CMCA	Carboxyméthylcellulose aminée (<i>amidated carboxymethylcellulose</i>)
DDS	Système de libération contrôlée (<i>drug delivery system</i>)
ECM	Matrice extracellulaire (<i>extracellular matrix</i>)
ESB	Société Européenne des Biomatériaux (<i>European Society for Biomaterials</i>)
FGF	Facteur de croissance fibroblastique (<i>fibroblast growth factor</i>)
FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
FT-Raman	Spectroscopie Raman à transformée de Fourier (<i>Fourier transform Raman spectroscopy</i>)
GAG	Glycosaminoglycane (<i>glycosaminoglycan</i>)
GFR	Groupe Français de Rhéologie (<i>French Group of Rheology</i>)
GPTMS	Glycidoxypropyltriméthoxysilane (<i>Glycidoxypropyltrimethoxysilane</i>)
HA	Hydroxyapatite (<i>hydroxyapatite</i>)
HEC	Hydroxyéthylcellulose (<i>hydroxyethylcellulose</i>)
HEMA	Hydroxyéthylméthacrylate (<i>hydroxyethyl methacrylate</i>)
HNC	Chondrocytes nasaux humains (<i>human nasal chondrocytes</i>)
HNSC	Chondrocytes de septum nasal humain (<i>human nasal septal chondrocytes</i>)
HPMC	Hydroxypropylméthylcellulose (<i>hydroxypropylmethylcellulose</i>)
HPMC-Si	Hydroxypropylméthylcellulose silanisée (<i>silated hydroxypropylmethylcellulose</i>)
HyalA	Acide hyaluronique (<i>hyaluronic acid</i>)
IBS	Substitut osseux injectable (<i>injectable bone substitute</i>)
ICPCS	Suspension de céramique phosphocalcique injectable (<i>injectable calcium phosphate ceramic suspension</i>)
IGF-1	Facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (<i>insulin-like growth factor 1</i>)
KLD-12	Leucine-lysine-acide aspartique (<i>Leucine-lysine-aspartic acid</i>)

LCST	Température critique inférieure de solubilité (<i>low critical solution temperature</i>)
MC	Méthylcellulose (<i>methylcellulose</i>)
NHAC	Chondrocytes articulaires normaux humains (<i>normal human articular chondrocytes</i>)
NIH	Institut National de la Santé (<i>National Institutes of Health</i>)
PDMS	Polydiméthylsiloxane (<i>poly(dimethyl siloxane)</i>)
PEG	Polyéthylène glycol (<i>poly(ethylene glycol)</i>)
PEGA	Polyéthylène glycol acrylate (<i>poly(ethylene glycol) acrylate</i>)
PEGDA	Polyéthylène glycol diacrylate (<i>poly(ethylene glycol) diacrylate</i>)
PEGMA	Polyéthylène glycol méthacrylate (<i>poly(ethylene glycol) methacrylate</i>)
PEO	Oxyde de polyéthylène (<i>poly(ethylene oxide)</i>)
PGA	Poly(acide glycolique) (<i>poly(glycolic acid)</i>)
PHEMA	Polyhydroxyéthylméthacrylate (<i>poly(hydroxyethyl methacrylate)</i>)
PLA	Poly(acide lactique) (<i>poly(lactic acid)</i>)
PLGA	Poly(acide lactique-co-acide glycolique) (<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>)
PMMA	Polyméthylméthacrylate (<i>poly(methyl methacrylate)</i>)
PPO	Oxyde de polypropylène (<i>poly(propylene oxide)</i>)
RAC	Chondrocytes articulaires de lapin (<i>rabbit articular chondrocytes</i>)
RGD	Arginine-glycine-acide aspartique (<i>arginine-glycine-aspartic acid</i>)
SFB	Société pour les Biomatériaux (<i>Society for Biomaterials</i>)
TGF-β	Facteur de croissance transformant β (<i>transforming growth factor β</i>)
VEGF	Facteur de croissance endothéliale vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
α-TCP	Phosphate tricalcique α (<i>α tricalcium phosphate</i>)
β-TCP	Phosphate tricalcique β (<i>β tricalcium phosphate</i>)

RÉSUMÉ

Les biomatériaux injectables constituent un domaine particulier d'utilisation par voie percutanée des biomatériaux. Cela leur impose certaines propriétés rhéologiques lors de leur mise en œuvre. Au cours de ces travaux, le principal objectif fut d'évaluer les propriétés rhéologiques de deux biomatériaux injectables utilisés en ingénierie ostéoarticulaire et dentaire : (i) une matrice extracellulaire synthétique et (ii) une suspension phosphocalcique injectable.

Un hydrogel (HPMC-Si) a été obtenu par greffage de 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS) sur les groupements hydroxyle d'une hydroxypropylméthylcellulose commerciale. Les propriétés rhéologiques de la solution avant et lors de la gélification ont été étudiées. Les résultats ont montré que la silanisation réduit le volume hydrodynamique des solutions diluées, mais n'affecte pas de manière significative le comportement rhéologique des solutions concentrées. Nous avons observé que la stérilisation des solutions d'HPMC-Si réduit le volume hydrodynamique des chaînes macromoléculaires et que l'augmentation du pH des solutions concentrées stériles réduit leur viscosité limite. L'étude de la thermogélification de l'HPMC a montré une séparation de phase durant la stérilisation. Les associations intra et intermoléculaires, non totalement réversibles, établies lors de cette étape peuvent être responsables des modifications des propriétés rhéologiques. La formation de différents hydrogels à partir des solutions basiques d'HPMC-Si a été étudiée. Grâce à la caractérisation rhéologique de ces hydrogels nous avons montré que la cinétique de réticulation ainsi que les propriétés viscoélastiques dépendent de la concentration finale en HPMC-Si, du pH final et de la température.

Une suspension de céramique phosphocalcique injectable considérée comme un substitut osseux injectable prêt à l'emploi a été étudiée. La caractérisation rhéologique de l'HPMC, qui constitue le fluide suspendant de cette suspension, a confirmé le comportement d'une solution macromoléculaire. La cinétique de sédimentation des particules phosphocalciques a montré l'influence de la taille des particules et la concentration du fluide suspendant sur la vitesse de sédimentation et sur la compacité des sédiments avant et après stérilisation. Les propriétés rhéologiques et d'injectabilité de cette suspension phosphocalcique ont ensuite été étudiées. Nous avons montré que les suspensions présentent une viscosité plus élevée par rapport à la solution d'HPMC et que les propriétés rhéologiques dépendent de la composition de la suspension. La simulation d'injection a été réalisée grâce à une seringue munie d'une aiguille. Une approche théorique basée sur l'écoulement capillaire d'un fluide non-newtonien a été utilisée pour prédire la pression d'injection à partir des résultats rhéologiques et des conditions opératoires d'extrusion. L'estimation théorique de la pression d'extrusion a confirmé le glissement à la paroi. L'influence du glissement a conduit à un facteur de proportionnalité constant entre la théorie et l'expérience.

A B S T R A C T

Injectable biomaterials are a particular field of biomaterials used for noninvasive surgical techniques (*e.g.* percutaneous surgery). The fundamental characteristic of this type of biomaterials is their rheological properties during implantation. In this context, the subject of this research work was to evaluate the rheological properties of two injectable biomaterials used in osteoarticular and dental tissue engineering: (i) a synthetic extracellular matrix and (ii) an injectable calcium phosphate suspension.

The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose hydrogel were studied. It is shown that although silanization reduces the hydrodynamic volume in dilute solution, but it does not affect significantly the rheological behavior of the concentrated solutions. In dilute solution, intrinsic viscosity of different HPMC-Si solutions before steam sterilization indicated that macromolecular chains occupied larger hydrodynamic volume compared to the sterilized HPMC-Si solutions. For the sterilized HPMC-Si concentrated solutions the limiting viscosities decreased when the pH increasing. This change remarked in dilute and concentrated domain has been attributed to the formation of both intra and intermolecular associations during the phase separation process of HPMC-Si during steam sterilization. The formation of HPMC-Si hydrogels from injectable aqueous solution was studied after neutralization. The study of the gelation process revealed the dependence of the final concentration of HPMC-Si hydrogel, pH and temperature on cross-linking kinetics and viscoelastic properties.

An injectable calcium phosphate ceramic suspension was studied. This 'ready to use' injectable bone substitute is consisting of an aqueous HPMC solution as matrix and calcium phosphate particles as fillers. The rheological characterization revealed the macromolecular behavior of the HPMC. The investigations of settling kinetics showed the dependence of the particle size and the HPMC concentration on the settling velocity and sediment compactness before and after sterilization. The rheological properties and injectability of this suspension were also studied. The suspensions showed a strongly increased viscosity as compared to the HPMC solution. The rheological properties of suspensions depend on the composition. A simple device has been used to characterize extrusion of the paste using a disposable syringe fitted with a needle. The injectability modeling was realized. A theoretical approach based on the capillary flow of non-newtonian fluids was used to predict the necessary pressure for injection, on the basis of rheological properties and extrusion conditions. The theoretical estimation of the extrusion pressure showed a wall slip in the suspensions, so that the injection pressure is less than anticipated. The influence of wall slip leads however to a constant proportionality factor between theory and injection experiments.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. PREAMBULE	3
2. LES BIOMATERIAUX ET LE CONCEPT DE BIOCOMPATIBILITE.....	4
2.1. <i>Introduction</i>	4
2.2. <i>Catégories de biomatériaux</i>	4
2.2.1. En fonction de la réponse de l'hôte.....	4
2.2.2. En fonction de l'utilisation.....	5
2.3. <i>Biocompatibilité des biomatériaux</i>	5
2.3.1. Notions théoriques.....	5
2.3.2. Biomatériaux de référence	6
2.4. <i>Conclusion</i>	8
3. LES HYDROGELS ET L'INGENIERIE TISSULAIRE.....	9
3.1. <i>Introduction</i>	9
3.2. <i>Définition</i>	10
3.3. <i>Méthodes de formation des hydrogels</i>	11
3.3.1. Réticulation covalente	11
3.3.2. Réticulation ionique.....	12
3.3.3. Réticulation physique	13
3.4. <i>Structures et propriétés des hydrogels</i>	13
3.4.1. Gonflement	14
3.4.2. Elasticité	14
3.4.3. Porosité, paramètre de maille ou perméabilité.....	15
3.4.4. Diffusion.....	15
3.5. <i>Application des hydrogels en ingénierie tissulaire</i>	16
3.5.1. Applications <i>in vitro</i>	17
3.5.2. Applications <i>in vivo</i>	18
3.6. <i>Les hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage</i>	19
3.6.1. Le chitosan.....	19
3.6.2. L'alginate.....	20
3.6.3. L'acide hyaluronique.....	21
3.6.4. La cellulose.....	22
a. L'hydroxypropylméthylcellulose	23
b. La carboxyméthylcellulose	25
3.7. <i>Conclusion</i>	26
4. LES SUBSTITUTS OSSEUX INJECTABLES	27
4.1. <i>Introduction</i>	27
4.2. <i>Préparation des suspensions phosphocalciques injectables</i>	28
4.2.1. Cahier des charges.....	28
4.2.2. Composition des suspensions phosphocalciques injectables	28
a. Phase minérale : BCP	28
i. Hydroxyapatite (HA).....	29
ii. Phosphate tricalcique β (β -TCP).....	29
b. Phase organique : HPMC.....	30
4.3. <i>Généralités sur les suspensions granulaires</i>	30
4.3.1. Introduction.....	30
4.3.2. Forces d'interaction interparticulaires.....	31
a. Forces volumiques.....	31
b. Forces de surface.....	33
c. Théorie de DLVO.....	34
i. Forces attractives : forces de Van der Waals.....	34
ii. Forces répulsives : forces électrostatiques.....	35
4.3.3. Propriétés du fluide suspendant.....	36
a. La nature du polymère	36
b. Effet de la concentration	37
c. Propriétés des polymères en solution	37
i. Viscosité des solutions macromoléculaires diluées.....	37
ii. Viscosité intrinsèque	38
iii. Masses molaires	40
4.4. <i>Conclusion</i>	41
5. GENERALITES SUR LA RHEOLOGIE ET LA VISCOELASTICITE	42

5.1.	<i>Introduction</i>	42
5.2.	<i>Définition</i>	42
5.3.	<i>Notion de mouvement de cisaillement simple</i>	42
5.3.1.	Notions fondamentales	42
a.	Contrainte de cisaillement.....	43
b.	Taux de cisaillement.....	43
c.	Viscosité.....	43
5.3.2.	Modes d'écoulement des fluides	44
a.	Comportement sans seuil d'écoulement.....	44
b.	Comportement avec seuil d'écoulement	45
c.	Modélisations mathématiques des courbes d'écoulement	45
5.4.	<i>Viscoélasticité</i>	46
5.4.1.	Introduction.....	46
5.4.2.	Quelques rappels sur la rhéologie oscillatoire	47
a.	Sollicitation périodique.....	47
b.	Notions fondamentales	47
5.4.3.	Dépendance en fréquence de quelques matériaux typiques	50
5.5.	<i>Rhéométrie et appareillages</i>	51
5.5.1.	Introduction.....	51
5.5.2.	Rhéomètres rotatifs.....	51
a.	Cône plan.....	51
b.	Plans parallèles.....	52
c.	Cylindres coaxiaux	53
5.5.3.	Rhéomètres capillaires.....	54
5.6.	<i>Conclusion</i>	55
CHAPITRE 2 : LES MATRICES EXTRACELLULAIRES SYNTHÉTIQUES.....		56
1.	PROBLEMATIQUE	57
2.	LES PROPRIETES RHEOLOGIQUES D'UNE MATRICE D'HPMC-SI UTILISEE EN INGENIERIE TISSULAIRE	59
3.	ANALYSE VISCOSIMETRIQUE ET ETUDE DE LA GELIFICATION D'UNE SOLUTION D'HPMC-SI	61
4.	DISCUSSION	63
CHAPITRE 3 : LES SUSPENSIONS PHOSPHOCALCIQUES INJECTABLES		68
1.	PROBLEMATIQUE	69
2.	MECANISME DE STABILITE D'UNE SUSPENSION DE CERAMIQUE DE PHOSPHATE DE CALCIUM.....	70
3.	CARACTERISATION RHEOLOGIQUE ET MODELISATION DE L'INJECTION D'UNE SUSPENSION DE CERAMIQUE PHOSPHOCALCIQUE INJECTABLE	72
4.	DISCUSSION.....	74
CONCLUSION GÉNÉRALE - PERSPECTIVES		79
BIBLIOGRAPHIE.....		82
LISTE DES FIGURES		92
LISTE DES TABLEAUX		93
ANNEXES.....		94

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La science des biomatériaux s'est beaucoup développée depuis une trentaine d'années. Le premier symposium international des biomatériaux a été inauguré en 1967 alors que la communauté scientifique a fondé une Société pour les Biomateriaux aux Etats-Unis (SFB) en 1974 puis une en Europe (ESB) en 1976.

L'utilisation des biomatériaux ne s'arrête plus à la simple fonction de biomécanique qu'on a bien voulu leur donner initialement. Toutes sortes de matériaux ont été testés comme substituts biologiques sous la forme de prothèses ou de matériaux de comblement pour remplacer une partie manquante mécanique voire fonctionnelle. Si la plupart des systèmes implantés ont d'abord eu des propriétés restauratrices de manière passive et inerte, de nouvelles voies thérapeutiques interactives avec l'hôte sont actuellement explorées grâce à la plus grande connaissance des mécanismes de développement de l'ingénierie tissulaire.

Les biomatériaux injectables constituent un domaine particulier d'utilisation par voie percutanée des biomatériaux. Cela leur impose certaines propriétés rhéologiques lors de leur mise en œuvre. Les chirurgies orthopédiques et dentaires utilisent de plus en plus des biomatériaux injectables. En ingénierie tissulaire, les biomatériaux injectables sont considérés comme des matrices extracellulaires synthétiques qui supportent la différenciation et la prolifération des cellules. Le concept de biomatériau injectable rassemble entre autres les ciments hydrauliques, les céramiques phosphocalciques, les hydrogels, les matériaux d'origine naturelle et les vecteurs de substances actives.

Au cours de ces travaux de doctorat, le principal objectif sera d'évaluer les propriétés rhéologiques de deux biomatériaux injectables utilisés en ingénierie ostéoarticulaire et dentaire : une matrice extracellulaire synthétique et une suspension phosphocalcique injectable.

Nous consacrerons tout d'abord une partie bibliographique aux biomatériaux et au concept de biocompatibilité. Nous passerons ensuite en revue la description et l'utilisation des hydrogels en ingénierie tissulaire. Des généralités sur les substituts osseux phosphocalciques injectables seront également présentées. Nous finirons notre étude bibliographique par un rappel sur la rhéologie et la viscoélasticité.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons le comportement d'un hydrogel d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si), considéré comme matrice tridimensionnelle pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, d'un point de vue physico-chimique, rhéologique et viscoélastique. Dans un premier temps une caractérisation sous différentes

formes (poudres, solutions diluées et solution concentrées) de l'influence de la silanisation de l'hydroxypropylméthylcellulose sera présentée. Aussi nous présenterons l'influence du pH et de la stérilisation à la vapeur sur le comportement rhéologique de l'HPMC-Si en milieu dilué et concerté. L'étude de la cinétique de réticulation de cet hydrogel ainsi que l'étude de la viscoélasticité seront ensuite rapportées en fonction de la concentration, du pH et de la température.

Le troisième chapitre aura pour ambition de faire une étude globale sur les suspensions phosphocalciques injectables (ICPCS). Tout d'abord, nous nous intéresserons au mécanisme de stabilité de ces suspensions. Enfin, nous présenterons le comportement rhéologique de ces suspensions ainsi que l'examen et la modélisation de leur injectabilité via une seringue équipée d'une aiguille.

Pour clore ce travail, une conclusion générale permettra de résumer l'ensemble de nos travaux de recherche et d'aborder les perspectives actuelles du domaine des biomatériaux injectables.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Préambule

Nous rappellerons dans la première partie de ce chapitre des généralités sur les biomatériaux et sur le concept de biocompatibilité. Nous présenterons en détail les différentes catégories de biomatériaux en fonction de la réponse de l'hôte et de l'utilisation. Ensuite nous évoquerons les notions théoriques de la biocompatibilité ainsi que les différents biomatériaux de référence.

Dans la deuxième partie de ce chapitre nous décrirons les hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire. Nous développerons plus particulièrement les méthodes de formations des hydrogels ainsi que leurs structures et leurs propriétés. Une description des hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage sera également présentée.

La troisième partie de ce chapitre sera consacrée aux substituts osseux injectables où nous présenterons en détail les suspensions phosphocalciques. Ensuite nous décrirons les suspensions granulaires du point de vue de leur stabilité puis les propriétés des solutions de polymères utilisés comme fluides suspendants.

Notre outil de caractérisation étant principalement la rhéologie, il nous a semblé utile de décrire les différentes notions fondamentales de la rhéologie et de la viscoélasticité. Nous présenterons donc dans un premier temps la notion de mouvement de cisaillement simple. L'objectif sera de présenter les différentes grandeurs rhéologiques (contrainte et taux de cisaillement et viscosité) et les différents modes d'écoulement. Dans un deuxième temps nous décrirons la rhéologie oscillatoire et la réponse viscoélastique de quelques matériaux typiques. Enfin dans un dernier temps, nous présenterons les différents types des rhéomètres.

2. Les biomatériaux et le concept de biocompatibilité

2.1. Introduction

Le terme 'biomatériau' a été redéfini à plusieurs reprises pour s'adapter à l'évolution des types de matériaux utilisés à cet effet [1-4]. En 1986, la Société Européenne des Biomateriaux (ESB) a proposé une première définition. Elle a défini un biomatériau comme : «un matériau utilisé dans un dispositif médical pour interagir avec les milieux biologiques». En 1991, une définition complémentaire a été proposée par le même groupe lors de la conférence de Chester (UK). Un biomatériau était ainsi défini comme : «un matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques, qui participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance fonctionnelle» [5]. Cependant, ces deux définitions manquent de rigueur en omettant de clarifier deux points importants : la réaction de l'hôte et la durée de service [1]. De plus, la seconde définition ne tient pas compte des matériaux contenant des cellules vivantes [2].

Une définition plus précise et plus satisfaisante avait été soumise dès 1982 lors de la conférence de consensus de l'Institut National de la Santé (NIH) aux Etats-Unis : «un biomatériau est un matériau d'origine naturelle ou synthétique, utilisé seul ou combiné avec un principe actif, comme partie intégrante d'un dispositif, pour le traitement, l'accroissement ou le remplacement de tissus ou organes, sans causer de dommage aigu ou chronique à son hôte, tout en assurant son efficacité biologique et/ou physique prévue, pendant sa durée de service *in vivo*» [6].

Cette définition considère surtout deux aspects trop souvent ignorés qui sont les effets indésirables et la durée de service de l'implant [1]. En fait, cette définition concorde mieux avec le sens que l'on attribue actuellement à la biocompatibilité [2].

2.2. Catégories de biomatériaux

2.2.1. En fonction de la réponse de l'hôte

En fonction de la réponse de l'hôte, un biomatériau peut être placé dans une des quatre catégories suivantes [6]:

- Matériau inerte : absence de réponse ou réponse très faible de l'hôte ;
- Matériau interactif : réponse spécifique comme une adhésion ou une croissance du tissu adjacent à la surface ou dans l'implant ;
- Matériau viable : le matériau contenant des cellules vivantes est traité par l'hôte comme une matrice tissulaire normale ;
- Matériau replant : il s'agit d'un matériau de tissu natif cultivé *in vitro* à partir des cellules du patient.

Les deux derniers types se rapprochent plus en fait des greffes hétérologue et autologue avec une étape intermédiaire de culture cellulaire *in vitro*. Ils trouvent plutôt une application dans la régénération tissulaire [7].

2.2.2. En fonction de l'utilisation

En fonction de leur rôle à jouer, les biomatériaux sont répartis en quatre catégories [6]:

- Remplacement d'un tissu malade ou non fonctionnel : articulations, valves cardiaques, dents et lentilles oculaires ;
- Assistance à la réparation d'un tissu : fils de sutures, implants chirurgicaux pour les réductions de fractures et dispositifs de réparation de ligaments et tendons ;
- Remplacement complet ou partiel de la fonction d'un organe majeur : hémodialyse, assistance respiratoire et cardiaque, perfusion, libération d'insuline ;
- Libération d'un principe actif : libération ciblée à une région localisée ou systémique avec un taux soutenu dans le temps.

2.3. *Biocompatibilité des biomatériaux*

2.3.1. Notions théoriques

Lorsqu'on aborde la question de biocompatibilité d'un biomatériau, il est difficile de la définir sur le plan purement qualitatif. Alors que des millions de dispositifs médicaux sont implantés chez l'homme chaque année avec un taux de succès très raisonnable, on pourrait croire que la biocompatibilité est un concept bien assimilé [8].

Une réponse inflammatoire aiguë de quelques jours est observée avec n'importe quel type d'implant. Tout implant non dégradable va induire chez l'hôte un passage à l'inflammation chronique et même une réponse à un corps étranger à long terme. Dans le contexte de l'implantation, ces réponses doivent être perçues comme étant des réponses locales inévitables. L'étendue et la durée de la réaction inflammatoire caractérisent la biocompatibilité d'un biomatériau. Ainsi, le degré de perturbation des mécanismes homéostatiques et l'étendue des réponses physiopathologiques sont des mesures de la réaction de l'hôte qui peuvent permettre de déterminer la biocompatibilité d'un biomatériau et ses chances d'utilisation en tant qu'implant [9].

À partir de l'histopathologie morphologique descriptive de la réaction inflammatoire, la notion de biocompatibilité a évolué vers une énonciation plus globale du mode d'interaction entre les tissus de l'hôte et le matériau implanté afin de définir si cette interaction permet d'atteindre les attentes prévues en fonction du site et du but de l'implantation. Ainsi, une définition plus spécifique de la biocompatibilité d'un système implantable a été adoptée par l'ensemble de la

communauté scientifique dans le domaine. La biocompatibilité d'un matériau est définie par la capacité de ce matériau à accomplir un rôle avec une réponse de l'hôte appropriée, dans une application spécifique [2, 3, 8].

En fait, cette conception actuelle de la biocompatibilité qui inclue l'application fonctionnelle de l'implant, est plus restrictive pour un matériau donné. En effet, un matériau qui a fait preuve d'innocuité dans une application spécifique peut ne pas être biocompatible dans une autre application. Il faut alors envisager une nouvelle évaluation de la biocompatibilité avec la nouvelle application. Par contre, un matériau qui provoque une réaction adverse dans une application donnée n'est pas forcément à condamner d'office puisqu'il peut être tout à fait biocompatible dans une autre application [10]. Dans l'interaction entre l'implant et les tissus adjacents, les caractéristiques physico-chimiques de la surface d'un matériau sont certainement parmi les paramètres les plus critiques à considérer pour comprendre, prévoir et donc orienter la réponse initiale de l'hôte favorablement en fonction du rôle de l'implant, améliorant ainsi sa biocompatibilité. Les propriétés de l'implant dans son ensemble, encore appelées propriétés de masse (composition intérieure), vont plutôt déterminer le succès de l'implant à long terme [11]. Pour une évaluation plus globale de la biocompatibilité d'un système implantable, il faut tenir compte non seulement du matériau qui le compose mais aussi des additifs, des résidus et/ou contaminants de fabrication, des produits de dégradation, de l'interaction de toutes les composantes et des caractéristiques du produit fini. Une évaluation du biomatériau isolé ne s'avère pas suffisante pour prévoir la réaction causée par le produit fini après son implantation [10, 12].

Finalement, il n'existe pas de définition absolue de la biocompatibilité puisque le monde des biomatériaux est en perpétuelle évolution. Mais d'un point de vue théorique, la réponse de l'hôte recherchée, est toute interaction positive entre le matériau implanté et les tissus avoisinants. La biocompatibilité correspond à un processus dynamique bidirectionnel qui implique les effets temporels de l'hôte sur le matériau et du matériau sur l'hôte [6].

2.3.2. Biommatériaux de référence

La biocompatibilité n'est pas une grandeur mesurable, tout au plus peut-on prétendre apprécier la biocompatibilité d'un matériau à travers la comparaison de son comportement, dans des circonstances expérimentales codifiées, à celui de matériaux dits de référence [6].

La pénurie d'une bonne documentation scientifique sur les standards de caractérisation des biommatériaux de référence, pose un problème pour définir la biocompatibilité [13]. C'est pourquoi en 2000, des bases de données de référence des propriétés des biommatériaux ont été élaborées [11]. Il s'agissait avant tout de déterminer les informations nécessaires et pertinentes

qui doivent figurer dans ces bases de données pour contribuer à l'évaluation et à l'amélioration des performances des matériaux ou dispositifs implantables actuels et futurs. En effet, le développement de bases de données permettra d'avoir des informations utiles à l'identification et la sélection des biomatériaux pour les nouveaux systèmes implantables tout en limitant les tests redondants de caractérisation des propriétés. L'intérêt de déterminer des matériaux de référence a été concentré essentiellement dans le domaine orthopédique, ophtalmique, cardio-vasculaire, dentaire et en ingénierie tissulaire [11] :

- Les matériaux orthopédiques doivent être classés en fonction de leurs composants, de la réponse biologique qu'ils provoquent et de leurs propriétés de surface et de masse, de façon à construire une base de données matricielle. Parmi les matériaux de référence choisis, on retrouve par ordre de priorité :
 - i.* titane ;
 - ii.* alliages chrome-cobalt ;
 - iii.* oxyde d'aluminium ;
 - iv.* aciers inoxydables ;
 - v.* polyméthylméthacrylate (PMMA) ;
 - vi.* poly(acide lactique-*co*-acide glycolique) (PLGA).
- Un consensus s'est établi sur la nécessité de définir les propriétés des matériaux ophtalmiques pour ériger des standards dans les tests d'étalonnage. La base de données doit présenter les propriétés mécaniques (module élastique, forces de tension et flexion), optiques (indice de réfraction et transparence), chimiques (hydrophobicité, teneur en eau) et biologiques (comportement, interaction, innocuité). Parmi les matériaux de référence choisis, on retrouve par ordre de priorité :
 - i.* polydiméthylsiloxane (PDMS) ;
 - ii.* polyméthylméthacrylate (PMMA) ;
 - iii.* polyhydroxyéthylméthacrylate (PHEMA).
- La base de données des matériaux cardio-vasculaires doit contenir des informations sur les propriétés en fonction des applications médicales spécifiques (valves cardiaques et autres dispositifs cardio-vasculaires). À cause d'un manque de standardisation des différents tests de caractérisation des propriétés, les seuls matériaux de référence retenus pour le moment sont les polyuréthanes.
- La base de données des matériaux dentaires doit se construire sur la composition, les propriétés et les performances cliniques. Les matériaux de référence sont entre autres les sulfates et phosphates de calcium et les métaux.

- Pour les matériaux en ingénierie tissulaire, la base de données doit considérer le type (naturel ou synthétique et résorbable ou irrésorbable) et les caractéristiques physico-chimiques (composition de masse, porosité, vitesse de dégradation) et mécaniques (module élastique, forces de tension et compression). Ce nouveau domaine étant en plein essor, les matériaux de référence sont encore à déterminer. Ils doivent être caractérisés de manière spécifique (porosité, interconnectivité, chimie de surface et de masse, propriétés physiques et mécaniques, réactivité cellulaire).

2.4. Conclusion

En conclusion de cette partie, la biocompatibilité est une notion évolutive qui doit suivre les nouveautés en implantologie (nouveau matériau, nouveau système, nouvelle technologie ou nouvelle application). Avec le besoin permanent de connaître les limites de nouveaux biomatériaux, il est essentiel de développer sans cesse de meilleures approches et méthodes afin de prédire la durabilité et la performance *in vivo* de ces biomatériaux conçus sous forme de systèmes implantables. Les progrès dans l'évaluation de la biocompatibilité seront liés avec ceux des matériaux assurant ainsi la naissance de nouvelles générations de biomatériaux.

A partir de ce concept, notre unité de recherche (INSERM U791) a développé deux types de biomatériaux injectables : une matrice extracellulaire synthétique pour l'ingénierie tissulaire du cartilage [14, 15] et un substitut osseux injectable pour l'ingénierie ostéoarticulaire et dentaire [16]. Dans les deux parties qui suivent nous nous intéresserons à ces deux types de biomatériaux injectables.

3. Les hydrogels et l'ingénierie tissulaire

3.1. Introduction

L'ingénierie tissulaire est une stratégie ayant pour objectif de réparer ou de constituer des tissus fonctionnels ou des organes proches de ceux de l'homme. C'est un domaine multidisciplinaire qui applique les principes des sciences de la vie, la biologie cellulaire et moléculaire et la physico-chimie [17]. Les applications de l'ingénierie tissulaire concernent tous les domaines de la chirurgie reconstructrice. Les techniques d'ingénierie tissulaire impliquent la culture de cellules vivantes sur une structure synthétique. Les trois éléments fondamentaux impliqués en ingénierie tissulaire sont :

- La matrice synthétique appropriée pour la transplantation et le maintien des cellules ;
- Les cellules réparatrices qui forment une matrice fonctionnelle ;
- Les molécules bioactives, comme les cytokines et les facteurs de croissance, qui permettront d'appuyer la formation des nouveaux tissus [18].

La matrice synthétique est la structure sur laquelle l'architecture tissulaire doit s'organiser. Les cellules sont soit celles de l'hôte qui vont proliférer sur la matrice synthétique *in vivo*, soit les cellules de l'hôte cultivées *in vitro* sur la matrice puis secondairement auto-greffées au patient.

Les cellules sont responsables de la régénération de nouveaux tissus par la synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire. La structure synthétique joue le rôle d'une charpente qui fournit initialement une stabilité mécanique et aussi un modèle pour guider la croissance cellulaire tridimensionnelle. L'interaction cellule/matériau constitue donc un paramètre crucial pour la réussite d'une application en l'ingénierie tissulaire.

Les hydrogels sont des matrices synthétiques constituées d'un réseau de polymères hydrophiles qui absorbent l'eau et/ou les fluides biologiques. Les hydrogels peuvent être créés à partir d'un grand nombre de matériaux solubles dans l'eau incluant des polymères synthétiques, des protéines et des molécules naturelles. La structure tridimensionnelle (3D) des hydrogels est due à la réticulation qui forme une structure insoluble dans le fluide de l'environnement. L'élasticité de ces structures et la présence d'une grande quantité d'eau permettent une ressemblance avec les différents tissus biologiques.

En 1954, Wichterle et Lim ont synthétisé le premier hydrogel dans le but de concevoir une substance idéale et biocompatible [19]. Des chaînes moléculaires de 2-hydroxyéthylméthacrylate (HEMA) étaient liées entre elles par une succession de liaisons chimiques pour former une structure moléculaire uniforme selon les quatre critères de conception suivants [20] :

- Eviter la dissolution des macromolécules de l'hydrogel dans les fluides biologiques.
- Créer une structure chimique et biochimique stable.

- Avoir une haute perméabilité pour les éléments nutritifs et les déchets biologiques.
- Reproduire les caractéristiques physiques semblables aux tissus biologiques naturelles.

La teneur en eau et les propriétés mécaniques des hydrogels sont similaires à celles des tissus humains, ce qui permet de les utiliser dans de nombreuses applications biomédicales. La première utilisation des hydrogels synthétiques pour des applications biomédicales comme implant a eu lieu en 1954. Sept années après, Wichterle avait conçu des lentilles souples de contact à partir d'hydrogels [20]. Depuis, les hydrogels ont connu un succès remarquable dans le domaine biomédical. Ils étaient utilisés comme systèmes de libération de principes actifs (DDS) [21, 22], peau artificielle [7], réparation du cartilage [23], remplacement du nucleus pulposus du disque intervertébral [24, 25], de la cornée [26, 27], du tissu vasculaire [28] et pour d'autres applications biomédicales [29-33].

En se basant sur les quatre critères de Wichterle [20], les matrices synthétiques doivent être biocompatibles et doivent adapter leurs formes et leurs structures au tissu ciblé. Les hydrogels doivent également maintenir un contact étroit avec les tissus avec un effet d'adhésion négligeable. En outre, les matrices synthétiques doivent être en mesure d'envelopper les cellules et de favoriser la prolifération de ces dernières sans les endommager sous l'effet de la pression osmotique. Les matrices synthétiques doivent être largement poreuses pour permettre la diffusion des nutriments et des métabolites entre les cellules et l'environnement local [30]. En ingénierie tissulaire, les hydrogels ont deux avantages supplémentaires. (i) Tout d'abord, dans le cadre des techniques chirurgicales non-invasives, ces hydrogels réticulent *in situ*, ce qui permet d'éviter la chirurgie ouverte pour les implanter [34]. Ils peuvent être relativement réticulés sous différentes conditions tant que les cellules encapsulées survivent à la modification physique ou chimique causant la gélification [35]. (ii) Deuxièmement, les matrices synthétiques doivent être biodégradables au fur et à mesure que les cellules prolifèrent au sein des tissus fonctionnels. La biodégradabilité est une caractéristique que certains hydrogels présentent [34].

3.2. Définition

Les hydrogels sont des polymères hydrophiles réticulés qui sont capables de gonfler dans l'eau et forment des réseaux tridimensionnels insolubles. Le réseau reste à l'équilibre dans un milieu aqueux en raison de l'équilibre des forces élastiques du polymère réticulé et des forces osmotiques du liquide (Figure 1.1). La composition chimique et la densité de réticulation déterminent le taux de gonflement et la porosité du gel [30]. En outre, la réticulation des hydrogels leur confère une réponse élastique suite à une sollicitation de contrainte donnée [36].

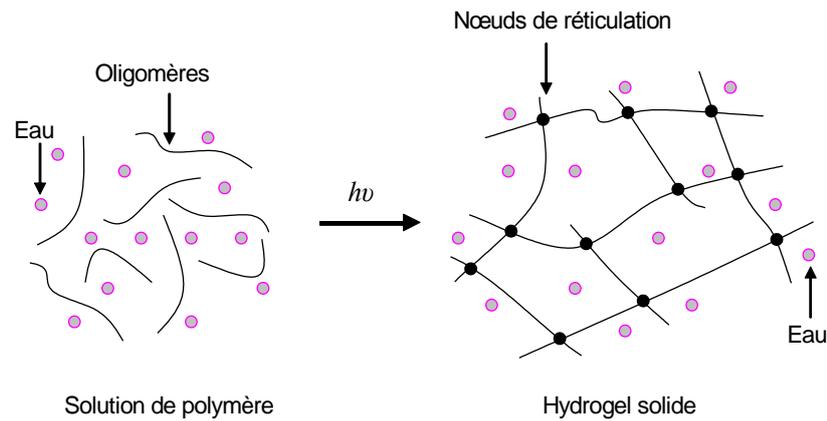


Figure 1.1 : Schéma de la transition sol-gel suite à la photopolymérisation d'un hydrogel (d'après Hillel et al., 2007 [37]).

3.3. Méthodes de formation des hydrogels

La réticulation du polymère représente un facteur fondamental dans la structure de l'hydrogel. Elle affecte la formation de l'hydrogel, sa forme, sa taille et aussi sa dégradation. Pour une application médicale réussie, le contrôle de la réticulation est impératif. Cette section passera en revue les différents types de réticulation des hydrogels : réticulation covalente, ionique et physique [38]. En outre, elle abordera les différents hydrogels qui présentent chaque type de réticulation avec un accent sur leurs applications en ingénierie tissulaire.

3.3.1. Réticulation covalente

La réticulation covalente peut être initiée par la polymérisation radicalaire, elle peut aussi se produire par des réactions de condensation, des irradiations à haute énergie (rayonnement gamma) et des catalyses enzymatiques [38]. Avant le début de la polymérisation radicalaire, les polymères nécessitent généralement une modification par l'ajout d'unités polymérisables. Par exemple, l'acrylate a été ajouté aux groupes fonctionnels du polyéthylène glycol (PEG) pour promouvoir les associations covalentes dans le polymère [39]. La polymérisation radicalaire des groupes d'acrylate est initiée par la lumière ou par des systèmes thermiques [31, 40].

La photopolymérisation implique la conversion des solutions liquides des polymères qui forment un gel en présence de lumière et d'un photo-initiateur [38]. La photopolymérisation est une méthode idéale pour l'implantation clinique, elle renforce le contrôle spatial tridimensionnel et temporel de l'hydrogel. Les hydrogels peuvent être ainsi injectés, formés et solidifiés *in situ* [35]. Cette approche est compatible avec les techniques chirurgicales non-invasives et peut être appliquée dans la chirurgie craniofaciale avec une photopolymérisation arthroscopique en utilisant une fibre optique comme source de lumière [34].

En ingénierie tissulaire, et à titre d'exemple, deux hydrogels formés par réticulation covalente sont utilisés : le polyéthylène glycol (PEG) et l'acide hyaluronique (HyalA) qui est un glycosaminoglycane (GAG) trouvé dans la matrice extracellulaire (ECM). La modification des gels par des molécules bioactives et/ou des groupes chimiques réticulants augmente leur utilité comme matrices synthétiques par l'amélioration de la fonctionnalité biochimique et la stabilité mécanique [41]. Les molécules de polyéthylène glycol acrylate (PEGA) polymérisent et forment un hydrogel réticulé chimiquement [42]. L'acide hyaluronique, à son tour, doit subir une modification structurelle de ses groupes fonctionnels pour permettre une réaction de réticulation radicalaire [43]. En 2004, Shu *et al.* ont synthétisé un nouvel acide hyaluronique modifié par l'ajout des fonctions thiol. Cet hydrogel est réticulable *in situ* et permet d'avoir les caractéristiques d'une matrice extracellulaire synthétique [44]. Hern et Hubbell étaient les premiers à modifier le PEGA par un peptide adhésif (RGD) pour améliorer l'adhésion cellulaire et promouvoir la cicatrisation tissulaire [45]. Dans d'autres expériences, le polyéthylène glycol méthacrylate (PEGMA) a été modifié par des peptides pour améliorer son utilisation en ingénierie osseuse [46]. Aussi, l'acide hyaluronique a été copolymérisé par le polyéthylène glycol diacrylate (PEGDA) et le RGD pour améliorer l'adhésion et la prolifération des cellules aussi bien que pour améliorer la réparation du cartilage [47, 48].

Les dérivés cellulotiques peuvent aussi subir une réticulation covalente afin de former un hydrogel. Le greffage de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) avec des silanes a été développé par notre unité de recherche (INSERM U791) [49]. La propriété essentielle de ce polysaccharide en solution basique est d'autoréticuler lors d'un abaissement de pH et d'obtenir un gel réticulé sans catalyseur chimique et sans réaction exothermique [50]. L'autoréticulation de ce gel silanisé est basée sur la chimie du silicium et en particulier celle des silanols [51]. La dissolution du polymère dans une solution basique permet la transformation des fonctions silanes en fonctions silanolates, et à pH physiologique les silanols se forment après la protonation des silanolates. La polycondensation de ces derniers aboutit à la création d'un réseau tridimensionnel.

3.3.2. Réticulation ionique

Un deuxième type de réticulation des hydrogels se produit par des interactions ioniques. L'alginate, un polysaccharide naturel abondant dans les algues, forme généralement un hydrogel par les liens ioniques en présence des cations divalents ou polyvalents [52]. Dans une réaction à température ambiante et à pH physiologique, les ions calcium interagissent avec l'alginate pour créer des ponts ioniques entre les chaînes du polymère [53]. Les interactions ioniques sont plus faibles que la réticulation covalente, et les gels d'alginate formés subissent

une dissolution rapide dans une solution physiologique, un environnement où les biohydrogels sont censés être utilisés. En 1999, LeRoux *et al.* ont démontré que le contact du gel d'alginate avec la solution du chlorure de sodium diminue significativement ses propriétés mécaniques [54]. Dans un hydrogel d'alginate, le mécanisme d'échange des ions divalents par des cations monovalents de sodium entraîne une dégradation du polymère [55].

3.3.3. Réticulation physique

Certains agents de réticulations présentent un effet non désirable sur les cellules et devraient être enlevés avant l'application de l'hydrogel [38]. Pour éviter les productions potentiellement toxiques, les scientifiques ont étudié la réticulation d'hydrogels par voie physique. Les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les forces de Van der Waals sont les principales interactions primaires responsables de la réticulation physique. Bien que chaque lien physique soit relativement faible, la combinaison des interactions crée un lien fort [56]. Zhang a décrit l'auto-assemblage moléculaire comme une construction moléculaire suivant une série d'étapes pour former un réseau stable et défini dont la déréticulation est empêchée par l'interaction physique entre les chaînes du polymère [38]. Si une grande partie des travaux de recherche de Zhang se concentre sur les protéines, le principe fondamental de l'auto-assemblage des peptides peut être étendu aux polymères synthétiques et aussi aux molécules naturelles. C'est le cas des copolymères amphiphiles (Pluronic[®]) constitués d'oxyde de polyéthylène (PEO) et d'oxyde de polypropylène (PPO). Sa réticulation est basée sur les interactions hydrophobes dans une solution aqueuse suite à une augmentation de température [57].

La réticulation physique des facteurs bioactifs est l'une des méthodes employées pour créer des hydrogels biomimétiques. Les facteurs de croissance restent actifs après l'encapsulation pour augmenter la prolifération et la différenciation des cellules encapsulées et pour améliorer la régénération tissulaire locale [52, 58]. Les facteurs de croissance qui peuvent être piégés au sein des hydrogels incluent entre autres la protéine de morphogénèse osseuse de type 2 (BMP-2), les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF), le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), le facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1 (IGF-1) et le facteur de croissance transformant β (TGF- β) [59].

3.4. Structures et propriétés des hydrogels

La fonction d'un hydrogel dépend, en grande partie, de sa structure réticulée. La densité de la réticulation influence directement les propriétés fondamentales des hydrogels telles que le gonflement, la résistance mécanique, l'élasticité, la perméabilité et même la diffusion [30].

3.4.1. Gonflement

Le gonflement des hydrogels, ou la quantité d'eau absorbée, aide à définir les propriétés physiques des hydrogels. Le gonflement est fortement dépendant de la structure chimique du polymère et inversement proportionnel à la densité de réticulation. En 1943, Flory et Rehner étaient les premiers à corrélérer la densité de réticulation au gonflement de polymère dans un solvant organique pour quantifier les caractéristiques de caoutchouc. Dans le modèle de Flory-Rehner [60], le gonflement est considéré comme un équilibre entre les forces élastiques du polymère et les forces thermodynamiques en raison de l'interaction entre le polymère et le solvant. En 1977, Peppas et Merrill ont modifié la théorie de Flory-Rehner et ils ont proposé un autre modèle qui s'applique à la production des hydrogels à partir des solutions de polymères [61]. En raison des forces élastiques, la présence d'eau modifie la variation du potentiel chimique dans le système [30]. La structure chimique affecte le gonflement dû à la présence de groupes chimiques au sein de l'hydrogel. Par exemple, les hydrogels avec des groupes hydrophiles gonflent plus vite que les hydrogels avec des groupes hydrophobes [30]. Pour la classe des hydrogels intelligents (smart hydrogels), dont les changements de volume dépendent des conditions environnementales, le gonflement peut être également dépendant de plusieurs paramètres tels que le pH, la température ou les radiations [62].

Le gonflement à l'équilibre peut être déterminé expérimentalement ou calculé théoriquement. La mesure exacte du gonflement à l'équilibre aide à déterminer la densité de réticulation, la taille de la maille et les coefficients de diffusion. Les méthodes expérimentales de mesure du gonflement des hydrogels comportent la mesure gravimétrique suivant le fluide immergent et la mesure des variations dimensionnelles [63].

La mesure du gonflement à l'équilibre est une norme standard établie, mais dans certaines applications, comme la libération contrôlée des principes actifs, il faut pratiquer des mesures dynamiques [64].

3.4.2. Élasticité

Comme le gonflement, l'élasticité est parmi les propriétés indispensables qui caractérisent les hydrogels. Sous l'influence d'une contrainte, qui inclue la tension et sa réciproque la compression, l'hydrogel gonflé montre un comportement élastique. L'élasticité, semblable au gonflement, dépend et peut être calculée à partir de la densité de réticulation. Une densité de réticulation élevée a pour résultat une force mécanique plus grande, [30]. En synthétisant un nouvel hydrogel, Li *et al.* ont augmenté la densité de réticulation pour améliorer les propriétés mécaniques et en même temps diminuer le taux de gonflement de l'hydrogel [65]. De même, Kim *et al.* ont montré de fortes propriétés mécaniques en augmentant la densité de réticulation

des fibroïnes de soie résultant d'une température de gélification élevée et aussi d'une concentration élevée des fibroïnes [66].

3.4.3. Porosité, paramètre de maille ou perméabilité

La porosité des hydrogels, le paramètre de maille ou la perméabilité, est une propriété structurale qui estime la longueur entre les chaînes réticulées successives dans un hydrogel. La porosité dépend de la densité de réticulation, de la concentration et de la composition du monomère [62]. En 1998, une étude menée par Cruise *et al.* a montré que le polyéthylène glycol di-acrylate (PEGDA) montre un changement significatif de la porosité lorsque la masse molaire du polymère change. Une taille des pores faible a été également observée après modification de la concentration de PEGDA [67]. Dans un réseau macromoléculaire inerte avec une distribution uniforme des pores, la taille de maille augmente significativement en fonction du gonflement et inversement proportionnelle [36]. En 2004, Kim *et al.* ont démontré une relation similaire suite à des expériences avec des hydrogels en soie. Ils ont montré une diminution de taille de pores résultante d'une forte réticulation de la fibroïne [66]. Les mesures directes de la porosité peuvent être réalisées par diffusion de lumière dynamique (DLS) [68]. D'autres méthodes alternatives indirectes peuvent être utilisées telles que la porosimétrie, les mesures d'élasticité et la mesure du gonflement à l'équilibre [62, 69].

3.4.4. Diffusion

Le taux de diffusion du soluté est un paramètre important pour déterminer la cinétique de la libération des principes actifs, le transport des éléments nutritifs et des déchets en ingénierie tissulaire. La diffusion des nutriments, des gaz, des déchets ou d'autres solutés dépend d'une multitude de facteurs, y compris la morphologie du réseau macromoléculaire, la teneur en eau, la composition du polymère et sa concentration, la cinétique de dégradation (Tableau 1.1) et le taux de gonflement [62].

Tableau 1.1 : Facteurs influençant la biodégradabilité des polymères (d'après Pillai *et al.*, 2001 [70]).

Nature	Facteurs
Chimique	Structure et composition.
Physico-chimique	Echange et force ionique, pH.
Physique	Forme et taille des chaînes.
Morphologique	Microstructure (amorphe, cristallin).
Enzymatique	Hydrolyse, flore microbienne.

Ces facteurs fondamentaux peuvent se combiner pour créer des effets chimiques ou des effets de frottement qui ralentissent la diffusion de soluté. Un effet chimique décrit la force d'attraction entre le soluté et la matrice d'hydrogel tandis que la taille physique d'exclusion représente le principal effet de frottement sur la diffusion à travers un hydrogel [36].

3.5. Application des hydrogels en ingénierie tissulaire

Cette partie discutera les applications *in vitro* et *in vivo* des hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage (Tableau 1.2). Après examen des principaux facteurs nécessaires pour combiner les cellules vivantes avec des hydrogels, les utilisations expérimentales des hydrogels naturels seront abordées. L'encapsulation des cellules dans les hydrogels constitue une méthode unique pour étudier l'ingénierie tissulaire du cartilage dont le principe est illustré dans la Figure 1.2.

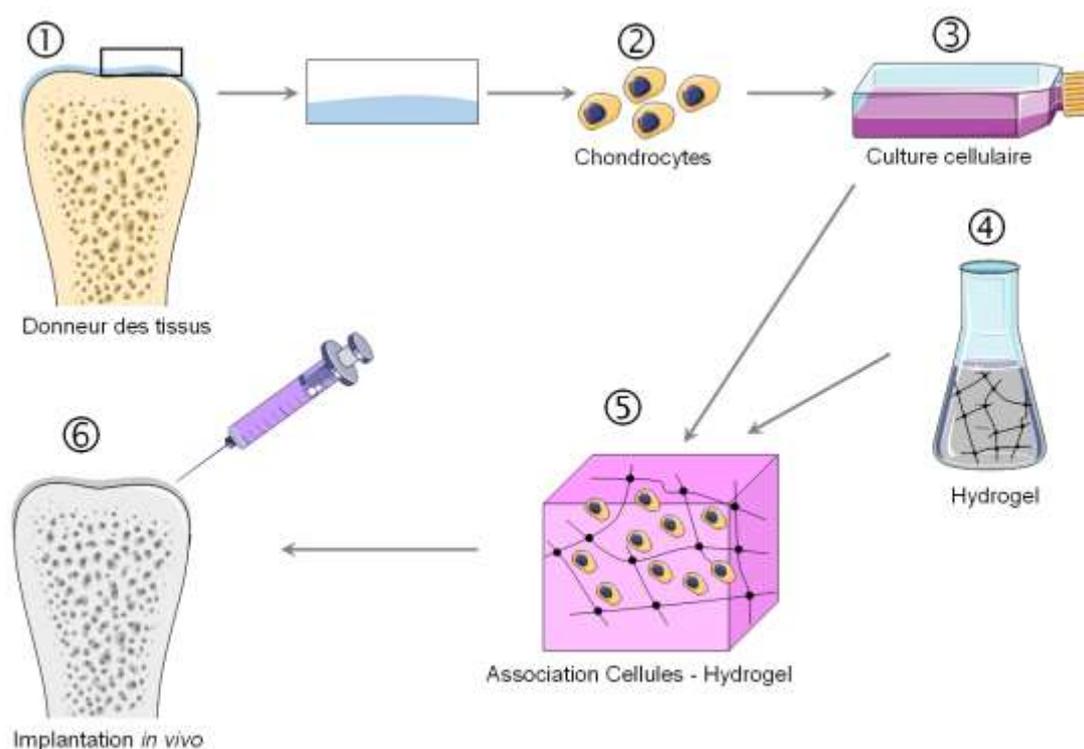


Figure 1.2 : Illustration schématique de la stratégie suivie pour l'utilisation d'une matrice synthétique : (1) prélèvement des tissus cartilagineux ; (2) isolation des chondrocytes autologues ; (3) amplification et différenciation *in vitro* ; (4) préparation d'un hydrogel réticulant ; (5) formation d'un réseau 3D associant la matrice synthétique et les chondrocytes ; (6) implantation *in vivo*.

En ingénierie tissulaire, différents hydrogels sont utilisés pour encapsuler les cellules. Les applications *in vitro* et *in vivo* de ces hydrogels exigent certains critères minimums à respecter. Pour la culture cellulaire *in vitro*, l'hydrogel devrait montrer une capacité de soutenir la

prolifération et le phénotype cellulaire, une porosité suffisante pour permettre la diffusion des nutriments et des gaz, une densité désirée adaptée aux propriétés viscoélastique et surtout l'absence de toxicité résultant du matériel même et/ou de sa préparation. Les applications *in vivo*, exigent en plus d'autres critères tels que l'absence de matière et de produits de dégradation toxiques et la limitation des réponses inflammatoires.

Tableau 1.2 : Liste de quelques hydrogels naturels utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage.

Hydrogel	Structure	Procédé de réticulation	Référence
Chitosan	Polymère injectable	Thermo-gélfication	Chenite <i>et al.</i> , 2000 [71]
	Disque poreux	Lyophilisation	Kim <i>et al.</i> , 2003 [72]
	Cylindre poreux	Lyophilisation	Xia <i>et al.</i> , 2004 [73]
Acide hyaluronique	Polymère injectable	Gélfication	Park <i>et al.</i> , 2005 [74]
Dérivé cellulosique	Polymère injectable	Polycondensation	Fatimi <i>et al.</i> , 2008 [75]
Alginate	Gel réticulé	Polymérisation	Chia <i>et al.</i> , 2005 [76]
Collagène	Polymère injectable	Gélfication	Kino-Oka <i>et al.</i> , 2005 [77]

3.5.1. Applications *in vitro*

Les matrices synthétiques jouent plusieurs rôles importants dans les recherches *in vitro* en ingénierie tissulaire. Par exemple, les hydrogels sont employés pour former un environnement extracellulaire contrôlé pour étudier l'interaction tridimensionnelle cellule/cellule et cellule/ECM. La conception et la synthèse des nouveaux tissus avec les propriétés spécifiques exigent la connaissance détaillée des interactions des cellules entre elles, et les interactions avec d'autres facteurs bioactifs et leur microenvironnement. Il a été observé que certains types de cellules (les chondrocytes par exemple) se différencient en culture bidimensionnelle tandis que le maintien de leur phénotype est supporté en culture tridimensionnelle [37].

Les hydrogels ont été également modifiés avec des facteurs bioactifs et des peptides d'adhésion cellulaire pour améliorer la génération tissulaire. Plusieurs groupes de recherche ont montré l'augmentation de la prolifération des cellules encapsulées dans des hydrogels modifiés avec des peptides d'adhésion cellulaire type RGD [78-80]. La présence des facteurs bioactifs au sein d'un hydrogel peut aussi améliorer la prolifération cellulaire. Après l'incorporation des TGF- β 1 dans des hydrogels de chitosan où les chondrocytes sont cultivés, la prolifération cellulaire a été augmentée ainsi que la production des GAG et du collagène de type 2 par rapport à des hydrogels sans TGF- β 1 [81].

La microstructure de l'hydrogel a également montré un effet sur les cellules cultivées. Les hydrogels synthétisés à partir d'oligopeptides synthétiques auto-assemblés présentent une microstructure fibrillaire d'ordres de grandeur trois fois plus faibles que ceux des hydrogels de

polymères synthétiques tels que l'oxyde de polyéthylène (PEO), le poly (acide lactique) (PLA) et le poly (acide glycolique) (PGA) [82]. En 2004, Kisiday *et al.* ont cultivé des chondrocytes au sein d'un hydrogel synthétique à base de peptide (KLD-12), et ils ont comparé leur prolifération et les propriétés mécaniques par rapport à un hydrogel d'agarose considéré comme matrice synthétique de référence. Les chondrocytes cultivés au sein de l'hydrogel peptidique ont proliféré plus que ceux cultivés au sein de l'hydrogel d'agarose, bien que les propriétés mécaniques, l'aspect histologique et les compositions biochimiques aient été semblables [83].

3.5.2. Applications *in vivo*

Les matrices synthétiques sont également employées d'une façon large dans les recherches *in vivo* en ingénierie tissulaire. Elles sont les plus couramment utilisées comme véhicule de cellules et/ou de facteurs bioactifs, dont le but ultime est d'appuyer la croissance et le développement des tissus sains, ainsi que son intégration dans les tissus environnants. Dans ce cadre, les matrices synthétiques doivent être biocompatibles avec les tissus de l'hôte, sans libérer des matières toxiques ou de provoquer une réponse inflammatoire marquée. En outre, la matrice synthétique doit avoir suffisamment de force et de résistance pour fonctionner là où elle est implantée sans rupture prématurée.

L'utilisation actuelle des hydrogels *in vivo* en ingénierie tissulaire du cartilage comporte une phase de modélisation chez la souris nude par l'implantation d'une matrice synthétique (habituellement en sous-cutanée) afin de déterminer la capacité de générer un tissu sain qui ressemble à du cartilage [37]. Puis sur des modèles animaux plus grands, le défaut de cartilage peut être créé, suivie de l'application d'une matrice synthétique (hydrogel) avec des chondrocytes pour évaluer la régénération tissulaire.

Plusieurs groupes scientifiques ont démontré une sécrétion de matrice cartilagineuse *in vivo* en utilisant des chondrocytes encapsulés dans des hydrogels naturels, tels que la fibrine [84], l'agarose [85], l'alginate [78, 86], le chitosan [71, 87], la cellulose [88-92], l'acide hyaluronique [74, 93], le collagène [77, 94] et d'autres polymères synthétiques [95, 96]. Il est difficile donc de tirer de larges conclusions au sujet de la convenance de divers hydrogels pour l'ingénierie tissulaire *in vivo*, dû à la large variabilité dans la conception et dans les techniques expérimentales. L'utilisation des hydrogels pour soutenir la croissance des chondrocytes et la production des nouvelles matrices extracellulaires est bien établie. Et c'est pour ça qu'une connaissance de différents types d'hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage semble indispensable.

3.6. Les hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage

Cette partie est un bref aperçu sur les travaux de recherche sur les polymères naturels utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage. La plupart des hydrogels utilisés seront décrits, aussi bien que les nouvelles techniques qui facilitent l'application clinique de l'ingénierie tissulaire.

3.6.1. Le chitosan

Le terme 'chitosan' ou 'chitosane' est généralement utilisé pour décrire une série de polymères de chitosan avec différents poids moléculaires ($50\text{kDa} < M_w < 2000\text{kDa}$) et degrés de désacétylation variables ($40\% < \text{DDA} < 98\%$) (Figure 1.3). Le chitosan n'est pas soluble dans l'eau, mais des solutions de chitosan peuvent être obtenues en milieu acide aqueux qui charge les groupes aminés positivement, ce qui permet de surmonter ainsi les forces associatives entre les chaînes. Le chitosan est un polysaccharide dérivé de la chitine, qui se trouve dans les exosquelettes des arthropodes, qui a été partiellement ou entièrement désacétylé [71]. Il s'agit d'un polymère cationique composé de chaînes linéaires d'unités N-acétyl- β -D-glucosamine liées en (1 \rightarrow 4). L'alcalinisation d'une solution aqueuse de chitosan à un pH supérieur à 6,2 provoque une précipitation d'un hydrogel due aux forces ioniques [97]. En 2000, Chenite *et al.* ont étudié un mélange de chitosan et de glycérole-phosphate pour synthétiser un hydrogel qui se comporte comme un liquide à température ambiante et à pH physiologique mais qui se gélifie à température physiologique. Cette matrice synthétique a été mélangée avec des chondrocytes, et après une culture *in vitro* le mélange a été implanté sous-cutané chez des souris nues. Après quatre semaines d'implantation, les analyses histologiques de la matrice extracellulaire ont été réalisées suivant la méthode de Von Kossa et la coloration au bleu de toluidine [71]. Suite à ces analyses et aussi aux tests de viabilité cellulaire, une production de la matrice extracellulaire a été observée ainsi que le maintien du phénotype cellulaire. En 2005, Hoemann *et al.* ont utilisé un chitosan thermosensible pour encapsuler des chondrocytes afin de réaliser une culture *in vitro*. Le mélange a été implanté dans des défauts articulaires de genou de lapin. Après une semaine d'implantation, les observations ont montré que l'hydrogel est resté en place malgré la mobilité et la charge du lapin, bien que le délai était suffisant pour la formation significative d'un nouveau tissu cartilagineux [97].

Le chitosan présente une matrice synthétique adaptée à l'ingénierie tissulaire. Sa composition chimique affecte directement ses propriétés *in vivo*. Quand le degré de désacétylation du chitosan augmente, le temps de séjour *in vivo* augmente et la réaction inflammatoire diminue [71]. Comme les molécules polycationiques, le chitosan adhère naturellement aux tissus biologiques, qui ont habituellement une charge extérieure négative. Ceci peut expliquer son maintien dans le défaut articulaire du lapin malgré la mobilité de ce dernier et aussi les forces

mécaniques appliquées [97]. En outre, les préparations de chitosan ne se basent pas sur des agents de réticulation potentiellement toxiques ou des solvants organiques, ce qui réduit la toxicité pour les cellules encapsulées ou de l'hôte dans lequel il est implanté [71].

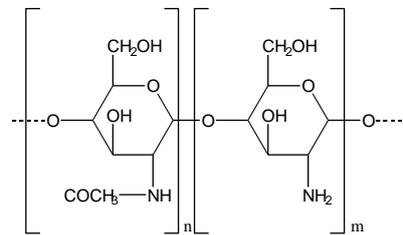


Figure 1.3 : Structure chimique du chitosan (d'après Berger et al., 2005 [98]).

3.6.2. L'alginate

L'alginate est un polysaccharide dérivé de l'acide alginique, qui se trouve dans les algues marines en particulier dans les algues brunes. C'est un copolymère composé de l'acide β-D-mannuronique et l'acide β-L-guluronique, liés entre eux par des liaisons glycosidiques (1→4). La proportion et la distribution de ces deux monomères sont déterminantes pour une large expansion des propriétés physico-chimiques de l'alginate. Sa composition chimique varie selon les diverses espèces d'algues, les différentes parties de la même plante [99].

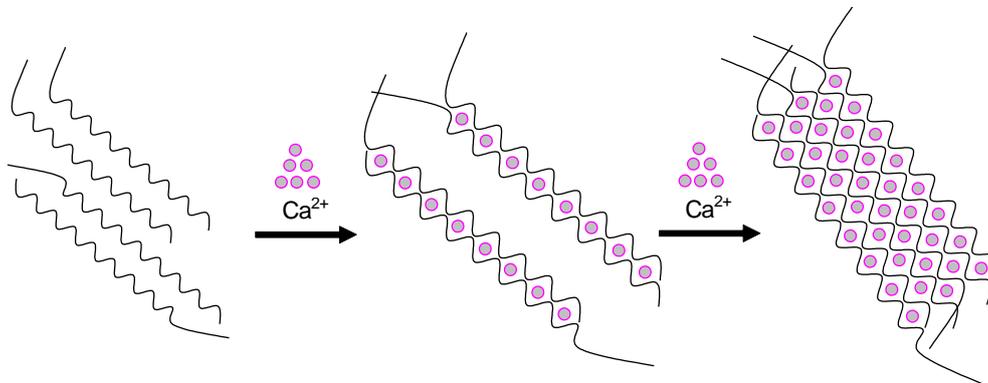


Figure 1.4 : Schéma représentatif de l'agrégation des chaînes d'alginate sous forme de "boîte à œufs" au cours de la formation des gels d'alginate.

L'addition d'un cation divalent telle que le calcium provoque la formation d'un hydrogel insoluble (Figure 1.4). La réticulation de l'alginate est initiée par les forces ioniques et est complètement réversible par chélation du cation divalent utilisé précédemment [100]. En ingénierie tissulaire, les hydrogels d'alginate ont été utilisés pour encapsuler les chondrocytes et pour délivrer des facteurs de croissance [101].

Plusieurs travaux de recherche sont intéressés à la croissance des chondrocytes et la sécrétion de la matrice pendant la culture tridimensionnelle au sein de l'alginate [76, 99, 100]. En 2005, Chia *et al.* ont cultivé en 3D des chondrocytes de septum nasal humain (HNSC) au sein d'un

hydrogel d'alginate et ils les ont comparés à ceux dans une culture monocouche. Les résultats étudiaient la prolifération des chondrocytes, la synthèse de collagène et la synthèse des GAG. Les chondrocytes cultivés au sein de l'alginate ont moins proliféré que ceux dans la culture monocouche mais ils ont produit significativement plus de GAG et de collagène type 2. Par contre, les chondrocytes dans la culture monocouche ont démontré une synthèse importante de collagène de type 1 et une sécrétion minimale de GAG [76].

Les hydrogels d'alginate sont utiles pour l'ingénierie tissulaire du cartilage en raison de l'absence de toxicité, de la facilité de manipulation et de la réaction inflammatoire minimale [99]. Comme pour la plupart des hydrogels, la force mécanique des alginates est suffisante pour les implanter pendant plusieurs semaines, mais leur fragilité initiale ne leur permet pas de résister aux contraintes de l'environnement avoisinantes comme dans le cas des articulations qui supportent un certain poids. L'une des applications intéressantes de l'alginate est la stimulation du phénotype chondrocytaire lors de la culture 3D *in vitro*. Après culture, l'hydrogel d'alginate peut être dissout avec un agent de chélation et les chondrocytes peuvent être récupérés pour un usage ultérieur, comme par exemple la transplantation des chondrocytes autologues [76].

3.6.3. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un polysaccharide présent naturellement dans la matrice extracellulaire du cartilage et dans le liquide synovial. Il est considéré comme le constituant majeur des glycosaminoglycanes et du cartilage. L'acide hyaluronique aide à protéger les articulations en augmentant la viscosité du liquide synovial et en rendant le cartilage plus élastique. L'acide hyaluronique est un copolymère composé de l'acide-β-D-glucuronique et de N-acétyl-β-D-glucosamine, liés entre eux par des liaisons glycosidiques alternées (1→4) et (1→3) (Figure 1.5).

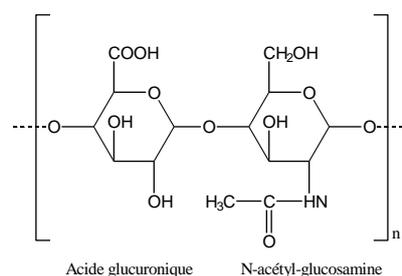


Figure 1.5 : Structure chimique de l'acide hyaluronique (d'après Bencherif et al., 2008 [102]).

L'injection de l'acide hyaluronique a été utilisée pour traiter les symptômes de l'arthrose. Il a été démontré que l'acide hyaluronique a un effet stimulant sur la sécrétion de la matrice des chondrocytes [103]. Depuis 1999, une greffe commerciale à base de l'acide hyaluronique (Hyalograft[®] C) est utilisée en clinique pour le traitement des défauts ostéochondraux. Il s'agit

d'un greffe tissulaire composé de chondrocytes autologues semés sur une matrice extracellulaire synthétique d'acide hyaluronique [104].

En 2004, Nettles *et al.* ont décrit la synthèse de modification de l'acide hyaluronique par le méthacrylate [105]. Ce nouveau polymère est capable de réticuler *in situ* pour former un hydrogel stable une fois mélangé à un photo-initiateur. Cet hydrogel était semblable à d'autres, en termes de propriétés mécaniques, croissance de chondrocytes et sécrétion de matrice *in vitro*. Il a été montré que l'application de l'acide hyaluronique, sans cellules, au niveau d'un défaut ostéocondrale dans le genou de lapin conduit à l'infiltration des cellules voisines dans le nouvel hydrogel réticulé et la formation de nouveaux tissus après deux semaines. Ce nouveau cartilage a été bien intégré au tissu environnant mais il était fibreux de nature. Les propriétés des hydrogels hyaluroniques peuvent être facilement modifiées en alternant la quantité d'acide hyaluronique, le degré de modification (*i.e.* méthacrylation) [102], le degré de réticulation, la nature chimique [105], aussi bien que par l'ajout des parties fonctionnelles spécifiques telles que les peptides d'adhésion cellulaire et les facteurs de croissance [80]. Une étude supplémentaire sera donc nécessaire pour déterminer la pertinence des hydrogels à base d'acide hyaluronique pour différentes applications cliniques potentielles.

3.6.4. La cellulose

La cellulose est le polymère le plus répandu et le plus abondamment synthétisé dans la nature. Il appartient aux polysaccharides qui constituent la fraction majeure de la paroi végétale. C'est un homopolymère linéaire constitué de nombreuses unités β -D-glucose liées en (1 \rightarrow 4) (Figure 1.6). L'unité de base de la cellulose est le cellobiose, formé de deux résidus glucose orientés l'un par rapport à l'autre selon un angle de 180° autour de l'axe de la molécule. Cette disposition conduit à une structure en ruban, stabilisé par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. De nombreuses liaisons hydrogène intermoléculaires associent les molécules en une structure microfibrillaire élémentaire. Ces microfibrilles peuvent à leur tour s'associer pour former des fibres qui présentent une structure cristalline. Cette cristallinité confère aux parois végétales leur rigidité et leur insolubilité dans l'eau [106].

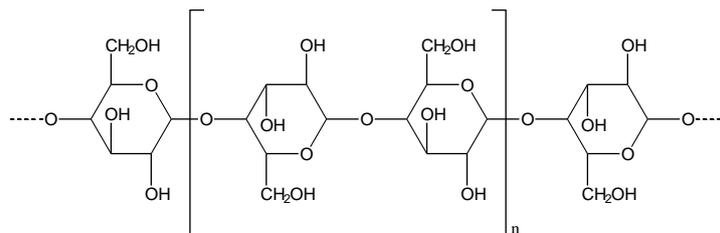


Figure 1.6 : Structure chimique de la cellulose.

L'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) et la carboxyméthylcellulose (CMC) sont des dérivés cellulosiques qui appartiennent à la grande famille des éthers de cellulose qui regroupe entre autres la méthylcellulose (MC) et l'hydroxyéthylcellulose (HEC). L'HPMC et la CMC connaissent un large succès dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. En tant qu'hydrogels, ces deux dérivés cellulosiques sont utilisés comme matrice synthétique pour la régénération du cartilage [89, 92] et la régénération des tissus osseux [88, 107, 108].

a. L'hydroxypropylméthylcellulose

L'hydroxypropylméthylcellulose est un polysaccharide connu sous le nom d'éther de propylène glycol méthylcellulose. Ce polymère en poudre contient entre 19 et 30% de groupe méthoxyle et entre 3 et 12% de groupe d'hydroxypropyle (Figure 1.7).

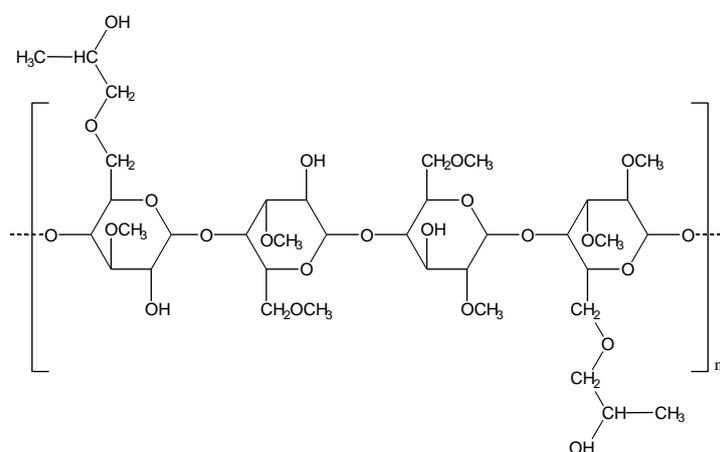


Figure 1.7 : Structure chimique de l'hydroxypropylméthylcellulose (d'après Fatimi *et al.*, 2008 [109]).

La modification chimique de l'HPMC permet d'avoir un hydrogel qui durcit *in vivo* sous l'influence du pH et sans avoir recours à un agent chimique catalytique. Cette propriété a été obtenue grâce à la silanisation de ses groupements fonctionnels. Cet hydrogel d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si) durci a une tenue suffisante pour obtenir des formes moulées ou prendre des formes définies même au contact de tissus mous. Les synthèses et les propriétés physicochimiques de ce type de produit ont été décrites pour la première fois en 1990 par Sau [50], puis reprises en 2000 par Turczin *et al.* pour des applications biomédicales [110]. Différents silanes peuvent être greffés selon leur groupement terminal. Les principales étapes de leur synthèse sont décrites à la Figure 1.8.

La synthèse permet d'obtenir un polymère dont la solubilisation en milieu aqueux n'est réalisable que pour un pH basique supérieur à 12,8. Les conditions de solubilisation de l'HPMC-Si sont réalisées par des bases fortes type hydroxyde de sodium à des concentrations voisines de 0,1 à 0,2 M. Cette limite de pH permet la transformation des fonctions silanes en

fonction silanolate sous forme ionique ($-\text{SiO}^-\text{Na}^+$). Tant que le pH est supérieur à 12,3, la forme silanolate est stabilisée. La réticulation de l'hydrogel est générée par un abaissement du pH conduisant à la transformation des silanolates en silanols ($-\text{SiOH}$). Ces derniers condensent entre eux aboutissant à la création d'un réseau tridimensionnel de molécules d'éthers de cellulose (Figure 1.9).

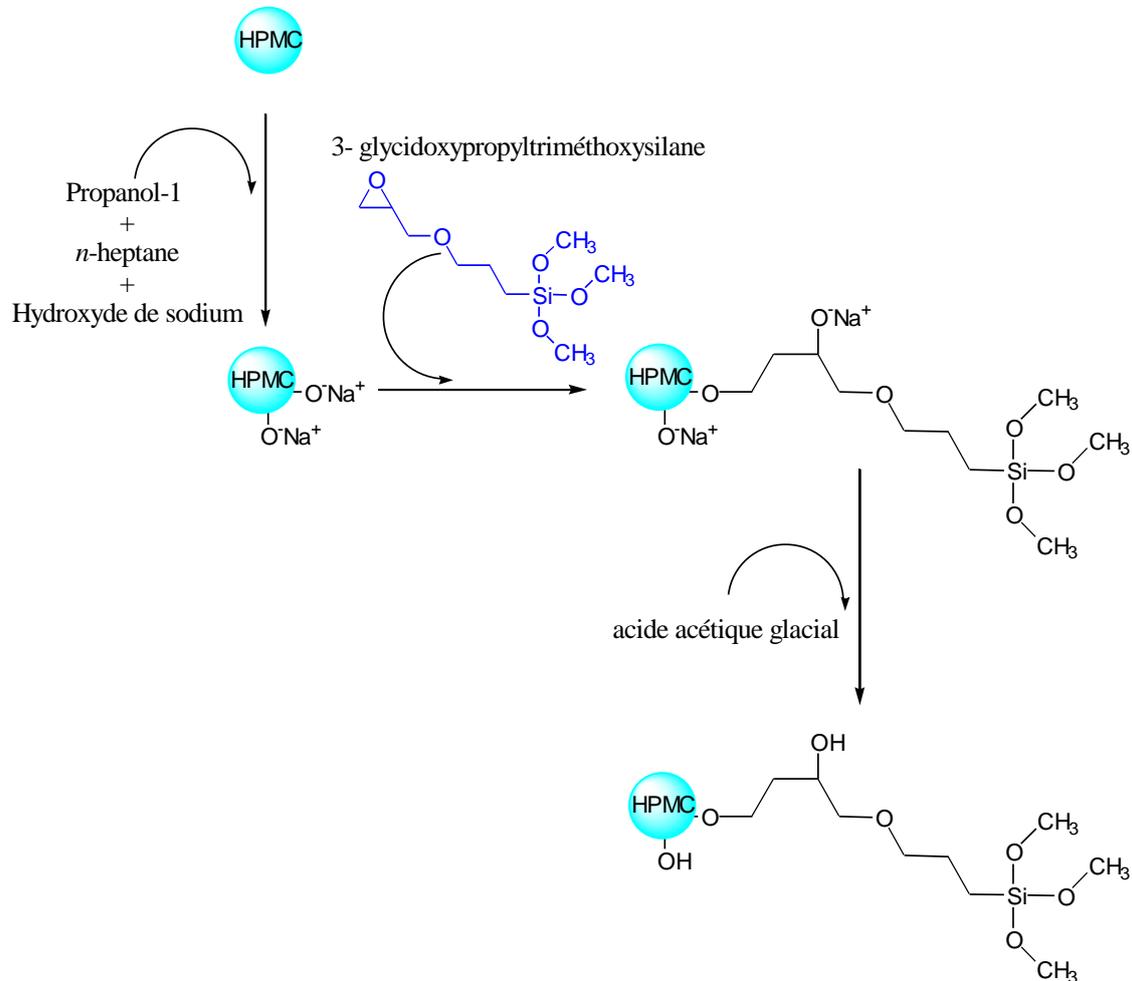


Figure 1.8 : Réactions de greffage et de neutralisation pour la synthèse d'HPMC-Si (d'après Fatimi et al., 2008 [111]).

L'hydrogel d'HPMC-Si est apparu comme une matrice synthétique potentielle pour la culture tridimensionnelle et pour l'amplification des chondrocytes. Suite au test de cytotoxicité, et à l'étude de la viabilité et de la prolifération des chondrocytes articulaires de lapin (RAC) *in vitro*, l'hydrogel a été montré comme non toxique et biocompatible en plus de sa capacité à maintenir le phénotype chondrocytaire en culture tridimensionnelle [90].

En 2007, Vinatier *et al.* ont utilisé l'hydrogel d'HPMC-Si comme matrice synthétique pour le transfert des chondrocytes nasaux humains (HNC). Ses propriétés rhéologiques, sa biocompatibilité et l'absence de toxicité *in vitro*, plus sa biofonctionnalité ont permis de l'utiliser comme matrice synthétique en ingénierie tissulaire du cartilage *in vivo*. Après trois

semaines d'implantation chez la souris nude, les analyses histologiques de la matrice extracellulaire ont été réalisées. Une production de la matrice extracellulaire contenant des GAG et du collagène de type 2 a été observée ainsi que le maintien du phénotype chondrocytaire [89].

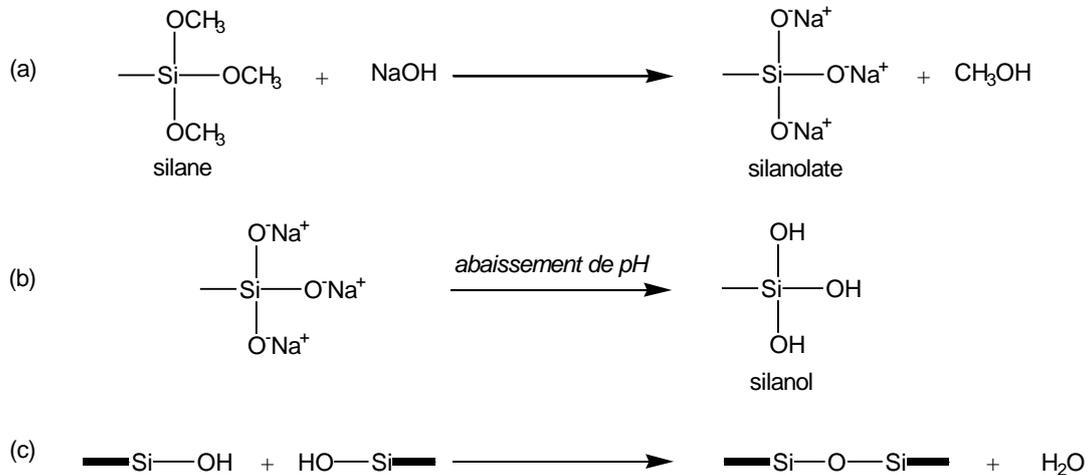


Figure 1.9 : Processus de réticulation de l'HPMC-Si : (a) formation de silanolate ; (b) protonation de silanolate ; (c) condensation de silanol (d'après Fatimi et al., 2008 [75]).

b. La carboxyméthylcellulose

Récemment, une carboxyméthylcellulose aminée (CMCA) (Figure 1.10) a été synthétisée pour former un hydrogel utilisé comme un substitut au cartilage arthrosique du lapin [91].

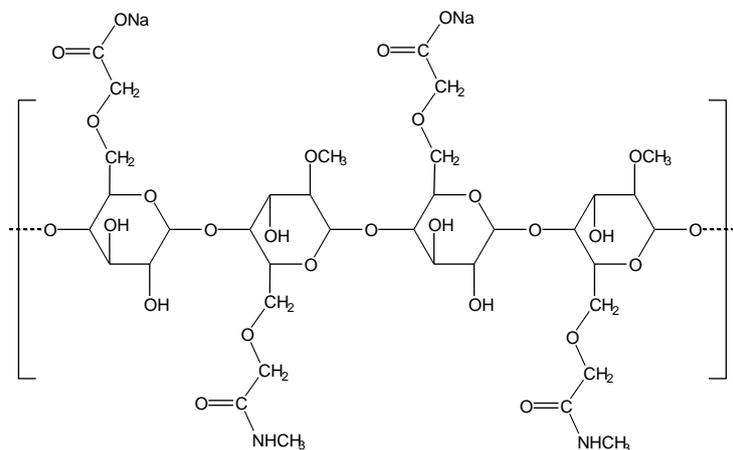


Figure 1.10 : Structure chimique de la carboxyméthylcellulose aminée (d'après Leone et al., 2008 [91]).

La caractérisation de ce dérivé de carboxyméthylcellulose a montré que la synthèse a permis d'avoir une répartition régulière des fonctions amines tout le long des chaînes polysaccharidiques. Grâce à cette régularité, un hydrogel homogène peut être obtenu avec un caractère thixotrope. Les chaînes du polysaccharide aminé sont réticulées grâce à des ponts dues

à la formation de liaisons aminées entre les groupes carboxyliques du polysaccharide et les groupes amines de l'agent réticulant utilisé (1,3-diaminopropane) [91, 92]. De plus, l'hydrogel de CMCA a montré un comportement typique du cartilage, il semble être viscoélastique et résiste à forte sollicitation de contrainte [91].

Après la caractérisation rhéologique et mécanique de l'hydrogel de CMCA, Leone *et al.* ont réalisé des études *in vitro* et *in vivo* [92]. Des chondrocytes articulaires normaux humains (NHAC) ont été incubés dans l'hydrogel de CMCA. L'acide hyaluronique a été utilisé comme témoin dans les mêmes conditions que la CMCA. Il est considéré comme l'hydrogel optimum pour la thérapie ostéoarticulaire [112]. L'étude de la viabilité et de la prolifération cellulaire et l'activité métabolique, ont été réalisées après une et deux semaines sur différents échantillons. Les résultats ont montré que les chondrocytes prolifèrent au sein de la CMCA de la même façon que l'acide hyaluronique sans différence significative. Le maintien du phénotype chondrocytaire en culture tridimensionnelle a été également observé ainsi que la production du collagène type 2 et des protéoglycanes [92].

Au niveau de l'expérimentation animale, l'hydrogel CMCA a été utilisé comme matrice synthétique avec des NHAC pour réparer des lésions cartilagineuses au niveau du genou chez le lapin. Après sept semaines d'implantation, les analyses histomorphométriques des échantillons ont montré la formation d'une nouvelle couche de tissu fibro-cartilagineux. Le défaut cartilagineux a été complètement rempli et des formations des chondrocytes ont été observés au niveau du nouveau cartilage hyalin formé [92].

3.7. Conclusion

Par leur nature, les hydrogels sont des polymères hydrophiles, réticulés et fortement gonflés. Les propriétés d'un hydrogel spécifique sont extrêmement importantes dans le choix des matériaux pour une application médicale donnée. Dans cette partie nous avons évoqué les propriétés caractérisant un hydrogel telles que le gonflement, l'élasticité, la perméabilité et la diffusion. Cependant, ces mêmes propriétés dépendent fortement des conditions environnementales. Avec cette combinaison de facteurs, il est impératif que les propriétés de l'hydrogel soient déterminées et mesurées dans les mêmes conditions aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Dans la partie « Généralités sur la rhéologie et la viscoélasticité » nous explorerons des méthodes pour analyser les propriétés viscoélastiques et mécaniques et leur dépendance à l'égard de la structure des polymères.

4. Les substituts osseux injectables

4.1. Introduction

Les techniques chirurgicales non-invasives constituent des approches thérapeutiques nouvelles, qui combinées aux progrès de la technologie des biomatériaux phosphocalciques, permettent et justifient le développement de substituts osseux injectables [113]. Deux types de stratégies correspondant à deux catégories différentes de biomatériaux ont été explorées, la première reposant sur les ciments hydrauliques phosphocalciques [114], la seconde proposant l'utilisation de suspensions de céramiques phosphocalciques injectables [115].

Avec le développement des ciments phosphocalciques, les chercheurs ont choisi de mettre en avant la nécessité d'avoir un biomatériau possédant des propriétés mécaniques primaires grâce à la réaction de prise du ciment en l'absence de macroporosité initiale ou induite de ces composés. Plusieurs de ces composés durcissables sont déjà disponibles sur le marché. Ils reposent sur le mélange de différents composants phosphocalciques qui réagissent ensemble pour donner un composé final durcissable après son injection *in situ*. Ces ciments ne sont pas prêts à l'emploi et présentent des temps de prise très variables. Après durcissement, ils conduisent à des composés denses, ne possédant qu'une microporosité alors que de nombreux travaux ont démontré la nécessité d'une macroporosité suffisante pour une meilleure substitution osseuse [116].

La seconde voie repose sur l'association de granules phosphocalciques, dont les propriétés biologiques sont particulièrement bien connues, et d'un polymère biocompatible [117]. Le composé obtenu est un substitut osseux injectable (IBS) dont l'injectabilité et la rhéologie peuvent être adaptées en changeant la granulométrie et/ou le taux de charge de la phase minérale et/ou la concentration en polymère. De telles céramiques injectables sont 'prêtes à l'emploi' (Figure 1.11). Ce concept de suspensions de céramiques phosphocalciques injectables (ICPCS) a abouti au développement d'un composé associant des granules de phosphate de calcium et un polymère cellulosique qui confère à l'ICPCS son injectabilité. Cet ICPCS est stérile et prêt à l'emploi [118]. Des études précliniques visant à explorer la biofonctionnalité d'un tel composé chez l'animal ont été réalisées avec succès pour des indications orthopédiques et parodontales [119]. La colonisation osseuse observée avec l'ICPCS est supérieure à celle obtenue grâce aux céramiques phosphocalciques macroporeuses et aux ciments osseux phosphocalciques [120]. De même, une étude récente, a démontré que l'injection de phosphate de calcium dans des défauts osseux de taille critique à l'extrémité distale de fémurs de lapin, permet la restauration de la structure osseuse trabéculaire de l'os après six semaines d'implantation ainsi que des propriétés mécanique quatre fois supérieures que celles de l'os. [121].



Figure 1.11 : Photographie d'une suspension phosphocalcique injectable.

4.2. Préparation des suspensions phosphocalciques injectables

4.2.1. Cahier des charges

L'ICPCS est considéré comme un biomatériau injectable prêt à l'emploi. L'avantage de ce type de biomatériau est sa simplicité d'utilisation *in vivo*. Ce biomatériau ne présente pas ou peu de propriétés mécaniques primaires intrinsèques même si le polymère est réticulable.

La formulation des ICPCS doit être bien étudiée afin d'obtenir un biomatériau selon les quatre critères de conception suivants :

- Etre stérilisable : il ne doit pas subir de modifications physico-chimiques durant la stérilisation [122] ;
- Etre stable durant le temps : lors du stockage l'ICPCS ne doit pas subir de sédimentation des particules de céramiques phosphocalciques biphasés (BCP) et ensuite une séparation de phase [123] ;
- Etre prêt à l'emploi si possible : il faut éviter chaque manipulation du produit avant l'implantation *in vivo* [124] ;
- Avoir une bonne injectabilité : la rhéologie de l'ICPCS doit être satisfaisante pour avoir un matériau consistant et injectable [115].

Différents paramètres peuvent influencer ces critères tels que le type et la concentration du polymère utilisé, le taux de charge des particules ainsi que leur granulométrie. Ces critères ne peuvent donc être applicables qu'après une connaissance approfondie des constituants majeurs de l'ICPCS : la phase minérale et la phase organique.

4.2.2. Composition des suspensions phosphocalciques injectables

a. Phase minérale : BCP

La phase minérale apporte la bioactivité au matériau injectable. Cette phase de l'ICPCS est constituée des granules de BCP (40-80 ou 80-200µm en diamètre). Ce sont des mélanges d'hydroxyapatite (HA) et de phosphate de calcium tricalcique (β -TCP) [125]. L'hydroxyapatite est peu soluble et se résorbe lentement alors que le β -TCP est plus soluble et se résorbe rapidement. Le BCP permet d'associer les propriétés respectives de chacun des composants. Le

BCP peut être obtenu soit par frittage d'un mélange de poudres d'HA et de β -TCP, soit par précipitation en milieu aqueux basique à une température d'environ 100°C d'une apatite déficiente en calcium (CDA) qui conduit, après calcination (1050°C), à l'obtention d'un mélange intime d'HA et de β -TCP [126]. Les propriétés chimiques du BCP dépendent des proportions des deux constituants du mélange. Il est alors possible de contrôler la vitesse de résorption et de substitution osseuse de la céramique. Pour les ICPCS, la composition avec un rapport atomique moyen calcium/phosphate (Ca/P) de 1,60 (60% d'HA et 40% de β -TCP) semble être le compromis le plus intéressant car ils présentent une cinétique de résorption et d'ostéoinduction qui se rapproche de celle de l'os humain [127].

Si ces propriétés de dissolution sont bien connues sur le plan chimique, leur expression est cependant étroitement dépendante de la surface spécifique des cristaux. En effet chaque monocristal a pour un volume donné une surface spécifique qui s'exprime en $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. En fonction de la température de frittage pour élaborer une biocéramique, cette surface spécifique change, plus la température est élevée, plus les cristaux sont gros et plus la surface spécifique diminue. Ainsi pour un matériau de même nature chimique l'un sera beaucoup plus résorbable s'il est préparé à basse température (présence d'une microporosité et grande surface spécifique) qu'un autre fritté à plus haute température (faible microporosité et surface spécifique) et en conséquence, les propriétés biologiques seront totalement différentes. A noter à la fin que la microporosité du BCP est définie comme étant l'espace qui existe entre les cristaux des particules de BCP [128].

i. Hydroxyapatite (HA)

L'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) est caractérisée par un rapport atomique Ca/P de 1,67 moins élevé que celui d'une poudre d'os (1,71). Les phases minérales des os et des dents ont été identifiées comme des phosphates de calcium possédant une structure apatitique à cause de leur ressemblance sur les plans cristallographiques et chimiques avec les minéraux de type apatitique. L'HA peut résulter d'une double décomposition en milieu alcalin d'un sel d'acide orthophosphorique et d'un sel de calcium ou d'une réaction en phase solide de CaCO_3 avec CaH_2PO_4 à 1200°C. L'HA pure est le moins soluble de tous les phosphates de calcium synthétiques et possède donc une cinétique de résorption lente [129].

ii. Phosphate tricalcique β (β -TCP)

Le phosphate tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) est caractérisé par un rapport atomique Ca/P de 1,5 et existe sous quatre formes : la forme α stable entre 1120 et 1470°C et métastable à température ambiante, la forme β stable en dessous de 1120°C, et la forme γ obtenue sous haute pression. Le

β -TCP ne peut pas être directement synthétisé par précipitation en milieux aqueux. Il est obtenu par chauffage de phosphate de calcium amorphe (ACP) entre 800 et 1000°C. Il est également possible de synthétiser du β -TCP par chauffage d'un mélange intime de solides comme CaHPO_4 et CaCO_3 à 1000°C pendant une heure. Celui-ci porté au-dessus de 1200°C permet également d'obtenir la forme α . La présence de β -TCP pur n'a pas été observée dans les tissus biologiques. La plupart des phosphates tricalciques rencontrés dans les milieux biologiques sont ceux substitués en magnésium, ils sont alors appelés Whitlockite et ont été observés dans de nombreuses calcifications pathologiques et dans les caries arrêtées de la dentine. Le β -TCP pur est plus soluble que l'HA pure. Il est généralement admis qu'*in vitro* et *in vivo*, le β -TCP est plus dégradable que l'HA [129].

b. Phase organique : HPMC

Le polymère qui constitue la phase organique de l'ICPCS est l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). L'intérêt de ce polysaccharide dérivé de la cellulose est basé sur sa très bonne biocompatibilité [124] et ses propriétés rhéologiques importantes qui confèrent à l'ICPCS sa consistance et son injectabilité [115].

La solution d'HPMC présente un comportement rhéologique rhéofluidifiant. Les propriétés thermorhéologiques de ce polymère glucidique ont été largement étudiées avec de nombreuses interprétations [130-132]. Sous l'action du chauffage, la solution d'HPMC devient thixotrope puis gélifie [132]. La température de gélification dépend du degré de substitution ainsi que de la concentration et de la masse moléculaire [133]. Lors de la baisse de la température, la solution d'HPMC retrouve son état de départ. La gélification thermoréversible de ce type de polymère a été reconnue comme étant un phénomène de grande importance [132].

4.3. Généralités sur les suspensions granulaires

4.3.1. Introduction

Une suspension ou dispersion est l'état d'un solide divisé, mêlé à la masse d'un liquide (généralement moins dense que lui) sans être dissous par lui. Les phases non continues (particules) sont appelées les phases dispersées et le milieu continu (liquide) qui les contient étant la phase dispersante ou le fluide suspendant. Le contrôle de la structure des suspensions constitue donc un intérêt primordial pour les chercheurs. La stabilité et la rhéologie sont les deux paramètres qu'il faut maîtriser dans une suspension. La stabilité dépend de la taille des particules et des propriétés physico-chimiques de leurs surfaces mais aussi des propriétés physico-chimiques et rhéologiques du fluide suspendant. Sur le plan rhéologique, la caractéristique la plus marquante des suspensions concentrées est probablement leur aptitude à

subir des grandes déformations plastiques, à contrainte quasi-constante, une fois la contrainte seuil atteinte [134].

Le rôle de la lubrification hydrodynamique interparticulaire dans les suspensions est ambigu. En premier lieu, c'est sans aucun doute une source de dissipation hydrodynamique. Comme Frankel et Acrivos [135] l'ont souligné et quantifié, la principale source de dissipation hydrodynamique dans les assemblées denses de grains en suspension dans un fluide réside dans l'expulsion de ce fluide hors des zones confinées entre des particules proches les unes des autres lorsque celles-ci se rapprochent ou, au contraire, dans son aspiration dans ces zones lorsque les particules s'éloignent. Cette dissipation est d'autant plus forte que la viscosité du fluide interstitiel est forte. La lubrification hydrodynamique a également un effet diamétralement opposé, conduisant cette fois à une diminution de la dissipation [134]. En effet, en empêchant les particules d'entrer en contact, la lubrification hydrodynamique limite la dissipation frictionnelle associée au frottement de particules en contact direct. En résumé, la lubrification hydrodynamique est une arme à double tranchant. En régime d'écoulement dominé par la dissipation visqueuse dans le fluide interstitiel, c'est une source de viscosification. En régime frictionnel, c'est au contraire une source de fluidification. Les conditions de passage d'un régime à l'autre ont été examinées très généralement sur le plan théorique [135, 136].

4.3.2. Forces d'interaction interparticulaires

Cette partie a pour objectif de décrire les forces d'interaction mises en jeu dans les suspensions. Nous nous contentons de mettre l'accent sur les paramètres physico-chimiques qui permettent de contrôler la stabilité des suspensions. Suivant qu'une particule soit Brownienne (*i.e.* selon un mouvement Brownien) ou non, elle sera soumise ou non aux forces de gravitation, à l'agitation thermique et aura un comportement spécifique sous écoulement (force hydrodynamique) [137]. Dans les suspensions granulaires, la combinaison des forces d'interactions interparticulaires peut conduire à la stabilisation du système par apparition d'une ou de plusieurs barrières d'énergie suffisamment hautes pour maintenir les particules à distance les unes des autres. Les forces d'interactions constituent le mécanisme de stabilité de toutes les suspensions [137].

a. Forces volumiques

Les forces que nous considérons sont des forces dont l'amplitude dépend de la taille des particules. Nous en considérons trois : Brownienne, hydrodynamique et gravitationnelle. Les suspensions peuvent se séparer en deux familles de particules suivant qu'elles sont colloïdales ou non.

Une particule est considérée comme colloïdale lorsque sa taille est telle qu'aucune séparation de phase rapide ne se produit par sédimentation ou par crémage. La taille critique d'un colloïde dépend donc des caractéristiques physiques des constituants du système (viscosité du solvant, différence de densité entre la particule et le milieu continu, etc...). Cette taille peut se calculer simplement en comparant t_s le temps caractéristique de sédimentation sur une distance de la taille du rayon de la particule et t_d le temps pour que cette particule parcourt la même distance par agitation thermique [137].

$$t_s = \frac{a}{V_{Stokes}} \quad (\text{Équation 1.1})$$

et

$$t_d = \frac{a^2}{D} \quad (\text{Équation 1.2})$$

où V_{Stokes} est la vitesse de sédimentation d'une particule de rayon a et D le coefficient de diffusion définies comme :

$$V_{Stokes} = \frac{2}{9} \frac{\Delta\rho g a^2}{\eta_f} \quad (\text{Équation 1.3})$$

et

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_f a} \quad (\text{Équation 1.4})$$

où $\Delta\rho$ est la différence de densité entre les particules et le fluide suspendant de viscosité η_f , g le coefficient de gravité, k_B la constante de Boltzmann et T la température.

- Si $t_d \ll t_s$ l'effet de la gravité est négligeable ; la particule est colloïdale.
- Si $t_d \gg t_s$ l'effet de la gravité entraîne la sédimentation des particules.
- La limite colloïdale peut donc se définir pour $t_d = t_s$, soit :

$$a = \left(\frac{3 k_B T}{4 \pi \Delta\rho} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (\text{Équation 1.5})$$

Dans le cas d'une suspension phosphocalcique injectable, la différence de densité étant $\Delta\rho=2060\text{kg.m}^{-3}$, nous trouvons un rayon a de $0,47\mu\text{m}$, soit un diamètre de l'ordre du micron [123].

Ainsi des particules colloïdales sont maintenues en suspension par le mouvement Brownien. Cette agitation permet des collisions entre les particules qui peuvent entraîner ou pas une agrégation suivant la nature des interactions de surface. Il est toutefois possible d'éviter ou de limiter la sédimentation d'une suspension de particules non colloïdales et non floculées en ajustant leur densité avec celle du milieu dispersant ou encore en augmentant la viscosité du

milieu dispersant. Mais même lorsque la sédimentation est évitée, les particules non colloïdales peuvent migrer lorsqu'elles sont mises sous écoulement [137].

b. Forces de surface

Nous avons vu avec un calcul simple que des particules de plus de 1µm sédimentent sous l'effet de la gravité. La taille des particules de BCP se situe plutôt dans des gammes supérieures (40-80 et 80-200µm). Les particules de BCP sédimentent donc rapidement sans autre force pour contrer l'effet de la gravité.

La sédimentation peut être évitée si les particules interagissent entre elles pour former un réseau capable de résister à son propre poids. Ces interactions interparticulaires se contrôlent avec les forces de surface. Une suspension est stable devant la gravité sous deux conditions :

- Les particules doivent avoir un rayon a inférieur à un rayon critique a_c . Si $a > a_c$ la structure devient instable sous l'effet de la gravité : elle s'effondre sous son propre poids.
- Leur concentration en solution doit être supérieure à une valeur critique. Il faut que leur concentration soit suffisante pour que les particules puissent former un réseau tridimensionnel rigide.

Le contrôle des forces interparticulaires permet d'obtenir des suspensions de particules dans des états dispersés, faiblement floculés ou coagulés. La formation d'une structure floculée permet d'éviter la sédimentation de particules non Browniennes. Cette structure est stable si les forces cohésives entre les particules sont comparables à la force de gravité qui s'exerce sur elles.

De la même manière que nous avons fait pour calculer la taille critique au-delà de laquelle une particule sédimente, nous pouvons calculer la taille maximum a_c en dessous de laquelle il est possible de maintenir en suspension des particules. La force de surface doit être supérieure à la force de gravité F_g qui s'exerce sur une particule :

$$F \geq F_g \sim \frac{4}{3} \pi a^3 \Delta \rho g \quad (\text{Équation 1.6})$$

Ce qui donne un rayon critique a_c de :

$$a_c \sim \left(\frac{3}{4} \frac{F}{\pi \Delta \rho g} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Équation 1.7})$$

Dans le cas de deux sphères en interaction, nous pouvons écrire :

$$F = \frac{Aa}{12h^2} \quad (\text{Équation 1.8})$$

Où A est la constante de Hamaker des particules dans le milieu dispersant et h est la distance entre les deux surfaces des particules.

Nous obtenons donc une expression du rayon critique a_c au-delà duquel les interactions de surface sont trop faibles pour éviter la sédimentation :

$$a_c \sim \frac{1}{\sqrt{16\pi h}} \left(\frac{A}{\Delta\rho g} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Équation 1.9})$$

Avec des valeurs typiques de la constante de Hamaker (10^{-20}J), une différence de densité de 2060kg.m^{-3} et une distance h entre les surfaces des particules de 1nm , nous trouvons une taille critique de l'ordre de $100\mu\text{m}$, soit deux ordres de grandeurs supérieures à la taille critique de sédimentation.

Les forces de surface permettent donc de contrôler la stabilité d'une suspension dont la taille des particules est inférieure à $100\mu\text{m}$.

Il est important de maîtriser le profil du potentiel de surface de nos particules. Dans l'état dispersé, les particules se repoussent les unes des autres. Dans l'état faiblement floculé les particules tombent dans un minimum de potentiel secondaire pour former des agrégats isolés. Dans ce cas il existe une distance de séparation d'équilibre entre les particules floculées. Au contraire, lorsque les particules tombent dans le premier minimum de potentiel, nous avons un contact entre les particules.

La floculation des particules permet donc d'éviter leur sédimentation mais elle entraîne aussi une forte modification des propriétés rhéologiques. Il est donc indispensable de contrôler les interactions de surface pour avoir les bonnes propriétés de dispersion (vis à vis de la sédimentation) et d'écoulement (d'un point de vue rhéologique) [137].

c. Théorie de DLVO

Une suspension est composée de particules chargées dans un liquide. Des phénomènes d'agglomération, de coagulation, de sédimentation ou de floculation peuvent apparaître après un certain temps. Afin de réaliser des suspensions stables, il est essentiel d'identifier les différents facteurs intervenant dans ce système physico-chimique. Deux types de forces sont en général considérés dans la description d'un système colloïdal : les forces d'attraction de Van der Waals et les forces de répulsion électrostatique. La simple combinaison des forces attractives de Van der Waals et répulsives de l'électrostatique permet de comprendre la tendance à l'agrégation ou à la stabilisation d'une suspension. La théorie la plus simple a été proposée dans les années 40 par les couples Derjaguin-Landau et Verwey-Overbeek [138].

i. Forces attractives : forces de Van der Waals

Les forces à longue distance issues des interactions de Van der Waals sont toujours attractives entre des particules identiques. Le potentiel de Van der Waals dépend de la distance avec une

amplitude qui est fonction des propriétés diélectriques des particules en interaction et du milieu dispersant. Pour des particules sphériques ce potentiel s'exprime via l'expression de Hamaker [139] :

$$W_{vdW}(h) = -\frac{A}{6} \left[\frac{2a^2}{h+2a} + \frac{2a^2}{h-2a} + \ln \left(\frac{h+2a-4a^2}{h+2a} \right) \right] \quad (\text{Équation 1.10})$$

où $W_{vdW}(h)$ est l'énergie potentielle d'attraction, a le rayon des particules, h est la distance entre les surfaces des particules (avec $h=r-2a$ où r est la distance les centres des particules sont séparés de la distance r) et A la constante de Hamaker, caractéristique du matériau constituant les particules et du milieu interstitiel. En général, les constantes de Hamaker sont ainsi tabulées, pour des interfaces du même type séparées par le vide ou un solvant. L'hydroxyapatite dans l'eau par exemple a une constante de Hamaker de 6.10^{-20} J [140].

Lorsque les molécules sont proches les unes des autres, la polarisation responsable des forces de Van der Waals, est quasiment instantanée vis à vis de la fréquence de relaxation. Pour les séparations supérieures à 5nm cette approximation n'est plus valable ce qui diminue l'attraction de Van der Waals. Cette modification peut être prise en compte en utilisant une constante de Hamaker qui dépend de la distance (correction de Gregory).

Un moyen de s'affranchir de l'attraction de Van der Waals est d'ajuster les propriétés diélectriques du solvant et des particules pour faire disparaître les forces attractives [137].

ii. Forces répulsives : forces électrostatiques

Les forces électrostatiques répulsives permettent de stabiliser les suspensions de particules. Les charges de surface entraînent des répulsions à longues portées qui stabilisent la suspension. Deux particules dont les centres sont séparés de la distance r , se repoussent l'une de l'autre avec un potentiel d'interaction $W_{er}(h)$ [139] :

$$\frac{W_{er}(h)}{k_B T} = -2\pi a \epsilon_0 \epsilon_r \psi^2 \ln \left(1 + e^{kh} \right) \quad (\text{Équation 1.11})$$

où ψ est le potentiel de surfaces des particules, ϵ_0 la permittivité du vide, ϵ_r la permittivité relative des particules, a leur rayon et k^{-1} la longueur de Debye.

La longueur de Debye (k^{-1}) représente la gamme de l'interaction électrostatique qui existe dans les suspensions. Elle est donnée par [139] :

$$k^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r R T}{F^2 I}} \quad (\text{Équation 1.12})$$

où R est la constante des gaz parfait, F la constante de Faraday et I la force ionique.

Pour des particules chargées, la concentration totale des ions dans le solvant contrebalance la charge de surface des particules. En addition de ces contre-ions, il peut exister une

concentration d'électrolyte qui corresponde au nombre de paires d'ions par unité de volume dans la suspension.

Donc pour maintenir la stabilité d'une suspension, les forces répulsives électrostatiques doivent être dominantes. Pour cela un moyen de contrôler l'état de dispersion d'une suspension consiste à ajouter des forces de répulsion stériques. Elles peuvent être introduites en adsorbant des molécules organiques sur la surface des particules. Pour que la répulsion soit efficace, il est important de respecter certaines règles qui prennent en compte le type de molécules adsorbées ainsi que leur concentration d'utilisation.

Ces solutions peuvent être résumées en deux stratégies fondamentales (Figure 1.12) :

- Répulsion stérique : cela implique que les polymères ajoutés au système, sont adsorbés à la surface des particules et interdisent une mise en contact des surfaces des particules.
- Stabilisation électrostatique: c'est l'effet sur l'interaction de la particule due à la distribution ou à la présence d'éléments chargés dans le système.

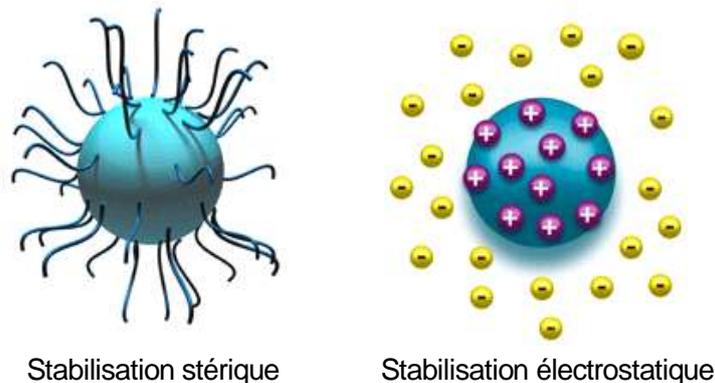


Figure 1.12 : Exemples de stabilisations d'une particule isolée.

Un autre moyen de contrôler l'état de dispersion d'une suspension consiste à contrôler les propriétés physico-chimiques du fluide suspendant. Dans le cas des suspensions phosphocalciques injectables, le fluide suspendant est une solution d'hydroxypropylméthylcellulose. Une large connaissance des propriétés physico-chimiques et rhéologiques des polymères est donc indispensable.

4.3.3. Propriétés du fluide suspendant

a. La nature du polymère

Le choix du polymère dans une suspension concentrée telles que les suspensions phosphocalciques injectables est difficile. L'architecture du polymère dépend du cahier des charges. Il est important de contrôler :

- L'adsorption ou non du polymère sur la surface des particules de BCP ;
- Les parties hydrophiles et hydrophobes de la chaîne ;

- La densité et l'emplacement des charges ;
- La taille de la chaîne principale ;
- La rigidité ainsi que le comportement du polymère dans le solvant.

L'adsorption d'un polymère sur la surface des particules dépend de tous ces paramètres mais aussi de sa concentration.

b. Effet de la concentration

Le comportement d'un polymère mis dans la suspension dépend de sa nature, de sa concentration et de son interaction avec la surface des particules.

Considérons l'ajout d'une solution de polymère non chargé et de rayon de giration supérieur à la longueur de Debye, à une dispersion de particules stabilisées électrostatiquement (Figure 1.12). Supposons de plus que le polymère s'adsorbe sur la surface des particules. Pour les faibles concentrations en polymères, les chaînes adsorbées auront une configuration de type aplatie de telle sorte que le polymère ne dépasse pas de la longueur d'écrantage de la particule. Dans ce cas la répulsion électrostatique continuera à imposer la stabilité au système. Si nous augmentons un peu la concentration en polymères, la conformation aplatie des chaînes n'est plus possible du fait de l'augmentation du nombre de polymères adsorbés. L'épaisseur des polymères sur la surface des particules devient alors supérieure à la couche de Debye. Le pontage de deux particules par une chaîne de polymère est alors possible si les surfaces ne sont pas saturées en polymères, ce qui entraîne la floculation de la suspension. Dans cette gamme de concentration, le polymère aura donc un effet floculant. Si nous augmentons encore la concentration en polymères pour atteindre la saturation sur la surface des particules, de telle sorte que chaque particule est entourée d'une couche en polymères, les polymères fixés sur chaque surface se repoussent. C'est uniquement dans ce cas que nous avons le phénomène de répulsion stérique (Figure 1.12).

c. Propriétés des polymères en solution

i. Viscosité des solutions macromoléculaires diluées

La détermination expérimentale de la viscosité constitue très certainement la technique la plus répandue actuellement en chimie macromoléculaire pour caractériser les polymères en solution. C'est, d'ailleurs, la méthode la plus ancienne permettant d'évaluer les masses molaires moyennes, puisqu'elle fut proposée en 1930 par Staudinger et Heuer [141]. L'emploi intensif de cette méthode et son avantage pratique sur les autres techniques telles que la diffusion de la lumière, l'osmométrie, etc..., sont dûs essentiellement au fait qu'elle ne nécessite pas un

appareillage complexe. Les données expérimentales sont, de plus, très rapidement exploitables par ce procédé.

La mise en solution d'un échantillon macromoléculaire s'accompagne, en effet, d'un accroissement très important de la viscosité de la solution ainsi obtenue, même lorsque le soluté se trouve en faibles quantités. La mesure de cet accroissement viscosimétrique permet de connaître les dimensions macromoléculaires (rayon de giration ou distance quadratique moyenne entre les deux extrémités de chaque chaîne macromoléculaire), c'est-à-dire d'atteindre la conformation moyenne du polymère.

Cette technique permet également d'obtenir des renseignements intéressants sur les interactions polymère-solvant à condition d'opérer à des températures différentes. Elle peut être utilisée avec profit dans l'étude des polymères ramifiés, de la polydispersité des échantillons ainsi que dans la mise en évidence des phénomènes d'agrégation des chaînes en solution.

ii. Viscosité intrinsèque

Lorsque le soluté du mélange binaire soumis à un écoulement est constitué par une substance macromoléculaire, il est très utile d'introduire une nouvelle grandeur fondamentale en physico-chimie macromoléculaire et qui est désignée sous le nom de viscosité intrinsèque. Cette grandeur fondamentale apporte, en effet, des renseignements quantitatifs dans les caractérisations pondérales, géométriques et interactionnelle des polymères dissous. La mesure de la viscosité intrinsèque permet également de caractériser les chaînes macromoléculaires ramifiées. Cette quantité est représentée par la limite de la viscosité spécifique réduite lorsque la dilution de la solution devient infinie. La viscosité intrinsèque $[\eta]$ peut s'écrire donc sous la forme suivante :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \frac{\eta - \eta_{solvant}}{\eta_{solvant}} \quad (\text{Équation 1.13})$$

où c est la concentration du soluté, η_{sp} la viscosité spécifique, $\eta_{solvant}$ la viscosité absolue du solvant pur et η la viscosité absolue de la solution macromoléculaire.

La viscosité intrinsèque est exprimée, le plus souvent, en décilitres par gramme (dl.g^{-1} ou 100ml.g^{-1}).

La détermination expérimentale de la viscosité intrinsèque d'une solution macromoléculaire s'effectue généralement en mesurant la variation de la viscosité spécifique réduite en fonction de la concentration c du soluté et en extrapolant à concentration nulle. Parmi les équations qui vérifient de telles variations, la plus connue et la plus couramment utilisée est celle de Huggins [142].

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_h [\eta]^2 c \quad (\text{Équation 1.14})$$

Le coefficient de proportionnalité k_h est appelé constante de Huggins.

Cette méthode consiste à tracer graphiquement, pour des concentrations en polymère inférieures au gramme par décilitre, la variation linéaire de la viscosité spécifique réduite η_{sp}/c en fonction de la concentration c . La viscosité intrinsèque est alors égale à l'ordonnée à l'origine de la droite ainsi obtenue. La pente de cette droite permet le calcul simultané de la constante k_h de Huggins.

Les viscosités intrinsèques peuvent être également obtenues en extrapolant, à dilution infinie, les variations linéaires de la quantité $(1/c)\text{Ln}(\eta/\eta_0)$, appelée viscosité inhérente, en fonction de la concentration c . Cette dernière dépendance est représentée par la relation de Kraemer [143].

$$\frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_0} = [\eta] + k_k [\eta]^2 c \quad (\text{Équation 1.15})$$

Le coefficient de proportionnalité k_k est appelé constante de Kraemer. C'est une seconde constante pour un système polymère-solvant-température donné, dont la valeur est reliée à la valeur correspondante de la constante de Huggins :

$$k_h + k_k = 0,5 \quad (\text{Équation 1.16})$$

Certains auteurs préconisent l'emploi de ce dernier procédé graphique en raison des pentes qui sont, en valeurs absolues, toujours plus faibles que celles relatives aux tracés de Huggins et qui permettent ainsi d'extrapoler à concentration nulle, avec une plus grande précision. Il semble que la méthode qui procure les meilleurs résultats consiste à porter simultanément les viscosités 'spécifique réduite' η_{sp}/c et 'inhérente' $(1/c)\text{Ln}(\eta/\eta_0)$ en fonction de la concentration c [141]. Un exemple de cette double extrapolation est donné dans la Figure 1.13.

En assimilant chaque chaîne à une sphère isolée (cas des solutions diluées) et en appliquant la loi d'Einstein relative aux suspensions très diluées on déduit la relation ci-dessous qui permet d'accéder aux données du volume hydrodynamique si M_w est connue [141].

$$[\eta] = 2,5 \frac{N_a V_h}{M_w} \quad (\text{Équation 1.17})$$

avec N_a le nombre d'Avogadro, V_h le volume hydraté de la sphère et M_w la masse molaire. Pour les particules non sphériques, le même genre de relation vaut encore en remplaçant le facteur 2,5 par le facteur ν dit de Simha. Ce facteur qui a été calculé pour différentes formes de molécules non sphériques prend des valeurs très supérieures à 2,5.

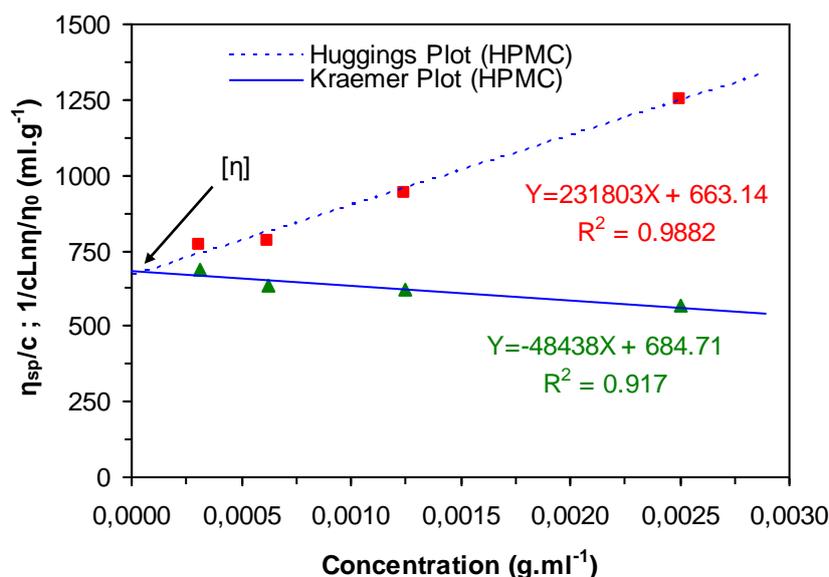


Figure 1.13 : Exemple de la détermination expérimentale de la viscosité intrinsèque par double extrapolation des variations des viscosités ‘spécifique renduite’ et ‘inhérente’, en fonction de la concentration du polymère. Couple: hydroxypropylméthylcellulose-solution de soude (d’après Fatimi et al., 2008 [75]).

iii. Masses molaires

L’application la plus importante et la plus ancienne de la viscosimétrie en chimie macromoléculaire est incontestablement la détermination expérimentale des masses des polymères. La viscosité intrinsèque $[\eta]$ et la masse molaire M_w d’un échantillon supposé isomoléculaire sont, en effet, reliées par la loi de Mark-Houwink-Sakurada [144] :

$$[\eta] = KM_w^a \quad (\text{Équation 1.18})$$

Les deux paramètres K et a sont des constantes pour un couple polymère-solvant donné et à une température donnée. En générale, l’exposant a prend selon le couple polymère-solvant considéré, des valeurs comprises entre 0,5 et 0,8 pour des chaînes flexibles. Cette relation d’origine expérimentale est valable dans un large domaine de masses molaires et peut être interprétée par les théories viscosimétriques des solutions macromoléculaires [141]. La masse molaire d’un échantillon fractionné peut être, par suite, évaluée très facilement et très rapidement à partir de la seule mesure de sa viscosité intrinsèque, après avoir déterminé au préalable les deux constantes K et a , en utilisant d’autres échantillons fractionnés dissous dans le même solvant, pris à la même température.

4.4. Conclusion

Il ressort de cette synthèse que l'ICPCS est un biomatériau adéquat pour les techniques chirurgicales non-invasives. Grâce à la biofonctionnalité de ce biomatériau injectable, des résultats intéressants ont été obtenus pour des indications orthopédiques et parodontales.

Les deux phases qui constituent ce biomatériau présentent deux principaux rôles au niveau de la formulation. La phase minérale (BCP) donne au matériau son caractère bioactif grâce à ses propriétés biologiques. La phase organique (HPMC) donne au matériau son caractère injectable grâce à ses propriétés rhéologiques.

La stabilité au cours du temps de ce type de matériau semble être difficile. On a vu dans la partie « Généralités sur les suspensions granulaires » que de nombreux paramètres peuvent influencer la stabilité des suspensions granulaires. Grâce à des lois théoriques on a pu mettre en évidence le mécanisme de la stabilité.

Il est alors évident que dans le cadre de la fabrication de ce type de biomatériau, il faut prendre en compte les propriétés physico-chimiques des particules de BCP (taille, forme, surface spécifique, microporosité, charge électrostatique, etc...) et aussi celles de la solution de polymère (nature et concentration du polymère, viscosité intrinsèque, masse molaire, etc...).

5. Généralités sur la rhéologie et la viscoélasticité

5.1. Introduction

L'objet de cette partie est donc de présenter, dans un premier temps, les principales grandeurs rhéologiques utilisées dans la caractérisation des fluides. Dans un deuxième temps, les différents comportements rhéologiques des fluides répertoriés dans la littérature et les principaux modèles mathématiques utilisés pour les caractériser seront décrits.

5.2. Définition

La rhéologie a pour objet l'étude de la déformation des corps, y compris leur écoulement, sous l'influence des contraintes qui leur sont appliquées. Le terme 'rhéologie' fut inventé par Eugène Bingham en 1928, du mot grec 'ρεω', signifiant écoulement. Du grec le suffixe 'rhéo' signifie couler et le suffixe 'logie' désigne une science. Selon le Groupe Français de Rhéologie (GFR), la rhéologie est la science de la matière en écoulement, des contraintes qu'il faut lui appliquer et des modifications de structure qui en résulte. La rhéologie fait appel à la mécanique, à la physique, à la chimie, aux mathématiques et à la biologie qui lui fournissent ses instruments de base, et se montre utile à chacune de ces disciplines [145].

5.3. Notion de mouvement de cisaillement simple

5.3.1. Notions fondamentales

Un matériau soumis à un ensemble de forces est susceptible de se déformer. Les mouvements des différents points du matériau sont dépendants de la répartition et de l'intensité des forces appliquées [146].

Supposons, le mouvement d'un échantillon résultant d'une force (F) à une certaine vitesse (V) entre deux surfaces planes d'épaisseur (dy), l'une immobile, l'autre animée d'un déplacement parallèle à la première, représenté dans la Figure 1.14. Le 'cisaillement' du matériau sera quantitativement caractérisé par deux grandeurs rhéologiques : le taux et la contrainte de cisaillement notés respectivement $\dot{\gamma}$ et τ .

Les hypothèses du système, pendant toute la durée de l'écoulement (du cisaillement) sont :

- Un mouvement laminaire, c'est-à-dire sans turbulence. La structure du matériau est assimilée à une superposition de couches adjacentes (en lamelles) d'épaisseur infiniment minces. La déformation du matériau s'effectue par un glissement relatif des différentes couches les unes sur les autres, sans qu'il y ait transfert de matière d'une couche à l'autre. Il s'agit d'un mouvement strictement ordonné qui se produit sans brassage de matériau et sans variation de son volume.

- Un écoulement stationnaire dont la vitesse est stable pour tous les points du système considéré.

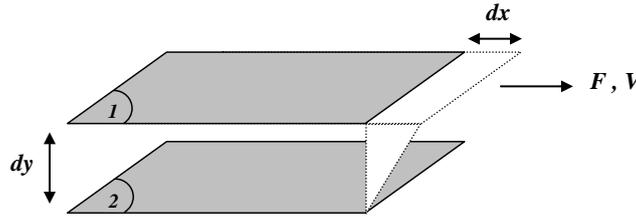


Figure 1.14 : Mouvement de cisaillement simple résultant d'une force (F) et d'une vitesse (V) entre deux plans parallèles selon la direction x .

a. Contrainte de cisaillement

On définit la contrainte de cisaillement τ_{xy} , exercée dans la direction x , comme étant la force (F) exercée tangentiellement à la surface de ces couches par unité de surface (S) (Équation 1.19) ;

$$\tau_{xy} = \frac{F}{S} \quad (\text{Équation 1.19})$$

b. Taux de cisaillement

La déformation de cisaillement, notée γ , s'exprime sous la forme suivante:

$$\gamma_{xy} = \frac{dx}{dy} \quad (\text{Équation 1.20})$$

Le taux de cisaillement, notée $\dot{\gamma}$, caractérise la variation de la vitesse (dV) sur l'épaisseur (dy) et s'exprime sous la forme suivante :

$$\dot{\gamma} = \frac{dV}{dy} \quad (\text{Équation 1.21})$$

Le taux de cisaillement est égale à la dérivé de la déformation par rapport au temps (Équation 1.22) ;

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma_{xy}}{dt} \quad (\text{Équation 1.22})$$

c. Viscosité

La détermination des deux grandeurs, $\dot{\gamma}$ et τ , permet de définir la viscosité du fluide étudié. La contrainte de cisaillement augmente avec le taux de cisaillement et le rapport entre ces deux grandeurs va dépendre des propriétés du matériau considéré, c'est la viscosité, notée η (Équation 1.23).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (\text{Équation 1.23})$$

La viscosité est une grandeur suffisante pour caractériser de manière précise le comportement rhéologique d'un fluide, si celui-ci se trouve être un fluide newtonien pour lequel la viscosité est indépendante du cisaillement. Autrement, dans le cas d'un fluide non newtonien, la viscosité varie en fonction du taux de cisaillement et montre ainsi un comportement rhéologique beaucoup plus complexe ($\eta = f(\dot{\gamma})$). Les courbes traduisant graphiquement cette équation rhéologique d'état du matériau sont appelées les rhéogrammes.

5.3.2. Modes d'écoulement des fluides

Les rhéogrammes obtenus lors des tests rhéologiques permettent de décrire les propriétés d'écoulement du matériau. La représentation la plus courante consiste à exprimer la variation de la contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement. Ainsi, les typologies des rhéogrammes représentatifs des fluides newtoniens et des fluides non newtoniens sont présentées sur la Figure 1.15.

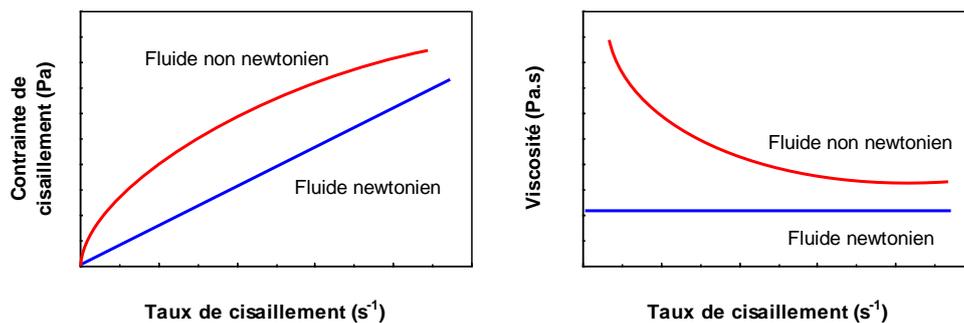


Figure 1.15 : Rhéogrammes des fluides newtoniens et non newtoniens.

Les fluides newtoniens ont leurs viscosités constantes en fonction du taux de cisaillement. Cependant de nombreux autres fluides ne présentent pas ce comportement simple lors de l'écoulement, leurs viscosités dépendent du gradient de vitesse. Ces fluides sont dits 'non newtoniens'.

a. Comportement sans seuil d'écoulement

Le comportement sans seuil d'écoulement regroupe deux principales catégories de fluides les fluides aux comportements rhéofluidifiants et aux comportements rhéoépaississants. Les courbes d'écoulements de ces deux principales catégories de fluides sans contrainte seuil sont représentées sur la Figure 1.16.

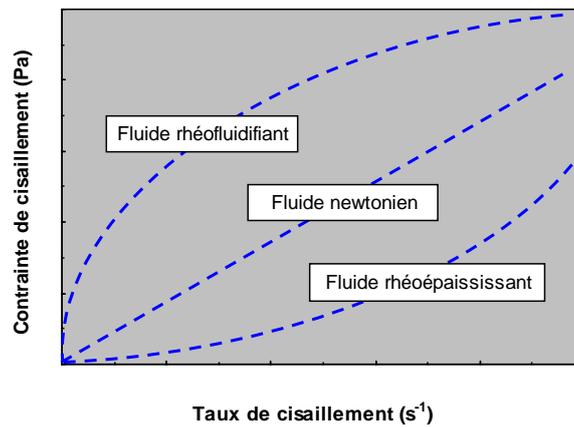


Figure 1.16 : Rhéogrammes des principales catégories de fluides sans seuil d'écoulement.

La première catégorie concerne les fluides aux comportements rhéofluidifiants. La représentation de cette catégorie de fluide est caractérisée par un rhéogramme passant par l'origine avec une concavité vers le bas (Figure 1.16).

b. Comportement avec seuil d'écoulement

Le comportement avec contrainte seuil concerne les fluides dits plastiques. Le comportement plastique de ces fluides se traduit par l'existence d'une contrainte de cisaillement seuil (τ_c) en dessous de laquelle l'écoulement ne se produit pas (Figure 1.17).

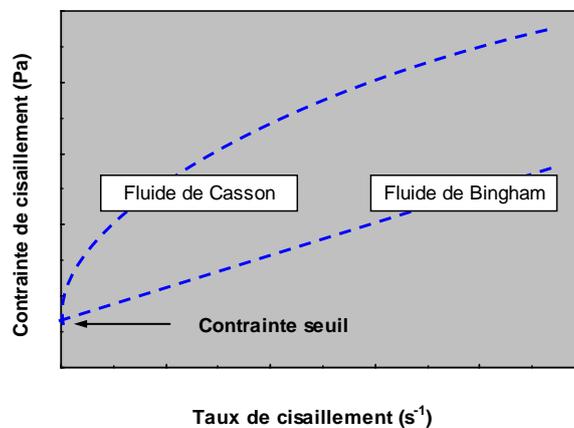


Figure 1.17 : Rhéogrammes des principales catégories de fluides présentant un seuil d'écoulement.

Ce comportement est généralement lié à l'existence d'une structure tridimensionnelle assez rigide ou floculée, qui ne se rompt que si on exerce une force minimale. Le seuil d'écoulement correspond à l'énergie nécessaire pour séparer les particules.

c. Modélisations mathématiques des courbes d'écoulement

Le Tableau 1.3 présente les principales lois rhéologiques décrivant le comportement des fluides sans et avec seuil d'écoulement.

La loi d'Ostwald-de Waele ou loi puissance est la plus communément utilisée pour modéliser les courbes d'écoulement des fluides présentant un comportement rhéofluidifiant dans le domaine des matériaux injectables (mortier de ciment, matériaux de liaison, colles, etc...). Dans ce modèle à deux paramètres, K est appelée la consistance du fluide et n (<1) l'indice de l'écoulement traduisant l'écart avec le fluide newtonien. Les fluides rhéoépaississants obéissent également à la même loi mais avec un indice d'écoulement $n > 1$. Les limites de la loi puissance d'Ostwald-de Waele interviennent quand le matériau présente des régions de comportement newtonien à faible ou à fort taux de cisaillement. Dans ce cas, d'autres lois (Cross, Carreau et Carreau-Yasuda) semblent plus adéquates pour ce type de matériau avec deux plateaux newtoniens, définies pour les faibles et hauts taux de cisaillement. Les valeurs des viscosités limites correspondantes sont notées η_0 et η_∞ [147]. Cela signifie que les viscosités limites ne dépendent pas du taux de cisaillement. La viscosité diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement dans des conditions supérieures au taux de cisaillement critique ($\dot{\gamma}_c$) au-delà duquel la condition limite cesse d'être linéaire.

Tableau 1.3 : Lois rhéologiques décrivant l'écoulement de fluides sans seuil d'écoulement.

Modèle	Loi rhéologique	Référence
Ostwald-de Waele	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	Ostwald, 1925 [148] de Waele, 1923 [149]
Cross	$\eta = \eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^n}$	Cross, 1965 [150]
Carreau	$\eta = \eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{\left[1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^2\right]^n}$	Carreau, 1972 [151]

5.4. Viscoélasticité

5.4.1. Introduction

La notion de solide élastique et de liquide visqueux est tirée de notre expérience quotidienne. Considérons un solide élastique qui s'allonge quand on l'étire modérément. Il reste dans l'état 'allongé' tant que l'on maintient la force appliquée, puis il revient dans sa forme initiale quand on le relâche, et ce, immédiatement. La déformation appliquée au matériau est proportionnelle à la force (loi de Hooke) et ne persiste qu'aussi longtemps que la force est maintenue [152].

Prenons maintenant un liquide visqueux et soumettons le à une expérience analogue : on en confine une noisette entre deux plans parallèles, et de la même manière que l'on a tiré sur le

solide élastique, on déplace le plan supérieur parallèlement au plan inférieur que l'on maintient fixe. La force nécessaire à maintenir immobile le plan inférieur n'est plus, cette fois, proportionnelle à la déformation, mais à la vitesse avec laquelle elle a été imposée (loi de Newton). Une fois la déformation établie, il n'est plus nécessaire d'exercer de force sur le plan pour maintenir constante la déformation [152].

Il existe une classe de matériaux aux propriétés mécaniques intermédiaires entre le solide élastique et le liquide visqueux, ce sont les fluides viscoélastiques. Pour maintenir constant une déformation imposée de manière instantanée à un matériau viscoélastique, la force qu'il est nécessaire d'appliquer décroît avec le temps et s'annule après un temps suffisamment long. Néanmoins, si la force appliquée cesse, le matériau aura tendance à revenir vers sa forme initiale à la manière du solide élastique. Par contre, si la déformation a été maintenue pendant un temps suffisamment long, le fluide gardera la nouvelle forme qui lui a été imposée. Ainsi, le fluide viscoélastique se comporte plutôt comme un solide élastique aux temps courts, et comme un liquide visqueux aux temps longs.

5.4.2. Quelques rappels sur la rhéologie oscillatoire

Ayant précisé ces notions et définitions, nous pouvons maintenant examiner plus en détail les matériaux viscoélastiques. Il est possible d'interpréter en termes d'énergie les observations faites au début de cette partie sur les trois types de matériaux : élastique, visqueux et viscoélastique.

a. Sollicitation périodique

Lorsqu'une déformation sinusoïdale de fréquence donnée est appliquée à un matériau présentant un comportement viscoélastique linéaire, la contrainte correspondante est également sinusoïdale avec un déphasage δ (Figure 1.18).

La réponse du solide élastique est en phase avec la sollicitation. On peut dire que le déphasage entre sollicitation et réponse est nul : $\delta=0$. La réponse du liquide est en quadrature de phase avec la déformation : $\delta=\pi/2$. Ceci correspond au fait que dans un liquide simple, c'est la vitesse de déformation qui génère la contrainte. Les propriétés rhéologiques d'un corps viscoélastique se situent entre les deux cas extrêmes (liquide visqueux et solide élastique). Par conséquent, il présente un déphasage δ par rapport à l'oscillation : $0\leq\delta\leq\pi/2$.

b. Notions fondamentales

Le matériau purement élastique stocke toute l'énergie mécanique qui lui est transmise lors d'une déformation sous forme d'énergie élastique. Il retourne donc de lui-même dans son état

initial lorsque la déformation cesse, restituant l'énergie élastique précédemment stockée sous forme d'énergie mécanique.

Inversement, un matériau purement visqueux dissipe instantanément l'énergie mécanique fournie lors de la déformation, et, sera donc incapable de reprendre sa forme initiale une fois la déformation achevée.

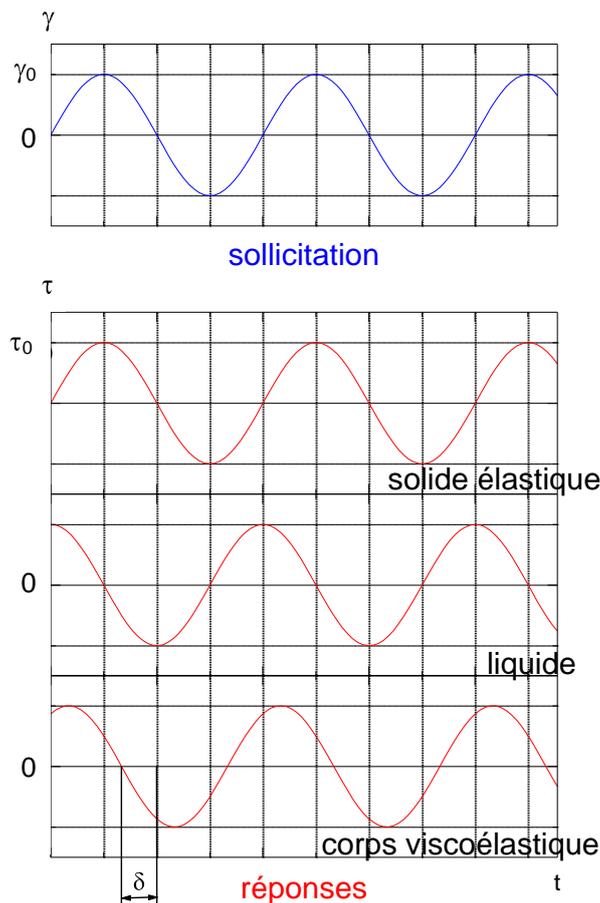


Figure 1.18 : Réponses de différents matériaux à un test dynamique.

Entre ces deux comportements, le matériau viscoélastique stocke une partie de l'énergie mécanique qu'on lui fournit et il en dissipe une autre partie. A l'instant t , lorsqu'une déformation sinusoïdale de fréquence ω est appliquée à un matériau présentant un comportement viscoélastique linéaire, la contrainte correspondante est également sinusoïdale, mais présente un déphasage δ (Figure 1.18) avec :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (\text{Équation 1.24})$$

et

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (\text{Équation 1.25})$$

où γ_0 et τ_0 sont les amplitudes maximales de la déformation et de la contrainte de cisaillement, respectivement.

La contrainte peut ainsi s'écrire sous la forme suivante :

$$\tau(t) = \tau_0 \left[\sin(\omega t) \cos(\delta) + \cos(\omega t) \sin(\delta) \right] \quad (\text{Équation 1.26})$$

Le module complexe G^* est défini à tout instant comme le rapport de la contrainte de cisaillement sur la déformation, soit :

$$G^* = \frac{\tau^*}{\gamma^*} = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \left[\cos(\delta) + i \sin(\delta) \right] = \frac{\tau_0}{\gamma_0} e^{i\delta} \quad (\text{Équation 1.27})$$

Ce module de cisaillement peut se décomposer en une partie réelle G' , appelée module de conservation (module élastique), et une partie imaginaire G'' , appelée module de perte (module visqueux) :

$$G^* = G' + iG'' \quad (\text{Équation 1.28})$$

avec :

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) \quad (\text{Équation 1.29})$$

et

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta) \quad (\text{Équation 1.30})$$

Le module complexe s'écrit donc sous la forme :

$$|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (\text{Équation 1.31})$$

Le facteur de perte $\tan(\delta)$ se définit comme le rapport du module de perte et du module de conservation :

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (\text{Équation 1.32})$$

La viscosité complexe η^* , qui peut se décomposer en une partie réelle η' et une partie imaginaire η'' , peut également être définie à partir des modules complexes :

$$\eta^* = \eta' - i\eta'' \quad (\text{Équation 1.33})$$

avec:

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} \quad (\text{Équation 1.34})$$

et

$$\eta'' = \frac{G'}{\omega} \quad (\text{Équation 1.35})$$

Le module de viscosité dynamique s'écrit donc sous la forme :

$$|\eta^*| = \sqrt{\eta'^2 + \eta''^2} = \frac{|G^*|}{\omega} \quad (\text{Équation 1.36})$$

5.4.3. Dépendance en fréquence de quelques matériaux typiques

La caractérisation du comportement viscoélastique linéaire consiste à mesurer G' et G'' (ou η' et η'') en fonction de la fréquence ω . La variation de ces grandeurs avec la fréquence fournit des informations pertinentes sur le comportement. Sur la Figure 1.19, on présente la réponse typique de quelques matériaux.

Un liquide purement visqueux montre une droite de pente 1 en G'' , (*i.e.* obéit à la loi $G'' \propto \omega^1$) et une droite de pente 2 en G' (*i.e.* obéit à la loi $G' \propto \omega^2$). La gamme de fréquences associée est la zone d'écoulement. Elle correspond (pour les polymères) à la relaxation de l'ensemble des chaînes résultante du mouvement de reptation de chaque chaîne (pour les chaînes enchevêtrées). Après le point de croisement, dans la zone plateau, le module G' devient pratiquement indépendant de la fréquence, et le module G'' diminue quand la fréquence augmente. Dans cette zone, dite aussi plateau caoutchoutique, les mouvements sont aucune chaîne ne peut avoir de mouvement d'ensemble. Le matériau se comporte comme un caoutchouc où les points de réticulation sont des interactions intermoléculaires fortes telles que les enchevêtrements.

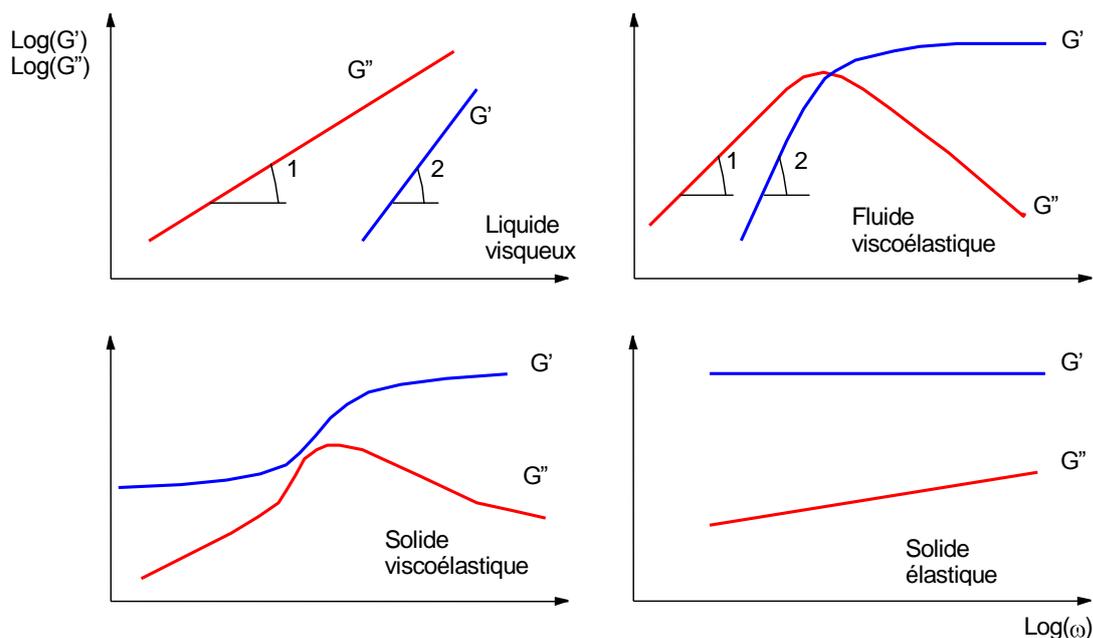


Figure 1.19 : Réponses types de quelques matériaux à une sollicitation harmonique.

D'un point de vue expérimental, à basse fréquence, le solide viscoélastique se caractérise par un G' indépendant de la fréquence et par un G'' qui augmente quand on augmente la fréquence. A hautes fréquences, ce type de matériau se caractérise par une légère augmentation de G' puis un plateau en fonction de la fréquence, par contre G'' devient décroissante.

Le solide élastique se caractérise par un G' indépendant de la fréquence. En pratique on en mesure toujours un, qui est souvent 50, 100 fois ou plus, inférieur à G' . Plus la fréquence est basse, plus ce G'' diminue.

5.5. Rhéométrie et appareillages

5.5.1. Introduction

Nous avons vu précédemment quelques notions fondamentales de la rhéologie. Pour mettre en évidence le comportement de différents matériaux, on utilise des rhéomètres comme moyens d'investigation. En pratique il existe deux principales catégories de rhéomètres : les rhéomètres rotatifs et les rhéomètres capillaires.

5.5.2. Rhéomètres rotatifs

Dans ce type de rhéomètre, une déformation (ou un gradient de déformation) est appliquée sur l'échantillon par rotation angulaire (ou vitesse angulaire) d'un mobile. La contrainte de cisaillement est mesurée par l'intermédiaire du couple mesuré après la déformation imposée. Il est aussi possible d'appliquer à l'échantillon une contrainte et d'en déduire une déformation ou un gradient de déformation.

Dans la plupart des cas des rhéomètres rotatifs, on trouve trois géométries principales : cône plan (Figure 1.20a), plans parallèles (Figure 1.20b) et cylindres coaxiaux (Figure 1.20c).

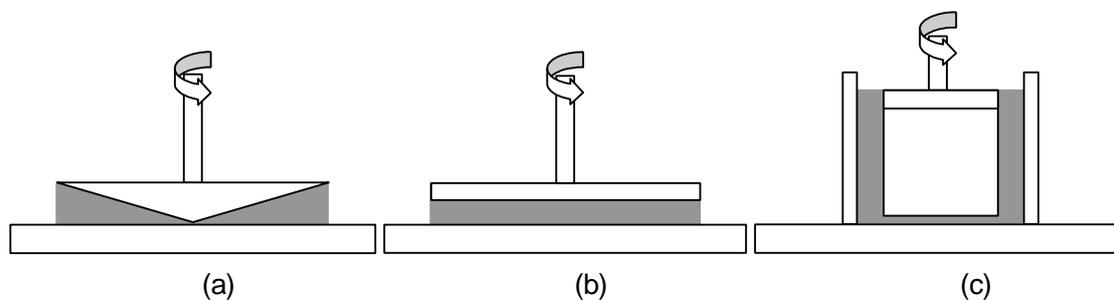


Figure 1.20 : Représentation schématique des différentes géométries : (a) cône plan (b) plans parallèles et (c) cylindres coaxiaux.

a. Cône plan

Dans ce cas l'échantillon est situé entre un disque plan et un cône d'angle faible (ψ) en rotation l'un par rapport à l'autre. La vitesse linéaire est proportionnelle à la distance à l'axe de rotation (r). Du fait de la présence du cône, l'épaisseur de l'échantillon (h) est elle aussi proportionnelle à la distance à l'axe de rotation. Dans cette géométrie, le taux de cisaillement est donc a priori homogène dans tout l'échantillon (Figure 1.21).

Dans la théorie de l'utilisation de la géométrie cône plan, la pointe du cône est au contact du plateau inférieur. Pour éviter l'usure de cette pointe, et du plateau inférieur, le cône a été légèrement tronqué.

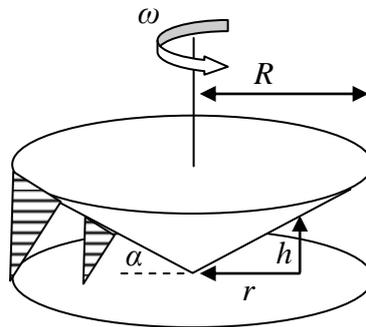


Figure 1.21 : Représentation schématique tridimensionnelle d'une géométrie 'cône plan'.

En géométrie cône plan, le taux de cisaillement s'exprime en fonction de la vitesse angulaire du cône (ω) sous la forme :

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega r}{h} = \frac{\omega}{\alpha} \quad (\text{Équation 1.37})$$

La contrainte de cisaillement dans ce cas s'écrit sous la forme :

$$\tau = \frac{3M}{2\pi R^3} \quad (\text{Équation 1.38})$$

où M est le couple mesuré et R le rayon de la géométrie.

b. Plans parallèles

Dans ce cas l'échantillon est situé entre deux disques plans en rotation l'un par rapport à l'autre. La vitesse linéaire est proportionnelle à la distance (r) à l'axe de rotation. L'épaisseur de l'échantillon (h), en revanche, est identique sur toute la surface des disques. Le taux de cisaillement est donc non homogène dans cette géométrie : le cisaillement est nul au centre et maximal à la périphérie de l'échantillon (Figure 1.22).

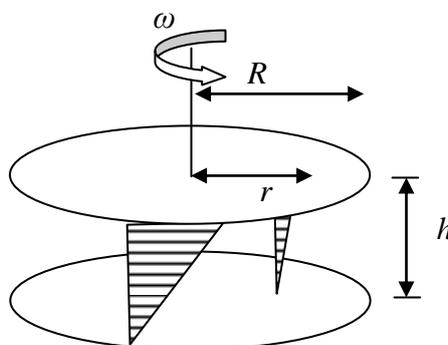


Figure 1.22 : Représentation schématique tridimensionnelle d'une géométrie 'plans parallèles'.

En géométrie plans parallèles, le taux de cisaillement s'exprime en fonction de la vitesse angulaire du cône (ω) sous la forme :

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega r}{h} \quad (\text{Équation 1.39})$$

Donc le taux de cisaillement varie de 0 au centre du plan à $(\omega R/d)$ au périphérique du plan.

En tenant compte de la non-homogénéité du taux de cisaillement, qui dépend de la position, la contrainte de cisaillement dans ce cas s'écrit sous la forme :

$$\tau = \frac{3M}{2\pi R^3} \left(1 + \frac{1}{3} \frac{d \ln M}{d \ln \dot{\gamma}} \right) \quad (\text{Équation 1.40})$$

La contrainte de cisaillement newtonienne (ou apparente) peut ainsi s'écrire sous la forme :

$$\tau_{app} = \frac{2M}{\pi R^3} \quad (\text{Équation 1.41})$$

c. *Cylindres coaxiaux*

Dans une cellule de couette, l'échantillon se trouve dans le fin interstice compris entre deux cylindres coaxiaux de rayons voisins ($R_1 < R_2$), en rotation l'un par rapport à l'autre où un cylindre est entraîné en rotation. Cette fois, la vitesse linéaire est la même sur toute la surface de chacun des cylindres. En revanche, leurs surfaces diffèrent légèrement puisque leurs rayons sont différents. Dans cette géométrie, avec un entrefer mince, le taux de cisaillement est donc homogène dans tout l'échantillon (Figure 1.23).

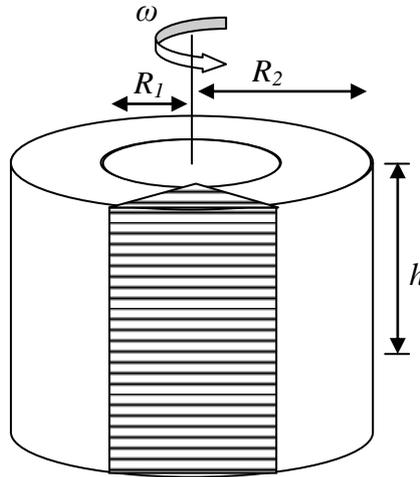


Figure 1.23 : Représentation schématique tridimensionnelle d'une géométrie 'cylindres coaxiaux'.

En géométrie cylindres coaxiaux, le taux de cisaillement s'écrit sous la forme :

$$\dot{\gamma} = \frac{R_1 \omega}{R_2 - R_1} \quad (\text{Équation 1.42})$$

Il faut noter que certains auteurs et constructeurs d'appareils, dans l'hypothèse d'un entrefer étroit [152], utilisent la relation ci-dessous qui présente une forme différente :

$$\dot{\gamma} = \frac{2\omega}{1 - \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^2} \quad (\text{Équation 1.43})$$

La contrainte de cisaillement dans ce cas s'écrit sous la forme :

$$\tau = \frac{M}{2\pi R_1^2 h} \quad (\text{Équation 1.44})$$

5.5.3. Rhéomètres capillaires

Le rhéomètre capillaire, dont le schéma de principe est présenté ci-dessous, est le plus couramment utilisé pour mesurer la viscosité des polymères fondus.

Le matériau à caractériser est mis en température dans un réservoir cylindrique, dans lequel peut coulisser un piston (Figure 1.24).

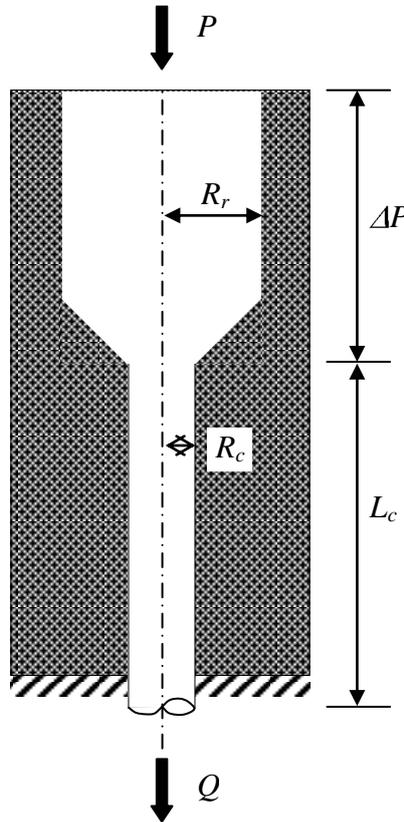


Figure 1.24 : Représentation schématique d'un rhéomètre capillaire.

A la partie inférieure du réservoir se trouve un tube capillaire de longueur L_c et de rayon R_c . Le déplacement du piston à vitesse donnée permet au produit de s'écouler dans ce capillaire avec un débit volumique Q . La mesure de la perte de charge ΔP dans le capillaire pour un débit donné donne alors accès à la viscosité :

$$\eta = \frac{\tau_p}{\dot{\gamma}_p} \quad (\text{Équation 1.45})$$

où τ_p et $\dot{\gamma}_p$ sont respectivement la contrainte et le taux de cisaillement à la paroi.

Il est donc nécessaire de définir ces deux grandeurs à partir des valeurs mesurées, ΔP et Q .

La contrainte à la paroi τ_p est obtenue par :

$$\tau_p = R_c \frac{\Delta P}{2L_c} \quad (\text{Équation 1.46})$$

La détermination de $\dot{\gamma}_p$ est plus délicate, car ce paramètre dépend de la nature du fluide. Pour un fluide newtonien, ce paramètre que nous appelons taux de cisaillement apparent s'écrit sous la forme :

$$\dot{\gamma}_a = 4 \frac{Q}{\pi R_c^3} \quad (\text{Équation 1.47})$$

Pour un fluide quelconque présente un comportement de type loi de puissance, le taux de cisaillement à la paroi s'écrit également :

$$\dot{\gamma}_p = \frac{3n+1}{n} \frac{Q}{\pi R_c^3} = \frac{3n+1}{4n} \dot{\gamma}_a \quad (\text{Équation 1.48})$$

où n est l'indice la loi de puissance défini comme suivant :

$$n = \frac{d \log \tau_p}{d \log \dot{\gamma}_a} \quad (\text{Équation 1.49})$$

5.6. Conclusion

Au cours de cette partie nous avons mis en évidence les notions fondamentales de la rhéologie ainsi que les méthodologies de caractérisation des fluides et des matériaux viscoélastiques.

D'un point de vu plus général, cette partie nous a permis de bien comprendre les points suivants :

- Les principales grandeurs rhéologiques ;
- Les différents comportements rhéologiques ;
- Les principes de la rhéologie oscillatoire ;
- Les différents types de rhéomètres.

Comme nous l'avons souligné en introduction, la rhéologie est essentielle à la caractérisation des biomatériaux injectables. Aussi elle est essentielle à la compréhension des modifications qu'elles subissent au cours des préparations ou au cours des manipulations *in vitro* et *in vivo*.

**CHAPITRE 2 : LES MATRICES
EXTRACELLULAIRES SYNTHÉTIQUES**

Article 1 : A. Fatimi, J. F. Tassin, S. Quillard, M. A. V. Axelos, P. Weiss. The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* 2008;29(5):533-543.

Article 2 : A. Fatimi, J. F. Tassin, R. Turczyn, M. A. V. Axelos, P. Weiss. Gelation studies of a silated hydroxypropylmethylcellulose solution: influence of pH and sterilization. *Biomacromolecules* (soumis).

1. Problématique

Par leur nature, les hydrogels sont des polymères hydrophiles, réticulés et fortement gonflés. Les propriétés d'un hydrogel spécifique sont extrêmement importantes dans le choix des matériaux pour une application médicale donnée. La fonction d'un hydrogel dépend, en grande partie, de sa structure réticulée. Nous avons décrit auparavant les propriétés fondamentales caractérisant un hydrogel telles que le gonflement, l'élasticité, la perméabilité et la diffusion. Cependant, ces mêmes propriétés dépendent fortement des conditions environnementales. Avec cette combinaison de facteurs, il est impératif que les propriétés de l'hydrogel soient déterminées avant chaque utilisation médicale.

L'hydrogel d'HPMC-Si possède parfaitement les propriétés fondamentales des hydrogels, ce qui a fait de lui un bon candidat potentiel comme matrice pour l'ingénierie tissulaire. Les biologistes sont principalement intéressés par les propriétés rhéologiques (solution visqueuse avant réticulation) et viscoélastiques (matériau élastique après réticulation) de cet hydrogel ainsi que ses propriétés biologiques (biocompatibilité et non toxicité). Dans un premier temps, l'hydrogel d'HPMC-Si est apparu comme une matrice synthétique potentielle pour maintenir le phénotype chondrocytaire en culture tridimensionnelle *in vitro*. Dans un deuxième temps, l'hydrogel d'HPMC-Si a été utilisé comme matrice synthétique en ingénierie tissulaire du cartilage *in vivo*.

La réticulation de l'hydrogel d'HPMC-Si *in situ* est générée par un abaissement du pH. Le passage d'une solution visqueuse injectable à un matériau élastique est basé sur la chimie du silicium et en particulier celle des silanols. L'HPMC-Si est obtenue par greffage de 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane sur les groupements hydroxyle d'une HPMC commerciale (Methocel[®] E4M). La dissolution du polymère (HPMC-Si) dans une solution basique permet la transformation des fonctions silanes en fonctions silanolate forme ionique ($-\text{SiO}^-\text{Na}^+$), et à pH physiologique les silanols ($-\text{SiOH}$) se forment après la protonation des silanolate. La polycondensation de ces derniers aboutit à la création d'un réseau tridimensionnel.

La modification chimique de l'HPMC pourrait affecter les propriétés rhéologiques de cette dernière. Dans ce contexte, notre objectif fut de comparer les propriétés physico-chimiques et rhéologiques de l'HPMC non greffée et l'HPMC silanisée. Le but de cette étude a donc été de déterminer les différences sous plusieurs formes : (i) caractérisation chimique des matériaux sous forme de poudre en utilisant des techniques spectroscopiques vibrationnelles (FT-IR et FT-Raman), (ii) caractérisation des solutions diluées en utilisant la mesure de la viscosité intrinsèque, et (iii) caractérisation des solutions concentrées en utilisant des mesures rhéologiques (courbes d'écoulement et tests oscillatoires). Ceci fait l'objet de la première partie

de l'article 1. Une deuxième partie de l'article 1 a été consacrée à la caractérisation viscoélastique de l'hydrogel d'HPMC-Si. La cinétique de la réticulation et les propriétés viscoélastiques ont été déterminées en fonction du temps. Ces mesures nous ont permis de déterminer le point de gel de l'HPMC. Ces données permettront de définir et d'adapter les propriétés viscoélastiques du polymère d'HPMC-Si pour son application à l'ingénierie tissulaire du cartilage (article 1).

Les résultats obtenus lors de l'étude précédente (article 1) nous ont suggéré qu'il pourrait être intéressant de voir l'effet du pH et de la stérilisation sur le comportement rhéologique de l'HPMC-Si. Notre objectif (article 2) fut donc d'étudier l'influence du pH et de la stérilisation sur le comportement des solutions diluées et des solutions concentrées en utilisant des mesures de viscosité intrinsèque et de viscosité limite, respectivement. Dans l'objectif de comprendre le comportement du polymère durant la stérilisation, nous avons choisi d'étudier la thermogélification de l'HPMC non greffée en fonction de la concentration. La deuxième partie de l'article 2 a été de caractériser l'influence du pH final et de la température sur la cinétique de réticulation de l'HPMC-Si en comparant les temps de gel déterminés par la méthode rhéologique mise au point dans l'article 1 (article 2).

L'objectif de ces deux articles était donc de caractériser l'HPMC-Si au niveau microscopique et macroscopique des points de vue physico-chimique, rhéologique et viscoélastique, et de le comparer à ses précurseurs.

2. Les propriétés rhéologiques d'une matrice d'HPMC-Si utilisée en ingénierie tissulaire

Résumé :

Cet article décrit les propriétés rhéologiques d'une hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si) utilisée en ingénierie tissulaire comme matrice extracellulaire synthétique tridimensionnelle. L'HPMC-Si est obtenue par greffage de 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane sur les groupements hydroxyle d'une HPMC commerciale (Methocel[®] E4M). La première partie de cet article est consacrée à une étude comparative entre l'HPMC-Si et l'HPMC. Les résultats ont montré que la présence des groupements silane réduit le volume hydrodynamique des solutions diluées, mais n'affecte pas de manière significative le comportement rhéologique des solutions concentrées. La solution visqueuse d'HPMC-Si (pH=12,8) se transforme en un hydrogel élastique en abaissant le pH par addition d'un tampon acide. Des travaux antérieurs ont montré que la cinétique de réticulation de l'HPMC-Si ainsi que ses propriétés élastiques finales étaient dépendantes du pH final et de la température. Effectivement, ces deux paramètres jouent un rôle important dans la condensation des groupes silanol et donc dans la formation du réseau tridimensionnel. La présente étude sur le processus de gélification a démontré que la cinétique de réticulation ainsi que les propriétés viscoélastiques dépendent aussi de la concentration finale en HPMC-Si. Une méthode basée sur des concepts empruntés à la théorie de la percolation a été appliquée pour déterminer le point de gel de l'HPMC-Si et pour étudier la corrélation entre la fréquence d'oscillation et les modules de conservation (G') et de perte (G''). Les résultats ont montré que les modules G' et G'' présentent au point de gel une loi de puissance avec un exposant (0,68) qui s'étend sur toute la gamme de la fréquence. La méthode employée est la seule méthode qui permet d'évaluer le temps nécessaire pour que la solution visqueuse d'HPMC-Si se transforme en un hydrogel élastique. Dans notre cas, ce temps était d'environ 23min pour un pH final de 7,4.

ARTICLE 1

**The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering
matrices**

A. Fatimi, J. F. Tassin, S. Quillard, M. A. V. Axelos, P. Weiss

Biomaterials 2008;29(5):533-543

3. Analyse viscosimétrique et étude de la gélification d'une solution d'HPMC-Si

Résumé :

Dans ce papier, nous avons étudié les propriétés rhéologiques de l'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si). La propriété générale de cet éther de cellulose modifié est de réticuler suite à la condensation des groupes silanol après un abaissement de pH. Dans l'ordre, nous avons décrit et comparé le comportement de différentes solutions d'HPMC-Si dans le domaine dilué et concentré avant et après stérilisation. Au cours des processus de gélification de l'HPMC-Si les paramètres de condensation des groupes silanol, le pH et la température, ont été également étudiés. En solution diluée, les résultats de la viscosité intrinsèque de différentes solutions d'HPMC-Si ont montré que la stérilisation ne réduit apparemment que très faiblement le volume spécifique des chaînes macromoléculaires. Dans le domaine concentré, les résultats ont montré que le pH n'affecte pas de manière significative le comportement rhéologique des solutions non stériles. Par contre, après stérilisation, la viscosité limite des solutions diminue d'environ 30% lorsque le pH augmente. Cette chute de viscosité limite est due à la formation d'associations intra et intermoléculaires lors de la séparation de phase produite pendant la stérilisation. La formation de différents hydrogels à partir des solutions basiques d'HPMC-Si a été étudiée. La cinétique de réticulation de l'HPMC-Si dépend du pH final et de la température. Le temps de gel diminue lorsque le pH augmente. Le même résultat a été obtenu en fonction de la température.

ARTICLE 2

**Gelation studies of a silated hydroxypropylmethylcellulose solution: influence of pH and
sterilization**

A. Fatimi, J. F. Tassin, R. Turczyn, M. A. V. Axelos, P. Weiss

Biomacromolecules (soumis)

4. Discussion

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la compréhension du comportement rhéologique de l'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si).

Nous avons étudié l'influence de la silanisation sur le comportement de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) en comparant le matériau à l'état de poudre, de solutions diluées et concentrées, avant et après silanisation. Aussi avons nous étudié le comportement de l'HPMC-Si en fonction du pH de dissolution dans le domaine dilué et concentré avant et après stérilisation à la vapeur d'eau. Concernant la formation des hydrogels à partir des solutions visqueuses d'HPMC-Si, nous avons étudié la cinétique de réticulation en fonction de différents paramètres (concentration, pH et température).

Les analyses des poudres de l'HPMC et l'HPMC-Si par FT-IR n'ont pas montré de différence significative. Ces résultats montrent que la silanisation de l'HPMC n'affecte pas la structure chimique du polymère. Au niveau des spectres FT-IR nous avons observé les bandes caractérisant l'HPMC [49, 153]. Des études similaires ont montré que la silanisation du chitosan induit de nouvelles absorptions [154, 155]. Dans notre cas aucune de ces bandes n'a été observée dans le spectre de l'HPMC-Si. Ceci pourrait être dû au fait que l'HPMC possède des absorptions très fortes dans cette gamme de fréquence et aussi au faible taux de silane (0,59% en masse) présent dans le polymère. Les résultats obtenus par FT-IR ont été confirmés par FT-Raman. Le greffage du silane n'a pas été détecté par cette méthode [153, 156].

Dans le domaine dilué, la valeur de la viscosité intrinsèque ($[\eta]$) de l'HPMC (674 ml.g^{-1}) est élevée par rapport à celle de l'HPMC-Si (587 ml.g^{-1}). Cette différence montre que les chaînes macromoléculaires de l'HPMC occupent un volume hydrodynamique plus grand que celui des chaînes macromoléculaires de l'HPMC-Si et donc que les chaînes de l'HPMC-Si sont plus compactes. Ce changement de volume hydrodynamique peut être dû à la modification de la conformation macromoléculaire due aux interactions spécifiques ou à une diminution de la masse molaire résultant d'une éventuelle dégradation durant la silanisation. En se basant sur les mesures de la viscosité 'spécifique réduite' et la viscosité 'inhérente' en fonction de la concentration [142, 143], la constante de Huggins k_h (0,53 et 0,26) et la constante de Kraemer k_k (0,10 et 0,17) ont été calculées pour l'HPMC et l'HPMC-Si, respectivement. La somme de ces deux constantes pour un système polymère-solvant-température donné, devrait être égale à 0,5 ($\pm 10\%$). Une valeur plus faible ou plus élevée que cette somme est attribuée à une association moléculaire [157]. Les valeurs trouvées dans cette étude ne sont pas loin de cette gamme, ce qui signifie la présence d'une association moléculaire légère [157].

Pour les solutions concentrées, la viscosité limite (η_0) a été obtenue à partir des courbes d'écoulement à bas taux de cisaillement. On a observé une dépendance de la viscosité limite en fonction de la concentration du polymère, caractérisée par une loi de puissance avec un exposant de 4,20 et 4,41 pour l'HPMC et l'HPMC-Si, respectivement. De telles valeurs de l'exposant ont déjà été obtenues pour des solutions enchevêtrées telles que les solutions de chitosan [158]. Le temps de relaxation (λ) des solutions concentrées a été obtenu par le modèle de Cross [150]. Le temps de relaxation dépend de la concentration avec un exposant de 3,91 et 3,72 pour l'HPMC et l'HPMC-Si, respectivement. Les valeurs des exposants obtenues dans cette étude sont plus élevées que celles obtenues pour les solutions macromoléculaires enchevêtrées telle que la solution de chitosan ($\lambda \sim c^{3.1}$) [158]. La valeur de l'exposant n du modèle de Cross obtenue à partir des courbes maîtresses d'écoulement de l'HPMC et de l'HPMC-Si était de l'ordre de 0,78 et 0,81, respectivement. Ces valeurs sont caractéristiques des polysaccharides qui adoptent des conformations semi-flexibles [159, 160].

La comparaison de solutions diluées et concentrées montre une baisse de la viscosité intrinsèque et une légère augmentation de la viscosité limite après la silanisation. Les interactions spécifiques entre les groupements silane greffés sont probablement la cause de cette différence.

Concernant les propriétés viscoélastiques des solutions concentrées de l'HPMC avant et après silanisation, nous avons étudié le module de conservation (G') et le module de perte (G'') en fonction de la fréquence d'oscillation (ω) dans le domaine linéaire. Le comportement viscoélastique des solutions d'HPMC et d'HPMC-Si est celui d'une solution macromoléculaire [161, 162]. A basse fréquence ($\omega < 10 \text{ rad.s}^{-1}$) les modules G' et G'' présentent une pente de 2 et 1, respectivement ($G' \propto \omega^2$ et $G'' \propto \omega^1$) [161, 162]. Ensuite, nous avons choisi de présenter les courbes maîtresses obtenues à partir de la gamme de fréquences d'oscillation et les modules de conservation et de perte. La concentration des polymères à 3% en masse a été choisie comme concentration de référence. L'existence d'une courbe maîtresse montre que le comportement de G' et G'' est identique pour toute la gamme de concentration et que l'HPMC et l'HPMC-Si se comportent comme les polymères enchevêtrés [161].

L'effet de la stérilisation sur le comportement des solutions diluées à différents pH a été obtenu. Les solutions stériles d'HPMC-Si ont montré une viscosité intrinsèque ($[\eta]$) légèrement plus faible par rapport aux solutions non stériles. Cette différence montre que les chaînes macromoléculaires d'HPMC-Si sont devenues apparemment plus compactes après la stérilisation à la vapeur. Une diminution de la masse molaire des chaînes durant la stérilisation semble produite. L'effet de la concentration de NaOH sur le volume hydrodynamique des chaînes était négligeable.

Les courbes d'écoulement des solutions visqueuses ont été obtenues à 25°C en fonction de la concentration de l'HPMC-Si, le pH et la stérilisation. Dans tout les cas nous avons obtenu un comportement rhéofluidifiant avec un plateau newtonien à bas taux de cisaillement. L'effet de la concentration a été obtenu. Les viscosités limites (η_0) augmentent en fonction de la concentration de l'HPMC-Si (2 et 3%). Le même effet a été noté pour le temps de relaxation (λ). Après stérilisation le pH (*i.e.* concentration de NaOH) influence le comportement rhéologique des solutions d'HPMC-Si. A une concentration fixe d'HPMC-Si la viscosité limite et le temps de relaxation diminuent quand le pH augmente. Ces diminutions indiquent que les interactions moléculaires spécifiques mènent à une certaine association entre les chaînes macromoléculaires à pH élevé [163].

Le phénomène de séparation de phase de l'HPMC-Si pendant la stérilisation à la vapeur doit également être pris en considération et pourrait être considéré comme responsable des associations intra ou intermoléculaires. En effet, au cours du processus de stérilisation, une séparation de phase de la solution d'HPMC se produit. Les résultats ont montré que la courbe de point de trouble présente une forme concave indiquant que les solutions d'HPMC présentent une séparation de phase du type LCST (température critique inférieure de solubilité). Au dessous de la courbe de trouble le système est une solution monophasique transparente, alors qu'au dessus le système est turbide [13, 14]. Le minimum correspond au point critique (T_c et C_c) où T_c est la température critique (50,3°C) et C_c la concentration critique en HPMC (3~3,5%).

La relation de Cox-Merz [164] est une correspondance qui existe entre la viscosité complexe (η^*) et la viscosité apparente (η), quand le taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) et la fréquence (ω) sont comparés respectivement a pu être valider sur l'HPMC-Si [165].

La réticulation de l'hydrogel d'HPMC-Si a été étudiée. Comme nous l'avons vu auparavant, la dissolution de la poudre d'HPMC-Si dans une solution basique permet la transformation des fonctions silanes en fonctions silanolates. A pH physiologique les silanols se forment après la protonation des silanolates et la polycondensation de ces derniers aboutit à la création d'un réseau tridimensionnel. La réticulation s'accompagne d'une évolution de la viscosité et de l'élasticité au cours du temps. Le point de gel apparaît au niveau de la conversion du système évolutif au gel. Les mesures rhéologiques dynamiques permettent de décrire de manière fine l'évolution du système passant de l'état liquide à l'état solide (transition sol-gel).

Dans ce contexte, nous avons choisi une concentration d'HPMC-Si de 3% en masse. Le processus de gélification de l'HPMC-Si dans le domaine linéaire a été déterminé en fonction du temps. Le comportement de l'hydrogel d'HPMC-Si reflète une transition sol-gel classique [166]. En se basant sur les principes de la théorie de percolation [166] on a déterminé le point

de gel (t_{gel}) qui correspond au temps nécessaire pour que la solution visqueuses d'HPMC-Si se transforme en gel élastique. Ce point de gel est obtenu lorsque les deux modules G' et G'' présentent la même dépendance en loi de puissance avec la fréquence ($G' \propto G'' \propto \omega^{\Delta}$) [167]. Il est définie ici par le temps de gel, temps pour lequel les courbes de $\tan(\delta)$ à différentes fréquence se croisent conformément à la méthode de Winter et Chambon [168, 169]. La mesure de $\tan(\delta)$ au point de gel confirme la validité de cette théorie par la détermination de l'exposant Δ , avec $G''/G' = \tan(\delta) = \tan(\Delta\pi/2)$ [170]. Pour l'HPMC-Si (concentration finale de 2%, à pH physiologique et à température ambiante) l'exposant Δ de la loi de puissance correspondait à 0,68, qui est très proche de la valeur théorique (0,71) [166, 167].

La concentration finale de l'HPMC-Si joue un rôle très important dans la cinétique de réticulation ainsi que les propriétés viscoélastiques de l'hydrogel formé. A pH physiologique nous avons préparé l'hydrogel d'HPMC-Si à deux concentrations différentes (1,5 et 2%). L'effet de la dilution sur la cinétique de réticulation ainsi que les propriétés viscoélastiques a été observé. Le point de gel obtenu pour l'HPMC-Si à 2% était de 23min par contre l'HPMC-Si à 1,5% présentait un point de gel de 32min. Les valeurs de G' et G'' de l'HPMC-Si à 1,5% étaient inférieures à celles obtenues pour l'HPMC-Si à 2%. La dilution de l'HPMC-Si a un effet important dans la détermination des propriétés de réticulation. Ce paramètre peut être utilisé pour contrôler la cinétique de réticulation et les propriétés viscoélastiques de l'hydrogel formé.

La réticulation de l'HPMC-Si a été étudiée en fonction du pH final. Chaque fois un tampon acide (à pH variable) a été ajouté à la solution visqueuse d'HPMC-Si (pH=12,8) à concentration constante (2%). Le point de gel de l'HPMC-Si a été déterminé en fonction du pH final après neutralisation. Les résultats ont montré que le point de gel diminue en fonction du pH selon une loi puissance. L'augmentation du pH accélère le processus de gélification de l'HPMC-Si. Cette accélération est attribué à un effet cinétique de la condensation de silanol [171, 172].

L'influence de la température sur la réticulation de l'HPMC-Si a été aussi étudiée. Les résultats ont montré qu'à pH physiologique et à concentration constante (2%) le point de gel diminue selon une loi d'Arrhenius [173]. Une catalyse de la condensation des silanols peut expliquer cette cinétique de réticulation [51]. La formation d'un gel physique à haute température qui accompagne la condensation du silanol peut aussi expliquer cette diminution du point de gel [132].

Grâce à ces mesures rhéologiques, nous avons pu vérifier quels étaient les paramètres (concentration, pH et température) capables de modifier la cinétique de la réticulation ainsi que les propriétés viscoélastiques de l'HPMC-Si. Le contrôle de ces paramètres permettra de proposer des hydrogels d'HPMC-Si présentant des propriétés viscoélastiques différentes et

adaptables en fonction de l'application souhaitée. Le point de gel est un paramètre crucial dans les applications biomédicales surtout en ingénierie tissulaire du cartilage. C'est le temps maximal pour manipuler et mélanger l'hydrogel avec les chondrocytes et pouvoir les injecter [89]. Le point de gel de notre hydrogel (concentration finale de 2%, à pH physiologique et à température ambiante) coïncide parfaitement avec ce que les biologistes cherchent pour une matrice extracellulaire synthétique capable de soutenir le développement des chondrocytes, leur différenciation et le maintien de leur phénotype [90].

***CHAPITRE 3 : LES SUSPENSIONS
PHOSPHOCALCIQUES INJECTABLES***

Article 3 : A. Fatimi, J. F. Tassin, M. A. V. Axelos, P. Weiss. The stability mechanisms of an injectable calcium phosphate ceramic suspension. *Acta Biomaterialia* (soumis).

Article 4 : A. Fatimi, J. F. Tassin, J. Bosco, R. Deterre, M. A. V. Axelos, P. Weiss. Rheological characterisation and injectability modelling of an injectable calcium phosphate ceramic suspension. *Biomaterials* (soumis).

1. Problématique

Nous avons vu dans le premier chapitre que les approches thérapeutiques nécessaires à la reconstruction des tissus osseux en chirurgie orthopédique et dentaire sont basées sur l'utilisation des céramiques phosphocalciques. Les suspensions phosphocalciques injectables composées de particules de phosphate de calcium biphasées (BCP) et d'une solution d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) commerciale (Methocel[®] E4M) rentrent parfaitement dans la catégorie des biomatériaux développés pour cet effet. Le composé obtenu est un substitut osseux injectable (IBS) dont l'injectabilité et la rhéologie peuvent être adaptées en changeant la granulométrie et/ou le taux de charge de la phase minérale et/ou la concentration en polymère. De telles céramiques injectables sont 'prêtes à l'emploi'.

Dans l'objectif de comprendre le comportement de ces suspensions granulaires, nous avons cherché à savoir si les suspensions de céramique phosphocalcique injectables (ICPCS) pouvaient être considérées comme des biomatériaux 'prêts à l'emploi'. Dans cet optique et toujours dans l'objectif d'utiliser des outils rhéologiques, nous avons choisi d'étudier d'abord le comportement rhéologique du fluide suspendant en fonction de la concentration. Le polymère utilisé dans cette étude était l'HPMC. Le second objectif de cette étude fut de déterminer le mécanisme responsable de la stabilité de différentes ICPCS. Un examen de la sédimentation des particules phosphocalciques dans l'HPMC a été réalisé en fonction de la concentration du fluide suspendant, de la taille des particules ainsi que la stérilisation (article 3).

Un biomatériau phosphocalcique consistant et injectable ne peut être obtenu qu'après une bonne connaissance de ses propriétés rhéologiques. Dans ce contexte nous avons réalisé une étude visant à comprendre le lien entre la rhéologie et l'injectabilité de ce type de biomatériaux phosphocalciques. L'objectif de cette seconde partie de ce chapitre a été donc de caractériser le comportement rhéologique et de modéliser l'injectabilité de l'ICPCS via une seringue. A l'aide d'un rhéomètre rotatif et d'un analyseur de texture, la caractérisation rhéologique et l'étude de l'injectabilité de l'ICPCS ont été réalisées sous 30 conditions opératoires (article 4).

2. Mécanisme de stabilité d'une suspension de céramique de phosphate de calcium

Résumé :

Les céramiques phosphocalciques sont largement utilisées comme substituts osseux dans les applications dentaire et orthopédique. Une suspension de céramique phosphocalcique injectable (ICPCS) a été développée pour la chirurgie mini-invasive. Ce biomatériau injectable est composé d'une solution de biopolymère (hydroxypropylméthylcellulose HPMC) comme matrice organique et de céramiques bioactives (phosphate de calcium biphasé BCP) comme charges minérales. La stabilité de cette suspension est indispensable pour cette génération de biomatériaux injectables dite 'prêt à l'emploi', mais malheureusement au cours du stockage, les particules de BCP sédimentent dans le fluide suspensant. Cette étude est consacrée à la compréhension de l'effet de la formulation sur la stabilité de différentes suspensions avant et après stérilisation. La caractérisation rhéologique de l'HPMC a confirmé le comportement d'une solution macromoléculaire. La cinétique de sédimentation a montré l'influence de la taille des particules phosphocalciques et la concentration du fluide suspensant sur la vitesse de sédimentation et sur la compacité des sédiments avant et après stérilisation. La vitesse de sédimentation diminue lorsque la viscosité du milieu augmente, ou le diamètre des particules diminue. Les particules de plus gros diamètre sédimentent plus rapidement que les particules de petit diamètre. Les images de microscopie électronique à balayage des sédiments non stériles et stériles ont montré l'adsorption d'une partie de l'HPMC dans le sédiment sur la surface de BCP.

ARTICLE 3

The stability mechanisms of an injectable calcium phosphate ceramic suspension.

A. Fatimi, J. F. Tassin, M. A. V. Axelos, P. Weiss

Acta Biomaterialia (soumis)

3. Caractérisation rhéologique et modélisation de l'injection d'une suspension de céramique phosphocalcique injectable

Résumé :

La suspension de céramique phosphocalcique injectable (ICPCS) est utilisée dans le domaine de la chirurgie orthopédique et dentaire comme substitut osseux injectable. Ce biomatériau injectable est constitué de granules de phosphate de calcium biphasés (BCP) et une solution d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). Dans cette étude nous nous intéressons à la rhéologie et à l'injectabilité de cette suspension. La solution d'HPMC à 3% (dans l'eau) présente un comportement newtonien à faible taux de cisaillement suivi par un comportement rhéofluidifiant et les courbes d'écoulement ont été modélisées par l'équation de Cross. Les propriétés rhéologiques de différentes suspensions (taux de charge de BCP = 35, 40, 45 et 50%) ont été étudiées en géométrie de plans parallèles. Les résultats montrent que les suspensions présentent une viscosité élevée par rapport à la solution d'HPMC. A fort taux de cisaillement, les courbes d'écoulement ont été modélisées par une loi de puissance (modèle d'Ostwald-de Waele). De plus, les résultats montrent que les paramètres de ce modèle dépendent de la composition de la suspension. La simulation d'injection a été réalisée grâce à une seringue munie d'une aiguille. La pression d'injection de quatre formulations a été déterminée, par la mesure de la force s'exerçant sur le piston, en fonction de différentes conditions (longueur du capillaire et débit volumique). Une approche théorique basée sur l'écoulement capillaire d'un fluide non-newtonien a été utilisée pour prédire la pression d'injection à partir des courbes d'écoulement et des conditions d'extrusion. Deux fluides modèles (fluide newtonien et solution d'HPMC) ont été utilisés. L'estimation théorique de la pression d'extrusion montre un accord quantitatif avec ces deux fluides modèles, tandis qu'un glissement à la paroi pour les suspensions a été mis en évidence, en raison d'une pression d'injection moins élevée que celle prévue par le modèle. L'influence du glissement à la paroi conduit toutefois à un facteur de proportionnalité constant entre la théorie et l'expérience.

ARTICLE 4

**Rheological characterisation and injectability modelling of an injectable calcium
phosphate ceramic suspension**

A. Fatimi, J. F. Tassin, J. Bosco, R. Deterre, M. A. V. Axelos, P. Weiss

Biomaterials (soumis)

4. Discussion

Dans l'objectif de comprendre le comportement de ces suspensions granulaires, nous avons cherché à savoir si les suspensions de céramique phosphocalcique injectables (ICPCS) pouvaient être considérées comme des biomatériaux injectables prêts à l'emploi. Pour cela nous nous sommes particulièrement intéressés au phénomène de sédimentation et à leur injectabilité.

Dans la première partie de ce chapitre nous avons réalisé une étude sur la stabilité des suspensions phosphocalciques. L'utilisation finale du matériau nécessitant une étape de stérilisation, nous avons d'abord étudié le comportement rhéologique du fluide suspendant avant et après stérilisation. Nous avons fait implicitement l'hypothèse que les changements du fluide suspendant dans cette étape sont équivalents que les particules soient présentes ou non. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la sédimentation des particules phosphocalciques en fonction de la taille des particules, de la concentration en polymère et de la stérilisation. Dans cette étude la fraction volumique des particules était de 17,4% (équivalent à un taux de charge massique de 40%).

Les propriétés d'écoulement de la solution d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) qui constitue le fluide suspendant sont typiques de celles des solutions macromoléculaires. Les solutions d'HPMC ont montré un plateau newtonien à faible taux de cisaillement. La longueur de ce plateau diminue au fur et à mesure que la concentration en polymère augmente. La viscosité limite obtenue à bas taux de cisaillement augmente avec la concentration en polymère. Ces résultats confirment ceux obtenus dans les articles 1 et 2. La sensibilité des mesures rhéologiques nous a permis de mettre en évidence la différence entre les solutions d'HPMC stériles et non stériles. Une diminution de la viscosité limite (η_0) et du temps de relaxation (λ) a été observée. Les mesures dynamiques ont également montré une différence entre les échantillons stériles et non stériles. Au cours du processus de stérilisation à la vapeur les solutions d'HPMC subissent une gélification physique et une séparation de phase [130, 174]. Cette séparation de phase pendant la stérilisation de l'HPMC a déjà été étudiée dans l'article 2 et la diminution de la viscosité limite des solutions pourrait être expliquée par une formation irréversible d'agrégats [163].

L'évaluation de la stabilité des ICPCS constitue une étape importante de cette génération de biomatériau injectable. Les résultats de l'article 3 montrent que la sédimentation des particules phosphocalciques est d'abord un phénomène physique lié à la gravité.

Nous avons montré que les particules de grande taille (80-200 μ m) sédimentent plus vite que les petites particules (40-80 μ m). La concentration de l'HPMC a aussi un effet remarquable sur la cinétique de sédimentation. La vitesse de sédimentation diminue au fur et à mesure que la

viscosité du fluide suspendant augmente. Ces résultats sont en accord qualitatif avec la loi de Stokes [175]. La comparaison de la vitesse expérimentale (U) à la vitesse théorique (U_s) a montré que les valeurs expérimentales sont systématiquement inférieures à la vitesse théorique [175-177].

A une fraction volumique (ϕ) de l'ordre de 17.4%, la suspension phosphocalcique est clairement située dans le domaine semi-dilué ou concentré. Dans ce régime, des interactions hydrodynamiques collectives doivent être prises en considération. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur une approche empirique [178-180] pour corrélérer les résultats expérimentaux et les prévisions de cette approche [175, 181, 182].

Alors que le rapport des vitesses de sédimentation (U/U_s) devrait être de l'ordre de 0.4, nos résultats expérimentaux ont montré des rapports de vitesse nettement plus faibles. Cet effet pourrait être attribué à la présence d'une solution enchevêtrée de polymère comme fluide suspendant et aux interactions entre particules d'une part et entre particules et chaînes de polymère d'autre part. En effet, nous avons montré que la taille des particules est très supérieure à la maille (ζ) de la solution de polymère (40nm). La sédimentation d'une particule nécessite donc de se frayer un chemin au travers de la solution enchevêtrée, impliquant des mouvements très collectifs des chaînes macromoléculaires que les interactions polymères-particules, en particulier les phénomènes d'adsorption peuvent rendre difficiles, ou pour le moins ralentis.

Afin d'examiner l'effet de la stérilisation à la vapeur sur la stabilité des suspensions phosphocalciques nous avons comparé les cinétiques de sédimentation des échantillons stériles et non stériles. On a constaté que la stérilisation affecte légèrement le comportement de sédimentation des suspensions. L'influence de la taille des particules et de la concentration en polymère reste en accord qualitatif avec la loi de Stokes, comme déjà observé pour les solutions non stériles.

En ce qui concerne les sédiments, on a montré que le volume de sédiment augmente quand la concentration en polymère augmente. Ceci peut être expliqué par le fait que des chaînes de polymère, pour ne pas dire une partie du réseau macromoléculaire sont entraînées dans le sédiment. Ceci conduit à une distance augmentée entre les particules et par conséquent un volume plus élevé de sédiment. La diminution de la taille de sédiment, quand la taille des particules augmente, peut être expliquée par une force gravitationnelle de consolidation plus élevée avec de plus grandes particules.

La morphologie des sédiments (stériles et non stériles) observée par microscopie électronique à balayage a montré la structure d'un composé macroporeux avec des espaces vides. Les particules de BCP les plus petites semblent incorporées dans un film de polymère. Ces résultats

confirment les observations précédemment faites sur des suspensions de phosphate de calcium [183].

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la compréhension du lien entre la rhéologie et l'injectabilité de la suspension phosphocalcique en cherchant à nous rapprocher des conditions d'utilisation. Dans ce but, nous avons étudié le comportement rhéologique des ICPCS en fonction du taux de charge des particules phosphocalciques avec une concentration en polymère constante (3%). Aussi, nous avons étudié leur injectabilité en fonction de la longueur de l'aiguille, du taux de charge et de la vitesse d'extrusion. Dans un deuxième temps, nous avons modélisé l'injection de ces suspensions phosphocalciques via une seringue équipée d'une aiguille.

Les résultats rhéologiques ont montré que la suspension à 50% de taux de charge présente un comportement thixotrope. En général, ce comportement classique est confirmé pour les suspensions concentrées dont fait partie les biomatériaux phosphocalciques injectables [184]. Avant d'établir les courbes d'écoulement de différentes suspensions, un précisaillement de 100s^{-1} pendant 100s a été appliqué pour atteindre plus rapidement un état d'équilibre sous l'écoulement. Cette procédure a montré des résultats reproductibles. Les suspensions à différents taux de charges ont montré un comportement rhéofluidifiant [185]. Par rapport au fluide suspendant (HPMC à 3%) les suspensions ont montré une viscosité plus élevée. A faible taux de charge les suspensions ont montré un pseudo-plateau newtonien à faible taux de cisaillement. La longueur de ce pseudo-plateau diminue au fur et à mesure que le taux de charge augmente.

Afin de se rapprocher des conditions d'injection, une approche particulière a été portée aux données à haut gradient (correspondent aux vitesses apparentes calculées à partir des conditions opératoires d'extrusion) dans cette gamme très limitée de taux de cisaillement, dont le comportement est bien représenté par le modèle d'Oswald-de Waele (loi de puissance) [148, 149]. Ce modèle qui est déjà utilisé pour modéliser l'écoulement des suspensions phosphocalciques nous a permis de déduire le facteur de consistance K ainsi que l'indice d'écoulement n [185]. Ces deux paramètres ont montré une forte dépendance en fonction du taux de charge. Le facteur K augmente alors que l'indice n diminue avec le taux de charge de BCP. L'augmentation de la consistance est attribuée aux fortes interactions particule-particule générées par le nombre important de particules présentes dans la suspension. La diminution de la lubrification favorise la résistance des particules ce qui mène à un indice d'écoulement faible [186]. L'addition d'un polymère dans une suspension granulaire (faible taux de charge) peut parfois mener à une diminution de la viscosité de la pâte suite à l'augmentation de la

lubrification. La présence d'un polymère entre les grains réduit le coefficient de frottement entre les particules, et par conséquent améliore l'injectabilité de la suspension [187]. Ce comportement n'est pas observé dans nos expériences à cause d'une concentration en particules insuffisante.

L'injection de ces suspensions phosphocalciques via une seringue équipée d'une aiguille a été étudiée. Différentes courbes d'extrusion (force d'extrusion en fonction du déplacement du piston) ont été obtenues. Ces courbes étaient caractérisées par une forte augmentation de la force d'extrusion suivie d'un plateau [187]. L'obtention d'un plateau constant durant l'extrusion confirme l'absence d'une séparation de phase au niveau de la seringue [123, 187]. La force d'injection a montré une forte dépendance à la longueur de l'aiguille, à la vitesse d'extrusion ainsi qu'au taux de charge. La force d'injection est proportionnelle à la longueur d'aiguille de telle manière que les effets d'entrée peuvent être négligés, ou en d'autres termes, le gradient de pression à l'intérieur du capillaire est indépendant de la longueur de l'aiguille [188]. L'augmentation de la force d'injection en fonction du taux de charge est due à l'augmentation de la viscosité de la suspension. L'influence de la vitesse d'extrusion montre que la force d'injection augmente avec le débit (contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement).

Ce concept d'injectabilité a été utilisé pour modéliser l'injection de l'ICPCS via une seringue équipée d'une aiguille. Pour cela nous avons utilisé deux fluides modèles pour prédire la pression d'injection à partir de leur comportement rhéologique. Nous avons utilisé une huile de vaseline (viscosité de 30Pa.s) comme fluide newtonien et une solution d'HPMC (concentration de 6% en masse) comme fluide non-newtonien. L'injection de l'huile de vaseline et de la solution d'HPMC à différentes vitesses d'extrusion a donné des résultats reproductibles. La pression d'extrusion augmente linéairement avec le débit volumique et correspond exactement à la pression calculée à partir de la mesure viscosimétrique. L'accord entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques obtenues à partir des mesures rhéologiques a permis de valider le système d'injection et de modéliser ensuite l'injectabilité de l'ICPCS.

La pression nécessaire pour injecter l'ICPCS a été mesurée à partir de la force. La pression d'injection théorique a été calculée à partir des paramètres rhéologiques des suspensions (facteur de consistance et indice d'écoulement) et des paramètres expérimentaux de l'extrusion (rayon de seringue, rayon et longueur d'aiguille et vitesse d'injection). La comparaison de la pression expérimentale (injectabilité) et la pression théorique (rhéologie) a montré que les valeurs expérimentales et théoriques de la pression d'injection suivent la même tendance. Par contre il n'y a pas une bonne concordance comme celle observée avec les fluides modèles. La

pression expérimentale est systématiquement inférieure que la pression théorique avec un facteur de décalage de 2.

Le comportement rhéologique des suspensions a été modélisé par une loi de puissance sur une gamme limitée de taux de cisaillement. Cependant, les dérivations utilisées pour calculer la pression d'injection théorique impliquent que le comportement de loi de puissance doit être appliqué sur toute la gamme du taux de cisaillement au niveau du capillaire (Annexe 1). Et puisque la loi de puissance n'a été utilisée qu'à fort taux de cisaillement, l'approximation du modèle a mené à une surestimation de la pression d'injection théorique. Le modèle d'injection proposé auparavant suppose que le glissement à la paroi du capillaire est négligeable. Or, dans certaines conditions d'écoulement ou pour certains produits, cette hypothèse peut être prise en défaut ce qui conduit à des erreurs importantes dans l'interprétation des données. Cette hypothèse considère que la vitesse du fluide à la paroi est nulle. Dans le cas des suspensions concentrées on sait que les particules près de la paroi montrent une concentration plus faible que la concentration moyenne (zone de déplétion). Ce phénomène pourrait également se produire naturellement dans le rhéomètre employé pour déterminer le comportement d'écoulement. C'est pour ça que nos expériences rhéologiques sur les suspensions phosphocalciques sont effectuées sur une géométrie 'plans parallèles' de surfaces rugueuses afin d'éviter le glissement de la suspension à la paroi. Pour mettre en évidence le glissement à la paroi de l'aiguille, il existe deux grandes catégories de méthodes (Annexe 2). La première méthode consiste à utiliser des aiguilles de géométrie identique mais d'états de surface différents [189]. La deuxième méthode consiste à utiliser des aiguilles de diamètres différents [190].

En conclusion, nous avons étudié une suspension phosphocalcique injectable de point de vue stabilité et injectabilité, en nous appuyant sur des mesures rhéologiques. Les propriétés de cette suspension peuvent être adaptées en fonction de l'application médicale. La taille des particules de BCP, la concentration en HPMC et le taux de charge massique de BCP constituent des paramètres clés de ce biomatériau injectable.

CONCLUSION GÉNÉRALE - PERSPECTIVES

Les biomatériaux injectables constituent un domaine particulier d'utilisation par voie percutanée des biomatériaux. Au cours des trois dernières décennies, le développement des biomatériaux injectables est devenu un des domaines de recherche les plus effervescents, impliquant une interrelation de haut niveau entre plusieurs disciplines scientifiques telles que la chimie, le génie des matériaux, l'ingénierie tissulaire, le génie des procédés et la médecine. De nos jours, l'exploration au niveau moléculaire, des interactions entre les cellules vivantes et le biomatériau injectable, représente un des principaux défis dans le développement des biomatériaux caractérisés par une meilleure biocompatibilité à long terme et une performance *in vivo* accrue. Le comportement de ces biomatériaux, leur injectabilité et leurs propriétés rhéologiques, lors de leur mise en œuvre, sont considérées comme une caractéristique fondamentale. Une meilleure compréhension de ces comportements va permettre le contrôle des propriétés à l'échelle microscopique et macroscopique. En effet, la recherche dans ce domaine tend vers la mise en place et le développement de nouveaux biomatériaux injectables pour répondre à des applications biomédicales très spécifiques.

Dans ce contexte, deux biomatériaux injectables ont été développés au sein de notre unité de recherche (INSERM U791). Ces deux biomatériaux sont utilisés en ingénierie ostéoarticulaire et dentaire comme matrice extracellulaire synthétique (HPMC-Si) et comme suspension phosphocalcique injectable (ICPCS), respectivement. Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à la caractérisation rhéologique de ces deux biomatériaux injectables. Ainsi, au cours des différentes expériences, nous avons étudié :

- Le comportement rhéologique de l'hydroxypropylméthylcellulose silanisée.
- La stabilité, la rhéologie et l'injectabilité des suspensions phosphocalciques injectables.

Dans la première partie, nous avons étudié l'influence de la silanisation sur le comportement de l'HPMC en comparant la poudre, les solutions diluées et concentrées avant et après silanisation. Nous avons montré que la silanisation de l'HPMC n'affecte pas la structure chimique du polymère. Sur le plan rhéologique nous avons montré que la présence des groupements silane réduit le volume hydrodynamique des solutions diluées, mais n'affecte pas de manière significative le comportement rhéologique des solutions concentrées. L'effet du pH et de la stérilisation sur le comportement de l'HPMC-Si a été également étudié. En solution diluée, les résultats de la viscosité intrinsèque de différentes solutions d'HPMC-Si ont montré que la stérilisation réduit légèrement le volume hydrodynamique des chaînes macromoléculaires. Dans

le domaine concentré, nous avons montré que l'augmentation du pH réduit la viscosité limite des solutions stériles, mais n'affecte pas de manière significative le comportement rhéologique des solutions non stériles. Aussi avons nous étudié la formation des hydrogels à partir des solutions visqueuses d'HPMC-Si. Nous avons montré la dépendance de la cinétique de réticulation aux différents paramètres (concentration, pH et température).

Dans la deuxième partie, nous avons étudié la stabilité, la rhéologie et l'injectabilité des suspensions phosphocalciques injectables. Nous avons montré l'influence de la formulation sur la stabilité de différentes suspensions avant et après stérilisation. Les résultats ont montré que la vitesse de sédimentation des particules phosphocalciques diminue lorsque la viscosité du fluide suspensif (HPMC) augmente, ou le diamètre des particules diminue. Ensuite nous avons réalisé une étude visant à comprendre le lien entre la rhéologie et l'injectabilité de ce type de biomatériaux phosphocalciques. Nous avons montré que les suspensions présentent une viscosité élevée par rapport à la solution d'HPMC. De plus, les propriétés rhéologiques de la suspension dépendent de la composition. La simulation d'injection a été réalisée grâce à une seringue munie d'une aiguille. Une approche théorique basée sur l'écoulement capillaire d'un fluide non-newtonien a été utilisée pour prédire la pression d'injection à partir des courbes d'écoulement et des conditions d'extrusion. Les deux fluides (fluide newtonien et solution d'HPMC) utilisés comme modèles ont montré un accord quantitatif entre les valeurs expérimentales et théoriques de la pression d'extrusion. L'injection des suspensions phosphocalciques a permis d'établir l'existence d'un glissement à la paroi suite à la différence entre la pression d'injection obtenue expérimentalement et celle prévue par le modèle. L'influence du glissement à la paroi a conduit à un facteur de proportionnalité constant entre la théorie et l'expérience.

En conclusion, ce travail nous a permis de caractériser le comportement rhéologique de deux biomatériaux injectables différents (hydrogel et suspension). Ces biomatériaux, de par la diversité de leur structure et leur comportement, sont considérés comme des fluides complexes.

Ce travail de thèse représente une petite partie du programme régional BIOREGOS (Biomatériaux et Régénération OstéoArticulaire) de la région Pays de la Loire. C'est un programme de recherche pluridisciplinaire large qui a pour objectif d'associer les biomatériaux à des cellules vivantes. Cela permettra de réaliser des autogreffes hybrides afin de résoudre des cas cliniques complexes jusqu'ici insolubles. Le deuxième objectif de ce programme est de chercher à prévenir les fractures locales lors d'ostéoporose par l'injection de biomatériaux chargés en substances actives ou d'injecter des hydrogels innovants associés aux cellules dans le cas de la réparation du cartilage articulaire.

Les résultats de ce travail nous encouragent à poursuivre nos recherches dans le domaine de la rhéologie des biomatériaux injectables. Tout d'abord par la réalisation des études sur des nouveaux hydrogels appliqués en ingénierie tissulaire. Ensuite par la caractérisation de l'interaction cellules-hydrogel en utilisant des méthodes rhéologiques, biomécaniques (relaxation des contraintes, compression, etc...) et physiques (paramètre de maille, gonflement, etc...).

Enfin, la rhéologie et l'injectabilité des ciments phosphocalciques et d'autres suspensions phosphocalciques en fonction de la composition (HA, α -TCP, β -TCP, etc...) nous semblent tout à fait envisageables. Des études complémentaires seront envisagées afin de confirmer le lien entre la rhéologie et l'injectabilité.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Bruck SD. Materials or biomaterials? *Int J Artif Organs* 1990;13(8):469-471.
- [2] Park H, Park K. Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems. *Pharm Res* 1996;13(12):1770-1776.
- [3] Chandra R, Rustgi R. Biodegradable polymers. *Prog Polym Sci* 1998;23:1273-1335.
- [4] Duncan E. What is a biomaterial? *Medical Device & Diagnostic Industry* 1990;12:138-142.
- [5] Williams DF. Definitions in Biomaterials, Second Consensus Meeting, Eur. Soc. Biomat., Chester, UK, Ed Elsevier. September 1991.
- [6] Désévaux C. Développement d'un implant solide biodégradable à base d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose, pour la libération contrôlée d'un principe actif [Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques]. Montréal: Université de Montréal; 2002.
- [7] Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin Ther* 1997;19(5):894-905.
- [8] Ratner BD. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *J Control Release* 2002;78(1-3):211-218.
- [9] Ali SA, Zhong SP, Doherty PJ, Williams DF. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. I. Poly(caprolactone). *Biomaterials* 1993;14(9):648-656.
- [10] Anderson JM, Langone JJ. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. *J Control Release* 1999;57(2):107-113.
- [11] Tesk JA. Special report: NIST workshop on reference data for the properties of biomaterials. *J Biomed Mater Res* 2001;58(5):463-466.
- [12] Langer RS, Peppas NA. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials* 1981;2(4):201-214.
- [13] Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science* 1994;263(5154):1715-1720.
- [14] Lapkowski M, Weiss P, Daculsi G, Dupraz A, inventors. International Patent WO 97/05911, 1997.
- [15] Guicheux J, Vinatier C, Grimandi G, Daculsi G, Weiss P, inventors. International Patent WO 2005/044326, 2004.
- [16] Daculsi G, Weiss P, Delecrin J, Grimandi G, Passuti N, inventors. International Patent WO 95/21634, 1994.
- [17] Mooney DJ, Mikos AG. Growing new organs. *Sci Am* 1999;280(4):60-65.
- [18] Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann Biomed Eng* 2004;32(1):148-159.
- [19] Wichterle O, Lim D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 1960;185(4706):117-118.
- [20] Wichterle O. The beginning of the soft lens. *Soft Contact Lenses: Clinical and Applied Technology*. London, Bailliere Tindall: Ed M Ruben, 1978. p. 3-5.
- [21] Bouhadir KH, Alsberg E, Mooney DJ. Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents. *Biomaterials* 2001;22(19):2625-2633.
- [22] Brown CD, Stayton PS, Hoffman AS. Semi-interpenetrating network of poly(ethylene glycol) and poly(D,L-lactide) for the controlled delivery of protein drugs. *J Biomater Sci Polym Ed* 2005;16(2):189-201.
- [23] de Chalain T, Phillips JH, Hinek A. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and kappa-elastin. *J Biomed Mater Res* 1999;44(3):280-288.

- [24] Thomas J, Lowman A, Marcolongo M. Novel associated hydrogels for nucleus pulposus replacement. *J Biomed Mater Res A* 2003;67(4):1329-1337.
- [25] Leone G, Torricelli P, Chiumiento A, Facchini A, Barbucci R. Amidic alginate hydrogel for nucleus pulposus replacement. *J Biomed Mater Res A* 2007;84(2):391-401.
- [26] Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(7):2316-2324.
- [27] Maltese A, Borzacchiello A, Mayol L, Bucolo C, Maugeri F, Nicolais L, et al. Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: rheological characterization. *Biomaterials* 2006;27(29):5134-5142.
- [28] Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986;231(4736):397-400.
- [29] Murphy SM, Hamilton CJ, Davies ML, Tighe BJ. Polymer membranes in clinical sensor applications. II. The design and fabrication of permselective hydrogels for electrochemical devices. *Biomaterials* 1992;13(14):979-990.
- [30] Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50(1):27-46.
- [31] Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002;23(22):4307-4314.
- [32] Nuttelman CR, Henry SM, Anseth KS. Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2002;23(17):3617-3626.
- [33] Flynn L, Dalton PD, Shoichet MS. Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24(23):4265-4272.
- [34] Anseth KS, Metters AT, Bryant SJ, Martens PJ, Elisseeff JH, Bowman CN. In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. *J Control Release* 2002;78(1-3):199-209.
- [35] Elisseeff J, McIntosh W, Anseth K, Riley S, Ragan P, Langer R. Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res* 2000;51(2):164-171.
- [36] Gehrke SH, Fisher JP, Palasis M, Lund ME. Factors determining hydrogel permeability. *Ann N Y Acad Sci* 1997;831:179-207.
- [37] Hillel A, Shah P, Elisseeff J. Hydrogels in cell encapsulation and tissue engineering. In: Jenkins M, editor. *Biomedical polymers*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2007. p. 57-82.
- [38] Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(1):13-36.
- [39] West JL, Hubbell JA. Photopolymerized hydrogel materials for drug-delivery applications. *Reactive Polym* 1995;25(2-3):139-147.
- [40] Elisseeff J, Puleo C, Yang F, Sharma B. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(3):150-161.
- [41] Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* 2005;26(4):359-371.
- [42] Martens PJ, Bryant SJ, Anseth KS. Tailoring the degradation of hydrogels formed from multivinyl poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) macromers for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules* 2003;4(2):283-292.
- [43] Baier Leach J, Bivens KA, Patrick CW, Jr., Schmidt CE. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2003;82(5):578-589.

- [44] Shu XZ, Liu YC, Palumbo FS, Luo Y, Prestwich GD. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(7-8):1339-1348.
- [45] Hern DL, Hubbell JA. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J Biomed Mater Res* 1998;39(2):266-276.
- [46] Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2002;23(22):4315-4323.
- [47] Shu XZ, Ghosh K, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Clark RA, et al. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 2004;68(2):365-375.
- [48] Park YD, Tirelli N, Hubbell JA. Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials* 2003;24(6):893-900.
- [49] Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* 2002;99(3):215-228.
- [50] Sau AC. Self-crosslinkable silylated polysaccharides. American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry 1990;31(1):636-637.
- [51] Bourges X, Weiss P, Coudreuse A, Daculsi G, Legeay G. General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers* 2002;63(4):232-238.
- [52] Lee KY, Peters MC, Anderson KW, Mooney DJ. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature* 2000;408(6815):998-1000.
- [53] Drury JL, Dennis RG, Mooney DJ. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* 2004;25(16):3187-3199.
- [54] LeRoux MA, Guilak F, Setton LA. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *J Biomed Mater Res* 1999;47(1):46-53.
- [55] Lee KY, Rowley JA, Eiselt P, Moy EM, Bouhadir KH, Mooney DJ. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules* 2000;33(11):4291-4294.
- [56] Zhang S. Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnol Adv* 2002;20(5-6):321-339.
- [57] Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 2002;82(2-3):189-212.
- [58] Burdick JA, Mason MN, Hinman AD, Thorne K, Anseth KS. Delivery of osteoinductive growth factors from degradable PEG hydrogels influences osteoblast differentiation and mineralization. *J Control Release* 2002;83(1):53-63.
- [59] Elisseeff J, McIntosh W, Fu K, Blunk BT, Langer R. Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Orthop Res* 2001;19(6):1098-1104.
- [60] Flory PJ, Rehner J. Statistical mechanics of cross-linked polymer networks II. Swelling. *J Chem Phys* 1943;11(11):521-526.
- [61] Peppas NA, Merrill EW. Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications. *J Biomed Mater Res* 1977;11(3):423-434.
- [62] Lowman AM, Peppas NA. Solute transport analysis in pH-responsive, complexing hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol). *J Biomater Sci Polym Ed* 1999;10(9):999-1009.
- [63] Noomrio MH, Zhang R, Eisenthal R, Hubble J. Characterisation of hydrogel gel swelling by molecular exclusion. *Biotechnol Lett* 2005;27(20):1587-1590.
- [64] Traitel T, Kost J, Lapidot SA. Modeling ionic hydrogels swelling: characterization of the non-steady state. *Biotechnol Bioeng* 2003;84(1):20-28.

- [65] Li Q, Wang J, Shahani S, Sun DD, Sharma B, Elisseff JH, et al. Biodegradable and photocrosslinkable polyphosphoester hydrogel. *Biomaterials* 2006;27(7):1027-1034.
- [66] Kim UJ, Park J, Li C, Jin HJ, Valluzzi R, Kaplan DL. Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules* 2004;5(3):786-792.
- [67] Cruise GM, Scharp DS, Hubbell JA. Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels. *Biomaterials* 1998;19(14):1287-1294.
- [68] Stock RS, Ray WH. Interpretation of photon correlation spectroscopy data: A comparison of analysis methods. *J Polym Sci Polym Phys* 1985;23(7):1393-1447.
- [69] Canal T, Peppas NA. Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks. *J Biomed Mater Res* 1989;23(10):1183-1193.
- [70] Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5(4):447-451.
- [71] Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 2000;21(21):2155-2161.
- [72] Kim SE, Park JH, Cho YW, Chung H, Jeong SY, Lee EB, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *J Control Release* 2003;91(3):365-374.
- [73] Xia W, Liu W, Cui L, Liu Y, Zhong W, Liu D, et al. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004;71(2):373-380.
- [74] Park SH, Park SR, Chung SI, Pai KS, Min BH. Tissue-engineered cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation. *Artif Organs* 2005;29(10):838-845.
- [75] Fatimi A, Tassin JF, Quillard S, Axelos MAV, Weiss P. The rheological properties of silylated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* 2008;29(5):533-543.
- [76] Chia SH, Homicz MR, Schumacher BL, Thonar EJ, Masuda K, Sah RL, et al. Characterization of human nasal septal chondrocytes cultured in alginate. *J Am Coll Surg* 2005;200(5):691-704.
- [77] Kino-Oka M, Maeda Y, Yamamoto T, Sugawara K, Taya M. A kinetic modeling of chondrocyte culture for manufacture of tissue-engineered cartilage. *J Biosci Bioeng* 2005;99(3):197-207.
- [78] Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001;80(11):2025-2029.
- [79] Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ. Engineering growing tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(19):12025-12030.
- [80] Hsu SH, Whu SW, Hsieh SC, Tsai CL, Chen DC, Tan TS. Evaluation of chitosan-alginate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. *Artif Organs* 2004;28(8):693-703.
- [81] Lee JE, Kim SE, Kwon IC, Ahn HJ, Cho H, Lee SH, et al. Effects of a chitosan scaffold containing TGF-beta1 encapsulated chitosan microspheres on in vitro chondrocyte culture. *Artif Organs* 2004;28(9):829-839.
- [82] Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, et al. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(15):9996-10001.
- [83] Kisiday JD, Jin M, DiMicco MA, Kurz B, Grodzinsky AJ. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. *J Biomech* 2004;37(5):595-604.
- [84] Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 2007;28(1):55-65.

- [85] Hu JC, Athanasiou KA. Low-density cultures of bovine chondrocytes: effects of scaffold material and culture system. *Biomaterials* 2005;26(14):2001-2012.
- [86] Chang SC, Tobias G, Roy AK, Vacanti CA, Bonassar LJ. Tissue engineering of autologous cartilage for craniofacial reconstruction by injection molding. *Plast Reconstr Surg* 2003;112(3):793-799; discussion 800-791.
- [87] Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(1):78-89.
- [88] Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, Layrolle P, Weiss P. Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels. *Biomed Mater Eng* 2006;16(4 Suppl):S107-113.
- [89] Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, Vignes-Colombeix C, et al. Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 2007;80(1):66-74.
- [90] Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005;26(33):6643-6651.
- [91] Leone G, Delfini M, Di Cocco ME, Borioni A, Barbucci R. The applicability of an amidated polysaccharide hydrogel as a cartilage substitute: structural and rheological characterization. *Carbohydr Res* 2008;343(2):317-327.
- [92] Leone G, Fini M, Torricelli P, Giardino R, Barbucci R. An amidated carboxymethylcellulose hydrogel for cartilage regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2008.
- [93] Dausse Y, Grossin L, Miralles G, Pelletier S, Mainard D, Hubert P, et al. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(1):16-28.
- [94] Heymer A, Haddad D, Weber M, Gbureck U, Jakob PM, Eulert J, et al. Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. *Biomaterials* 2008;29(10):1473-1483.
- [95] Elisseeff J, Anseth K, Sims D, McIntosh W, Randolph M, Yaremchuk M, et al. Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1999;104(4):1014-1022.
- [96] Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(5):936-944.
- [97] Hoemann CD, Sun J, Legare A, McKee MD, Buschmann MD. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(4):318-329.
- [98] Berger J, Reist M, Chenite A, Felt-Baeyens O, Mayer JM, Gurny R. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application. *Int J Pharm* 2005;288(2):197-206.
- [99] Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999;20(1):45-53.
- [100] Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Schloo BL, Vacanti JP, Vacanti CA. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg* 1996;97(1):168-178; discussion 179-180.
- [101] Suzuki Y, Tanihara M, Suzuki K, Saitou A, Sufan W, Nishimura Y. Alginate hydrogel linked with synthetic oligopeptide derived from BMP-2 allows ectopic osteoinduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2000;50(3):405-409.
- [102] Bencherif SA, Srinivasan A, Horkay F, Hollinger JO, Matyjaszewski K, Washburn NR. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials* 2008;29(12):1739-1749.

- [103] Akmal M, Singh A, Anand A, Kesani A, Aslam N, Goodship A, et al. The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87(8):1143-1149.
- [104] Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, et al. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005(435):96-105.
- [105] Nettles DL, Vail TP, Morgan MT, Grinstaff MW, Setton LA. Photocrosslinkable hyaluronan as a scaffold for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng* 2004;32(3):391-397.
- [106] McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem* 1984;53:625-663.
- [107] Trojani C, Boukhechba F, Scimeca JC, Vandebos F, Michiels JF, Daculsi G, et al. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2006;27(17):3256-3264.
- [108] Weiss P, Vinatier C, Sohier J, Fatimi A, Laïb S, Layrolle P, et al. Self-hardening hydrogel for cartilage and bone tissue engineering. *Macromolecular Symposia* 2007;266(1):30-35.
- [109] Fatimi A, Axelos MAV, Tassin JF, Weiss P. Rheological characterization of self-hardening hydrogel for tissue engineering applications: gel point determination and viscoelastic properties. *Macromolecular Symposia* 2008;266(1):12-16.
- [110] Turczyn R, Weiss P, Lapkowski M, Daculsi G. In situ self hardening bioactive composite for bone and dental surgery. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11(2):217-223.
- [111] Fatimi A, Tassin JF, Turczyn R, Axelos MAV, Weiss P. Gelation studies of a silylated hydroxypropylmethylcellulose solution: influence of pH and sterilization. *Biomacromolecules* (submitted 2nd september 2008).
- [112] Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, Ambrosio L, Fini M, Torricelli P, et al. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 2002;23(23):4503-4513.
- [113] Gauthier O, Khairoun I, Bosco J, Obadia L, Bourges X, Rau C, et al. Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(1):47-54.
- [114] Julien M, Khairoun I, Legeros RZ, Delplace S, Pilet P, Weiss P, et al. Physico-chemical-mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates. *Biomaterials* 2007;28(6):956-965.
- [115] Weiss P, Gauthier O, Bouler JM, Grimandi G, Daculsi G. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. *Bone* 1999;25(2 Suppl):67S-70S.
- [116] Khairoun I, Magne D, Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G, et al. In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement. *J Biomed Mater Res* 2002;60(4):633-642.
- [117] Daculsi G, Weiss P, Bouler JM, Gauthier O, Millot F, Aguado E. Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials. *Bone* 1999;25(2 Suppl):59S-61S.
- [118] Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998;19(16):1473-1478.
- [119] Gauthier O, Boix D, Grimandi G, Aguado E, Bouler JM, Weiss P, et al. A new injectable calcium phosphate biomaterial for immediate bone filling of extraction sockets: a preliminary study in dogs. *J Periodontol* 1999;70(4):375-383.
- [120] Gauthier O, Goyenvalle E, Bouler JM, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12(5):385-390.
- [121] Gauthier O, Muller R, von Stechow D, Lamy B, Weiss P, Bouler JM, et al. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials* 2005;26(27):5444-5453.

- [122] Bourges X, Schmitt M, Amouriq Y, Daculsi G, Legeay G, Weiss P. Interaction between hydroxypropyl methylcellulose and biphasic calcium phosphate after steam sterilisation: capillary gas chromatography studies. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001;12(6):573-579.
- [123] Fatimi A, Tassin JF, Axelos MAV, Weiss P. Sedimentation study of biphasic calcium phosphate particles. *Key Engineering Materials* 2008;361-363(1):365-368.
- [124] Weiss P, Layrolle P, Clergeau LP, Enckel B, Pilet P, Amouriq Y, et al. The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. *Biomaterials* 2007;28(22):3295-3305.
- [125] Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14(3):195-200.
- [126] Bouler JM, LeGeros RZ, Daculsi G. Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio. *J Biomed Mater Res* 2000;51(4):680-684.
- [127] Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res* 1989;23(8):883-894.
- [128] Daculsi G, Malard O, Goyenvalle E. Efficacy and performance of bone substitute for bone reconstruction in place of allograft and autograft. *ITBM-RBM* 2005;26(3):218-222.
- [129] LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 1993;14(1):65-88.
- [130] Sarkar N. Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropylmethylcellulose. *J Appl Polym Sci* 1979;24:1073-1087.
- [131] Sarkar N, Walker LC. Hydration-dehydration properties of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydrate Polymers* 1995;27:177-185.
- [132] Hussain S, Keary C, Craig DQM. A thermorheological investigation into the gelation and phase separation of hydroxypropyl methylcellulose aqueous systems. *Polymer* 2002;43(21):5623-5628.
- [133] Haque A, Richardson RK, Morris ER, Gidley MJ, Caswell DC. Thermogelation of methylcellulose. Part II: Effect of hydroxypropyl substituents. *Carbohydrate Polymers* 1993;22:175-186.
- [134] Lombois H, Lootens D, Halary JL, Hébraud P, Colombet P, Lécolier E, et al. Sur le rôle ambigu de la lubrification dans la rhéologie des pâtes granulaires. *Rhéologie* 2005;7:11-21.
- [135] Frankel NA, Acrivos A. On the viscosity of a concentrated suspension of solid spheres. *Chemical Engineering Science* 1967;22:847-853.
- [136] Coussot P, Ancey C. Rheophysical classification of concentrated suspensions and granular pastes. *Physical Review E* 1999;59:4445-4457.
- [137] Lootens D. Ciments et suspensions concentrées modèles. Ecoulement, encombrement et floculation [Thèse de Doctorat en Physique et Chimie des Matériaux]. Paris: Université Pierre et Marie Curie; 2005.
- [138] Spitzer JJ. Colloidal interactions: contact limiting laws, double-layer dissociation, and "non-DLVO" (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) forces. *Colloid and Polymer Science* 2003;281(6):589-592.
- [139] Tuinier R, de Kruif CG. Stability of casein micelles in milk. *J Chem Phys* 2002;117(3):1290-1295.
- [140] Tian JM, Zhang Y, Guo XM, Dong LM. Preparation and characterization of hydroxyapatite suspensions for solid freeform fabrication. *Ceram Int* 2002;28(3):299-302.
- [141] Quivoron C. Viscosité des solutions macromoléculaires diluées. *Chimie Macromoléculaire II*. Paris: Hermann, 1972. p. 212.

- [142] Huggins ML. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. *Journal of the American Chemical Society* 1942;64:2716-2718.
- [143] Kraemer EO. Molecular weights of celluloses and cellulose derivatives. *Industrial and Engineering Chemistry* 1938;30:1200-1203.
- [144] Keary CM. Characterization of METHOCEL cellulose ethers by aqueous SEC with multiple detectors. *Carbohydrate Polymers* 2001;45(3):293-303.
- [145] Coussot P, Grossiord JL. *Comprendre la rhéologie: de la circulation du sang à la prise du béton*. Les Ulis: EDP Sciences, 2002.
- [146] Grossiord JL, Quemada D. Des concepts aux outils. *Comprendre la rhéologie: de la circulation du sang à la prise du béton*. Les Ulis: EDP Sciences, 2002. p. 9-31.
- [147] Sittikijyothin W, Torres D, Gonçalves MP. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers* 2005;59(3):339-350.
- [148] Ostwald WO. The velocity function of viscosity of disperse systems. *Colloid and Polymer Science* 1925;36 (2):99-117.
- [149] de Waele A. Viscometry and plastometry. *Journal of the Oil and Colour Chemists Association* 1923;6:33-41.
- [150] Cross MM. Rheology of non-Newtonian fluids: a new flow equation for pseudoplastic systems. *J Colloid Sci* 1965;20:417-426.
- [151] Carreau PJ. Rheological Equations from Molecular Network Theories. *Journal of Rheology* 1972;16(1):99-127.
- [152] Couarraze G, Grossiord JL. *Initiation à la rhéologie*. 3 ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 2000.
- [153] Langkilde FW, Svantesson A. Identification of celluloses with Fourier-transform (FT) mid-infrared, FT-Raman and near-infrared spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 1995;13(4-5):409-414.
- [154] Liu L, Su YH, Lai JY. In situ crosslinking of chitosan and formation of chitosan-silica hybrid membranes with using γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent. *Polymer* 2004;45:6831-6837.
- [155] Shiroasaki Y, Kubo M, Takashima S, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A. In vitro apatite formation on organic polymers modified with a silane coupling reagent. *J R Soc Interface* 2005;2(4):335-340.
- [156] Alvarez-Lorenzo C, Lorenzo-Ferreira RA, Gomez-Amoza JL, Martinez-Pacheco R, Souto C, Concheiro A. A comparison of gas-liquid chromatography, NMR spectroscopy and Raman spectroscopy for determination of the substituent content of general non-ionic cellulose ethers. *J Pharm Biomed Anal* 1999;20(1-2):373-383.
- [157] Morris ER, Cutler AN, Ross-Murphy SB, Rees DA. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions *Carbohydrate Polymers* 1981;1(1):5-21
- [158] Cho J, Heuzey MC, Begin A, Carreau PJ. Viscoelastic properties of chitosan next term solutions: Effect of concentration and ionic strength. *Journal of Food Engineering* 2006;74(4):50-515.
- [159] Hember MWN, Morris ER. Solubility, solution rheology and salt-induced gelation of welan polysaccharide in organic solvents. *Carbohydrate Polymers* 1995;27(1):23-36.
- [160] Goh KKT, Haisman DR, Singh H. Characterisation of a high acyl gellan polysaccharide using light scattering and rheological techniques. *Food Hydrocolloids* 2006;20:176-183.
- [161] Clark AH, Ross-Murphy SB. Structure and mechanical properties of biopolymer gels. *Advanced Polymer Science* 1987;83:57-192.
- [162] Desbrières J, Hirrien M, Ross-Murphy SB. Thermogelation of methylcellulose: rheological considerations. *Polymer* 2000; 41 2451-2461.

- [163] Bohic S, Weiss P, Roger P, Daculsi G. Light scattering experiments on aqueous solutions of selected cellulose ethers: contribution to the study of polymer-mineral interactions in a new injectable biomaterial. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12(3):201-205.
- [164] Cox WP, Merz EH. Correlation of dynamic and steady viscosities. *Journal of Polymer Science* 1958;28:619-622.
- [165] Ross-Murphy SB, Shatwell KP. Polysaccharide strong and weak gels. *Biorheology* 1993;30(3-4):217-227.
- [166] Axelos MA, Kolb M. Crosslinked biopolymers: Experimental evidence for scalar percolation theory. *Physical Review Letters* 1990;64(12):1457-1460.
- [167] Audebrand M, Kolb M, Axelos MA. Combined rheological and ultrasonic study of alginate and pectin gels near the sol-gel transition. *Biomacromolecules* 2006;7(10):2811-2817.
- [168] Chambon F, Winter HH. Stopping of crosslinking reaction in a PDMS polymer at the gel point. *Polymer Bulletin* 1985;13(6):499.
- [169] Winter HH, Mours M. Rheology of polymers near liquid-solid transitions. *Adv Polym Sci* 1997;134:165.
- [170] In M, Prud'homme RK. Fourier transform mechanical spectroscopy of the sol-gel transition in zirconium alkoxide ceramic gels. *Rheologica Acta* 1993;32(6):556-565.
- [171] Michael A. Silicon in organic, organometallic, and polymer chemistry. New York: Brook John Wiley & Sons, 2000.
- [172] Rytger-Kricheldorf H. Silicon in polymer synthesis. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1996.
- [173] Nickerson MT, Patel J, Heyd DV, Rousseau D, Paulson AT. Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin. *Int J Biol Macromol* 2006;39(4-5):298-302.
- [174] Sarkar N. Kinetics of thermal gelation of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers* 1995;26:195-203.
- [175] Vesaratchanon JS, Nikolov A, Wasan DT. Sedimentation of concentrated monodisperse colloidal suspensions: Role of collective particle interaction forces. *J Colloid Interface Sci* 2008;322(1):180-189.
- [176] Shojaei A, Arefinia R. Analysis of the sedimentation process in reactive polymeric suspensions. *Chemical Engineering Science* 2006;61(23):7565-7578.
- [177] Kryuchkov YN. Modeling of sedimentation processes for calculating the particle size distributions of disperse systems. *Theor Found Chem Eng* 2005;39(5):522-528.
- [178] Richardson JF, Zaki WN. Sedimentation and fluidization. *Trans Inst Chem Engr* 1954;32:35-53.
- [179] Brady JF, Durlofsky LJ. The sedimentation rate of disordered suspensions. *Phys Fluids* 1988;31(4):717-727.
- [180] Buscall R, White LR. The consolidation of concentrated suspensions - Part 1: The theory of sedimentation. *J Chem Soc Faraday Trans* 1987;1(83):873 - 891.
- [181] Al-Naafa MA, Selim MS. Sedimentation of monodisperse and bidisperse hard-sphere colloidal suspensions. *AIChE J* 1992;38(10):1618-1630.
- [182] Auzeais FM, Jackson R, Russel WB. The resolution of shocks and the effects of compressible sediments in transient settling. *J Fluid Mech* 1988;195:437-462.
- [183] Dupraz A, Nguyen TP, Richard M, Daculsi G, Passuti N. Influence of a cellulosic ether carrier on the structure of biphasic calcium phosphate ceramic particles in an injectable composite material. *Biomaterials* 1999;20(7):663-673.
- [184] Liu C, Shao H, Chen F, Zheng H. Rheological properties of concentrated aqueous injectable calcium phosphate cement slurry. *Biomaterials* 2006;27(29):5003-5013.

- [185] Bujake JEJ. Rheology of concentrated dicalcium phosphate suspensions. *J Pharm Sci* 1965;54(11):1599-1604.
- [186] Chang C, Powell RL. Effect of particle size distributions on the rheology of concentrated bimodal suspensions. *Journal of Rheology* 1994;38(1):85-98.
- [187] Bohner M, Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials* 2005;26(13):1553-1563.
- [188] Bagley EB. End corrections in the capillary flow of polyethylene. *Journal of Applied Physics* 1957;28(5):624-627
- [189] Chauffoureaux JC, Dehennau C, van Rijkevorseel J. Flow and Thermal Stability of Rigid PVC. *Journal of Rheology* 1979;23(1):1-24.
- [190] Mooney M. Explicit formulas for slip and fluidity. *Journal of Rheology* 1931;2(2):210-222.

LISTE DES FIGURES

<i>Figure</i>	<i>Page</i>
<i>Figure 1.1 : Schéma de la transition sol-gel suite à la photopolymérisation d'un hydrogel (d'après Hillel et al., 2007 [37]).</i>	11
<i>Figure 1.2 : Illustration schématique de la stratégie suivie pour l'utilisation d'une matrice synthétique : (1) prélèvement des tissus cartilagineux ; (2) isolation des chondrocytes autologues ; (3) amplification et différenciation in vitro ; (4) préparation d'un hydrogel réticulant ; (5) formation d'un réseau 3D associant la matrice synthétique et les chondrocytes ; (6) implantation in vivo.</i>	16
<i>Figure 1.3 : Structure chimique du chitosan (d'après Berger et al., 2005 [98]).</i>	20
<i>Figure 1.4 : Schéma représentatif de l'agrégation des chaînes d'alginate sous forme de "boîte à œufs" au cours de la formation des gels d'alginate.</i>	20
<i>Figure 1.5 : Structure chimique de l'acide hyaluronique (d'après Bencherif et al., 2008 [102]).</i>	21
<i>Figure 1.6 : Structure chimique de la cellulose.</i>	22
<i>Figure 1.7 : Structure chimique de l'hydroxypropylméthylcellulose (d'après Fatimi et al., 2008 [109]).</i>	23
<i>Figure 1.8 : Réactions de greffage et de neutralisation pour la synthèse d'HPMC-Si (d'après Fatimi et al., 2008 [109]).</i>	24
<i>Figure 1.9 : Processus de réticulation de l'HPMC-Si : (a) formation de silanolate ; (b) protonation de silanolate ; (c) condensation de silanol (d'après Fatimi et al., 2008 [75]).</i>	25
<i>Figure 1.10 : Structure chimique de la carboxyméthylcellulose aminée (d'après Leone et al., 2008 [91]).</i>	25
<i>Figure 1.11 : Photographie d'une suspension phosphocalcique injectable.</i>	28
<i>Figure 1.12 : Exemples de stabilisations d'une particule isolée.</i>	36
<i>Figure 1.13 : Exemple de la détermination expérimentale de la viscosité intrinsèque par double extrapolation des variations des viscosités 'spécifique renduite' et 'inhérente', en fonction de la concentration du polymère. Couple: hydroxypropylméthylcellulose-solution de soude (d'après Fatimi et al., 2008 [75]).</i>	40
<i>Figure 1.14 : Mouvement de cisaillement simple résultant d'une force (F) et d'une vitesse (V) entre deux plans parallèles selon la direction x.</i>	43
<i>Figure 1.15 : Rhéogrammes des fluides newtoniens et non newtoniens.</i>	44
<i>Figure 1.16 : Rhéogrammes des principales catégories de fluides sans seuil d'écoulement.</i>	45
<i>Figure 1.17 : Rhéogrammes des principales catégories de fluides présentant un seuil d'écoulement.</i>	45
<i>Figure 1.18 : Réponses de différents matériaux à un test dynamique.</i>	48
<i>Figure 1.19 : Réponses types de quelques matériaux à une sollicitation harmonique.</i>	50
<i>Figure 1.20 : Représentation schématique des différentes géométries : (a) cône plan (b) plans parallèles et (c) cylindres coaxiaux.</i>	51
<i>Figure 1.21 : Représentation schématique tridimensionnelle d'une géométrie 'cône plan'.</i>	52
<i>Figure 1.22 : Représentation schématique tridimensionnelle d'une géométrie 'plans parallèles'.</i>	52
<i>Figure 1.23 : Représentation schématique tridimensionnelle d'une géométrie 'cylindres coaxiaux'.</i>	53
<i>Figure 1.24 : Représentation schématique d'un rhéomètre capillaire.</i>	54

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau</i>	<i>Page</i>
<i>Tableau 1.1 : Facteurs influençant la biodégradabilité des polymères (d'après Pillai et al., 2001 [70]).</i>	<i>15</i>
<i>Tableau 1.2 : Liste de quelques hydrogels naturels utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage.</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 1.3 : Lois rhéologiques décrivant l'écoulement de fluides sans seuil d'écoulement.</i>	<i>46</i>

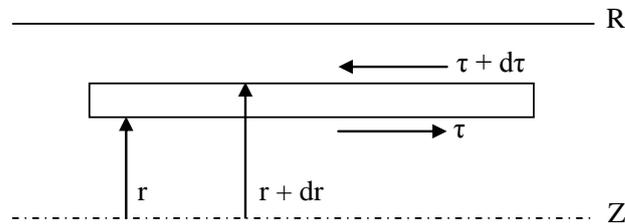
ANNEXES

Annexe 1 : Relation entre le débit et la contrainte à la paroi dans une conduite cylindrique

Annexe 2 : Correction du glissement à la paroi

Annexe 1 : Relation entre le débit et la contrainte à la paroi dans une conduite cylindrique

Pour caractériser un écoulement il est nécessaire d'établir une relation entre des grandeurs mesurables telles que la pression et le débit. Considérons l'écoulement d'un fluide dans un canal cylindrique.



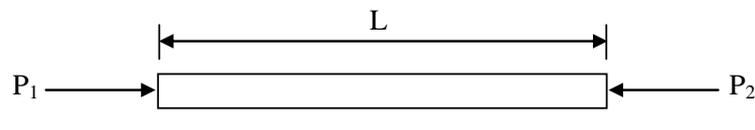
Le bilan de quantité de mouvement sur l'enveloppe cylindrique s'écrit sous la forme :

$$\Sigma \text{ forces intérieures} + \Sigma \text{ forces extérieures} = 0$$

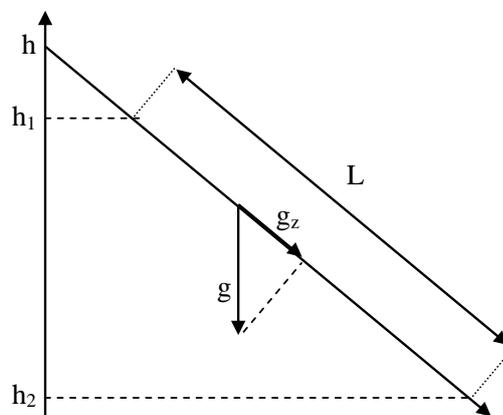
La somme des forces extérieures est nulle (écoulement établi, donc conservation du profil de vitesse).

Les forces intérieures englobent les :

1. Forces de frottement visqueuses dues au transfert radial de quantité de mouvement ;
2. Forces de pesanteur ;
3. Forces de pression exercées aux extrémités.



$$\text{Soit : } 2\pi L r \tau - 2\pi L (r + dr) (\tau + d\tau) + P_1 - P_2 + 2\pi r dr \rho g_z L = 0$$



$$\text{d'où } \frac{d\tau}{dr} = \left[\frac{P_1 - P_2}{L} + \rho g_z \right] r$$

Notons $\hat{P} = P + \rho g_z h$ la pression motrice

$$\text{et } P_1 - P_2 + \rho g_z L = P_1 - P_2 + \rho g_z (h_1 - h_2) = \hat{P}_1 - \hat{P}_2 = \Delta P$$

$$\text{Donc } \frac{d\tau}{dr} = \frac{\Delta P}{L} r \text{ soit } \tau = \frac{\Delta P}{L} \frac{r}{2} + \frac{cte}{r}$$

Comme τ n'est pas infini à $r=0$ donc $cte=0$

On obtient donc $\tau_w = \frac{R \Delta P}{2 L}$ où τ_w est la contrainte de frottement à la paroi.

On en déduit $\frac{\tau}{\tau_w} = \frac{r}{R}$, cette relation est valable quel que soit le fluide.

Le débit Q est défini comme étant la vitesse u du fluide qui traverse l'élément de surface dS .

$$\text{Donc le débit est donné par : } Q = \int_0^R 2\pi r u dr$$

Après intégration par partie et compte tenu de la relation rhéologique donnant le comportement du fluide considéré :

$$\dot{\gamma} = -\frac{du}{dr} = f\left(\tau_w \frac{r}{R}\right) \text{ on a } \frac{Q}{\pi} = R^2 u \Big|_0^R - \int_0^R r^2 du = \int_0^R r^2 f\left(\tau_w \frac{r}{R}\right) dr$$

En éliminant $r = R \frac{\tau}{\tau_w}$ on a la relation de *Rabinowitsch* valable pour tous les fluides :

$$\frac{Q}{\pi R^3} = \frac{1}{\tau_w^3} \int_0^{\tau_w} \tau^2 f\left(\frac{\tau}{\tau_w}\right) d\tau$$

Si on connaît la nature du fluide c.à.d. $f\left(\frac{\tau}{\tau_w}\right)$ on intègre et on a une relation entre Q et ΔP (ou τ_w).

Avec l'expression $\dot{\gamma} = -\frac{du}{dr} = f\left(\frac{\tau}{\tau_w}\right)$, une intégration fournira le profil de vitesse correspondant à l'écoulement laminaire établi dans la conduite cylindrique.

Examinons à présent des exemples où le comportement rhéologique du fluide est connu.

a. Fluide newtonien

La loi de comportement rhéologique dans ce cas est :

$$\dot{\gamma} = f\left(\frac{\tau}{\tau_w}\right) = \frac{\tau}{\eta} \text{ (loi de Newton)}$$

Si on rapporte cette loi dans la relation de *Rabinowitsch* on obtient : $\frac{Q}{\pi R^3} = \frac{\tau_w}{4\eta}$, soit la relation

de *Hagen-Poiseuille* :

$$Q = \frac{\pi D^4}{128\eta} \frac{\Delta P}{L}$$

b. Fluide rhéofluidifiant

La loi de comportement rhéologique d'un fluide d'*Ostwald-de-Waele* s'écrit sous la forme :

$$\tau = K\dot{\gamma}^n, \text{ soit } \dot{\gamma} = \left(\frac{\tau}{K}\right)^{\frac{1}{n}}$$

L'intégration de la relation de *Rabinowitsch* donne alors : $\frac{Q}{\pi R^3} = \frac{n}{3n+1} \left(\frac{\tau_w}{K}\right)^{\frac{1}{n}}$ or $\tau_w = \frac{D}{4} \frac{\Delta P}{L}$

$$\text{d'où } \frac{\Delta P}{L} = 2K \left(\frac{3n+1}{n}\right)^n \frac{U_m^n}{R^{n+1}}$$

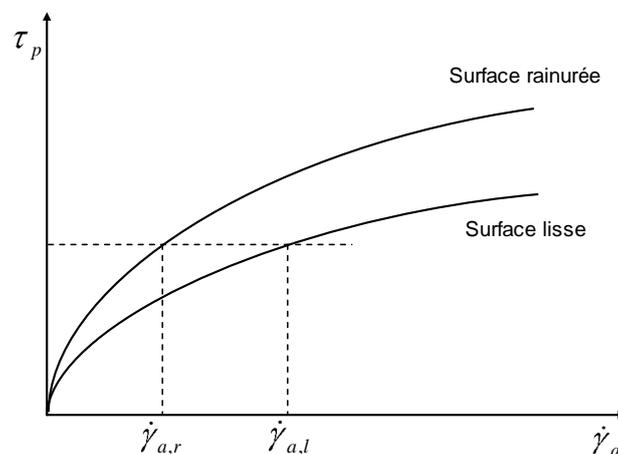
Annexe 2 : Correction du glissement à la paroi

Une des hypothèses majeures dans le dépouillement des mesures en filière capillaire est que le produit adhère à la paroi de l'écoulement. Or, dans certaines conditions d'écoulement ou pour certains produits (en particulier les produits formulés, comportant charges et additifs divers), cette hypothèse peut être mise en défaut, ce qui conduit à des erreurs importantes dans l'interprétation des données.

Pour mettre en évidence le glissement à la paroi, il existe deux grandes catégories de méthodes : La première consiste à utiliser des filières de géométrie identique mais d'états de surface différents : une filière rainurée donnera des conditions de non-glissement, alors qu'une filière lisse pourra permettre celui-ci. La comparaison des courbes d'écoulement permet alors de conclure :

- Si les courbes contrainte de cisaillement / taux de cisaillement apparent sont confondues, il n'y a pas de glissement.
- Si les courbes sont distinctes, il y a glissement et la vitesse de glissement correspondante V_g peut être déduite de la différence entre les deux courbes suivantes à contrainte donnée :

$$V_g = \frac{R}{4} (\dot{\gamma}_{a,l} - \dot{\gamma}_{a,r})$$



Cette technique est rarement utilisée. La difficulté majeure concerne l'importance des rainures nécessaires pour assurer le non-glissement, et l'effet de ces rainures sur les paramètres géométriques utilisés dans l'interprétation des résultats.

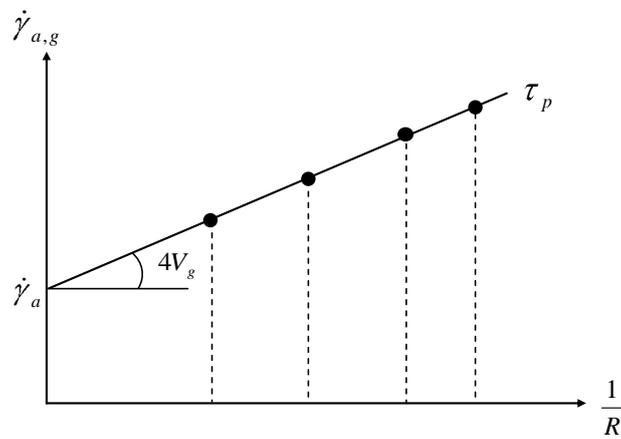
La deuxième méthode est la plus largement utilisée dans ce domaine. Elle consiste à utiliser des capillaires de diamètres différents. Ici aussi, l'obtention de courbes contrainte de cisaillement / taux de cisaillement apparent superposées est le gage de conditions de non-glissement, alors que

des courbes distinctes permettent de conclure à un glissement à la paroi. Dans ce dernier cas, si on suppose que la vitesse de glissement V_g n'est fonction que de la seule contrainte de cisaillement à la paroi τ_p , on peut écrire :

$$\dot{\gamma}_{a,g} = \frac{4Q}{\pi R_c^3} = \dot{\gamma}_a + \frac{4V_g}{R}$$

où $\dot{\gamma}_{a,g}$ est le taux de cisaillement apparent avec glissement, $\dot{\gamma}_a$ est le taux de cisaillement apparent sans glissement.

En traçant alors $\dot{\gamma}_{a,g}$ en fonction de $1/R$ à contrainte τ_p , on va obtenir une droite, dont l'ordonnée à l'origine donne $\dot{\gamma}_a$ et la pente $4V_g$.



RÉSUMÉ

Les biomatériaux injectables constituent un domaine particulier d'utilisation par voie percutanée des biomatériaux. Cela leur impose certaines propriétés rhéologiques lors de leur mise en œuvre. Au cours de ces travaux, le principal objectif fut d'évaluer les propriétés rhéologiques de deux biomatériaux injectables utilisés en ingénierie ostéoarticulaire et dentaire : (i) une matrice extracellulaire synthétique et (ii) une suspension phosphocalcique injectable.

Un hydrogel (HPMC-Si) a été obtenu par greffage de 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS) sur les groupements hydroxyle d'une hydroxypropylméthylcellulose commerciale. Les propriétés rhéologiques de la solution avant et lors de la gélification ont été étudiées. Les résultats ont montré que la silanisation réduit le volume hydrodynamique des solutions diluées, mais n'affecte pas de manière significative le comportement rhéologique des solutions concentrées. Nous avons observé que la stérilisation des solutions d'HPMC-Si réduit le volume hydrodynamique des chaînes macromoléculaires et que l'augmentation du pH des solutions concentrées stériles réduit leur viscosité limite. L'étude de la thermogélification de l'HPMC a montré une séparation de phase durant la stérilisation. Les associations intra et intermoléculaires, non totalement réversibles, établies lors de cette étape peuvent être responsables des modifications des propriétés rhéologiques. La formation de différents hydrogels à partir des solutions basiques d'HPMC-Si a été étudiée. Grâce à la caractérisation rhéologique de ces hydrogels nous avons montré que la cinétique de réticulation ainsi que les propriétés viscoélastiques dépendent de la concentration finale en HPMC-Si, du pH final et de la température.

Une suspension de céramique phosphocalcique injectable considérée comme un substitut osseux injectable prêt à l'emploi a été étudiée. La caractérisation rhéologique de l'HPMC, qui constitue le fluide suspendant de cette suspension, a confirmé le comportement d'une solution macromoléculaire. La cinétique de sédimentation des particules phosphocalciques a montré l'influence de la taille des particules et la concentration du fluide suspendant sur la vitesse de sédimentation et sur la compacité des sédiments avant et après stérilisation. Les propriétés rhéologiques et d'injectabilité de cette suspension phosphocalcique ont ensuite été étudiées. Nous avons montré que les suspensions présentent une viscosité plus élevée par rapport à la solution d'HPMC et que les propriétés rhéologiques dépendent de la composition de la suspension. La simulation d'injection a été réalisée grâce à une seringue munie d'une aiguille. Une approche théorique basée sur l'écoulement capillaire d'un fluide non-newtonien a été utilisée pour prédire la pression d'injection à partir des résultats rhéologiques et des conditions opératoires d'extrusion. L'estimation théorique de la pression d'extrusion a confirmé le glissement à la paroi. L'influence du glissement a conduit à un facteur de proportionnalité constant entre la théorie et l'expérience.

ABSTRACT

Injectable biomaterials are a particular field of biomaterials used for noninvasive surgical techniques (*e.g.* percutaneous surgery). The fundamental characteristic of this type of biomaterials is their rheological properties during implantation. In this context, the subject of this research work was to evaluate the rheological properties of two injectable biomaterials used in osteoarticular and dental tissue engineering: (i) a synthetic extracellular matrix and (ii) an injectable calcium phosphate suspension.

The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose hydrogel were studied. It is shown that although silanization reduces the hydrodynamic volume in dilute solution, but it does not affect significantly the rheological behavior of the concentrated solutions. In dilute solution, intrinsic viscosity of different HPMC-Si solutions before steam sterilization indicated that macromolecular chains occupied larger hydrodynamic volume compared to the sterilized HPMC-Si solutions. For the sterilized HPMC-Si concentrated solutions the limiting viscosities decreased when the pH increasing. This change remarked in dilute and concentrated domain has been attributed to the formation of both intra and intermolecular associations during the phase separation process of HPMC-Si during steam sterilization. The formation of HPMC-Si hydrogels from injectable aqueous solution was studied after neutralization. The study of the gelation process revealed the dependence of the final concentration of HPMC-Si hydrogel, pH and temperature on cross-linking kinetics and viscoelastic properties.

An injectable calcium phosphate ceramic suspension was studied. This 'ready to use' injectable bone substitute is consisting of an aqueous HPMC solution as matrix and calcium phosphate particles as fillers. The rheological characterization revealed the macromolecular behavior of the HPMC. The investigations of settling kinetics showed the dependence of the particle size and the HPMC concentration on the settling velocity and sediment compactness before and after sterilization. The rheological properties and injectability of this suspension were also studied. The suspensions showed a strongly increased viscosity as compared to the HPMC solution. The rheological properties of suspensions depend on the composition. A simple device has been used to characterize extrusion of the paste using a disposable syringe fitted with a needle. The injectability modeling was realized. A theoretical approach based on the capillary flow of non-newtonian fluids was used to predict the necessary pressure for injection, on the basis of rheological properties and extrusion conditions. The theoretical estimation of the extrusion pressure showed a wall slip in the suspensions, so that the injection pressure is less than anticipated. The influence of wall slip leads however to a constant proportionality factor between theory and injection experiments.