

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE 3MPL :
MATIÈRE, MOLÉCULES, MATÉRIAUX EN PAYS DE LA LOIRE

Année 2012

Hydrogels nanocomposites : Élaboration et études physico-chimiques

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Science des matériaux
Spécialité : Physico-chimie des matériaux

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Nela BUCHTOVÁ

Le 14 décembre 2012, devant le jury ci-dessous

Président	M. Jean-François TASSIN	Professeur – IMMM, CNRS-Université du Maine
Rapporteurs	M. Thibaud CORADIN	Directeur de recherche – LCMCP, CNRS, Paris
	M. Denis MORINEAU	Directeur de recherche – IPR, CNRS, Rennes
Examineurs	Mlle Catherine LE VISAGE	Directeur de recherche – LBPC, INSERM, Paris
	M. Jean LE BIDEAU	Professeur – IMN, CNRS-Université de Nantes
	M. Pierre WEISS	Professeur – LIOAD, INSERM-Université de Nantes
Invité	M. Olivier CHAUVET	Professeur – IMN, CNRS-Université de Nantes

*Directeur de thèse : Jean LE BIDEAU
Co-directeur : Pierre WEISS
Co-encadrant : Olivier CHAUVET*

« Il n'y a pas une méthode unique pour étudier les choses. »

Aristote

Remerciements

Ma thèse a été effectuée au sein de l'équipe Physique des Matériaux et Nanostructures (PMN) à l'Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), en collaboration avec le Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD) de Nantes. Ainsi, je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Prof. Jean LE BIDEAU (IMN), mon co-directeur Prof. Pierre WEISS (LIOAD) et mon co-encadrant Prof. Olivier CHAUVET (IMN) de m'avoir offert cette opportunité de travailler avec eux, pour leur temps qu'ils m'ont consacré et pour les nombreux conseils inestimables qu'ils ont pu me prodiguer durant ces trois merveilleuses années. J'ai vraiment apprécié toutes les discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir ensemble. Merci aussi au directeur de l'IMN, Prof. Guy OUVRARD, de m'avoir accueilli dans le laboratoire.

Ensuite, je voudrais remercier les membres de mon comité de suivi de thèse pour avoir accepté d'examiner les avancés annuelles de mon travail : Dr. Philippe POULIN du Centre de Recherche Paul Pascal (Bordeaux) et plus particulièrement Dr. Stéphane CÉRANTOLA du Service RMN et RPE de l'Université de Bretagne Occidentale (Brest), qui a réalisé toutes les expériences de la RMN du liquide présentées dans cette thèse. Je le remercie aussi pour toutes les orientations concernant la dépolymérisation des polysaccharides.

Un grand merci à tous les membres de mon jury de thèse : Prof. Jean-François TASSIN de l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM – Université du Maine), Dr. Thibaud CORADIN, directeur de recherche au Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), Dr. Denis MORINEAU, directeur de recherche à l'Institut de Physique de Rennes (IPR), et Dr. Catherine LE VISAGE, directeur de recherche au Laboratoire de bio-ingénierie cardiovasculaire pour la thérapie et pour l'imagerie médicale (LBPC – Inserm). Je leur suis reconnaissante d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse et je les remercie vivement pour toutes les remarques et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à Prof. Clément SANCHEZ, directeur du LCMCP et professeur au Collège de France, Dr. Philippe BELLEVILLE et Dr. Karine VALLÉ, directeurs de recherche au Laboratoire Sol-Gel au CEA Le Ripault, pour nous avoir proposé de renforcer nos hydrogels avec les nanofibres de silice, développées dans le cadre de la thèse de Frédéric RAMBAUD. Je remercie également Dr. Simon THIBAUD du CEA Le Ripault de nous avoir aidés avec le transfert de technologie de la synthèse des nanofibres de silice.

Un remerciement particulier à Dr. Patrick JUDEINSTEIN de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay pour avoir effectué les expériences de la cryoporométrie et de la RMN à gradient de champ pulsé, ainsi que pour toutes les discussions intéressantes et les explications qu'il m'a apporté sur ces sujets.

Ma reconnaissance va aussi à tous les membres du Laboratoire Léon Brillouin (LLB – CEA Saclay), notamment à Dr. Didier LAIREZ, Dr. Jean-Marc ZANOTTI, Dr. Stéphane LONGEVILLE et Dr. Natálie MALÍKOVÁ pour leur agréable accueil et pour tous leurs contributions et conseils qu'ils ont pu me donner lors de mes expériences de la diffusion des neutrons et de la diffusion de la lumière.

Je voudrais également remercier Dr. Nicolas BOYARD et Dr. Christophe JOSSET du Laboratoire de Thermocinétique de Nantes (LTN) pour l'étude DSC et la très intéressante discussion concernant les transitions de phase de l'eau.

Merci à Brigitte BOUCHET, ingénieur d'études à l'INRA de Nantes, d'avoir effectué la microscopie confocale à balayage laser, et à Guillaume MABILLEAU et Romain MALLET, ingénieurs de la plateforme SCIAM à l'Université d'Angers, pour les images cryo-MEB et les essais sur le MEB environnemental.

Je voudrais également remercier l'équipe de Dr. Sylvia COLLIEC-JOUAULT du Laboratoire Biotechnologies et Molécules Marines (Ifremer – Nantes), plus particulièrement Dr. Nathalie CHOPIN, Corinne SINQUIN et Jacqueline RATISKOL, pour leurs conseils avisés concernant la chimie et la dépolymérisation des polysaccharides.

Je remercie bien sûr tout le personnel de l'IMN et du LIOAD que j'ai pu côtoyer durant ces trois années. En particulier, je remercie Dr. Gildas RÉTHORÉ et Khalid KHAIROUN (LIOAD) pour la synthèse de l'HPMC-Si et l'aide qu'ils m'ont portée avec les mesures rhéologiques et mécaniques. Gildas RÉTHORÉ et Dr. Cécile BOYER, avec les conseils de Dr. Jérôme GUICHEUX et Dr. Claire VINATIER (LIOAD), ont effectué les essais de la cytotoxicité et analysé les résultats, je leur en suis très reconnaissante. Merci à Dr. Michaël PARIS (IMN) pour m'avoir initiée à la RMN du solide et à Dr. Patricia BERTONCINI (IMN) pour les expériences de l'épifluorescence et les essais de l'AFM. Un grand merci surtout à Françoise LARI, Sabrina BOURMAND (IMN) et le stagiaire de Licence 3 Thibaud DUFFAY pour la réalisation des synthèses des nanofibres de silice sans lesquelles je ne pourrais pas finir ma thèse. Une mention particulière à Franch GUILLOU (IMN) de m'avoir fabriqué de magnifiques cellules pour les expériences QENS. Je ne peux en aucun cas oublier mes chers collègues de bureau : Aurélie, Carole, Sophie, Abu, Souad, mais aussi Agata, Pierre-Emanuel, ... la liste des personnes à remercier serait longue !

Enfin, j'aimerais aussi remercier ma famille et mes amis de m'avoir soutenue, même à distance, durant ces trois années qui se sont finalement si rapidement écoulées.

Sommaire

<u>Introduction</u>	1
----------------------------	---

Chapitre I : État de l'art

1. Le cartilage	7
2. Ingénierie tissulaire du cartilage articulaire	9
3. Les hydrogels	12
3.1. Généralités	12
3.2. Hydrogels à base de polymères naturels et biodégradables	15
3.3. Structure, dynamique et propriétés mécaniques des hydrogels	16
3.3.1. Morphologie et structure	17
3.3.2. Dynamique	21
3.3.3. Propriétés mécaniques	23
3.4. Stratégies de renforcement des hydrogels	24
4. Les polysaccharides	28
4.1. Généralités	28
4.2. La cellulose et ces dérivés	30
5. Conclusion	34
Références bibliographiques	36

Chapitre II : Structure de l'hydroxypropylméthylcellulose silanisée

1. Introduction	47
1.1. L'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) E4M	48
1.2. Synthèse de l'HPMC-Si	50
1.3. Caractérisations de l'HPMC-Si effectuées avant cette thèse	54
2. Partie expérimentale	57
2.1. Diffusion de la lumière	57
2.1.1. Diffusion statique de la lumière	58
2.1.2. Diffusion dynamique de la lumière	66
2.2. RMN du solide	70
2.3. RMN du liquide	75
3. Conclusion	82
Références bibliographiques	84

Chapitre III : Hydrogel d'HPMC-Si

1. Introduction	89
2. Structure et morphologie des hydrogels d'HPMC-Si	92
2.1. La structure	92
2.1.1. Analyse thermogravimétrique (ATG)	92
2.1.2. RMN du solide	93
2.2. La morphologie	95
2.2.1. Microscopie électronique à balayage environnementale (MEB-environnemental)	96
2.2.2. Microscopie à force atomique (AFM)	97
2.2.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)	98
2.2.4. Cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB)	100
2.2.5. Evaluation du paramètre de maille des hydrogels d'HPMC-Si par rhéologie et calcul théorique	103
2.2.6. Evaluation du paramètre de maille des hydrogels d'HPMC-Si par diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)	104
2.3. Conclusion	108
3. État et dynamique de l'eau dans les hydrogels d'HPMC-Si	111
3.1. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	111
3.2. La cryoporométrie	115
3.3. Diffusion quasi-élastique des neutrons (QENS)	119
3.4. RMN à gradient de champ pulsé (PGSE)	122
3.5. Conclusion	126
4. Propriétés rhéologiques et mécaniques des hydrogels d'HPMC-Si	127
4.1. Temps de gel	128
4.2. Propriétés mécaniques	130
4.2.1. Comportement en compression	130
4.2.2. Comportement en cisaillement	131
4.2.3. Relaxation de la contrainte	132
4.3. Conclusion	134
5. Conclusion	135
Références bibliographiques	138

Chapitre IV : Hydrogels nanocomposites

1. Introduction	145
2. Nanofibres de silice (NFs)	145
3. Synthèse des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs	149
4. Propriétés rhéologiques et mécaniques des hydrogels nanocomposites	152
4.1. Temps de gel	152
4.2. Comportement en compression	154
4.2.1. Seuil de percolation	156
4.2.2. La loi de mélange	159
4.3. Relaxation de la contrainte	162
4.4. Conclusion	164
5. Caractérisation des hydrogels nanocomposites	164
5.1. Dispersion des nanofibres de silice	165
5.1.1. Dispersion macroscopique	166
5.1.2. Dispersion macroscopique tridimensionnelle	167
5.2. Morphologie	169
5.2.1. Microscopie électronique à balayage	169
5.2.2. Cryo-microscopie électronique à balayage	170
5.2.3. Evaluation du paramètre de maille	
par diffusion des neutrons aux petits angles	171
5.3. État et dynamique de l'eau	175
5.3.1. Analyse thermogravimétrique	176
5.3.2. La cryoporométrie	177
5.3.3. RMN à gradient de champ pulsé	180
5.4. Conclusion	183
6. Conclusion	184
Références bibliographiques	187

Chapitre V : Étude de la cytotoxicité

1. Introduction	191
2. Cytotoxicité en 2D	193
3. Cytotoxicité en 3D	199
4. Conclusion	203
Références bibliographiques	205

<u>Conclusion</u>	207
--------------------------	-----

<u>Annexes</u>	213
-----------------------	-----

Introduction

Introduction

Les maladies dégénératives du cartilage articulaire, telle que l'arthrose, concernent aujourd'hui une population importante dans le monde et constituent donc un problème de santé publique. Le surpoids, une activité sportive excessive ou des accidents peuvent entraîner une usure prématurée du cartilage articulaire, qui ne peut alors plus remplir sa fonction protectrice des os lors du frottement pendant le mouvement des articulations. Accompagnée d'une douleur, la dégradation du cartilage articulaire réduit la mobilité des personnes concernées et affecte leur qualité de vie.

Puisque le cartilage est un tissu avec un faible pouvoir régénératif, à partir d'un certain stade de son endommagement, seules les opérations chirurgicales remplaçant le cartilage abîmé et une partie de l'os par un implant artificiel sont à l'heure actuelle couramment mises en œuvre. Malheureusement, ces opérations sont assez douloureuses et nécessitent une longue période de convalescence des patients. L'ingénierie tissulaire du cartilage par chirurgie mini-invasive représente une voie prometteuse dans le traitement de la dégénérescence du cartilage. Son principe consiste à mettre en place une matrice artificielle, contenant des cellules précurseurs capables de régénérer le cartilage, à l'endroit où se trouve la lésion de manière la moins invasive possible, idéalement par injection. Certains matériaux de la famille des hydrogels constituent potentiellement de bons candidats pour de telles matrices artificielles.

C'est donc dans le cadre de la chirurgie mini-invasive de l'ingénierie tissulaire du cartilage que l'équipe de Pr. P. Weiss du Laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire (LIOAD) développe de nouveaux hydrogels à base de polysaccharides modifiés, notamment l'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si). Les hydrogels d'HPMC-Si présentent plusieurs avantages pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage : ils sont hautement hydratés, injectables, biocompatibles et capables de maintenir des cellules précurseurs du cartilage à un endroit donné. Cependant, leurs propriétés mécaniques sont faibles comparées à celles du cartilage natif. De plus, peu d'informations concernant leurs caractéristiques physico-chimiques ont jusqu'à présent été rapportées. Ainsi, l'amélioration de la résistance mécanique des hydrogels à base d'HPMC-Si, simultanément à un approfondissement de la compréhension de la structure,

de la texture ainsi que de la physique de ces gels sont les principaux objectifs de cette thèse.

Ce travail s'articule autour de cinq chapitres. Après une brève description du cartilage humain et du principe de l'ingénierie tissulaire, le *premier* chapitre sera consacré principalement à la présentation générale des hydrogels. Un aperçu de l'état de l'art des travaux concernant plus particulièrement la morphologie, l'état et la dynamique de l'eau confinée dans les hydrogels définira notre axe de recherche. Les faibles propriétés mécaniques de la plupart des hydrogels seront également présentées montrant ainsi l'intérêt de leur renforcement.

Dans le *deuxième* chapitre de la thèse, nous nous intéresserons à la structure du polymère HPMC-Si. La structure de ce dérivé cellulosique n'a encore jusqu'à présent jamais fait l'objet d'une étude à part entière. Le but sera entre autres de remonter à l'orientation des groupements fonctionnels silanes greffés sur les chaînes d'HPMC-Si. Cette information est nécessaire pour comprendre le mécanisme de la formation des hydrogels basés sur l'HPMC-Si.

Les hydrogels d'HPMC-Si, sans renfort, seront introduits lors du *troisième* chapitre. Leur structure et morphologie, ainsi que l'état et la dynamique de l'eau qu'ils confinent seront étudiés afin d'asseoir la compréhension de ces hydrogels. Certaines propriétés mécaniques de ces hydrogels seront également présentées afin qu'elles puissent être comparées aux propriétés mécaniques des hydrogels nanocomposites, renforcés par les nanofibres de silice, qui feront l'objet du *quatrième* chapitre.

Le *cinquième* et dernier chapitre présentera les résultats des études de la cytotoxicité, menées au laboratoire LIOAD sur les hydrogels nanocomposites. Dans l'objectif de l'application visée en ingénierie tissulaire du cartilage, la cytotoxicité des hydrogels nanocomposites sera testée sur les cellules d'une lignée cellulaire du cartilage humain aussi bien que sur les cellules souches du tissu adipeux.

Chapitre I

État de l'art

1. Le cartilage

Le cartilage fait partie des tissus conjonctifs, c'est-à-dire des tissus dont les cellules, des chondrocytes dans le cas du cartilage, sont séparées par de la matrice extracellulaire (MEC). Cette matrice extra cellulaire est produite par les chondrocytes. La MEC présente une structure complexe [1], constituée principalement d'eau (jusqu'à 85 % massique à l'âge adulte) et d'un réseau de macromolécules : des glycosaminoglycanes (chaînes de nature glucidique sulfatées, à part l'acide hyaluronique, capables de retenir une grande quantité d'eau) et des protéines, notamment des fibres de collagène et d'élastine. Certains glycosaminoglycanes et protéines s'associent pour former des protéoglycanes. La synthèse et la dégradation de tous les composants de la MEC est assurée par les chondrocytes, cellules arrondies et volumineuses, réparties au sein de la MEC dans de petites logettes appelées chondroplastes. Chacune de ces logettes, qui sont assez éloignées les unes des autres, peut contenir jusqu'à huit chondrocytes. Un schéma simplifié de la structure du cartilage est représenté sur la figure I.1.

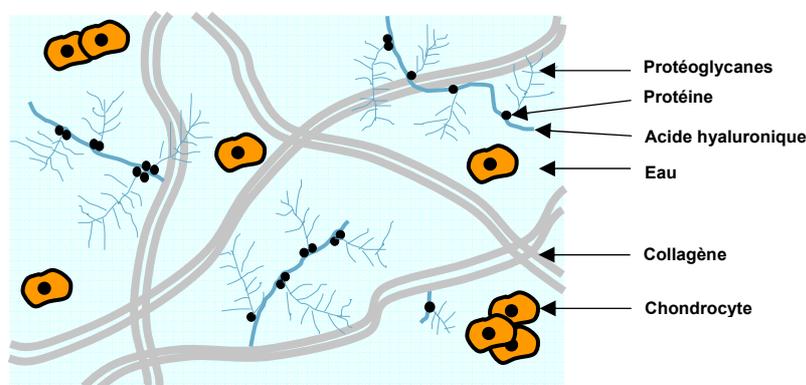


Figure I.1 : Représentation schématique de la structure du cartilage.

En fonction du taux relatif de chacun de ses composants on distingue 3 types de cartilage qui diffèrent par leurs propriétés et fonctions qu'ils remplissent dans le corps [2] :

- Cartilage hyalin
- Cartilage élastique
- Cartilage fibreux (fibrocartilage)

Le cartilage hyalin peut être divisé en deux principaux sous-types : le cartilage hyalin articulaire, recouvrant les surfaces de frottement des articulations, et le cartilage hyalin non-articulaire, présent par exemple dans la cloison nasale ou aux extrémités des côtes de la cage thoracique. Le cartilage élastique, qui contient beaucoup de fibres d'élastine et de collagène, constitue les parties plus flexibles du corps, comme l'oreille externe ou l'épiglotte. Le cartilage fibreux, quant à lui, présente des propriétés intermédiaires entre le cartilage hyalin et le cartilage élastique. Riche en fibres de collagène, il est très résistant aux tractions et de ce fait on le retrouve dans les disques intervertébraux, dans les ménisques des genoux ou encore aux sites d'insertion des ligaments, des tendons et des capsules articulaires.

D'un point de vue « matériau », c'est le cartilage hyalin articulaire qui est l'un des types du cartilage les plus exposés aux contraintes mécaniques. Sa surface est très lisse pour permettre aux os de glisser facilement l'un sur l'autre et donc minimiser la friction au sein des articulations. Tissu mou et flexible, il permet également d'amortir les chocs que les articulations subissent au quotidien. Malheureusement, au cours de la vie, le cartilage, hautement hydraté, perd sa capacité de rétention d'eau et sa sollicitation par friction augmente. De plus, les accidents, une activité sportive excessive ou le surpoids entraînent une usure du cartilage articulaire prématurée se traduisant par l'apparition de lésions et une douleur ressentie au niveau des articulations concernées. Cette maladie douloureuse, l'arthrose, est la plus fréquente des maladies rhumatologiques. Il est estimé qu'en France une personne sur deux âgées de plus de 55 ans est atteinte par l'arthrose, ce qui est un véritable problème de santé publique [3].

Contrairement à tous les autres tissus de l'organisme, le cartilage est un tissu non vascularisé, sans vaisseaux lymphatiques ni nerfs. Grâce à sa haute teneur en eau le transport des nutriments à travers la MEC vers les chondrocytes s'effectue par diffusion dont l'efficacité peut souvent être améliorée par la compression ou la flexion du cartilage lors des mouvements du corps. A cause de l'isolement des chondrocytes, de leur impossibilité de migrer vers les lésions pour y reconstituer la MEC, de la non vascularisation et de la structure complexe de ce tissu, le cartilage a des capacités de

développement et d'autoréparation limitées. Ainsi, à l'âge adulte, le cartilage ne se régénère plus, et par conséquent, tout endommagement est irréversible.

2. Ingénierie tissulaire du cartilage articulaire

Si les lésions du cartilage articulaire gagnent en profondeur jusqu'à atteindre le niveau de l'os vascularisé, la régénération spontanée du cartilage devient possible. Malheureusement, le nouveau cartilage ainsi créé possède une structure différente et des propriétés mécaniques inférieures à celles du cartilage natif [4]. De ce fait il ne résiste pas aux contraintes exercées par les articulations et les douleurs ainsi que la mobilité réduite persistent. Actuellement, il n'existe aucun traitement thérapeutique efficace contre l'arthrose. Seuls les traitements symptomatiques, c'est-à-dire qui soulagent la douleur, et le changement des règles d'hygiène de vie peuvent être proposés aux patients.

A partir d'un certain niveau de détérioration, la seule possibilité reste pour le moment une opération chirurgicale pendant laquelle l'articulation endommagée est remplacée par un implant artificiel (comme la prothèse totale de hanche montrée sur la figure I.2). Cependant, une telle intervention est très douloureuse et la convalescence est assez longue. Par ailleurs, la durée de vie d'un implant est d'environ 20 ans : il est ensuite nécessaire de le changer. Du point de vue économique, les nombreuses opérations chirurgicales liées à ces problèmes articulaires et les arrêts de travail associés ont un coût important pour la Sécurité Sociale en France, estimé à environ 2% de son budget total en 2005 [3]. Avec le vieillissement de la population ce problème va continuer à s'aggraver. Il apparaît donc nécessaire de chercher une alternative. Un traitement local, par exemple par injection d'acide hyaluronique ou dans certains cas par une greffe de chondrocytes autologues cultivées, commence à occuper une place grandissante dans le traitement de l'arthrose [6]. L'utilisation des cellules s'inscrit dans le cadre de l'ingénierie tissulaire qui a pour but la régénération (complète ou partielle) de la partie endommagée d'un tissu donné. Il faut souligner que la plupart des techniques d'ingénierie tissulaire en sont toujours à un stade expérimental, loin d'une application clinique potentielle.

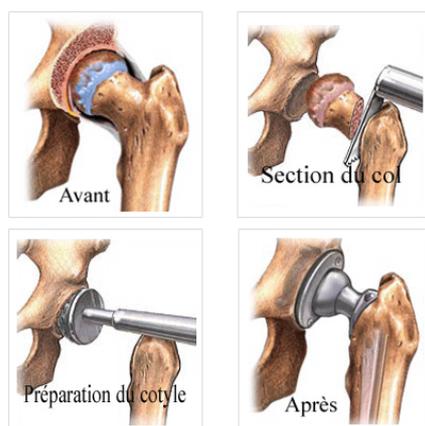


Figure I.2 : Illustration du remplacement d'une hanche par une prothèse totale [5].

Une des approches extrêmement prometteuse pour la régénération articulaire consiste à combler la lésion avec un matériau biocompatible dont la structure et les propriétés mécaniques miment celles du cartilage natif : une matrice tridimensionnelle hautement hydratée contenant des cellules précurseurs du cartilage (cellules souches mésenchymateuses ou chondrocytes, autologues ou allogéniques, c'est-à-dire prélevées ou non sur le patient lui-même) [7]. Le but est d'assurer la prolifération des chondrocytes au sein de la matrice et la différenciation des cellules souches en chondrocytes, qui produiraient ensuite la MEC native et reconstruiraient le cartilage [2]. La création d'une matrice artificielle (réseau hôte pour les cellules) est nécessaire dans cette démarche. Cette matrice a pour rôle de délivrer et de maintenir les cellules précurseurs à un endroit donné. En effet, l'injection d'une simple suspension de cellules n'est pas efficace à cause du manque d'adhésion des cellules ; par contre leur association avec une matrice artificielle va leur permettre de résider sur la zone à réparer. De plus, l'utilisation d'une matrice confère de meilleures propriétés mécaniques par rapport à une suspension. Si la matrice contient des protéines ou des principes actifs (biofacteurs), elle permet également de stimuler la croissance et le développement des cellules ainsi délivrées et la formation de la MEC [7]. Il est important de mentionner que les chondrocytes sont très sensibles à l'environnement qui les entoure [8]-[10] : ils peuvent rapidement perdre leur phénotype et la faculté de synthétiser la MEC s'ils ne se trouvent pas dans un milieu proche du milieu physiologique [11].

Il existe beaucoup de matériaux, d'origine naturelle ou synthétiques, potentiellement utilisables en tant que matrices artificielles biocompatibles. Parmi eux, on peut citer par exemple des matériaux à base de protéines [12], de polysaccharides comme le chitosan [13] ou l'acide hyaluronique [14], [15], ou encore de polymères synthétiques comme le poly(éthylène glycol) [16] ou les élastomères biodégradables [17]. Indépendamment du type de matériau utilisé, une très bonne hydratation de la matrice artificielle pour qu'elle puisse offrir aux cellules incorporées un milieu comparable à celui du cartilage natif est un critère essentiel pour cette application. C'est pour cette raison que les hydrogels, réseaux moléculaires tridimensionnels gonflés d'eau, constituent de très bons candidats pour l'ingénierie tissulaire du cartilage [18]-[20].

Parallèlement au bon choix du matériau, il faut se tourner vers la chirurgie mini-invasive pour minimiser l'impact de l'intervention chirurgicale. Dans ce but, il est souhaitable que la matrice soit acheminée vers la lésion de la plus simple manière possible, (*cf.* figure I.3). Pour certains hydrogels, il est possible d'injecter une solution de précurseur à un endroit bien précis à l'aide d'une seringue. Une fois en place, cette solution peut gélifier *in situ* formant ainsi un hydrogel qui s'adapte parfaitement à la surface endommagée. Les étapes d'usinage des implants aussi bien que les grosses opérations chirurgicales ne sont alors plus nécessaires. Les hydrogels injectables représentent donc un fort potentiel pour l'ingénierie tissulaire du cartilage par chirurgie mini-invasive [21], [22].

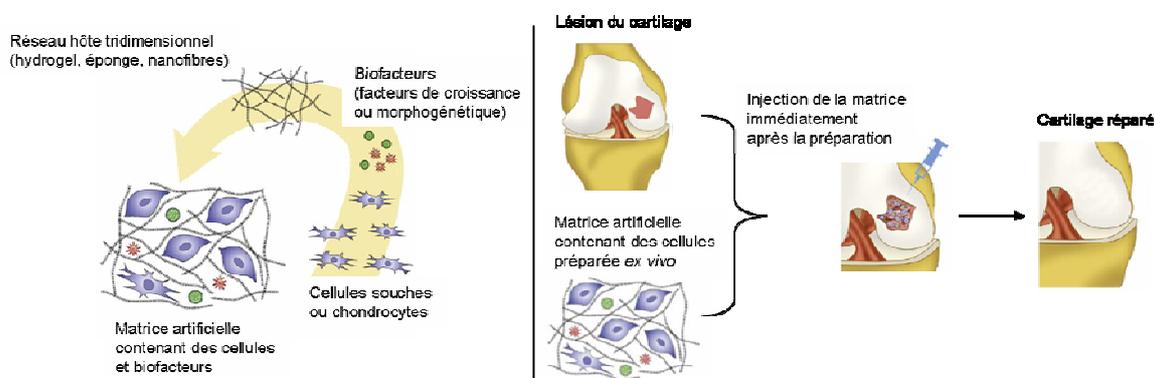


Figure I.3 : Préparation d'une matrice artificielle contenant des cellules précurseurs du cartilage et des biofacteurs (à gauche) et principe de l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire par injection d'une telle matrice (à droite). Repris de la référence [9].

3. Les hydrogels

3.1. Généralités

Un gel est un réseau tridimensionnel solide dilué dans un fluide ne présentant pas d'écoulement à l'état stable. Il s'agit d'un objet macroscopiquement solide qui présente à la fois des propriétés cohésives d'un solide et celles du transport diffusif propres à un fluide [23]. La phase solide peut être constituée de nanoparticules ou de macromolécules liées entre elles de façon physique ou chimique. Le fluide peut être l'air (aérogel, xérogel), ou bien un liquide comme l'huile, l'alcool ou l'eau. Dans ce dernier cas, on parle alors d'hydrogel. Beaucoup d'hydrogels sont fortement hydratés, ils peuvent contenir au moins 20 %, mais plus souvent plus de 80 % et jusqu'à 99 % en masse d'eau [24], [25]. Dès lors on peut comprendre l'intérêt des hydrogels pour l'ingénierie tissulaire du cartilage : les cellules ont besoin d'un milieu très hydraté avec une bonne diffusion des nutriments, mais capable de les maintenir en place et de leur offrir un soutien mécanique.

Les gels peuvent être classés en différents groupes suivant leur [24]:

- Origine (naturels ou synthétiques)
- Structure (amorphes, semi-cristallins, supramoléculaires *etc.*)
- Charge électrique (ioniques ou neutres)
- Capacité de répondre aux effets externes (sensibles ou insensibles)

Le plus souvent on distingue deux types de gels selon la nature des liaisons entre les macromolécules constituant le réseau : les gels physiques ou chimiques. Les gels physiques sont formés de polymères reliés entres-eux par des interactions faibles (van der Waals ou liaisons hydrogène). Ces liaisons peuvent être rompues et reformées au cours du temps et leur nombre total varie en fonction des paramètres externes (mécaniques ou thermodynamiques). Il s'agit de gels réversibles. De ce fait, ces gels ont une mauvaise tenue mécanique et sont couramment comparés aux solutions semi-diluées de macromolécules [23]. De l'autre côté, les gels chimiques sont stabilisés par des liaisons chimiques entre les macromolécules. Ces liaisons sont stables et leur nombre ne change

pas avec les contraintes mécaniques ou la variation de la température. On parle alors de gels irréversibles. Ceci rend les gels chimiques plus résistants en comparaison des gels physiques, par conséquent intéressants pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Cependant, les propriétés mécaniques des hydrogels dépendent également du taux d'hydratation : la fragilité d'un hydrogel augmente avec la quantité d'eau qu'il va contenir.

Le premier hydrogel à base de poly(2-hydroxyéthyl) méthacrylate a été formulé en 1960 par O. Wichterle et D. Lím [26]. Il était destiné à une utilisation en tant que biomatériau pour les lentilles de contact. Depuis, les hydrogels suscitent de plus en plus d'attention et le nombre de publications les concernant ne cessent de croître chaque année pour atteindre plus de 2000 publications par an en 2010 [27]. Les hydrogels ont désormais trouvé des applications dans des domaines bien différents : l'agriculture, la pharmacologie, l'industrie agroalimentaire, du textile et du bâtiment, l'électrotechnique et bien sûr la biomédecine [20], [24], [25], [28], [29] pour n'en citer que quelques uns. Les hydrogels peuvent servir comme matériaux superabsorbants, biocapteurs [30], [31], biomatériaux [19], [32], [33] ou encore comme matériaux électro-conducteurs [34]-[37]. On peut également noter que dans la nature les hydrogels constituent par exemple certains corps d'animaux invertébrés tels que l'anémone de mer ou la méduse [25].

Un inconvénient majeur des hydrogels est leur dessèchement rapide. En effet, l'eau peut s'évaporer facilement à l'air libre, surtout à température élevée et atmosphère sèche. C'est pourquoi les applications des hydrogels sont limitées aux milieux humides, ou aux milieux hermétiquement protégés de l'extérieur.

La préparation d'un hydrogel consiste en la transformation d'une solution aqueuse macromoléculaire (précurseur du gel) en un réseau de macromolécules reliées entre elles et emprisonnant la solution aqueuse à l'intérieur (le gel). Une telle transition est appelée gélification ou réticulation (voir figure I.4). Dans le cas des gels chimiques, le « temps de gel » ou encore le « point de gel » désigne le temps nécessaire pour qu'un réseau macromoléculaire infini apparaisse à travers tout le volume pour la première fois. Au point de gel, la masse moléculaire moyenne du système diverge. Le point de gel est associé à un changement brusque des propriétés viscoélastiques qui correspond à la formation du

réseau macromoléculaire au sein du gel. Il peut donc être déterminé à partir de mesures rhéologiques. Cependant, le point de gel n'indique que le début de la réticulation. La gélification totale (réticulation complète) n'est généralement atteinte que longtemps après ce temps de gel.

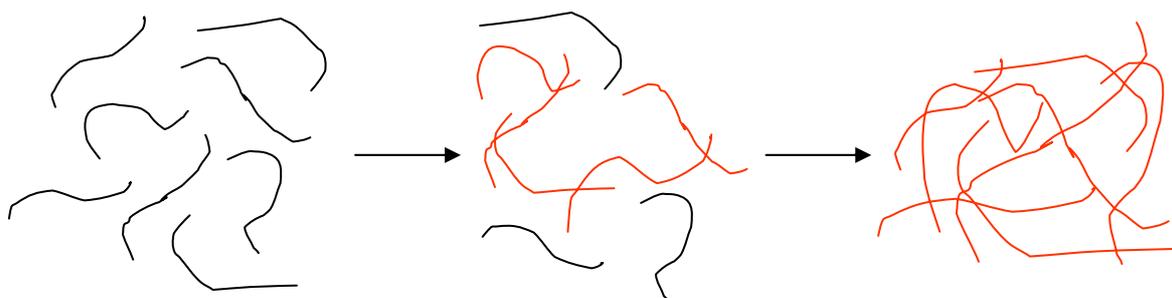


Figure I.4 : Schéma de la formation progressive d'un gel chimique : la solution macromoléculaire de précurseurs (à gauche) se transforme en gel - réseau continu complètement réticulé (à droite), en passant par le point de gel (au milieu). Le point de gel est le moment où un réseau percolant solide apparaît à travers le système.

La gélification peut être déclenchée par différentes méthodes. La technique la plus simple consiste à ajouter un réticulant dans la solution de précurseurs du gel, c'est-à-dire une molécule réactive qui participe à la création du lien entre les différents chaînes macromoléculaires. Un exemple de gel obtenu ainsi est un hydrogel à base de chitosane développé en tant que biomatériau, dont les chaînes sont réticulées avec une molécule appelée génipine [38]. D'autres méthodes de gélification utilisent une variation de pH [39], [40] ou de température [41], [42]. Il est également possible de déclencher la gélification en appliquant un champ électrique à la solution de précurseurs [43] ou en l'irradiant à la lumière visible [44], aux microondes [45] ou encore aux rayons gamma [46]. Il est parfois nécessaire de jouer avec plusieurs paramètres pour obtenir une gélification complète, comme changer le pH et la température à la fois [47].

La chirurgie mini-invasive dans le cadre d'une ingénierie tissulaire du cartilage nécessite des hydrogels injectables et une gélification *in situ* après injection de la solution de précurseurs. Il est souhaitable que le temps de gel ne soit pas trop court pour permettre l'injection (quelques minutes), ni trop long sinon la solution risque de s'écouler et de ne pas résider sur le site visé. Le moyen par lequel on déclenche la gélification de la solution

est également important. Il faut qu'il soit facile à mettre en œuvre et inoffensif pour le patient et pour les médecins [48]. Par exemple, les hydrogels obtenus après irradiation aux rayons gamma ne présentent pas un grand intérêt pour la chirurgie micro-invasive. D'un autre côté, la lumière visible, qui est inoffensive, ne pénètre pas facilement à travers les tissus du corps humain. Un déclenchement par changement de température est un bon moyen pour une gélification *in vivo* [49], [50], surtout si la température de gélification se situe autour de 37 °C, température physiologique du corps humain. Un changement de pH ou un ajout des molécules réticulantes sont également envisageables pour une gélification *in vivo*, pourvu que le temps de gel soit bien ajusté. Dans tous les cas il ne faut pas que les molécules dégagées par les réactions de réticulation soient toxiques pour l'organisme.

3.2. Hydrogels à base de polymères naturels et biodégradables

Le principe de l'ingénierie tissulaire du cartilage en utilisant des hydrogels est de faire reconstruire le cartilage au fur et à mesure à partir des cellules précurseurs du cartilage incorporées dans ce gel. L'hydrogel ne constitue donc qu'une structure de soutien temporairement nécessaire. Une fois la régénération du cartilage finie, il faut que le gel soit dégradé par l'organisme et éjecté du corps. C'est pourquoi les hydrogels à base de polymères biodégradables sont très intéressants pour l'ingénierie tissulaire [51]. La biodégradation peut être décrite comme un phénomène de décomposition de matière organique par l'action de micro-organismes (bactéries, champignons), de cellules de l'organisme (macrophages), d'enzymes (protéases, estérases,...) ou simplement par hydrolyse. Il s'agit d'une fragmentation avec modification chimique et perte des propriétés mécaniques. Le matériau est converti en dioxyde de carbone, en eau, et/ou en méthane et éventuellement en une nouvelle biomasse et des résidus [52]. Pour une biodégradation *in vivo*, il est important que les produits de dégradation ne soient pas dangereux pour l'organisme.

Il existe aujourd'hui un grand nombre d'hydrogels à la fois biodégradables et injectables [47], [53], qui sont soit à base de polymères synthétiques, tels que le poly(alcool vinylique), les polypeptides, les polylactides, les polyesters, les polyphosphazènes et beaucoup d'autres ; soit à base de polymères naturels, comme le

chitosan, l'acide hyaluronique, les alginates, la gélatine, l'héparine, le sulfate de chondroïtine, *etc.* ; ou leurs mélanges.

Les hydrogels à base de polymères naturels sont très intéressants pour diverses applications, et pas uniquement pour l'ingénierie tissulaire. Les biopolymères sont issus de ressources renouvelables, ils sont complètement biocompatibles et biodégradables, et par conséquent ils s'inscrivent parfaitement dans la chimie dite « verte ». Ces polymères connaissent depuis quelques années un réel essor du fait de leur origine naturelle et surtout de leur caractère biodégradable. Leur utilisation en substitution ou même en mélange à d'autres polymères synthétisés à partir d'hydrocarbures offre des applications intéressantes. En effet, dans un monde où les matériaux recyclables ou biodégradables prennent peu à peu leur place, les biopolymères sont de plus en plus valorisés [54].

Les hydrogels à base de polymères naturels représentent donc un grand intérêt pour l'ingénierie tissulaire du cartilage [27], [55]. Les biopolymères comme l'acide hyaluronique [14], [56] ou les polysaccharides [57] ont été employés pour développer de nouveaux hydrogels pour les applications dans le domaine biomédical. Dans la famille des polysaccharides, c'est surtout la cellulose [51], le polymère le plus abondant dans la nature, et ses dérivés, [58] qui attirent l'attention ces dernières années pour le développement des hydrogels biocompatibles et biodégradables.

3.3. Structure, dynamique et propriétés mécaniques des hydrogels

Les hydrogels sont des systèmes très complexes à comprendre et à décrire. La description de leur structure et dynamique n'est pas facile. Il existe plusieurs modèles et théories sur la morphologie et les mouvements internes des hydrogels, mais même si les recherches progressent, il reste toujours beaucoup de questions sans réponse. Il faut donc prendre des précautions en se basant sur un modèle pour interpréter les résultats expérimentaux. Par ailleurs, les propriétés des gels dépendent fortement de leurs conditions de préparation et de leur composition. Par conséquent, la prédiction des propriétés d'un hydrogel est très difficile [23], [59].

3.3.1. Morphologie et structure

Un hydrogel peut être vu comme une matrice solide poreuse emprisonnant de l'eau. Un paramètre important qui décrit bien la matrice est la taille de ses pores d . Dans la littérature, il est possible de trouver des tailles de pore allant de quelques nanomètres aux centaines de micromètres, en fonction du type de polymère constituant la matrice, de la méthode de préparation, du taux d'hydratation et de la technique de caractérisation utilisée. Les principales techniques de caractérisation des matériaux poreux sont rassemblées sur la figure I.5 en fonction de leur résolution spatiale. Ainsi, une taille de pores nanométrique a été observée par microscopie électronique à transmission dans des hydrogels à base d'alginate contenant plus de 98 % massique d'eau [60]. D'autres études montrent que certains hydrogels à base de chitosan avec 97 % massique d'eau présentent une porosité de l'ordre de la dizaine de micromètre, déterminée par microscopie électronique à balayage, microscopie en mode environnemental et la porosimétrie par intrusion de mercure [61]. Généralement, la taille de pore diminue quand la concentration en polymère augmente, comme dans le cas des hydrogels à base d'arabinoxylane [62], qui passent d'une taille des pores d'environ 40 μm à une taille de 20 μm en augmentant la concentration du polymère de 0.5 à 1.5 % massiques.

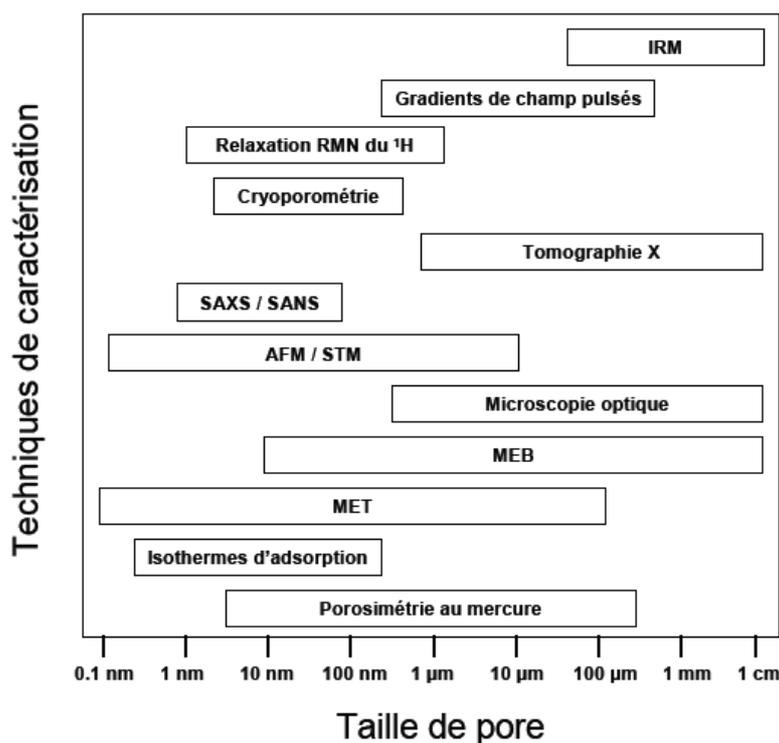


Figure I.5 : Principales techniques de caractérisation des matériaux poreux en fonction de la taille de pore à observer [63].

Un autre paramètre appelé paramètre de maille ζ est parfois utilisé pour décrire la structure de la matrice d'un hydrogel. Il s'agit de la distance moyenne entre deux nœuds de réticulation du réseau polymérique. Ce paramètre est de l'ordre du nanomètre et peut être calculé ou mesuré directement par différentes techniques spectroscopiques ou indirectement par exemple grâce aux résultats de rhéologie.

Ainsi, la morphologie d'un hydrogel peut être représentée de trois façons différentes, comme illustré sur la figure I.6. La figure I.6a montre un hydrogel dont la morphologie est caractérisée uniquement par une taille de pore moyenne d . Ces pores, remplis d'eau, ont des parois denses constituées de polymère. Une autre vision de la morphologie d'un hydrogel est présentée sur la figure I.6b : les chaînes de polymère forment un maillage homogène dans tout le volume, caractérisé par le paramètre de maille ζ . Enfin, la figure I.6c présente une situation intermédiaire entre les cas précédents : une structure hiérarchisée, avec de grands pores dont les parois, moins denses, sont elles-mêmes constituées d'un maillage de chaînes de polymère. Cette hiérarchisation peut être bien illustrée, encore une fois par le cas des hydrogels à base d'arabinoxylanes [62]. Dans

ce dernier cas, bien qu'ils aient des pores de l'ordre de 40 μm , leur paramètre de maille déterminé par le gonflement du réseau polymérique est d'environ 200-300 nm.

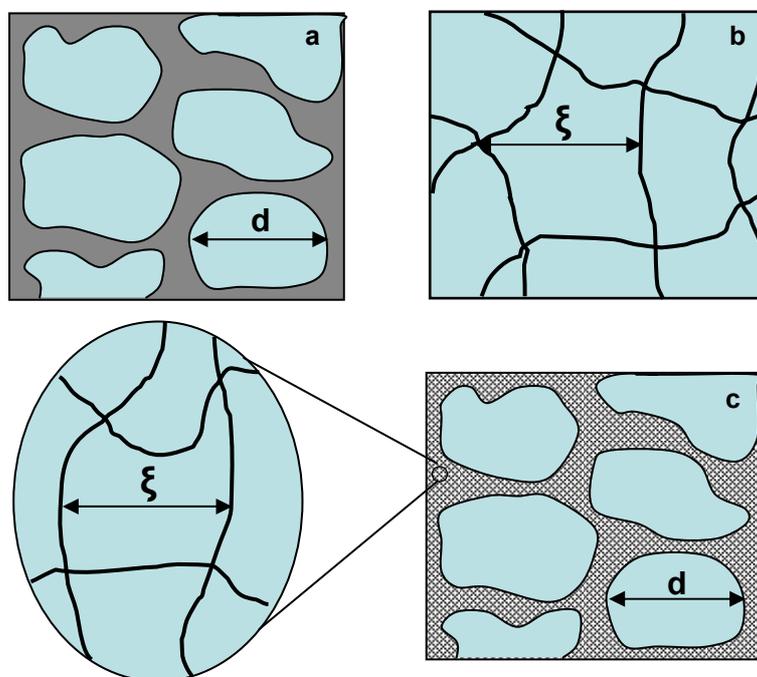


Figure I.6 : Représentation schématique de différentes morphologies d'un hydrogel : (a) grands pores remplis d'eau (en bleu) avec des parois de polymère denses (en gris) ; (b) maillage homogène de chaînes de polymère (en noir) gonflé d'eau ; (c) structure hiérarchisée avec des pores dont les parois sont moins denses, constituées d'un maillage de polymère. d : taille moyenne des pores ; ξ : paramètre de maille.

Il est donc indispensable de caractériser chaque nouveau gel pour connaître sa morphologie exacte. Dans tous les cas, il est essentiel de prendre des précautions pour que la morphologie du gel soit préservée pendant l'étape de caractérisation. Les hydrogels sont des systèmes très sensibles et difficiles à caractériser. En effet, toute variation de paramètre comme le taux d'hydratation par exemple peut conduire à des modifications de morphologie et l'image observée ne reflète pas la réalité de la structure du gel. Néanmoins la connaissance de la porosité d'un hydrogel est souvent primordiale pour sa mise en application. Par exemple pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, la taille des pores doit être suffisante pour pouvoir accueillir plusieurs cellules de type chondrocytes et leur permettre de se multiplier : elle doit donc se situer autour de 100-400 μm [64].

Etant donné que chaque hydrogel est constitué principalement d'eau, comprendre la nature, l'organisation et la dynamique de l'eau dans un tel système hautement hydraté est également nécessaire pour son développement et sa mise en application. Une des premières descriptions de la structure de l'eau dans les hydrogels provient de M. S. Jhon et J. D. Andrade [65]. Selon eux, il y aurait au moins 3 types d'eau différents dans un hydrogel quelconque :

- L'eau d'hydratation
- L'eau interfaciale
- L'eau classique appelée selon un anglicisme « bulk » (volume ou masse)

L'existence de ces trois différents types d'eau a été démontrée sur plusieurs types d'hydrogel par différentes techniques, comme la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie infrarouge ou la calorimétrie différentielle (DSC). Chaque type d'eau a ses propres caractéristiques, plus ou moins proches de l'eau classique non confinée. Elles ont été décrites par les chercheurs en s'appuyant sur les résultats expérimentaux [66]-[69].

Le comportement thermodynamique de l'eau dite « bulk » est proche de celui de l'eau classique, sa température de cristallisation/fusion se situe autour de 0 °C. Les molécules de ce type d'eau bougent librement à travers les pores dans tout le volume de l'hydrogel. Cette eau est aussi connue sous le nom « d'eau libre ». L'eau d'hydratation se trouve à la surface du réseau polymérique, elle constitue sa première couche d'hydratation. Ses molécules sont en interaction directe avec les parties hydrophiles du polymère via les liaisons hydrogène. De ce fait, ce type d'eau est parfois appelé « eau liée », même si ses molécules sont en échange rapide permanent entre un état lié et un état non-lié du fait de la courte durée de vie des liaisons hydrogène (inférieure à la picoseconde à température ambiante) [70]. Leur mobilité est néanmoins réduite. Par conséquent, la cristallisation/fusion de l'eau d'hydratation est décalée vers les températures beaucoup plus basses. On peut parfois rencontrer l'appellation « eau liée non-gelable », car la transition de phase n'est pas observée jusqu'à environ -70 °C. Finalement, l'eau interfaciale représente un état physique intermédiaire et est spatialement disposée entre les deux types d'eau précédents. Elle est en faible interaction avec l'eau de la première

couche d'hydratation ou le polymère. Sa température de cristallisation/fusion est seulement légèrement décalée vers les plus basses températures par rapport à celle de l'eau classique. C'est pourquoi on l'appelle également « eau lié gelable » ou encore « eau intermédiaire ».

La figure I.7 illustre les 3 types d'eau au sein d'un hydrogel à base de poly(N,N-diméthylacrylamide) [69]. Le gel hydraté qui contient les 3 types d'eau (à gauche) se dessèche progressivement jusqu'à ce qu'il ne contienne plus que de l'eau adsorbée sur le polymère, l'eau liée (à droite). Sur cet exemple, on peut voir que la présence de ces 3 types d'eau dans un hydrogel dépend de son taux d'hydratation et de la nature du polymère (hydrophile/hydrophobe) le constituant.

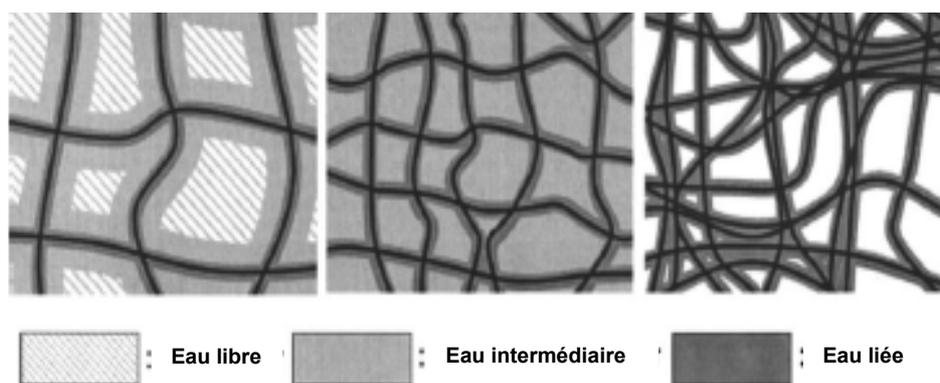


Figure I.7 : Illustration schématique des différents types d'eau présents dans un hydrogel, qui passe de l'état gonflé (à gauche) à l'état desséché (à droite). Repris de la référence [69].

3.3.2. Dynamique

Comme on vient de le voir, les hydrogels peuvent contenir de l'eau « bulk » qui se rapproche par ses caractéristiques de l'eau classique volumique. Les molécules d'eau en présentent la dynamique caractéristique. La technique expérimentale choisie pour étudier cette dynamique fournit des informations dans une gamme spectrale spatiale et temporelle qui lui est propre. La figure I.8 résume les éléments principaux de dynamique moléculaires corrélés avec leur gamme de temps caractéristiques et les techniques de adaptées à cette échelle temporelle.

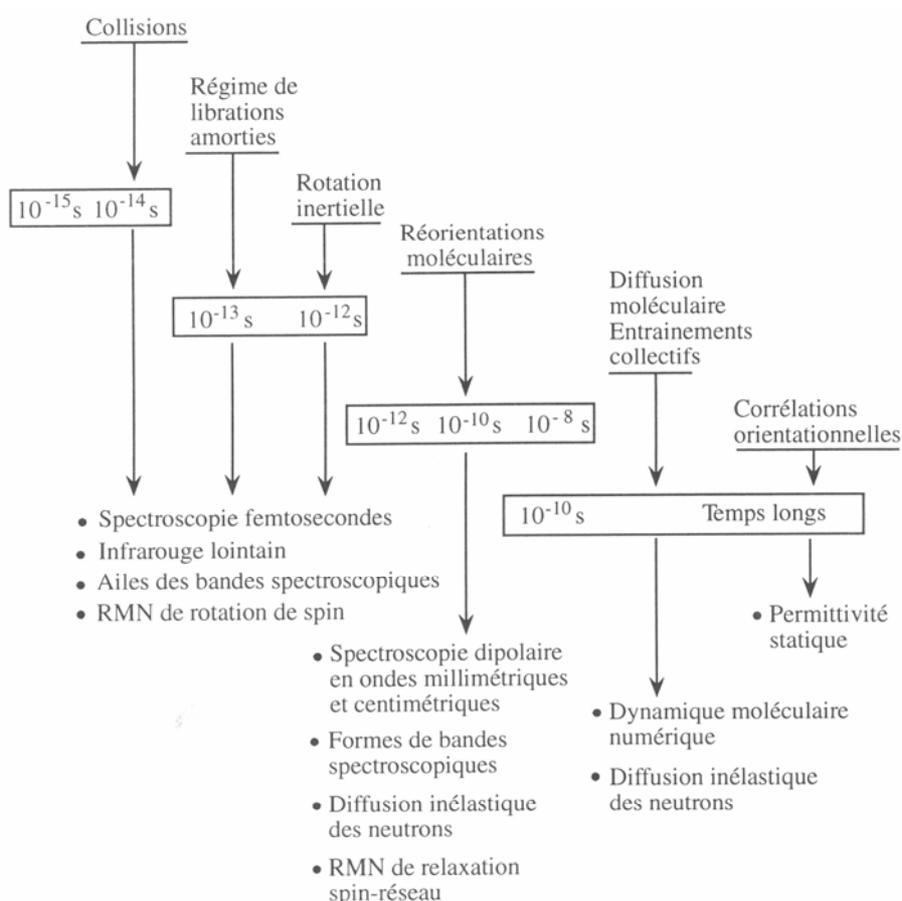


Figure I.8 : Mouvements moléculaires : échelle de temps et méthodes d'étude [71].

La dynamique moléculaire la plus intéressante à étudier dans le cas des hydrogels est sans doute la diffusion des molécules d'eau et des solutés. Une bonne diffusion au sein d'un hydrogel est nécessaire pour un grand nombre d'applications, y compris l'ingénierie tissulaire. La valeur du coefficient de diffusion D de l'eau volumique pure à température ambiante a été mesurée à $2.27 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ par la méthode de la cellule à diaphragme, une technique expérimentale qui permet de déterminer la diffusivité en phase liquide [72]. Cette valeur constitue un repère pour les mesures sur les hydrogels.

A une température donnée, la diffusion des molécules d'eau dépend de la tortuosité du réseau hôte ainsi que de leur affinité avec celui-ci. La diffusion peut être ralentie à cause de l'adsorption de l'eau sur le polymère. Par ailleurs, la diffusion varie également en fonction de la température, de la composition de la solution présente dans le gel et du taux d'hydratation ce qui peut contrebalancer l'effet de la tortuosité du réseau. Ainsi, le coefficient de diffusion des molécules d'eau dans des hydrogels à base de sucre

méthyl-4,6-O-benzylidène- α -D-glucopyranoside, mesuré par RMN à gradient de champ pulsé, est très proche de celui de l'eau volumique pure à l'échelle de temps observée (10 ms). Cependant, sa valeur varie légèrement en fonction de la densité du réseau hôte : elle diminue de 2.17 à $1.84 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour les concentrations en sucre allant de 1.5 à 5 % ($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) à 27 °C [73]. Ce résultat montre que la diffusion des molécules d'eau confinées dans ce type de gel dépend légèrement de sa composition, mais elle n'est globalement pas très affectée par la présence du réseau hôte sur un intervalle de temps de 10 ms. Grâce à ce résultat, les auteurs en concluent que la taille des pores dans ces gels doit être supérieure à 6 μm .

La diffusion des molécules autres que celles de l'eau (solutés) dépend aussi du rapport entre leur taille et la taille des pores ou le paramètre de maille de l'hydrogel donné. Plus le rayon hydrodynamique d'une molécule se rapproche de la taille de l'espace de confinement, pore ou maille, plus le coefficient de diffusion sera faible. Un suivi de leur diffusion est possible par exemple par RMN en faisant un marquage isotopique comme dans le cas de l'eau, ou avec des méthodes basées sur la fluorescence [62].

En adoptant un autre point de vue, on doit aussi considérer l'hydrogel comme une solution des chaînes polymériques enchevêtrées entre-elles, autrement dit s'intéresser à la structure et dynamique de la matrice. Le réseau polymérique d'un gel aussi bien que les molécules d'eau en interaction à sa surface possèdent une certaine dynamique [25]. L'étude de cette dynamique est envisageable, mais il faut alors bien choisir la technique expérimentale suivant l'échelle spatio-temporelle concernée.

3.3.3. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des hydrogels diffèrent de celles des solides conventionnels en particulier à cause de la haute teneur en eau. Leur comportement est souvent comparé à celui des caoutchoucs modifiés au dessus de la température de transition vitreuse et décrit en utilisant la théorie de l'élasticité caoutchoutique et de la viscoélasticité [74]. Les hydrogels sont des systèmes mous et élastiques aux propriétés mécaniques faibles. Ces dernières dépendent de plusieurs facteurs à la fois (type de

polymère, taux d'hydratation, densité de réticulation, environnement, *etc.*) et il est donc impossible de généraliser.

Les hydrogels sont capables de subir des changements de volume importants tout en se desséchant ou absorbant de l'eau ce qui induit des variations des autres propriétés, y compris la résistance mécanique. Pour illustrer l'effet du taux d'hydratation sur les propriétés mécaniques d'un hydrogel, on peut citer l'exemple typique d'un hydrogel à base de gélatine utilisé couramment dans la cuisine. Hydraté à 5 fois son poids sec, le module élastique d'un tel hydrogel est d'environ 0.8 MPa. Quand le taux d'hydratation augmente jusqu'à 40 fois son poids sec, le module élastique ne s'élève plus qu'à 40 kPa [25]. Ce comportement est caractéristique de la plupart des gels simples.

La rigidité du réseau polymérique joue aussi un rôle important dans la résistance mécanique des hydrogels. A taux d'hydratation égal, un hydrogel constitué d'un polymère rigide (par exemple carboxyméthylcellulose) sera plus résistant qu'un hydrogel à base d'un polymère flexible (polyacrylamide), même si la densité de liaisons entre les chaînes rigides est plus faible [23].

Pour des applications en ingénierie tissulaire du cartilage, il est souhaitable que le gel possède des propriétés mécaniques proches de celles du cartilage natif, une rigidité et en même temps une élasticité suffisante tout en gardant un taux d'hydratation élevé. Le cartilage subit des contraintes en cisaillement, traction et surtout en compression. Le module élastique en compression du cartilage articulaire varie entre quelques centaines de kPa et jusqu'à 1 MPa suivant l'articulation concernée [8], [75]. Comme on vient de le voir dans l'exemple du gel de gélatine, les modules des hydrogels hautement hydratés sont généralement assez faibles comparé aux modules du cartilage, on peut donc être tenté de les renforcer.

3.4. Stratégies de renforcement des hydrogels

Les faibles propriétés mécaniques de la plupart des hydrogels limitent souvent leur utilisation dans de nombreux domaines. Le domaine biomédical n'est pas une exception.

L'utilisation des hydrogels pour l'ingénierie tissulaire du cartilage nécessite des matériaux rigides, mais capables d'amortir les nombreux chocs exercés sur les articulations lors des mouvements du corps, tout en conservant les caractéristiques texturales nécessaires au développement des chondrocytes autologues. Il existe plusieurs moyens de renforcer ces systèmes hautement hydratés [74].

La stratégie la plus simple à laquelle on peut penser pour améliorer les propriétés mécaniques est d'augmenter la quantité de macromolécules dans les hydrogels. En effet, la résistance mécanique varie en fonction du taux de polymère comme illustré sur l'exemple de la gélatine dans le paragraphe précédent. En augmentant la proportion de la partie solide dans un gel, la quantité d'eau diminue en même temps. Malheureusement ceci peut être un point bloquant si on veut préserver un taux d'hydratation élevé. De plus, on est parfois confronté à une mauvaise dissolution ou miscibilité des macromolécules avec l'eau et il peut donc être difficile de jouer avec ce paramètre-là pour améliorer la tenue mécanique des hydrogels.

Une autre stratégie qui permet d'augmenter les propriétés mécaniques tout en gardant le même rapport solide/liquide est d'augmenter la densité des points de réticulation entre les différentes macromolécules, en rajoutant des agents de réticulation ou bien en augmentant le nombre de groupements fonctionnels créant les liaisons entre les chaînes polymériques. Une amélioration significative des propriétés mécaniques a pu ainsi être observée sur plusieurs types d'hydrogels [76], [77]. Cependant, les propriétés de diffusion ou d'absorption d'eau sont elles-aussi modifiées. Avec un réseau plus dense, la capacité d'absorber l'eau diminue généralement et la diffusivité des molécules est réduite.

Une troisième voie de renforcement des hydrogels est l'ajout d'une troisième composante, comme par exemple un autre polymère avec des propriétés différentes [78], [79]. Ce dernier peut de son côté former un nouveau réseau et renforcer ainsi le système. Dans ce cas, on parle souvent de deux réseaux interpénétrés, nommés dans la littérature internationale IPN pour « InterPenetrated Networks » [80], [81]. Le nouveau polymère peut également se lier au réseau déjà existant et lui rapporter du soutien. Dans cette

stratégie, il faut faire attention aux problèmes de miscibilité entre les deux polymères et au seuil de dissolution des polymères dans l'eau.

Enfin, rajouter des nanocharges pour élaborer des hydrogels nanocomposites constitue une alternative pour renforcer des hydrogels. Les nanocharges sont des particules dont au moins une dimension est dite nanométrique (par convention inférieur à 100 nm). La très petite taille des nanoparticules induit des propriétés physiques et chimiques qui diffèrent significativement de celles des matériaux massifs, en raison notamment du très grand rapport surface sur volume. Par conséquent, l'ajout des nanocharges dans un hydrogel peut permettre non seulement d'exalter ses propriétés mécaniques, mais également de lui donner de nouvelles capacités de répondre aux stimuli extérieurs, comme le champ magnétique ou la température [33], [82], [83]. Bien entendu, puisque certaines nanoparticules sont suspectées d'avoir des effets négatifs sur l'environnement et sur la santé [84], [85], il est essentiel de prendre des précautions et de se protéger en manipulant ces nano-objets mais aussi d'étudier la toxicité de l'hydrogel ainsi renforcé.

A ce jour, un grand nombre de nanocharges naturelles ou synthétiques est connu. De manière générale, les nanocharges sont classées en 3 groupes suivant le nombre de dimensions nanométriques. Ainsi, les particules dites abusivement zéro-dimensionnelles sont les particules dont les trois dimensions sont inférieures à 100 nm. Elles sont souvent synthétisées à partir des métaux [86]. On trouve parmi elles les boîtes quantiques dont les dimensions sont suffisamment faibles pour faire apparaître des effets quantiques. Les nanofibres ou les nanotubes sont des nanocharges unidimensionnelles dont le diamètre est à l'échelle nanométrique mais dont la longueur peut atteindre le micromètre ou plus, comme dans le cas des nanotubes de carbone [87]. Finalement, les nanocharges bidimensionnelles sont des feuillets ou des plaquettes d'une épaisseur nanométrique. On peut en donner pour exemple le graphène [88] ou les argiles [89].

Le mécanisme de renfort des hydrogels par ajout de nanocharges implique le transfert et la répartition des contraintes mécaniques entre matrice et charges. Pour cela il est en particulier nécessaire que les nanocharges soient bien dispersées au sein de

l'hydrogel nanocomposite. De plus, la formation d'un réseau continu percolant de nanocharges dans le gel conduit à un changement important des propriétés mécaniques. L'interface entre les nanocharges et la matrice du gel est elle-aussi importante, un contact suffisamment intime est essentiel pour que le transfert de contraintes mécaniques puisse avoir lieu [90], [91]. Les nanocharges isolées ou sans bonne adhésion vont agir plutôt comme des défauts et vont affaiblir le gel.

Pour obtenir un réseau percolant renforçant un hydrogel, une plus grande quantité de nanocharges sera nécessaire en utilisant des nanoparticules sphériques (0 D) qu'en prenant des nanocharges uni- ou bidimensionnelles. Ces effets de la dimensionnalité des charges ont déjà été observés dans la littérature. Des hydrogels nanocomposites de poly(N,N-diméthylacrylamide) contenant des nanocharges de silice sphériques ont été réalisés et une amélioration des propriétés mécaniques a été obtenue uniquement avec un taux volumique de 20-25 % de nanoparticules, pour lequel le module élastique passe de 1 kPa (hydrogel non chargé) à 20-40 kPa [92]. Inversement, un taux massique de 0.5 % de nanotubes de carbone a suffi pour augmenter considérablement la tenue mécanique d'hydrogels en alcool polyvinylique [93]. Leur module élastique augmente de plus de 78 % pour atteindre 0.57 MPa en rajoutant les nanotubes de carbone. Dans ces deux exemples, une bonne interaction entre la surface des nanocharge et le réseau de polymère est assurée. Les nanocharges présentant une anisotropie de forme sont donc beaucoup plus intéressantes pour le renforcement des hydrogels.

En fait, quand on examine plus attentivement la composition du cartilage articulaire, on peut dire qu'il s'agit également d'un hydrogel composite, renforcé avec environ 20% de fibres d'élastine et de collagène [25]. Cela suggère qu'un hydrogel nanocomposite contenant des nanofibres pourrait constituer un bon biomatériau pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. De plus, certaines nanocharges peuvent apporter d'autres fonctionnalités que le simple renfort mécanique : elles peuvent par exemple servir comme réservoirs de facteurs de croissance ou de principes actifs. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage, l'incorporation des nanofibres poreuses contenant des principes actifs au sein d'un hydrogel injectable pourrait favoriser la prolifération des cellules initiales et ainsi accélérer la régénération du cartilage. L'ajout de médicaments et

leur relargage progressif *in vivo* permettrait un traitement localisé de la douleur. Un exemple de telles nanocharges est donné par des nanoparticules de soie qui ont été employées dans le développement de nouveaux hydrogels bionanocomposites à base de soie pour la libération continue et contrôlée de molécules actives [94]. Bien entendu, l'incorporation des nanoparticules dans les hydrogels doit préserver le caractère non-toxique et la biocompatibilité du matériau final si l'application en ingénierie tissulaire du cartilage est visée.

4. Les polysaccharides

4.1. Généralités

Les polysaccharides sont des polymères naturels synthétisés par des organismes vivants. Ils entrent dans la composition de la plupart des cellules aussi bien animales et végétales que microbiennes. La cellulose, l'amidon ou le chitosan sont les polysaccharides les plus connus [54]. Leurs unités de base sont représentées sur la figure I.9.

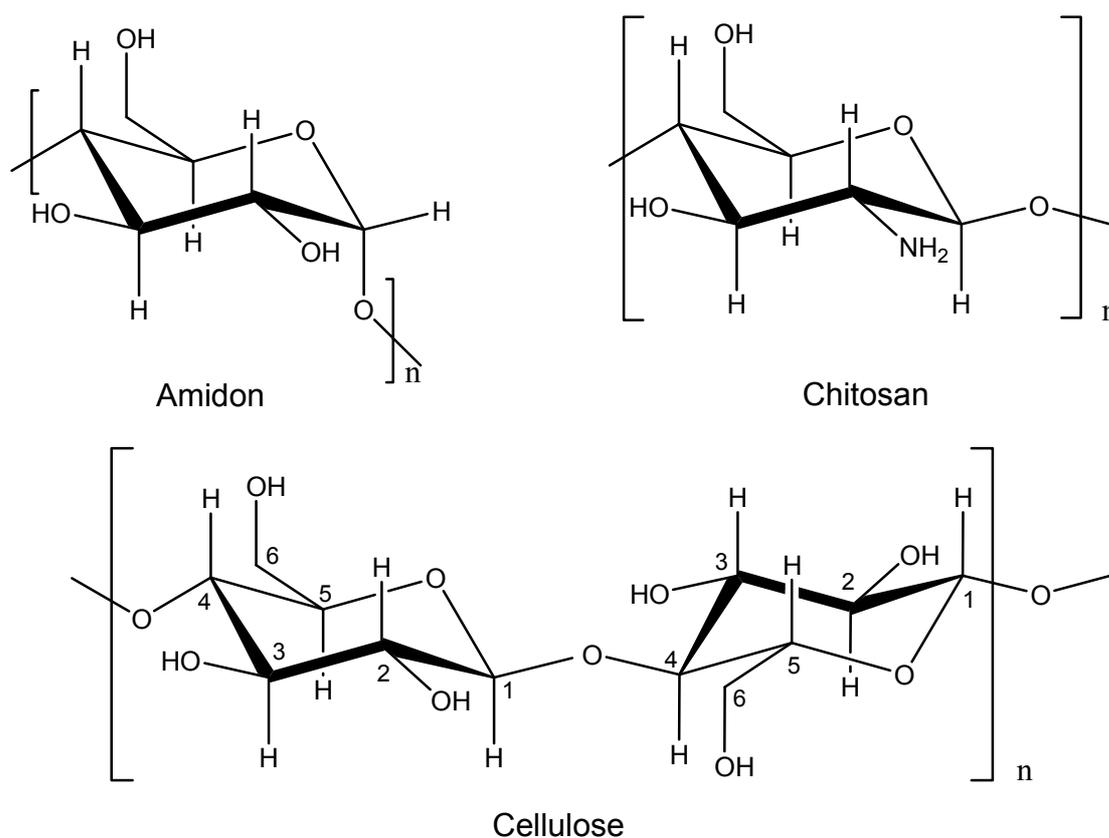


Figure I.9 : Formules chimiques de l'amidon, du chitosan et de la cellulose, n indique le degré de polymérisation, les atomes de carbone des unités glucosidiques de la cellulose sont numérotés de 1 à 6.

La chaîne moléculaire des polysaccharides est constituée de monomères glucides, appelés « oses », connus également sous nom de sucres. Les glucides sont des composés contenant entre 3 et 9 atomes de carbone, un groupement carbonyle (aldéhyde ou cétone) et plusieurs groupements hydroxyle. Ils sont classés suivant leur nombre d'atomes de carbone : trioses (3 atomes de carbone), tetroses (4 carbones), pentoses (5 carbones), et ainsi de suite. Les glucides sont chiraux : on parle d'isomérisation D-L qui s'exprime conventionnellement en orientant l'avant-dernier groupement hydroxyle (du haut vers le bas) vers la droite pour la série D, ou vers la gauche pour la série L [95]. Un exemple d'un D-hexose nommé D-glucose, comportant 6 atomes de carbone, 5 groupements hydroxyle et un groupement aldéhyde, est représenté sur la figure I.10.

Pour former une chaîne de polysaccharide, il faut que les oses qui comportent un groupement aldéhyde et plus de 4 atomes de carbone soient en forme cyclique et non pas linéaire. La formation d'un cycle est possible en milieu acide grâce à la réaction entre

l'aldéhyde et un alcool présent sur la même molécule. Cette réaction conduit encore une fois à deux isomères, dits anomères α et β , qui diffèrent par la position d'un groupement hydroxyle (voir figure I.10). Les oses cycliques se lient ensuite entre eux par des liaisons dites « O-osidiques », car il y a toujours un atome d'oxygène entre deux molécules de glucide, résultat d'une condensation entre deux groupements hydroxyle. Un polysaccharide est généralement composé de quelques centaines jusqu'à quelques milliers de glucides.

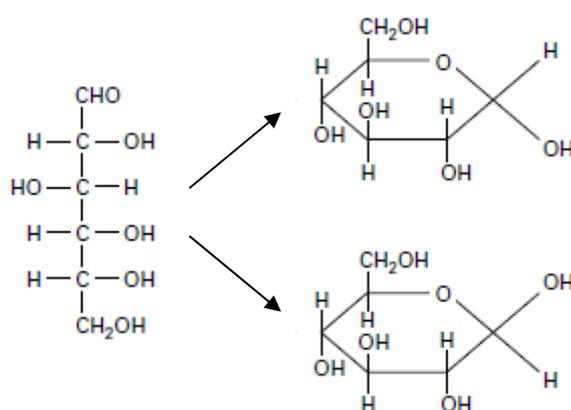


Figure I.10 : D-glucose en forme linéaire et deux formes cycliques possibles : anomère α -D-glucopyranose (en haut) et β -D-glucopyranose (en bas). Repris de la référence [95].

4.2. La cellulose et ses dérivés

La cellulose est un polysaccharide produit entre autres par photosynthèse. Etant la composante la plus importante de la paroi végétale, on peut dire que la cellulose est la matière première organique la plus abondante dans la nature, pratiquement inépuisable, renouvelable et bien sûr biodégradable [96]. Cinquante milliards de tonnes de cellulose sont produites chaque année par les plantes, les algues et certaines bactéries. La cellulose est la macromolécule la plus abondante sur la Terre [52].

Sa formule chimique est donnée figure I.9. La chaîne de la cellulose est linéaire, constituée de molécules de β -D-glucopyranose, telle que représentée sur la figure I.10. Les glucopyranoses sont reliés entre eux par des liaisons O-glycosidiques β -(1 \rightarrow 4), c'est-à-dire les liaisons -C-O-C- entre les atomes de carbone 1 et 4 des deux sucres voisins. A

l'état solide, ces deux sucres voisins présentent une rotation autour de la liaison glycosidique de 180° l'un par rapport à l'autre à cause des contraintes imposées par la liaison β . On peut en déduire qu'une unité de répétition de la chaîne cellulosique est formée de deux glucopyranoses, il s'agit d'un dimère appelé cellobiose.

La cellulose fait partie des homopolymères, car toutes ses unités de répétition sont de même nature chimique. Son degré de polymérisation (DP) peut varier de quelques centaines à des dizaines de milliers selon l'origine (coton, bois, *etc.*) et le traitement de préparation. Dans la pratique, la cellulose est toujours polydisperse, c'est-à-dire qu'elle contient un mélange de chaînes de différentes longueurs. C'est pourquoi sa masse moléculaire ou le DP ne peuvent être exprimés qu'en valeurs moyennes. La cellulose peut également être produite par certaines bactéries; dans ce cas, elle est appelée biocellulose ou cellulose bactérienne [97], [98]. Cependant, même si cette dernière présente quelques avantages comparée à la cellulose végétale, notamment une plus grande pureté (la paroi végétale contient également de la lignine et de l'hémicellulose), elle n'est pas commercialisée en grande-échelle à cause de sa synthèse relativement difficile et coûteuse.

La cellulose est utilisée depuis des milliers d'années sous forme de bois ou de coton, comme source d'énergie, matériau de construction, pour fabriquer du papier ou des vêtements, et même dans le domaine pharmaceutique et alimentaire. Aujourd'hui, il existe un grand nombre de fibres synthétiques basées sur la modification chimique des fibres cellulosiques, comme par exemple la viscose. Les propriétés et la réactivité chimique de la cellulose sont déterminées par les interactions intermoléculaires, les réactions de réticulation, les longueurs des chaînes et leur distribution.

Grâce à la multitude de groupements hydroxyles $-OH$ tout le long de la chaîne, la cellulose est très hydrophile et présente une grande aptitude pour des modifications chimiques, car ces groupements sont assez réactifs. De plus, les liaisons β sont susceptibles d'attaques hydrolytiques. En fait, toutes les réactions chimiques possibles ont lieu uniquement sur les liaisons glycosidiques et/ou les groupements hydroxyles [99]. Les groupements hydroxyles forment des liaisons hydrogène intramoléculaires entre deux cycles de glucopyranose voisins impliquant ainsi les groupements $-OH$ des atomes de

carbone 2 et 6, et le groupement -OH des atomes de carbone 3 et l'atome d'oxygène endocyclique.

Les groupements hydroxyyles jouent un rôle important en ce qui concerne la solubilité de la cellulose : elle est insoluble dans la plupart des solvants organiques et dans l'eau [99]. En effet, outre les liaisons intramoléculaires, les chaînes cellulosiques sont très fortement reliées entre-elles via des liaisons hydrogène entre les groupements -OH des atomes de carbone 6 et 3 créant ainsi différentes structures et morphologies fibreuses partiellement cristallines [96]. Ce réseau de liaisons hydrogène est tellement fort que la cellulose ne présente pas de fusion avant sa dégradation thermique [100]. À cause du caractère hydrophile, les molécules d'eau adsorbées jouent un rôle important dans la formation de ces liaisons. Par suite de sa structure supramoléculaire, l'état solide de la cellulose est donc représenté par une alternance de régions cristallisées (le taux de cristallinité peut atteindre jusqu'à 80%) et de régions désordonnées (amorphes à la diffraction).

Pour dissoudre la cellulose, il faut rompre les liaisons hydrogène ce qui n'est pas évident en utilisant les solvants ordinaires. Les solvants couramment employés pendant la dissolution de la cellulose sont volatils ou génèrent des gaz dangereux et toxiques [101]. Ceci est particulièrement gênant si on veut utiliser la cellulose comme polymère « vert », non toxique et biocompatible, alors que le traitement de dissolution n'est pas du tout écologique. Cependant, une bonne dissolution est nécessaire pour réaliser des réactions en phase homogène sans dérivatisation préalable. Des études menées depuis quelques années ont montré que certains liquides ioniques démontrent un fort potentiel de solubilisation de la cellulose [102]. L'utilisation de liquides ioniques offre donc de nouvelles voies pour la modification et dérivatisation de la cellulose, nous y reviendrons brièvement dans le chapitre 2.

Pour satisfaire à divers besoins industriels, la cellulose est souvent modifiée physiquement, chimiquement, enzymatiquement ou génétiquement, ce qui fait varier son hydrophobicité, l'encombrement stérique local de la chaîne voire la charge électrique de la molécule. Les modifications chimiques, basées sur des réactions des groupements

hydroxyles, conduisent à la formation de dérivés cellulosiques de type esters et éthers en introduisant des groupements méthyle, hydroxypropyle, hydroxyéthyle ou carboxyméthyle [96], [100]. Des substitutions mixtes peuvent être faites pour obtenir par exemple l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC).

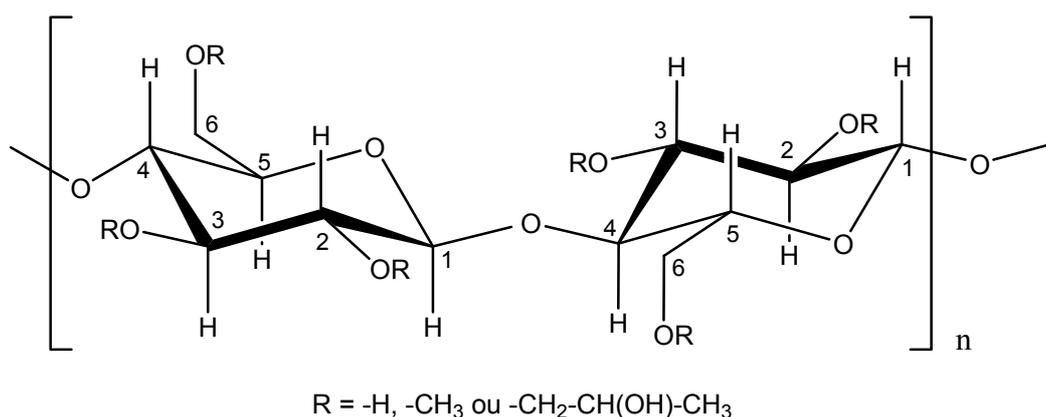


Figure I.11 : Formule chimique de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), n indique le degré de polymérisation ; la position des groupements fonctionnels (R) est complètement aléatoire tout le long de la chaîne.

L'HPMC est l'un des dérivés cellulosiques le plus couramment employé. Sa structure est représentée sur la figure I.11. Les différents groupements fonctionnels ($-R$) ne sont pas distribués de façon régulière le long de la chaîne. Les propriétés physicochimiques de ce polymère semi-synthétique sont très influencées par le taux de groupements méthoxy ($-O-CH_3$) et hydroxypropyle ($-CH_2-CH(OH)-CH_3$), ainsi que par la masse moléculaire [103]. Par exemple, le taux d'humidité de l'HPMC augmente avec l'augmentation du nombre de groupements hydroxypropyles.

L'HPMC se présente sous forme d'une poudre blanche qui est caractérisée par sa capacité de rétention d'eau, sa non-toxicité, sa stabilité sur une large gamme de pH (entre 2 et 13), son activité de surface, sa viscoélasticité, sa solubilité dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques polaires. L'HPMC peut subir une gélification thermoréversible après sa dissolution dans l'eau [104]. Effectivement, l'HPMC est soluble dans l'eau froide et sa solution se transforme de manière réversible en gel physique en chauffant. Grâce à toutes ses propriétés, l'HPMC est couramment utilisée dans les aliments (émulsifiant, épaississant, qui remplace la gélatine animale) ; dans ce contexte

elle est référencée E464 selon la directive européenne 95/2/CE. L'HPMC peut également servir comme lubrifiant ophtalmique, dans les produits cosmétiques, les médicaments, et les biomatériaux [27], [103], [105].

Nous reviendrons sur l'HPMC qui nous servira de matrice pour la construction de nos hydrogels dans la suite de ce manuscrit.

5. Conclusion

La dégradation du cartilage articulaire due aux maladies dégénératives, à une activité sportive excessive ou encore au surpoids, concerne aujourd'hui une grande partie de la population mondiale. Du fait de la faible capacité d'auto-réparation du cartilage, le seul traitement efficace pour le moment est une opération chirurgicale et le remplacement total de l'articulation par un implant. Cependant, de telles opérations sont douloureuses et très coûteuses. La recherche s'oriente actuellement vers l'ingénierie tissulaire du cartilage, une technique qui fait partie de la médecine dite régénérative, car elle consiste en remplacement du cartilage par un biomatériau contenant des cellules précurseurs imitant le cartilage natif et permettant sa reconstitution progressive. Pour limiter l'impact d'un acte chirurgical sur le patient, la médecine régénérative se tourne aujourd'hui vers les techniques de chirurgie micro-invasive. Dans ce cadre, l'utilisation des hydrogels injectables, à base de polymères biocompatibles et si possible biodégradables, présente un grand intérêt pour le traitement des endommagements du cartilage.

Les hydrogels sont des matériaux connus depuis plus de 50 ans, mais du fait de leur grande diversité, ils ne sont toujours pas très bien compris ni décrits. Il est nécessaire de caractériser chaque nouveau type d'hydrogel comme un système à part, et une généralisation des descriptions de leurs structures ou de leurs propriétés dynamiques est très limitée. A cause de leur taux d'hydratation élevé, la plupart des hydrogels possèdent de faibles propriétés mécaniques qui limitent souvent leur utilisation. C'est pourquoi il est souhaitable de développer de nouveaux hydrogels avec de meilleures propriétés mécaniques tout en gardant un taux d'hydratation important. Une des possibilités assez largement explorée aujourd'hui est l'ajout de nanoparticules dans les hydrogels pour

exalter leur résistance mécanique. De tels hydrogels peuvent ainsi être appelés « hydrogels nanocomposites ». La gamme de nanoparticules disponibles est très large, le choix doit être fait en fonction de la future application de l'hydrogel. L'utilisation d'un hydrogel nanocomposite en tant que biomatériau pour l'ingénierie tissulaire du cartilage nécessite non seulement les propriétés mécaniques les plus proches du cartilage natif, mais également un caractère biocompatible qui doit rester préservé.

Dans la suite de ce travail, nous explorerons les hydrogels à base d'HPMC pour application éventuelle en ingénierie tissulaire du cartilage et leur renfort par des nanocharges : les nanofibres de silice mésoporeuses.

Références bibliographiques

- [1] Hynes, R. O., The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* **2009**, 326, (5957), 1216-1219.
- [2] International Cartilage Repair Society. <http://www.cartilage.org/> (Consulté le **10 Juillet 2012**).
- [3] Le Pen, C.; Reygrobelle, C.; Gérentes, I., Les conséquences socioéconomiques de l'arthrose en France. Etude COART France. *Revue du Rhumatisme* **2005**, 72, (12), 1326-1330.
- [4] Buckwalter, J. A., Articular Cartilage: Injuries and Potential for Healing. *Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy* **1998**, 28, (4), 192-202.
- [5] Chirurgie de la hanche, du genou et de l'épaule. <http://www.hanche-genou-epaule.com/> (Consulté le **15 Juillet 2012**).
- [6] Mansat, C.; Mazières, B.; Maheu, E.; Bahuaud, J.; Dreiser, R.-L., Traitement local de l'arthrose. *La lettre de l'observatoire du mouvement* **2006**, (18), 1-14.
- [7] Tuli, R.; Li, W.-J.; Tuan, R., Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy* **2003**, 5, (5), 235 - 238.
- [8] Levental, I.; Georges, P. C.; Janmey, P. A., Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* **2007**, 3, (3), 299-306.
- [9] Vinatier, C.; Mrugala, D.; Jorgensen, C.; Guicheux, J.; Noël, D., Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in Biotechnology* **2009**, 27, (5), 307-314.
- [10] Discher, D. E.; Mooney, D. J.; Zandstra, P. W., Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* **2009**, 324, (5935), 1673-1677.
- [11] Von Der Mark, K.; Gauss, V.; Von Der Mark, H.; Muller, P., Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* **1977**, 267, (5611), 531-532.
- [12] Jonker, A. M.; Löwik, D. W. P. M.; van Hest, J. C. M., Peptide- and Protein-Based Hydrogels. *Chemistry of Materials* **2012**, 24, (5), 759-773.
- [13] Thein-Han, W. W.; Kitiyanant, Y.; Misra, R. D. K., Chitosan as scaffold matrix for tissue engineering. *Materials Science and Technology* **2008**, 24, (9), 1062-1075.

- [14] Burdick, J. A.; Prestwich, G. D., Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2011**, 23, (12), H41-H56.
- [15] Muzzarelli, R. A. A.; Greco, F.; Busilacchi, A.; Sollazzo, V.; Gigante, A., Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 89, (3), 723-739.
- [16] Cui, J.; Lackey, M. A.; Madkour, A. E.; Saffer, E. M.; Griffin, D. M.; Bhatia, S. R.; Crosby, A. J.; Tew, G. N., Synthetically Simple, Highly Resilient Hydrogels. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (3), 584-588.
- [17] Amsden, B., Curable, biodegradable elastomers: emerging biomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Soft Matter* **2007**, 3, (11), 1335-1348.
- [18] Lee, K. Y.; Mooney, D. J., Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews* **2001**, 101, (7), 1869-1880.
- [19] Drury, J. L.; Mooney, D. J., Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **2003**, 24, (24), 4337-4351.
- [20] Slaughter, B. V.; Khurshid, S. S.; Fisher, O. Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N. A., Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials* **2009**, 21, (32-33), 3307-3329.
- [21] Yu, L.; Ding, J., Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews* **2008**, 37, (8), 1473-1481.
- [22] Nair, L. S.; Laurencin, C. T.; Tandon, M., Injectable Hydrogels as Biomaterials. In *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc.: **2009**; pp 179-203.
- [23] Adam, M.; Bastide, J.; Candau, S. J.; Cohen Addad, J. P.; Joanny, J. F.; Lairez, D.; Oppermann, W.; Schröder, U. P.; de Gennes, P. G., *Physical properties of polymeric gels*. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, **1996**.
- [24] Deligkaris, K.; Tadele, T. S.; Olthuis, W.; van den Berg, A., Hydrogel based devices for biomedical applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, 147, (2), 765-774.
- [25] Calvert, P., Hydrogels for Soft Machines. *Advanced Materials* **2009**, 21, (7), 743-756.
- [26] Wichterle, O.; Lim, D., Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **1960**, 185, (4706), 117-118.

- [27] Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E., Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* **2011**, 12, (5), 1387-1408.
- [28] Zohuriaan-Mehr, M.; Omidian, H.; Doroudiani, S.; Kabiri, K., Advances in non-hygienic applications of superabsorbent hydrogel materials. *Journal of Materials Science* **2010**, 45, (21), 5711-5735.
- [29] Rimmer, S., Synthesis of hydrogels for biomedical applications: control of structure and properties. In *Biomedical hydrogels*, Rimmer, S., Ed. Woodhead Publishing in Materials: Cambridge, **2011**; pp 51-62.
- [30] Hendrickson, G. R.; Andrew Lyon, L., Bioresponsive hydrogels for sensing applications. *Soft Matter* **2009**, 5, (1), 29-35.
- [31] Richter, A.; Gerlach, G.; Arndt, K.-F., Hydrogels for Actuators. In *Hydrogel Sensors and Actuators*, Wolfbeis, O. S., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2010**; Vol. 6, pp 221-248.
- [32] Kopecek, J., Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials* **2007**, 28, (34), 5185-5192.
- [33] Satarkar, N. S.; Biswal, D.; Hilt, J. Z., Hydrogel nanocomposites: a review of applications as remote controlled biomaterials. *Soft Matter* **2010**, 6, (11), 2364-2371.
- [34] Guiseppi-Elie, A., Electroconductive hydrogels: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials* **2010**, 31, (10), 2701-2716.
- [35] Guo, B.; Finne-Wistrand, A.; Albertsson, A.-C., Facile Synthesis of Degradable and Electrically Conductive Polysaccharide Hydrogels. *Biomacromolecules* **2011**, 12, (7), 2601-2609.
- [36] Choudhury, N. A.; Sampath, S.; Shukla, A. K., Hydrogel-polymer electrolytes for electrochemical capacitors: an overview. *Energy & Environmental Science* **2009**, 2, (1), 55-67.
- [37] Khaleque, T.; Abu-Salih, S.; Saunders, J. R.; Moussa, W., Experimental Methods of Actuation, Characterization and Prototyping of Hydrogels for BioMEMS/NEMS Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2011**, 11, (3), 2470-2479.

- [38] Muzzarelli, R. A. A., Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 77, (1), 1-9.
- [39] Daculsi, G.; Weiss, P.; Dupraz, A.; Lapkowski, M. Coomposition for biomaterials, methods of preparation. *Brevet FR 95-9582* **1995**, *Brevet WO A1 9705911* **1997**.
- [40] Floren, M. L.; Spilimbergo, S.; Motta, A.; Migliaresi, C., Carbon Dioxide Induced Silk Protein Gelation for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (7), 2060-2072.
- [41] Kang, E. Y.; Moon, H. J.; Joo, M. K.; Jeong, B., Thermogelling Chitosan-g-(PAF-PEG) Aqueous Solution As an Injectable Scaffold. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (6), 1750-1757.
- [42] Ekenseair, A. K.; Boere, K. W. M.; Tzouanas, S. N.; Vo, T. N.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G., Synthesis and Characterization of Thermally and Chemically Gelling Injectable Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (6), 1908-1915.
- [43] Zhang, Y.; Ji, C., Electro-Induced Covalent Cross-Linking of Chitosan and Formation of Chitosan Hydrogel Films: Its Application as an Enzyme Immobilization Matrix for Use in a Phenol Sensor. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, (12), 5275-5281.
- [44] Kadłubowski, S.; Henke, A.; Ulański, P.; Rosiak, J. M.; Bromberg, L.; Hatton, T. A., Hydrogels of polyvinylpyrrolidone (PVP) and poly(acrylic acid) (PAA) synthesized by photoinduced crosslinking of homopolymers. *Polymer* **2007**, 48, (17), 4974-4981.
- [45] Zhao, Z.; Li, Z.; Xia, Q.; Xi, H.; Lin, Y., Fast synthesis of temperature-sensitive PNIPAAm hydrogels by microwave irradiation. *European Polymer Journal* **2008**, 44, (4), 1217-1224.
- [46] Jovanović, Ž.; Krklješ, A.; Stojkowska, J.; Tomić, S.; Obradović, B.; Mišković-Stanković, V.; Kačarević-Popović, Z., Synthesis and characterization of silver/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel nanocomposite obtained by in situ radiolytic method. *Radiation Physics and Chemistry* **2011**, 80, (11), 1208-1215.
- [47] Nguyen, M. K.; Lee, D. S., Injectable Biodegradable Hydrogels. *Macromolecular bioscience* **2010**, 10, (6), 563-579.

- [48] Delair, T., In situ Forming Polysaccharide-based 3D-Hydrogels for Cell Delivery in Regenerative Medicine. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 87, (2), 1013-1019.
- [49] Klouda, L.; Mikos, A. G., Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, 68, (1), 34-45.
- [50] Park, M. H.; Joo, M. K.; Choi, B. G.; Jeong, B., Biodegradable Thermogels. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45, (3), 424-433.
- [51] Sannino, A.; Demitri, C.; Madaghiele, M., Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. *Materials* **2009**, 2, (2), 353-373.
- [52] Castelan, G., Polymères biodégradables. *Technique de l'ingénieur* **2007**, BIO4150.
- [53] Li, Y.; Rodrigues, J.; Tomas, H., Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, (6), 2193-2221.
- [54] Jarroux, N., Les biopolymères: différentes familles, propriétés et applications. *Technique de l'ingénieur* **2008**, AM3580.
- [55] Balakrishnan, B.; Banerjee, R., Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Chemical Reviews* **2011**, 111, (8), 4453-4474.
- [56] Xu, X.; Jha, A. K.; Harrington, D. A.; Farach-Carson, M. C.; Jia, X., Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter* **2012**, 8, (12), 3280-3294.
- [57] Söderqvist Lindblad, M.; Sjöberg, J.; Albertsson, A.-C.; Hartman, J., Hydrogels from Polysaccharides for Biomedical Applications. In *Materials, Chemicals, and Energy from Forest Biomass*, American Chemical Society: **2007**; Vol. 954, pp 153-167.
- [58] Chang, C.; Zhang, L., Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 84, (1), 40-53.
- [59] Shapiro, Y. E., Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. *Progress in Polymer Science* **2011**, 36, (9), 1184-1253.
- [60] Leal-Egana, A.; Braumann, U.-D.; Diaz-Cuenca, A.; Nowicki, M.; Bader, A., Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface. *Journal of Nanobiotechnology* **2011**, 9, (1), 24.

- [61] Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M., In Situ Forming Chitosan Hydrogels Prepared via Ionic/Covalent Co-Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2011**, 12, (9), 3275-3284.
- [62] Paës, G.; Chabbert, B., Characterization of Arabinoxylan/Cellulose Nanocrystals Gels to Investigate Fluorescent Probes Mobility in Bioinspired Models of Plant Secondary Cell Wall. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (1), 206-214.
- [63] Jaffel, H. Caractérisation multi-échelles de matériaux poreux en évolution: cas du plâtre. *Thèse de doctorat*, Ecole Polytechnique ParisTech, Centre de Recherche du groupe Lafarge, Palaiseau, **2006**.
- [64] Xu, F.; Sridharan, B.; Durmus, N. G.; Wang, S.; Yavuz, A. S.; Gurkan, U. A.; Demirci, U., Living Bacterial Sacrificial Porogens to Engineer Decellularized Porous Scaffolds. *PLoS ONE* **2011**, 6, (4), e19344.
- [65] Jhon, M. S.; Andrade, J. D., Water and hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research* **1973**, 7, (6), 509-522.
- [66] Qu, X.; Wirsén, A.; Albertsson, A. C., Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer* **2000**, 41, (12), 4589-4598.
- [67] Li, X.; Cui, Y.; Xiao, J.; Liao, L., Hydrogel–hydrogel composites: The interfacial structure and interaction between water and polymer chains. *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, 108, (6), 3713-3719.
- [68] Ostrowska-Czubenko, J.; Gierszewska-Druzynska, M., Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 77, (3), 590-598.
- [69] Sekine, Y.; Ikeda-Fukazawa, T., Structural changes of water in a hydrogel during dehydration. *The Journal of Chemical Physics* **2009**, 130, (3), 034501-7.
- [70] Tamai, Y.; Tanaka, H.; Nakanishi, K., Molecular Dynamics Study of Polymer-Water Interaction in Hydrogels. 2. Hydrogen-Bond Dynamics. *Macromolecules* **1996**, 29, (21), 6761-6769.
- [71] Gerschel, A., *Liaisons intermoléculaires: Les forces en jeu dans la matière condensée*. EDP Sciences: Paris, **1995**; p 274.
- [72] Tanaka, K., Self-diffusion coefficients of water in pure water and in aqueous solutions of several electrolytes with ^{18}O and ^2H as tracers. *Journal of the*

- Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **1978**, 74, 1879-1881.
- [73] Kowalczyk, J.; Jarosz, S.; Tritt-Goc, J., Characterization of low molecular-weight gelator methyl-4,6-O-(p-nitrobenzylidene)-[alpha]-d-glucopyranoside hydrogels and water diffusion in their networks. *Tetrahedron* **2009**, 65, (47), 9801-9806.
- [74] Anseth, K. S.; Bowman, C. N.; Brannon-Peppas, L., Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* **1996**, 17, (17), 1647-1657.
- [75] Mansour, J. M., Biomechanics of cartilage. In *Kinesiology: the Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*, Oatis, C. A., Ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, **2003**; pp 66-79.
- [76] Fonseca Silva, T. C.; Habibi, Y.; Colodette, J. L.; Lucia, L. A., The influence of the chemical and structural features of xylan on the physical properties of its derived hydrogels. *Soft Matter* **2011**, 7, (3), 1090-1099.
- [77] Toh, W. S.; Lim, T. C.; Kurisawa, M.; Spector, M., Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials* **2012**, 33, (15), 3835-3845.
- [78] Rederstorff, E.; Weiss, P.; Sourice, S.; Pilet, P.; Xie, F.; Siquin, C.; Collic-Jouault, S.; Guicheux, J.; Laïb, S., An in vitro study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, (5), 2119-2130.
- [79] Ibrahim, S.; Kothapalli, C. R.; Kang, Q. K.; Ramamurthi, A., Characterization of glycidyl methacrylate - Crosslinked hyaluronan hydrogel scaffolds incorporating elastogenic hyaluronan oligomers. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, (2), 653-665.
- [80] Barbucci, R.; Giardino, R.; De Cagna, M.; Golini, L.; Pasqui, D., Inter-penetrating hydrogels (IPhs) as a new class of injectable polysaccharide hydrogels with thixotropic nature and interesting mechanical and biological properties. *Soft Matter* **2010**, 6, (15), 3524-3532.
- [81] Xia, Y.-q.; Guo, T.-y.; Song, M.-d.; Zhang, B.-h.; Zhang, B.-l., Hemoglobin Recognition by Imprinting in Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogel Based on Polyacrylamide and Chitosan. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (5), 2601-2606.

- [82] Schexnaider, P.; Schmidt, G., Nanocomposite polymer hydrogels. *Colloid & Polymer Science* **2009**, 287, (1), 1-11.
- [83] Messing, R.; Schmidt, A. M., Perspectives for the mechanical manipulation of hybrid hydrogels. *Polymer Chemistry* **2011**, 2, (1), 18-32.
- [84] Buzea, C.; Pacheco, I.; Robbie, K., Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* **2007**, 2, (4), MR17-MR71.
- [85] Peralta-Videa, J. R.; Zhao, L.; Lopez-Moreno, M. L.; de la Rosa, G.; Hong, J.; Gardea-Torresdey, J. L., Engineering Nanomaterials in the Environment; Are they a Hazard? A review. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, 186, (1), 1-15.
- [86] Rao, C. N. R.; Kulkarni, G. U.; Thomas, P. J.; Edwards, P. P., Metal nanoparticles and their assemblies. *Chemical Society Reviews* **2000**, 29, (1), 27-35.
- [87] Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, 354, (6348), 56-58.
- [88] Geim, A. K.; Novoselov, K. S., The rise of graphene. *Nature Materials* **2007**, 6, (3), 183-191.
- [89] Haraguchi, K., Nanocomposite hydrogels. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2007**, 11, (3-4), 47-54.
- [90] Ahmed, S.; Jones, F. R., A review of particulate reinforcement theories for polymer composites. *Journal of Materials Science* **1990**, 25, (12), 4933-4942.
- [91] Fu, S.-Y.; Feng, X.-Q.; Lauke, B.; Mai, Y.-W., Effects of particle size, particle/matrix interface adhesion and particle loading on mechanical properties of particulate-polymer composites. *Composites Part B: Engineering* **2008**, 39, (6), 933-961.
- [92] Carlsson, L.; Rose, S.; Hourdet, D.; Marcellan, A., Nano-hybrid self-crosslinked PDMA/silica hydrogels. *Soft Matter* **2010**, 6, (15), 3619-3631.
- [93] Tong, X.; Zheng, J.; Lu, Y.; Zhang, Z.; Cheng, H., Swelling and mechanical behaviors of carbon nanotube/poly(vinyl alcohol) hybrid hydrogels. *Materials Letters* **2007**, 61, (8-9), 1704-1706.
- [94] Numata, K.; Yamazaki, S.; Naga, N., Biocompatible and Biodegradable Dual-Drug Release System Based on Silk Hydrogel Containing Silk Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (5), 1383-1389.

- [95] Montreuil, J.; Verbert, A., Analyse des glucides et des glycoprotéines. *Technique de l'ingénieur* **1997**, P3320.
- [96] Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.-P.; Bohn, A., Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, (22), 3358-3393.
- [97] Iguchi, M.; Yamanaka, S.; Budhiono, A., Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science* **2000**, 35, (2), 261-270.
- [98] Cheng, K.-C.; Catchmark, J. M.; Demirci, A., Production and application of bacterial cellulose. *Current Topics in Biotechnology* **2009**, 5, 1-20.
- [99] Klemm, D.; Philipp, B.; Heinze, T.; Heinze, U.; Wagenknecht, W., *Comprehensive Cellulose Chemistry* Wiley-VHC: Weinheim, **1998**; Vol. 1 Fundamentals and Analytical Methods.
- [100] Oh, S. Y.; Yoo, D. I.; Shin, Y.; Seo, G., FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydrate Research* **2005**, 340, (3), 417-428.
- [101] Fukaya, Y.; Hayashi, K.; Wada, M.; Ohno, H., Cellulose dissolution with polar ionic liquids under mild conditions: required factors for anions. *Green Chemistry* **2008**, 10, (1), 44-46.
- [102] Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D., Dissolution of Cellose with Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (18), 4974-4975.
- [103] Fatimi, A.; Tassin, J.-F.; Quillard, S.; Axelos, M. A. V.; Weiss, P., The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* **2008**, 29, (5), 533-543.
- [104] Joshi, S. C., Sol-Gel Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) in Ionic Media Including Drug Release. *Materials* **2011**, 4, (10), 1861-1905.
- [105] Bourges, X.; Weiss, P.; Daculsi, G.; Legeay, G., Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Advances in Colloid and Interface Science* **2002**, 99, (3), 215-228.

Chapitre II

Structure de l'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée

1. Introduction

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage et de l'os, l'équipe de Pr. P. Weiss au laboratoire LIOAD a développé des biohydrogels injectables à base d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (HPMC-Si) [1], [2]. L'HPMC-Si est un composé hybride organique-inorganique, un polymère d'origine naturelle modifié par des groupements alcoxysilanes. La polycondensation entre ces groupements provoque une réticulation des chaînes polymères et la formation d'un hydrogel chimique.

L'HPMC-Si est synthétisé à partir de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), un dérivé cellulosique fabriqué de manière industrielle. Même si le protocole de synthèse de l'HPMC-Si ainsi que la préparation de son hydrogel sont aujourd'hui bien maîtrisés, il reste encore beaucoup de questions sur la structure du polymère HPMC-Si, qui n'est toujours pas bien connue. Cette structure est particulièrement difficile à déterminer, premièrement car la structure de l'HPMC n'est pas régulière. Le greffage des groupements alcoxysilanes s'effectue alors sur une molécule dont on ne connaît pas la structure précise : il est donc pratiquement impossible de définir leurs positions exactes. Par ailleurs, le sens des greffons, c'est-à-dire le côté par lequel ils sont liés à l'HPMC, n'a pas, lui non plus, été identifié préalablement à ce travail. Par conséquent, le mécanisme de réticulation des chaînes d'HPMC-Si qui a été proposé par Bourges *et al.* lors de la synthèse de l'HPMC-Si [2], n'est pas supporté par des évidences expérimentales.

Or, il est primordial de connaître la structure d'un polymère pour maîtriser ses applications et pour avoir un bon contrôle de la synthèse. Comme évoqué précédemment, il faut d'abord s'intéresser à l'HPMC avant de déterminer la structure de l'HPMC-Si. Décrire la structure des polysaccharides et de leurs dérivés n'est pas une tâche facile, surtout quand les polymères en question possèdent un degré de polymérisation élevé. Nous avons essayé de caractériser la structure des deux polymères, HPMC et HPMC-Si, grâce à différentes méthodes analytiques couramment utilisées pour la caractérisation de nouvelles structures : la diffusion statique et dynamique de la lumière, la résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide et la RMN du liquide. Le point critique demeure la

préparation des échantillons, surtout dans le cas de la RMN du liquide, qui nécessite une dépolymérisation minutieuse et longue.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons employer des termes de la chimie des polymères. Pour plus d'informations détaillées, le lecteur peut se référer aux ouvrages suivants [3].

1.1. L'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) E4M

L'hydroxypropylméthylcellulose est un éther de cellulose, le polymère d'origine naturel le plus abondant sur la Terre. Soluble à l'eau froide et capable de former un gel physique thermoréversible, l'HPMC est un composé chimique couramment employé comme émulsifiant, épaississant, liant, *etc.* dans beaucoup de domaines industriels, notamment dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique sous le nom E464, un aditif sans odeur ni arôme qui n'est pas dégradé par le métabolisme humain et résiste aux enzymes et aux pH entre 2 et 13 [2], [4]-[6]. Son utilisation est particulièrement avantageuse dans le cas où on souhaite faire gonfler le volume sans rajouter de calories supplémentaires aux nutriments ou aux médicaments.

L'HPMC que nous utilisons pour la synthèse de l'HPMC-Si est vendu sous la marque « Methocel® » de la société Colorcon Inc., une filiale du groupe The Dow Chemical CompanyTM. Ce polymère est produit à partir de fibres celluloses qui sont chauffées dans une solution de soude, puis traitées avec du chlorure de méthyle et de l'oxyde de propylène. Les fibres ainsi modifiées sont purifiées et broyées pour obtenir une poudre fine blanche : l'HPMC [7].

La molécule d'HPMC, représentée sur la figure II.1, est constituée d'un enchaînement linéaire $\beta(1\rightarrow4)$ d'unités glucosidiques dont les fonctions hydroxyles pendantes (-OH) ont été partiellement transformées en éthers. Cette modification est faite à la fois par des groupements méthyles (-CH₃), provenant du chlorure de méthyle, et hydroxypropyles (-CH₂-CH(OH)-CH₃), obtenus par l'ouverture du cycle époxyde de l'oxyde de propylène. Une fonctionnalisation des hydroxyles pendants sur les

groupements hydroxypropyles n'est pas exclue non plus, c'est pourquoi il est préférable d'écrire une formule générique à l'aide de la lettre *R* (chaîne alkyle ou H) à la place de l'atome d'hydrogène dans les groupements « hydroxypropyles » $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OR})-\text{CH}_3$.

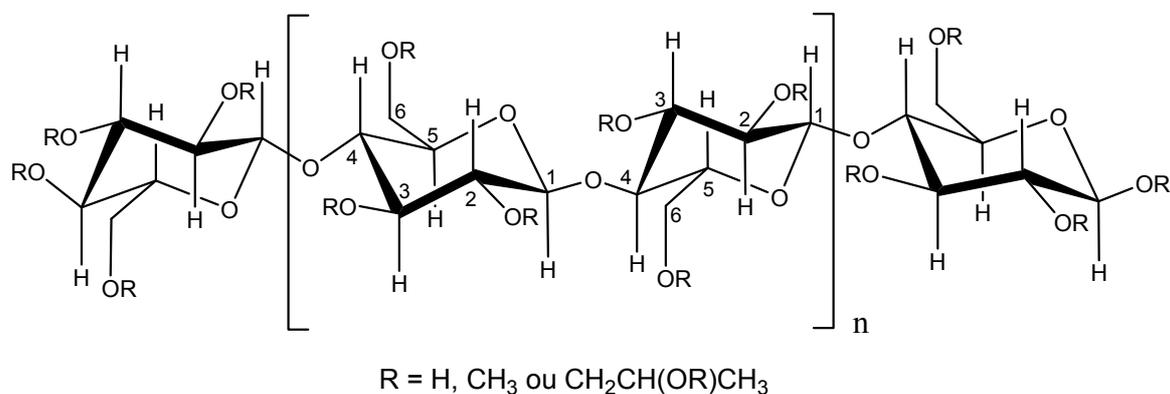


Figure II.1 : Représentation schématique de l'HPMC, *n* indique le degré de polymérisation et les groupements fonctionnels *R* sont disposés le long de la chaîne de manière aléatoire. Les atomes de carbone de chaque unité glucosidique sont numérotés de 1 à 6.

La disposition des groupements fonctionnels le long de la chaîne polymère est complètement aléatoire car les réactions de fonctionnalisation ne sont pas sélectives. Seul l'ordre de réactivité face à une réaction d'éthérisation des groupements hydroxyyles présents sur les unités glucosidiques de la cellulose est connu : les groupements hydroxyyles sur les atomes de carbone C2 et C6 ont à peu près la même réactivité, beaucoup plus élevée que celle des groupements hydroxyyles sur les atomes de carbone C3 à cause des gênes stériques [8] (la numérotation des atomes de carbone est indiquée sur la figure II.1). Par conséquent, le fabricant donne uniquement le taux moyen de groupements pendants, sachant que les groupements méthyles restent les groupements pendants en nombre majoritaire sur l'HPMC. Le degré de polymérisation de l'HPMC peut varier de quelques centaines à quelques milliers d'unités de répétition en fonction de la préparation.

La société Colorcon Inc. utilise une nomenclature spécifique pour définir les différents types d'HPMC. La synthèse d'HPMC-Si se fait à partir de l'HPMC E4M (HPMC Methocel® E4M, Colorcon Inc., UK). La lettre *E* indique les taux de substitution de l'HPMC par des groupements hydroxypropyles et méthyles. Le fabricant donne les chiffres suivants : 28.3 wt% de groupements méthoxyyles ($-\text{O}-\text{CH}_3$) et 9.5 wt%

d'hydroxypropoxyles (-O-CH₂-CH(OR)-CH₃). En d'autres termes, si on prend en compte qu'il n'y a que 3 positions de fonctionnalisation disponibles sur chaque unité glucosidique (3 groupements hydroxyles pendants par unité sur la cellulose), il y a 1.9 groupements méthyles et 0.23 groupements hydroxypropyles par unité. Le reste (0.87) sont les hydroxyles pendants non-substitués [7]. Ces chiffres peuvent varier de lot en lot, il est donc important de les vérifier au préalable pour chaque nouveau lot d'HPMC E4M.

4M dans la nomenclature de l'HPMC est relié à la viscosité à 20 °C d'une solution aqueuse à 2 wt% de ce type de polymère : $4M = 4000 \text{ cP} = 4000 \text{ mPa.s}$. La viscosité est reliée à la masse molaire de l'HPMC mais celle ci n'est pas mentionnée dans la documentation fournie par Colorcon. Les principales caractéristiques de l'HPMC E4M sont résumées dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Principales caractéristiques de l'HPMC Methocel® E4M utilisé pour la synthèse de l'HPMC-Si.* : pour une solution aqueuse à 2 wt% du polymère.

Viscosité*	3570 mPa.s
Méthoxyles	28.3 wt%
Hydroxypropoxyles	9.5 wt%
Humidité	1.8 wt%
pH*	6.1

1.2. Synthèse de l'HPMC-Si

La synthèse de l'HPMC silanisé (HPMC-Si), appelée aussi la silanisation, a été établie et décrite par Bourges *et al.* [2]. Elle consiste en une étherification partielle des groupements hydroxyles pendants de l'HPMC E4M par un greffage de molécules de 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS). Le GPTMS est schématisé sur la figure II.2. La silanisation s'effectue dans un mélange de 1-propanol et heptane, en présence de soude et avec barbotage d'azote. Les détails du protocole expérimental sont présentés en Annexe 1-A.

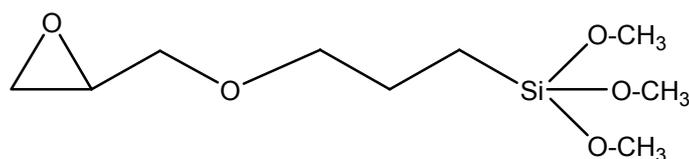


Figure II.2 : 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS).

Le mécanisme supposé du greffage de GPTMS sur l'HPMC est représenté sur la figure II.3 : en milieu basique, le cycle époxy de la molécule GPTMS s'ouvre par attaque des groupements nucléophiles (les OH^- provenant de la soude) sur l'atome de carbone du cycle époxy le moins encombré. Une fois le cycle ouvert, le GPTMS peut se lier par cet atome de carbone aux groupements $-\text{OH}$ pendants présents sur la chaîne de l'HPMC, pour ainsi former l'HPMC-Si.

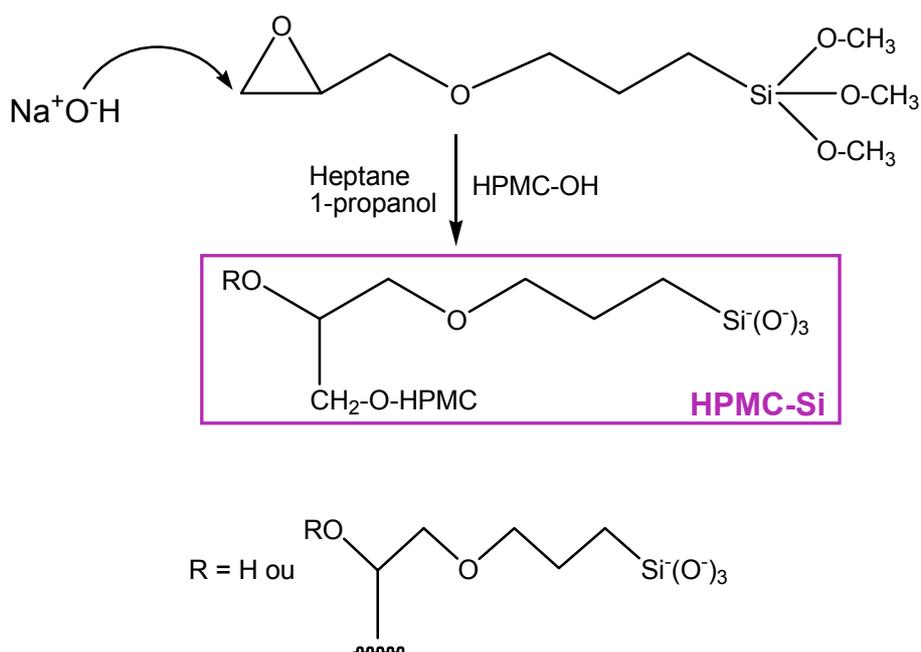


Figure II.3 : Mécanisme supposé de la réaction de silanisation de l'HPMC E4M : ouverture du cycle époxy de GPTMS par une attaque nucléophile et greffage à l'HPMC.

Ce mécanisme n'a encore jamais pu être vérifié expérimentalement. Or, en milieu basique, les trois groupements méthoxysilanes peuvent s'hydrolyser pour former des silanolates de sodium, qui peuvent également se lier à l'HPMC via les groupements hydroxyles. Bien que moins probable à cause des gênes stériques, cette possibilité existe. Par conséquent, à l'heure actuelle on ne peut pas préciser avec certitude de quel côté est

lié le GPTMS. Dans la suite du manuscrit, nous allons identifier les deux possibilités de greffage schématisés sur la figure II.4 par les expressions : « côté époxy » et « côté silicium ». Bien évidemment, il est souhaitable que le GPTMS soit lié côté époxy, car dans ce cas-là le côté silicium reste disponible pour les réactions de réticulation. Comme on le verra dans le chapitre suivant, ce sont justement les réactions entre deux groupements alcoxysilanes qui sont supposées créer un hydrogel via la formation de ponts Si-O-Si entre les différentes chaînes d'HPMC-Si.

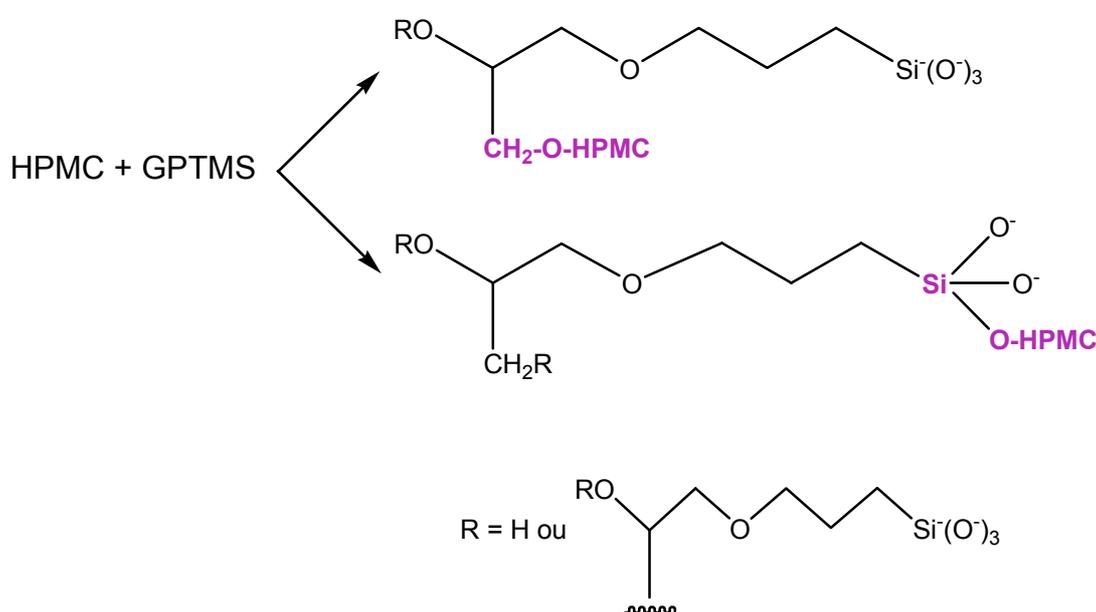


Figure II.4 : Deux possibilités de greffage d'une molécule de GPTMS sur la chaîne d'HPMC : « côté époxy » (en haut) et « côté silicium » (en bas).

La synthèse de l'HPMC-Si est plus complexe que les schémas réactionnels des figures II.3 et II.4. La présence d'autres espèces réactives dans le milieu réactionnel, comme par exemple une autre molécule de GPTMS dont le cycle époxy est déjà ouvert mais pas encore greffé ou un groupement hydroxyle pendant de l'HPMC ionisé ($\text{-O}^-\text{Na}^+$), rend le processus de silanisation beaucoup plus complexe. Ces espèces peuvent effectivement participer à l'ouverture des cycles époxy et empêcher le greffage des molécules GPTMS sur l'HPMC. En outre, une molécule de GPTMS peut réagir avec l'eau résiduelle et former la molécule représentée sur la figure II.5, inutilisable pour le greffage côté époxy. Cette forme peut toujours être greffée par le côté silicium sur l'HPMC ou sur une autre molécule GPTMS (liée ou pas). Enfin, puisque la silanisation s'effectue sur

l'HPMC par ses groupements $-OH$ pendants dont on ne connaît pas les positions exactes, il n'est pas possible pour le moment de prédire où vont se lier les molécules de GPTMS. Il faut donc a priori prendre en compte toutes les possibilités.

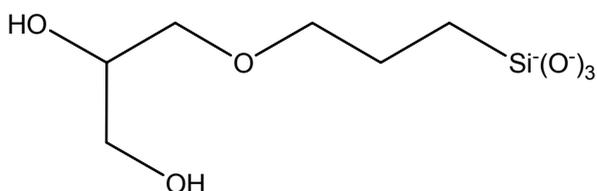


Figure II.5 : Forme que prend une molécule GPTMS après l'ouverture du cycle époxy en présence d'eau résiduelle.

Comme déjà mentionné, la silanisation de l'HPMC est réalisée dans un mélange de deux solvants : 1-propanol et heptane. Cette combinaison est la seule capable de « dissoudre » à la fois l'HPMC et le GPTMS. Toutefois, on peut remarquer que les chaînes d'HPMC ne sont pas complètement dépliées dans ce mélange, elles sont présentes sous forme de pelotes visibles à l'œil. On parle alors d'un milieu hétérogène. Le greffage des groupements alkoxy-silanes se fait uniquement sur les groupements hydroxyles facilement accessibles, c'est-à-dire à la surface des pelotes. Cela diminue considérablement le rendement de la silanisation car beaucoup d'hydroxyles restent inaccessibles, comme schématisé sur la figure II.6. Le rendement de la silanisation peut être exprimé en pourcentage massique de silicium greffé sur l'HPMC-Si. Il se situe autour de 0.6 wt% de silicium pour l'HPMC silanisé en milieu hétérogène.

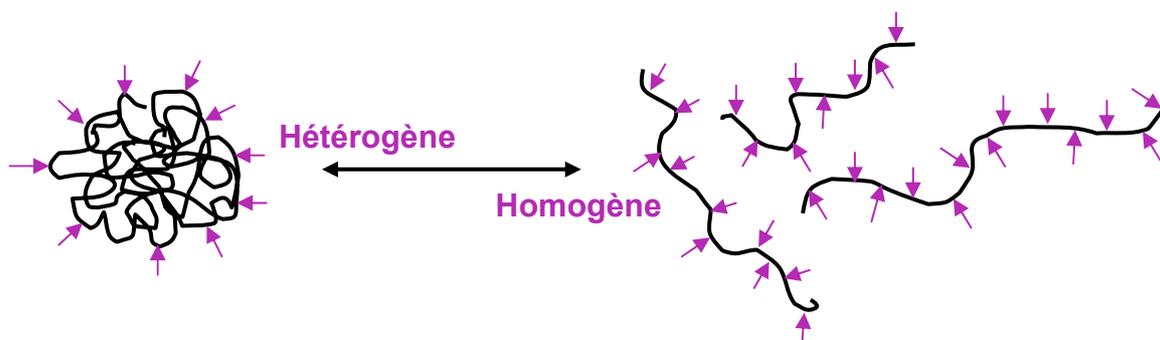


Figure II.6 : Représentation schématique de la silanisation en milieu hétérogène (à gauche) et homogène (à droite). Les flèches indiquent l'accessibilité des sites de greffage.

Il est important de noter qu'une autre technique de silanisation de l'HPMC, utilisant des liquides ioniques comme solvants, a été développée et brevetée au sein de nos laboratoires [9]. Les liquides ioniques utilisés sont de bons solvants de l'HPMC : ils ont l'avantage de déplier complètement les pelotes d'HPMC et de dissoudre le GPTMS pour créer un milieu homogène (voir figure II.6). Ainsi, le greffage doit pouvoir s'effectuer tout le long de la chaîne polymère et le taux de silanisation augmente jusqu'à 3.2 wt% de silicium, 5 fois plus en comparaison avec la méthode de silanisation classique. Cependant, cette technique n'est toujours pas bien maîtrisée, c'est pourquoi l'HPMC-Si synthétisé par la méthode classique, en milieu hétérogène, reste pour le moment la seule source de polymère utilisé pour la préparation des hydrogels d'HPMC-Si.

1.3. Caractérisations de l'HPMC-Si effectuées avant cette thèse

Même si la structure de l'HPMC-Si n'est pour le moment pas bien connue, certaines propriétés de ce polymère ont déjà été étudiées, comme par exemple son taux de silanisation : un paramètre très important de l'HPMC-Si. La détermination du taux de silanisation, c'est-à-dire le pourcentage massique de silicium présent en moyenne dans le polymère HPMC-Si, est possible grâce à la RMN du solide ou par dosage ICP-AES du silicium. Au laboratoire LIOAD, il a été démontré que le taux de silicium dans le polymère après synthèse se situe autour de 0.6-0.7 wt% [2], [5], [10]. Mais comme la synthèse de l'HPMC E4M n'est pas tout à fait bien maîtrisée, les propriétés de l'HPMC E4M peuvent légèrement varier d'un lot à l'autre. De ce fait, il est possible que la silanisation de l'HPMC ne donne pas toujours le même taux de silicium, ce qui aura une influence sur les propriétés du polymère. Il est donc important de caractériser l'HPMC-Si après chaque nouvelle synthèse.

Les méthodes spectroscopiques, telles que la spectroscopie infrarouge et Raman, sont généralement très riches d'information en ce qui concerne la nature des liaisons chimiques dans une molécule. Elles permettent via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques d'effectuer entre autre l'identification des groupements moléculaires présents dans un matériau. Ainsi, les spectres FT-IR et FT-Raman ont été réalisés sur l'HPMC et l'HPMC-Si (voir figure II.7) [2]. Cependant,

aucune différence visible induite par la silanisation n'a été détectée entre HPMC et HPMC-Si. On peut expliquer ce comportement car les principales bandes caractéristiques provenant de l'HPMC sont très intenses et la faible quantité de molécules GPTMS ne donne pas un signal suffisamment important pour qu'il ressorte dans les spectres de l'HPMC-Si. Néanmoins, ce résultat indique que la structure chimique de l'HPMC n'est pas dégradée par la silanisation.

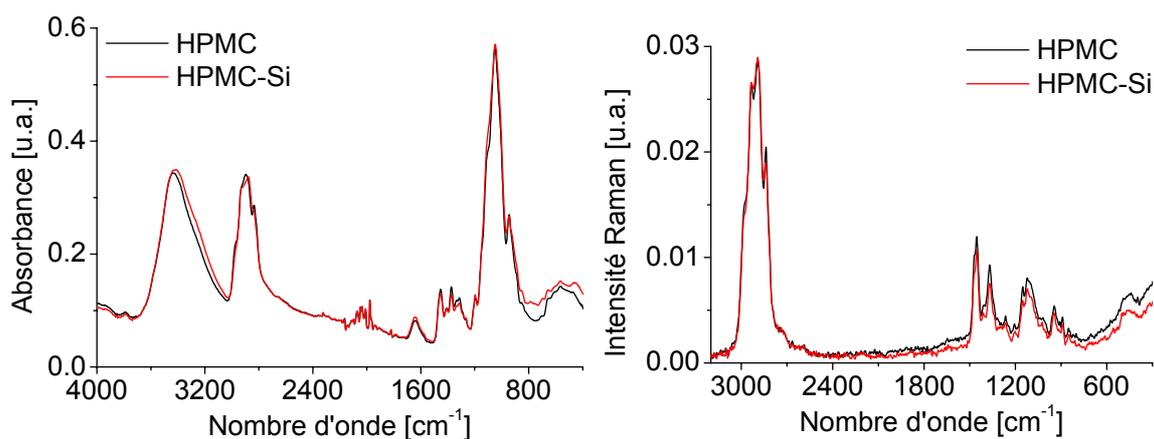


Figure II.7 : Spectres FT-IR (à gauche) et FT-Raman (à droite) de l'HPMC et de l'HPMC-Si.

L'HPMC-Si est un polymère soluble dans des solutions aqueuses fortement basiques (pH autour de 13). Ce sont justement les solutions aqueuses à base de soude qui servent à la préparation des hydrogels d'HPMC-Si. Ainsi, certaines caractérisations de l'HPMC-Si en solution basique ont également été effectuées. En particulier, les propriétés rhéologiques d'HPMC-Si dans une solution aqueuse à 0.2 M de NaOH ont été bien étudiées par Fatimi *et al.* [5]. La dépendance de la viscosité des solutions basiques d'HPMC-Si en fonction de la concentration a été évaluée. A 25 °C, la viscosité Newtonienne augmente avec la concentration en polymère : elle passe de 0.01 Pa.s (1 wt% d'HPMC-Si) à 10.76 Pa.s (5 wt% d'HPMC-Si). La viscosité Newtonienne de la solution à base de 5 wt% d'HPMC non silanisé est 6.64 Pa.s, c'est-à-dire inférieure à celle d'HPMC-Si. La fonctionnalisation par des groupements alcoxysilanes augmente donc la viscosité Newtonienne des solutions d'HPMC-Si. La silanisation améliore également les propriétés viscoélastiques du polymère HPMC-Si. Le comportement des modules en cisaillement G' et G'' en fonction de la fréquence de cisaillement est identique pour toutes

les concentrations en HPMC-Si. Il est caractéristique des solutions visqueuses de polymères enchevêtrés.

Le comportement général des fonctions alcoxysilanes dans une solution NaOH_{aq} est présenté sur la figure II.8. La première ligne de cette figure montre l'ionisation des alcoxysilanes en silanolate ($-\text{Si}(\text{O}^-\text{Na}^+)_3$), une forme stable jusqu'à environ pH 12.2 - 12.1. Au-dessous de ce pH limite, les silanolate se transforment en silanols ($-\text{Si}(\text{OH})_3$) qui peuvent interagir entres-eux (polycondenser) pour former des ponts siloxanes (Si-O-Si) [2], comme illustré avec les deux lignes suivantes de la figure II.8. C'est pour cette raison que l'HPMC est silanisé : pour obtenir une polycondensation entre les chaînes polymères et donc un hydrogel chimique.

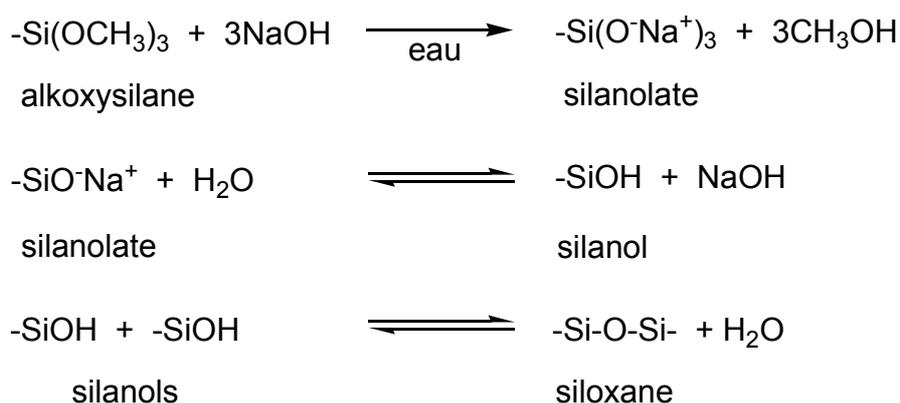


Figure II.8 : Comportement des fonctions alcoxysilanes dans une solution aqueuse de soude et des fonctions silanolate en milieu aqueux au-dessous de pH 12.2-12.1.

Comme on a pu le voir dans le paragraphe précédent, lors de la synthèse de l'HPMC-Si, le GPTMS peut également se fixer sur les molécules de GPTMS libres ou déjà greffées à l'HPMC. Il n'est alors pas exclu que le polymère HPMC-Si juste après synthèse contienne des molécules de GPTMS non directement greffées aux chaînes polymères. Si ces molécules GPTMS sont liées via des liaisons Si-O-Si, ces dernières ne peuvent pas être rompues lors de rinçages post-synthèse, mais elles peuvent être coupées grâce à l'action d'une solution aqueuse de soude après dissolution de l'HPMC-Si. Par conséquent, il est possible d'éliminer les molécules de GPTMS ainsi libérées en dialysant la solution d'HPMC-Si. On devrait donc observer une diminution du taux de silicium dans

l'HPMC-Si après sa dialyse. Cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée avant cette thèse et fera aussi l'objet de la partie expérimentale suivante.

2. Partie expérimentale

Pour essayer de déterminer la structure de l'HPMC-Si, nous avons fait appel à des techniques de caractérisation classiques des polymères pour obtenir des informations sur la taille des polymères, leur conformation et la structure chimique des chaînes, telles que la diffusion de la lumière, la RMN du solide et la RMN du liquide. Les études ont été menées à la fois sur l'HPMC-Si et l'HPMC E4M pour pouvoir comparer les deux polymères. Notre but est de décrire et comprendre la structure de ces deux polymères et de vérifier l'hypothèse sur le sens du greffage des molécules de GPTMS sur l'HPMC-Si. Les résultats et leur discussion sont présentés dans cette partie expérimentale. Il est important de noter que toutes les expériences ont été faites avec les mêmes lots d'HPMC et d'HPMC-Si synthétisé.

2.1. Diffusion de la lumière

Les mesures de diffusion de la lumière ont été effectuées au Laboratoire Léon Brillouin (LLB) à Saclay avec l'aide du Dr. D. Lairez. La diffusion de la lumière a été mesurée en mode statique et dynamique. Les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-A.

Pour ces mesures, 3 types de solutions mères ont été fraîchement préparés dans 0.2 M NaOH_{aq} à une concentration de 1 mg.ml⁻¹ :

- HPMC E4M
- HPMC-Si
- HPMC-Si (solution dialysée, voir Annexe 1-B)

La solution aqueuse de soude à 0.2 M a été choisie comme solvant parce que c'est elle qui est utilisée pour la préparation des hydrogels d'HPMC-Si. Les dilutions ont été faites à partir de ces 3 solutions mères par pesée, en rajoutant de l'eau millipore.

2.1.1. Diffusion statique de la lumière

Lorsque l'on met en solution des petites particules et que l'on irradie la solution par la lumière visible, celle-ci peut être diffusée dès lors que les particules ont une taille comprise entre la dizaine de nanomètres jusqu'à quelques centaines de nanomètres. En analysant cette lumière diffusée, on peut extraire des informations concernant ces particules. Dans le cas des polymères ou des macromolécules en solution, les paramètres caractéristiques accessibles par diffusion statique de la lumière sont :

- La masse molaire moyenne en poids M_w
- Le rayon de giration R_g
- La concentration critique c^*

Lors d'une expérience de diffusion de la lumière, on mesure l'intensité de la lumière diffusée I en fonction de l'angle de diffusion θ . L'angle de diffusion est relié au vecteur de diffusion, dont le module q est exprimé par l'équation suivante :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{II.1})$$

avec n l'indice de réfraction du milieu (ici $n = 1.33$ comme pour l'eau pure, parce que l'indice de réfraction de l'eau n'est pas très affecté par la présence de soude), λ la longueur d'onde de la lumière incidente (laser argon $\lambda = 488 \text{ nm}$) et θ l'angle de détection. La diffusion de la lumière s'applique aux objets dont la taille est comprise entre une dizaine et jusqu'à des centaines de nanomètre. Sachant que la taille d'un cycle de glucose est de l'ordre de 1 nm [11], la taille caractéristique des polysaccharides, qui ne sont jamais sous forme de chaînes complètement étendues en solution, correspond bien à cette échelle spatiale.

En solution, les macromolécules sont soumises au mouvement brownien et l'intensité qu'elles diffusent fluctue au cours du temps à cause de ce mouvement. En diffusion statique, on prend une valeur moyenne de l'intensité sur une certaine durée de l'expérience à chaque angle de mesure. Pour une concentration de macromolécules c donnée, l'intensité diffusée $I(q)$ est donnée par [12] :

$$I(q) \approx KcM_w \left(1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} + \dots\right) \quad (\text{II.2})$$

Dans cette équation, K est un coefficient regroupant les paramètres optiques du système, M_w la masse molaire moyenne en poids des chaînes polymères et R_g leur rayon de giration. Pour des raisons entropiques, les chaînes polymères ne sont pas dépliées en solution, mais elles se contractent sur elles-mêmes pour former des pelotes. Le rayon de giration est le rayon d'une sphère qui exprime la taille de ces pelotes. Il s'agit d'une moyenne quadratique des distances au centre de gravité de tous les diffuseurs élémentaires constituant la pelote. L'équation II.2 n'est valable que dans le domaine de Guinier, dans lequel $qR_g \ll 1$, et pour les solutions diluées.

Les mesures d'intensité diffusée ont été effectuées pour 20 angles de détection différents allant de 21 à 151° et pour plusieurs concentrations en polymères (3 ou 4). L'intensité diffusée à un angle de détection donné a été obtenue en moyennant 200 mesures d'une durée de 0.2 s chacune. Pour chaque concentration, l'intensité $I(q)$ a été mesurée deux fois et exprimée comme $I/I(q^2)$ (représentation de Zimm), une ligne droite dont la pente est une fonction de R_g :

$$\frac{1}{I(q^2)} \approx \frac{1}{I(0)} \left(1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} - \dots\right) \quad (\text{II.3})$$

avec $I(0)$ l'intensité extrapolée à angle de diffusion nul ($q = 0$). Un exemple d'une telle fonction, obtenue sur la solution mère d'HPMC E4M, est représenté sur la figure II.9. En faisant un ajustement linéaire des données expérimentales (voir l'équation indiquée sur la figure), nous avons obtenu la valeur du rayon de giration à cette concentration ($c = 1 \text{ mg.m}^{-1}$) : $R_g = 58 \text{ nm}$.

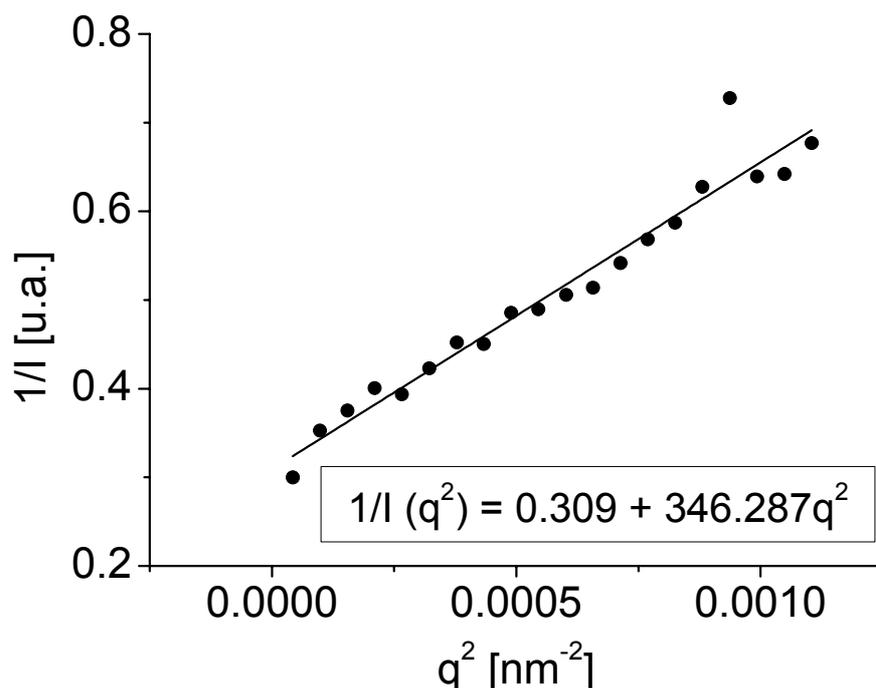


Figure II.9 : Fonction $1/I (q^2)$ obtenue sur la solution mère d'HPMC E4M à température ambiante. La ligne représente un ajustement linéaire des points expérimentaux effectué avec l'équation indiquée dans l'encart.

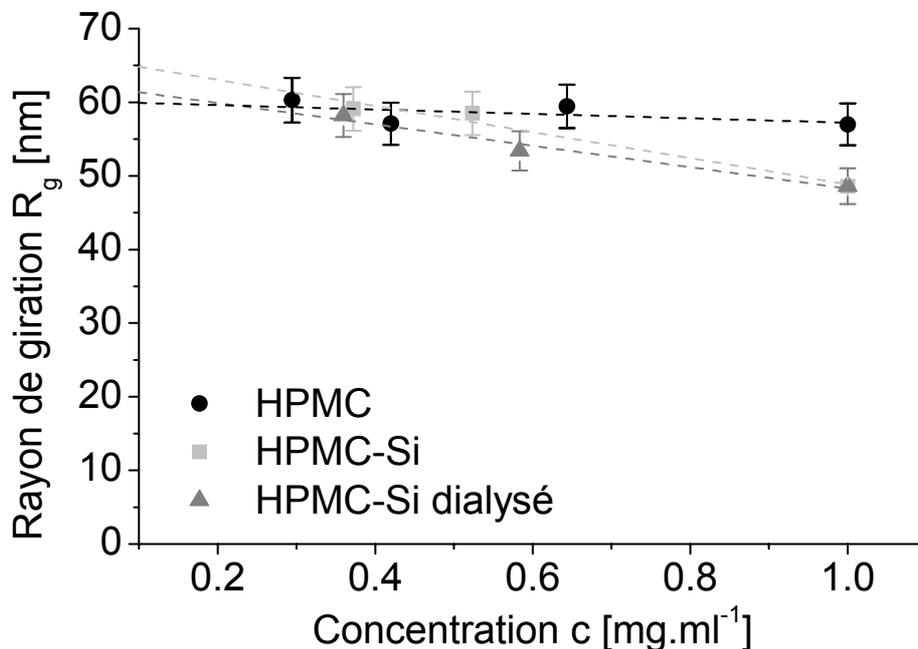


Figure II.10 : Rayon de giration en fonction de la concentration pour les différents polymères en solution aqueuse à 0.2 M de NaOH : HPMC, HPMC-Si et HPMC-Si dialysé. Les barres d'erreur représentent 5 % de la valeur du R_g . Les lignes constituent des ajustements linéaires des points expérimentaux.

A chaque concentration en polymère, une valeur moyenne de R_g a été établie sur les deux mesures de $I(q)$. Ainsi, pour chaque polymère nous avons obtenu une série de données $R_g(c)$, présentées sur la figure II.10.

On constate que le rayon de giration diminue légèrement avec la concentration en polymère. Ceci est dû à l'interaction entre les pelotes qui augmente pour les concentrations plus élevées. Mais on peut remarquer que les points expérimentaux ne varient pas beaucoup d'un échantillon à l'autre. Au premier regard, il ne semble pas y avoir de différences notables entre l'HPMC, l'HPMC-Si et l'HPMC-Si dialysé. Leurs rayons de giration sont donc a priori très proches, tout comme la nature des polymères. Les barres d'erreur ont été estimées par expérience et fixées à 5 % de la valeur de chaque point expérimental $R_g(c)$.

La « vraie » valeur du rayon de giration d'une macromolécule n'est obtenue qu'à concentration nulle, car c'est uniquement là qu'on s'affranchit de toutes les interactions entre pelotes. Nous avons effectué un ajustement linéaire pour chacune des trois fonctions $R_g(c)$ (voir les lignes pointillées sur la figure II.10). L'ajustement est très bon et permet après extrapolation à une concentration nulle, d'obtenir la valeur $R_g(0)$ propre à chaque échantillon. Les valeurs ainsi obtenues sont notées R_g et résumées dans le tableau II.2. Elles varient de 60 à 67 nm. Elles représentent les caractéristiques (constantes) de chaque polymère dans ce solvant à température ambiante.

Tableau II.2 : Rayons de giration R_g des différents polymères dans une solution aqueuse à 0.2 M de NaOH à température ambiante. Les incertitudes sont de l'ordre de 5 %.

	R_g [nm]
HPMC E4M	60
HPMC-Si	67
HPMC-Si dialysé	63

Le rayon de giration de l'HPMC E4M dans une solution à 0.2 M de soude à température ambiante est environ de 60 nm. Ce rayon est légèrement inférieur au rayon de 67 nm trouvé pour l'HPMC-Si après synthèse. On peut penser qu'il s'agit de l'effet de

greffage. En greffant des fonctions alcoxysilanes sur l'HPMC, la pelote de polymère peut devenir plus grosse à cause des gênes stériques ainsi générées. Après dialyse, on observe une faible diminution du rayon de giration vers 63 nm. L'effet de la dialyse est d'éliminer les molécules de GPTMS non greffées à l'HPMC-Si. Ceci a peu de raisons de faire diminuer le rayon de giration. En réalité, les différences entre ces trois valeurs sont très faibles et en première approximation, on peut dire que ces trois polymères ont le même rayon de giration. Il est estimé à environ $R_g \sim 65 \text{ nm}$ en prenant une droite moyenne d'ajustement. En conclusion, la taille des pelotes de l'HPMC E4M, de l'HPMC-Si avant et après dialyse est à peu près la même dans une solution 0.2 M NaOH_{aq} à température ambiante.

Dans le cas d'une solution monodisperse de polymère dans un bon solvant, l'intensité diffusée à angle de diffusion nul $I(q \rightarrow 0) = I(0)$ reflète les propriétés macroscopiques du matériau. La diffusion est liée aux hétérogénéités statistiques présentes dans la solution, notamment aux fluctuations de concentration. Il est donc possible d'exprimer l'intensité diffusée extrapolée à angle nul comme [12] :

$$\frac{I(0)}{Kc} \approx M_w \left(1 - \frac{c}{c^*} + \dots\right) \quad (\text{II.4})$$

pour les solutions dont la concentration $c/c^* \ll 1$. La concentration critique c^* exprime la concentration à partir de laquelle les pelotes des chaînes polymères formées dans la solution commencent à se toucher, comme illustré sur la figure II.11.

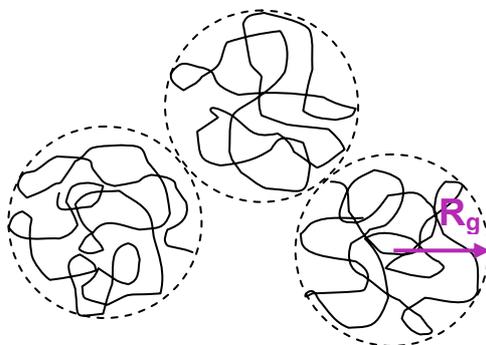


Figure II.11 : Illustration des pelotes de polymères dans une solution à une concentration c^* avec R_g le rayon de giration.

Cette concentration critique sépare le domaine des solutions diluées du domaine des solutions semi-diluées, puis concentrées.

Si on trace $I(0)/c$ en fonction de la concentration, on obtient une droite dont l'extrapolation à $c = 0$ nous donne la masse molaire moyenne en poids M_w , et la pente la concentration critique c^* . La figure II.12 montre les dépendances $I(0,c)/c$ pour les trois polymères mesurés. Les valeurs de $I(0)$ utilisées pour composer ce graphique sont les valeurs moyennes obtenues sur deux mesures de l'intensité $I(q)$. Les barres d'erreur ont été estimées à 2 %.

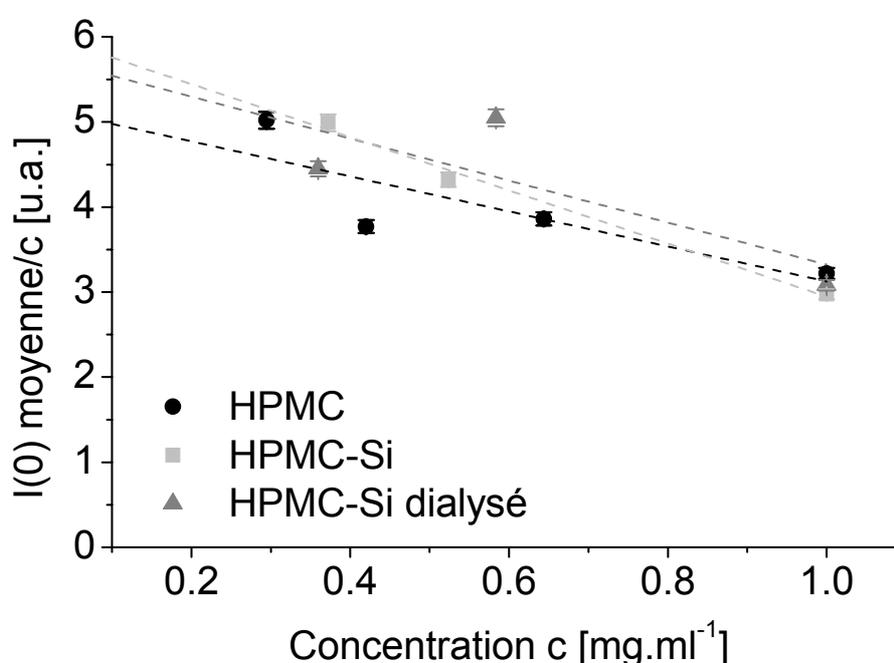


Figure II.12 : Intensité à angle de diffusion nul divisée par la concentration en fonction de la concentration pour les différents polymères en solution aqueuse à 0.2 M de soude : HPMC, HPMC-Si et HPMC-Si dialysé. Les lignes constituent des fit linéaires des points expérimentaux. Les barres d'erreur sont de 2 % de chaque valeur.

On peut constater que les valeurs de $I(0)/c$ ne varient pas beaucoup d'un échantillon à l'autre, en particulier pour $c = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$, le cas des solutions mères, où les valeurs de l'intensité $I(0)$ sont pratiquement identiques pour tous les trois échantillons. Les écarts obtenus pour les concentrations suivantes sont liés à la dilution qui a été faite par pesée, et par conséquent ils sont liés à l'imprécision de la pesée.

En effectuant des ajustements linéaires des points expérimentaux de chaque polymère (voir les lignes pointillées sur la figure II.12), on peut obtenir les masses molaires moyennes M_w ainsi que les concentrations critiques c^* des 3 polymères. Les résultats sont reportés dans le tableau II.3.

Tableau II.3 : Masses molaires moyennes en poids M_w et concentrations critiques c^* des différents polymères dans une solution aqueuse à 0.2 M de NaOH à température ambiante. Les incertitudes sont de l'ordre de 2 %.

	M_w [g.mol ⁻¹]	c^* [mg.ml ⁻¹]
HPMC E4M	370 000	2.52
HPMC-Si	434 000	1.94
HPMC-Si dialysé	414 000	2.35

La masse molaire de l'HPMC E4M est d'environ 370 000 g.mol⁻¹ ce qui est inférieur à la masse molaire de l'HPMC-Si non dialysé qui est proche de 434 000 g.mol⁻¹. Cette différence est attribuée au greffage des molécules GPTMS sur la chaîne polymère. De plus, ce résultat nous confirme que les chaînes polymères n'ont pas été dégradées lors de la synthèse de l'HPMC-Si. Par conséquent, la concentration critique en solution de soude est plus élevée pour l'HPMC ($c^* = 2.52 \text{ mg.ml}^{-1}$) que pour l'HPMC-Si ($c^* = 1.94 \text{ mg.ml}^{-1}$). En d'autres termes, il est possible de dissoudre plus d'HPMC que d'HPMC-Si dans le même volume de solution aqueuse à 0.2 M de soude ; ceci pourrait être relié à un caractère hydrophobe accru pour l'HPMC-Si. On peut remarquer par ailleurs, que les concentrations c d'HPMC et d'HPMC-Si non dialysé utilisées pendant les mesures sont bien en-dessous des valeurs critiques, ce qui justifie le choix des équations II.2 et II.4.

Après dialyse, la masse molaire de l'HPMC-Si diminue d'environ 20 000 g.mol⁻¹. Cette différence est sans doute liée au départ des molécules GPTMS non greffées directement sur la chaîne polymère lors de la dialyse de la solution d'HPMC-Si. Mais là aussi, la différence est faible et étant données les erreurs induits par les approximations et par la mesure elle-même, on ne peut pas être sûr qu'elle soit vraiment significative. Malheureusement, il n'est pas possible d'observer les molécules GPTMS non greffées qui

partent dans le dialysat, car l'appareil est insensible aux molécules aussi petites en aussi faible concentration.

Cette étude nous a permis de démontrer, que même si les deux molécules (HPMC et HPMC-Si avant ou après dialyse) ont à peu près la même taille de pelote en solution aqueuse à 0,2 M de soude et à température ambiante, elles n'ont pas la même masse molaire moyenne. La différence est certainement due aux groupements alcoxysilanes greffés sur la chaîne polymère. En considérant que la masse molaire d'une molécule de GPTMS vaut $M = 248.39 \text{ g.mol}^{-1}$, la différence de masse d'une chaîne individuelle d'HPMC-Si après silanisation correspond à peu près à 257 molécules de GPTMS. La masse molaire moyenne d'un cycle glucosidique du polymère HPMC E4M peut être estimée à $M_{cycle} = 202 \text{ g.mol}^{-1}$ en supposant que les groupements hydroxyles sur les fonctions hydroxypropyles ne sont pas substitués par des méthyles. Sachant que le nombre d'unités glucosidiques de l'HPMC E4M est :

$$N = \frac{M_w}{M_{cycle}} \approx \frac{370\,000}{202} \cong 1832 \quad (\text{II.5})$$

il en résulte qu'il y a environ 1 groupement alcoxysilane pour 7 unités glucosidiques dans l'HPMC-Si avant dialyse. La dialyse de la solution d'HPMC-Si permet d'éliminer une partie des alcoxysilanes qui ne sont pas directement greffés sur le polymère mais qui peuvent être englobés par la pelote, ce qui se traduit par une légère diminution de la masse molaire de l'HPMC-Si dialysé. Cette différence correspond à environ 80 molécules de GPTMS ce qui signifie qu'après dialyse il ne reste plus que $\sim 70\%$ des groupements alcoxysilanes. L'HPMC-Si après dialyse contient donc à peu près 1 groupement alcoxysilane pour 10 unités glucosidiques.

La diffusion statique de la lumière a déjà été effectuée au laboratoire LIOAD par Bohic *et al.* sur le polymère HPMC en différentes solutions aqueuses [13]. Dans une solution aqueuse de soude et à 25 °C, la masse molaire moyenne de l'HPMC a été évaluée à $M_w = 180\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ et son rayon de giration à $R_g = 89 \text{ nm}$. Cependant l'HPMC en question, nommé Benecel MP 651, provenait du fournisseur français Aqualon. Son taux de groupements méthoxyles est de 29 wt%, c'est-à-dire proche des 28.3 wt% que possède

l'HPMC E4M. Mais le taux de groupements hydroxypropoxyles ainsi que la viscosité ne sont pas indiqués. Il est donc difficile de comparer nos résultats obtenus sur l'HPMC E4M avec les travaux antérieurs.

Bien entendu, R_g et M_w ne sont pas indépendants. La théorie de Flory montre que l'expression suivante est valable pour une solution diluée et en bon solvant, avec N le nombre de monomères d'une chaîne polymère, $\nu = 0.6$ le coefficient de Flory (universel) et a la taille d'un monomère [14]:

$$R_g \approx aN^\nu \quad (\text{II.6})$$

Dès lors, on peut calculer la valeur de a à partir des résultats précédents et la comparer à la taille d'un cycle de glucose : $a_{\text{glucose}} = 1 \text{ nm}$ [11]. En prenant les valeurs expérimentales obtenues sur l'HPMC E4M :

- $R_g = 65 \text{ nm}$
- $N \sim 1832$

on trouve alors que la taille d'un monomère d'HPMC E4M est : $a \sim 0.7 \text{ nm}$. Cette valeur est en bon accord avec la taille 1 nm d'un cycle de glucose. La masse molaire ainsi que le rayon de giration de l'HPMC E4M en solution aqueuse à 0.2 M de NaOH déterminés par la diffusion statique de la lumière à température ambiante sont donc bien cohérentes.

2.1.2. Diffusion dynamique de la lumière

Grâce à la diffusion dynamique de la lumière nous pouvons accéder à la valeur du rayon hydrodynamique R_H des pelotes polymères présentes dans les solutions. La différence entre un rayon de giration et un rayon hydrodynamique est illustrée sur la figure II.13.

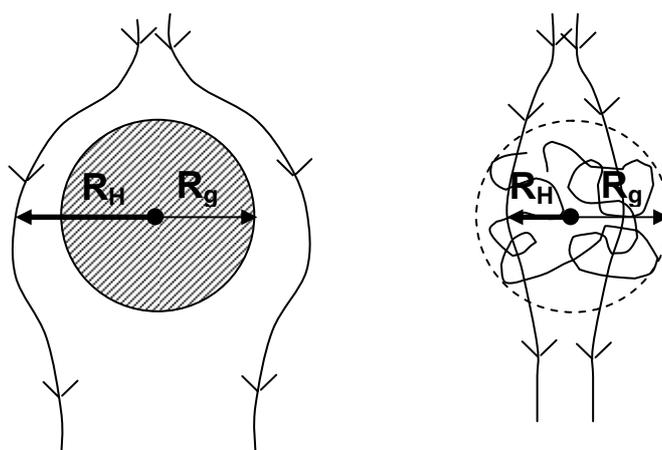


Figure II.13 : Rayon de giration R_g et rayon hydrodynamique R_H pour une sphère dure (à droite) et pour une pelote de polymère (à gauche) dans un liquide. Les lignes fléchées représentent le mouvement du liquide.

Les points au centre de chaque sphère indiquent les centres de gravité des objets.

Le rayon hydrodynamique représente la taille effective d'une particule déterminée par son mouvement brownien dans un liquide, en prenant en compte à la fois sa forme et sa couche d'hydratation. Dans le cas d'une sphère dure, les forces de frottement du liquide font que le rayon hydrodynamique est supérieur au rayon de giration (R_g est égal au rayon de la sphère). Mais dans le cas d'une pelote de polymère, le liquide peut passer partiellement à travers la pelote et par conséquent le rayon hydrodynamique est inférieur au rayon de giration. Le rapport R_H/R_g définit la compacité des pelotes : dans le cas où $R_H/R_g < 0.6$, on parle de pelotes diffuses ; quand $R_H/R_g > 0.8$ on parle de pelotes denses. Si la valeur du rapport R_H/R_g se situe entre 0.6 et 0.8, on est dans le cas d'une chaîne de polymère idéale.

Contrairement à la diffusion statique de la lumière, pour laquelle on exploite une moyenne de l'intensité sur un intervalle de temps, lors de la diffusion dynamique de la lumière on mesure des fluctuations de l'intensité diffusée en fonction du temps. Comme les macromolécules en solution subissent un mouvement brownien, une légère différence de la fréquence entre celle de la lumière incidente et celle de la lumière diffusée existe à cause de l'effet Doppler. Cela se traduit par une fluctuation de l'intensité totale diffusée autour de sa valeur moyenne. Ces fluctuations sont relatives aux fluctuations locales de densité et de concentration dans le milieu.

Expérimentalement, dans le cas des solutions très diluées et dans le domaine de Guinier ($qR_g \ll l$), nous avons accès à la fonction d'auto-corrélation, fonction décroissante en fonction du temps [12] :

$$G(\tau) \propto e^{-\frac{2t}{\tau}} \quad (\text{II.7})$$

avec

$$\tau = \frac{1}{Dq^2} \quad (\text{II.8})$$

où τ est le temps de relaxation qui dépend de la taille des macromolécules via le coefficient de diffusion D . Lorsque qR_g est très petit devant l'unité, les particules diffusantes sont considérées comme des points et la perte de corrélation n'est due qu'à leur diffusion par translation. Le coefficient de diffusion D est considéré ici comme un coefficient de diffusion translationnel. Un ajustement exponentiel de l'équation II.7 nous permet d'obtenir la valeur de ce coefficient de diffusion, à partir de laquelle on peut calculer le rayon hydrodynamique R_H des pelotes en utilisant la relation d'Einstein-Stokes :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (\text{II.9})$$

avec η la viscosité du solvant, T la température absolue et k_B la constante de Boltzmann.

Malheureusement, faute de temps, nous n'avons pu effectuer une expérience de diffusion dynamique de la lumière que sur la solution mère d'HPMC. La figure II.14 montre la fonction d'auto-corrélation $G(t)$ de cette solution obtenue à l'angle de diffusion $\theta = 32.17^\circ$. Après avoir ajusté les points expérimentaux avec la fonction exponentielle décroissante dont l'équation est indiquée sur le graphique, nous avons obtenu un coefficient de diffusion, $D = 5.07 \text{ nm}^2 \cdot \mu\text{s}^{-1}$. Nous avons alors pu déterminer que le rayon hydrodynamique d'une pelote d'HPMC E4M était d'environ 42 nm. Nous trouvons donc que cette valeur est bien inférieure à la valeur du rayon de giration, estimée à 65 nm dans le paragraphe précédent. En prenant ces deux rayons, on peut calculer un rapport R_H/R_g

proche de 0.65. Cette valeur se situe entre 0.6 et 0.8 indiquant ainsi que la chaîne d'HPMC E4M se comporte comme une chaîne idéale dans une solution aqueuse à 0.2 M de NaOH à température ambiante.

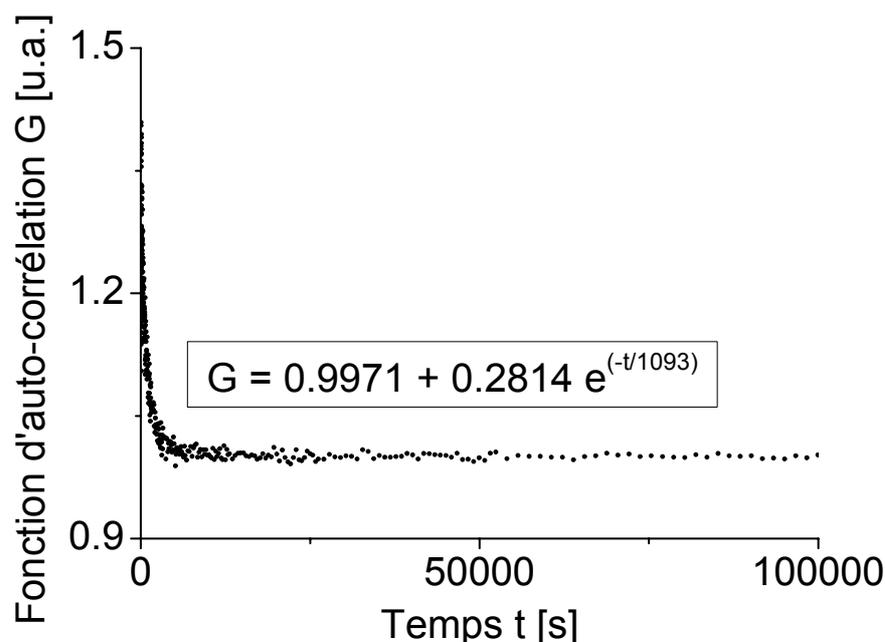


Figure II.14 : Fonction d'auto-corrélation de la solution mère d'HPMC E4M à l'angle de diffusion $\theta = 32.17^\circ$. L'ajustement des données expérimentales a été réalisé avec la fonction indiquée dans l'encart.

Même si les mesures sur les solutions d'HPMC-Si n'ont pas été effectuées, on peut s'attendre à ce que leur rayon hydrodynamique soit légèrement plus élevé que celui de l'HPMC E4M. En effet, si les rayons de giration sont pratiquement identiques pour tous les échantillons, l'HPMC-Si a une masse molaire supérieure à celle de l'HPMC et ses pelotes doivent être logiquement plus denses, ce qui se traduirait alors par un rapport R_H/R_g plus élevé et donc, à R_g égal, un rayon hydrodynamique supérieur. Cela reste à vérifier, mais les mesures de viscosité effectuées par Fatimi *et al.* [5] sur des solutions basiques très diluées d'HPMC E4M et d'HPMC-Si non dialysé suggèrent que le volume hydrodynamique occupé par une molécule d'HPMC est supérieur à celui d'HPMC-Si. Par conséquent les pelotes d'HPMC-Si sont plus compactes. Cette différence est sans doute liée à l'interaction entre les groupements alcoxysilanes greffés sur la même chaîne polymère qui contracte la pelote.

Tous les résultats de diffusion de la lumière obtenus sur l'HPMC E4M, l'HPMC-Si avant et après dialyse dans une solution aqueuse de soude à température ambiante sont résumés dans le tableau II.4.

Tableau II.4 : Résumé des résultats obtenus grâce à la diffusion de la lumière.

	M_w [g.mol ⁻¹]	c^* [mg.ml ⁻¹]	R_g [nm]	R_H [nm]
HPMC E4M	370 000	2.52	60	42
HPMC-Si	434 000	1.94	67	-
HPMC-Si dialysé	414 000	2.35	63	-

2.2. RMN du solide

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet d'observer les environnements chimiques des isotopes ayant un spin nucléaire non nul et de déterminer ainsi la structure des composés. La RMN, surtout en phase liquide, est un outil de routine en chimie organique. Mais comme la dissolution de l'HPMC-Si n'est pas très facile, nous nous sommes d'abord tournés vers la RMN du solide pour tenter de décrire la structure de l'HPMC et de l'HPMC-Si. Malheureusement, la RMN ¹H et ¹³C sur des polysaccharides donne en général des spectres inexploitable à cause du grand nombre d'atomes d'hydrogène ou de carbone dans de multiples environnements. La RMN du silicium ²⁹Si a donc été choisie pour observer les environnements des atomes de silicium des groupements alcoxysilanes greffés sur les chaînes polymères de l'HPMC-Si. L'isotope ²⁹Si a un spin 1/2 et possède une gamme de déplacements chimiques assez large (plus de 500 ppm), il est donc bien approprié à l'étude des environnements chimiques dans les composés du silicium. Cependant, à cause de sa faible abondance naturelle (~ 4.5 %) et du temps de relaxation élevé, les temps d'accumulations sont généralement très longs si les composés observés ne contiennent pas beaucoup de silicium, ce qui limite les possibilités d'investigation.

La RMN du solide a été effectuée à l'IMN sur un spectromètre Bruker AVANCE 500 MHz équipé d'une sonde CP/MAS 7 mm. Les paramètres expérimentaux de nos expériences sont détaillés en Annexe 3-B. La séquence employée pour la RMN MAS ²⁹Si était l'HPDEC (*High Power Decoupling* pulse program). Cette séquence nous permet de

nous affranchir des interactions dipolaires (couplage hétéronucléaire) entre les atomes de silicium et d'hydrogène, qui compliqueraient les spectres, en faisant le découplage du proton ^1H [15], [16]. Le découplage consiste à appliquer un pulse de haute puissance à la fréquence de résonance du proton pendant le temps d'acquisition du signal de silicium. Les protons subissent alors des transitions répétées à une vitesse déterminée par la fréquence du pulse. Si cette vitesse est suffisante, les spins ^{29}Si peuvent être observés sans les effets du couplage dipolaire avec les protons, ce qui simplifie beaucoup les spectres.

La RMN du solide se fait généralement avec rotation à haute fréquence sous un angle bien précis appelé angle magique de 54.74° par rapport à l'axe du champ. On parle de RMN MAS (*Magique Angle Spinning*). Cette rotation a pour but d'éliminer les contributions anisotropes intervenant dans différentes interactions mesurées par RMN (déplacement chimique, couplage dipolaire et quadripolaire) et qui induisent d'importants élargissements de raie.

Un spectre typique d'HPMC-Si avant dialyse est présenté sur la figure II.15 en rouge. On remarque quatre bandes caractéristiques sur ce spectre. Les deux pics situés à -9.8 ppm et à -135.2 ppm proviennent du signal de la référence interne. Nous avons utilisé le TKS (tétrakis(triméthoxysilyl)silane) dont la molécule est représentée sur la même figure [17] comme étalon. L'utilisation d'une référence permet à la fois de définir l'origine de l'axe des déplacements chimiques et de quantifier la quantité de silicium présent dans l'échantillon. Le pic à -9.8 ppm correspond aux signaux des 4 atomes de Si du TKS portant les groupements méthyles, le deuxième pic à -135.2 ppm à l'atome de silicium du centre de la molécule TKS. Comme on connaît le nombre de moles de silicium auquel correspondent les deux pics de l'étalon, on peut calculer le nombre de moles de Si greffés sur l'HPMC-Si après avoir intégré la surface sous les pics appartenant à l'échantillon. Ensuite, connaissant la masse de l'échantillon dans le rotor, il est facile d'obtenir le pourcentage massique de silicium dans l'échantillon.

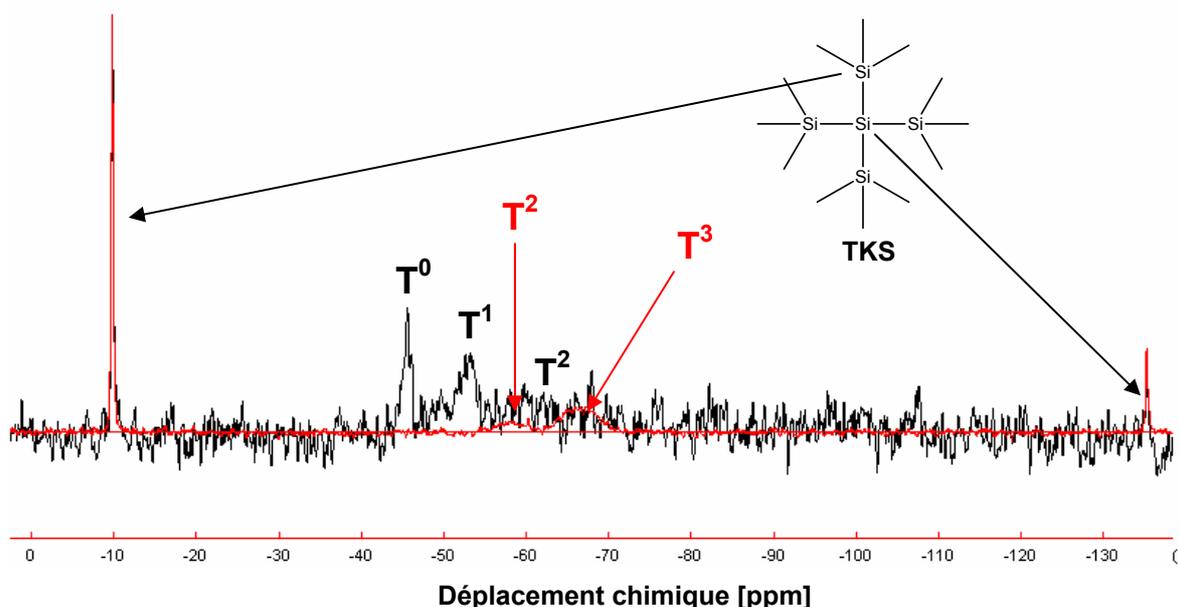


Figure II.15 : Spectres RMN MAS ^{29}Si de l'HPMC-Si avant (rouge) et après dialyse (noire). T^0 , T^1 , T^2 et T^3 indiquent les bandes des Si liés aux échantillons. Les signaux de l'étalon interne TKS dont la molécule est schématisée, sont indiqués par deux flèches. Les intégrations des pics donnent les taux de silicium suivants : 1.2 wt% avant dialyse et 0.7 wt% après dialyse.

Les deux pics de l'échantillon se situent autour de -58 et -66 ppm. Dans la littérature, ces déplacements chimiques correspondent à des environnements chimiques du silicium nommés T^2 et T^3 [18]-[20]. Cette nomenclature est expliquée sur la figure II.16.

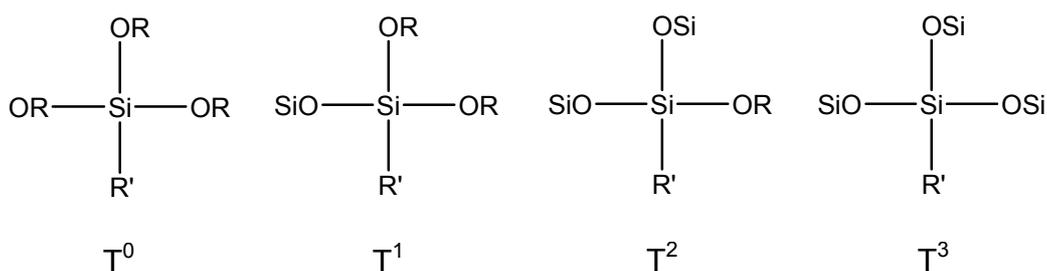


Figure II.16 : Nomenclature des environnements chimiques du silicium dans les trisiloxanes. R et R' désignent une chaîne alkyle ou un H.

La lettre T correspond dans cette notation à un atome de silicium présentant trois liaisons avec trois atomes d'oxygène, donc pouvant potentiellement créer jusqu'à 3 liaisons Si-O-Si avec trois atomes de silicium voisins. Les chiffres correspondent ensuite au nombre de liaisons siloxanes (ponts Si-O-Si) effectivement formées. Normalement, on

pourrait s'attendre à observer uniquement la présence de groupements T^0 sur la poudre d'HPMC-Si, car on suppose que les chaînes polymères n'ont pas encore réticulées. Néanmoins, comme on a déjà pu le voir, la synthèse d'HPMC-Si s'effectue en milieu basique dans lequel les groupements méthoxysilanes s'ionisent en silanolates, puis en présence de H^+ se transforment en groupes silanols. Ces derniers peuvent donc polycondenser entre eux et former des ponts Si-O-Si, d'où la présence possible de groupements T^2 et T^3 dans le spectre.

Mais la polycondensation ne provient pas forcément de greffons GPTMS liés à deux chaînes d'HPMC-Si différentes, il peut également y avoir des liaisons intra-chaînes. De plus, puisque l'échantillon avant dialyse contient aussi des molécules GPTMS non greffées à l'HPMC-Si, ces molécules peuvent aussi avoir polycondensé sur les greffons GPTMS. Nous pensons que toutes ces trois possibilités de polycondensation contribuent à la présence des groupements T^2 et T^3 dans l'HPMC-Si avant dialyse. Si ces groupements sont gênants pour déterminer précisément la structure du polymère silanisé, leur présence dans l'échantillon n'est pas dérangeante pour l'application visée, car pendant la préparation de l'hydrogel le polymère va être à nouveau dissous dans une solution basique et les ponts siloxanes vont se rompre.

En utilisant une séquence de polarisation croisée (CP pour *Cross Polarization*), nous nous sommes aperçus de la présence de siliciums T^1 vers -49 ppm (le spectre est présenté sur la figure 3.3 en Annexe 3-B). La polarisation croisée permet de gagner en sensibilité en mesurant le signal d'un noyau peu abondant (dans notre cas le ^{29}Si) par l'intermédiaire d'un noyau abondant voisin (^1H). Après excitation du proton, on transfère sa polarisation via le couplage dipolaire vers les noyaux de silicium proches. Le transfert est d'autant plus efficace que les distances entre noyaux sont courtes et que les liaisons sont rigides. Par conséquent, cette technique n'est pas quantitative [16]. On peut néanmoins conclure que la quantité de T^1 doit être très faible parce que ces groupements ne sont pas visibles sur les spectres HPDEC de la figure II.15. Il est à noter que l'acquisition d'un spectre HPDEC nécessitait généralement plus de 60 h, il n'était donc pas raisonnable de faire une accumulation encore plus longue pour espérer observer un signal provenant des T^1 .

Après intégration des pics du spectre de l'HPMC-Si avant dialyse de la figure II.15 (spectre en rouge), nous avons obtenu la quantité de silicium présent dans l'HPMC-Si avant dialyse : 1.2 wt% (masse de Si par rapport à la masse totale de l'HPMC-Si). Malheureusement, il n'est pas possible de quantifier les différentes populations de silicium séparément, on ne peut donner que le taux de silicium global. On ne peut pas non plus obtenir plus d'informations sur la structure de l'HPMC-Si car les bandes du spectre sont très larges et avec un signal faible.

Le spectre d'HPMC-Si dialysé est présenté sur la figure II.15 en noir. Ce spectre est beaucoup plus bruité et les pics ne sont pas bien définis, même si ce spectre a été obtenu avec 500 scans de plus que le spectre précédent. Les bandes caractéristiques des groupements siloxanes évoluent : le déplacement chimique des groupements T^2 est légèrement décalé de -58 à environ -60 ppm. De plus, on n'observe plus les groupements T^3 et on voit l'apparition des groupements T^1 (-53 ppm) et T^0 (-45 ppm).

Il a été difficile de faire une intégration de ces pics, mais on peut estimer que le taux de silicium est d'environ 0.7 wt%. Cette valeur est inférieure au taux de silicium dans l'HPMC-Si non dialysé (1.2 wt%). Près de 40% des molécules de GPTMS ne sont donc pas greffées à l'HPMC-Si et sont perdues lors de la dialyse. Ce résultat se corrèle bien avec celui trouvé par diffusion statique de la lumière où l'on a vu que la différence en masse molaire avant et après dialyse correspondait à peu près à une perte de 30% des groupements alcoxysilanes. Avec 1 groupement alcoxysilane pour 10 cycles glucosidiques (après dialyse) la silanisation n'est donc pas très efficace. Ceci est sans doute lié au caractère hétérogène de la synthèse de silanisation déjà discuté dans le paragraphe 1.2.

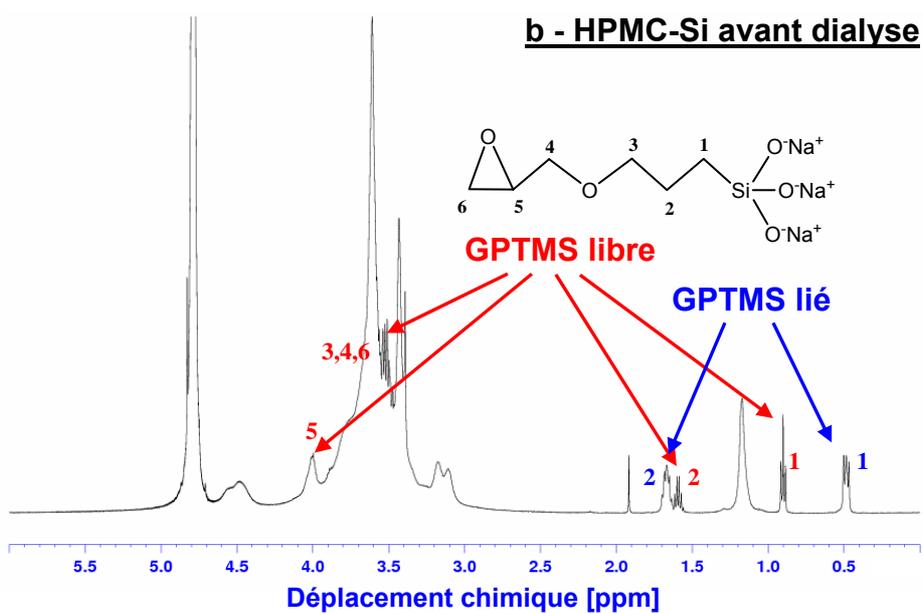
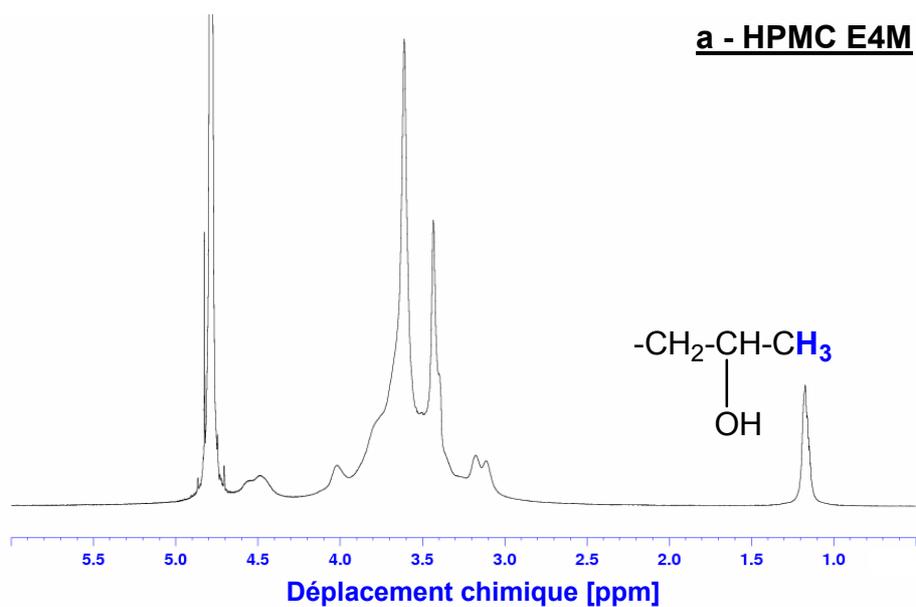
En conclusion, la RMN du solide nous permet d'obtenir les taux de silicium contenu dans l'HPMC-Si avant et après dialyse : le taux passe de 1.2 wt% à 0.7 wt%, ce qui correspond à une perte de 40% de groupements alcoxysilanes. Ces groupements qui ne sont pas directement liés à l'HPMC-Si peuvent donc être éliminés en dialysant dans une solution aqueuse basique. Ce résultat est en cohérence avec celui trouvé par diffusion statique de la lumière. La RMN du solide nous informe aussi sur l'environnement

chimique des atomes de silicium. Ces derniers se trouvent sous forme de groupements T^0 , T^1 et T^2 , c'est-à-dire qu'ils peuvent déjà être partiellement condensés comme illustré sur la figure II.16. Le faible taux de silicium dans l'HPMC-Si est à l'origine de toutes les difficultés de caractérisation de ce polymère en RMN du solide. Pour essayer d'avoir plus d'informations sur la structure de l'HPMC-Si, nous nous sommes dirigés vers la RMN du liquide.

2.3. RMN du liquide

La RMN du liquide a été effectuée par le Dr. S. Cérantola au Service de Résonance Magnétique Nucléaire – Résonance Paramagnétique Electronique de l'Université de Bretagne Occidentale à Brest. Tous les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-C.

Notre étude a commencé avec les spectres de RMN du proton ^1H des polymères HPMC, HPMC-Si avant et après dialyse et sans modification supplémentaire. L'HPMC-Si a été dissous dans une solution basique de soude deutérée (NaOD dans D_2O) à pH 11-12. La solution basique d'HPMC-Si dialysée a été simplement diluée avec du D_2O et l'HPMC a été dissous uniquement dans D_2O . La séquence utilisée pour l'acquisition s'appelle « zg30 ». Il s'agit d'une impulsion simple qui bascule l'aimantation de 30° au lieu de 90° habituels. Pour l'HPMC-Si dialysé, il a été nécessaire d'employer une séquence « zgpr », qui consiste en un pulse de pré-saturation, puis un pulse qui bascule l'aimantation de 90° . La pré-saturation du proton permet de supprimer le signal de l'eau (H_2O) résiduelle qui est tellement fort qu'il empêche les signaux faibles liés aux petites molécules d'apparaître dans le spectre. Les spectres ont été accumulés sur le spectromètre Bruker AVANCE 500 MHz équipé d'une sonde 5 mm inverse CP TCI ^1H . Ils sont présentés sur la figure II.17.



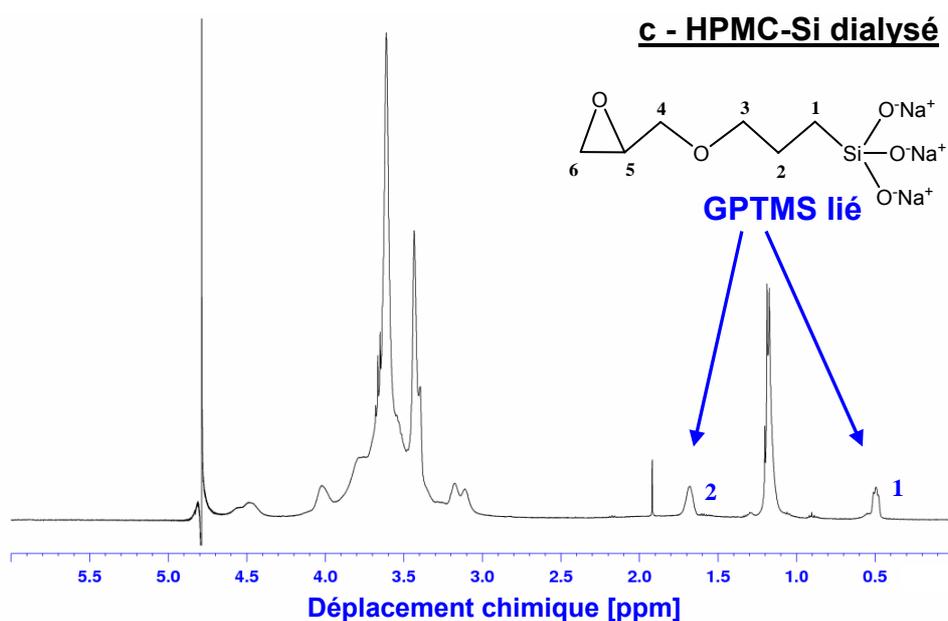


Figure II.17 : Spectres RMN ^1H de : (a) HPMC E4M (en D_2O), (b) HPMC-Si avant dialyse (en $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$, pH 11-12) et (c) HPMC-Si dialysé (en $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$, pH 11-12). Le pic à ~ 1.15 ppm correspond aux protons des groupements méthyles situés aux extrémités des groupements hydroxypropyles ; les pics liés aux atomes d'hydrogène des molécules GPTMS sont indiqués par des flèches et numérotés comme indiqué sur la molécule.

En comparant les spectres d'HPMC et d'HPMC-Si avant dialyse, on constate que les spectres se ressemblent à part quelques pics vers 0.5 ppm, 0.9 ppm, deux massifs vers 1.6 et 1.7 ppm et un autre massif vers 3.5-3.7 ppm. Ces pics peuvent être attribués aux molécules de GPTMS [21]. Après dialyse, les pics à 0.9 ppm et 1.6 ppm ainsi que le massif entre 3.5-3.7 ppm disparaissent dans le spectre de l'HPMC-Si dialysé. Ils correspondent donc aux molécules GPTMS non liées directement à l'HPMC-Si et qui se libèrent en solution aqueuse basique. Cette hypothèse est soutenue par le fait que ces pics sont assez fins et bien résolus, ce qui correspond à des molécules très mobiles : les molécules GPTMS libérées dans la solution. Les bandes plus larges correspondent donc vraisemblablement aux molécules de GPTMS liées à l'HPMC-Si. Ainsi, pour la première fois, nous pouvons établir qu'il existe bien une différence entre les GPTMS liés et non liés directement sur un spectre RMN ^1H d'HPMC-Si. De plus, ceci confirme les résultats précédents en montrant la disparition des molécules de GPTMS libres après dialyse.

Malheureusement, le reste des spectres de la figure II.17 reste très compliqué à interpréter, à cause de la taille des chaînes polymères et de la grande diversité des positions des groupements fonctionnels sur les cycles glucosidiques. Puisque la substitution des cycles glucosidiques est aléatoire avec près de 2000 cycles par chaînes, les pics caractéristiques de chaque environnement chimique particulier deviennent trop nombreux et forment des bandes ou des massifs trop larges dans le spectre. Seul le pic vers 1.15 ppm peut être attribué aux groupements méthyles des extrémités des groupements hydroxypropyles [22].

Pour essayer de simplifier ces spectres et obtenir plus d'informations sur la structure de ces polysaccharides, nous avons procédé à une dépolymérisation [8]. La dépolymérisation permet de couper les chaînes polymères en chaînes plus courtes contenant quelques unités glucosidiques (oligomères), voire en monomères. Il est important de bien choisir la technique de dépolymérisation pour qu'elle soit sélective. En effet, il faut couper uniquement des liaisons glycosidiques et préserver des groupements fonctionnels intacts. Après plusieurs tentatives de dépolymérisation radicalaire et de dépolymérisation acide, il s'est avéré que la dépolymérisation acide dans une solution aqueuse à 5 M d' H_2SO_4 et à 70 °C était la meilleure solution. Le protocole expérimental d'une telle dépolymérisation est décrit en Annexe 1-E.

Après dépolymérisation, on obtient un mélange d'oligomères plus ou moins longs. Le spectre ^1H de ce mélange est mieux résolu (voir figure II.18), mais demeure néanmoins toujours trop compliqué. Nous avons entrepris de faire une séparation des différentes phases contenues dans le mélange en fonction de leur masse molaire. Ceci a été réalisé par chromatographie séparative sur colonne de silice greffée avec des chaînes alcanes C_{18} . On injecte les oligomères dans des mélanges de solvants polaires/apolaires (eau/méthanol) dans la colonne et selon leur masse molaire et donc la taille des oligomères, leur temps de rétention va être différent. On peut alors séparer les oligomères de taille différentes. Ce travail est encore actuellement en cours. Nous espérons pouvoir obtenir une statistique des sites préférentiels pour le greffage des différents groupements fonctionnels sur l'HPMC E4M, et ensuite des groupements alcoxysilanes sur l'HPMC-Si.

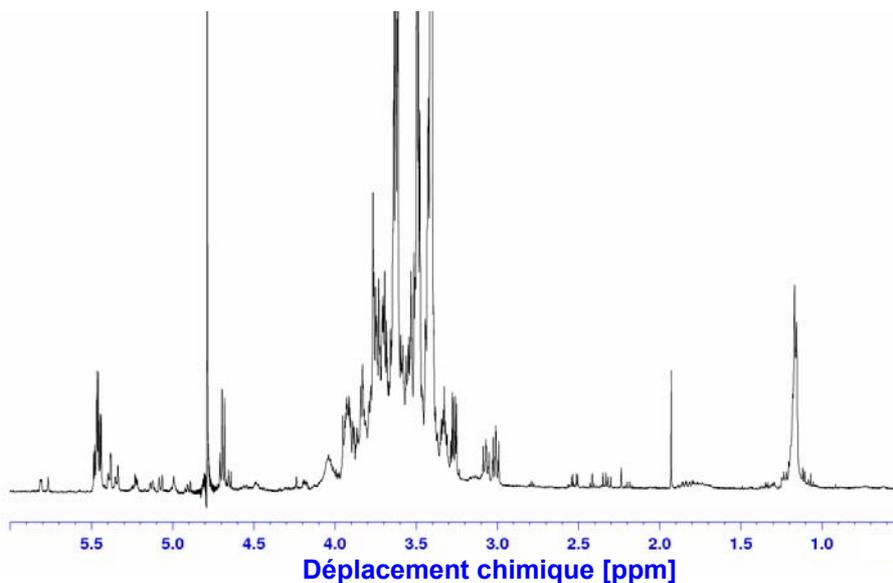


Figure II.18 : Spectre RMN ^1H de l'HPMC-Si dialysé et dépolymérisé (en D_2O).

Pour essayer d'identifier le sens de greffage des molécules de GPTMS sur l'HPMC-Si, nous avons réalisé des spectres bidimensionnels 2D ^{29}Si - ^1H des solutions basiques d'HPMC-Si sur l'appareil Bruker DRX 500 MHz, équipé d'une sonde 5 mm inverse TBI ^1H -B, en utilisant une séquence d'impulsions appelée HMBC. Cette séquence permet d'observer les corrélations entre les protons situés à deux et trois liaisons du silicium, les corrélations entre les premiers voisins étant supprimées. Grâce à la séquence HMBC, on devrait pouvoir différencier les deux cas où le GPTMS est lié « côté époxy » et « côté silicium ». Ces deux cas sont schématisés sur la figure II.19 avec les protons voisins indiqués en mauve. La séquence d'impulsions HMBC est complexe mais indispensable, car comme on peut le constater sur la figure II.19, les premiers voisins des atomes de silicium seront toujours identiques et ce n'est qu'à partir des deuxièmes voisins que la différence sera visible. C'est pourquoi la séquence HMBC est bien appropriée à cette étude.

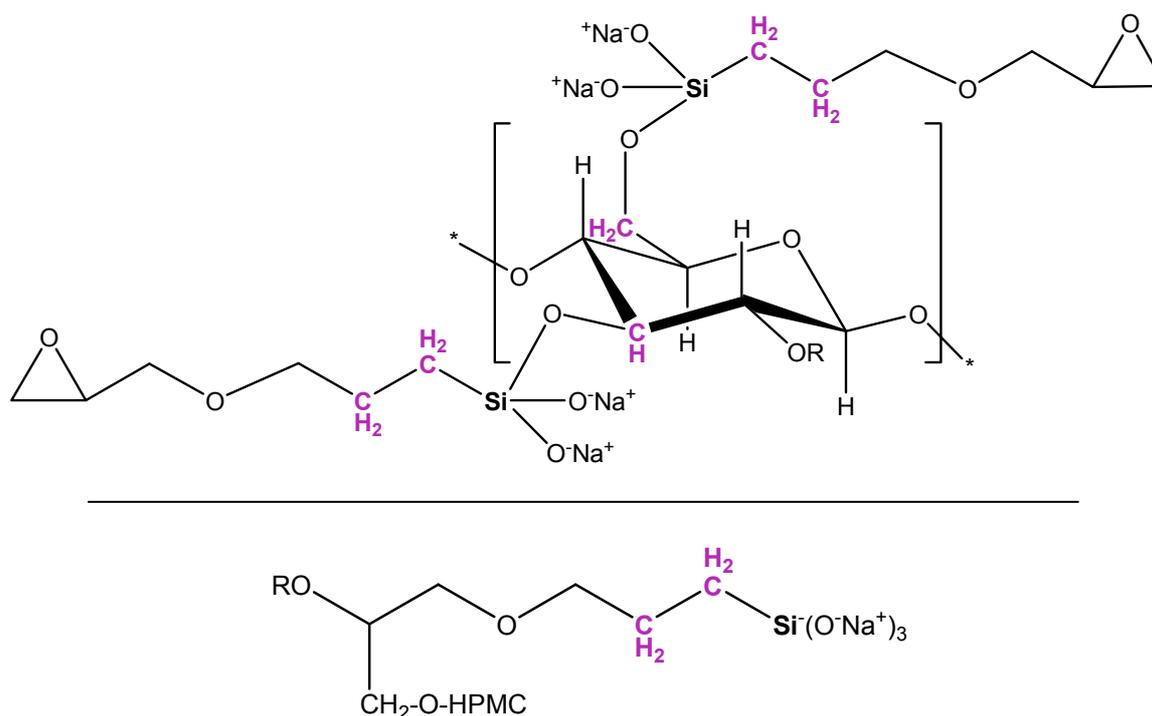


Figure II.19 : Représentation schématique des atomes d'hydrogène voisins (en mauve) situés à 2 et 3 liaisons chimiques de l'atome de silicium (en gras) d'une molécule de GPTMS dans le cas où celle-ci se lie par le côté silicium (en haut) ou par le côté époxy (en bas) à l'HPMC dans une solution aqueuse basique.

Dans le cas où le GPTMS est lié côté époxy (en bas de la figure II.19), on s'attend à observer des corrélations entre les atomes d'hydrogène des groupements $-CH_2$ du GPTMS, et éventuellement les atomes d'hydrogène des groupements $-CH_3$ (mais comme on dissout l'HPMC-Si dans une solution basique, cette dernière possibilité est très peu probable car les groupements méthoxysilanes s'ionisent). Dans le cas où le GPTMS est lié côté silicium (en haut de la figure II.19), on devrait voir en plus des corrélations avec les groupements $-CH_2$ du GPTMS d'autres corrélations provenant des groupements $-CH$ ou des $-CH_2$ du polymère HPMC-Si.

Deux spectres HMBC 1H - ^{29}Si ont ainsi été obtenus, l'un pour l'HPMC-Si avant dialyse, l'autre pour l'HPMC-Si dialysé. Ces spectres sont présentés sur la figure II.20. Ils sont composés d'un spectre 1H sur l'axe x et d'un spectre ^{29}Si sur l'axe y . Des spots de corrélations entourés indiquent les signaux des protons qui sont les deuxièmes et troisièmes voisins directs (via des liaisons chimiques) des atomes de silicium.

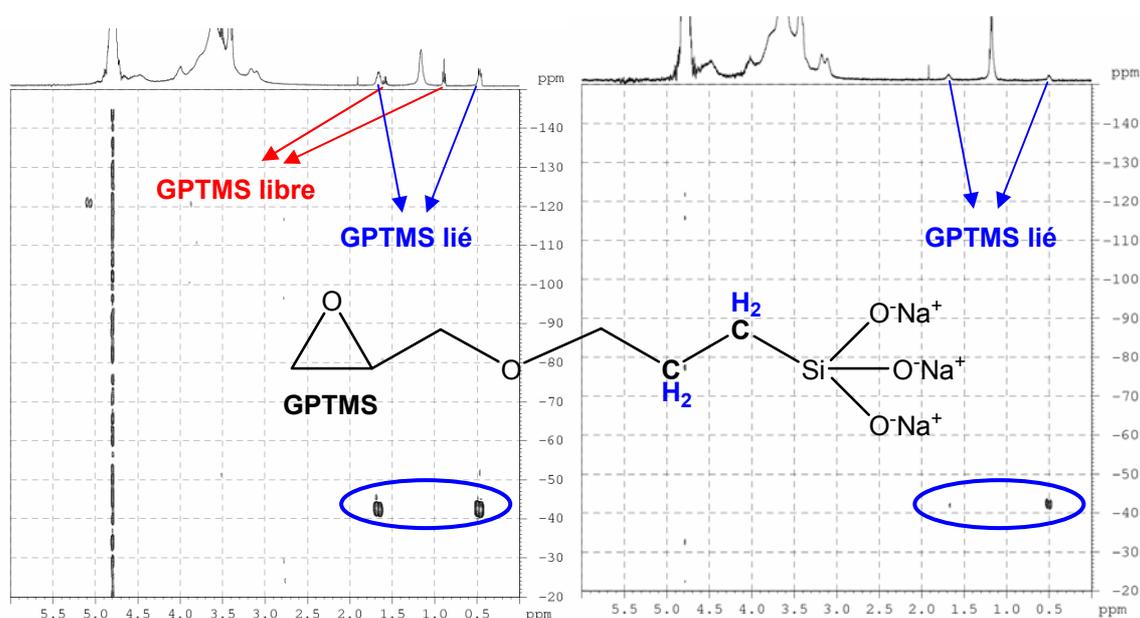


Figure II.20 : Spectres RMN 2D ^1H - ^{29}Si (x - y) des solutions basiques d'HPMC-Si avant (à gauche) et après dialyse (à droite) obtenus en utilisant une séquence HMBC. Les déplacements chimiques du proton sont portés en abscisse et ceux du silicium en ordonnée. Les deux polymères étaient dissous dans une solution de NaOD dans D_2O ($\text{pH} > 12$). Les flèches montrent les signaux provenant des molécules GPTMS liées et non liées à l'HPMC-Si. Les spots indiquant la corrélation entre les protons des groupements $-\text{CH}_2$ du GPTMS et les atomes de Si sont entourés en bleu.

Le spectre d'HPMC-Si non dialysé montre que les atomes de silicium sont liés uniquement aux deux groupements $-\text{CH}_2$, provenant des molécules de GPTMS [21]. Avant dialyse, l'HPMC-Si contient des molécules GPTMS greffées et non directement greffées au polymère qui se libèrent en solution basique. Afin de s'affranchir des signaux parasites des molécules GPTMS libres nous avons donc fait un spectre 2D de l'HPMC-Si après dialyse. Les deux spots indiquant la corrélation entre les atomes de Si et les deux groupements $-\text{CH}_2$ voisins persistent même après dialyse, ce qui confirme qu'une partie des molécules de GPTMS sont bien liées à la chaîne polymère. Il est important de remarquer, avec notre résolution expérimentale, qu'il n'y a en apparence pas d'autres spots de corrélation entre les atomes de silicium et d'autres groupements $-\text{CH}$ ou $-\text{CH}_2$. Ceci démontre que toutes les molécules GPTMS greffées à l'HPMC-Si sont liées par les « côtés époxy ».

Pour la première fois, nous avons réussi à mettre en évidence que les molécules de GPMTS se greffaient bien aux chaînes d'HPMC et que ce greffage se faisait par le « côté

époxy » pour former le composé silanisé HPMC-Si. Ce résultat confirme le schéma de synthèse proposé pour la synthèse de l'HPMC-Si qui supposait l'ouverture des cycles époxydes et leur attachement à l'HPMC-Si. Ainsi, les « côtés silicium » des molécules GTPMS greffés à l'HPMC-Si se retrouvent libres et disponibles pour la formation des ponts siloxanes après dissolution dans une solution aqueuse basique, et vont donc pouvoir induire une polycondensation des chaînes polymères. Cette polycondensation permettra d'obtenir un hydrogel d'HPMC-Si qui fera l'objet du chapitre suivant.

3. Conclusion

L'HPMC-Si a été synthétisé à partir de l'HPMC E4M pour permettre une réticulation chimique entre les chaînes polymères et pour obtenir ainsi un hydrogel. Même si les protocoles de synthèse et de réticulation sont maîtrisés, ils n'ont pas été décrits de façon argumentée jusqu'à présent, car la structure des polymères est mal connue. C'est pourquoi nous avons essayé de décrire à la fois la structure de l'HPMC E4M et celle de l'HPMC-Si en utilisant la diffusion de la lumière et la RMN du solide ou du liquide.

La masse molaire moyenne en poids d'une chaîne d'HPMC ou d'HPMC-Si a été évaluée par diffusion statique de la lumière. Elle a été estimée à environ $370\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l'HPMC et $434\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l'HPMC-Si. Nous observons donc une différence liée à la présence des molécules GPTMS dans le cas de l'HPMC-Si. Après dialyse de la solution d'HPMC-Si, on observe une légère diminution de la masse molaire de l'HPMC-Si dialysé. Elle est attribuée au départ des molécules de GPTMS non greffées à l'HPMC-Si qui se libèrent en solution basique et sont éliminées en dialysant. La vraie masse molaire de l'HPMC-Si a donc été déterminée à $414\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ avec un taux de greffage d'environ 1 molécule de GPTMS pour 10 unités glucosidiques. Les rayons de giration, qui correspondent à la taille des pelotes des chaînes polymères en solution, ont pu être évalués à 65 nm. Ils sont à peu près égaux pour tous les échantillons, ce qui montre que les pelotes d'HPMC-Si sont légèrement plus compactes que les pelotes d'HPMC. La diffusion dynamique de la lumière nous a permis d'estimer le rayon hydrodynamique de l'HPMC E4M. Il est plus faible (42 nm) que le rayon de giration, comme attendu, et leur

rapport montre que les pelotes d'HPMC ne sont ni trop compactes, ni trop dépliées, on est dans le cas d'un polymère idéal dans un bon solvant.

La RMN du solide du ^{29}Si nous a permis de déterminer le taux de greffage des groupements alcoxysilanes sur l'HPMC-Si, exprimé en pourcentage massique de Si, et de vérifier ainsi les résultats obtenus en diffusion de la lumière. Les environnements chimiques des atomes de siliciums ont pu être identifiés, il s'agit des formes T^0 , T^1 et T^2 , donc de groupements siloxanes partiellement ou complètement polycondensés. Malheureusement, étant données la longueur et la complexité des chaînes d'HPMC-Si, il a été impossible d'observer une éventuelle présence des sites préférentiels pour le greffage du GPTMS ni par quel côté se greffe le GPTMS. En effet, les signaux sont trop larges et trop faibles, le taux de silanisation n'atteint que 0.7 wt% de Si.

La RMN du liquide en 2D ^{29}Si - ^1H , nous a permis pour la première fois d'identifier le sens de greffage du GPTMS sur l'HPMC-Si. Il s'avère que les molécules de GPTMS se lient après l'ouverture des cycles époxy par les « côtés époxy », comme espéré. Les « côtés silicium » restent donc disponibles pour la création de ponts Si-O-Si ce qui conduit à la réticulation chimique des chaînes d'HPMC-Si et la formation d'un hydrogel. Néanmoins, la complexité des signaux dans les spectres RMN 1D ^1H était toujours très élevée pour pouvoir obtenir plus d'informations sur la structure d'HPMC et d'HPMC-Si. Nous avons dû procéder à une dépolymérisation de ces polysaccharides pour obtenir des oligomères plus courts. Ces travaux de dépolymérisation sont toujours en cours. Après séparation des différentes phases présentes dans le mélange des oligomères obtenu lors de la dépolymérisation, nous espérons remonter vers une statistique des sites préférentiels pour le greffage des groupements fonctionnels de l'HPMC et l'HPMC-Si.

Nous avons aussi essayé d'utiliser la spectroscopie de surface XPS sur l'HPMC E4M et l'HPMC-Si pour déterminer les environnements chimiques du silicium. Les résultats ne sont pas présentés ici car cette technique ne nous a pas apporté de nouvel élément concernant la structure de ces deux polymères.

Références bibliographiques

- [1] Daculsi, G.; Weiss, P.; Dupraz, A.; Lapkowski, M. Composition for biomaterials, methods of preparation. *Brevet FR 95-9582* **1995**, *Brevet WO A19705911* **1997**.
- [2] Bourges, X.; Weiss, P.; Daculsi, G.; Legeay, G., Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Advances in Colloid and Interface Science* **2002**, *99*, (3), 215-228.
- [3] Groupe Français d'études et d'applications des Polymères, *Initiation à la Chimie et à la Physico-Chimie Macromoléculaire*, Commission Enseignement du GFP, Ed. France, **1978**; 18 Vol.
- [4] Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E., Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, (5), 1387-1408.
- [5] Fatimi, A.; Tassin, J.-F.; Quillard, S.; Axelos, M. A. V.; Weiss, P., The rheological properties of silylated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* **2008**, *29*, (5), 533-543.
- [6] Joshi, S. C., Sol-Gel Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) in Ionic Media Including Drug Release. *Materials* **2011**, *4*, (10), 1861-1905.
- [7] Colorcon, The Dow Chemical CompanyTM. <http://www.colorcon.com/> (Consulté le **20 Août 2012**).
- [8] Alvarez-Lorenzo, C.; Lorenzo-Ferreira, R. A.; Gómez-Amoza, J. L.; Martínez-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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1999**, *20*, (1-2), 373-383.
- [9] Le Bideau, J.; Recho, J.; Weiss, P.; Fatimi, A.; Guicheux, J. Silanisation d'éther de cellulose par "chimie verte" dans des liquides ioniques. Procédés de fonctionnalisation. *Brevet FR 08/05473* **2008**, *Brevet WO10/037986 A1* **2010**.
- [10] Laïb, S. Marquage chimique de dérivés cellulose pour un suivi *in vivo* chez l'animal. Incorporation d'agents anti-ostéoporotiques sur des matrices phosphocalciques. *Thèse de doctorat*, Université de Nantes, Nantes, **2004**.
- [11] A Sence of Scale. <http://www.falstad.com/scale/> (Consulté le **23 Août 2012**).

- [12] Adam, M.; Bastide, J.; Candau, S. J.; Cohen Addad, J. P.; Joanny, J. F.; Lairez, D.; Oppermann, W.; Schröder, U. P.; de Gennes, P. G., *Physical properties of polymeric gels*. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, **1996**.
- [13] 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. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2001**, 12, (3), 201-205.
- [14] Flory, P. J., The Configuration of Real Polymer Chains. *The Journal of Chemical Physics* **1949**, 17, (3), 303-310.
- [15] Laws, D. D.; Hans-Marcus, L. B.; Alexej, J., Solid-State NMR Spectroscopic Methods in Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, (17), 3096-3129.
- [16] Bryce, D. L.; Bernard, G. M.; Gee, M.; Lumsden, M. D.; Eichele, K.; Wasylshen, R. E., Practical Aspects of Modern Routine Solid-State Multinuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: One-Dimensional Experiments. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* **2001**, 46, (2), 46-82.
- [17] Hayashi, S.; Hayamizu, K., Chemical Shift Standards in High-Resolution Solid-State NMR (^{13}C , ^{29}Si , and ^1H Nuclei). *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1991**, 64, (2), 685-687.
- [18] Hamoudi, S.; Yang, Y.; Moudrakovski, I. L.; Lang, S.; Sayari, A., Synthesis of Porous Organosilicates in the Presence of Alkytrimethylammonium Chlorides: Effect of the Alkyl Chain Length. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, (38), 9118-9123.
- [19] Alonso, B.; Massiot, D.; Babonneau, F.; Brusatin, G.; Giustina, G. D.; Kidchob, T.; Innocenzi, P., Structural Control in Germania Hybrid Organic-Inorganic Materials. *Chemistry of Materials* **2005**, 17, (12), 3172-3180.
- [20] Toussaint, G.; Brisbois, M.; Grandjean, J.; Cloots, R.; Henrist, C., Hybrid lamellar silica: Combined template extraction and hydrophilic silanation. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 329, (1), 120-126.
- [21] Wang, J.; Fan, X.; Tian, W.; Wang, Y.; Li, J., Ring-opening polymerization of γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane catalyzed by multi-metal cyanide catalyst. *Journal of Polymer Research* **2011**, 18, (6), 2133-2139.

- [22] Clasen, C.; Kulicke, W. M., Determination of viscoelastic and rheo-optical material functions of water-soluble cellulose derivatives. *Progress in Polymer Science* **2001**, 26, (9), 1839-1919.

Chapitre III

Hydrogel d'HPMC-Si

1. Introduction

Le polymère HPMC-Si, présenté dans le chapitre précédent, a été synthétisé au laboratoire LIOAD dans le cadre du développement d'un nouvel hydrogel pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage et de l'os. La préparation de l'hydrogel à base d'HPMC-Si a été mise au point par l'équipe de P. Weiss dans la continuité de son travail sur les hydrogels à base d'HPMC non silanisé [1]. La silanisation de l'HPMC a été réalisée pour permettre la formation d'un hydrogel chimique grâce à la polycondensation des chaînes d'HPMC-Si, basée sur un simple changement de pH [2].

Les hydrogels à base d'HPMC-Si présentent plusieurs avantages pour l'ingénierie tissulaire : il s'agit des gels à base de polymère d'origine naturelle, ils sont biocompatibles, injectables et capables de gélifier *in situ* une fois injectés dans le corps. Les travaux de recherche sur les hydrogels à base de l'HPMC-Si se poursuivent depuis son développement [3]-[8]. Cependant, certains aspects de ces biomatériaux n'étaient pas étudiés et sont l'objet de ce chapitre.

Le protocole de la préparation des hydrogels à base d'HPMC-Si est présenté de manière schématique sur la figure III.1. Le polymère HPMC-Si est d'abord dissous pendant deux jours à une concentration de 3 wt% dans une solution aqueuse très basique à 0.2 M de NaOH ($pH \sim 13$). Après deux dialyses dans une solution aqueuse à 0.09 M de NaOH, qui permettent à la fois de baisser le pH de la solution polymérique vers un pH proche de 12.4 et d'éliminer les molécules de GPTMS non directement greffées aux chaînes d'HPMC-Si, comme discuté dans le chapitre précédent, la solution aqueuse basique d'HPMC-Si est prête à être transformée en hydrogel. Cette solution basique est très visqueuse, sa viscosité est de 2.9 Pa.s à 25 °C [5], elle est donc plus de 3 ordres de grandeur supérieure à la viscosité de l'eau (10^{-3} Pa.s à 20 °C).

En mélangeant un volume de la solution basique d'HPMC-Si avec un demi-volume d'une solution tampon acide d'un pH de 3.2 à base d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES), appelée solution tampon B (solution TB), on obtient une solution précurseur de l'hydrogel à pH physiologique

(pH 7.4). Cette dernière est injectable encore pendant 30 à 40 minutes avant de gélifier. L'hydrogel final contient alors 2 wt% de polymère et 98 wt% de solution aqueuse. Il s'agit donc d'un hydrogel hautement hydraté. Le protocole précis de la préparation de l'hydrogel à base d'HPMC-Si est décrit en Annexe 1-C.

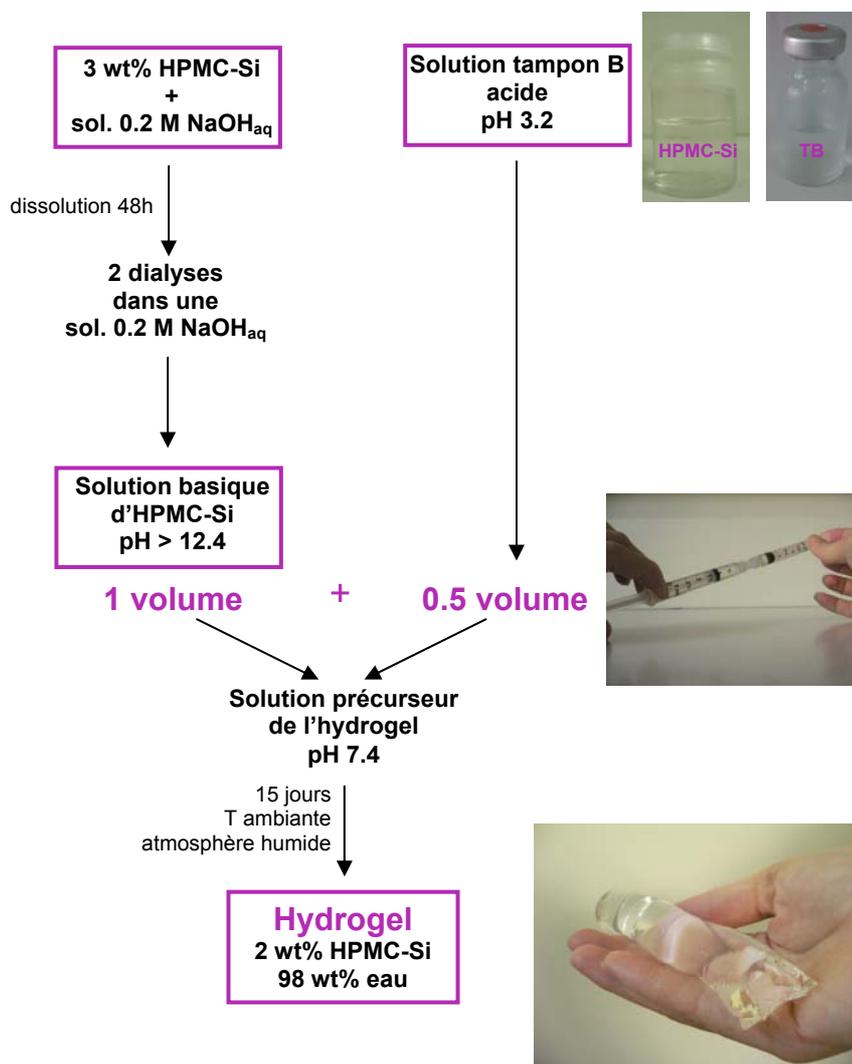


Figure III.1 : Représentation schématique de la préparation de l'hydrogel à base d'HPMC-Si. Les étapes clés sont indiquées en bleu et illustrées avec des images.

Le mécanisme proposé est schématisé sur la figure III.2 [5]. La solubilisation de l'HPMC-Si dans une solution aqueuse est possible à des pH supérieurs à 12.5, grâce à l'hydrolyse des groupements alcoxysilanes en silanolates. Ces derniers sont stables au dessus d'un pH limite situé vers 12.1-12.2, en-dessous duquel ils se transforment en silanols puis polycondensent. Grâce aux deux dialyses, qui conduisent à un abaissement progressif de pH de la solution basique d'HPMC-Si, le pH est ajusté à une valeur proche

de la valeur limite de stabilité des silanolates ($pH \sim 12.4$). En rajoutant la solution tampon acide à $pH 3.2$ (solution TB), le pH de la solution polymère baisse rapidement de 12.4 à 7.4 et provoque une transformation des groupements silanolates en silanols. Les silanols polycondensent ensuite pour créer des enchaînements de liaisons Si-O-Si. Les chaînes du polymère forment donc un réseau tridimensionnel : c'est un hydrogel chimique constitué d'un réseau macromoléculaire qui confine la solution aqueuse.

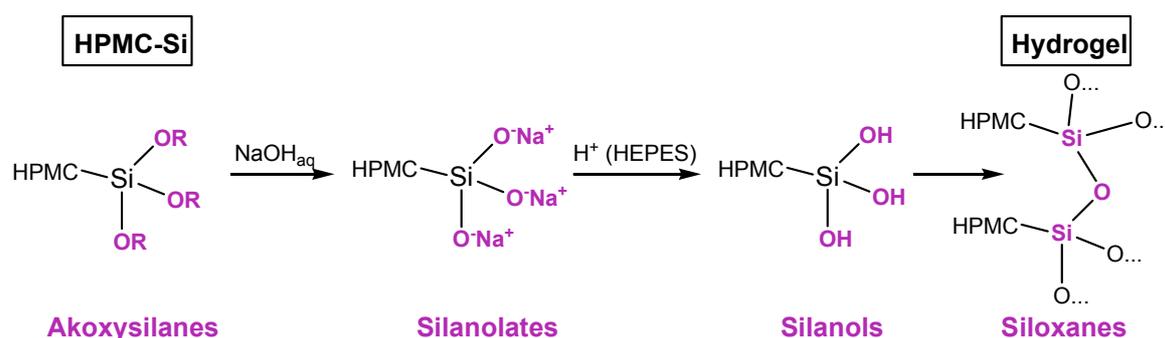


Figure III.2 : Représentation schématique des processus chimiques lors de la préparation de l'hydrogel à partir d'HPMC-Si. De gauche à droite : la dissolution du polymère HPMC-Si ($R = H, Na$ ou Si) dans une solution aqueuse de soude et l'ajout d'une solution tampon acide à base d'HEPES conduit à la polycondensation des chaînes polymères et la formation de l'hydrogel.

La vitesse de la polycondensation des groupements silanols dépend fortement du pH. La polycondensation est rapide juste en dessous du pH limite de stabilité des liaisons Si-O-Si et elle ralentit fortement avec un pH s'approchant de 7 approximativement [7]. Les mesures de viscosité de la solution précurseur de l'hydrogel ont démontré que la polycondensation complète de l'hydrogel d'HPMC-Si à pH 7.4 nécessite 15 jours de vieillissement à température ambiante et sous atmosphère humide [3]. La température joue également un rôle dans la polycondensation de l'hydrogel d'HPMC-Si : cette dernière est plus rapide à 37 °C qu'à température ambiante [6]. Pour des raisons pratiques, toutes les études présentées par la suite ont été réalisées sur les hydrogels vieillis deux semaines à température ambiante.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous intéresser d'abord à la morphologie et la structure des hydrogels d'HPMC-Si. Nous essayerons de déterminer et de comprendre l'organisation du polymère et de l'eau au sein de ces gels avec pour but de remonter aux paramètres caractéristiques des hydrogels : le paramètre de la maille et/ou la

taille des pores. Ensuite, l'état et la dynamique de l'eau dans les hydrogels d'HPMC-Si seront étudiés. La dynamique de l'eau ainsi que la taille des pores représentent des paramètres clés pour l'implantation et la viabilité des cellules dans ces hydrogels. Finalement, certaines propriétés mécaniques des hydrogels d'HPMC-Si seront présentées.

2. Structure et morphologie des hydrogels d'HPMC-Si

2.1. La structure

2.1.1. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique a été effectuée sur l'hydrogel et sur le polymère seul dans le but d'observer une différence de stabilité thermique entre les deux formes d'HPMC-Si. Les échantillons ont été chauffés de la température ambiante jusqu'à 600 °C à une vitesse de 5 °C.min⁻¹ en présence d'air (SETARAM TGA 92 – 16.8).

Les deux courbes représentant la perte de masse de l'échantillon en fonction de la température sont présentées sur la figure III.3. Le polymère, qui n'a pas été desséché au préalable, contient environ 3 wt% d'eau qui s'évapore jusqu'à 100 °C. La dégradation thermique du polymère commence à 200 °C et se termine vers 500 °C. En revanche, l'hydrogel se déshydrate jusqu'à environ 130 °C dans notre expérience, à cause de la quantité d'eau plus élevée (98 wt%). La dégradation de la matrice d'HPMC-Si est observée à environ 240 °C, soit légèrement au-dessus de la température du début de dégradation thermique du polymère seul.

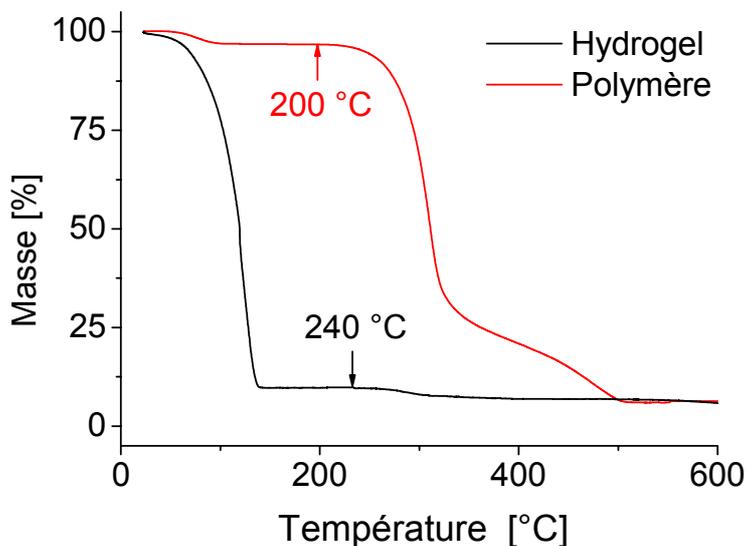


Figure III.3 : Analyse thermogravimétrique du polymère HPMC-Si et de son hydrogel.

Cette différence en température peut être le signe de la présence des liaisons chimiques entre les macromolécules HPMC-Si. En effet, la polycondensation entre les chaînes de polymère conduit à une plus grande stabilité thermique et, par conséquent, nous observons un décalage du début de dégradation dans le cas de la matrice de l'hydrogel vers les températures plus élevées. Nous avons donc une première confirmation concernant la présence des liaisons chimiques au sein des hydrogels à base d'HPMC-Si.

2.1.2. RMN du solide

La nature des liaisons chimiques formant l'hydrogel d'HPMC-Si a été déterminée grâce à la RMN du solide du ^{29}Si . Nous avons observé l'évolution des environnements chimiques des atomes de silicium présents dans l'HPMC-Si depuis sa synthèse jusqu'à sa gélification. Les spectres de l'HPMC-Si avant et après dialyse ont été présentés dans le chapitre précédent. Nous avons pu observer que les chaînes de polymère étaient déjà partiellement polycondensées, car les atomes de silicium se trouvaient dans les environnements chimiques T^0 , T^1 et T^2 . Après gélification, l'hydrogel d'HPMC-Si a été lyophilisé et découpé en petits morceaux qui ont été mélangés avec la référence interne (TKS). Deux spectres RMN MAS ^{29}Si CP et HPDEC ont été enregistrés en appliquant les séquences d'impulsions avec les paramètres indiqués en Annexe 3-B.

Le spectre en polarisation croisée CP de l'hydrogel d'HPMC-Si lyophilisé est présenté sur la figure III.4 en noir. A part les deux pics situés à -9.8 et -135.2 ppm liés au TKS, nous pouvons voir trois autres pics provenant des atomes de silicium présents dans l'hydrogel. Ces atomes de silicium se trouvent dans les environnements chimiques T^1 (-48.6 ppm), T^2 (-57.7 ppm) et T^3 (-65.7 ppm). Les groupements alcoxysilanes pendants forment donc bien un, deux ou trois ponts siloxanes (Si-O-Si) à la fin de la polycondensation de l'hydrogel.

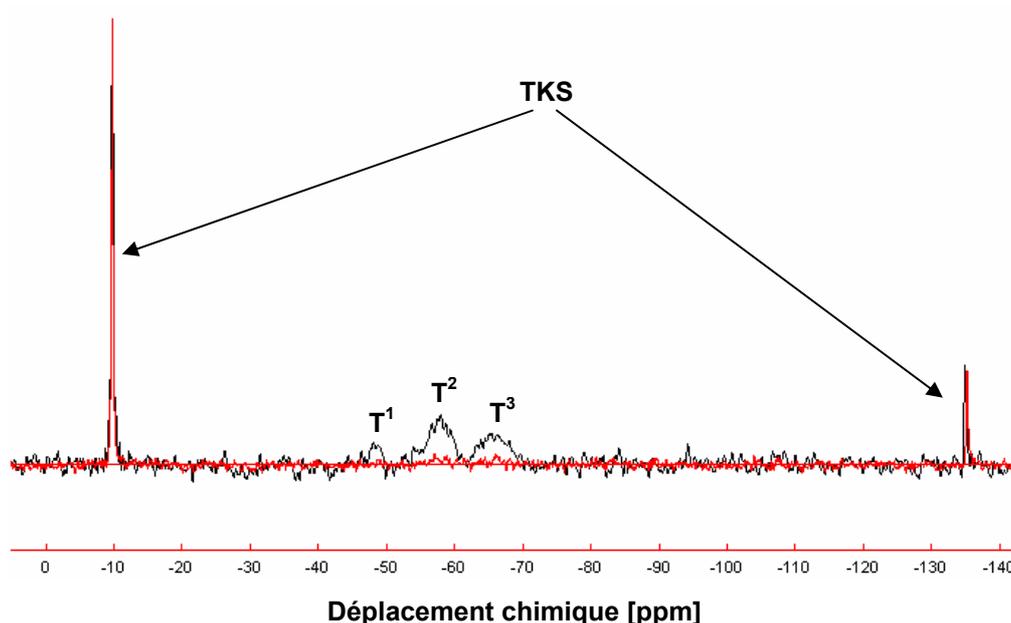


Figure III.4 : Spectres RMN MAS ^{29}Si d'un hydrogel d'HPMC-Si lyophilisé. Le spectre obtenu avec la séquence CP est en noir, le spectre HPDEC est en rouge.

Cependant, en faisant un spectre avec la séquence HPDEC (sur la même figure en rouge), l'intensité des signaux T^2 et T^3 relatifs à l'hydrogel est très faible et celle du signal correspondant aux atomes de silicium T^1 n'est plus visible. Cela signifie que la quantité de silicium dans l'échantillon n'est pas suffisante pour obtenir un signal correct même après plus de 60 h d'acquisition. Après un ajustement et une intégration des pics T^2 et T^3 dans le spectre rouge, le taux de silicium trouvé est d'environ 0.3 wt%. Cette valeur est assez proche de celle trouvée dans l'HPMC-Si après dialyse (0.6 wt%), sachant que l'incertitude sur l'ajustement est sans doute grande vu la faible intensité des pics. Ce résultat est donc en cohérence avec celui présenté en chapitre II.

La RMN du solide de ^{29}Si nous donne une indication sur la structure des hydrogels d'HPMC-Si : les chaînes de polymère sont complètement ou partiellement polycondensées, c'est-à-dire que chaque atome de silicium participe à la formation d'un, deux ou trois ponts siloxanes. Ce résultat confirme le processus de gélification présenté sur la figure III.2, qui n'était jusqu'à présent qu'hypothétique.

2.2. La morphologie

Après avoir partiellement identifié la nature chimique de l'hydrogel, il est essentiel de déterminer sa morphologie. En particulier, se pose la question de la morphologie qu'adopte la matrice du gel pour inclure des quantités d'eau proches de 98 wt%. Comme déjà discuté dans le chapitre I, il existe plusieurs façons d'agencer la matrice et l'eau au sein d'un hydrogel (voir figure I.6).

Ainsi, comme présenté auparavant, trois hypothèses d'organisation texturale se présentent : (i) une matrice avec de grands pores, caractérisés par une taille moyenne d , et dont les parois sont denses, constituées d'HPMC-Si ; (ii) des chaînes d'HPMC-Si qui peuvent former un maillage homogène dans tout le volume du gel, décrit par un paramètre de maille ζ ; (iii) une structure hiérarchisée avec de grands pores de taille d dont les parois sont moins denses, constituées d'un maillage d'HPMC-Si caractérisé par un paramètre de maille ζ .

L'étude de la morphologie des systèmes hautement hydratés est souvent complexe. En effet, la présence d'une grande quantité d'eau constitue un point bloquant pour certaines techniques de caractérisation, comme par exemple pour la microscopie électronique. Pourtant, la microscopie électronique représente un bon moyen pour l'observation directe de la morphologie des échantillons. Il est bien sûr possible de déshydrater l'échantillon pour faciliter sa caractérisation, mais cela implique de la prudence dans l'interprétation ultérieure car la déshydratation risque de modifier la texture du polymère et fausser l'observation.

Nous nous sommes donc d'abord tournés vers les techniques permettant l'étude de la morphologie des hydrogels à l'état hydraté, telles que la microscopie électronique à balayage en mode environnemental et la microscopie à force atomique. Ensuite, nous avons essayé d'autres types de microscopie électronique qui nécessitent la lyophilisation ou congélation. Enfin, différents calculs ainsi que la diffusion des neutrons aux petits angles ont été réalisés afin d'évaluer le paramètre de maille des hydrogels d'HPMC-Si.

2.2.1. Microscopie électronique à balayage environnementale (MEB-environnemental)

Les microscopes électroniques classiques fonctionnent sous vide secondaire, vide dans lequel doit se trouver l'échantillon lors de son observation. Or, un système qui possède 98 wt% d'eau va se déshydrater très rapidement sous une pression très faible.

Pour éviter la déshydratation de notre hydrogel, nous avons essayé d'imager sa morphologie dans un microscope électronique à balayage en mode environnemental (MEB-environnemental). Dans ce type de MEB, la pression dans la chambre d'observation est d'environ 400 Pa, ce qui est beaucoup plus proche de la pression atmosphérique ($\sim 10^5$ Pa) que dans un MEB ordinaire ($\sim 10^{-5}$ Pa). Cette pression relativement élevée nous laisse suffisamment de temps pour pouvoir faire quelques images de la surface de l'échantillon avant qu'il ne se déshydrate.

Moura *et al.* ont également utilisé un MEB-environnemental pour déterminer la porosité dans des hydrogels à base de chitosan, contenant entre 94 et 97 wt% d'eau, qui ont été développés en tant que biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire [9]. Dans leur étude, les images enregistrées à une pression de 500 Pa montrent une porosité qui varie de 200 à 400 μm en fonction de la composition du gel.

Notre essai de microscopie environnementale a été effectué à l'Université d'Angers par G. Mabileau sur le microscope Zeiss EVO LS10 à une pression de 407 Pa. Une image de la section de notre hydrogel d'HPMC-Si est présentée sur la figure III.5.

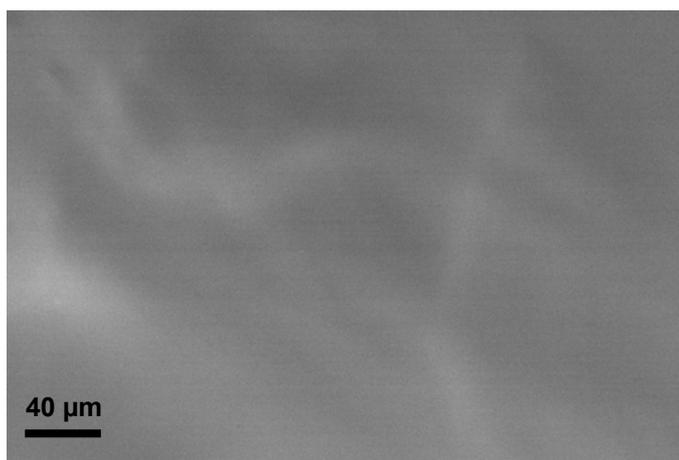


Figure III.5 : Image de la section de l'hydrogel d'HPMC-Si obtenue sur le MEB-environnemental à une tension d'accélération de 20 kV et une pression de 407 Pa.

Malheureusement, le MEB-environnemental ne permet pas de faire des grossissements importants (pas plus de x1000), et il faut souvent se limiter à un grossissement d'environ x500, surtout pour les échantillons très hydratés. Notre image a été faite à un grossissement x310. Il faut constater que dans ces conditions, il est impossible de voir une différence entre le liquide et le polymère. Nous n'avons donc pas pu déterminer la morphologie de l'hydrogel avec ce type de microscopie.

2.2.2. Microscopie à force atomique (AFM)

Une autre technique de caractérisation de la morphologie qui permet de préserver le taux d'hydratation des échantillons, est la microscopie à force atomique (AFM) en mode environnemental. Cette technique utilise une pointe pour balayer la surface d'un échantillon et analyser ainsi sa topologie. Un microscope AFM fonctionne à l'air libre, il peut aussi travailler en milieu liquide, ce qui évite la déshydratation des hydrogels.

La microscopie AFM sur l'hydrogel d'HPMC-Si a été effectuée sur le microscope JPK Nanowizard II. La surface de l'hydrogel a été recouverte d'une petite quantité d'eau distillée, ensuite une pointe pyramidale Bruker ($r = 7 \text{ nm}$) montée sur un levier (cantilever) en nitrure de silicium conçue spécialement pour le travail en milieu liquide a été utilisée en mode intermittent. Ce mode consiste à faire vibrer le cantilever à sa propre fréquence de résonance au-dessus de la surface de l'échantillon. Une image peut être

obtenue soit en visualisant l'amplitude d'oscillation du levier qui est modifiée par l'interaction surface-pointe, soit en visualisant la phase.

En fait, aucune image de la surface de l'hydrogel n'a pas pu être enregistrée car la pointe de l'AFM pénétrait à l'intérieur du gel, même si nous avons travaillé en mode intermittent. Les essais sans eau sur la surface ou encore en mode contact, où la pointe doit appuyer sur la surface de l'échantillon pour la balayer, ont donné les mêmes résultats. Notre hydrogel est trop mou pour ce type de microscopie. Par conséquent, par microscope AFM nous ne pouvons pas obtenir d'information sur la surface de l'hydrogel.

2.2.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Puisque les observations en mode hydraté n'ont pas donné d'informations concernant la morphologie de l'hydrogel d'HPMC-Si, nous avons étudié l'échantillon déshydraté. La déshydratation doit être rapide pour limiter l'impact négatif de la diminution du taux d'hydratation sur la morphologie. Dans un premier temps, nous avons opté pour une lyophilisation classique de notre hydrogel. La lyophilisation consiste en une congélation de l'échantillon à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ suivie d'une sublimation sous vide de la glace ainsi formée. L'hydrogel lyophilisé peut être observé dans un MEB ordinaire (sous vide). Il faut toutefois métalliser sa surface, car l'HPMC-Si est un polymère isolant.

Les images obtenues avec les conditions indiquées en Annexe 3-D sont présentées sur la figure III.6.

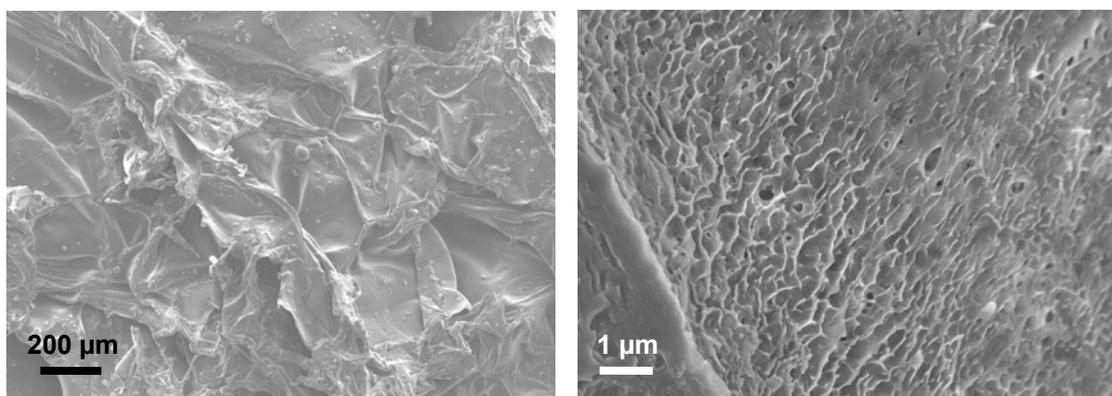


Figure III.6 : Images MEB des sections de l'hydrogel d'HPMC-Si lyophilisé.

Il s'agit de sections d'un hydrogel d'HPMC-Si lyophilisé. On peut voir que le polymère ne présente pas la morphologie à laquelle on pourrait s'attendre dans le cas d'un hydrogel. En effet, notre hydrogel aurait pu présenter une structure poreuse remplie d'eau, comme par exemple des hydrogels à base d'arabinoxylane (composante d'hémicellulose) étudiés pour comprendre les processus dans les parois cellulaires végétales [10], ou des hydrogels à base de chitosan développés en tant que biomatériaux [9]. Dans ces deux derniers cas, la congélation à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et la lyophilisation de ces hydrogels avaient permis d'observer la porosité de l'hydrogel.

Or, comme on peut le constater sur la figure III.6, il n'y a pas de pores visibles dans notre hydrogel. En fait, il semble qu'une simple congélation à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ n'est pas assez rapide pour figer la morphologie de l'hydrogel telle qu'elle est à température ambiante. La congélation lente provoque la cristallisation de l'eau qui est plus volumineuse que la glace amorphe et élargit donc les pores. Ceci a déjà été observé dans des hydrogels à base d'alginate conçus pour l'ingénierie tissulaire, dans lesquels la taille des pores a été étudiée en fonction du mécanisme de congélation [11]. Une fois la glace cristalline sublimée, les parois des grands pores, peut-être trop fragiles, peuvent s'effondrer. Ceci pourrait expliquer pourquoi, dans notre cas, nous n'avons pas observé de structure poreuse.

Pour pallier ce problème, nous sommes passés par une congélation dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide à une température proche de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ce type de congélation est largement utilisée depuis plusieurs décennies dans le domaine biomédical, parce qu'il permet une bonne préservation de la morphologie et de la qualité des tissus. Ceci est lié à deux raisons principales : premièrement, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ est une température suffisamment basse pour empêcher la formation de grands cristaux qui endommagent des tissus ; deuxièmement, contrairement à l'azote liquide, l'isopentane ne dégaze pas au contact de l'échantillon et de ce fait élimine les risques de fractures.

Une fois les hydrogels d'HPMC-Si congelés dans l'isopentane, ils ont été lyophilisés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous vide. L'image résultante d'une section de l'hydrogel, obtenue avec les conditions indiquées en Annexe 3-D, est présentée sur la figure III.7.

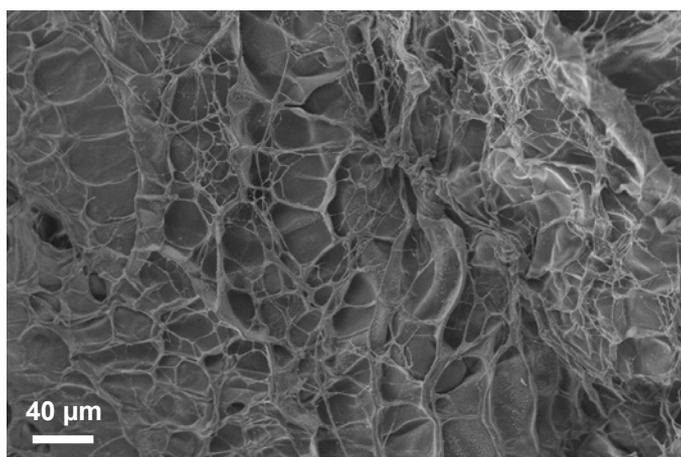


Figure III.7 : Image MEB de la section de l'hydrogel d'HPMC-Si congelé dans l'isopentane et lyophilisé.

On voit que l'HPMC-Si forme des pores d'une taille de l'ordre de quelques dizaines de micromètres. Les hydrogels d'HPMC-Si congelés dans l'isopentane et lyophilisés ont déjà été étudiés dans le cadre de la thèse de E. Rederstorff au LIOAD [8]. Même si la morphologie des images de cette dernière étude ne correspond pas tout à fait à celle de la figure III.7, la taille des pores est du même ordre de grandeur dans les deux cas.

Cependant, il n'est pas certain que l'on préserve la morphologie des hydrogels dans les préparations précédentes. C'est pourquoi nous avons décidé de poursuivre l'étude de la morphologie de nos hydrogels sur un microscope électronique en mode cryogénique.

2.2.4. Cryo-microscopie électronique à balayage (cryo-MEB)

La cryo-microscopie électronique à balayage est à priori une technique bien adaptée à l'observation des hydrogels [12]. Elle bénéficie d'une congélation rapide dans l'azote pâteux (l'azote dans une phase intermédiaire entre un état solide et liquide, sa température moyenne est environ $-207\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous pression atmosphérique [13]) et ne nécessite pas de lyophilisation subséquente des échantillons. Comme on vient de le voir, il s'agit de deux étapes clés pouvant influencer la morphologie des hydrogels.

Dans un cryo-microscope, l'observation des spécimens s'effectue à froid. La congélation rapide dans l'azote pâteux, obtenu en baissant la pression de l'azote liquide, permet d'éviter la formation de glace cristalline : l'eau en phase solide amorphe n'est pas

plus volumique que l'eau liquide dans des conditions standards. L'échantillon monté sur un porte échantillon est plongé dans l'azote pâteux et ensuite rapidement transféré dans la chambre de préparation du microscope, dont la température se situe à $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ et la pression à $\sim 10^{-4}$ Pa. La surface de l'échantillon y est découpée grâce à une guillotine et la glace superficielle est sublimée en augmentant la température à $-87\text{ }^{\circ}\text{C}$. Enfin, la surface de l'échantillon est métallisée. L'observation se fait à $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, l'eau de l'hydrogel reste donc dans un état solide pendant toute la préparation et l'observation. Les détails concernant la préparation des échantillons ainsi que les paramètres expérimentaux sont décrits en Annexe 3-E.

Les images ainsi obtenues sont présentées sur la figure III.8. Nous pouvons observer une morphologie poreuse de nos hydrogels avec une distribution de taille de pores allant de quelques micromètres jusqu'à quelques dizaines de micromètres. Même si la cryomicroscopie ne permet pas de travailler à de plus forts grossissements, les pores semblent délimités par des parois dont l'épaisseur est d'environ 100 nm, comme montré dans l'insert de la figure III.8.

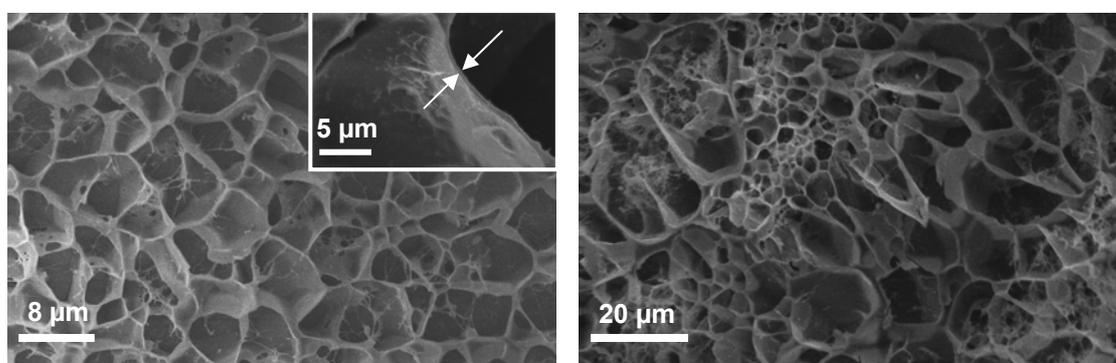


Figure III.8 : Images des sections de l'hydrogel d'HPMC-Si provenant du cryo-MEB. L'insert montre l'épaisseur de la paroi d'un pore (~ 100 nm).

La cryo-microscopie a déjà été employée pour observer différents types d'hydrogels [14]-[17]. A titre d'exemple, on peut citer les hydrogels à base de chitosan, développés en tant que biomatériaux, qui contiennent des macropores générés avec le gaz de CO_2 dense [18]. Une taille de pores moyenne a été déterminée grâce à la cryo-microscopie, d'environ 30 à 40 μm.

Pour comparaison, nous avons cherché à observer un échantillon non silanisé. Pour cela, nous avons utilisé le même protocole de cryo-microscopie sur une solution basique (0.2 M NaOH_{aq}) à 2 wt% d'HPMC E4M non silanisé. Les images obtenues sont présentées sur la figure III.9.

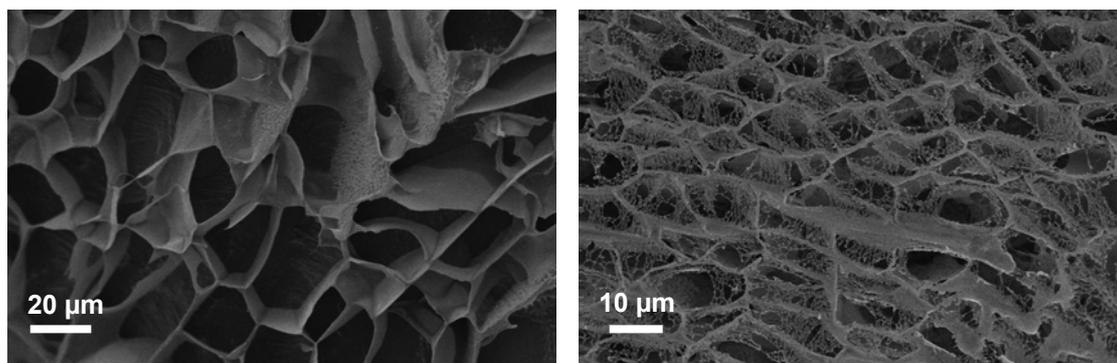


Figure III.9 : Images cryo-MEB de la solution basique d'HPMC à 2 wt%.

De façon surprenante, la morphologie du produit final est comparable à celle de l'hydrogel de la figure III.8. Pourtant, dans ce cas, les chaînes d'HPMC non-silanisé ne peuvent pas former de gel chimique. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que la morphologie de la solution d'HPMC diffère de celle d'un gel d'HPMC-Si. Ce n'est pas le cas. Cela signifie donc que la morphologie observée n'est probablement qu'un artefact, lié au changement brutal de température lors de la congélation.

A ce stade, nous ne pouvons donc pas décrire avec exactitude la morphologie de nos hydrogels. S'agit-il de systèmes contenant des pores d'une taille micrométrique, formés de parois denses d'HPMC-Si, comme le démontrent toutes nos observations microscopiques ? Ou bien s'agit-il des systèmes plus simples, constitués d'un réseau très peu dense d'HPMC-Si décrit avec un seul paramètre unique : le paramètre de maille ? Nous ne pouvons pas actuellement répondre à cette question. Dans la suite nous allons nous intéresser à cette deuxième hypothèse, particulièrement à travers l'étude du paramètre de maille des hydrogels d'HPMC-Si.

2.2.5. Evaluation du paramètre de maille des hydrogels d'HPMC-Si par rhéologie et calcul théorique

Le paramètre de maille ξ des hydrogels déjà présenté au chapitre I peut être calculé, de façon indirecte, à partir des résultats de mesures rhéologiques ou des valeurs de masses molaires.

Un paramètre de maille des hydrogels d'HPMC-Si a déjà été estimé à partir des mesures rhéologiques du module de conservation en cisaillement (G') [19]. En effet, selon la théorie de Flory [20], le paramètre de maille est lié au module de conservation par :

$$\xi = \sqrt[3]{\frac{k_B T}{G'}} \quad (\text{III.1})$$

avec k_B la constante de Boltzmann et T la température absolue. Cette relation n'est valable que pour les polymères en bon solvant, ce qui est bien le cas de l'HPMC-Si dans la solution aqueuse à 0.2 M de soude.

En prenant la valeur expérimentale de $G' = 310 \text{ Pa}$ à $T = 300 \text{ K}$, et avec $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$, on trouve une valeur du paramètre de maille $\xi \approx 24 \text{ nm}$.

Le paramètre de maille dépend aussi du polymère utilisé pour l'hydrogel. Pour un hydrogel dans un bon solvant, gonflé de manière homogène, on peut relier le paramètre de maille à la masse molaire du polymère, selon [21] :

$$\xi = l \frac{1}{\sqrt[3]{v_{2m}}} \sqrt{c_n \frac{2M_c}{M_r}} \quad (\text{III.2})$$

avec l la longueur de liaison moyenne dans une unité de répétition du polymère constituant le gel, v_{2m} la fraction volumique du polymère dans le gel à l'état gonflé, c_n le paramètre caractéristique de Flory, M_r la masse molaire moyenne d'une unité de répétition du polymère et M_c la masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation.

Nous pouvons prendre la liaison carbone-oxygène C-O comme une liaison moyenne typique de l'HPMC-Si, d'où $l = 1.49 \text{ \AA}$. La fraction volumique d'HPMC-Si dans le gel est 0.02. La valeur du paramètre de Flory est, en première approximation, celle de la cellulose, c'est-à-dire 20.9 [22]. La masse moyenne M_r d'une unité d'HPMC-Si est proche de 226 g.mol^{-1} en prenant la masse molaire moyenne d'une unité glucosidique d'HPMC E4M, soit environ 202 g.mol^{-1} , et en supposant que l'HPMC-Si contient 1 groupement alcoxysilane pour 10 cycles. De plus, si tous les alcoxysilanes sont polycondensés en siloxanes, le gel d'HPMC-Si a un nœud de réticulation tous les 10 cycles glucosidiques. Nous pouvons donc prendre $M_c \approx 2260 \text{ g.mol}^{-1}$. Avec toutes ces approximations, on trouve une valeur du paramètre de maille d'environ $\xi \approx 11 \text{ nm}$. Le paramètre de maille ainsi obtenu est du même ordre de grandeur que celui trouvé précédemment grâce aux mesures rhéologiques.

Nous pouvons donc en conclure que le paramètre de maille théorique de l'hydrogel d'HPMC-Si est de l'ordre de grandeur d'une dizaine de nanomètre. Il est souhaitable de confirmer ce résultat théorique par une mesure expérimentale. Une technique bien adaptée à sonder les distances de l'ordre du 1 nm jusqu'à 100 nm est la diffusion des neutrons aux petits angles (voir figure I.5).

2.2.6. Evaluation du paramètre de maille des hydrogels d'HPMC-Si par diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)

La diffusion des neutrons aux petits angles (SANS de l'anglais *Small Angle Neutron Scattering*) est une technique largement utilisée pour déterminer la forme et l'organisation des objets diffusants dispersés dans un milieu homogène. Similairement à la diffusion de la lumière, le principe du SANS consiste à envoyer un faisceau de neutrons de faible divergence angulaire et de longueur d'onde λ sur un échantillon et à mesurer la variation d'intensité diffusée $I(q)$ en fonction de la valeur du vecteur de diffusion q , relié à l'angle de diffusion θ par la relation suivante :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{III.3})$$

Le domaine de valeurs du vecteur de diffusion q (en \AA^{-1}) doit être du même ordre de grandeur que celui des distances à mesurer. Compte tenu des longueurs d'ondes caractéristiques des neutrons, comprises entre 0.1 et 2 nm, les valeurs du vecteur de diffusion intéressantes sont obtenues pour des faibles valeurs de l'angle θ , typiquement inférieur à 5° .

L'évolution de l'intensité diffusée $I(q)$ nous permet de déterminer la forme et l'organisation des structures qui diffusent au sein de l'échantillon, sous condition que l'intensité diffusée par celles-ci ne soit pas négligeable. Il faut donc s'assurer que les structures étudiées possèdent un bon contraste par rapport au milieu dans lesquels elles sont dispersées. L'obtention d'un bon contraste en SANS est facilitée par la différence importante entre les longueurs de diffusion cohérentes des atomes d'hydrogène ($b_{coh} = -0,374 \times 10^{-12} \text{ cm}$) et de deutérium ($b_{coh} = 0,667 \times 10^{-12} \text{ cm}$). Cette différence est à la base du principe de substitution isotopique et de l'emploi de solvants deutérés, techniques expérimentales très couramment utilisées en SANS. Plus de détails concernant le principe de la diffusion des neutrons aux petits angles sont indiqués en Annexe 2-C.

Pour augmenter le contraste entre la solution aqueuse et le réseau de polymère, les hydrogels d'HPMC-Si ont été préparés en milieu D_2O . Par conséquent, les atomes d'hydrogène qui diffusent proviennent pratiquement exclusivement du polymère. Deux concentrations en polymère ont été réalisées : à 2 wt% et 4 wt% d'HPMC-Si. Quand la concentration en polymère augmente, l'intensité diffusée devrait augmenter elle-aussi et l'observation de la contribution liée au polymère devrait être plus facile. Les échantillons ont été introduits dans des cellules en quartz de 5 mm d'épaisseur. Les expériences SANS ont été menées au Laboratoire Léon Brillouin (LLB) à Saclay, sur le spectromètre PACE avec Dr. D. Lairez. La longueur d'onde des neutrons était de 12 \AA pour les valeurs de q comprises entre 0.004 et 0.1 \AA^{-1} , et de 5 \AA pour les valeurs de q comprises entre 0.04 et 0.4 \AA^{-1} . Les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-F.

Les résultats obtenus pour les deux types d'hydrogels sont présentés sur la figure III.10 où l'on représente l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion.

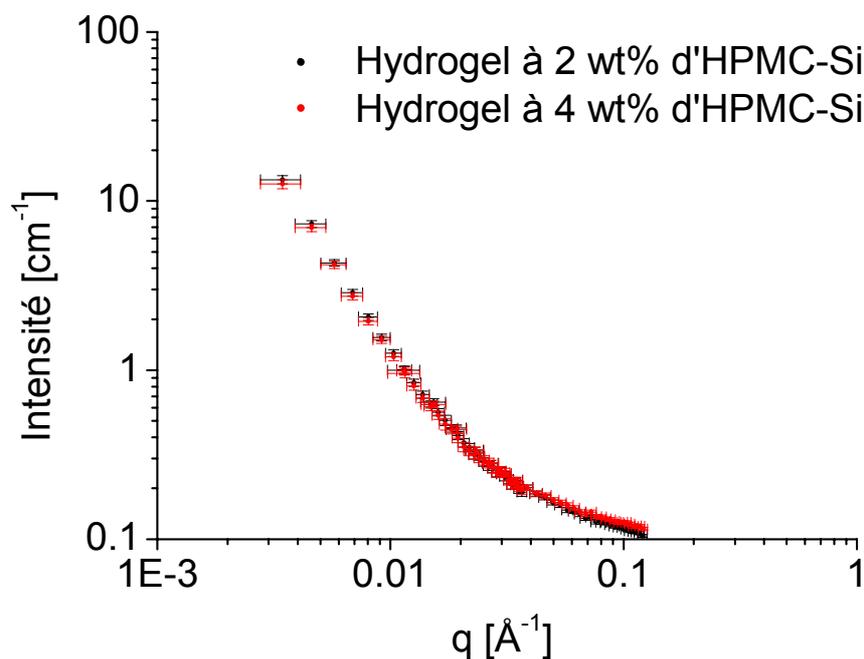


Figure III.10 : Intensité SANS en fonction de la valeur du vecteur de diffusion pour les hydrogels à 2 wt% et 4 wt% d'HPMC-Si.

On peut constater que l'intensité diffusée par les hydrogels en fonction de l'angle de diffusion ne varie pas du tout quand la concentration en polymère passe de 2 à 4 wt%, ce qui est très étonnant. Ceci indique que ce n'est pas le polymère qui diffuse, mais autre chose, peut-être des impuretés ou des hétérogénéités dont la concentration est indépendante de celle du polymère. L'hypothèse la plus vraisemblable est que cette source de la diffusion soit des microbulles introduites dans les échantillons pendant leur préparation. En effet, la préparation d'un hydrogel nécessite un mélange de solution basique d'HPMC-Si avec la solution TB dans deux seringues luer-lock interconnectées. Cette étape peut causer l'introduction de bulles d'air invisibles à l'œil nu mais dont les dimensions correspondraient à celles observées par SANS. La quantité de bulles contenues dans chaque échantillon est indépendante de la concentration en polymère, car le volume à mélanger est toujours identique. Les microbulles restent piégées dans les hydrogels, parce que leur viscosité est trop importante pour qu'elles puissent remonter à la surface.

Nous avons fait également la diffusion sur deux solutions d'HPMC E4M non-silanisé : à 3 wt% et à 6 wt% dans une solution 0.2 M NaOH en D₂O. Ces

concentrations en polymère correspondent aux concentrations des solutions basiques d'HPMC-Si avant leur mélange avec la solution tampon et leur réticulation. Les intensités diffusées par ces deux échantillons sont présentées sur la figure III.11a.

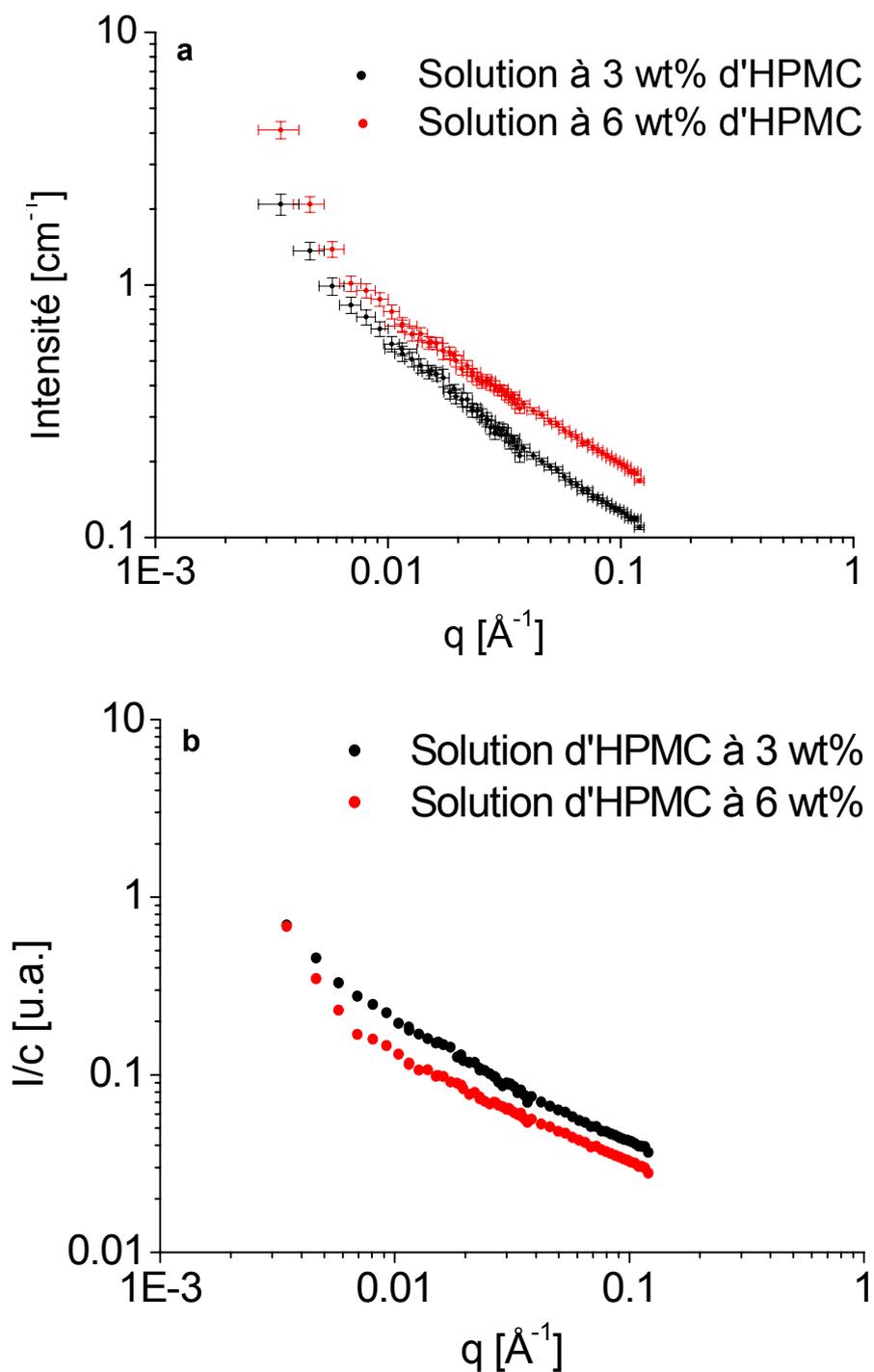


Figure III.11 : Intensité SANS absolue (a) et rapportée à la concentration (b) en fonction de la valeur du vecteur de diffusion pour les solutions à 3 wt% et 6 wt% d'HPMC.

Contrairement au cas précédent des hydrogels, l'intensité diffusée par les solutions varie en fonction de la concentration. Si on rapporte ces intensités à la concentration en polymère (voir la figure III.11b), les deux courbes I/c devraient être superposées. Or, ce n'est pas le cas. La solution la plus concentrée diffuse moins que celle qui contient moins de polymère. Pour le moment, nous n'avons aucune explication à ce résultat étrange.

Par ailleurs, en observant la figure III.11a on peut constater que l'intensité diffusée par les deux solutions d'HPMC aux petites valeurs de q est sensiblement inférieure à celle diffusée par les hydrogels (figure III.10). Ceci tend à confirmer le fait que dans le cas des hydrogels l'intensité est diffusée par des microbulles et non pas par le polymère HPMC-Si. Les solutions d'HPMC étant moins visqueuses, elles ne contiennent pas autant de bulles et par conséquent elles diffusent moins.

Nous ne pouvons malheureusement pas tirer plus de conclusions de la diffusion des neutrons aux petits angles. La technique de préparation des hydrogels d'HPMC-Si ne permet pas d'éviter la formation de microbulles qui rendent l'observation du réseau de polymère difficile. Par conséquent, nous n'avons pas pu déterminer le paramètre de maille expérimental malgré la mise en œuvre de techniques sophistiquées.

2.3. Conclusion

Cette partie de la thèse a été consacrée à la détermination de la structure et de la morphologie des hydrogels à base d'HPMC-Si qui n'ont jusqu'à présent pas été bien étudiées.

En ce qui concerne la structure, les résultats d'ATG et de RMN du solide du ^{29}Si confirment que dans les hydrogels les chaînes d'HPMC-Si sont réticulées entre-elles et que chaque groupement alcoxysilane forme une, deux ou trois liaisons siloxanes (Si-O-Si). La polycondensation améliore légèrement la stabilité thermique du polymère d'environ 40 °C par rapport à son état non lié.

La morphologie des hydrogels, contenant 98 wt% d'eau, est très difficile à observer. Pour les études à l'état hydraté, le choix de méthodes de caractérisation est restreint. Nous avons d'abord opté pour le MEB-environnemental ainsi que l'AFM en milieu liquide. Malheureusement, ces deux techniques ne nous ont pas permis d'observer la morphologie des hydrogels d'HPMC-Si. Pour les autres techniques d'imagerie, il a fallu congeler et éventuellement lyophiliser les hydrogels. Un tel procédé de préparation peut causer des changements importants de morphologie et conduire à une observation qui ne reflète pas la morphologie de l'hydrogel en conditions naturelles. Nos observations montrent que les hydrogels d'HPMC-Si contiennent des pores d'une taille micrométrique avec des parois d'environ 100 nm d'épaisseur.

En ce qui concerne la détermination de la valeur du paramètre de maille, les seuls résultats obtenus proviennent des calculs du paragraphe 2.2.5. Ils donnent un paramètre de maille ξ de l'ordre de dizaines de nanomètre. La diffusion des neutrons aux petits angles n'a pas pu confirmer ces résultats. En effet, le SANS ne nous a donné aucune valeur expérimentale, parce que l'intensité diffusée provenait des microbulles présentes dans les échantillons et non pas du réseau d'HPMC-Si.

Tous ces résultats nous montrent que nos hydrogels sont sans doute des systèmes trop complexes pour qu'ils puissent être décrits par un seul paramètre. C'est pourquoi nous penchons plutôt pour l'existence d'un système hiérarchisé, comme schématisé sur la figure I.6c dans le chapitre I, avec de grands pores, de diamètres de l'ordre du micromètre, dont les parois sont constituées d'un maillage de chaînes d'HPMC-Si avec un paramètre de maille de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Cette description n'est qu'hypothétique et nécessite encore une confirmation.

En effectuant de simples calculs nous pouvons démontrer qu'il est en effet possible de confiner 98 wt% d'eau dans une matrice à 2 wt% de polymère, tout en restant en accord avec les trois types de morphologies représentées sur la figure I.6 dans le chapitre I.

Premièrement, prenons le cas de l'hydrogel contenant de grands pores avec des parois denses d'HPMC-Si. En considérant des distances entre les chaînes d'HPMC-Si de

l'ordre du rayon de van der Waals, il n'y a pas de molécules d'eau dans les parois. En première approximation, nous pouvons prendre des pores cubiques de côté d avec des parois d'épaisseur e . Pour que de tels pores puissent contenir 98 wt% d'eau, ce qui correspond à peu près à 98 vol% d'eau, il faut satisfaire la relation suivante :

$$\frac{3e}{d} = \frac{2}{98} \quad (\text{III.4})$$

Avec une épaisseur des parois d'environ 100 nm, telle qu'observée par cryo-microscopie, nous trouvons $d \approx 15 \mu\text{m}$ pour le côté du pore cubique. Cette valeur correspond très bien à la taille de pores observée par cryo-microscopie. Il est donc possible que l'hydrogel à base de 2 wt% d'HPMC-Si confine 98 wt% d'eau avec une telle morphologie.

Deuxièmement, imaginons l'hydrogel constitué d'un maillage homogène de chaînes d'HPMC-Si. En première approche, ces chaînes de rayon de van der Waals r délimitent des cubes avec des arêtes de longueur ξ . Pour pouvoir confiner 98 vol% d'eau dans de tels cubes, il faut que la relation suivante soit validée :

$$3\pi\left(\frac{r}{\xi}\right)^2 = \frac{2}{98} \quad (\text{III.5})$$

Avec un rayon r d'environ 1 nm, nous trouvons $\xi \approx 21 \text{ nm}$ pour l'arête du cube. Cette valeur est très bien corrélée avec la valeur du paramètre de maille trouvée dans le paragraphe 2.2.5. Cela prouve qu'il est également possible de confiner 98 wt% d'eau dans un maillage de 2 wt% d'HPMC-Si caractérisé par un paramètre de maille d'environ 20 nm.

Finalement, dans une structure hiérarchisée avec une taille de pores inférieure à 15 μm et des parois de pores moins denses, contenant un maillage de paramètre inférieur à 20 nm, il est possible de confiner 98 wt% d'eau. Notre hypothèse sur la morphologie de l'hydrogel d'HPMC-Si avec des pores micrométriques et du maillage nanométrique est donc tout à fait envisageable.

3. Etat et dynamique de l'eau dans les hydrogels d'HPMC-Si

Comme déjà discuté dans le chapitre I, l'eau dans les hydrogels peut se trouver en trois états différents : l'eau d'hydratation (ou liée non-cristallisable), l'eau interfaciale (ou liée pouvant changer d'état) et l'eau « bulk » (ou libre). Ces trois états diffèrent par leur température de cristallisation/fusion et par leur dynamique. Dans cette partie nous allons nous intéresser aux états et à la dynamique des molécules d'eau présentes dans les hydrogels d'HPMC-Si.

3.1. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle (DSC de l'anglais *Differential Scanning Calorimetry*) est une des techniques les plus accessibles et les plus faciles à mettre en œuvre pour déterminer les états de l'eau présents dans les systèmes hydratés. En faisant varier la température, la DSC nous permet de déterminer les températures et les enthalpies associées aux transitions de phase de l'échantillon.

Notre étude DSC a été réalisée en collaboration avec Dr. N. Boyard et Dr. C. Josset du Laboratoire de Thermocinétique de Nantes (LTN), situé à Polytech Nantes. L'hydrogel d'HPMC-Si ainsi que la solution aqueuse « bulk » de la même composition que celle confinée dans le gel ont d'abord été refroidis rapidement à -50°C , à une vitesse d'environ $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Ensuite, 10 cycles de -50°C à 40°C montée/descente ont été effectués à une vitesse de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Puisque les allures de tous les cycles étaient reproductibles, seuls les 4 derniers cycles de chaque échantillon ont été choisis pour être traités. Les températures de fusion/cristallisation ont été déterminées comme étant les températures maximales/minimales des pics associés. Les détails concernant cette étude sont décrits en Annexe 3-G.

Un pic de cristallisation et de fusion de chacun des deux échantillons est présenté sur la figure III.12.

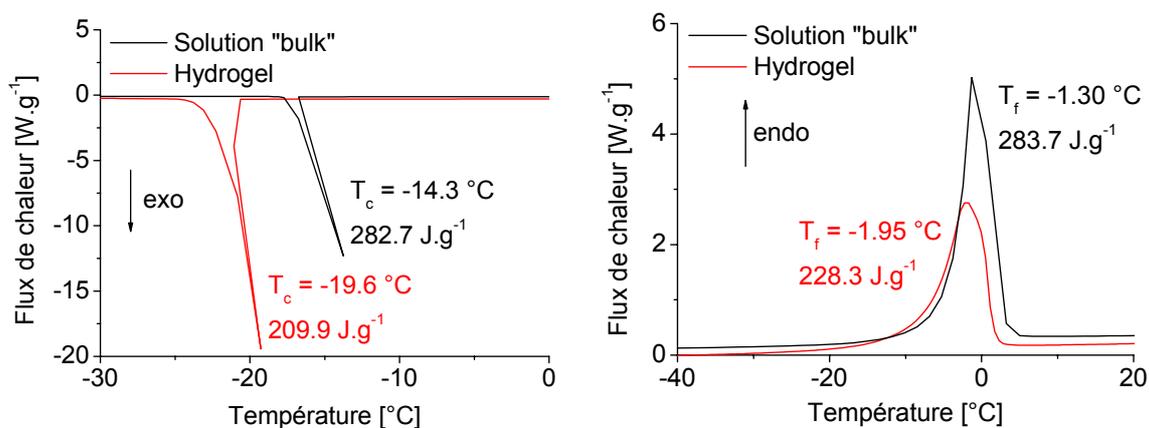


Figure III.12 : Courbes de cristallisation (à gauche) et de fusion (à droite) de l'hydrogel d'HPMC-Si et de la solution aqueuse « bulk » de même composition que celle présente dans ce gel. Les températures de cristallisation/fusion ainsi que les enthalpies correspondantes sont indiquées auprès de chaque pic avec le même code de couleur.

A gauche, on voit la cristallisation des solutions aqueuses : « bulk » (en noir) et celle confinée dans l'hydrogel (en rouge). Rappelons ici que dans cette étude DSC, les solutions aqueuses ont la même composition et contiennent donc les sels nécessaires à la synthèse. La cristallisation de l'eau, très exothermique en un temps très court, est un phénomène très difficile à observer. L'appareil de DSC ne peut enregistrer et réguler suffisamment rapidement les variations de flux de chaleur aussi grandes et rapides ; ceci explique l'allure des thermogrammes de cristallisation de la figure III.12. De plus, l'eau se trouve dans un état métastable avec de nombreux germes de cristallisation et il suffit d'une petite perturbation, comme par exemple une vibration de l'appareil, pour déclencher la cristallisation. C'est pourquoi il est difficile d'obtenir la même température de cristallisation à chaque balayage. Le facteur déterminant reste donc la valeur de l'enthalpie de cristallisation : elle ne doit pas être très différente de celle de l'enthalpie de fusion et elle ne doit pas varier beaucoup d'un cycle enregistré à l'autre. Dans le cas des deux échantillons étudiés ces conditions sont réalisées. Ainsi, les valeurs des températures et des enthalpies de cristallisation indiquées dans le graphique sont les valeurs moyennes, obtenues sur les 4 derniers cycles de balayage en température.

Les pics de fusion sont présentés sur la figure III.12 à droite. Comparée à la cristallisation, la fusion de l'eau se déroule plus lentement et est donc plus facile à

observer avec des températures de fusion répétables à chaque balayage. Les valeurs des températures et des enthalpies de fusion sont indiquées dans le graphique pour chaque échantillon. Il s'agit également des valeurs moyennes obtenues sur les 4 derniers cycles enregistrés. Cependant, vu la montée lente de la courbe de fusion de la solution confinée dans l'hydrogel, il est difficile de déterminer la température limite à partir de laquelle il faut intégrer le pic pour obtenir l'enthalpie de fusion. De plus, cette montée progressive doit probablement être due aussi à la transition vitreuse du polymère HPMC-Si. Les limites d'intégration des pics de cristallisation étant plus faciles à définir, nous avons décidé de baser notre discussion sur les enthalpies de cristallisation.

L'enthalpie de cristallisation de la solution confinée dans l'hydrogel (209.9 J.g^{-1}) est inférieure à celle de la solution « bulk » (282.7 J.g^{-1}). Puisque notre hydrogel contient 98 wt% de solution et 2 wt% de polymère, on peut facilement identifier la quantité de la solution confinée qui contribue à cette cristallisation : il s'agit d'environ 76 wt%. Le reste (24 wt%) ne présente pas de changement de phase sur la gamme de températures exploitées (de $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ à $40 \text{ }^\circ\text{C}$, la figure III.12 ne donnant que la partie entre -30°C et 0°C).

En comparant les températures de fusion, on peut remarquer une légère baisse de la température de fusion de la solution confinée dans le gel ($-1.95 \text{ }^\circ\text{C}$) par rapport à celle de la solution « bulk » ($-1.30 \text{ }^\circ\text{C}$). Cet abaissement peut être lié à l'effet de confinement, appelé effet de type Gibbs-Thomson. Il peut se manifester par une baisse de la température de fusion et de cristallisation du liquide confiné dans de petits pores comparé à celles dans l'état « bulk ». En mettant en équation de part et d'autre les énergies libres du liquide et du solide confinés, ou en déterminant la température à laquelle les potentiels chimiques du solide confiné et du solide confinant sont égaux, on peut relier la baisse de la température de fusion du liquide confiné à la taille des pores suivant la relation [23], [24] :

$$T_{mB} - T_m(d) = -T_{mB} \frac{4\sigma_{sl} \cos \theta}{H_f \rho_s d} \quad (\text{III.6})$$

Dans cette équation, T_{mB} est la température de fusion du liquide « bulk » non confiné ($T_{mB} = 271.85 \text{ K}$ dans notre cas), $T_m(d)$ est la température de fusion du liquide confiné dans des pores de diamètre d (ici $T_m(d) = 271.2 \text{ K}$), σ_{sl} est l'énergie d'interface

solide-liquide par m^2 et θ est l'angle de mouillage ($\sigma_{sl} = 0.00545 J.m^{-2}$ et $\theta = 30^\circ$ dans le cas cellulose-eau [25]), H_f est l'enthalpie de fusion du liquide non confiné par gramme ($H_f = 283.7 J.g^{-1}$) et ρ_s est la masse volumique du solide (dans notre cas on peut prendre la valeur $1.3 g.cm^{-3}$ comme pour l'HPMC [26]).

En entrant tous ces paramètres dans l'équation III.6, nous pouvons déterminer une taille des pores d qui confinent la solution aqueuse dans les hydrogels d'HPMC-Si : $d \sim 21 nm$.

Cette valeur est bien cohérente avec la valeur du paramètre de maille ξ déterminée grâce aux calculs du paragraphe 2.2.5. L'effet du confinement sur les changements de phases de l'eau dans nos hydrogels est donc dû à la présence d'un maillage nanométrique ($\xi \sim 10-20 nm$) du polymère HPMC-Si. Suite à l'étude de la morphologie des hydrogels d'HPMC-Si, nous pensons que ce maillage forme des parois dont l'assemblage résulte en pores plus larges, d'une taille de l'ordre des micromètres. Ces pores micrométriques sont trop grands pour qu'ils puissent conduire à des changements de température observables en DSC.

Par ailleurs, les résultats de DSC nous permettent de distinguer la présence de deux types d'eau dans nos hydrogels. Un hydrogel d'HPMC-Si contient donc :

- $\sim 76 wt\%$ d'eau « bulk » (libre)
- $\sim 24 wt\%$ d'eau d'hydratation

L'eau libre confinée dans l'hydrogel possède la température de cristallisation/fusion proche de celle de la solution « bulk » comme présenté ci-dessus. En revanche, l'eau d'hydratation du gel reste en phase liquide jusqu'à au moins $-50^\circ C$ puisqu'aucune autre transition de phase n'a été détectée sur la gamme des températures exploitées. Les molécules d'eau d'hydratation doivent être en interaction avec la matrice polymère (hydrophile) via des liaisons hydrogène. Il est donc nécessaire d'exploiter également les températures inférieures à $-50^\circ C$ pour pouvoir observer la cristallisation de l'eau d'hydratation. Ceci fera l'objet des paragraphes suivants.

3.2. La cryoporométrie

La cryoporométrie est une technique de RMN du liquide dont le principe est basé sur l'effet Gibbs-Thomson, introduit dans le paragraphe précédent, qui se manifeste par un abaissement de la température de fusion d'un liquide confiné dans de petits pores comparé à celles dans l'état « bulk ». À la base, cette technique a été développée pour mesurer la porosité et la distribution de la taille des pores dans les matériaux poreux. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé la cryoporométrie pour observer et quantifier les transitions de phases de la solution aqueuse confinée dans l'hydrogel d'HPMC-Si. En utilisant la séquence d'impulsions dite de Hahn (voir Annexe 2-A) et en intégrant le signal obtenu, il est possible de mesurer la quantité d'isotopes observés appartenant à la phase liquide à chaque variation de température de l'échantillon, sans que les isotopes de la phase solide soient détectables. Le signal détecté est donc lié à la mobilité des espèces observées. Plus de détails concernant le principe de cette technique sont indiqués en Annexe 2-A.

La cryoporométrie a été réalisée par Dr. P. Judeinstein à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO), Université Paris-Sud à Orsay. Les spectres RMN ont été obtenus sur le spectromètre Bruker AVANCE 400 MHz équipé d'une sonde 4 mm QXO. Pour cette étude, l'hydrogel d'HPMC-Si a été préparé en D₂O. Il a d'abord été refroidi rapidement de la température ambiante jusqu'à 220 K. Ensuite, une série de spectres ¹H et ²H a été réalisée en augmentant la température de 220 K jusqu'à 315 K à une vitesse de 5 à 7 K.h⁻¹. Tous les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-H.

Les deux séries des spectres RMN (¹H et ²H) de l'hydrogel d'HPMC-Si en fonction de la température sont présentées sur la figure III.13. Le signal provenant des atomes de deutérium correspond à la partie liquide du gel, tandis que le signal provenant des atomes d'hydrogène est constitué de deux contributions : une donnée par le polymère et une autre donnée par une petite quantité de H₂O présente dans la solution dans le gel. En effet, l'eau deutérée ne contient jamais 100 % d'atomes de deutérium, de plus des échanges entre les atomes d'hydrogène du polymère et les atomes de deutérium de la solution deutérée ne peuvent pas être exclus.

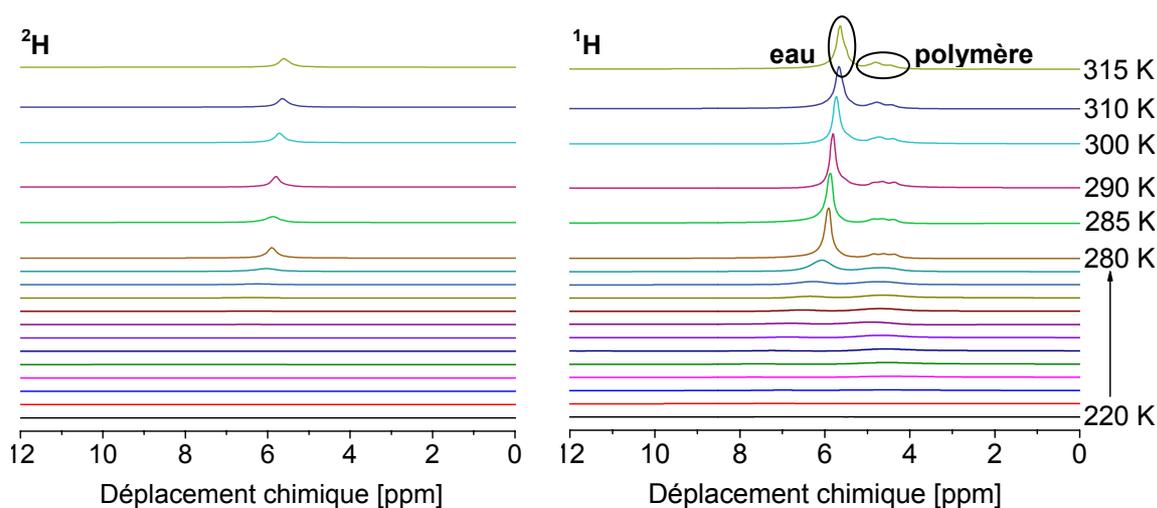


Figure III.13 : Spectres RMN ^2H (à gauche) et ^1H (à droite) de l'hydrogel d'HPMC-Si en fonction de la température. Le pas de température entre 220 K et 280 K est de 5 K.

Les spectres ^2H de la figure III.13 présentent un signal non nul avec un déplacement chimique vers 6 ppm dès 220 K, peu visible à l'échelle de représentation utilisée ici. A cette température, ce signal peut être attribué à la partie de la solution confinée dans l'hydrogel identifiée comme l'eau d'hydratation par la DSC. En chauffant l'échantillon, la dynamique des atomes de deutérium et par conséquent l'intensité de leur signal augmente. A 280 K, l'intensité atteint son maximum et se stabilise, parce que toute la solution de l'hydrogel, y compris la partie « bulk », se trouve désormais dans un état liquide. Les spectres ^1H de la figure III.13 présentent deux pics : l'un avec un déplacement chimique vers 6 ppm, l'autre situé à ~ 5 ppm. Le premier pic, assez étroit, est attribué aux atomes d'hydrogène présents dans la solution du gel : ils sont plus mobiles et donnent donc un signal plus fin. Le deuxième pic provient des protons du polymère dont la mobilité est restreinte. La dynamique du polymère et donc l'apparition de son signal commence à 230 K, soit 10 degrés au dessus de l'apparition du signal de l'eau hydrogénée (à 220 K).

La figure III.14 illustre bien le comportement dynamique de la solution deutérée de l'hydrogel d'HPMC-Si. Elle présente l'évolution des aires sous les pics dans les spectres ^2H de la figure III.13 en fonction de la température, cette aire étant proportionnelle à la quantité de noyaux responsables de ce signal. Le changement abrupt de la quantité d'atomes de deutérium mobiles entre 270 et 280 K correspond à la fusion de la solution

« bulk » dans le gel, ce qui est en accord avec la température de fusion déterminée par DSC ($T_f = -1.95 \text{ }^\circ\text{C} = 271.2 \text{ K}$).

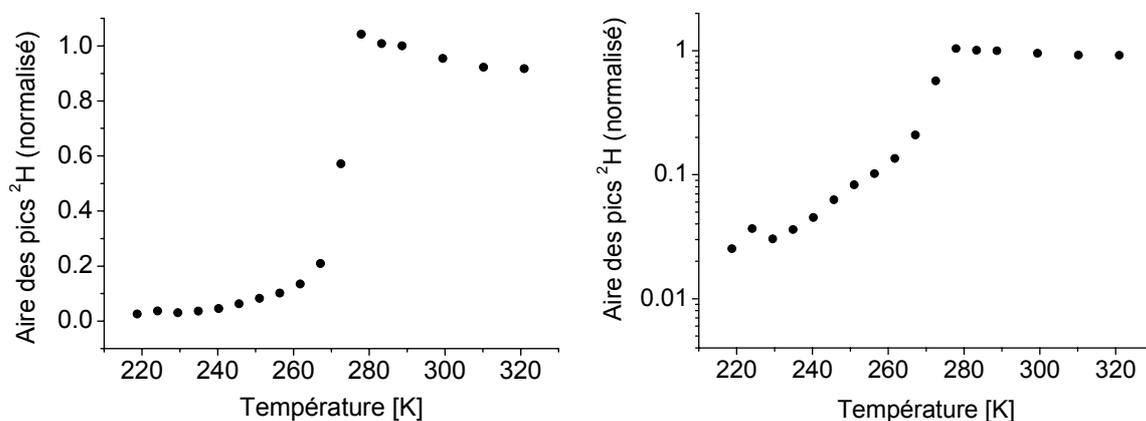


Figure III.14 : Intégrales des spectres ²H de la figure III.13 (normalisées) en fonction de la température. A gauche : axe y en échelle linéaire ; à droite : axe y en échelle logarithmique.

Pour pouvoir déterminer plus facilement la quantité de solution liquide à basse température, il est préférable de passer en échelle logarithmique. Ainsi, on observe dès 220 K environ 2-3 wt% de solution deutérée en phase liquide. Cette quantité augmente avec la température et, juste avant la fusion de la solution « bulk » c'est-à-dire avant 270 K, il y a entre 10 et 20 wt% de phase liquide dans l'hydrogel. Celle-ci correspond à l'eau d'hydratation. Ce résultat se corrèle bien avec celui trouvé par DSC, où l'on a pu voir qu'environ 24 wt% de la totalité de la solution confinée dans le gel ne contribue pas à la fusion/cristallisation de la solution de type « bulk ». La proportion d'eau d'hydratation dans les hydrogels à base d'HPMC-Si peut paraître élevée, mais elle est comparable par exemple à la quantité d'eau d'hydratation observée dans les hydrogels à base de chitosan relié par l'acide lactique ou l'acide glycolique [27]. Le taux de l'eau d'hydratation déterminé par DSC peut y atteindre jusqu'à 28 wt%.

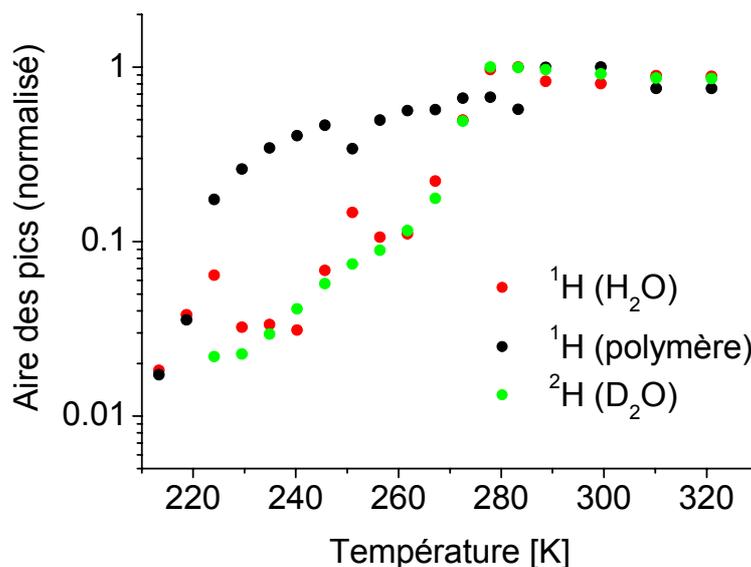


Figure III.15 : Intégrales des spectres ^2H et ^1H de la figure III.13 (normalisées) en fonction de la température.

Il est également intéressant de comparer l'évolution des quantités de toutes les espèces observées par cryoporométrie en fonction de la température. La figure III.15 présente une telle comparaison, qui nous permet de découpler la dynamique de la solution de l'hydrogel de celle du polymère. Nous pouvons constater un comportement unique pour la totalité de la solution confinée dans l'hydrogel (hydrogénée et deutérée), parce que les protons des molécules d'eau (en rouge) ainsi que les deutériums (en vert) suivent à peu près la même tendance en fonction de la température. En revanche, la dynamique du polymère (en noir) est différente : le polymère a une dynamique plus importante à basses températures (entre 220 et 280 K) en comparaison avec la dynamique de la solution. La dynamique du polymère observée est probablement liée aux mouvements latéraux des chaînes (groupements fonctionnels), parce que les pics dans les spectres ^1H (figure III.13) attribués au polymère ne sont pas aussi larges que ceux qui pourraient correspondre à la chaîne principale rigide. Ils correspondent aux parties du polymère les plus mobiles.

Pour approfondir notre compréhension de la dynamique de l'eau et du polymère dans l'hydrogel d'HPMC-Si, nous nous sommes tournés vers d'autres techniques, comme la diffusion inélastique des neutrons et la RMN du liquide à gradient de champ pulsé.

3.3. Diffusion quasi-élastique des neutrons (QENS)

La diffusion quasi-élastique des neutrons (QENS de l'anglais *Quasi-Elastic Neutron Scattering*) est une technique spectroscopique qui permet d'accéder à la dynamique des espèces à l'échelle spatio-temporelle la plus locale, c'est-à-dire de l'ordre des nanomètres et des picosecondes.

Lors de l'interaction neutron-noyau, une petite quantité d'énergie est échangée à cause du mouvement des noyaux diffusants. En mesurant la distribution en énergie ($E = \hbar\omega$) des neutrons diffusés, nous pouvons accéder à la fonction de diffusion dynamique incohérente $S_{inc}(\mathbf{q}, \omega)$, appelée aussi facteur de structure dynamique incohérent [28], [29] :

$$S_{inc}(\mathbf{q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\omega t} \int_{-\infty}^{\infty} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} G_s(\mathbf{r}, t) dt d\mathbf{r} \quad (\text{III.7})$$

avec \mathbf{q} vecteur de diffusion dont la valeur est définie par la relation III.3. Il s'agit d'une transformée de Fourier dans le temps et dans l'espace de la fonction d'autocorrélation $G_s(\mathbf{r}, t)$. Cette fonction décrit la distribution spatiale moyenne de densité de probabilité des noyaux en fonction du temps. A $\omega = 0$, la fonction de diffusion incohérente dépend de $\langle u^2 \rangle$, le déplacement carré moyen des noyaux diffusants. Ce dernier peut alors être obtenu à partir de l'étude des neutrons diffusés élastiquement ($\omega = 0$). En rapportant $\langle u^2 \rangle$ en fonction de la température, nous pouvons observer les changements de mobilité des noyaux et par conséquent déterminer leurs transitions de phase.

Après l'intégration de la fonction de diffusion dynamique incohérente sur un intervalle de q , on obtient une fonction $S_{inc}(\omega)$, centrée sur $\omega = 0$. Il s'agit en fait d'un élargissement de la raie de diffusion élastique, qui contient l'information sur la dynamique des noyaux dans l'échantillon étudié. Plus de détails concernant le principe de cette technique peuvent être trouvés en Annexe 2-C.

Pour cette expérience, deux types d'hydrogels d'HPMC-Si ont été préparés : en H₂O et en D₂O (pour pouvoir différencier le signal provenant de la solution deutérée et du

polymère hydrogéné). Les hydrogels ont été introduits dans des cellules en aluminium, spécialement conçues pour la diffusion quasi-élastique des neutrons. L'étude QENS a été réalisée par Dr. J.-M. Zanotti au LLB à Saclay sur le spectromètre à temps de vol MIBEMOL. La longueur d'onde des neutrons, générés par le réacteur Orphée, était de 5.2 Å. Le déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ a été mesuré en fonction de la température à partir de 4 K et jusqu'à 300 K. La diffusion élastique a été réalisée à 293 K. Tous les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-I.

La figure III.16 montre le déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ des molécules d'eau en fonction de la température dans l'eau distillée (en noir) et au sein de l'hydrogel d'HPMC-Si préparé en H₂O (en rouge). Etonnamment, on peut constater que dans cette gamme spatio-temporelle, la dynamique des molécules d'eau dans les deux types d'échantillon est identique sur toute la gamme de température. La montée soudaine des deux courbes aux alentours de 273 K correspond à la fusion de l'eau « bulk ». La majorité de la solution dans l'hydrogel se comporte donc comme de l'eau distillée « bulk ».

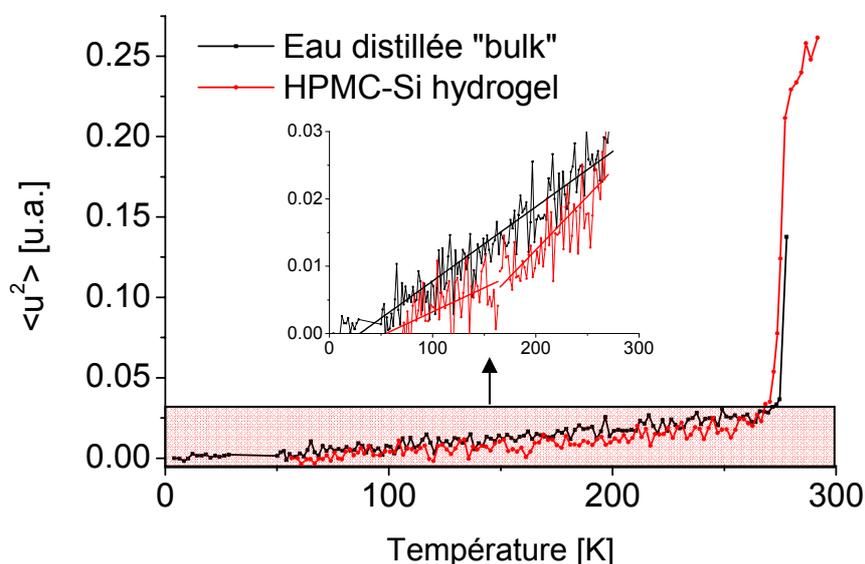


Figure III.16 : Déplacement carré moyen $\langle u^2 \rangle$ des molécules d'eau en fonction de la température dans l'eau distillée (en noire) et dans l'hydrogel d'HPMC-Si (en rouge). Insert : grandissement de la zone rouge, les lignes représentent les ajustements linéaires des données.

En agrandissant la zone avant la fusion « bulk », marquée sur fond rouge, nous pouvons voir une rupture de pente de l'ajustement linéaire du signal provenant de

l'hydrogel à 160 K (en insert). Cette rupture de pente correspond à un changement de dynamique dans la gamme spectrale de l'appareil : cette évolution peut être liée à la fusion de l'eau d'hydratation dans l'hydrogel ou bien encore à une modification de la dynamique des chaînes du polymère. Le changement de pente n'est pas très marqué : cela indique que la quantité de protons correspondante est faible. Elle doit être de l'ordre de quelques pourcents massiques. Cela est cohérent avec le résultat obtenu par cryoporométrie, où nous avons vu que l'hydrogel contient environ 2-3 wt% d'eau d'hydratation en phase liquide dès 220 K. Ceci conforte l'attribution de cette rupture de pente à la fusion de l'eau d'hydratation. Nous disposons donc pour la première fois d'une observation directe de la transition de phase de l'eau d'hydratation dans l'hydrogel d'HPMC-Si. Sa fusion est observée à 160 K (-113 °C) avec les temps caractéristiques associés à la spectrométrie QENS.

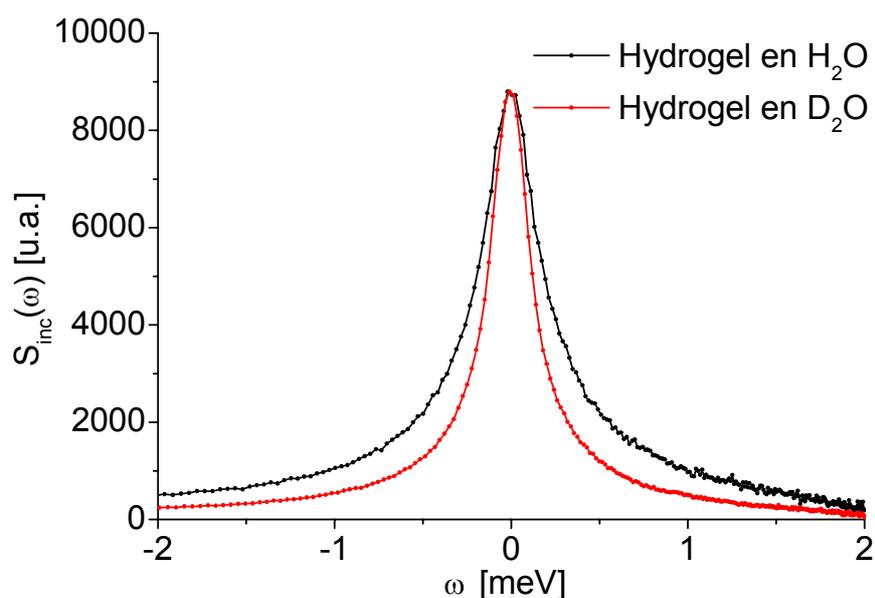


Figure III.17 : Fonctions de diffusion $S_{inc}(\omega)$ intégrées sur le vecteur de diffusion q en fonction de ω pour les hydrogels préparés en H_2O (en noir) et en D_2O (en rouge).

La figure III.17 montre la fonction de diffusion dynamique incohérente intégrée sur q , $S_{inc}(\omega)$, en fonction de l'énergie des neutrons diffusés (ω) pour les hydrogels préparés en H_2O et D_2O à 293 K. En observant la diffusion quasi-élastique des atomes d'hydrogène, nous pouvons découpler, au moins partiellement, la dynamique de la solution confinée dans l'hydrogel de la dynamique des protons de la matrice polymère.

Sur la figure III.17, le signal provenant de l'hydrogel en D₂O est normalisé par rapport au signal du gel en H₂O. La largeur à mi-hauteur de chaque fonction est corrélée à la mobilité des atomes d'hydrogène présents dans chaque échantillon : plus la largeur est importante, plus les atomes sont mobiles. On constate qu'à 293 K, la dynamique des atomes d'hydrogène dans les molécules d'eau de l'hydrogel en H₂O (spectre noir) est plus importante que la dynamique des atomes d'hydrogène du polymère dans l'hydrogel en D₂O (spectre rouge). Ceci confirme bien le résultat de l'observation précédente selon lequel à l'échelle spatio-temporelle locale (~ nm, ~ ps), la majorité de l'eau confinée dans l'hydrogel d'HPMC-Si a la même dynamique que l'eau distillée « bulk ».

3.4. RMN à gradient de champ pulsé (PGSE)

Pour observer la dynamique de l'eau confinée dans les hydrogels d'HPMC-Si à une échelle spatio-temporelle plus grande, nous avons réalisé des expériences en spectrométrie RMN à gradient de champ pulsé (PGSE de l'anglais *Pulsed Gradient Spin Echo*). Il s'agit d'une technique de RMN du liquide qui permet d'obtenir des informations sur la dynamique des espèces sur une échelle de temps et d'espace de l'ordre de la dizaine de millisecondes et de quelques micromètres. De plus, cette technique nous donne accès aux coefficients de diffusion des espèces mobiles dans les échantillons.

Le principe de la PGSE est expliqué en détails en Annexe 2-B. En bref, la PGSE est basée sur la séquence spin-écho de Hanh modifiée par deux gradients de champ magnétique statique sous forme d'impulsions d'intensité g_0 et de durée δ , espacés d'un temps Δ . Cet intervalle de temps Δ , appelé temps de diffusion, définit le temps pendant lequel nous observons la diffusion des spins (dans notre cas des protons). En faisant varier l'amplitude des gradients g_0 et en mesurant l'intensité de l'écho, on peut remonter au coefficient de diffusion D des protons selon l'équation :

$$\frac{I}{I_0} = \exp\left[-D\gamma^2 g_0^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right] \quad (\text{III.8})$$

avec I et I_0 les intensités en présence et en absence des gradients de champ, γ le rapport gyromagnétique ($\gamma_H = 267.5 \times 10^6 \text{ rad.s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$), ici $\Delta = 50 \text{ ms}$ et $\delta = 2.5 \text{ ms}$. En faisant un ou

plusieurs ajustements exponentiels de la fonction III.8, nous pouvons déterminer le ou les coefficient(s) de diffusion D , car un système peut avoir des espèces avec plusieurs mobilités ou avec une mobilité anisotrope décrite par plusieurs coefficients de diffusion.

L'hydrogel d'HPMC-Si a été préparé avec H_2O : la dynamique des atomes d'hydrogène, et par conséquent des molécules d'eau, de la solution aqueuse confinée dans ce gel a été comparée à la dynamique des molécules d'eau dans l'eau distillée « bulk ». Cette étude a été réalisée par Dr. P. Judeinstein à l'ICMMO à Orsay sur l'appareil RMN Bruker AVANCE 400 MHz équipé d'une sonde BBOxyz à 300 K avec les paramètres expérimentaux indiqués en Annexe 3-J.

Les spectres 1H de l'hydrogel d'HPMC-Si et de l'eau distillée « bulk », obtenus en absence de gradient de champs, sont présentés sur la figure III.18. La forme et l'élargissement du signal de l'hydrogel sont dus d'une part à la nature des échantillons, d'autre part à leur forme qui ne permet pas de réaliser une belle homogénéité du champ magnétique. En effet, un morceau de gel a dû être inséré dans un tube de la RMN du liquide (5 mm en diamètre) à l'aide d'une spatule. Par conséquent, il a été difficile de remplir le tube avec le gel de manière homogène. L'intégration de chacun des deux spectres de la figure III.18 constitue l'intensité de référence I_0 .

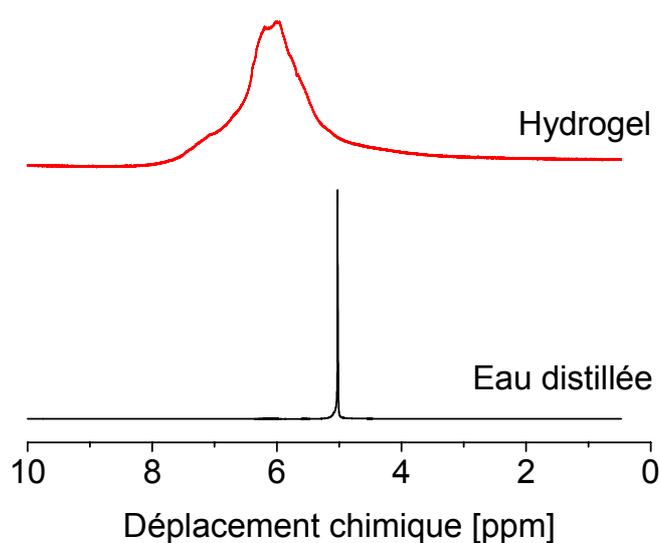


Figure III.18 : Spectres RMN du liquide de 1H de l'hydrogel d'HPMC-Si et de l'eau distillée à 300 K en absence de gradients.

En appliquant des gradients de champ dont les amplitudes varient entre 0.674 et 32.030 G.cm⁻¹, nous avons pu obtenir 16 spectres ¹H différents pour chaque échantillon. Les intégrations de ces spectres représentent deux séries d'intensités I . La figure III.19 montre la dépendance de $\ln(I/I_0)$ en fonction de la valeur du gradient de champ appliqué $\gamma^2 g_0^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ pour les deux échantillons étudiés. Dans cette représentation, chaque ajustement monoexponentiel donne une ligne droite avec une pente égale à la valeur du coefficient de diffusion. Nous pouvons constater qu'une seule fonction monoexponentielle est suffisante pour bien décrire la dépendance $(I/I_0)(g_0)$ de chaque échantillon. En d'autres termes, à cette échelle spatio-temporelle ($\sim 10 \mu\text{m}$, $\sim 50 \text{ms}$) et à 300 K, la dynamique des molécules d'eau dans l'hydrogel ainsi que dans l'eau distillée « bulk » est isotrope et caractérisée par une seule valeur du coefficient de diffusion D , indiquée dans le tableau III.1.

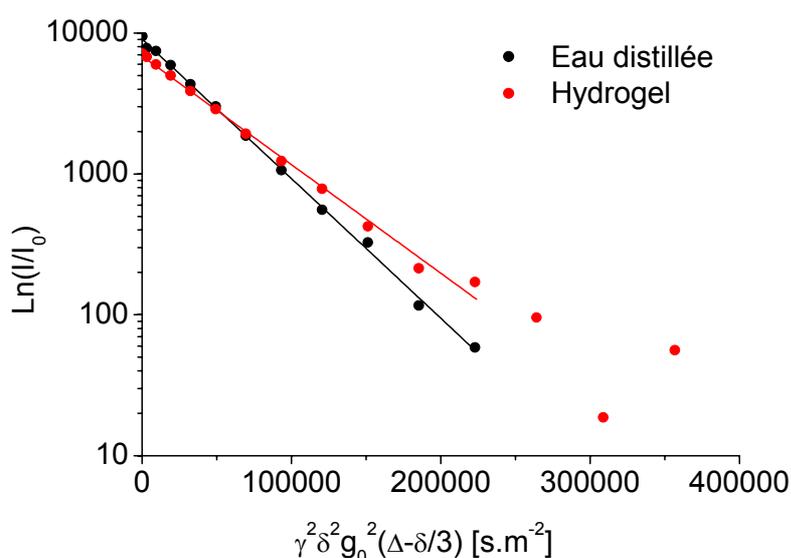


Figure III.19 : Fits monoexponentiels des fonctions de diffusion des molécules d'eau dans l'eau distillée « bulk » et dans la solution confinée dans l'hydrogel d'HPMC-Si.

Tableau III.1 : Coefficients de diffusion des molécules d'eau dans l'eau distillée « bulk » et dans la solution aqueuse confinée dans l'hydrogel d'HPMC-Si à 300 K.

	Coefficient de diffusion D [$10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]
Eau distillée	2.26
Hydrogel	1.88

Il est important de noter que, à l'échelle spatio-temporelle employée ici ($\sim 10 \mu\text{m}$, $\sim 50 \text{ms}$), les deux populations des molécules d'eau dans l'hydrogel (l'eau « bulk » et l'eau d'hydratation) sont identiques. Les molécules d'eau d'hydratation sont en interaction avec l'HPMC-Si via des liaisons hydrogène et sont en échange permanent très rapide entre un état lié et non-lié. Par conséquent, leur dynamique ne peut pas être observée avec des impulsions de gradients de $\delta = 2.5 \text{ms}$. Les temps caractéristiques de ces réarrangements des molécules d'eau d'hydratation correspondent aux picosecondes, il serait peut être possible de les étudier par exemple par spectroscopie ultrarapide infrarouge [30].

Le coefficient de diffusion des molécules d'eau distillée « bulk » ($D_{\text{bulk}} = 2.26 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), mesuré ici à 300 K, est identique à celui trouvé par Tanaka *et al.* ($2.27 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) par la méthode dite de la cellule à diaphragme à température ambiante [31]. La valeur du coefficient de diffusion des molécules d'eau de la solution aqueuse confinée dans l'hydrogel d'HPMC-Si est un peu plus faible, $D_{\text{confinée}} = 1.88 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Sachant que l'incertitude sur la détermination des coefficients de diffusion par RMN PGSE est généralement comprise entre 5 et 10 %, nous pouvons dire que les deux coefficients sont assez proches. Toutefois, le coefficient $D_{\text{confinée}}$ reste plus faible que D_{bulk} . La différence peut être liée au fait que la solution aqueuse d'hydrogel contient également des « impuretés », telles que des sels et des acides. Leur présence peut induire des modifications de diffusivité des molécules d'eau. De plus, la tortuosité du réseau macromoléculaire peut également jouer un rôle dans le ralentissement de la diffusion de l'eau, comme déjà discuté au chapitre I. En principe, il faudrait mesurer la diffusion des molécules d'eau dans la solution aqueuse « bulk » de même composition que celle présente dans l'hydrogel pour obtenir une meilleure comparaison, mais nous n'avons malheureusement pas eu le temps de le faire.

La valeur du coefficient de diffusion des molécules d'eau confinée dans l'hydrogel d'HPMC-Si est proche d'autres valeurs trouvées dans la littérature. A titre d'exemple, nous pouvons citer les hydrogels à base du sucre méthyl-4,6-O-(pintirobenzylidène)- α -D-glucopyranoside. Grâce à la spectrométrie PGSE ($\Delta = 10 \text{ms}$), à même concentration en sucre (2 wt%) et à même température (300 K), Kowalczyk *et al.* ont déterminé une valeur du coefficient de diffusion des molécules d'eau

dans leur hydrogel de $D = 2.16 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Puisque cette valeur est proche de celle de l'eau « bulk » et qu'elle correspond à des distances de diffusion de 6 μm (avec $\Delta = 10 \text{ ms}$), Kowalczyk *et al.* ont conclu que la taille des pores dans leur hydrogel doit être supérieure ou égale à 6 μm . Si tel n'était pas le cas, la diffusion des molécules d'eau dans ce gel serait affectée par la présence des parois de pores et la valeur du coefficient de diffusion serait plus faible.

En suivant le même raisonnement, nos résultats nous montrent que les molécules d'eau confinée dans l'hydrogel d'HPMC-Si se comportent pratiquement comme celles de l'eau distillée « bulk » sur des distances de l'ordre de 10 μm (dans notre cas $\Delta = 50 \text{ ms}$), distances sur lesquelles elles ne sont pas affectées par la présence des parois de pores. La taille des pores dans nos hydrogels doit donc se situer autour de 10 μm . Cette taille correspond bien à celle observée en microscopies électroniques, ce qui confirme notre hypothèse concernant la morphologie des hydrogels d'HPMC-Si : le gel contient des pores de taille micrométriques dont les parois sont constituées de maillage des chaînes d'HPMC-Si.

3.5. Conclusion

Grâce aux différentes techniques de caractérisation employées pour étudier l'état et la dynamique de l'eau confinée dans les hydrogels d'HPMC-Si, nous avons pu démontrer qu'à température ambiante un hydrogel à 2 wt% d'HPMC-Si contient deux types d'eau :

- ~ 80 wt% d'eau « bulk »
- ~ 20 wt% d'eau d'hydratation

Les molécules d'eau « bulk » ou libre présentent la même dynamique que celle de l'eau distillée « bulk » à l'échelle spatio-temporelle locale (de l'ordre des nanomètres et des picosecondes) aussi bien qu'à une échelle plus large (de l'ordre d'une dizaine de micromètres et des dizaines de millisecondes). La température de cristallisation/fusion de ce type d'eau est légèrement abaissée par rapport à la température de cristallisation/fusion de la solution aqueuse « bulk » de la même composition que celle confinée dans le gel.

En revanche, l'eau d'hydratation, appelée aussi « eau liée non gelable », ne présente pas de transition de phase jusqu'à ~ 160 K. Ses molécules sont en interaction directe avec les parties hydrophiles du polymère via des liaisons hydrogène et elles subissent des échanges rapides entre les états liés et non-liés, avec des temps caractéristiques de l'ordre de quelques picosecondes.

Ces résultats nous montrent que la diffusion des molécules d'eau « bulk » dans les hydrogels n'est pas affectée par la présence de la matrice d'HPMC-Si sur des distances allant jusqu'à $10 \mu\text{m}$. La baisse de la température de cristallisation/fusion de la solution aqueuse « bulk » confinée dans l'hydrogel, par rapport à la température de la solution non confinée, est probablement liée à la taille du paramètre de maille d'HPMC-Si, qui a été évaluée être de l'ordre de $10\text{-}20 \text{ nm}$. On note de plus que cet ordre de grandeur correspond à la périodicité attendue pour la distance de greffage de groupements alcoxysilanes le long d'une chaîne d'HPMC-Si, points devant présenter des nœuds de réticulation. Toutes ces informations tendent à confirmer notre hypothèse sur la morphologie hiérarchisée des hydrogels d'HPMC-Si : ils contiennent des pores d'une taille de l'ordre de $d \sim 10 \mu\text{m}$ dont les parois sont constituées de maillage des chaînes d'HPMC-Si avec un paramètre de maille de l'ordre de $\xi \sim 10\text{-}20 \text{ nm}$, comme schématisé sur la figure I.6c dans le chapitre I.

Nous pouvons également noter que nous avons tenté d'exploiter une autre technique spectroscopique pour caractériser la dynamique des molécules d'eau dans l'hydrogel d'HPMC-Si à une échelle spatio-temporelle intermédiaire entre celle du QENS et de la PGSE. Il s'agit de la diffusion quasi-élastique des neutrons effectuée sur un spectromètre à écho de spin (NSE, *Neutron Spin Echo*). Malheureusement, la NSE n'a pas pu nous apporter plus d'informations concernant notre hydrogel, parce que ce dernier ne donne pas un signal suffisamment intense pour qu'il puisse être traité.

4. Propriétés rhéologiques et mécaniques des hydrogels d'HPMC-Si

Les propriétés rhéologiques et mécaniques des hydrogels d'HPMC-Si sont étudiées depuis longtemps au sein du laboratoire LIOAD. Ici, nous présentons uniquement des

résultats obtenus dans le cadre de cette thèse, ils vont ensuite être comparés aux résultats obtenus sur les hydrogels renforcés dans le chapitre suivant.

Les hydrogels sont des matériaux présentant à la fois les propriétés des solides (élasticité) et celles des liquides (viscosité). Ainsi, ils ont un comportement viscoélastique. Les propriétés rhéologiques et mécaniques des matériaux viscoélastiques dépendent de l'allure de la déformation ou de la contrainte imposée. Il s'en suit qu'une contrainte appliquée de manière cyclique n'est pas en phase avec la déformation résultante : on observe une dissipation de l'énergie. Les différentes contraintes appliquées doivent rester en-dessous du niveau de la contrainte qui cause une déformation permanente du matériau. On parle d'un domaine linéaire.

Pour une contrainte en compression ou en cisaillement, le rapport entre celle-ci et la déformation est exprimé par le module correspondant : E^* en compression et G^* en cisaillement. Ces modules sont dynamiques et complexes, composés des modules de conservation E' et G' (partie élastique, restitution de l'énergie mécanique) et des modules de perte E'' et G'' (composantes visqueuses, dissipation de l'énergie mécanique). Lorsqu'un matériau viscoélastique est soumis à une contrainte sinusoïdale à une fréquence d'oscillation ω , l'angle de déphasage entre la contrainte et le signal de réponse en déformation du matériau est noté δ . Le rapport $G''/G' = \tan \delta$ est appelé facteur de perte, c'est une mesure du rapport d'énergie dissipée par amortissement à l'énergie élastique conservée puis restituée durant un cycle de déformation sinusoïdale.

4.1. Temps de gel

Le temps de gel, c'est-à-dire le temps nécessaire pour former le réseau macromoléculaire à travers le gel, a été mesuré par rhéologie. La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière sous l'effet d'une contrainte appliquée. Elle s'applique aux matériaux viscoélastiques, dont le comportement mécanique ne peut pas être décrit par les théories classiques de l'élasticité et de la mécanique des fluides newtoniens. La rhéologie est donc une technique bien adaptée pour étudier le comportement des hydrogels à base de polymères.

Le temps de gel peut être obtenu par des mesures mécaniques dynamiques oscillatoires des modules de cisaillement G' et G'' . Pour cela, nous étudions la dépendance de $\tan \delta(t) = G'/G''$ à différentes fréquences de cisaillement ω (en rad.s^{-1}) au cours du temps. On définit le temps de gel t_g comme le temps nécessaire pour que le facteur de perte $\tan \delta(t)$ devienne indépendant de ω .

Le temps de gel a été mesuré sur le rhéomètre Thermo HAAKE RS 300 en configuration cône/plan 1°/60 mm à 23°C. La solution basique d'HPMC-Si a été mélangée avec la solution TB et ce mélange a été directement injecté sur le plateau du rhéomètre. Les détails concernant la mesure du temps de gel sont indiqués en Annexe 3-K.

La figure III.20 montre la dépendance typique de $\tan \delta$ à 13 fréquences de cisaillement différentes variant de 1 à 22 Hz en fonction du temps.

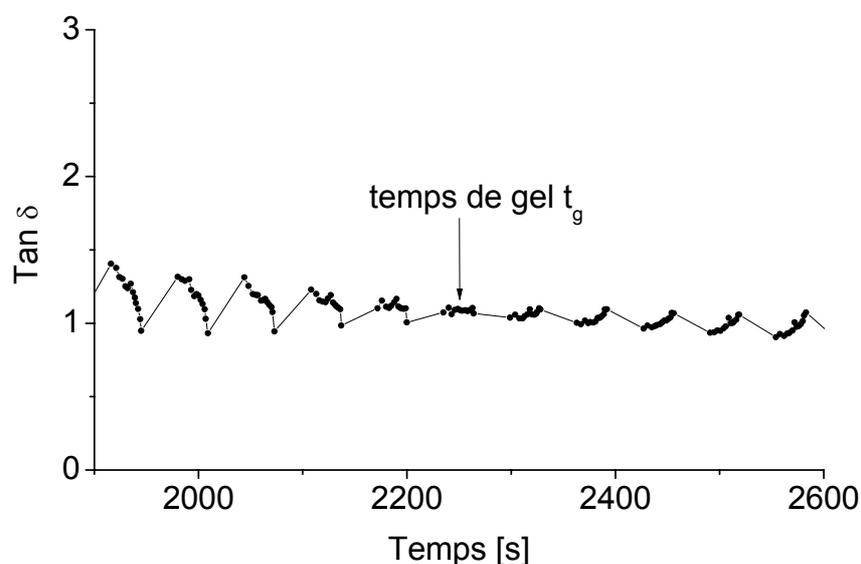


Figure III.20 : Variation typique de $\tan \delta$ mesuré pour différentes fréquences de cisaillement en fonction du temps. Le temps de gel de l'hydrogel d'HPMC-Si est indiqué par la flèche.

Un plateau, où $\tan \delta$ est indépendant de la fréquence, est indiqué par une flèche. Il s'agit du temps de gel t_g . Le temps de gel moyen t_g de l'hydrogel d'HPMC-Si est de $31(\pm 8)$ min à 23 °C. Comme déjà mentionné, même si le temps de gel est d'environ 30 minutes, la polycondensation complète nécessite plus de temps, typiquement 2 semaines [3].

4.2. Propriétés mécaniques

Nos hydrogels sont développés pour des applications en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Puisque les mouvements des articulations du corps humain sont associés à des temps caractéristiques de l'ordre de la seconde, les propriétés mécaniques des hydrogels destinés à l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire devraient être mesurées en mode dynamique, sous contrainte cyclique, pour de fréquences de sollicitation comprises entre 0.5 et 3 Hz [32]. A titre de comparaison, la valeur du module dynamique en cisaillement G^* du cartilage articulaire humain varie de 0.1 à 2.5 MPa quand la fréquence de sollicitation change de 0.01 à 20 Hz. En réalité les contraintes exercées sur le cartilage articulaire sont un mélange de compression et de cisaillement. Pendant le mouvement, le cartilage est exposé à des chargements cycliques et les charges sont appliquées très rapidement (10-150 ms) pour des courtes durées (10-400 ms). Ainsi, les fréquences des sollicitations dans un genou varient de 1 Hz (pour une marche lente) jusqu'à 2.25 Hz (sprint) [33].

Dans la suite, nous allons caractériser les hydrogels en utilisant les composantes élastiques des modules complexes : les modules de conservation E' et G' à la fréquence de sollicitation de 1 Hz. Cette fréquence a été choisie comme valeur de référence, parce qu'il s'agit de la fréquence de la marche, le mouvement prédominant chez les humains.

4.2.1. Comportement en compression

Le module élastique en compression E' constitue un des paramètres clés pour la caractérisation des matériaux destinés à l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire, parce que le cartilage est soumis aux pressions exercées par les os au sein des articulations. Le module en compression de l'hydrogel d'HPMC-Si a été déterminé par la technique appelée DMA (*Dynamic Mechanical Analysis*) sur un spectromètre mécanique dynamique. Celui-ci applique à l'échantillon une déformation sinusoïdale (en compression) à fréquences variables tout en restant dans le domaine de comportement linéaire. En mesurant la réponse de l'échantillon (la contrainte) et en connaissant sa géométrie, on peut déterminer son module élastique caractéristique.

La DMA a été réalisée sur l'appareil ElectroForce® BOSE équipé d'un logiciel WinTest en mode compression uniaxial non-confinée. Les hydrogels ont été préparés dans des puits plastiques destinés à la culture cellulaire. Après démoulage, ils présentent une forme cylindrique avec un diamètre d'environ 22 mm et une hauteur proche de 5.2 mm. Les dimensions exactes ont été mesurées pour chaque échantillon avec un pied à coulisse et paramétrées dans le logiciel. Chaque échantillon a subi des déformations sinusoïdales à des fréquences allant de 0.1 à 10 Hz avec 3 points par décade sur une échelle logarithmique. La valeur du module E' a été prise à 1 Hz. Tous les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-L.

Le module élastique en compression E' de l'hydrogel d'HPMC-Si est de 5.7(\pm 1.6) kPa. Les modules du cartilage varient entre quelques centaines de kPa jusqu'à plus de 10 MPa en fonction de l'articulation considérée, de l'âge, du poids et de la taille du corps humain [34], [35]. Prenons par exemple le cas d'une femme âgée de 33 ans, de 1.7 m de haut et pesant 50 kg. Le module en compression du cartilage situé dans la cheville est de 11.8 MPa et le module en compression du cartilage de la hanche est de 8.4 MPa [36]. On voit que la valeur E' de l'hydrogel d'HPMC-Si est très faible, trop faible pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage. Ceci n'est pas très étonnant sachant que cet hydrogel est constitué de 98 wt% d'eau. Il est donc évident qu'un renforcement est nécessaire pour améliorer ses propriétés mécaniques.

4.2.2. Comportement en cisaillement

Le cartilage articulaire ne subit pas uniquement des contraintes en compression mais également en cisaillement. Le module élastique en cisaillement G' représente la rigidité d'un échantillon sous cisaillement.

Le module élastique en cisaillement a été étudié sur le rhéomètre Thermo HAAKE MARS III en configuration plan/plan (diamètre du disque de mesure en Ti : 20 mm) équipé d'un logiciel RheoWin. Les hydrogels ont également été préparés dans des puits plastiques destinés à la culture cellulaire. Les mesures s'effectuaient directement dans ces puits. Les modules G' et G'' en mode dynamique ont été mesurés pour des fréquences de

cisaillement allant de 0.1 à 100 Hz avec 3 valeurs par décade (en échelle logarithmique) tout en appliquant une contrainte de 1 Pa. La valeur du module élastique en cisaillement a été prise à 1 Hz. Les détails de cette expérience sont décrits en Annexe 3-L.

Le module élastique en cisaillement de l'hydrogel d'HPMC-Si est de $G' = 1.1(\pm 0.1) \text{ kPa}$. Pour un gel chimique, on s'attend à ce que la valeur de G'' soit au moins d'une décade inférieure à celle de G' sur toute la gamme de fréquences, ce qui est bien notre cas. En cisaillement, l'hydrogel d'HPMC-Si ne présente pas non plus un module élastique suffisamment élevé pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Le module G' se situe par exemple autour de 0.2 à 2 MPa dans le cartilage articulaire d'un genou humain [37].

Pour un matériau homogène et isotrope, les lois de l'élasticité imposent que [38]:

$$E' = 2G'(1 + \nu) \quad (\text{III.9})$$

avec ν le coefficient de Poisson, qui est égal à 0.5 pour des matériaux incompressibles de type caoutchoutique. Cela implique que pour les hydrogels le module élastique en compression devrait être égal à $3G'$. Comme on peut le voir ici, cette relation n'est pas valable dans le cas de notre hydrogel d'HPMC-Si puisqu'il y a un facteur d'environ 5 entre les deux. Pourtant, nous n'avons aucune raison de supposer que ce gel ne soit pas isotrope ou homogène. Pour le moment, nous ne pouvons pas expliquer pourquoi cette relation de proportionnalité entre les modules en compression et en cisaillement n'est pas valable.

4.2.3. Relaxation de la contrainte

L'évaluation de la rigidité/élasticité de l'hydrogel a pu être effectuée en faisant le test de la relaxation de la contrainte. Le terme « rigidité » d'un matériau est utilisé pour décrire la relation entre la contrainte et la déformation déterminée dans le domaine du comportement linéaire du matériau. Ce test consiste à imposer une déformation à l'hydrogel et à suivre l'évolution de la force nécessaire pour maintenir cette déformation en fonction du temps. Pour un matériau purement élastique (un solide idéal), la courbe

$F(t)$ présentera un plateau. Pour un matériau purement visqueux (un fluide idéal), la force décroîtra rapidement jusqu'à zéro. Un hydrogel est un matériau viscoélastique, il présente donc un mélange entre les deux comportements. Sa fonction $F(t)$ sera composée à la fois d'une décroissance (partie liquide) et d'un plateau (partie solide).

L'étude de la relaxation a été faite sur l'appareil Stable Micro Systems en mode non-confiné avec un capteur de 5 kg. Les hydrogels ont été préparés dans les puits pour la culture cellulaire et démoulés juste avant les mesures. Nous avons appliqué une déformation de 10 % de la hauteur de chaque hydrogel pendant 10 minutes et mesuré l'évolution de la contrainte au cours de ce temps. Tous les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-L.

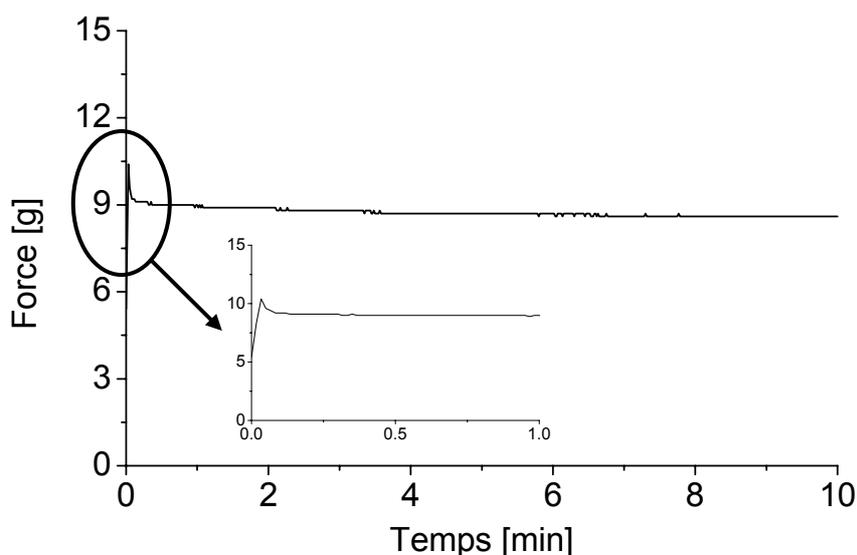


Figure III.21 : Test de la relaxation de l'hydrogel d'HPMC-Si.

La courbe de la force en fonction du temps obtenue sur l'hydrogel d'HPMC-Si est présentée sur la figure III.21. On observe d'abord une petite décroissance de la force dans les 6 premières secondes, suivie d'un plateau où la force se stabilise. En calculant l'écart entre le maximum de la courbe $F(t)$ et le plateau, on peut évaluer l'élasticité du matériau étudié. Plus la différence sera faible, plus le matériau est élastique. Cette élasticité résiduelle s'élève à 14.4 % pour l'hydrogel d'HPMC-Si. En même temps, la rigidité du matériau peut également être évaluée en observant le maximum de la force. Le matériau est d'autant plus rigide que la courbe de la force monte haut. Nous allons pouvoir par la

suite comparer la rigidité des différents hydrogels renforcés à la rigidité d'hydrogel d'HPMC-Si.

Toutes les caractéristiques mécaniques ainsi obtenues sont présentées dans le tableau III.2. Elles constituent des valeurs repères, qui pourront ensuite être comparées aux valeurs obtenues pour les hydrogels renforcés, présentés dans le chapitre suivant.

Tableau III.2 : Résumé des caractéristiques mécaniques de l'hydrogel d'HPMC-Si après 2 semaines de vieillissement à température ambiante.

Module en compression E'	Module en cisaillement G'	Elasticité résiduelle
5.7(\pm 1.6) kPa	1.1(\pm 0.1) kPa	14.4 %

4.3. Conclusion

Le dernier paragraphe de ce chapitre a été consacré aux mesures du temps de gel ainsi que des propriétés mécaniques des hydrogels d'HPMC-Si. Le temps de gel, c'est-à-dire le temps nécessaire pour former le réseau macromoléculaire à travers le gel, a été mesuré à 23 °C. Sa valeur moyenne est $t_g = 31(\pm 8)$ min.

Les propriétés mécaniques des hydrogels d'HPMC-Si ont été étudiées sur les échantillons après 2 semaines de vieillissement également à 23 °C. Les valeurs moyennes des modules en compression E' et en cisaillement G' à une fréquence de sollicitation de 1 Hz sont respectivement $E' = 5.7(\pm 1.6)$ kPa et $G' = 1.1(\pm 0.1)$ kPa.

Pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire, il est nécessaire de renforcer cet hydrogel à base d'HPMC-Si, car ses propriétés mécaniques sont faibles comparées à celles du cartilage natif. Ce travail fera l'objet du chapitre suivant. Les valeurs obtenues ici constituent donc des valeurs repères qui vont être par la suite comparées aux valeurs obtenues pour les hydrogels renforcés.

5. Conclusion

Dans cette partie de la thèse nous avons cherché à décrire au mieux les hydrogels à base d'HPMC-Si, contenant 2 wt% de polymère et 98 wt% d'eau. Les résultats concernant les premières études de leur structure, morphologie et dynamique ont été présentés et discutés. Quelques propriétés mécaniques de ces hydrogels ont également été rapportées.

La structure de l'hydrogel et par conséquent le mécanisme de sa formation ont été confirmés grâce à la RMN du solide de ^{29}Si . En effet, la création de ponts siloxanes Si-O-Si a été observée, indiquant que l'hydrogel d'HPMC-Si est un gel chimique. De plus, on peut attribuer à la formation de ce gel chimique la stabilité thermique du polymère qui a ainsi été légèrement améliorée d'environ 40 °C, comme observé par ATG.

Pour déterminer la morphologie de l'hydrogel d'HPMC-Si, nous avons mis en œuvre plusieurs types de microscopies. Malheureusement, à cause du taux d'hydratation s'élevant à 98 wt%, l'observation du réseau de polymère dans nos hydrogels n'est pas facile. De plus, les techniques de préparation des échantillons, pour permettre leur observation sous vide, impliquent la congélation de l'échantillon, ce qui peut induire des modifications de la morphologie de l'hydrogel. Néanmoins, la taille de pores ainsi observée est de l'ordre d'une dizaine de micromètres. Le paramètre de maille ξ , qui exprime la distance entre deux nœuds de réticulation de l'HPMC-Si dans l'hydrogel, a pu être évalué à 10-20 nm par des voies indirectes calculatoires basées sur des hypothèses. La diffusion des neutrons aux petits angles, qui aurait pu nous apporter une valeur expérimentale, n'a pas pu répondre à nos attentes, du fait de la présence des microbulles introduites dans les hydrogels lors de leur préparation. L'interaction avec la surface de ces microbulles diffuse les neutrons et empêche l'observation du signal provenant du réseau polymère.

L'état et la dynamique des molécules d'eau présentes dans l'hydrogel d'HPMC-Si ont également été étudiés. L'existence de deux types d'eau a été confirmée par DSC, cryoporométrie et QENS. Ainsi, la solution aqueuse confinée dans l'hydrogel est composée d'environ 80 wt% d'eau libre (« bulk ») et d'à peu près 20 wt% d'eau

d'hydratation. L'eau d'hydratation est en interaction avec les parties hydrophiles du polymère via des liaisons hydrogène. Ses molécules sont en échange permanent très rapide entre un état lié et un état non-lié. Par conséquent, ce type d'eau reste en phase liquide jusqu'à 160 K. En revanche, la température de cristallisation/fusion de l'eau « bulk » est juste légèrement abaissée par rapport à celle de l'eau non-confinée « bulk ». Cet abaissement peut être corrélé à la taille du paramètre de maille ξ de l'HPMC-Si qui confine ce type d'eau (effet Gibbs-Thomson) : $\xi \sim 21 \text{ nm}$. La dynamique de l'eau « bulk » confinée a également été observée par spectrométrie QENS à l'échelle spatio-temporelle la plus locale (de l'ordre du nanomètre et de la picoseconde), aussi bien que par spectrométrie PGSE à plus grande échelle (de l'ordre d'une dizaine de micromètres et de dizaines de millisecondes). Le résultat montre que l'eau « bulk » confinée dans l'hydrogel se comporte comme de l'eau « bulk » ordinaire. La PGSE nous a également fourni un coefficient de diffusion des molécules de ce type d'eau confinée de $1.88 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 300 K, ce qui est très proche du coefficient de diffusion des molécules d'eau distillée « bulk » de $2.26 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. La dynamique des molécules d'eau « bulk » n'est donc pratiquement pas affectée par la présence du réseau de polymère au sein de l'hydrogel à des distances de l'ordre d'une dizaine de micromètre.

Au regard de ces résultats, il nous apparaît que la morphologie de l'hydrogel d'HPMC-Si est bien hiérarchisée, telle que représentée sur la figure I.6c au chapitre I., avec des pores de diamètre $d \sim 10 \mu\text{m}$ dont les parois ($\sim 100 \text{ nm}$ d'épaisseur) sont constituées d'un maillage des chaînes d'HPMC-Si avec un paramètre de maille $\xi \sim 10\text{-}20 \text{ nm}$. L'ordre de grandeur du paramètre de maille correspond bien à la distance moyenne entre les groupements alcoxysilanes greffés le long d'une chaîne d'HPMC-Si (1 groupement alcoxysilane toutes les 10 unités glucosidiques). La taille de pores dans les hydrogels d'HPMC-Si est donc suffisamment grande pour pouvoir accueillir les cellules et permettre leur prolifération dans le but de la reconstitution du cartilage. De plus, vu la grande diffusivité de l'eau au sein de ces hydrogels, l'acheminement des nutriments et éventuellement des principes actifs vers les cellules est tout à fait possible.

Finalement, le temps de gel ainsi que les propriétés mécaniques de l'hydrogel d'HPMC-Si ont aussi été évalués dans ce chapitre. Le temps de gel, obtenu grâce à la

rhéologie, est de $t_g = 31(\pm 8)$ min, sachant que la polycondensation complète nécessite environ 15 jours. Toutes les expériences ont donc été menées sur les hydrogels après 2 semaines de vieillissement. Les modules élastiques en compression ($E' = 5.7(\pm 1.6)$ kPa) ainsi qu'en cisaillement ($G' = 1.1(\pm 0.1)$ kPa) sont trop faibles pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire pour une simple résidence du réseau hôte sur le site lésé. Les modules du cartilage articulaire se situent autour de centaines de kPa jusqu'à quelques MPa. C'est pourquoi un renfort des hydrogels à base d'HPMC-Si est nécessaire. Ce renfort fera l'objet du chapitre suivant.

Toutes les principales caractéristiques physico-chimiques des hydrogels à base d'HPMC-Si sont résumées dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Résumé des principales caractéristiques physico-chimiques des hydrogels d'HPMC-Si. Les quantités d'eau « bulk » et d'eau d'hydratation sont indiquées juste avant la fusion de l'eau « bulk » selon les résultats de cryoporométrie.

Paramètre de maille ξ	10-20 nm
Taille de pores d	~ 10 μm
Épaisseur des parois de pores	~ 100 nm
Quantité d'eau « bulk »	~ 80 wt%
Quantité d'eau d'hydratation	~ 20 wt%
Coefficient de diffusion D de l'eau « bulk » sur 10 μm et 50 ms à 300 K	$1.88 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Temps de gel t_g à 23 °C	31(± 8) min
Module en compression E'	5.7(± 1.6) kPa
Module en cisaillement G'	1.1(± 0.1) kPa

Références bibliographiques

- [1] Daculsi, G.; Weiss, P.; Delecrin, J.; Grimandi, G.; Passuti, N. Biomaterial composition-preparation proceeding. *Brevet WO 95/21634* **1995**.
- [2] Daculsi, G.; Weiss, P.; Dupraz, A.; Lapkowski, M. Composition for biomaterials, methods of preparation. *Brevet WO 97/05911* **1997**.
- [3] Weiss, P.; Vinatier, C.; Guicheux, J.; Grimandi, G.; Daculsi, G., A Self Setting Hydrogel as an Extracellular Synthetic Matrix for Tissue Engineering. *Key Engineering Materials* **2004**, 254-256, 1107-1110.
- [4] Vinatier, C.; Magne, D.; Weiss, P.; Trojani, C.; Rochet, N.; Carle, G. F.; Vignes-Colombeix, C.; Chadjichristos, C.; Galera, P.; Daculsi, G.; Guicheux, J., A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* **2005**, 26, (33), 6643-6651.
- [5] Fatimi, A.; Tassin, J.-F.; Quillard, S.; Axelos, M. A. V.; Weiss, P., The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* **2008**, 29, (5), 533-543.
- [6] Fatimi, A.; Axelos, M. A. V.; Tassin, J. F.; 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.
- [7] Fatimi, A.; Tassin, J.-F.; Turczyn, R.; Axelos, M. A. V.; Weiss, P., Gelation studies of a cellulose-based biohydrogel: The influence of pH, temperature and sterilization. *Acta Biomaterialia* **2009**, 5, (9), 3423-3432.
- [8] Rederstorff, E.; Weiss, P.; Sourice, S.; Pilet, P.; Xie, F.; Siquin, C.; Collic-Jouault, S.; Guicheux, J.; Laïb, S., An in vitro study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, (5), 2119-2130.
- [9] Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M., In Situ Forming Chitosan Hydrogels Prepared via Ionic/Covalent Co-Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2011**, 12, (9), 3275-3284.

- [10] Paës, G.; Chabbert, B., Characterization of Arabinoxylan/Cellulose Nanocrystals Gels to Investigate Fluorescent Probes Mobility in Bioinspired Models of Plant Secondary Cell Wall. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (1), 206-214.
- [11] Zmora, S.; Glicklis, R.; Cohen, S., Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials* **2002**, 23, (20), 4087-4094.
- [12] Apkarian, R. P.; Wright, E. R., Cryo and Cryo-Etch Methods for Quality Preservation of Hydrogels Imaged at High Magnification by Low Temperature SEM. *Microscopy and Microanalysis* **2005**, 11, (SupplementS02), 1088-1089.
- [13] Sansinena, M.; Santos, M. V.; Zaritzky, N.; Chirife, J., Comparison of heat transfer in liquid and slush nitrogen by numerical simulation of cooling rates for French straws used for sperm cryopreservation. *Theriogenology* **2012**, 77, (8), 1717-1721.
- [14] Yoshinobu, M.; Morita, M.; Higuchi, M.; Sakata, I., Morphological study of hydrogels of cellulosic super water absorbents by CRYO-SEM observation. *Journal of Applied Polymer Science* **1994**, 53, (9), 1203-1209.
- [15] Gemeinhart, R. A.; Chen, J.; Park, H.; Park, K., pH-sensitivity of fast responsive superporous hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2000**, 11, (12), 1371-1380.
- [16] Serp, D.; Mueller, M.; Von Stockar, U.; Marison, I. W., Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. II. Effect of temperature on the structure of Ca²⁺-alginate beads. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, 79, (3), 253-259.
- [17] Savina, I. N.; Gun'ko, V. M.; Turov, V. V.; Dainiak, M.; Phillips, G. J.; Galaev, I. Y.; Mikhalovsky, S. V., Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo-hydrogels. *Soft Matter* **2011**, 7, (9), 4276-4283.
- [18] Ji, C.; Annabi, N.; Khademhosseini, A.; Dehghani, F., Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO₂. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, (4), 1653-1664.
- [19] Weiss, P.; Guicheux, J.; Daculsi, G.; Grimandi, G.; Vinatier, C. Use of a hydrogel for the culture of chondrocytes. *Brevet WO 05/044326 A1* **2005**.
- [20] Flory, P. J., *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press: Ithaca, **1953**.

- [21] Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R., Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials* **2006**, 18, (11), 1345-1360.
- [22] Zhou, J.; Zhang, L.; Cai, J., Behavior of cellulose in NaOH/Urea aqueous solution characterized by light scattering and viscometry. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2004**, 42, (2), 347-353.
- [23] Jackson, C. L.; McKenna, G. B., The melting behavior of organic materials confined in porous solids. *The Journal of Chemical Physics* **1990**, 93, (12), 9002-9011.
- [24] Alba-Simionesco, C.; Coasne, B.; Dosseh, G.; Dudziak, G.; Gubbins, K. E.; Radhakrishnan, R.; Sliwinska-Bartkowiak, M., Effects of confinement on freezing and melting. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2006**, 18, (6), R15-R68.
- [25] Erbil, H. Y., Calculation of Spreading Pressure of Water on Cellulosic Films from Contact Angle Data. *Turkish Journal of Chemistry* **1997**, 21, (4), 332-345.
- [26] Colorcon, The Dow Chemical CompanyTM. <http://www.colorcon.com/> (Consulté le **20 Août 2012**).
- [27] Qu, X.; Wirsén, A.; Albertsson, A. C., Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer* **2000**, 41, (12), 4589-4598.
- [28] Bée, M., La diffusion quasi-élastique des neutrons; introduction et principes généraux. *Journal de Physique IV* **2000**, 10, (PR1), 1-14.
- [29] Teixeira, J., Introduction à la diffusion de neutrons. *Collection SFN* **2007**, 8, (Ecole Thématique Surfaces, Interfaces, Milieux Confinés par Diffusion de Neutrons), 1-9.
- [30] Fayer, M. D., Dynamics of Water Interacting with Interfaces, Molecules, and Ions. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45, (1), 3-14.
- [31] Tanaka, K., Self-diffusion coefficients of water in pure water and in aqueous solutions of several electrolytes with ¹⁸O and ²H as tracers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **1978**, 74, 1879-1881.
- [32] Stolz, M.; Raiteri, R.; Daniels, A. U.; VanLandingham, M. R.; Baschong, W.; Aebi, U., Dynamic Elastic Modulus of Porcine Articular Cartilage Determined at

- Two Different Levels of Tissue Organization by Indentation-Type Atomic Force Microscopy. *Biophysical journal* **2004**, 86, (5), 3269-3283.
- [33] Barker, M. K.; Seedhom, B. B., The relationship of the compressive modulus of articular cartilage with its deformation response to cyclic loading: does cartilage optimize its modulus so as to minimize the strains arising in it due to the prevalent loading regime? *Rheumatology* **2001**, 40, (3), 274-284.
- [34] Levental, I.; Georges, P. C.; Janmey, P. A., Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* **2007**, 3, (3), 299-306.
- [35] Mansour, J. M., Biomechanics of cartilage. In *Kinesiology: the Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*, Oatis, C. A., Ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, **2003**; pp 66-79.
- [36] Shepherd, D. E.; Seedhom, B. B., The 'instantaneous' compressive modulus of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Rheumatology* **1999**, 38, (2), 124-132.
- [37] Abbot, A. E.; Levine, W. N.; Mow, V. C., Biomechanics of the Articular Cartilage and Menisci of the Adult Knee. In *The Adult Knee*, Callaghan, J. J.; Rosenberg, A. G.; Rubash, H. E.; Simonian, P. T.; Wickiewicz, T. L., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, **2003**; Vol. 1, pp 81-104.
- [38] Mercier, J.-P.; Zambelli, G.; Kurz, W., *Introduction to Materials Science*. Elsevier Science: Paris, **2002**; p 460.

Chapitre IV

Hydrogels nanocomposites

1. Introduction

Nous venons de voir que les propriétés mécaniques des hydrogels d'HPMC-Si ne sont pas suffisantes pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Comme déjà discuté dans le chapitre I, différentes stratégies de renforcement des hydrogels sont envisageables. Actuellement, plusieurs pistes sont exploitées à la fois pour renforcer des hydrogels d'HPMC-Si, notamment l'ajout d'un deuxième polymère d'origine naturelle [1] ou l'ajout de nanoparticules telles que les nanotubes de carbone [2] ou des plaquettes de nano-argiles (travaux en cours).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'employer des nanocharges unidimensionnelles pour renforcer les hydrogels d'HPMC-Si. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux nanotubes de carbone, du fait de leurs propriétés mécaniques exceptionnelles. Cependant, un inconvénient des nanotubes de carbone est leur hydrophobicité qui empêche une bonne dispersion dans des milieux aqueux, un autre est la controverse au sujet de leur toxicité. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers d'autres nanocharges hydrophiles : les nanofibres de silice mésoporeuses qui nous ont été proposées dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Clément Sanchez de l'Université Paris VI et l'équipe de Philippe Belleville et Karine Vallé du CEA Le Ripault. En effet, ces nanofibres peuvent présenter plusieurs avantages pour nous : ce sont des charges anisotropes qui devraient permettre un renfort efficace à faible taux ; leur caractère hydrophile doit leur permettre une bonne dispersion dans les solutions aqueuses utilisées ; par ailleurs on peut espérer avoir une interaction chimique entre le polysaccharide silanisé et les nanofibres de silice; enfin, nous pensons à l'avenir exploiter la mésoporosité des fibres pour un relargage *in situ* de principes actifs ou d'agents de croissance. C'est donc avec ces nanofibres que nous avons synthétisé les hydrogels nanocomposites, présentés dans ce chapitre.

2. Nanofibres de silice (NFs)

Les nanofibres de silice mésoporeuses (NFs) ont été élaborées au Laboratoire Sol-Gel du CEA/DAM Le Ripault dans le cadre de la thèse de Dr. F. Rambaud [3]-[5].

Nous avons ensuite reproduit leur synthèse au sein de notre laboratoire, avec l'aide de Mme F. Lari, et de M. T. Duffay, stagiaire étudiant en L3, suivant un protocole expérimental adapté à nos besoins, décrit en détails en Annexe 1-D.

La synthèse des nanofibres de silice, dont le principe simplifié est schématisé sur la figure IV.1, peut être présentée comme une polycondensation sol-gel des précurseurs de la silice autour des micelles cylindriques formées à partir des tensioactifs dans une solution aqueuse. Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire constituées de deux parties : polaire (hydrophile) et apolaire (hydrophobe). Dans une solution aqueuse, les tensioactifs ont tendance à se regrouper et former des micelles : les structures sont orientées de telle manière que les parties polaires soient en interaction avec l'eau. Pendant la synthèse des nanofibres de silice, deux types de tensioactifs sont mélangés dans une solution aqueuse de soude à l'aide d'un agitateur mécanique : l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), responsable de la croissance des micelles en fibres, et le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), qui forme les micelles. La forme des micelles dépend fortement de la vitesse d'agitation. Ensemble avec la température (60 °C), la vitesse d'agitation (260 tr.min⁻¹) constitue le paramètre clé de cette synthèse.

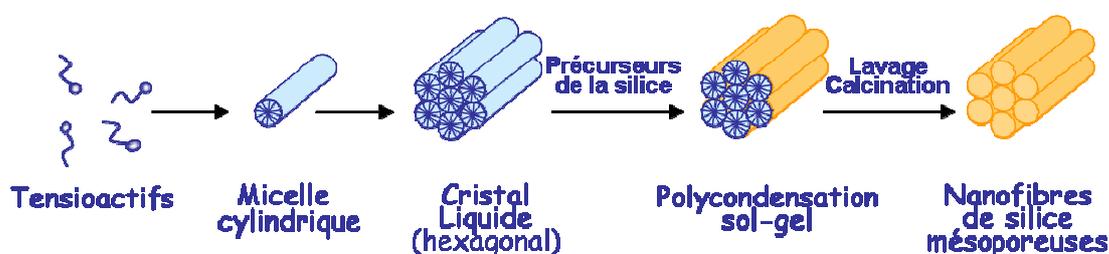


Figure IV.1 : Représentation schématique de la synthèse sol-gel des nanofibres de silice mésoporeuses.

Repris de la référence [4].

Une fois les micelles formées, deux précurseurs de silice sont introduits dans le milieu réactionnel : le tétraéthyle orthosilicate (TEOS) et le 3-mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTMS). Après 4h de polycondensation, les tensioactifs PFOA et CTAB sont éliminés par lavage, reflux et calcination successives pour ne laisser que de la silice mésoporeuse en forme de fibres.

Les nanofibres ainsi synthétisées sont d'abord caractérisées au MEB. Une image typique de leur morphologie est présentée sur la figure IV.2. Les NFs ont un diamètre nanométrique (de l'ordre de 50 nm) et une longueur qui peut atteindre jusqu'à 1 μm . Un paramètre important décrivant une nanocharge unidimensionnelle est son facteur de forme f . Il s'agit du rapport entre les deux dimensions de la nanocharge ($f \geq 1$). Sauf autre précision, les nanofibres utilisées pendant nos études avaient toutes un facteur de forme moyen d'environ 20 avec un diamètre autour de 50 nm et une longueur de 1 μm .

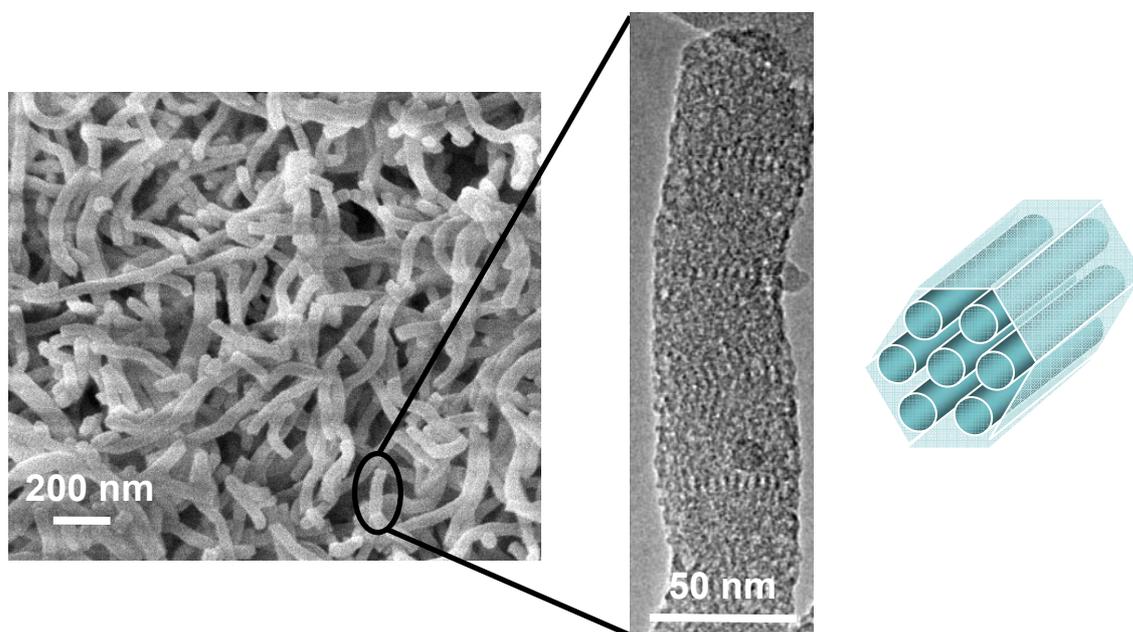


Figure IV.2 : Morphologie des nanofibres de silice observée par la microscopie électronique à balayage (à gauche) et par la microscopie électronique à transmission (au centre). Le schéma (à droite) montre la structure hexagonale en 2D des mésopores orientés suivant la longueur des fibres. Les torsades hélicoïdales des mésopores autour de l'axe des fibres ne sont pas représentés sur ce schéma [4].

La mésoporosité des nanofibres peut être observée en microscopie électronique à transmission (MET). Une image MET d'une fibre mésoporeuse est également présentée sur la figure IV.2. Les mésopores forment une structure hexagonale en 2D (dans la section de la fibre) et sont orientés et torsadés le long de la fibre.

La structure des nanofibres est déterminée grâce à la diffraction des rayons X (DRX) aux angles de diffraction 2θ allant de 1 à 8°. Nous avons pu obtenir le

diffractogramme présenté sur la figure IV.3 (les paramètres expérimentaux sont détaillés en Annexe 3-M).

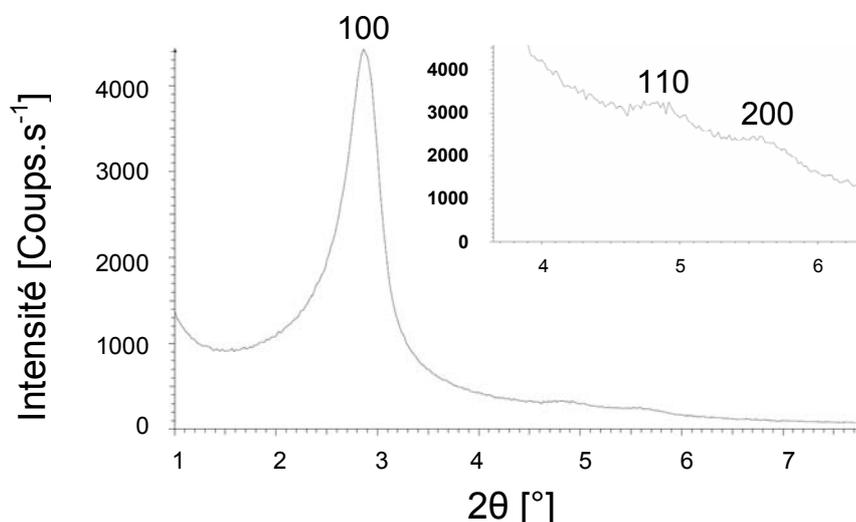


Figure IV.3 : Diffractogramme des nanofibres de silice. Insert : agrandissement de la zone entre $2\theta = 3.5^\circ$ et 6.5° .

Les 3 pics observés sur le diffractogramme sont situés à 2.86° , 4.90° et 5.60° . Ils correspondent aux plans de diffraction (100), (110) et (200) d'une structure hexagonale 2D d'un groupe d'espace $P6mm$ [4], [5]. En appliquant la loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (\text{IV.1})$$

sur le premier pic à $2\theta = 2.86^\circ$, nous trouvons la distance entre les différents plans de diffraction d d'environ 3.1 nm. La distance d correspond à la distance entre deux centres de mésopores voisins. Puisque cette valeur comprend également l'épaisseur des parois de pores, nous pouvons constater que le diamètre des mésopores est inférieur à 3 nm.

Le diamètre des mésopores ainsi que la surface spécifique des NFs ont pu être déterminés via la méthode d'adsorption-désorption d'azote, avec un traitement BET : la taille moyenne des pores est d'environ 2.6 nm et la surface spécifique est de l'ordre de $1000(\pm 27) \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Ces valeurs correspondent bien à celles obtenues par F. Rambaud [3].

3. Synthèse des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs

La synthèse des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs s'effectue suivant un protocole expérimental similaire à celui de la préparation des hydrogels d'HPMC-Si purs. Ce protocole est schématisé sur la figure IV.4 et décrit en détails en Annexe 1-C.

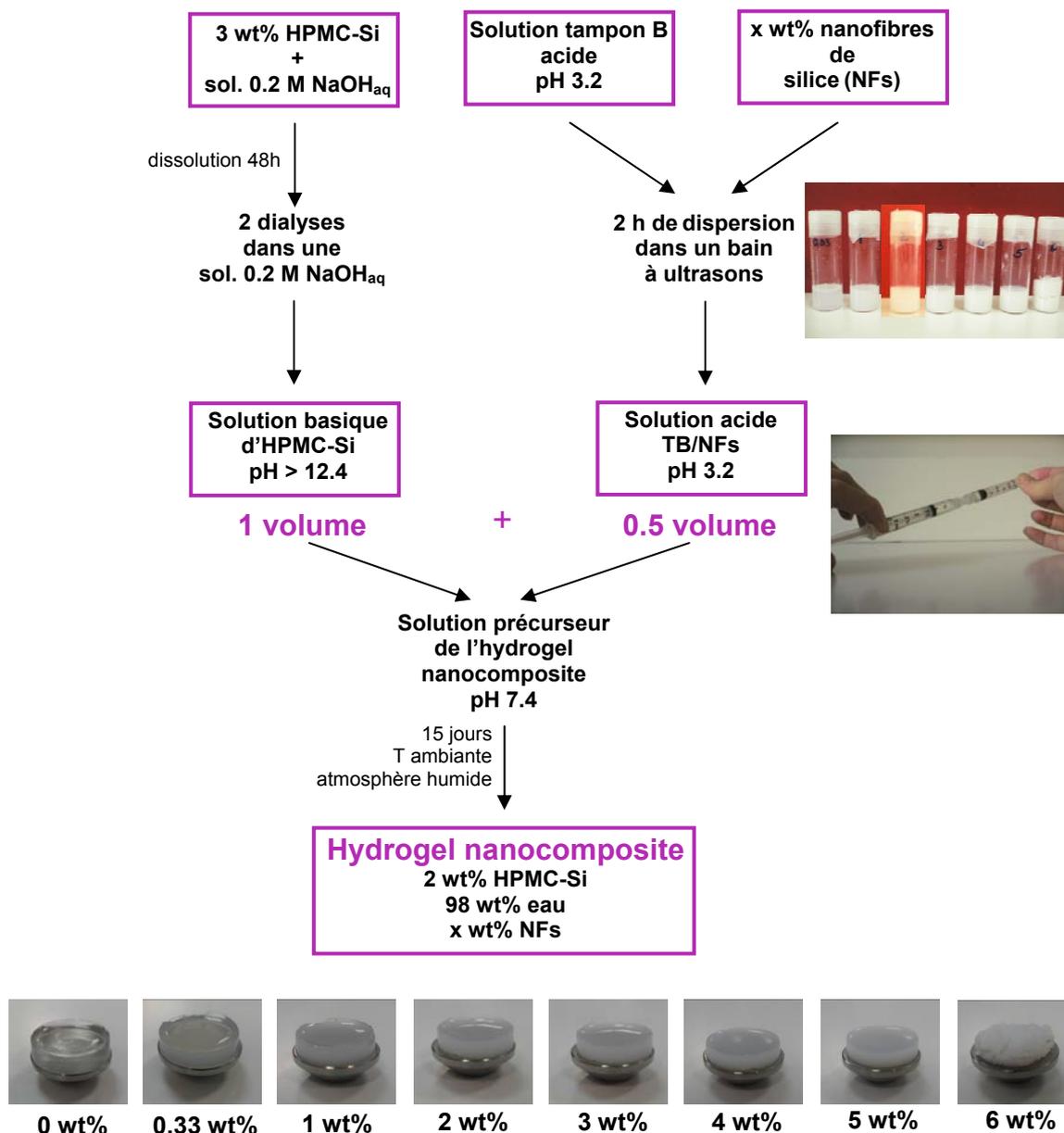


Figure IV.4 : Représentation schématisée de la préparation des hydrogels nanocomposites à base d'HPMC-Si et de nanofibres de silice. Les étapes clés sont indiquées en mauve et illustrées avec des images.

Les hydrogels nanocomposites présentés sur les photos contiennent différents taux de NFs.

Les nanofibres de silice sont des nanocharges hydrophiles, il est donc possible de les disperser dans la solution tampon acide (TB) à l'aide d'un bain à ultrasons. Cela conduit à des solutions appelées TB/NFs, homogènes et plus ou moins blanchâtres en fonction de la concentration en NFs. Pour obtenir la solution précurseur d'un hydrogel nanocomposite, 0.5 volume de solution TB/NFs doit être mélangé avec 1 volume de solution basique d'HPMC-Si. Similairement à la solution précurseur de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, la solution précurseur d'un hydrogel nanocomposite est également injectable pendant quelques minutes avant qu'elle n'atteigne le point de gel. La durée exacte pendant laquelle chaque solution précurseur reste injectable dépend du taux de NFs, comme on le verra dans le paragraphe suivant. Toutes les études présentées dans ce chapitre ont été menées sur les hydrogels nanocomposites après 15 jours de vieillissement à température ambiante et sous atmosphère humide, afin que les résultats puissent être comparés à l'hydrogel d'HPMC-Si pur. De tels hydrogels nanocomposites contenant différents taux de NFs sont présentés sur les images en bas de la figure IV.4. Les pourcentages massiques indiqués se réfèrent à la masse des NFs par rapport à la masse de l'hydrogel pur hydraté :

$$wt\% = 100 \times m_{NFs} / m_{hydrogel\ pur} \quad (IV.2)$$

L'ajout de nanofibres de silice n'inhibe donc pas l'aptitude du polymère HPMC-Si à polycondenser. En observant les images des différents hydrogels nanocomposites sur la figure IV.4, nous pouvons constater que les hydrogels passent de l'incolore et complètement transparent (hydrogel d'HPMC-Si pur) au blanc et opaque (hydrogel nanocomposite avec 5 wt% de NFs). Par ailleurs, nous avons pu remarquer qu'avec 6 wt% de NFs, l'obtention d'un hydrogel injectable n'est plus possible. Une telle quantité de nanofibres ne peut effectivement pas être dispersée dans la solution TB par les ultrasons. Le mélange des nanofibres avec la solution TB et la solution basique d'HPMC-Si a été fait à l'aide d'une spatule. Cet échantillon présente une texture granulaire et ne ressemble plus à un hydrogel. Ainsi, nous pouvons dire que le taux maximum de nanofibres permettant d'obtenir un hydrogel d'HPMC-Si homogène se situe entre 5 et 6 wt% de NFs.

Nous pouvons proposer un mécanisme de formation des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs, similaire à celui de la formation de l'hydrogel d'HPMC-Si pur. Ce mécanisme est schématisé sur la figure IV.5.

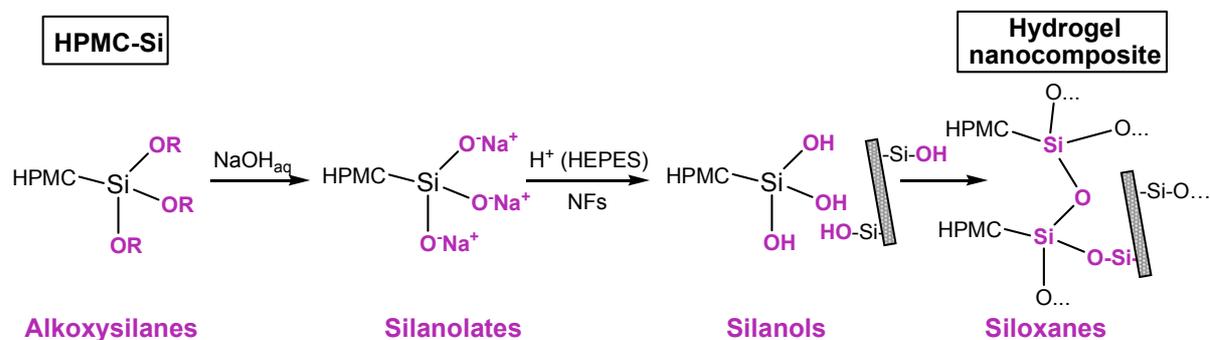


Figure IV.5 : Représentation schématique des processus chimiques lors de la préparation d'un hydrogel nanocomposite à partir d'HPMC-Si. De gauche à droite : la dissolution du polymère HPMC-Si dans une solution aqueuse de soude, l'ajout d'un mélange d'une solution tampon acide à base d'HEPES contenant des NFs, la polycondensation des chaînes polymériques avec les NFs et la formation de l'hydrogel nanocomposite.

Après la dissolution du polymère HPMC-Si dans la solution aqueuse de NaOH et la transformation des groupements alkoxysilanes en silanolates, la solution TB/NFs est rajoutée. L'ajout de la solution acide conduit à la formation des groupements silanols (-Si(-OH)₃) à partir des groupements silanolates de l'HPMC-Si. En même temps, des groupements silanols sont également naturellement présents sur la surface des nanofibres de silice (groupements hydroxyles pendants -Si-OH). Ainsi, les silanols du polymère et ceux des nanofibres peuvent polycondenser entres-eux pour former des liaisons siloxanes (Si-O-Si). En rajoutant des nanofibres de silice dans les hydrogels d'HPMC-Si, nous pouvons donc obtenir un réseau tridimensionnel constitué de polymère HPMC-Si et de NFs, comme schématisé sur la figure IV.6.

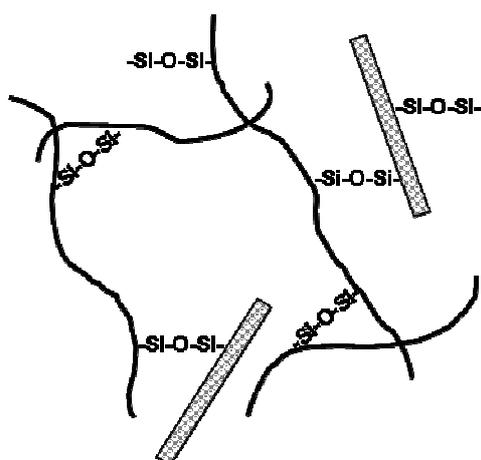


Figure IV.6 : Représentation schématique du réseau 3D constitué du polymère HPMC-Si (traits) et des NFs (bâtonnets) dans les hydrogels nanocomposites.

4. Propriétés rhéologiques et mécaniques des hydrogels nanocomposites

Les hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs ont été synthétisés dans le but d'obtenir un renfort mécanique par rapport aux hydrogels d'HPMC-Si pur. C'est donc naturellement l'étude des propriétés mécaniques des hydrogels nanocomposites que nous avons effectuée avant toute autre caractérisation. Tous les résultats ont été comparés aux valeurs obtenues pour l'hydrogel d'HPMC-Si pur afin de savoir si la présence des nanofibres améliore les propriétés mécaniques des hydrogels nanocomposites.

4.1. Temps de gel

Les mesures des temps de gel ont été effectuées de la même manière que dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, c'est-à-dire par des mesures mécaniques dynamiques oscillatoires des modules en cisaillement G' et G'' à 23 °C. Le temps nécessaire pour que le facteur de perte $\tan \delta(t) = G''/G'$ devienne indépendant de la fréquence de cisaillement ω correspond au temps de gel t_g . Plus d'informations sont disponibles en Annexe 3-K.

Les valeurs des temps de gel sont résumées pour les différents hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs dans le tableau IV.1 et représentées sur la figure IV.7 en fonction du taux de NFs.

Tableau IV.1 : Valeurs des temps de gel des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs à différents taux de NFs obtenus à 23 °C.

	Temps de gel t_g [min]
HPMC-Si pur	31(\pm 8)
HPMC-Si + 0.33 wt% NFs	26(\pm 4)
HPMC-Si + 1 wt% NFs	22(\pm 1)
HPMC-Si + 2 wt% NFs	21(\pm 4)
HPMC-Si + 2.5 wt% NFs	13(\pm 1)
HPMC-Si + 3 wt% NFs	2(\pm 1)
HPMC-Si + 4 wt% NFs	2(\pm 1)
HPMC-Si + 5 wt% NFs	2(\pm 1)

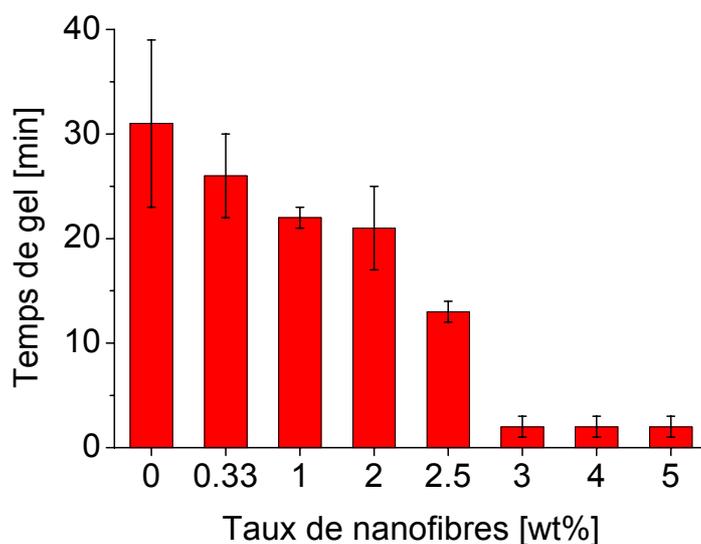


Figure IV.7 : Evolution du temps de gel des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs obtenu à 23 °C en fonction du taux de nanofibres de silice.

Nous pouvons constater que le point de gel des hydrogels nanocomposites varie en fonction de la concentration en NFs. L'ajout des nanofibres accélère la formation du réseau dans les hydrogels nanocomposites. Le point de gel est atteint d'autant plus vite que le taux de nanofibres est élevé. Cette tendance tend à confirmer notre hypothèse sur le mécanisme de la formation des hydrogels nanocomposites : les NFs participent à la

création du réseau dans les hydrogels nanocomposites via les liaisons siloxanes Si-O-Si avec le polymère HPMC-Si. Il y a donc une liaison chimique entre les nanofibres de silice et le polymère silanisé.

Nous remarquons surtout un changement important du temps de gel entre 2 et 3 wt% de NFs : il passe de 21(\pm 4) min dans le cas de l'hydrogel nanocomposite avec 2 wt% de NFs à 2(\pm 1) min pour l'hydrogel nanocomposite contenant 3 wt% de nanofibres. Ce changement pourrait signifier que les nanofibres forment un réseau percolant au sein des hydrogels nanocomposites. Si c'est le cas, nous devrions également observer un changement important des propriétés mécaniques des hydrogels nanocomposites entre ces deux concentrations en nanofibres.

4.2. Comportement en compression

Les modules élastiques en compression E' des hydrogels nanocomposites ont été mesurés avec la technique DMA en mode uniaxial non confiné. Les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-L. Les valeurs des modules E' obtenues pour les différents hydrogels nanocomposites à une fréquence de sollicitation de 1 Hz et à 23 °C sont résumées dans le tableau IV.2 et représentées en fonction du taux de NFs sur la figure IV.8.

Tableau IV.2 : Valeurs des modules en compression E' des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs à différents taux de NFs, obtenues à 1Hz et à 23 °C.

	Module en compression E' [kPa]
HPMC-Si pur	6.45(\pm 2.03)
HPMC-Si + 0.33 wt% NFs	6.40(\pm 0.89)
HPMC-Si + 1 wt% NFs	10.63(\pm 1.63)
HPMC-Si + 2 wt% NFs	8.97(\pm 2.97)
HPMC-Si + 3 wt% NFs	27.04(\pm 2.04)
HPMC-Si + 4 wt% NFs	23.10(\pm 2.98)
HPMC-Si + 5 wt% NFs	23.61(\pm 3.32)

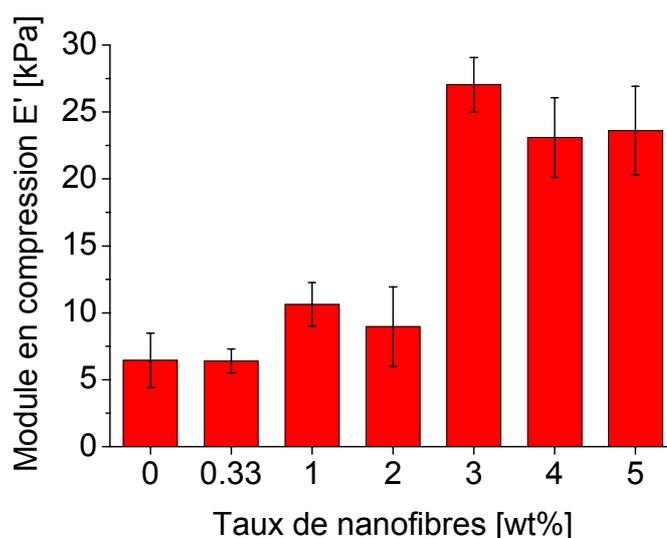


Figure IV.8 : Evolution du module en compression E' des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs en fonction du taux de nanofibres de silice avec un facteur de forme 20.

Les modules en compression E' des hydrogels nanocomposites ne varient pas beaucoup et restent proches de ceux de l'hydrogel d'HPMC-Si pur ($E' = 6.45(\pm 2.03) \text{ kPa}$) jusqu'à 2 wt% de NFs. Un changement des propriétés mécaniques se produit soudainement entre 2 et 3 wt%, où la valeur de E' passe de $8.97(\pm 2.97) \text{ kPa}$ à $27.04(\pm 2.04) \text{ kPa}$. Le module en compression devient alors plus de 4 fois supérieur à celui de l'hydrogel non renforcé. En augmentant encore plus la quantité de nanofibres dans les hydrogels nanocomposites jusqu'à 5 wt%, qui est le seuil maximal de chargement des hydrogels d'HPMC-Si, la valeur du module en compression ne change plus.

Le module en compression de l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs, $E' = 27.04(\pm 2.04) \text{ kPa}$, est toujours faible en comparaison des modules du cartilage articulaire humain, qui se situent plutôt autour de 1 MPa [6], [7]. Cependant, notre but n'est pas d'utiliser ce matériau pour remplacer les fonctions du cartilage articulaire à long terme, mais en tant que support temporaire en ingénierie tissulaire, afin qu'il puisse offrir un milieu favorable à la reconstitution autologue du cartilage articulaire à partir des cellules précurseurs. Les cellules précurseurs ont besoin d'une matrice qui mime au mieux la structure et les propriétés du cartilage natif pour qu'elles puissent proliférer et se différencier. Le module en compression de l'hydrogel nanocomposite à 3 wt% de NFs peut être suffisant pour une telle application.

L'amélioration considérable du module en compression des hydrogels nanocomposite est donc obtenue avec seulement 3 wt% de nanocharges. Cette quantité est assez faible comparée par exemple au 50 wt% de nanoparticules sphériques de phosphate de calcium qui avaient été nécessaires pour améliorer la tenue mécanique des hydrogels d'HPMC [8]. Ce résultat peut être attribué à deux éléments, déjà discuté dans le chapitre I : premièrement, c'est grâce à la forme très anisotrope de nos nanocharges que nous obtenons un réseau percolant à travers le gel avec un taux de charges plus faible qu'avec des particules sphériques ; deuxièmement, la faible quantité de nanofibres, qui améliore le module en compression de l'hydrogel nanocomposite en question, peut être liée à l'interaction chimique entre la matrice polymère et les nanofibres.

De plus, puisque la variation soudaine du module en compression se produit pour le même taux de nanofibres que le changement de temps de gel, c'est-à-dire entre 2 et 3 wt% de NFs, nous pouvons conclure qu'il y a bien une percolation du réseau chimique nanofibres/HPMC-Si, ou en d'autres termes la formation d'un réseau continu à travers tout le volume de l'hydrogel nanocomposite. Le seuil de percolation doit se situer entre 2 et 3 wt% de NFs, nous y reviendrons dans le paragraphe suivant. D'autre part, comme le changement des propriétés mécaniques est aussi lié à une bonne interaction entre la matrice de l'hydrogel et les nanocharges, cela confirme que les nanofibres de silice et le polymère silanisé sont liés par les liaisons siloxane Si-O-Si.

4.2.1. Seuil de percolation

Il existe plusieurs catégories de modèles qui permettent d'expliquer une amélioration des propriétés physiques dans les milieux composites quand on augmente la proportion de charges par rapport à la matrice. La grande catégorie des modèles dits de « milieu effectif » décrivent le milieu hétérogène comme une moyenne adaptée des différents constituants. Ces modèles conduisent à une amélioration des propriétés graduée décrite par des lois de mélange et ne font pas apparaître de transition brutale dans les propriétés quand le taux de charge augmente. La percolation est un modèle qui décrit les transitions de propriétés liées à la connectivité des charges à travers la matrice [9]. Nous avons vu que dans nos composites apparaissait une transition en terme de temps de gel ou

de module de compression quand le taux de nanofibres passe de 2 à 3 wt%. On peut se poser la question d'une transition induite par la percolation du réseau de nanofibres.

Quand on a affaire à des charges sphériques monodisperses (de facteur de forme $f = 1$) parfaitement dispersées au sein du matériau, il est possible de démontrer que la fraction volumique de charges nécessaire pour obtenir leur percolation est $V_f = 0.3$ [10]. Cette valeur seuil est appelée « seuil de percolation », noté V_c . Dans le cas des nanocharges de forme anisotrope ($f > 1$), comme pour les nanofibres de silice utilisées ici, cette fraction volumique va diminuer d'autant plus que le facteur de forme est élevé. Plusieurs approches théoriques existent, mais retenons simplement que pour des bâtonnets de facteur de forme inférieur à 100, répartis et orientés aléatoirement dans la matrice, on peut en première approximation utiliser la relation suivante [11]:

$$fV_f = V_c \quad (\text{IV.3})$$

La relation IV.3 exprime le fait que plus l'anisotropie, et donc le facteur de forme des nanocharges, est importante, plus la quantité de nanocharges nécessaire pour obtenir le seuil de percolation sera faible [12], [13].

Dans notre cas, le facteur de forme des nanofibres de silice f est approximativement de 20. Si on utilise la formule IV.3, on trouve alors un seuil de percolation d'environ 1,5 % en fraction volumique, soit d'environ 2.75 wt% de NFs dans nos hydrogels nanocomposites (en considérant une masse volumique des nanofibres de silice de 1.9 g.cm^{-3}). Nos mesures de compression par DMA montrent que le module élastique E' présente un changement important entre 2 et 3 wt%. Il en est de même pour le temps de gel qui chute brutalement pour des taux de nanofibres du même ordre. Ce simple calcul théorique, bien que très approximatif, nous donne donc une valeur qui corrèle très bien avec le résultat expérimental et suggère que la transition dans les propriétés de compression est bien due à une percolation du réseau de nanofibres.

Quand la longueur et par conséquent le facteur de forme des nanofibres diminue, la fraction volumique de NFs nécessaire pour obtenir le seuil de percolation doit augmenter. Nous avons réalisé des mesures DMA avec des hydrogels nanocomposites contenant des

nanofibres plus courtes avec un facteur de forme d'environ 11. L'application de la formule IV.3 donnerait un seuil de percolation d'environ 4.9 wt% de NFs pour ce type de nanofibres. Le diagramme de la figure IV.9 montre que le changement soudain du module en compression se produit pour les hydrogels nanocomposites contenant entre 4 et 5 wt% de NFs. Le seuil de percolation est donc bien décalé vers les plus grandes quantités de nanofibres, entre 4 et 5 wt%, exactement comme prévu par le calcul théorique. Une fois de plus, même si ce calcul reste très approximatif, il nous donne des résultats cohérents et tend à confirmer l'hypothèse d'une transition de percolation pour expliquer ces propriétés en compression.

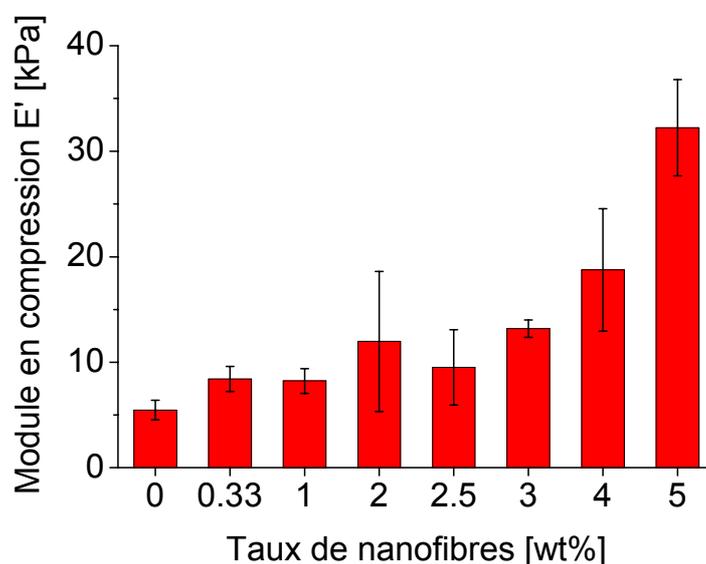


Figure IV.9 : Evolution du module en compression des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs en fonction du taux de NFs pour des nanofibres avec un facteur de forme $f \sim 11$.

Ceci implique en particulier, que les nanofibres sont bien dispersées au sein de nos hydrogels nanocomposites, et que leur inter-réticulation avec le réseau HPMC-Si est efficace mécaniquement. Ce dernier point est certainement celui qui explique la validité de la théorie de la percolation appliquée à ce problème de compression. Cela a été évoqué plus haut, la percolation est une transition de phase contrôlée par la connectivité des charges. Dans une sollicitation en compression, la connectivité jouera un rôle déterminant si les nanofibres sont physiquement liées entre elles directement ou via la matrice. Dans le cas contraire, on ne s'attend pas à un phénomène de transition, mais simplement un effet renfort, plutôt décrit par une loi de mélange.

En théorie de la percolation, les grandeurs physiques décrites suivent des lois de puissance en fonction du taux de charge au voisinage du seuil de percolation, contrairement aux lois de mélanges qui donnent généralement des variations plutôt linéaires. Des résultats expérimentaux peuvent en première approximation et juste au-dessus du seuil de percolation être ajustés selon la relation suivante [14], [15] :

$$E' \approx (V_f - V_c)^\beta \quad (\text{IV.4})$$

avec V_f la fraction volumique des nanocharges, V_c la fraction volumique critique, pour laquelle on obtient la percolation. Dans la théorie, β est un exposant critique universel, c'est-à-dire indépendant du facteur de forme des nanocharges (pour des facteurs de forme inférieurs à environ 100) et de la nature de la matrice. Sa valeur nous renseigne sur la dimensionnalité du réseau percolant : l'exposant β est universel pour une dimensionnalité donnée. Pour un réseau percolant tridimensionnel, l'exposant critique devrait être égal à environ 1.3. Cette valeur est rapportée dans la littérature et caractérise par exemple le comportement du module en cisaillement des oxydes poreux en fonction de leur porosité [16], le comportement des modules élastiques des matériaux rocheux en fonction de la densité des craquelures qu'ils contiennent [17], ou encore le comportement du module de Young des pastilles de lactose en fonction de leur densité [15].

Cependant, dans notre cas il est impossible d'effectuer un ajustement exponentiel des valeurs du module E' en fonction de la quantité de nanofibres, car nous n'avons que 3 points expérimentaux au-dessus du seuil de percolation. Par conséquent, nous ne pouvons pas obtenir la valeur de l'exposant β qui pourrait nous renseigner sur la dimensionnalité du réseau percolant dans nos hydrogels nanocomposites.

4.2.2. La loi de mélange

On l'a évoqué précédemment, une autre grande catégorie de modèles pour décrire les milieux hétérogènes est basée sur un milieu effectif dont les caractéristiques sont obtenues par des lois de mélange. Il est à noter ici, que même si il y a transition de percolation, les lois de milieux effectifs sont celles qui s'appliquent loin du seuil de percolation, en dehors du régime de validité des lois de puissance.

Le modèle le plus simple considère qu'un matériau composite est constitué d'une matrice polymérique (dans notre cas l'hydrogel d'HPMC-Si pur), dont la fraction volumique est V_m , et de charges (nanofibres de silice), qui occupent la fraction volumique V_f . Le volume total est donc $V_{total} = V_m + V_f$. En supposant que la compression exercée sur le matériau composite reste dans le régime du comportement linéaire (élasticité linéaire) et qu'il y a une affinité parfaite entre la matrice et les charges, il est possible d'écrire pour le module élastique :

$$E' = E'_f V_f + E'_m V_m \quad (IV.5)$$

Comme déjà mentionné, cette loi fournit des variations de propriétés à peu près linéaires avec le taux de charges. Cependant, cette loi de mélange n'est valable que pour les matériaux composites dont les charges sont alignées. Or, la distribution des nanofibres dans les hydrogels nanocomposites est sans doute aléatoire. Pour de tels matériaux, la loi des mélanges a été modifiée [18]:

$$E' = E'_m (1 - V_f) + \eta_0 E'_f V_f \left[1 - \frac{\tanh \frac{\beta l}{2}}{\frac{\beta l}{2}} \right] \quad (IV.6)$$

Il s'agit de la relation de Cox-Krenchel [19], [20], valable pour des fibres courtes. Elle contient le facteur de correction pour la dispersion aléatoire des charges η_0 (en 3D, $\eta_0 = 0.2$) et le facteur de correction pour des charges sous forme de fibres courtes de longueur l . Le facteur β peut s'exprimer comme :

$$\beta = \frac{1}{r} \sqrt{\frac{E'_m}{E'_f (1 + \nu) \ln\left(\frac{\pi}{4V_f}\right)}} \quad (IV.7)$$

où r est le rayon d'une fibre et ν est le coefficient de Poisson. $\nu = 0.28$ pour la silice mésoporeuse « bulk » [21]. Les modules E'_m et E'_f sont respectivement les modules en compression de la matrice et des charges. A l'échelle locale, on considère que les nanofibres de silice ont un comportement élastique et un module en compression proche

de celui de la silice mésoporeuse « bulk », $E'_f = 101 \text{ MPa}$ [21]. Le module de la matrice est le module de compression de l'hydrogel d'HPMC-Si pur est de 6.45 kPa.

Avec la relation Cox-Krenchel, nous pouvons calculer les valeurs théoriques du module en compression de nos hydrogels nanocomposites. Elles sont présentées et comparées aux valeurs expérimentales obtenues avec les nanofibres de facteur de forme 20 sur la figure IV.10.

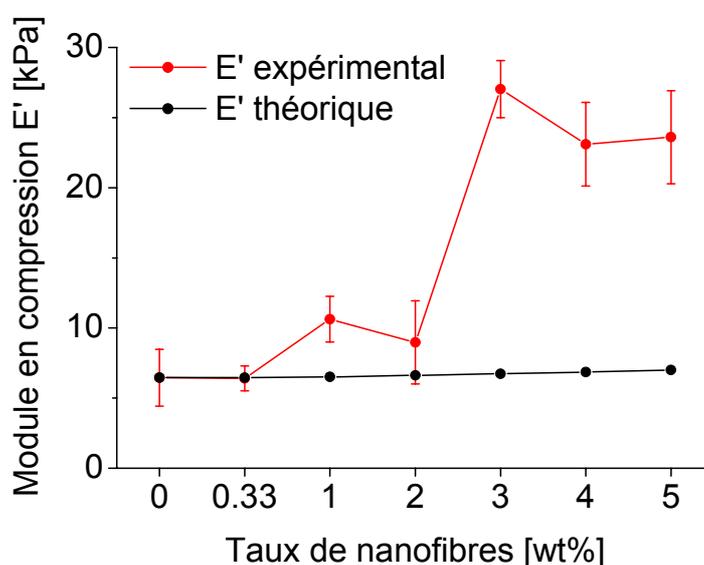


Figure IV.10 : Comparaison des valeurs expérimentales du module en compression des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs ($f = 20$) avec des valeurs théoriques calculées selon la relation Cox-Krenchel.

On peut constater que cette loi de mélange permet de décrire correctement les résultats expérimentaux en dessous de 2 wt% de NFs (au-dessous du seuil de percolation). Ceci signifie en particulier que l'effet de renfort est simplement assuré par addition des contributions individuelles des nanofibres. Par contre, on constate un écart très important au-dessus de 2 wt% de nanofibres. Cet écart est dû à la « connectivité » du réseau de fibres, connectivité confortée par la véritable liaison chimique entre fibres et matrice. Nous entrons alors dans un régime où c'est la théorie de la percolation qui s'applique.

4.3. Relaxation de la contrainte

Pour évaluer la rigidité/l'élasticité des hydrogels nanocomposites, ils ont été soumis au test de relaxation de la contrainte. Comme pour l'hydrogel d'HPMC-Si pur, nous avons imposé une déformation de 10 % de la hauteur des hydrogels et mesuré l'évolution de la contrainte pendant 10 minutes à 23 °C. Tous les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-L.

Nous pouvons considérer que les hydrogels nanocomposites ont également un comportement viscoélastique. Par conséquent, la forme de la courbe montrant la relaxation de la contrainte en fonction du temps $F(t)$ devrait avoir la même forme que celle observée pour l'hydrogel d'HPMC-Si pur. La force maximale nécessaire pour imposer la déformation exprime la rigidité de l'échantillon, tandis que la différence entre la force maximale et le plateau après sa relaxation correspond à l'élasticité résiduelle de l'échantillon.

La figure IV.11 montre les courbes de la relaxation de la contrainte pour les différents hydrogels nanocomposites. Les valeurs de la force maximale et de l'élasticité résiduelle sont résumées pour tous les échantillons dans le tableau IV.3.

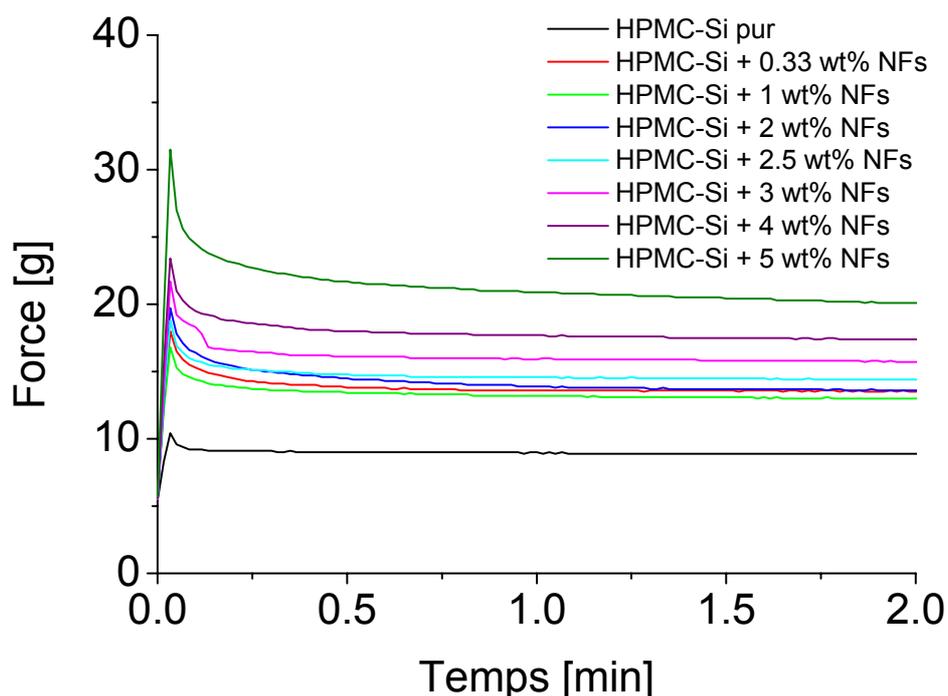


Figure IV.11 : Relaxation de la contrainte des hydrogels nanocomposites.

Tableau IV.3 : Force maximale nécessaire pour appliquer une déformation de 10 % de la hauteur des hydrogels nanocomposites et leur élasticité résiduelle.

	Force maximale [g]	Elasticité résiduelle [%]
HPMC-Si pur	10.4	14.4
HPMC-Si + 0.33 wt% NFs	18.0	25.0
HPMC-Si + 1 wt% NFs	16.8	22.6
HPMC-Si + 2 wt% NFs	19.7	31.0
HPMC-Si + 2.5 wt% NFs	18.8	23.4
HPMC-Si + 3 wt% NFs	21.7	27.6
HPMC-Si + 4 wt% NFs	23.4	25.6
HPMC-Si + 5 wt% NFs	31.5	36.2

Nous pouvons constater que la rigidité augmente pour les hydrogels contenant les nanofibres de silice. A 3 wt% de NFs, la force maximale est deux fois plus importante que dans le cas du gel pur et à 5 wt% de NFs la force est déjà trois fois supérieure à celle nécessaire pour une déformation identique de l'hydrogel pur. L'élasticité résiduelle, quant à elle, diminue avec la rigidité qui augmente, ce qui n'est pas étonnant. Nous avons donc réussi à améliorer la rigidité des hydrogels à base d'HPMC-Si en y rajoutant des nanofibres de silice.

4.4. Conclusion

Les études des propriétés mécaniques effectuées sur les hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs nous montrent que l'ajout de nanofibres de silice de facteur de forme 20 dans les hydrogels à base d'HPMC-Si accélère leur gélification et améliore leur résistance mécanique. Le temps de gel passe de 31 à environ 2 min avec seulement 3 wt% de NFs. En même temps, un tel hydrogel nanocomposite est à peu près deux fois plus rigide et son module élastique en compression est multiplié par quatre ($E' = 27.04(\pm 2.04) \text{ kPa}$) par rapport au module de l'hydrogel d'HPMC-Si pur ($E' = 6.45(\pm 2.03) \text{ kPa}$).

Même si nous avons réussi à améliorer la résistance mécanique des hydrogels d'HPMC-Si, les valeurs du module en compression n'atteignent toujours pas celles du cartilage articulaire natif. Cependant, elles pourraient être suffisantes pour une application en ingénierie tissulaire.

Les résultats de ces études nous montrent qu'il y a une interaction entre le polymère silanisé et les nanofibres de silice via les liaisons Si-O-Si. De plus, les nanofibres forment un réseau percolant pour un taux assez faible, situé entre 2 et 3 wt%. Cela indique que les nanofibres sont probablement bien dispersées au sein des hydrogels nanocomposites, mais aussi liées à la matrice. La dispersion va être étudiée dans le paragraphe suivant.

5. Caractérisation des hydrogels nanocomposites

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous allons nous intéresser d'abord à la dispersion des nanofibres de silice au sein des hydrogels nanocomposites. Ensuite, nous allons étudier la morphologie, l'état et la dynamique de l'eau dans ces hydrogels en nous appuyant sur les mêmes techniques de caractérisation que celles utilisées dans le cas de l'étude de l'hydrogel d'HPMC-Si pur.

5.1. Dispersion des nanofibres de silice

La dispersion des nanofibres de silice au sein des hydrogels nanocomposites a été étudiée grâce aux deux techniques basées sur la fluorescence. Pour cela, nous avons utilisé des nanofibres de silice dont la surface est fonctionnalisée avec des molécules de N-(triéthoxysilylpropyl)dansylamide, nommées NFs-dansyl (voir figure IV.12). Les groupements dansyls sont fluorescents et émettent une lumière dont la longueur d'onde se situe dans le jaune-vert (> 450 nm) après l'illumination dans l'UV (avec un maximum d'absorption à 222 nm).

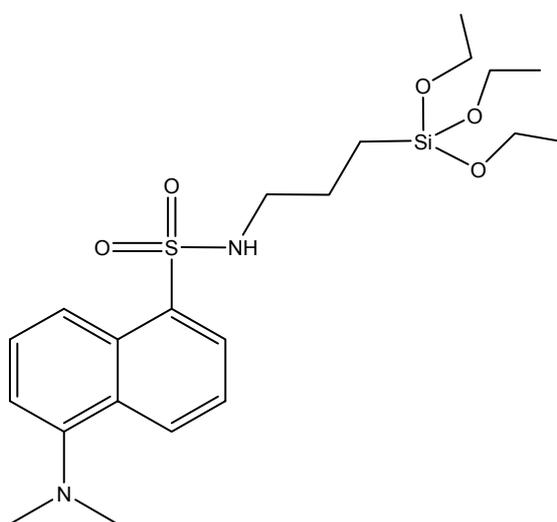


Figure IV.12 : Formule chimique de N-(triéthoxysilylpropyl)dansylamide.

La fonctionnalisation des nanofibres s'effectue directement lors de leur synthèse, en rajoutant l'alkoxysilyldansylamide dans le milieu réactionnel avec le précurseur de silice MPTMS. L'alkoxysilyldansylamide peut donc polycondenser avec les précurseurs de silice, laissant la fonction dansyl pendante sur la surface. Le taux de fonctionnalisation est de l'ordre de 10 mol%. C'est assez faible pour ne pas influencer le caractère hydrophile des nanofibres NFs-dansyl comparé aux NFs non-fonctionnalisées. Nous pouvons aussi considérer que l'ajout de telles nanofibres dans les hydrogels d'HPMC-Si n'a pas d'impact sur leur mécanisme de gélification. Même si la longueur des NFs-dansyl est plus courte, avec un facteur de forme moyen d'environ 6, cela n'affectera pas l'étude de leur dispersion.

5.1.1. Dispersion macroscopique

L'étude de la dispersion des nanofibres de silice à l'échelle macroscopique a été effectuée par microscopie en épifluorescence. Il s'agit d'une technique de microscopie optique qui permet d'observer la lumière émise par un échantillon fluorescent. Elle utilise un éclairage épiscopique, c'est-à-dire provenant du dessus de la surface de l'échantillon, et une détection de la fluorescence dans une configuration de type microscopie par réflexion. La microscopie en épifluorescence a été réalisée à l'IMN avec l'aide du Dr. P. Bertoncini sur microscope optique inversé Nikon Eclipse Ti-E équipé d'un objectif x10. La lumière excitatrice possède une longueur d'onde située entre 330 et 380 nm. La détection de la lumière émise a été faite grâce à un filtre passe-haut au-dessus de 450 nm. Tous les détails concernant cette étude sont indiqués en Annexe 3-N.

Dans des boîtes en polystyrène non-fluorescentes spécialement conçues pour l'étude de la fluorescence, quatre hydrogels d'HPMC-Si différents ont été préparés : un hydrogel d'HPMC-Si pur contenant un amas de NFs-dansyl laissé délibérément non-dispersé et trois hydrogels nanocomposites contenant respectivement 0.17, 0.33 et 1 wt% de NFs-dansyl dispersées.

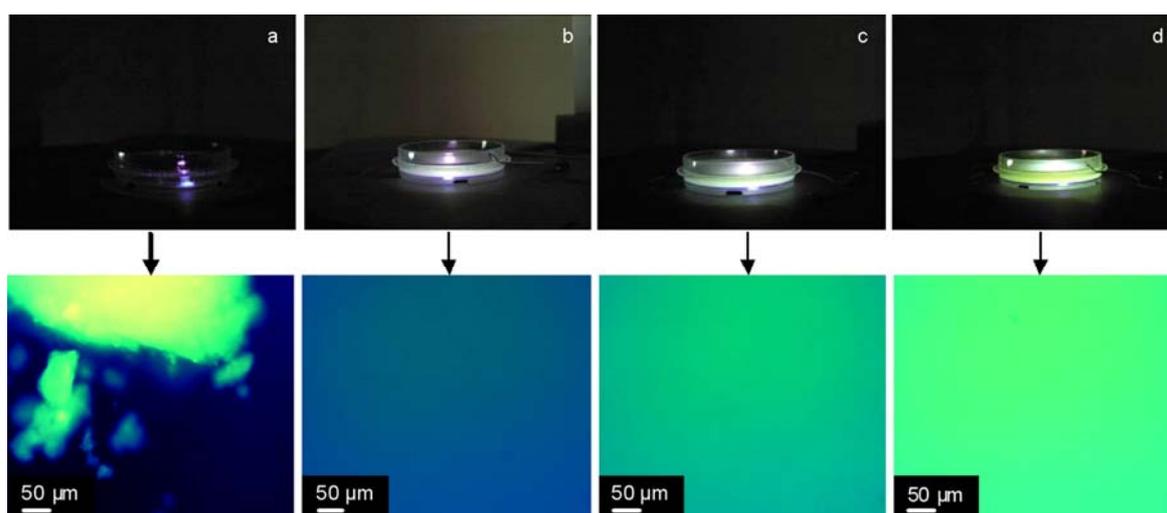


Figure IV.13 : Images des échantillons fluorescents sur le plateau du microscope en épifluorescence (en haut) avec la lumière détectée (en bas) ; (a) hydrogel d'HPMC-Si pur (couleurs foncées) contenant un amas de NFs-dansyl non-dispersé (couleurs jaune-vertes) ; (b), (c) et (d) hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs-dansyl contenant respectivement 0.17 wt%, 0.33 wt% et 1 wt% de NFs-dansyl dispersées.

Les images en haut de la figure IV.13 montrent les 4 échantillons fluorescents dans leur boîte sur le plateau du microscope lors de leur illumination. Nous pouvons remarquer que tout le volume de chaque hydrogel nanocomposite fluoresce (figures IV.13b-d), même si le faisceau de la lumière excitatrice est très fin. Ce n'est pas le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur contenant uniquement un amas de nanofibres (figure IV.13a), mettant bien en évidence que la fluorescence est uniquement due aux NFs-dansyl. La fluorescence de tout l'échantillon confirme la présence et donc la dispersion des nanofibres dans chaque hydrogel nanocomposite.

Les images en bas de la figure IV.13 montrent la fluorescence de nos échantillons. Ainsi, sur la figure IV.13a nous pouvons observer la différence entre l'hydrogel d'HPMC-Si, qui ne fluoresce pas (les zones foncées), et les agrégats de nanofibres fluorescents (les parties jaunes-vertes). Dans le cas des trois hydrogels nanocomposites (figures IV.13b-d), l'intensité de la lumière émise devient plus intense quand la quantité de nanofibres augmente, comme attendu. En effectuant plusieurs images dans le plan xy aussi bien qu'en profondeur z , nous constatons que l'intensité ne varie pas entre les différents points (x,y,z) au sein du même échantillon. Nous pouvons en conclure que les nanofibres sont effectivement bien dispersées dans tout le volume des hydrogels nanocomposites, à la sensibilité spatiale de cette technique près.

Cependant, il est important de noter que dans cette configuration la profondeur du champ de la fluorescence est de $z \pm 100 \mu m$. Cela implique que toutes les images présentées sur la figure IV.13 en bas sont en fait des projections en 2D des tranches d'environ $200 \mu m$ d'épaisseur dans le plan xy . Pour diminuer la profondeur du champ et pour obtenir plus d'information sur la dispersion des nanofibres au sein des hydrogels nanocomposites, nous nous sommes tournés vers la microscopie confocale.

5.1.2. Dispersion macroscopique tridimensionnelle

La microscopie confocale (CLSM de l'anglais *Confocal Laser Scanning Microscopy*) nous permet d'obtenir des images avec une très faible profondeur de champ, de l'ordre de quelques centaines de nanomètres. En effet, il est possible d'éliminer la

lumière provenant des plans hors du plan focal de l'objectif et d'obtenir une coupe optique nette correspondant uniquement au plan focal en plaçant un trou d'épingle (pinhole) devant le détecteur, dans le plan focal conjugué. Nous avons donc deux plans confocaux, d'où le nom de cette technique de microscopie. En faisant varier le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur $z \pm a \mu m$, nous pouvons réaliser une série d'images à partir desquelles il est possible de reconstituer la partie observée de l'échantillon en 3D.

La CLSM a été effectuée sur les mêmes hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs-dansyl que la microscopie en épifluorescence. L'étude a été menée à l'INRA de Nantes avec l'aide de Mme B. Bouchet sur le microscope Nikon Eclipse Ti-A1 équipé d'un objectif x40 à immersion dans l'eau. La lumière excitatrice de longueur d'onde $\lambda_{exc} = 375 \text{ nm}$ a été générée par une diode laser. La détection de la fluorescence a été faite grâce à un filtre passe-haut au-dessus de 400 nm. Pour obtenir la reconstitution tridimensionnelle d'un volume, une série d'images a été prise suivant l'axe z avec un pas de $0.5 \mu m$ et une profondeur du champ réglée à $0.66 \mu m$. Tous les paramètres expérimentaux sont détaillés en Annexe 3-O.

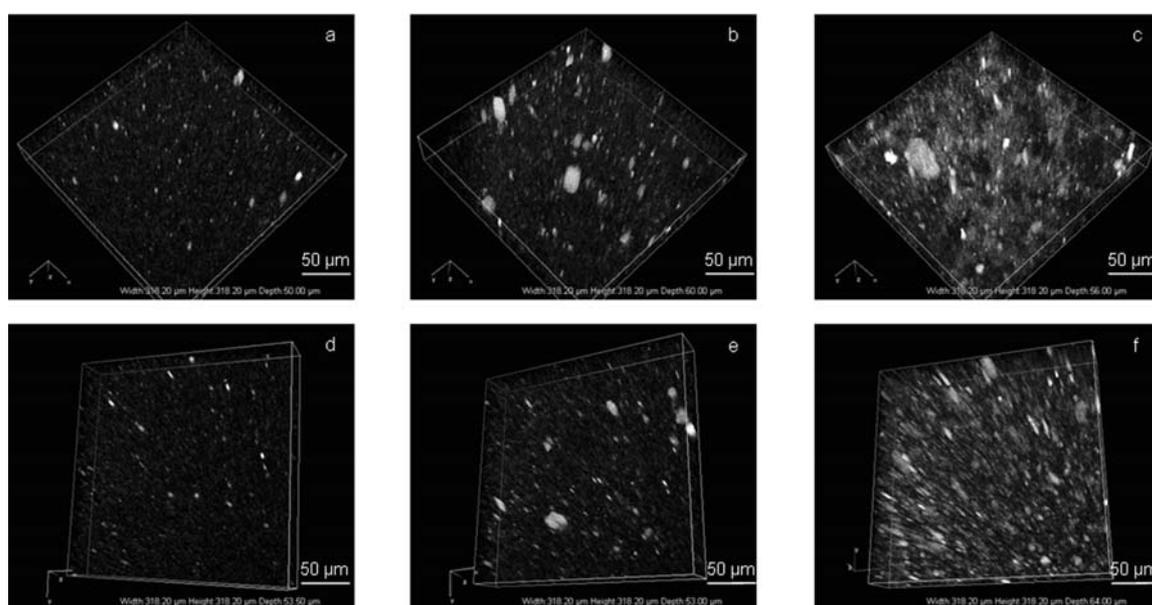


Figure IV.14 : Images CLSM montrant la reconstitution 3D des volumes proches de la surface supérieur (a)-(c) et inférieure (d)-(f) des hydrogels nanocomposites contenant : 0.17 wt% (a, d), 0.33 wt% (b, e) et 1 wt% (c, f) de NFs-dansyl.

Les reconstitutions 3D des volumes proches de la surface supérieure et inférieure de chacun des trois échantillons étudiés sont présentées sur la figure IV.14. Puisque la résolution latérale du microscope ne nous permet pas d'observer les nanofibres isolées, on ne peut pas dire si les points blancs représentent des amas de NFs-dansyl ou des NFs-dansyl isolées. Comme dans le cas de la microscopie en épifluorescence, la densité des points blancs augmente avec le taux de nanofibres. Nous pouvons constater que les nanofibres sont bien dispersées au sein des hydrogels nanocomposites. Cela valide l'efficacité de notre protocole de préparation des hydrogels nanocomposites : grâce à leur caractère hydrophile, les nanofibres de silice sont effectivement bien dispersées dans toute la solution TB et par la suite dans tout l'hydrogel. De plus, en comparant les images des volumes proches de la surface supérieure (en haut de la figure IV.14) et de la surface inférieure des échantillons (en bas), nous pouvons constater qu'il n'y a pas de sédimentation des nanofibres lors de la gélification. Cela est également cohérent avec des nanofibres en interaction avec le polymère.

5.2. Morphologie

Nous avons essayé d'étudier la morphologie des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs par microscopies AFM et MEB-environnemental. Malheureusement, comme dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, ces deux techniques ne nous ont fourni aucune image de la morphologie des hydrogels nanocomposites. Par conséquent, nous nous sommes tournés vers la microscopie électronique à balayage classique et en mode cryogénique, puis vers la diffusion des neutrons aux petits angles. Puisque un changement des propriétés mécaniques a été observé pour un taux de nanofibres situé entre 2 et 3 wt%, nous avons choisi d'étudier uniquement les hydrogels nanocomposites avec 1 et 3 wt% de NFs, c'est-à-dire avant et après le seuil de percolation.

5.2.1. Microscopie électronique à balayage

Après une congélation et lyophilisation des hydrogels nanocomposites à -20°C , nous avons observé leurs sections au microscope électronique à balayage classique (pour plus de détails voir Annexe 3-D). Les images typiques ainsi obtenues sont présentées sur

la figure IV.15. La figure IV.15a montre les nanofibres de silice seules, puis les figures IV.15b et c montrent les hydrogels nanocomposites avec 1 et 3 wt% de NFs respectivement.

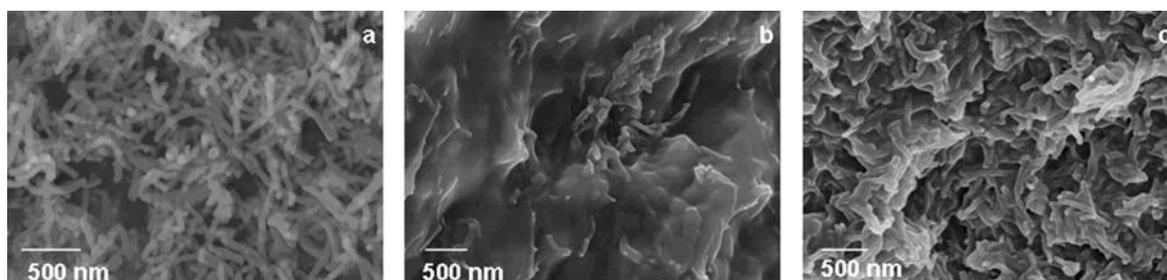


Figure IV.15 : Images MEB (a) des nanofibres de silice seules et (b,c) des hydrogels nanocomposites contenant respectivement 1 et 3 wt% de NFs.

Comme pour l'hydrogel pur, nous n'observons pas de structure poreuse. La morphologie des hydrogels nanocomposites est également détruite lors de la congélation et lyophilisation ordinaire. Mais nous pouvons néanmoins voir que les nanofibres sont bien incorporées dans la matrice polymère, ce qui confirme encore une fois l'existence de l'interaction entre les nanofibres de silice et le polymère silanisé. Malgré la présence des agrégats de NFs, ces derniers sont quand même bien dispersés au sein des échantillons. Nous avons donc la confirmation de la bonne dispersion des nanofibres, ou de petits agrégats, dans les hydrogels nanocomposites même à l'échelle nanométrique.

5.2.2. Cryo-microscopie électronique à balayage

La congélation des hydrogels nanocomposites dans l'azote pâteux et leur observation dans un cryo-MEB à -130 °C (voir Annexe 3-E) donne des images de la morphologie semblables à celles obtenues pour l'hydrogel d'HPMC-Si pur. Elles sont présentées sur la figure IV.16.

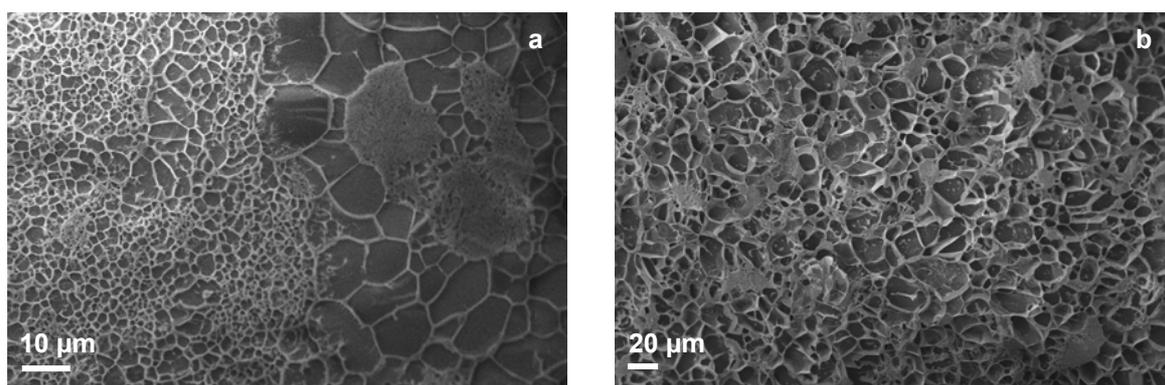


Figure IV.16 : Images cryo-MEB des hydrogels nanocomposites contenant (a) 1 wt% et (b) 3 wt% de NFs.

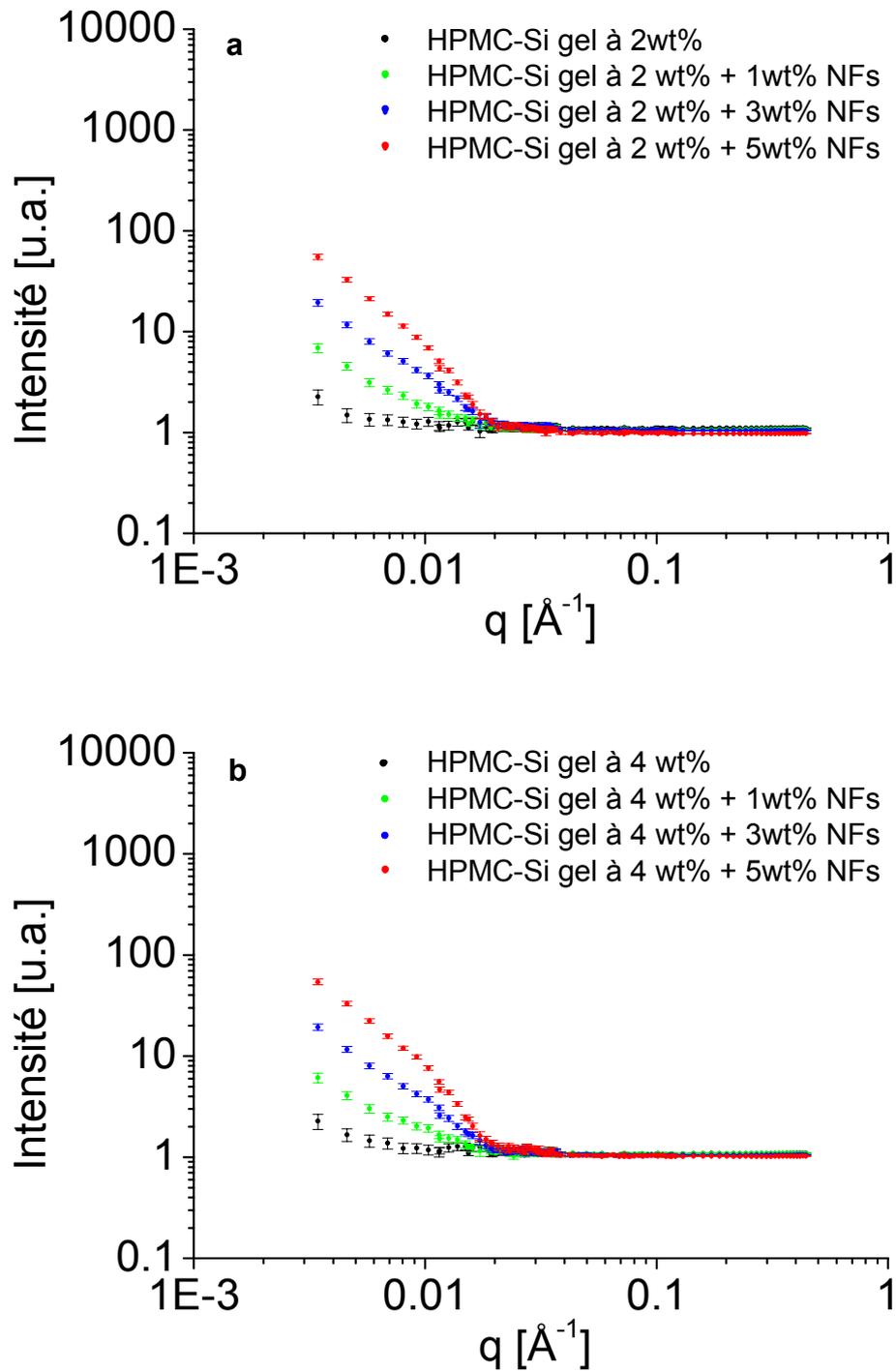
Nous pouvons voir une structure poreuse, avec une taille des pores d micrométrique dans les deux types d'hydrogels nanocomposites. L'épaisseur des parois de pores est également de l'ordre d'une centaine de nanomètres, comme dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur. Les nanofibres de silice sont présentes en paquets, mais ces paquets sont bien dispersés au sein des hydrogels nanocomposites.

Nous pouvons aussi constater que l'ajout des nanofibres de silice dans les hydrogels à base d'HPMC-Si n'affecte pas la taille de pores et l'épaisseur des parois de pores observées en cryo-MEB.

5.2.3. Evaluation du paramètre de maille par diffusion des neutrons aux petits angles

La diffusion de neutrons aux petits angles a été effectuée avec pour but de déterminer le paramètre de maille ξ des hydrogels nanocomposites. Comme dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, nous avons préparé deux séries d'échantillons, avec 2 ou 4 wt% d'HPMC-Si. A chaque concentration en polymère nous avons rajouté 1, 3 et 5 wt% de NFs. Tous les échantillons ont été préparés à la fois avec du D_2O , pour augmenter le contraste entre la solution deutérée et le polymère et les nanofibres de silice hydrogénés, et avec un mélange D_2O/H_2O (50 vol%/50 vol%). Ce dernier devrait permettre de supprimer le signal provenant des nanofibres de silice (voir Annexe 2-C) et de n'observer que le signal provenant du polymère. Les mesures SANS ont été faites de la même manière que pour les hydrogels d'HPMC-Si purs, pour plus de détails voir Annexe 3-F.

Les résultats SANS sont présentés sur la figure IV.17.



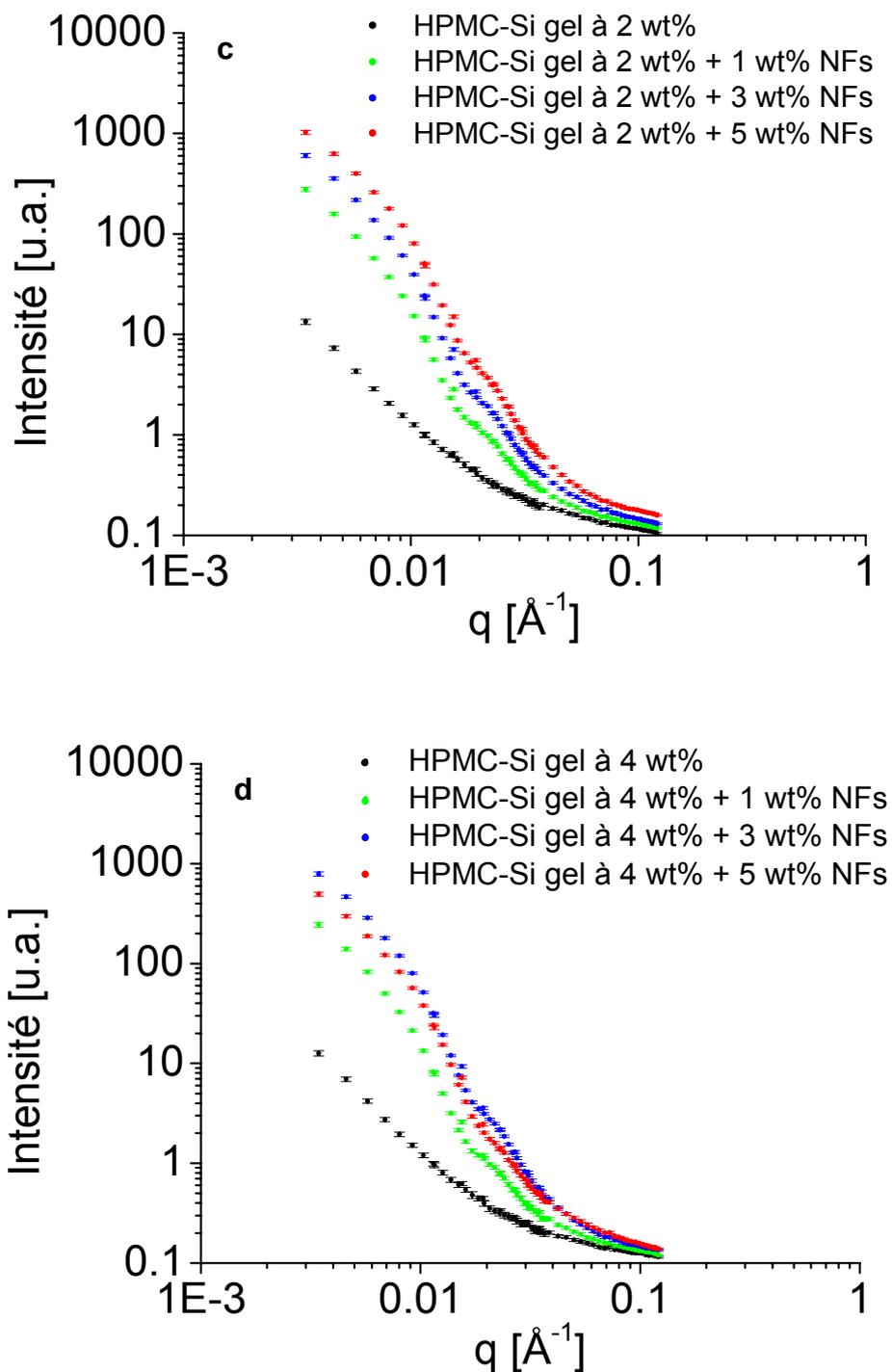


Figure IV.17 : Intensité diffusées en fonction de la valeur du vecteur de diffusion pour les hydrogels nanocomposites préparés en mélange D_2O/H_2O (50 vol%/50 vol%) (a,b) et en D_2O (c,d) à base de 2 wt% d'HPMC-Si (a,c) et 4 wt% d'HPMC-Si (b,d), contenant différents taux de nanofibres de silice.

Les figures IV.17a et b montrent l'intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion pour les hydrogels nanocomposites en mélange D_2O/H_2O . Nous pouvons voir

que l'intensité diffusée varie en fonction de la quantité de NFs. Elle est d'autant plus importante que la quantité de NFs est élevée. Il est donc évident que le signal détecté provient principalement des nanofibres de silice. La préparation des hydrogels nanocomposites en mélange D₂O/H₂O ne nous a pas permis de supprimer complètement leur signal, sans doute du fait d'un mauvais ajustement du rapport D₂O/H₂O. En effet, les proportions entre l'eau deutérée et hydrogénée devraient être plutôt 60 vol%/40 vol% pour obtenir l'extinction du signal de la silice (voir Annexe 2-C). De plus, nous pouvons remarquer qu'entre les deux séries d'hydrogels (à 2 et à 4 wt% d'HPMC-Si), à taux de nanofibres égal, l'intensité diffusée est identique. Nous n'observons donc pas la diffusion du polymère comme espéré initialement. Par conséquent, il est impossible de déterminer le paramètre de maille à partir de ces mesures.

Les figures IV.17c et d nous montrent la diffusion obtenue sur les hydrogels préparés en eau deutérée. La diffusion détectée devrait être dans ce cas liée à la fois aux nanofibres de silice et au polymère HPMC-Si. Cependant, ici encore, comme pour les mesures précédentes et comme dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, l'intensité ne varie pas en fonction de la quantité de polymère mais uniquement en fonction du taux de nanofibres de silice. Les courbes des hydrogels nanocomposites présentent trois signaux larges aux petits et moyens angles (q). Cela indique la présence d'une structure périodique au sein de ces hydrogels. Puisque leur intensité augmente avec le taux de NFs croissant, nous pensons que ces signaux larges sont liés aux nanofibres de silice, plus précisément à leur rayon. La longueur des nanofibres étant de l'ordre d'un micromètre, il s'agit d'un paramètre trop grand pour qu'il puisse être observé en diffusion des neutrons aux petits angles (voir figure I.5 dans le chapitre I). Un ajustement des données expérimentales a été effectué par Dr. D. Lairez en utilisant le facteur de forme d'un cylindre (voir Annexe 3-F). Nous retrouvons la valeur moyenne du rayon d'un cylindre $R = 20.8(\pm 0.7) \text{ nm}$, ce qui correspond très bien au rayon d'une nanofibre mesuré par MEB (environ 25 nm). Cela montre que les nanofibres ne sont pas alignées en fagots, mais sont orientées de manière aléatoire dans les hydrogels nanocomposites.

Par ailleurs, nous remarquons sur la figure IV.17d que l'intensité de diffusion de l'hydrogel contenant 5 wt% de NFs est inférieure à celle de l'hydrogel avec 3 wt% de

NFs. En reprenant la discussion concernant l'étude SANS du chapitre précédent, nous savons que l'intensité diffusée sur nos hydrogels d'HPMC-Si, indépendante de la quantité en polymère, doit être liée à la présence des microbulles. Ces microbulles apparaissent lors de la préparation des hydrogels et se retrouvent piégées à l'intérieur de ces derniers à cause de leur viscosité élevée. En rajoutant 5 wt% de NFs dans un hydrogel contenant déjà 4 wt% d'HPMC-Si, la viscosité augmente encore plus et rend la remontée des microbulles vers la surface des échantillons quasi impossible. Les microbulles peuvent par la suite être la source d'une diffusion neutronique et masquer le signal provenant du polymère et des nanofibres.

En conclusion, comme dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, l'étude SANS ne nous a pas fourni de valeur expérimentale d'un paramètre de maille des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs. L'ajout des nanofibres de silice rend les hydrogels encore plus difficiles à observer. Néanmoins, nous pensons que le paramètre de maille des hydrogels nanocomposites doit être égal ou inférieur à celui du gel pur, en fonction de la quantité de NFs, puisque les nanofibres de silice participent à la création du maillage d'HPMC-Si via les liaisons Si-O-Si, et donc que les hydrogels nanocomposites contiennent plus de points de réticulation. Cependant, il est impossible d'effectuer un calcul purement théorique du paramètre de maille à cause de l'importante distribution des points de réticulations possibles sur les nanofibres de silice de 1 μm de long. Le calcul de ζ à partir des mesures rhéologiques n'a pas encore été réalisé.

5.3. Etat et dynamique de l'eau

L'état et la dynamique de l'eau ont également été étudiés sur les hydrogels nanocomposites avant et après le seuil de percolation, c'est-à-dire avec 1 et 3 wt% de NFs. Nous avons fait appel aux mêmes techniques d'études que dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, à savoir l'analyse thermogravimétrique, la cryoporométrie et la RMN à gradient de champ pulsé.

5.3.1. Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique a été effectuée à l'IMN sur l'appareil Netzsch STA 449 F3 Jupiter. Les échantillons ont été chauffés sous air à partir de la température ambiante jusqu'à 300 °C à une vitesse de 5 °C.min⁻¹. Les courbes obtenues sur l'hydrogel d'HPMC-Si pur et sur les deux hydrogels nanocomposites sont présentées sur la figure IV.18.

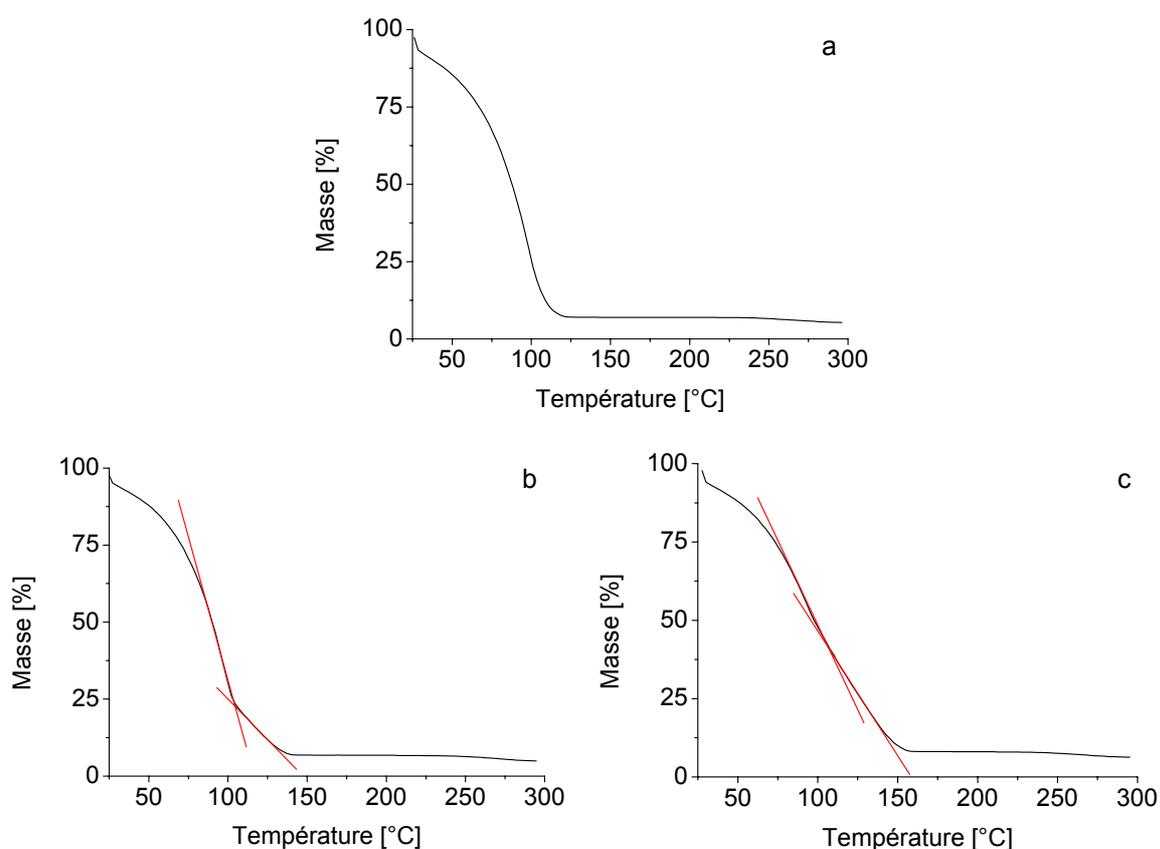


Figure IV.18 : Analyses thermogravimétriques de l'hydrogel d'HPMC-Si pur (a) et des hydrogels nanocomposites contenant 1 et 3 wt% de NFs (b,c).

La figure IV.18a montre l'évolution de la masse de l'hydrogel d'HPMC-Si pur en fonction de la température. Nous pouvons constater que l'hydrogel se déshydrate rapidement en chauffant jusqu'à environ 120 °C. La perte de masse à des températures supérieures à 240 °C correspond à la dégradation du polymère HPMC-Si.

La déshydratation des deux hydrogels nanocomposites, dont le comportement est présenté sur les figures IV.18b et c, s'effectuent en deux étapes, qui se manifestent par deux pentes différentes représentées par les tangentes rouges sur la figure. Pour les deux hydrogels nanocomposites, la première étape de déshydratation s'arrête à environ 100 °C. La deuxième déshydratation est plus lente avec une pente moins raide. Elle se termine à peu près vers 135 °C pour l'hydrogel nanocomposite contenant 1 wt% de NFs et elle continue jusqu'à environ 155 °C pour l'hydrogel avec 3 wt% de NFs.

Cette déshydratation plus lente peut être liée à la présence d'eau qui est en interaction avec la surface des nanofibres de silice, même au sein de leur mésoporosité. Les nanofibres sont hydrophiles, toute leur surface est naturellement recouverte de groupements hydroxyles pendants qui peuvent créer des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. L'évaporation de l'eau contenue dans la mésoporosité des nanofibres est donc retardée par rapport à l'évaporation de l'eau « bulk », ce qui se manifeste par une seconde pente plus douce de la courbe ATG. Comme la déshydratation des hydrogels nanocomposites dure plus longtemps quand la quantité de nanofibres augmente, cela justifie notre hypothèse.

Pour évaluer les proportions d'eau d'hydratation et d'eau « bulk » confinées au sein des hydrogels nanocomposites, nous avons effectué la cryoporométrie. De plus, une étude DSC est actuellement cours.

5.3.2. La cryoporométrie

La cryoporométrie a été réalisée par Dr. P. Judeinstein à l'ICCMO (Orsay) sur l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs préparé en eau deutérée. Après avoir été inséré dans un tube de RMN du liquide, l'échantillon a été rapidement refroidi de la température ambiante vers 220 K. Il a ensuite été chauffé à une vitesse plus lente (5-7 K.min⁻¹) jusqu'à 320 K. Une série de spectres RMN ¹H et ²H a été enregistrée au cours de la montée en température. Comme le signal détecté à chaque température provient uniquement des isotopes se trouvant en phase liquide, nous avons pu déterminer la transition de phase et les proportions d'eau d'hydratation ou d'interface, et d'eau

« bulk », ainsi que la dynamique de l'eau et du polymère dans cet hydrogel nanocomposite. Les résultats ainsi obtenus sont comparés à l'hydrogel d'HPMC-Si pur. Les détails concernant le principe de cette technique sont indiqués en Annexe 2-A, les détails expérimentaux se trouvent en Annexe 3-H.

Les deux séries de spectres RMN ^1H et ^2H sont présentées en fonction de la température sur la figure IV.19. Le pic dans les spectres ^2H (à environ 5.5 ppm) provient des atomes de deutérium présents dans la solution confinée dans l'hydrogel. Les spectres ^1H contiennent deux contributions : un premier pic à environ 5.5 ppm, lié à la présence d'une petite quantité de H_2O , et un deuxième pic vers 3.5 ppm, lié au polymère HPMC-Si hydrogéné. Les signaux provenant des molécules d'eau (hydrogénée ou deutérée) se retrouvent décalés d'environ 0.5 ppm vers les déplacements chimiques plus élevés comparé à l'hydrogel d'HPMC-Si pur, tandis que le signal du polymère est décalé d'à peu près 1 ppm vers les plus faibles déplacements chimiques. Ces différences sont sans doute liées à la présence des nanofibres de silice dans l'hydrogel.

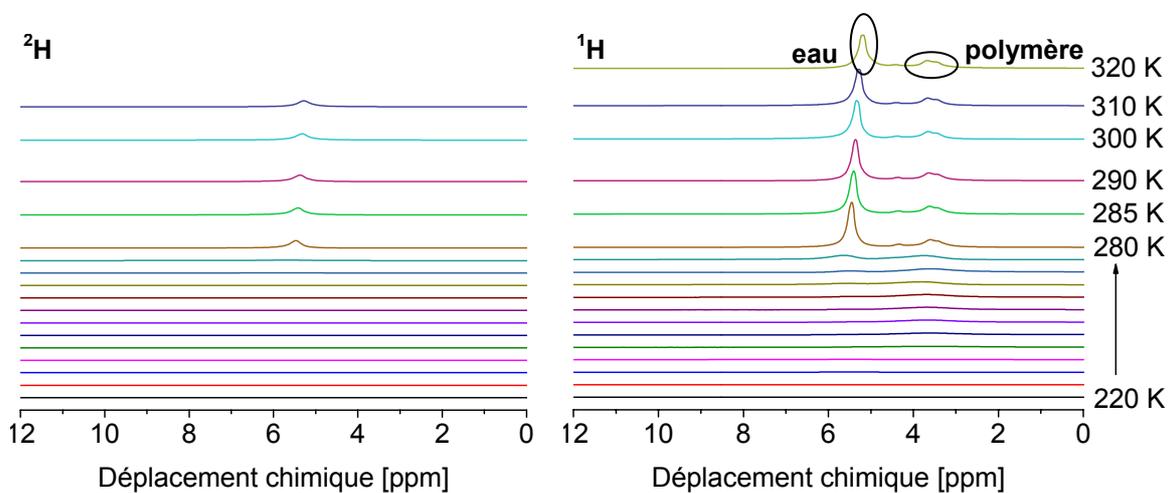


Figure IV.19 : Spectres RMN ^2H (à gauche) et ^1H (à droite) de l'hydrogel nanocomposite d'HPMC-Si + 3 wt% NFs en fonction de la température. Le pas de température entre 220 K et 280 K est de 5 K.

La figure IV.20 illustre le comportement de la solution deutérée confinée dans l'hydrogel nanocomposite et dans l'hydrogel sans nanofibres. Elle présente l'évolution de l'intensité des signaux dans les spectres ^2H des figures IV.19 et III.13 (chapitre III) en fonction de la température. Nous observons que la fusion de la solution « bulk » confinée

dans les deux types d'hydrogels se produit au même moment, c'est-à-dire entre 270 et 280 K. De plus, l'apparition de la solution en phase liquide (l'eau interfaciale d'hydratation) au sein de l'hydrogel nanocomposite a lieu également dès la première température mesurée (220 K). Mais le signal correspondant est tellement faible qu'il est difficile à intégrer. La quantité d'eau d'hydratation dans l'hydrogel nanocomposite à 220 K doit être inférieure à 1 wt%. C'est à peu près deux fois moins que dans le cas de l'hydrogel pur, où nous avons observé environ 2-3 wt% de solution en phase liquide à 220 K. La quantité d'eau d'hydratation augmente avec la température et juste avant la fusion de la solution « bulk », c'est-à-dire à 270 K. L'hydrogel nanocomposite contient entre 5 et 10 wt% d'eau d'hydratation. Cette quantité est toujours deux fois inférieure à celle observée dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur (10-20 wt%).

Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu par l'ATG, où nous avons vu que la quantité d'eau d'hydratation augmente après l'ajout de nanofibres de silice. Néanmoins, il faut rester prudent lors de l'interprétation des résultats de cryoporométrie. Les nanofibres de silice jouent le rôle d'impuretés dans les hydrogels d'HPMC-Si, de plus elles sont mésoporeuses, et par conséquent, il est difficile de comparer les effets observés avec le cas de l'hydrogel sans nanofibres.

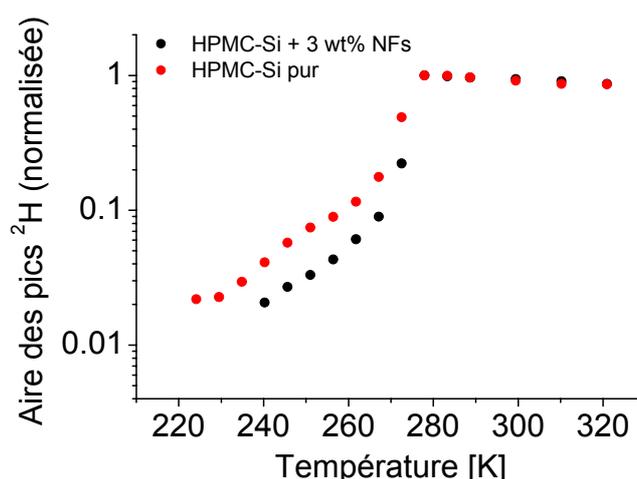


Figure IV.20 : Intégrales des spectres ^2H de la cryoporométrie (normalisées) en fonction de la température. Comparaison des données pour l'hydrogel d'HPMC-Si pur et pour l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs.

Le découplage de la dynamique des différentes composantes de l'hydrogel nanocomposite est présenté sur la figure IV.21. Celle-ci montre l'évolution des intensités dans les spectres ^1H et ^2H de la figure IV.19 en fonction de la température. Nous constatons que le comportement de la solution deutérée et hydrogénée est le même, exactement comme dans le cas de l'hydrogel pur. A basses températures, en dessous de la fusion de la solution « bulk », la dynamique du polymère HPMC-Si est également supérieure à celle de la solution. Comme déjà discuté dans le chapitre précédent, la dynamique du polymère est probablement liée aux mouvements des groupements fonctionnels et non pas de la chaîne principale. En résumé, nous pouvons dire que l'ajout des nanofibres de silice dans l'hydrogel d'HPMC-Si ne modifie pas la dynamique du polymère ni celle de la solution confinée à cette gamme de température observée.

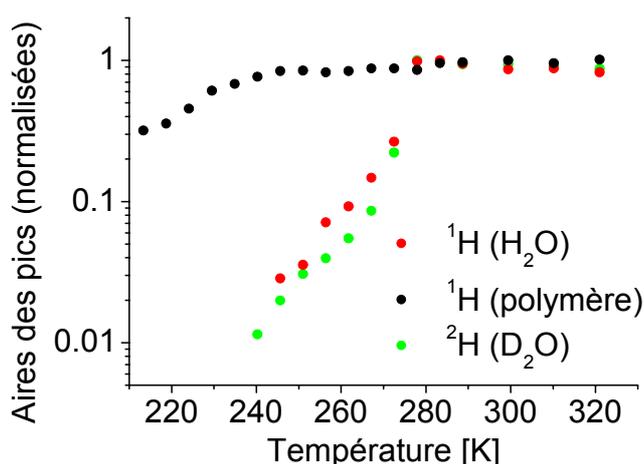


Figure IV.21 : Intégrales des spectres ^2H et ^1H de la figure IV.20 (normalisées) en fonction de la température pour l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs.

5.3.3. RMN à gradient de champ pulsé

La dynamique de l'eau dans les hydrogels nanocomposites a été étudiée en détails par la RMN à gradient de champ, c'est-à-dire à une échelle spatio-temporelle de l'ordre d'une dizaine de micromètres et des dizaines de millisecondes. Cette étude a également été faite par Dr. P. Judeinstein à l'ICCMO (Orsay) sur les hydrogels nanocomposites avec 1 et 3 wt% de NFs préparés avec de l'eau distillée. Les résultats ont été comparés à l'hydrogel d'HPMC-Si pur ainsi qu'à l'eau distillée. Le principe de cette technique est détaillé en Annexe 2-B et les détails expérimentaux sont indiqués en Annexe 3-J.

La figure IV.22 montre les spectres RMN ^1H de tous les échantillons étudiés en absence de gradient de champ et à 300 K. On peut constater que les signaux des hydrogels sont plus larges que celui de l'eau distillée, mais ceci est lié à la nature complexe et à la forme asymétrique des échantillons qui ne permet pas de réaliser une belle homogénéité du champ magnétique. L'intégration de chacun des spectres de cette figure constitue l'intensité de référence I_0 pour chaque échantillon donné.

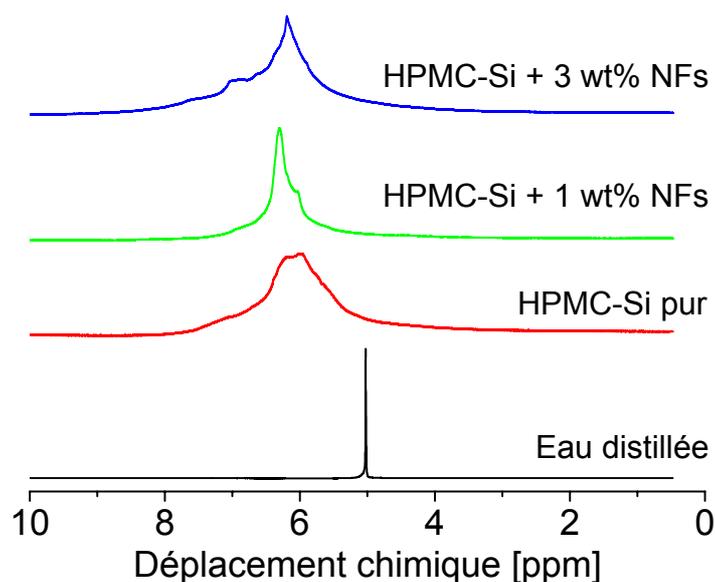


Figure IV.22 : Spectres RMN du liquide de ^1H de l'eau distillée et des différents hydrogels d'HPMC-Si à 300 K en absence des gradients.

En faisant varier la valeur du gradient de champ, nous avons pu enregistrer 16 spectres ^1H différents pour chaque échantillon. Les intégrations de ces spectres représentent des séries de données I . La figure IV.23 montre les dépendances $\ln(I/I_0)$ en fonction de la valeur du gradient de champ appliqué $\gamma^2 g_0^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ pour les quatre échantillons étudiés. Nous remarquons que tandis qu'une fonction monoexponentielle est suffisante pour bien décrire la dépendance $(I/I_0)(g_0)$ de l'eau distillée et de l'hydrogel pur, comme discuté dans le chapitre précédent, l'utilisation d'une fonction biexponentielle est nécessaire pour bien ajuster les données expérimentales dans le cas des hydrogels nanocomposites. Cela implique l'existence de deux coefficients de diffusion pour chaque hydrogel nanocomposite. Les valeurs de tous les coefficients de diffusion D sont rassemblées dans le tableau IV.4.

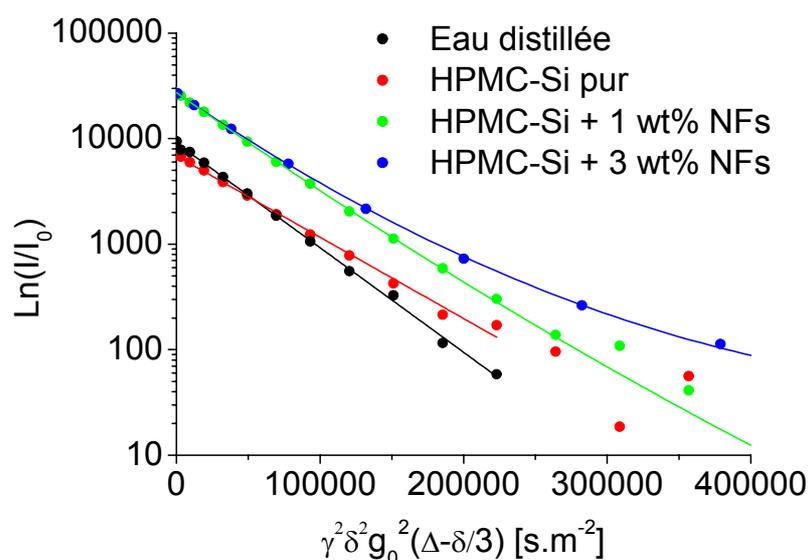


Figure IV.23 : Fits monoexponentiels des fonctions de diffusion des molécules d'eau dans l'eau distillée « bulk » et dans la solution confinée dans les différents hydrogels d'HPMC-Si.

Tableau IV.4 : Coefficients de diffusion des molécules d'eau dans l'eau distillée « bulk » et dans la solution aqueuse confinée dans les différents hydrogels d'HPMC-Si à 300 K. Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'HPMC-Si.

	Coefficient de diffusion D [$10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]
Eau distillée	2.26
HPMC-Si pur	1.88
HPMC-Si + 1 wt% NFs	2.28 (1.23)
HPMC-Si + 3 wt% NFs	2.70 (1.46)

Puisque les hydrogels nanocomposites présentent à cette échelle spatio-temporelle et à 300 K deux coefficients de diffusion différents, plusieurs explications sont possibles : les hydrogels peuvent contenir deux populations d'eau avec des diffusions isotropes différentes ; il peut y avoir aussi uniquement une seule population d'eau avec une diffusion anisotrope ; ou encore nous observons la diffusion isotrope d'une seule population d'eau et la dynamique du polymère. Il peut s'agir de cette dernière possibilité, car le déplacement chimique des espèces possédant le coefficient de diffusion plus faible est inférieur à celui de l'eau. Il semble donc que ce soit la dynamique du polymère, plus lente, qui soit décrite par les coefficients de diffusion plus faibles, indiqués dans le tableau IV.4 entre parenthèses. Cependant à ce stade, nous ne pouvons écarter la possibilité de diffusion d'eau au sein de la mésoporosité des NFs.

Les coefficients de diffusion de l'eau confinée dans les hydrogels nanocomposites sont supérieurs comparés à l'hydrogel d'HPMC-Si pur, et même légèrement supérieurs par rapport à l'eau distillée. La différence est d'autant plus grande que la quantité de nanofibres est élevée. Il est donc évident que l'ajout des nanofibres de silice améliore la diffusion des molécules d'eau confinée dans les hydrogels à base d'HPMC-Si.

5.4. Conclusion

En fonctionnalisant les nanofibres de silice avec des groupements dansyl fluorescents, nous avons pu étudier leur dispersion au sein des hydrogels nanocomposites. Les nanofibres peuvent être présentes en amas, mais ces derniers seraient bien dispersés dans tout le volume des hydrogels et ne sédimentent pas lors de la gélification. La bonne dispersion et non-sédimentation sont sans doute liées à l'interaction entre les nanofibres de silice et le polymère silanisé via les liaisons Si-O-Si. De plus, elles valident l'efficacité de notre protocole de préparation des hydrogels nanocomposites.

En ce qui concerne la morphologie de ces hydrogels, les observations en cryo-MEB nous ont démontré que l'ajout des nanofibres de silice ne modifie pas la taille de pores ni l'épaisseur de leurs parois. Cependant, la présence des nanofibres doit avoir un impact sur le paramètre de maille des hydrogels nanocomposites. La valeur du paramètre de maille n'a pas pu être évaluée expérimentalement : nous pensons qu'elle est inférieure à 10-20 nm, valeur trouvée par des calculs théoriques pour l'hydrogel d'HPMC-Si pur.

L'eau confinée dans les hydrogels nanocomposites se trouve également en deux états différents : l'eau « bulk » et l'eau d'hydratation. Cependant, pour le moment nous ne pouvons pas donner leurs proportions, car les deux techniques de caractérisations employées jusqu'à présent (ATG et cryoporométrie) nous ont fourni des résultats contradictoires. En effet, l'analyse thermogravimétrique indique que la quantité d'eau d'hydratation dans les hydrogels d'HPMC-Si augmente avec l'ajout de NFs, tandis que la cryoporométrie montre qu'il y a à peu près deux fois moins d'eau d'hydratation dans l'hydrogel contenant 3 wt% de NFs (5-10 wt%) que dans l'hydrogel pur (10-20 wt%).

L'étude DSC, qui est actuellement en cours, devrait nous rapporter plus de précisions sur ce sujet.

La dynamique de l'eau confinée dans les hydrogels nanocomposites est proche de celle de l'eau distillée « bulk », comme dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur. A 300 K et sur une grande échelle spatio-temporelle ($\sim 10 \mu\text{m}$ et $\sim 50 \text{ms}$), le coefficient de diffusion des molécules d'eau est même légèrement supérieur à celui de l'eau distillée « bulk » et cela d'autant plus que la quantité de nanofibres est élevée. Aux basses températures c'est la dynamique du polymère qui est plus importante que la dynamique des molécules d'eau, similairement aux observations faites sur l'hydrogel d'HPMC-Si pur.

6. Conclusion

Dans le but d'améliorer les propriétés mécaniques des hydrogels à base d'HPMC-Si, nous avons réussi à préparer les hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs en rajoutant des nanofibres de silice mésoporeuses à des concentrations allant jusqu'à 5 wt%. La synthèse de ces hydrogels s'effectue suivant un protocole similaire à celui de la préparation de l'hydrogel d'HPMC-Si pur. Les nanofibres étant hydrophiles, elles sont rajoutées dans la solution tampon acide et facilement dispersées grâce aux ultrasons. Après le mélange avec la solution basique du polymère, les solutions précurseurs des hydrogels nanocomposites restent injectables. Lors de leur gélification les nanofibres ne sédimentent pas. Elles peuvent se trouver en amas, mais ces amas de NFs sont bien dispersés dans tout le volume du gel final. Cela valide l'efficacité de notre protocole de préparation de ces hydrogels nanocomposites.

L'hydrogel nanocomposite contenant seulement 3 wt% de NFs de facteur de forme 20 présente des propriétés mécaniques supérieures comparées à celles de l'hydrogel d'HPMC-Si pur. Il est plus rigide et son module en compression est de $27.04(\pm 2.04)$ kPa, c'est-à-dire plus que 4 fois supérieur au module en compression de l'hydrogel pur qui est égal à $6.45(\pm 2.03)$ kPa. De plus, il gélifie 15 fois plus vite comparé au gel sans nanofibres. Tous ces résultats prouvent que les nanofibres participent à la formation de la matrice de l'hydrogel en créant les ponts Si-O-Si avec le polymère silanisé. Puisque le changement

des propriétés mécaniques intervient entre 2 et 3 wt% de NFs, nous pouvons dire que les nanofibres forment un réseau percolant au sein de l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs.

La morphologie des hydrogels nanocomposites semble d'être similaire à celle de l'hydrogel sans nanocharges, avec une taille de pores micrométrique et une épaisseur de parois de l'ordre d'une centaine de nanomètres. Cependant, nous pensons que le paramètre de maille doit être plus faible comparé à l'hydrogel non chargé, parce que les nanofibres participent à la formation du maillage. En l'absence d'une valeur expérimentale, nous pouvons estimer par raisonnement sur le nombre de points de réticulation potentiels que le paramètre de maille doit être inférieur à 10-20 nm.

L'eau confinée dans les hydrogels nanocomposites se trouve également sous deux formes : l'eau d'hydratation et l'eau « bulk ». Leurs proportions respectives ont pour le moment été évaluées uniquement par cryoporométrie. Il s'avère que l'ajout de 3 wt% de NFs diminue environ deux fois la quantité d'eau d'hydratation (5-10 wt%) par rapport au gel sans nanofibres (10-20 wt%), alors qu'on pourrait s'attendre à l'effet inverse à cause du caractère hydrophile des nanofibres. Sachant que les résultats de la cryoporométrie sont délicats à interpréter, parce que les hydrogels nanocomposites sont des systèmes plus complexes, d'autres techniques de caractérisations sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

En ce qui concerne la dynamique de l'eau dans les hydrogels nanocomposites, elle est améliorée par la présence des nanofibres de silice. Avec 3 wt% de NFs, le coefficient de diffusion des molécules d'eau $D = 2.70 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, mesuré à 300 K et sur une grande échelle spatio-temporelle ($\sim 10 \mu\text{m}$ et $\sim 50 \text{ms}$), est même légèrement supérieur à celui des molécules d'eau distillée « bulk » $D = 2.26 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. A cette température, les molécules d'eau diffusent donc librement au sein des hydrogels nanocomposite sur des longueurs, dans des directions aléatoires, allant jusqu'à $10 \mu\text{m}$. Ceci confirme l'hypothèse concernant la taille de pores micrométrique des hydrogels nanocomposites.

Toutes les principales caractéristiques physico-chimiques de l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs sont résumées dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5 : Résumé des principales caractéristiques physico-chimiques de l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs. Les quantités d'eau « bulk » et d'eau d'hydratation sont indiquées juste avant la fusion de l'eau « bulk » selon les résultats de cryoporométrie.

Paramètre de maille ξ	$\leq 10\text{-}20$ nm
Taille de pores d	~ 10 μm
Épaisseur des parois de pores	~ 100 nm
Quantité d'eau « bulk »	90-95 wt%
Quantité d'eau d'hydratation	5-10 wt%
Coefficient de diffusion D de l'eau « bulk » sur 10 μm et 50 ms à 300 K	2.70×10^{-5} $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Temps de gel t_g à 23 °C	2(\pm 1) min
Module en compression E'	27.04(\pm 2.04) kPa

Même si les propriétés mécaniques de ce nanocomposite ne sont pas encore comparables à celles du cartilage articulaire natif, elles peuvent être suffisantes pour une application en ingénierie tissulaire en tant que support temporaire pour des cellules précurseurs du cartilage. En offrant aux cellules un milieu favorable pour leur prolifération et différenciation, nous pouvons espérer d'obtenir une reconstitution complète du cartilage. Pour qu'ils puissent être injectés dans le corps humain, il est nécessaire que les hydrogels nanocomposites soient également biocompatibles. Des essais préliminaires de leur cytotoxicité ont déjà été effectués et les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

Références bibliographiques

- [1] Rederstorff, E.; Weiss, P.; Sourice, S.; Pilet, P.; Xie, F.; Sinquin, C.; Collic-Jouault, S.; Guicheux, J.; Laïb, S., An in vitro study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, (5), 2119-2130.
- [2] Xie, F.; Weiss, P.; Chauvet, O.; Le Bideau, J.; Tassin, J., Kinetic studies of a composite carbon nanotube-hydrogel for tissue engineering by rheological methods. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2010**, 21, (4), 1163-1168.
- [3] Rambaud, F.; Vallé, K.; Thibaud, S.; Julián-López, B.; Sanchez, C., One-Pot Synthesis of Functional Helicoidal Hybrid Organic-Inorganic Nanofibers with Periodically Organized Mesoporosity. *Advanced Functional Materials* **2009**, 19, (18), 2896-2905.
- [4] Rambaud, F. Elaboration de matériaux hybrides par procédé sol-gel pour application pile à combustible PEMFC. *Thèse de doctorat*, Université Pierre et Marie Curie, CEA, Paris, **2011**.
- [5] Yang, S.; Zhao, L.; Yu, C.; Zhou, X.; Tang, J.; Yuan, P.; Chen, D.; Zhao, D., On the Origin of Helical Mesostructures. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, (32), 10460-10466.
- [6] Levental, I.; Georges, P. C.; Janmey, P. A., Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* **2007**, 3, (3), 299-306.
- [7] Mansour, J. M., Biomechanics of cartilage. In *Kinesiology: the Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*, Oatis, C. A., Ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, **2003**; pp 66-79.
- [8] 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. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2001**, 12, (6), 573-579.
- [9] Zallen, R., *The physics of amorphous solids*. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1998**.

- [10] Brandon, D.; Kaplan, W. D., *Microstructural Characterization of Materials*. 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, **2008**.
- [11] De, S. K.; White, J. R., *Short Fibre-Polymer Composites*. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, **1996**.
- [12] Fu, S.-Y.; Feng, X.-Q.; Lauke, B.; Mai, Y.-W., Effects of particle size, particle/matrix interface adhesion and particle loading on mechanical properties of particulate-polymer composites. *Composites Part B: Engineering* **2008**, 39, (6), 933-961.
- [13] Ahmed, S.; Jones, F. R., A review of particulate reinforcement theories for polymer composites. *Journal of Materials Science* **1990**, 25, (12), 4933-4942.
- [14] Kirkpatrick, S., Percolation and Conduction. *Reviews of Modern Physics* **1973**, 45, (4), 574.
- [15] Leuenberger, H.; Ineichen, L., Percolation theory and physics of compression. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **1997**, 44, (3), 269-272.
- [16] Kováčik, J., Correlation between shear modulus and porosity in porous materials. *Journal of Materials Science Letters* **2001**, 20, (21), 1953-1955.
- [17] Davis, P. M.; Knopoff, L., The elastic modulus, percolation, and disaggregation of strongly interacting, intersecting antiplane cracks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, (31), 12634-12639.
- [18] Wang, J.; Wu, D.; Li, X.; Zhang, M.; Zhou, W., Poly(vinylidene fluoride) reinforced by carbon fibers: Structural parameters of fibers and fiber-polymer adhesion. *Applied Surface Science* **2012**, 258, (24), 9570-9578.
- [19] Cox, H. L., The elasticity and strength of paper and other fibrous materials. *British Journal of Applied Physics* **1952**, 3, (3), 72.
- [20] Krenchel, H. Theoretical and practical investigation of the elasticity and strength of fiber-reinforced material. Akademisk Forlag, Copenhagen, **1964**.
- [21] Puchegger, S.; Brandhuber, D.; Hüsing, N.; Peterlik, H., Changing poisson's ratio of mesoporous silica monoliths with high temperature treatment. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2006**, 352, (50-51), 5251-5256.

Chapitre V

Étude de la cytotoxicité

1. Introduction

Les hydrogels nanocomposites d'HPMC-Si sont développés pour servir comme de nouveaux biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Un biomatériau est, selon la définition la plus courante, un matériau non vivant, d'origine naturelle ou synthétique, utilisé dans un dispositif médical à des fins thérapeutiques ou non, et destiné à interagir avec des systèmes biologiques [1]. Pour une mise en application dans le domaine médical il est nécessaire de déterminer le niveau de biocompatibilité de chaque nouveau biomatériau développé.

La biocompatibilité est la capacité d'un matériau à remplir une fonction spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte, tout en ne dégradant pas le milieu biologique auquel il est destiné. Il ne s'agit surtout pas d'une simple tolérance à un matériau, parce que la biocompatibilité englobe toutes les réponses de l'organisme à la mise en place d'un tel matériau. Elle ne peut donc pas être évaluée par un test unique. La biocompatibilité doit être évaluée par une série de tests donnés par une norme ISO 10993.

La séquence des tests à réaliser pour définir la biocompatibilité d'un matériau est la suivante [2] :

- Essais primaires (génétoxicité *in vitro*, cancérogénicité et reproduction *in vivo*, hémolyse *in vitro*, toxicité systémique *in vivo*, cytotoxicité *in vitro*)
- Essais secondaires (irritation muqueuse *in vivo*, irritation cutanée *in vivo*, sensibilisation *in vivo*, implantation *in vivo*)
- Essais d'utilisation chez l'animal, dans les conditions normales d'utilisation du biomatériau
- Essais cliniques chez l'homme

Suivant l'application visée, le biomatériau doit subir uniquement certains de ces essais. De manière générale, les tests *in vitro* ont l'avantage d'être plus rapides, moins onéreux et plus reproductibles. Ils permettent également d'évaluer séparément les effets biologiques de chacun des composants du matériau. En revanche ces tests sont souvent

trop sensibles et n'ont que peu de rapport avec la réalité en clinique. Les tests *in vivo*, quant à eux, sont beaucoup plus proches de la clinique : ils permettent d'évaluer les effets d'un matériau loin de l'organe cible, la toxicité des métabolites (les produits de dégradation d'un biomatériau peuvent être dangereux) et ils facilitent l'interprétation des résultats. Par contre, si ces tests sont réalisés sur des animaux, il y a le risque que l'animal, même choisi à dessein, ne présente pas de réaction biologique assez proche de celle l'espèce humaine. L'inconvénient majeur des tests *in vivo* est leur longue durée, et par conséquent un coût important. Les effets néfastes peuvent aussi parfois passer inaperçus s'ils ne sont pas recherchés.

Le but de cette thèse n'était pas de faire l'évaluation complète de la biocompatibilité des hydrogels nanocomposites d'HPMC-Si. Toutefois, nous avons voulu évaluer au moins leur cytotoxicité par un essai primaire *in vitro*. Le préfixe « cyto- » provient du mot grec *kytos* (cellule). La cytotoxicité est donc la toxicité d'un matériau vis-à-vis des cellules. C'est la capacité du matériau à altérer et éventuellement détruire les cellules. Un test de cytotoxicité consiste en une étude de la viabilité cellulaire *in vitro* où les cellules et les échantillons sont mis en contact direct. Nous avons réalisé cette étude sur deux types de cellules : les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux hASC et une lignée cellulaire de chondrocytes humains SW1353. Chaque essai a été effectué en deux configurations : en 2D (cellules déposées sur une surface plane avec l'échantillon par dessus) et en 3D (cellules mélangées au sein de chaque échantillon).

Une lignée cellulaire est une famille distincte de cellules provenant de la même souche et génétiquement identiques à cette souche. Il s'agit d'une population de cellules capables de se diviser un grand nombre de fois en culture tout en conservant les mêmes caractéristiques que leur cellule d'origine, cette dernière ayant été isolée d'un tissu et d'un organisme particulier. L'utilisation des cellules provenant d'une lignée cellulaire permet d'avoir une source de cellules illimitée et d'obtenir des résultats reproductibles rapidement et à faible coût. Cependant, même si ces cellules sont faciles à cultiver et disponibles partout dans le monde, les techniques de culture cellulaire doivent être maîtrisées afin d'éviter toute contamination. Puisque les hydrogels nanocomposites d'HPMC-Si ont été synthétisés pour une application potentielle en ingénierie tissulaire du cartilage, les

cellules de la lignée cellulaire cancéreuse du cartilage humain SW1353 ont d'abord été choisies pour l'étude de cytotoxicité. Ces cellules sont souvent utilisées pour les études concernant les inflammations articulaires et la dégénération du cartilage [3].

Les cellules primaires différenciées ou non (souches) sont, contrairement à une lignée cellulaire, plus proches des réelles cellules cibles. Les cellules souches sont des cellules indifférenciées qui ont une capacité à engendrer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire. Les cellules souches provenant du tissu adipeux humain (hASC) font partie des cellules souches mésenchymateuses [4]. Contrairement aux cellules souches provenant de la moelle osseuse, les hASCs ont l'avantage d'être plus abondantes [5]. La cytotoxicité des hydrogels nanocomposites a également été testée sur les cellules souches hASC.

Les études de cytotoxicité ont été effectuées et leurs résultats évalués au laboratoire LIOAD par Dr. G. Réthoré et Dr. C. Boyer avec l'aide de Dr. J. Guicheux et Dr. C. Vinatier. Tous les détails expérimentaux sont présentés en Annexe 4.

2. Cytotoxicité en 2D

Cette configuration a permis d'étudier la cytotoxicité des hydrogels nanocomposites au contact avec des cellules fixées sur une surface plane. La viabilité ainsi que la prolifération cellulaire ont été vérifiées après 1, 2, 3 et 6 jours d'incubation des cellules en contact avec les échantillons. Quatre exemplaires de chaque échantillon ont été préparés pour chaque temps d'observation afin d'obtenir une statistique significative des résultats. Les cellules seules, en milieu de culture mais sans présence d'hydrogel, ont également été cultivées comme contrôle positif de leur viabilité et prolifération. Les cellules cultivées en présence de l'actinomycine D ont servi de contrôle négatif. L'actinomycine D est un composé chimique qui se lie spécifiquement à l'ADN cellulaire et inhibe ainsi l'action de l'ARN polymérase – la transcription de l'information génétique. De ce fait, il induit la mort des cellules.

La viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant une solution de MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) couramment employée en biologie pour tester la viabilité cellulaire. Le sel de tétrazolium se réduit en présence des enzymes mitochondriales des cellules vivantes en formazan, qui forme un précipité violet dans les mitochondries. La quantité de ce précipité est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes et à leur activité métabolique. Un simple dosage de la densité optique par spectroscopie optique permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement.

La prolifération (multiplication) cellulaire s'exprime généralement en nombre absolu de cellules vivantes à un temps donné. Le nombre total de cellules dans un échantillon comprend les cellules vivantes et les cellules mortes. Celles-ci peuvent être mises en évidence par l'utilisation du bleu de trypan, un colorant qui marque uniquement les cellules mortes. En fait, il ne peut pénétrer à l'intérieur de la cellule et donc ne la colorer que si sa membrane est abîmée, ce qui est justement le cas des cellules mortes.

Le résultat de l'étude du nombre de des cellules SW1353 vivantes en présence des hydrogels nanocomposites est présenté sur la figure V.1. Tout d'abord, un contrôle positif a consisté à vérifier l'activité mitochondriale des cellules seules. La densité optique, et par conséquent l'activité mitochondriale, augmente naturellement au cours du temps d'incubation. Les cellules seules restent donc bien vivantes et elles se multiplient. En revanche, le contrôle négatif montre qu'en présence d'actinomycine D les cellules SW1353 meurent au fur et à mesure du temps. En prenant en compte les écarts types, on peut considérer qu'il n'y a plus de cellules vivantes au bout de 24 h d'incubation.

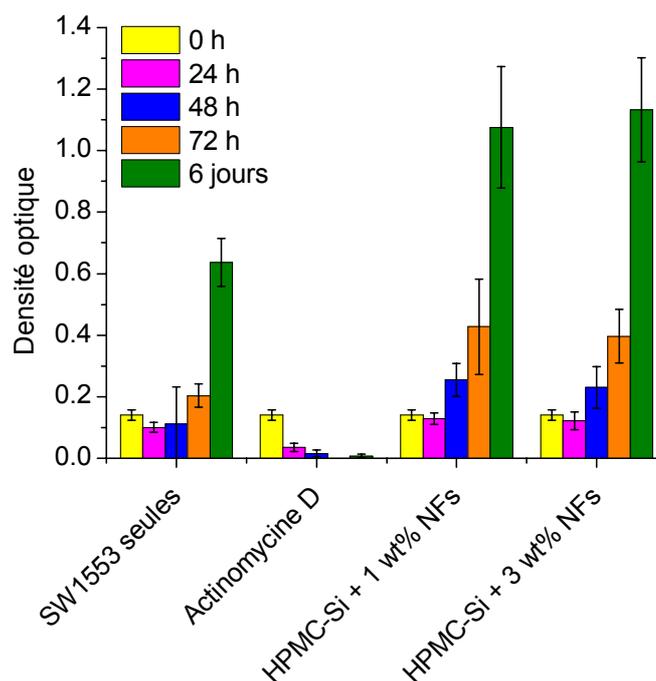


Figure V.1 : Nombre de cellules SW1353 vivantes en 2D exprimé en densité optique après 1, 2, 3 et 6 jours d'incubation au contact avec les hydrogels nanocomposites.

Dans le cas où les cellules SW1353 sont cultivées en présence des hydrogels nanocomposites contenant 1 et 3 wt% de NFs, on observe également une augmentation du nombre de cellules vivantes au cours du temps comme pour les cellules seules. Les hydrogels contenant jusqu'à 3 wt% de nanofibres de silice ne présentent donc pas de toxicité pour les cellules du cartilage humain. De plus, comparé à la culture des cellules seules, on peut dire que l'augmentation du nombre de cellules vivantes est encore plus prononcée en présence des hydrogels nanocomposites. Ceci laisse penser qu'il y a un effet bénéfique des hydrogels nanocomposites. Cependant, étant donné nos barres d'erreurs, cet effet n'est pas très marquant.

L'évolution de la prolifération des cellules SW1353 au contact avec les hydrogels nanocomposites est présentée sur la figure V.2. Comme attendu, le nombre absolu de cellules vivantes augmente au cours du temps aussi bien pour les cellules cultivées seules qu'en présence des deux hydrogels nanocomposites. Quant aux cellules en contact avec l'actinomycine D, leur nombre diminue rapidement et après 1 jour de culture, il ne reste plus aucune cellule vivante. Ceci confirme les résultats de l'activité mitochondriale où on a pu observer la non toxicité des hydrogels nanocomposites jusqu'à 3 wt% de NFs de

silice. Il est clair qu'on ne peut pas réellement parler d'un effet bénéfique des nanocomposites, étant donné les barres d'erreurs importantes là encore. Inversement, la non-toxicité des hydrogels nanocomposites pour des cellules de la lignée cellulaire SW1353 du cartilage humain est bien prouvée.

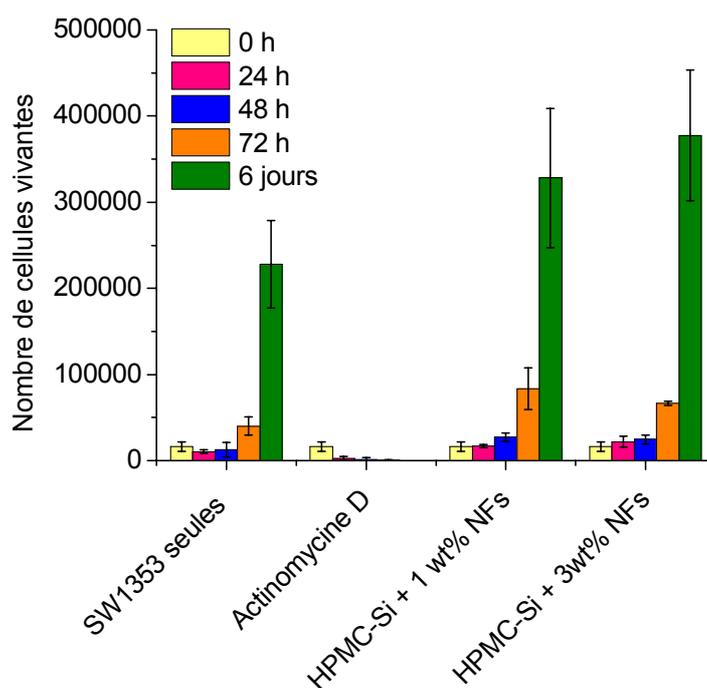


Figure V.2 : Prolifération des cellules SW1353 en 2D exprimée en nombre absolu de cellules vivantes après 1, 2, 3 et 6 jours d'incubation au contact avec les hydrogels nanocomposites.

Suite à la non-toxicité des hydrogels nanocomposites par rapport aux cellules SW1353 nous avons souhaité tester également la cytotoxicité des nanofibres de silice seules. Les recherches se focalisent de plus en plus sur la toxicité des nano-objets à cause du développement important des nanomatériaux ces dernières années. Les nanotubes de carbone en particulier se trouvent dans le collimateur des chercheurs et leur toxicité a déjà été beaucoup étudiée [6]. La toxicité d'autres types de nanocharges commencent aussi à être vérifiée, comme c'est le cas des nanocharges de silice [7]. Il a ainsi été démontré, que la cytotoxicité des nanocharges dépend non seulement du type cellulaire, mais également du facteur de forme des nano-objets, de leur porosité et de leurs propriétés de surface. Il est alors important d'étudier chaque type de nanocharges avec un type de cellules donné au cas par cas.

La prolifération des cellules SW1353 au contact avec les nanofibres de silice, dispersées dans le milieu de culture aux mêmes concentrations que dans les hydrogels nanocomposites, est présentée sur la figure V.3. Malheureusement, il faut constater que le nombre de cellules vivantes n'augmente pas en présence des NFs seules au cours du temps. Au contraire, la mortalité cellulaire est élevée, d'un niveau comparable à celui observé en présence d'actinomycine D. Les nanofibres de silice seules sont donc toxiques pour les cellules SW1353. Ceci est probablement lié à leur très petite taille à cause de laquelle les NFs pénètrent la membrane cellulaire et influencent ainsi le comportement des cellules jusqu'à provoquer leur mort.

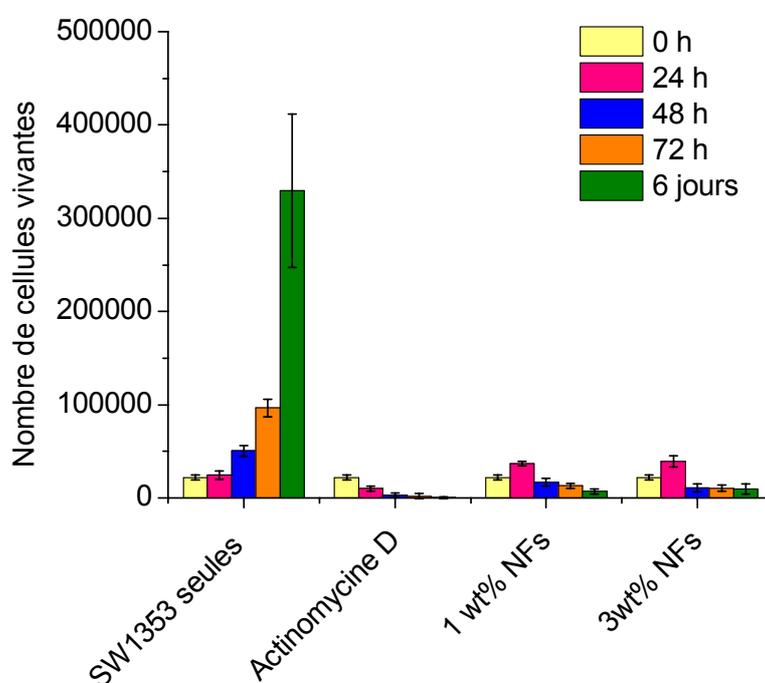


Figure V.3 : Prolifération des cellules SW1353 en 2D exprimée en nombre absolu de cellules vivantes après 1, 2, 3 et 6 jours d'incubation au contact avec les NFs de silice.

Cette étude montre toutefois, qu'une fois les nanofibres incorporées dans les hydrogels, elles perdent leur caractère cytotoxique, puisque les hydrogels nanocomposites ne présentent pas de toxicité vis-à-vis des cellules SW1353. Ces résultats confirment notre hypothèse faite au chapitre IV selon laquelle il y a immobilisation des NFs au sein des hydrogels grâce à la formation des liaisons Si-O-Si entre les fibres et le polymère silanisé. Cette immobilisation empêcherait la migration et la pénétration des nanocharges dans les

cellules et rend donc les hydrogels nanocomposites non-toxiques et mécaniquement plus résistants en même temps.

Après cette étude sur la lignée cellulaire SW1353, nous avons aussi testé la prolifération des cellules souches du tissu adipeux hASC au contact avec les hydrogels nanocomposites. Les résultats de cette étude sont présentés sur la figure V.4. Le nombre de cellules vivantes à chaque temps d'incubation donné a été comparé au nombre obtenu avec les cellules cultivées seules. Les résultats sont donc exprimés en pourcentages et les cellules cultivées seules restent par conséquent toujours à 100 %.

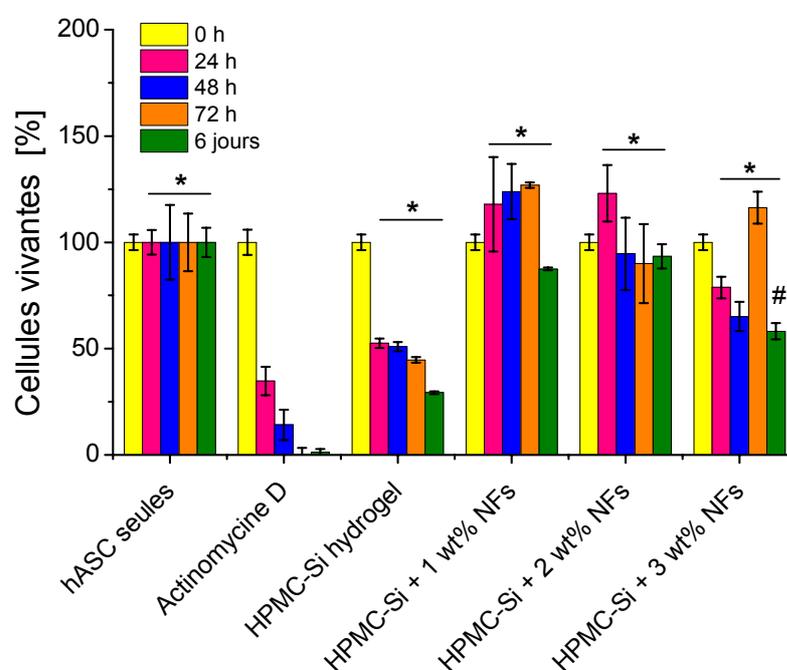


Figure V.4 : Prolifération des cellules hASC en 2D exprimée en % des cellules vivantes (par rapport au nombre de cellules seules à chaque temps donné) après 1, 2, 3 et 6 jours d'incubation au contact avec les différents hydrogels. * : différence significative par rapport au cas des cellules avec l'actinomycine D ; # : différence significative par rapport au cas des cellules seules.

La présence d'actinomycine D conduit à une diminution rapide du nombre des cellules vivantes : on passe de 100% à 35%, 14% et moins de 2% pour des temps allant respectivement de 0 à 1 jour, 2 jours et 3 jours ou au-delà. Autrement dit, ce contrôle négatif montre bien que les cellules hASC meurent au bout de 2 jours. Dans le cas de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, on peut observer une légère diminution de la prolifération

cellulaire (de l'ordre de 70% à 6 jours par rapport aux cellules seules). En présence de fibres, on constate aussi une légère diminution de quelques dizaines de pourcent, avec des résultats qui restent néanmoins supérieurs à ceux obtenus pour l'hydrogel seul. On en conclut donc que les cellules restent vivantes en présence d'hydrogels nanocomposites contenant jusqu'à 3 wt% de nanofibres sur toute la période d'incubation étudiée et que les hydrogels nanocomposites ne présentent pas de toxicité marquée pour les cellules souches hASC.

3. Cytotoxicité en 3D

La configuration en 3D consiste en un mélange homogène des cellules au sein d'un échantillon. Elle permet d'évaluer la capacité des hydrogels nanocomposites à supporter la prolifération des cellules en 3 dimensions. Comme dans l'étude précédente, la prolifération cellulaire a été vérifiée après 1, 2, 3 et 6 jours d'incubation des cellules au sein des échantillons. Quatre exemplaires de chaque échantillon ont été préparés pour chaque temps d'observation afin d'obtenir une statistique correcte des résultats.

La viabilité cellulaire ne peut pas être évaluée de la même manière qu'en 2D car il est impossible de séparer le gel et les cellules pour les marquer. Le marquage des cellules vivantes et mortes se fait ici directement à l'intérieur de chaque échantillon à l'aide d'un kit Live&Dead® basé sur le principe de la fluorescence. Le kit Live&Dead® contient deux marqueurs fluorescents : la calcéine-AM et l'éthidium homodimère-1. La calcéine-AM pénètre la membrane cellulaire des cellules vivantes. Une fois à l'intérieur, elle est hydrolysée par l'enzyme estérase en forme anionique (calcéine), qui ne peut plus sortir de la cellule et se trouve piégée dans le cytoplasme. Cette forme fluoresce fortement dans le vert avec un maximum d'émission vers 515 nm. L'éthidium homodimère-1 ne passe, quant à lui, qu'à travers des membranes cellulaires abîmées, celles des cellules mortes. Il se fixe à l'ADN dans le noyau de ces dernières et fluoresce dans le rouge avec un maximum à 617 nm. Ce colorant n'est pas très fluorescent tant qu'il n'est pas lié à l'ADN. Les cellules ainsi colorées sont observées en diffusion de lumière en microscopie confocale (CLSM). On peut observer les deux types de cellules (vivantes et mortes) avec

la même longueur d'onde excitatrice car les deux colorants ont des bandes d'absorption qui se chevauchent vers 490 nm.

Les images CLSM effectuées sur les échantillons contenant des cellules SW1353 sont résumées sur la figure V.5.

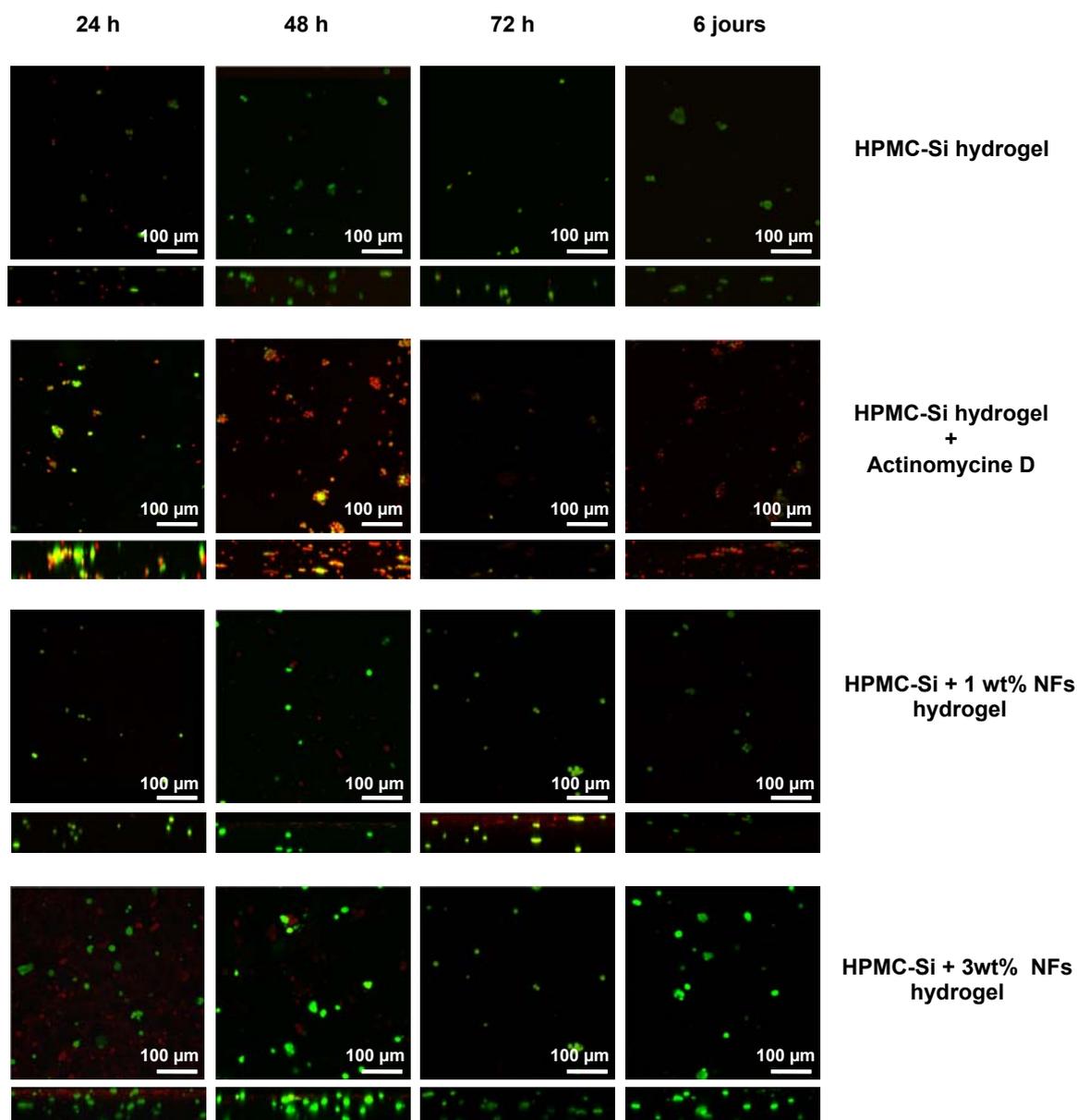


Figure V.5 : Images CLSM des cellules SW1353 au sein de l'hydrogel d'HPMC-Si pur, avec l'actinomycine D et des hydrogels nanocomposites contenant 1 et 3 wt% de NFs. Les images ont été prises aux 4 temps d'incubation différents et après le marquage Live&Dead® : les cellules vivantes sont marquées en vert, les cellules mortes en rouge. Chaque grand carré représente une image dans le plan xy , tous les petits rectangles sont des sections en xz .

Les cellules ont été mélangées avec le gel d'HPMC-Si pur, avec le gel d'HPMC-Si additionné d'actinomycine D, puis avec deux gels d'HPMC-Si avec des concentrations de nanofibres de 1 et 3 wt%. Les cellules vivantes sont représentées par les spots verts, quant aux cellules mortes elles sont en rouge. Les images montrent que les cellules prolifèrent bien dans le gel pur. Leur prolifération se fait en amas. En présence d'actinomycine D et au bout de 24 h, on n'observe que des spots rouges représentant les cellules mortes comme prévu. Dans le cas des hydrogels nanocomposites, le nombre de points verts ne diminue pas au cours du temps. Les cellules restent vivantes, de plus elles prolifèrent en amas. Cet essai en 3D confirme donc la non toxicité des hydrogels nanocomposites contenant jusqu'à 3 wt% de NFs vis-à-vis des cellules de la lignée cellulaire du cartilage humaine SW1353.

La toxicité des hydrogels nanocomposites par rapport aux cellules souches du tissu adipeux humain hASC a également été testée en 3D. Les résultats sont présentés sur la figure V.6. Les cellules ont été mélangées avec le gel d'HPMC-Si additionné d'actinomycine D, avec d'HPMC-Si pur, ainsi qu'avec trois gels d'HPMC-Si avec des concentrations de nanofibres de 1, 2 et 3 wt%. Leur viabilité a été observée 1, 2, 3 et 6 jours après leur mise dans les gels, comme pour toutes les études précédentes.

Encore une fois, on constate une bonne viabilité cellulaire en présence de tous les hydrogels, avec ou sans nanofibres, et une mortalité élevée en présence d'actinomycine D. Les cellules prolifèrent en amas au sein des hydrogels. Les hydrogels nanocomposites ne présentent visiblement pas de toxicité pour les cellules souches hASC.

Ces résultats de la cytotoxicité en 3D semblent confirmer encore une fois qu'il y a bien une immobilisation chimique des NFs de silice au sein des hydrogels nanocomposites via les liaisons Si-O-Si avec le polymère d'HPMC-Si. Par conséquent, on n'observe pas leur déplacement et pénétration dans les cellules qui se traduirait par une mortalité de cellules élevée. Cela donne de bons espoirs pour la mise en application de ces nouveaux biomatériaux à base de polysaccharide silanisé et renforcé.

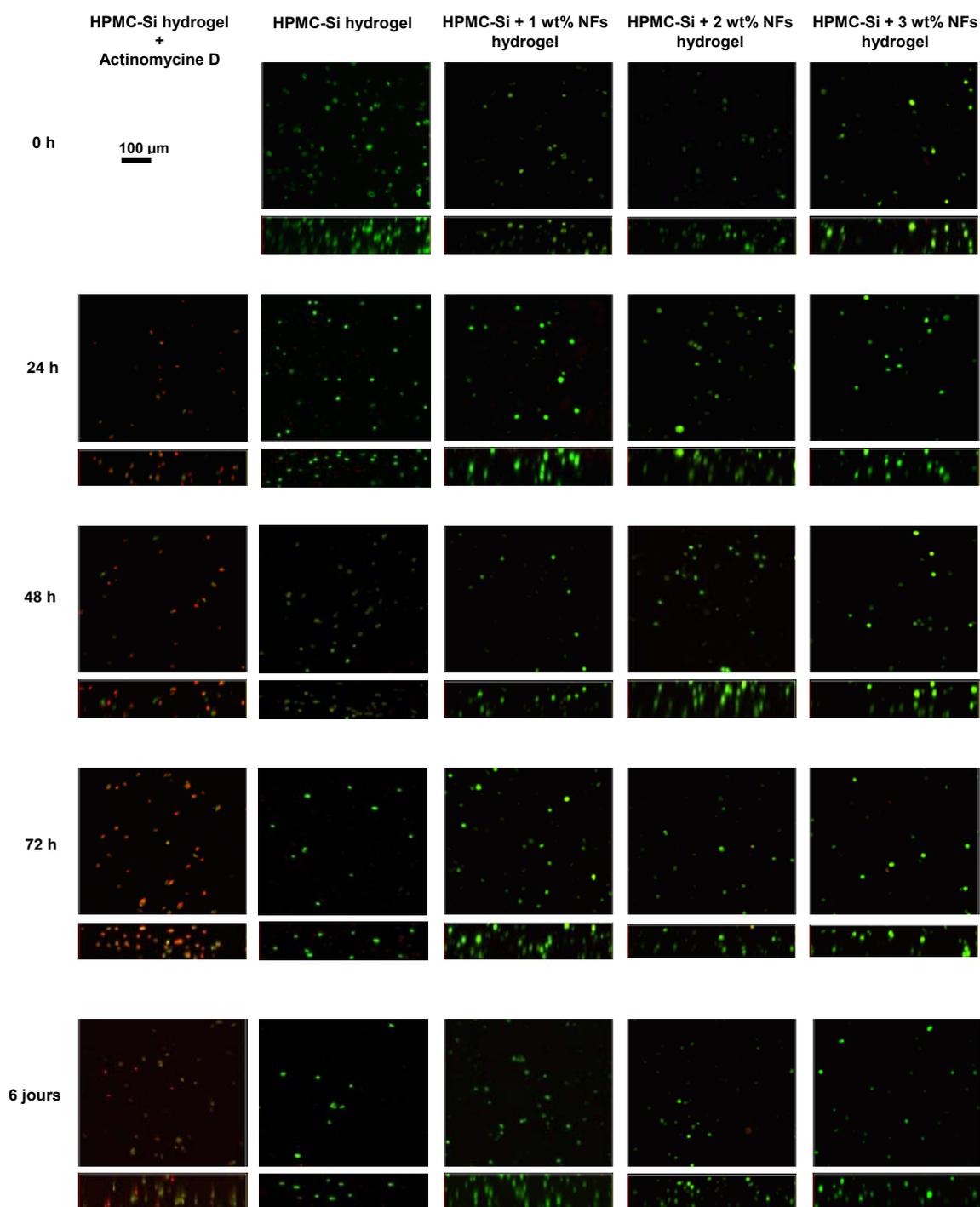


Figure V.6 : Images CLSM des cellules hASC au sein de l'hydrogel d'HPMC-Si pur et des hydrogels nanocomposites contenant 1, 2 et 3 wt% de NFs de silice. Les images ont été prises aux 4 temps d'incubation différents et après le marquage Live&Dead® : les cellules vivantes sont marquées en vert, les cellules mortes en rouge. Chaque grand carré représente une image dans le plan xy , tous les petits rectangles sont des sections en xz .

4. Conclusion

L'étude de la cytotoxicité des hydrogels nanocomposites à base d'HPMC-Si a été réalisée sur deux types de cellules : la lignée cellulaire SW1353 qui sont des cellules cancéreuses du cartilage humain et les cellules souches du tissu adipeux humain hASC. Les études ont été menées en deux configurations : en 2D, avec des hydrogels se trouvant sur les cellules, puis en 3D, avec les cellules mélangées à l'intérieur des hydrogels. Puisque les hydrogels nanocomposites présentent un changement des propriétés mécaniques entre 2 et 3 wt% de NFs de silice, nous avons choisi d'étudier les hydrogels contenant jusqu'à 3 wt% de NFs.

Les résultats de cytotoxicité en 2D montrent qu'il n'y a aucune influence des hydrogels nanocomposites sur le comportement des deux types de cellules. Ceci a été confirmé par l'étude en 3D, qui a mis en évidence la bonne viabilité cellulaire et la prolifération des cellules en amas au sein des hydrogels. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de tester la différenciation des cellules souches en chondrocytes, qui est une étape clé pour l'ingénierie tissulaire du cartilage.

Néanmoins, nous avons confirmé que les hydrogels nanocomposites n'ont pas d'influence négative sur le comportement de deux types de cellules humaines et on peut considérer qu'ils ne sont pas toxiques pour elles. Au contraire, les nanofibres de silice seules induisent la mort des cellules SW1353 ; à l'heure actuelle, la cytotoxicité avec les cellules souches hASC n'a pas été évaluée. Ces résultats confirment notre hypothèse sur l'immobilisation des nanofibres de silice au sein des hydrogels nanocomposites via les liaisons Si-O-Si entre les NFs et le polymère silanisé. Pour continuer à approuver le caractère biocompatible de ces hydrogels nanocomposites, il est nécessaire de poursuivre l'étude en mode *in vivo* sur les animaux.

Pour la suite, il serait également intéressant de profiter de la mésoporosité et de la grande surface spécifique des NFs pour essayer d'y introduire des principes actifs ou des facteurs de croissance pour la prolifération et la différenciation cellulaire. Les molécules actives pourraient être relarguées au fur et à mesure une fois l'hydrogel nanocomposite

injecté dans le corps. L'incorporation des petites molécules au sein de la silice mésoporeuse est possible [8], mais nécessite une étude à part.

Références bibliographiques

- [1] Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed.; Elsevier Academic Press: **2004**; p 851.
- [2] Camps, J. *Notions de biocompatibilité*; Université Médicale Virtuelle Francophone: **2009-2010**.
- [3] Vinatier, C.; Magne, D.; Weiss, P.; Trojani, C.; Rochet, N.; Carle, G. F.; Vignes-Colombeix, C.; Chadjichristos, C.; Galera, P.; Daculsi, G.; Guicheux, J., A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* **2005**, 26, (33), 6643-6651.
- [4] Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D. A.; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H., Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* **2002**, 13, (12), 4279-4295.
- [5] Al Battah, F.; De Kock, J.; Vanhaecke, T.; Rogiers, V., Current Status of Human Adipose-Derived Stem Cells: Differentiation into Hepatocyte-Like Cells. *The Scientific World Journal* **2011**, 11, 1568-1581.
- [6] Firme, C. P.; Bandaru, P. R., Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, 6, (2), 245-256.
- [7] Yu, T.; Malugin, A.; Ghandehari, H., Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity. *ACS Nano* **2011**, 5, (7), 5717-5728.
- [8] Wang, S., Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials* **2009**, 117, (1-2), 1-9.

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail de thèse nous avons d'abord réalisé un ensemble d'études structurales, texturale et physique sur les hydrogels à base d'un dérivé cellulosique modifié (HPMC-Si), qui sont développés pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire par chirurgie mini-invasive au laboratoire LIOAD. Ensuite, un renfort de ces hydrogels a été effectué par ajout de nanofibres de silice mésoporeuses avec lesquelles nous avons réussi à obtenir des hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs.

L'étude de la structure du polymère HPMC-Si nous a démontré que les groupements silanes se greffent sur le polymère par « l'extrémité époxy », laissant les « extrémités alcoxysilanes » disponibles pour la polycondensation et la formation des ponts siloxanes Si-O-Si lors de la préparation des hydrogels. L'observation des liaisons Si-O-Si en RMN du solide montre que l'hydrogel d'HPMC-Si est un gel chimique.

En ce qui concerne la morphologie des hydrogels d'HPMC-Si, il n'est pas possible de donner une description exacte avec certitude. Toutes les expériences ainsi que les calculs théoriques tendent à montrer que ces hydrogels sont des systèmes hiérarchisés, contenant de grands pores de taille micrométrique et dont les parois sont constituées de maillage peu dense d'HPMC-Si caractérisé par un paramètre de maille nanométrique. L'eau confinée dans une telle matrice (environ 98% en masse) est présente sous deux formes différentes : environ 20 wt% d'eau en interaction avec le réseau hôte, dite « eau d'hydratation », et à peu près 80 wt% d'eau présentant une dynamique d'eau sans interaction avec un corps étranger, dite eau « bulk ».

Les molécules d'eau d'hydratation sont en interaction avec les parties hydrophiles du polymère HPMC-Si via des liaisons hydrogène et subissent des échanges permanents et très rapides entre un état lié et un état non-lié, caractérisés par des temps de l'ordre de la picoseconde. Par conséquent, ce type d'eau reste en phase liquide jusqu'à environ 160 K. En revanche, la dynamique de l'eau « bulk » est presque identique à celle de l'eau ordinaire volumique, aussi bien à l'échelle spatio-temporelle locale (de l'ordre du nanomètre et de la picoseconde) qu'à une échelle plus grande (de l'ordre d'une dizaine de micromètres et des dizaines de millisecondes). A 300 K, le coefficient de diffusion des molécules d'eau « bulk » mesuré à grande échelle spatio-temporelle est très proche de

Conclusion

celui d'eau distillée. Ce résultat indique que la diffusion des molécules de ce type d'eau n'est pas affectée par la présence de la matrice polymère sur des libres parcours moyens d'une dizaine de micromètres, en accord avec l'hypothèse concernant la morphologie des hydrogels d'HPMC-Si. Une bonne diffusivité de l'eau au sein des hydrogels est importante pour une application en ingénierie tissulaire, parce qu'elle facilite le transport des nutriments et d'autres molécules vers les cellules. Ce point est donc tout particulièrement intéressant pour l'application visée.

L'ajout des nanofibres de silice dans les hydrogels permet une amélioration très significative de propriétés mécaniques : avec seulement 3wt% de NFs, le module élastique en compression de l'hydrogel nanocomposite devient plus de quatre fois supérieur à celui de l'hydrogel pur. Même si ces propriétés mécaniques ne sont pas comparables à celles du cartilage natif, l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs peut néanmoins être utilisé comme un support temporaire de chondrocytes ou de cellules souches durant la période de régénération du cartilage.

Il est particulièrement intéressant de remarquer que la nature chimique des nanofibres utilisées (silice) permet la création de véritables liaisons chimiques entre les fibres et la matrice lors de la polycondensation. Les NFs sont alors immobilisées au sein des hydrogels, puisqu'elles participent à la formation de la matrice de l'hydrogel en créant des ponts siloxanes avec le polymère HPCM-Si. Ces liaisons sont mises en évidence par mesures de compression, de temps de gel, et sont cohérentes avec le seuil de percolation et l'écart observé à la loi des mélanges. Elles contribuent à l'amélioration très significative des propriétés en compression malgré un taux de charges faible de l'ordre de 3%.

Les tests préliminaires de cytotoxicité effectués sur les hydrogels nanocomposites HPMC-Si/NFs montrent que ces derniers ne présentent pas de toxicité vis-à-vis des cellules de la lignée cellulaire cancéreuse du cartilage humain et des cellules souches du tissu adipeux humain, et cela jusqu'à 3 wt% de NFs. La non-toxicité pourrait être due à l'immobilisation des nanofibres dans les hydrogels nanocomposites grâce à la formation des liaisons Si-O-Si. Cependant, cette hypothèse va devoir être vérifiée par la microscopie électronique à transmission, qui permettra de mettre en évidence l'absence du

Conclusion

déplacement et de la pénétration des NFs dans les cellules. Il est également nécessaire de poursuivre les tests biologiques *in vivo* pour approuver la biocompatibilité des hydrogels nanocomposites.

La mésoporosité des nanofibres de silice représente de plus une perspective intéressante à exploiter dans un travail futur. Effectivement, les nanofibres peuvent être considérées comme des systèmes d'administration de principes actifs. Nous envisageons de charger la mésoporosité des nanofibres par des principes actifs ou des facteurs de croissance, qui pourraient être libérés progressivement après l'injection des hydrogels nanocomposites dans le corps humain. De cette façon, les principes actifs stimuleraient et favoriseraient la prolifération et la croissance cellulaire pour une meilleure régénération du tissu cartilagineux.

Annexes

Annexe 1 – Synthèses

A - Synthèse de l'HPMC-Si

Matériaux : Hydroxypropylméthylcellulose E4M (Methocel® E4M, Colorcon, The Dow Chemical CompanyTM, UK)
3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTMS, ≥ 98 %, Sigma Aldrich, Germany)
Heptane (99+ %, Acros Organics, Belgium)
1-propanol (99+ %, Acros Organics, Belgium)
Acide acétique glaciale (grade biochimique)
Hydroxyde de sodium (NaOH, pastilles)
Eau distillée

Pour environ 240 g d'HPMC-Si, il faut mélanger 12 g de NaOH, 420 ml de 1-propanol, 240 g d'HPMC et 1.9 l d'heptane dans un ballon tricol de 5 l. Le mélange est laissé sous agitation mécanique (300 tr/min, agitateur à pales éclipsables en PTFE) et sous barbotage d'azote pendant 50 min.

Ensuite, 36 ml de GPTMS sont rajoutés et le mélange est chauffé sous reflux à 85 °C pendant 3h 30 à l'aide d'un chauffe ballon et une sonde thermocouple au sein de la solution. Après ce délai, le barbotage ainsi que le chauffage sont arrêtés et la solution est laissée se refroidir sous agitation mécanique pendant environ 1 h pour atteindre 40 °C.

30 ml d'acide acétique glaciale sont rajoutés dans le mélange pour arrêter la réaction. 30 min après, la solution est mélangée avec un bain de lavage constitué de 2.55 l d'acétone et 0.45 l d'eau distillée. Le tout est filtré à travers un büchner recouvert d'un papier à filtrer.

La poudre (HPMC-Si) ainsi récupérée est mélangée sous agitation magnétique pendant 30 min avec un deuxième bain de lavage (2.55 l d'acétone et 0.45 l d'eau

distillée) et à nouveau filtrée. Ceci est répété encore deux fois avant que la poudre soit mise à sécher à l'air libre pendant une nuit, puis dans une étuve à 37 °C pendant 3 nuits.

B – Synthèse de l'HPMC-Si dialysé

Matériaux : HPMC-Si

Hydroxyde de sodium (NaOH, pastilles)

Eau distillée

6 g d'HPMC-Si sont dissous dans 194 ml de solution aqueuse à 0.2 M de NaOH sous agitation magnétique à température ambiante pendant 48 h dans un flacon bien fermé – la présence de CO₂ acidifie la solution et peut induire la polycondensation des chaînes d'HPMC-Si. Cette solution est versée dans des sacs de dialyse avec un seuil de coupure situé entre 6000 et 8000 Da. La première dialyse se fait dans 3.8 l de 0.09 M NaOH_{aq} pendant 20 h, la deuxième dans 4 l de 0.09 M NaOH_{aq} pendant 1-2 h. Les dialyses permettent d'éliminer le GPTMS non greffé, qui n'a pas été enlevé lors de la synthèse de l'HPMC-Si.

Pour obtenir le polymère « HPMC-Si dialysé », il suffit de dialyser cette solution basique deux fois dans 4 l d'eau distillée pour faire partir la soude. Le contenu du sac de dialyse (réticulé à cause de la baisse du pH) est ensuite lyophilisé et le produit ainsi obtenu se présente sous forme d'une mousse blanche : l'HPMC-Si dialysé.

C - Synthèse des hydrogels à base d'HPMC-Si

Matériaux : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES,

≥ 99.5 %, Sigma Aldrich, Germany)

Acide chlorhydrique (HCl, 37 wt%, Sigma Aldrich, Germany)

Chlorure de sodium (NaCl, ≥ 99 %, VWR GPR RECAPTUR®, UK)

HPMC-Si

Hydroxyde de sodium (NaOH, pastilles)

Eau distillée

Pour obtenir environ 300 ml de gel à 2 wt% d'HPMC-Si, il faut d'abord dissoudre 6 g d'HPMC-Si dans 194 ml de solution aqueuse à 0.2 M de NaOH sous agitation magnétique à température ambiante pendant 48 h dans un flacon bien fermé – la présence de CO₂ acidifie la solution et peut induire la polycondensation des chaînes d'HPMC-Si.

Cette solution est ensuite versée dans des sacs de dialyse avec un seuil de coupure situé entre 6000 et 8000 Da. La première dialyse se fait dans 3.8 l de 0.09 M NaOH_{aq} pendant 20 h, la deuxième dans 4 l de 0.09 M NaOH_{aq} pendant 1-2 h. Les dialyses permettent d'éliminer le GPTMS non greffé, qui n'a pas été enlevé lors de la synthèse de l'HPMC-Si, et également d'ajuster le pH de la solution. La solution basique d'HPMC-Si (pH > 12.2) ainsi obtenue est stockée au réfrigérateur à 4 °C dans un flacon fermé avant son utilisation.

La solution tampon B (TB) acide (pH 3.2) à base d'HEPES est préparée de la manière suivante : dans une fiole jaugée de 100 ml, il faut mélanger 6.2 g d'HEPES, 1.8 g de NaCl et 60 ml de solution aqueuse d'HCl à 0.1 M. Le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée et le tout est mélangé sous agitation magnétique jusqu'à la dissolution complète des poudres.

L'hydrogel d'HPMC-Si (pH 7.4) est obtenu en mélangeant 1 volume de la solution basique d'HPMC-Si avec 0.5 volume de la solution TB à l'aide de deux seringues luer-lock interconnectées. Cette solution précurseur de l'hydrogel est injectable encore pendant 30-40 min avant que le point de gel soit atteint. La polycondensation complète nécessite 2 semaines à température ambiante sous atmosphère humide.

La préparation des hydrogels nanocomposites nécessite la dispersion des nanofibres de silice dans la solution TB avant que celle-ci soit mélangée avec la solution basique d'HPMC-Si. La dispersion se fait pendant 2 h dans un bain à ultrason. Les temps de gel des solutions précurseurs des hydrogels nanocomposites dépendent du taux de nanofibres et sont généralement plus courts comparés à celui du gel pur.

D - Synthèse des nanofibres de silice (NFs)

Matériaux : Orthosilicate de tétraéthyle (TEOS, Sigma Aldrich, Germany)
Bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB, Sigma Aldrich, Germany)
Acide perfluorooctanoïque (PFOA, 96 %, Sigma Aldrich, Germany)
3-mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTMS, 95 %, ABCR, Germany)
Hydroxyde de sodium (NaOH, pastilles)
Acide chlorhydrique (HCl, 37 wt%)
Ethanol
Eau distillée

Le protocole de la synthèse des NFs de silice a été repris et adapté en se basant sur celui mis au point par Dr. F. Rambaud du Laboratoire Sol-Gel du CEA/DAM Le Ripault [1], [2]. L'adaptation du protocole a été réalisée avec l'aide du stagiaire L3 Physique-Chimie M. T. Duffay et la plupart des synthèses a ensuite été effectuée par Mme F. Lari.

Dans un ballon tricol de 500 ml sont versés 280 ml d'eau distillée, 2.1 ml de solution aqueuse 2 M de NaOH, 600 mg de CTAB et 60 mg de PFOA. Le mélange est chauffé dans un bain d'huile à 60 °C (thermocouple au sein de la solution) sous reflux et sous agitation mécanique (260 tr/min, agitateur à pales éclipsables en PTFE). Une fois la température bien stabilisée, 3.7 ml de TEOS sont rajoutés dans le milieu réactionnel et 30 s après 350 µl de MPTMS y sont injectés. La réaction se fait pendant 4 h et pendant ce temps-là le milieu réactionnel doit être protégé de l'air extérieur.

La solution est ensuite filtrée et lavée à l'eau distillée (~ 250 ml) et à l'éthanol (~ 250 ml) à travers un verre fritté de porosité 3. La poudre récupérée sur le verre fritté est mélangée avec 250 ml d'éthanol et 3-4 gouttes d'HCl dans un ballon 500 ml. Ce mélange est chauffé sous reflux (~ 90 °C) et sous agitation magnétique dans un bain d'huile pendant 15 h. La filtration à travers le verre fritté de porosité 3 suivie d'un lavage à l'éthanol (~ 250 ml) permet d'obtenir une poudre blanche – les nanofibres. Elles sont

séchées à l'étuve chauffée à 90 °C pendant 1 jour, puis calcinées à 550 °C pendant 6 h sous air dans un four tubulaire avant leur utilisation.

E – Dépolymérisation acide

Matériaux : Hydroxypropylméthylcellulose E4M (Methocel® E4M, Colorcon, The Dow Chemical CompanyTM, UK)

HPMC-Si dialysé

Acide sulfurique (H₂SO₄, 96 wt%)

Hydroxyde de sodium (NaOH, pastilles)

Eau distillée

Ethanol

200 mg de chaque polymère sont mis dans des ballons monocol de 500 ml avec 90 ml d'eau distillée, fermés et laissés à température ambiante pendant une nuit pour permettre aux polymères de gonfler dans l'eau. L'HPMC-Si doit être découpé aux ciseaux auparavant.

Ensuite, 41.7 ml d'acide sulfurique et 18.3 ml d'eau distillée sont rajoutés dans chaque ballon pour obtenir des solutions 5 M de H₂SO₄. Un changement de couleur peut avoir lieu, les solutions deviennent jaunâtres. Les ballons sont laissés 2 h à T ambiante, puis chauffés pendant 2 h sous agitation magnétique et sous reflux dans un bain d'huile à 70 °C.

Une fois les solutions refroidies, elles sont neutralisées avec de la soude pour obtenir un pH ~ 7. La neutralisation produit le sel sulfate de sodium, qui est soluble dans l'eau, mais pas dans l'éthanol. Alors, pour séparer les solutions contenant les polymères dépolymérisés (solubles dans l'éthanol) du sel, il suffit de rajouter de l'éthanol dans chaque solution. La précipitation du sel est presque immédiate et la décantation sépare le sel du reste des solutions. Les surnageants sont donc prélevés et à nouveau mélangés avec de l'éthanol. Ceci est reproduit jusqu'à ce qu'il n'y a plus de précipité dans les solutions.

Annexes

Les solutions sont ensuite séchées à l'air libre sous la hotte jusqu'à ce qu'il n'y a plus de liquide, puis à l'étuve à 50 °C pendant une nuit. Les poudres dépolymérisées ont une couleur ocre.

Annexe 2 – Principes de certaines techniques expérimentales

A – La cryoporométrie

La cryoporométrie est une technique de la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui a été développée dans les années 90 par Strange *et al.* [3] pour mesurer la porosité et la distribution de la taille des pores, située entre ~ 1 nm et ~ 10 μ m, dans les matériaux poreux. Son principe est basé sur l'effet Gibbs-Thomson : les petits cristaux du liquide formés dans les pores fondent à une température inférieure à celle des cristaux du liquide « bulk ». Cette différence de température est inversement proportionnelle à la taille des pores [4].

En effectuant les spectres RMN liquide en fonction de la température la cryoporométrie nous permet également de déterminer la transition de phase d'un composé entre son état solide et liquide et de la corrélérer à la quantité de spins qui y contribuent. Lors d'une expérience, les échantillons contenant un liquide sont donc introduits dans un simple spectromètre RMN liquide avec une température d'échantillon variable et rapidement refroidis jusqu'à ce que tout le liquide passe par une cristallisation. Ensuite, ils sont lentement chauffés et les spectres RMN sont enregistrés en fonction de la température. Comme les temps de relaxation T_2 des spins nucléaires sont généralement beaucoup plus courts dans un état gelé (de l'ordre des millisecondes) que dans un état fondu (de l'ordre des secondes), où les molécules sont plus mobiles, à chaque température donnée nous pouvons accéder à la quantité de la phase liquide contenue dans un matériau en observant les temps de relaxation T_2 plus longs via une technique de spin-écho.

La séquence de spin-écho de Hahn est présentée sur la figure 2.1. Elle est composée d'une première impulsion de 90° suivant l'axe x qui bascule l'aimantation M_z des spins nucléaires des noyaux observés (dans notre cas des noyaux d'hydrogène ou de deutérium) dans le plan xy . Ces spins peuvent ainsi subir une précession dans ce plan pendant le temps τ , après lequel une autre impulsion de 180° bascule les spins suivant l'axe y . Après une deuxième période τ , tout effet de précession est réduit à zéro et il ne subsiste que l'atténuation de l'aimantation M_z due au temps de relaxation T_2 . On peut donc

accéder au temps de relaxation T_2 des spins nucléaires observés grâce à cette séquence de Hahn.

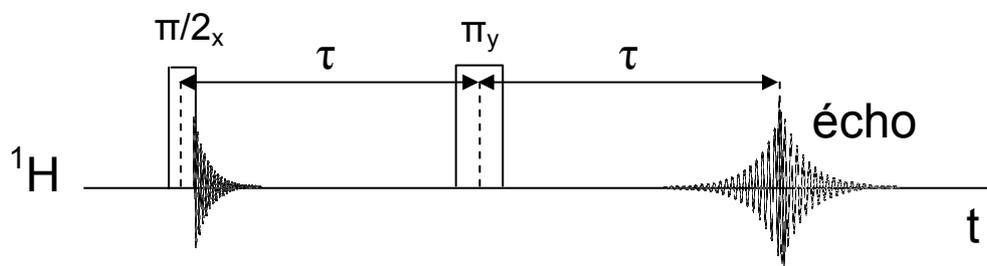


Figure 2.1 : Séquence d'impulsion de Hahn en fonction du temps t utilisée pendant l'expérience de la cryoporométrie pour mesurer le temps de relaxation T_2 des spins nucléaires des atomes d'hydrogène ^1H (ou de deutérium ^2H) contenus dans la phase liquide de l'eau dans les hydrogels d'HPMC-Si.

La décroissance du signal d'écho mesuré est clairement composée de deux parties distinctes pour toutes les températures en-dessous de la température de fusion du « bulk ». Un déclin exponentiel avec une longue constante de temps est dû à la partie liquide, le déclin avec une courte constante de temps à la partie solide. Il est donc important de sélectionner le temps τ supérieur à T_2 de la partie solide pour assurer que tout le signal détecté provient uniquement de la partie liquide. De manière générale, quelques dizaines de millisecondes sont suffisantes. L'amplitude du signal (l'intégrale des pics dans les spectres RMN) est mesurée en fonction de la température et elle est proportionnelle à la quantité des spins en mouvement et donc au volume du liquide présent.

Une calibration de la température est nécessaire à faire avant les mesures. Elle s'effectue à l'aide d'un composé, dont les variations des déplacements chimiques en fonction de la température sont bien connues et cataloguées. Le méthanol est un exemple d'un tel composé. Nous nous sommes servis de ce dernier pour calibrer la température du spectromètre RMN. La variation des déplacements chimiques des deux pics du méthanol, provenant des atomes d'hydrogène dans les groupements méthyles ($-\text{CH}_3$) et hydroxyles ($-\text{OH}$), avec la température peut être trouvée dans des tableaux prévus à cet effet.

B – La RMN à gradient de champ pulsé (PGSE)

La technique de spin écho à gradient de champ pulsé (PGSE de l'anglais *Pulsed Gradient Spin Echo*) est une expérience de la RMN liquide qui permet de mesurer le coefficient de diffusion D d'une espèce via une détermination indirecte de la position des noyaux actifs par leur fréquence de Larmor. La séquence d'impulsions utilisée pendant la PGSE est présentée sur la figure 2.2. Il s'agit d'une séquence spin-écho de Hahn modifiée par deux gradients de champ, développée par Stejskal et Tanner dans les années 60 [5], [6].

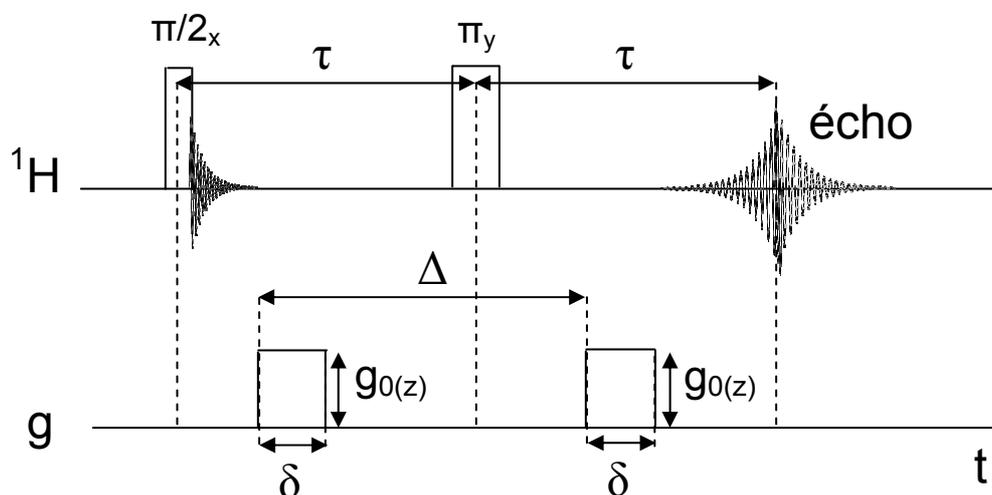


Figure 2.2 : Séquence d'impulsion PGSE en fonction du temps t , avec ^1H le canal d'observation des spins nucléaires des atomes d'hydrogène et g le canal des gradients de champ magnétique.

La séquence est composée d'une impulsion radiofréquence à 90° suivant l'axe x , qui bascule l'aimantation M_z des spins (dans notre cas les spins des atomes d'hydrogène ^1H) dans le plan de mesure xy et induit ainsi leur précession. Un gradient de champ statique de puissance g_0 et de durée δ selon l'axe z implique un déphasage entre les spins à la fin de la période τ . Une impulsion à 180° suivant l'axe y conduit à une inversion des spins. Un deuxième gradient de champ, identique au premier, mène aux deux cas possibles en fonction de la diffusion ou non des spins durant la période appelée temps de diffusion Δ :

- En absence de diffusion : il n'y a pas de translation selon l'axe z pendant l'intervalle Δ , les effets des deux impulsions gradients s'annulent et tous les spins sont refocalisés à la fin de la période 2τ . On obtient donc un signal d'écho maximum.
- En présence de diffusion : les positions des spins sur l'axe z sont différentes au début et à la fin de l'intervalle de diffusion Δ . Chaque spin est donc soumis à un champ magnétique différent et subit un mouvement de précession selon un angle modifié pendant les deux périodes τ . Ainsi, le déphasage après la première période τ est différent de celui observé après la deuxième période τ . L'angle de phase s'élargit en présence de diffusion et le signal d'écho est donc diminué. L'atténuation de l'écho est proportionnelle au coefficient de diffusion D et à la durée de l'intervalle de diffusion Δ .

Stejskal et Tanner ont montré que l'intensité du signal mesuré peut être décrite dans le cas d'une impulsion gradient rectangulaire par l'équation suivante :

$$\frac{I(2\tau)}{I_0} = \exp\left[-D\gamma^2 g_0^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right] \quad (2.1)$$

où $I(2\tau)$ est l'intensité du signal en présence de gradient de champ, $I(0)$ ou I_0 est l'intensité du signal en absence de gradient et γ et le rapport gyromagnétique du noyau observé (dans notre cas de l'atome d'hydrogène $\gamma_H = 267.5 \times 10^6 \text{ rad.s}^{-1}.T^{-1}$). Les puissances des gradients de champs appliqués sont généralement de l'ordre de 10 - 1000 G.cm^{-1} . En jouant sur les paramètres de la séquence, il est possible d'accéder aux valeurs des coefficients de diffusion en solution, qui se situent entre 10^{-9} et $10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$. En règle générale, une augmentation de la valeur de g_0 a le même effet sur l'atténuation du signal d'écho qu'une augmentation correspondante de Δ . Ainsi, pour obtenir une atténuation du signal d'écho équivalente avec un coefficient de diffusion dix fois plus faible, on peut augmenter le g_0 ou le Δ d'un facteur 3. Expérimentalement, il est préférable de fixer la période τ et choisir un intervalle Δ , très supérieur à la durée des gradients δ . Les mesures du coefficient de

diffusion D s'effectuent donc en enregistrant plusieurs expériences en augmentant progressivement l'intensité du gradient g_0 .

Dans le cas d'une seule espèce ou population diffusive, la valeur de D est obtenu en traçant le rapport I/I_0 en fonction de $\exp[-\gamma^2 g_0^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)]$ et en ajustant les valeurs expérimentales à une fonction mono-exponentiel. Autrement dit, le tracé de $\ln(I/I_0)$ en fonction de $\gamma^2 g_0^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ donne une ligne droite dont la pente est égale à D . Dans le cas d'un mélange d'espèces ou de populations avec des résonances superposées ayant deux ou plus de coefficients de diffusions, des modèles bi- ou multi-exponentiels doivent être utilisés.

L'intervalle de diffusion joue un rôle important dans la séquence PGSE puisqu'il détermine le temps pendant lequel nous observons la diffusion des espèces. La période d'observation de la diffusion des spins est $\Delta - \delta/3$. Les échelles de temps accessibles se situent entre 1 et 1000 ms. Dans notre cas, $\delta = 2.5 \text{ ms}$ et $\Delta = 50 \text{ ms}$. Sachant que le coefficient de diffusion des molécules d'eau « bulk » est $D = 2.27 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à température ambiante, la distance caractéristique l sur laquelle la diffusion des molécules d'eau est étudiée vaut alors :

$$l = \sqrt{D(\Delta - \frac{\delta}{3})} \approx 10 \mu\text{m} \quad (2.2)$$

L'observation des molécules d'eau dans nos échantillons se fait donc sur une échelle spatio-temporelle de l'ordre d'une cinquantaine de millisecondes et d'une dizaine de micromètres.

C – Diffusion de neutrons

L'étude de la matière condensée au niveau atomique et moléculaire s'appuie souvent sur les résultats de l'interaction avec des particules, comme les photons de la lumière visible ou les neutrons. Le neutron dit thermique est une des sondes les plus courantes et intéressantes. Le neutron est une particule de masse est $m_n = 1.675 \times 10^{-27} \text{ kg}$ avec un spin $\frac{1}{2}$ et sans aucune charge électrique. Il n'interagit donc pas avec les champs

électriques, dont celui dû aux électrons. De ce fait, sa pénétration dans la matière est très facile même à des énergies cinétiques très faibles, souvent inférieures à celle de l'agitation thermique des systèmes étudiés. Les informations concernant la structure et la dynamique des échantillons étudiés par diffusion des neutrons proviennent donc exclusivement des forces nucléaires entre les neutrons et les noyaux des atomes.

La source des neutrons est un réacteur nucléaire qui produit des neutrons d'une énergie cinétique de l'ordre de 2 MeV. Au Laboratoire Léon Brillouin au CEA à Saclay, où nous avons effectués nos mesures, le réacteur appelé Orphée a une puissance d'environ 14 MW, sachant que 1 MW correspond à une source de 3×10^{16} neutrons par seconde [7] dont la durée de vie est de 886.8 s, c'est-à-dire 14.8 min. Les expériences de diffusion de neutrons utilisent exclusivement des neutrons « thermiques », *i.e.* leur vitesse a été préalablement diminuée par interaction inélastique avec un milieu « thermalisé » à des températures allant de 20 K (neutrons « froids ») à 1200 °C (neutrons « chauds »). Du fait de la dualité onde-particule, le paramètre intéressant est la longueur d'onde des neutrons, souvent imposée par le monochromation du faisceau incident, où déduite de la vitesse. La fenêtre de longueur d'onde λ s'étend de 0.5 à 20 Å, des valeurs comparables aux distances interatomiques, ce qui permet de sonder les corrélations de position des particules. La fenêtre d'énergie est, par conséquent, comparable aux énergies cinétiques des mouvements atomiques et moléculaires (diffusion, rotation, vibration, phonons, *etc.*), elle est de l'ordre des meV. Malheureusement, la diffusion des neutrons est le plus souvent une technique complémentaire, car les sources des neutrons sont de faible intensité, de plus les processus de thermalisation, de monochromation et de focalisation des faisceaux ne permettent pas de fournir des flux de neutrons suffisants ($\sim 10^{4-8}$ neutrons.cm⁻².s⁻¹) comparé aux flux de photons disponibles dans les installations courantes de diffusion de la lumière ($> 10^{22}$ photons.cm⁻².s⁻¹) ou des rayons X ($\sim 10^{12-16}$ photons.cm⁻².s⁻¹).

Les neutrons interagissent avec les noyaux des atomes via une interaction forte. Une telle interaction est schématisée sur la figure 2.3. Les neutrons peuvent être diffusés élastiquement ou inélastiquement par les atomes de l'échantillon. Dans le cas de la diffusion élastique, l'énergie des neutrons est inchangée ($\hbar\omega = 0$), seule la direction du vecteur d'onde \mathbf{k} est modifiée, mais pas le module du vecteur de diffusion q :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (2.3)$$

Lors de la diffusion inélastique, une petite quantité d'énergie (≤ 2 meV) est échangée entre les neutrons et la matière ($\hbar\omega = E_f - E_i$). La direction du vecteur d'onde ainsi que le module du vecteur de diffusion sont donc modifiés. Les grandeurs importantes dans la diffusion des neutrons sont alors les variations du vecteur de diffusion q (indique l'inverse de la distance sondée par les neutrons) et d'énergie $\hbar\omega$ ($\omega \sim$ l'inverse du temps caractéristique sondé par les neutrons).

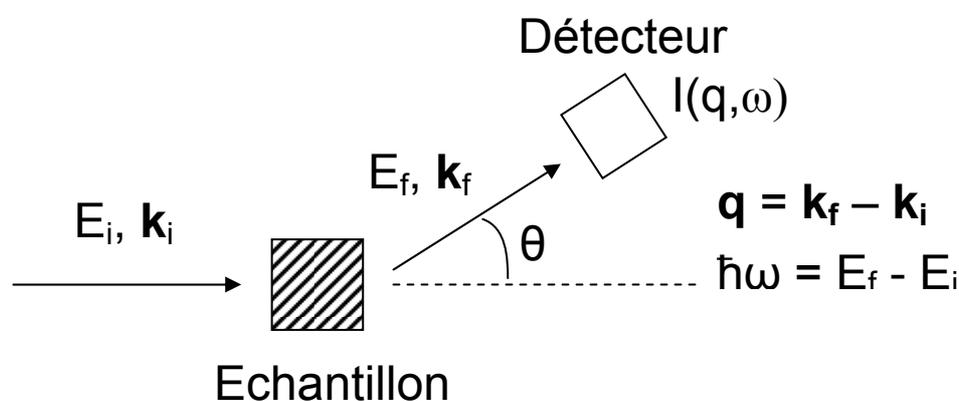


Figure 2.3 : Interaction neutron-échantillon avec le flux de neutrons incident ayant le vecteur d'onde k_i et l'énergie E_i et le flux de neutrons diffusés sous un angle θ avec une énergie E_f et un vecteur d'onde k_f . q est le vecteur de diffusion et $I(q, \omega)$ est l'intensité détectée au niveau du détecteur.

L'interaction neutron-noyau dépend de l'espèce chimique et de l'isotope considéré ainsi que de son état de spin. Dans le cas où tous les atomes du système sont identiques et dans le même état de spin, les ondes diffusées par ces atomes peuvent interférer. Les atomes font donc figure de sources secondaires cohérentes. La longueur de diffusion de chaque atome, qui traduit l'intensité de l'interaction neutron-atome, est alors dite cohérente, et on la note b_{coh} . La longueur d'onde des neutrons étant comparable aux distances interatomiques, les interférences donnent des informations conséquentes sur la structure locale des systèmes. Dans le cas, où tous les atomes ne sont pas identiques, ou pas tous dans le même état de spin, ils possèdent alors des longueurs de diffusion différentes. La relation de phase entre les ondes diffusées est alors variable. Les interférences ne peuvent pas avoir lieu et on somme uniquement les intensités des ondes.

Les atomes font figure de sources secondaires incohérentes. On schématise cela avec deux longueurs de diffusion, une cohérente b_{coh} et une incohérente b_{inc} . La longueur de diffusion cohérente d'un atome correspond donc à la moyenne des longueurs de diffusion des différents états de spin. Quant à la longueur de diffusion incohérente, elle rend compte des écarts à cette valeur moyenne. Pour une molécule, la longueur de diffusion est égale à la somme des longueurs de diffusion des atomes qui la composent. Ainsi, la longueur de diffusion d'une molécule d'eau $b_{H_2O} = -0,168 \times 10^{-12} \text{ cm}$ est très différente de celle d'une molécule d'eau lourde $b_{D_2O} = 1,920 \times 10^{-12} \text{ cm}$. La longueur de diffusion est reliée à la section efficace σ , qui exprime la probabilité d'interaction entre le neutron et l'atome donné, par la relation :

$$\sigma = 4\pi b^2 = \sigma_{coh} + \sigma_{inc} \quad (2.4)$$

Chaque élément a sa section efficace cohérente σ_{coh} et incohérente σ_{inc} . Les diffusions cohérentes et incohérentes peuvent être élastiques ou inélastiques.

La diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)

La diffusion des neutrons aux petits angles (SANS de l'anglais *Small Angle Neutron Scattering*) est une diffusion élastique, quasi-statique. L'expérience consiste à envoyer un faisceau monochromatique et collimaté de neutrons ayant une longueur d'onde λ sur un échantillon et à mesurer la distribution de l'intensité diffusée dans un petit domaine angulaire (environ 5°) autour du faisceau direct. L'angle de diffusion est caractérisé par le vecteur de diffusion \mathbf{q} via la relation 2.3. Sachant que la longueur d'onde des neutrons employés dans la diffusion aux petits angles situe entre 0.1 et 2 nm et que les angles observés sont inférieurs à 5° , cette technique nous permet d'étudier la structure de la matière condensée à une échelle d'espace allant de quelques angströms jusqu'à environ 50 nm. Dans la suite, nous allons nous intéresser uniquement aux aspects concernant la diffusion de neutrons aux petits angles sur les hydrogels d'HPMC-Si. Plus de détails sont disponibles par exemple dans les références suivantes [8], [9].

L'intensité $I(q)$ obtenue lors de l'expérience SANS nous donne des informations sur la forme et l'organisation des structures présentes dans l'échantillon, comme par

exemple le paramètre de maille d'un hydrogel. Pour cela, il faut que l'intensité diffusée par la structure que l'on souhaite observer soit assez importante par rapport à l'intensité du milieu environnant. En d'autres termes, il faut assurer un bon contraste $\Delta\rho$ entre la structure à observer et l'environnement, parce que l'intensité diffusée est directement proportionnelle au contraste au carré :

$$I(q) \approx \frac{n}{v} V^2 (\Delta\rho)^2 P(q) S(q) \quad (2.5)$$

où n est le nombre d'objets qui diffusent, v leur volume, V le volume de l'échantillon analysé, $P(q)$ le facteur de forme contenant des informations sur la taille d'un objet et $S(q)$ le facteur de structure qui nous donne des informations sur l'organisation des objets. Le facteur de structure est proche de 1 lorsque le système est dilué. Ainsi, il faut que la valeur du contraste $\Delta\rho$ soit la plus élevée possible pour avoir un signal avec une forte intensité.

Le contraste est calculé comme la différence de densité de longueur de diffusion ρ entre la structure à observer et le milieu environnant. La densité de longueur de diffusion est obtenue en rapportant la longueur de diffusion au volume molaire partiel :

$$\rho = \frac{b}{v} = \frac{b\rho_v N_A}{M_w} \quad (2.6)$$

avec M_w la masse molaire, ρ_v la masse volumique et N_A le nombre d'Avogadro.

Puisque la technique SANS est sensible à la substitution isotopie, il est possible de remplacer certaines atomes de l'échantillon par des isotopes du même élément chimique pour augmenter le contraste et ne pas changer les propriétés chimiques du matériau. Par exemple la substitution isotopique des atomes d'hydrogène par les atomes de deutérium et très souvent utilisée, parce que la différence entre la longueur de diffusion cohérente de l'atome d'hydrogène ($b_{coh} = -0.374 \times 10^{-12} \text{ cm}$) et celle de l'atome de deutérium ($b_{coh} = 0.667 \times 10^{-12} \text{ cm}$) est assez importante pour créer un contraste d'intensité suffisant.

Dans le cas des hydrogels à base de molécules organiques, il y a deux possibilités pour augmenter le contraste entre le réseau et la solution aqueuse : soit deutérer le

polymère, soit le solvant. La première solution étant souvent difficile à mettre en œuvre car cela implique de doubler le travail de synthèse (et de caractérisations), la deuxième option est donc la plus largement employée. C'est pourquoi nos échantillons (solutions d'HPMC et les hydrogels d'HPMC-Si) ont été préparés dans de l'eau deutérée : pour avoir assez de contraste entre le polymère hydrogéné et la solution deutérée.

La longueur de diffusion incohérente est indépendante de l'angle de diffusion en diffusion quasi-statique et constitue un bruit de fond plat qu'il faut soustraire des spectres. Les atomes d'hydrogène sont une source importante du bruit de fond dans les échantillons hydrogénés, parce que leur longueur de diffusion incohérente est $b_{inc} = 2.53 \times 10^{-12}$ cm, contrairement aux atomes de deutérium dont la longueur de diffusion incohérente est $b_{inc} = 0.404 \times 10^{-12}$ cm.

Lorsqu'on étudie des systèmes contenant plusieurs composantes, tels que les hydrogels nanocomposites contenant le polymère et les nanofibres, il est possible de « supprimer » sélectivement l'intensité provenant de l'une des composantes, c'est-à-dire de choisir un mélange de solvant deutéré et non deutéré pour que le contraste de la composante à éteindre soit nul. Dans le cas des hydrogels nanocomposites, les densités de longueur de diffusion des différents constituants sont les suivants :

- $D_2O : \rho = 6.4 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$
- $SiO_2 : \rho = 3.6 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$
- $H_2O : \rho = -0.56 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$
- $HPMC-Si : \rho = -1.6 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$

La densité de longueur de diffusion de l'HPMC-Si a été calculée en considérant qu'un cycle glucosidique de l'HPMC-Si (un diffuseur élémentaire) soit constitué de $C_{9.7}O_{3.4}H_{33.8}Si_{0.1}$.

Il est possible d'« éteindre » le signal provenant de la silice et de n'observer que celui du polymère en compensant la densité de longueur de diffusion de la silice par celle de la solution aqueuse de l'hydrogel. Ceci peut être facilement obtenu en jouant sur la

proportion volumique entre le D₂O (x) et H₂O ($1-x$) dans la solution constituant l'hydrogel : $3.6 = 6.4x - 0.56(1-x)$. Ainsi, nous obtenons $x \approx 0.6$. Un mélange de 60 vol% D₂O et de 40 vol% H₂O devrait donc « éteindre » le signal de la silice et préserver uniquement celui du polymère HPMC-Si. Malheureusement, lors du premier calcul, une erreur est survenue et le x a été évalué en étant $x = 0.5$. C'est pourquoi nous n'avons pas réussi à éteindre le signal provenant de la silice et l'intensité mesurée provenait à la fois du polymère et des nanofibres de silice.

Comme pour d'autres techniques de diffusion du rayonnement, le traitement des données requiert l'application d'un modèle, et nécessite donc la plus grande prudence lors de l'interprétation. Les détails concernant l'acquisition et le traitement des données sont indiqués en Annexe 3-F.

La diffusion quasi-élastique des neutrons (QENS)

La diffusion quasi-élastique des neutrons (QENS) est une technique permettant d'étudier les mouvements translationnels et rotationnels des atomes et des molécules de la matière condensée. Dans la diffusion quasi-élastique, une petite quantité d'énergie ($\hbar\omega \leq 2 \text{ meV}$) est échangée entre les neutrons et les noyaux atomiques de l'échantillon à cause du mouvement de ces derniers : le neutron interagit élastiquement avec une particule en mouvement, mais à cause de l'effet Doppler on détecte le neutron avec une énergie différente. Par convention, $E = \hbar\omega$ est positive lorsque le neutron cède l'énergie au système. Les expériences QENS peuvent être utilisées pour étudier les mouvements moléculaires activés thermiquement avec les temps caractéristiques de l'ordre de $10^{-10} - 10^{-13}$ secondes, correspondant à une échelle spatiale de l'ordre de quelques nanomètres. Par la suite nous allons nous intéresser uniquement aux aspects qui concernent les expériences sur nos hydrogels. Plus d'informations concernant la diffusion quasi-élastique des neutrons peuvent par exemple être retrouvées dans les références suivantes [10], [11].

Lors d'une expérience de QENS, nous mesurons la section efficace différentielle, c'est-à-dire la quantité de neutrons diffusés par un échantillon par seconde, par unité d'angle solide $d\Omega$ et par unité de transfert d'énergie dE :

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE} = \frac{I_S}{\Phi_0} \frac{1}{d\Omega dE} \quad (2.7)$$

où Φ_0 est le flux de neutrons incident par seconde et par cm^2 et $I_S = \sigma\Phi_0$ représente le nombre de neutrons diffusés par seconde, avec σ la section efficace. La fonction $d^2\sigma/d\Omega dE$ dépend de l'évolution des positions relatives des objets diffusants du système au cours du temps. Elle est constituée d'une somme de deux termes : section efficace différentielle liée à la diffusion cohérente et section efficace différentielle due à la diffusion incohérente. Chacune d'entre elles étant une fonction d'un facteur de structure dynamique associé $S(q, \omega)$.

La diffusion cohérente contient l'information concernant les corrélations entre les positions des différents objets diffuseurs aux différents temps (*i.e.* la position du diffuseur j à temps t est $\mathbf{R}_j(t)$, sachant que la position du diffuseur i à temps $t = 0$ était $\mathbf{R}_i(0)$). Le signal cohérent peut nous donner des informations sur la présence d'un ordre structural dans la matière et sur les mouvements collectifs (comme les phonons dans les cristaux). La diffusion incohérente est reliée la fonction d'auto-corrélation entre les positions du même objet diffuseur à des temps différents (*i.e.* la position d'un diffuseur i donné à temps t est $\mathbf{R}_i(t)$ sachant que la position du même diffuseur à temps $t = 0$ était $\mathbf{R}_i(0)$). Le signal incohérent nous permet d'analyser le mouvement rotationnel ou translationnel des éléments diffuseurs (atomes) individuels et par conséquent la dynamique de la molécule à laquelle ils appartiennent. C'est donc la partie incohérente de la diffusion ($S_{inc}(\omega)$ intégrée sur le q), qui nous intéresse dans les expériences QENS, car elle nous donne des informations sur la dynamique des molécules dans la matière condensée, même si la diffusion quasi-élastique mesurée est toujours un mélange des deux types de diffusion (cohérente et incohérente).

Le facteur de structure dynamique incohérent $S_{inc}(q, \omega)$ en fonction de l'énergie (ω) et de l'angle de diffusion (q) peut être obtenue à partir de la fonction intermédiaire de la

diffusion incohérente $I_{inc}(q,t)$ grâce à la transformée de Fourier. S_{inc} peut être séparée, en première approximation, en somme de deux parties centrées sur $\omega = 0$: une partie purement élastique (une δ fonction qui contient l'information sur la géométrie de l'objet diffusant) et une partie quasi-élastique (il s'agit d'une fonction Lorentzienne, porteuse de l'information sur l'échelle temporelle de la diffusion). Puisque les mouvements des objets qui diffusent ne sont pas discrets, la diffusion quasi-élastique se manifeste comme un élargissement de la raie de diffusion élastique en fonction de l'énergie.

Comme dans la diffusion quasi-statique (SANS), il est possible d'ajuster le rapport du signal cohérent/incohérent en utilisant la substitution isotopique. Par exemple, la très grande section efficace incohérente des atomes d'hydrogène ($\sigma_{inc} = 79.9 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$), comparée à celle des atomes de deutérium ($\sigma_{inc} = 2 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$), fait de la diffusion quasi-élastique des neutrons une technique privilégiée pour l'analyse des mouvements individuels des atomes d'hydrogène dans les composés hydrogénés, comme c'est le cas des hydrogels. La substitution isotopique entre les atomes d'hydrogène et de deutérium n'est donc pas utile pour l'étude de la dynamique des molécules d'eau dans les hydrogels à base d'HPMC-Si. Cependant, un hydrogel préparé en D_2O permet d'observer la dynamique des atomes d'hydrogène sur les chaînes polymériques et donc de différencier la dynamique de l'eau de celle du polymère.

Les mesures s'effectuent dans un spectromètre à temps de vol, c'est-à-dire qu'on détecte les neutrons en fonction de leur angle de diffusion et leur vitesse, la position et la vitesse initiale étant connues. En connaissant la position finale des neutrons et le temps nécessaire pour leur détection, nous pouvons obtenir la fonction de diffusion expérimentale $S_{inc}(q,\omega)$.

La dynamique des atomes d'hydrogène présents dans les hydrogels à base d'HPMC-Si a été étudiée à l'échelle spatio-temporelle locale, c'est-à-dire à l'échelle de l'ordre d'un nanomètre et d'une picoseconde. Les détails concernant l'acquisition et le traitement des données sont indiqués en Annexe 3-G.

Annexe 3 – Conditions expérimentales

A – Diffusion de la lumière

Les mesures de la diffusion de la lumière ont été effectuées au Laboratoire Léon Brillouin (LLB) à Saclay avec l'aide de Dr. D. Lairez. La source de la lumière à diffuser (polarisée verticalement) était constituée d'un laser argon avec une puissance autour de 166 mW émettant à une longueur d'onde $\lambda = 488 \text{ nm}$. La détection se faisait grâce à un goniomètre à angle variable. Les données ont été traitées sur un logiciel « Pasidur 2000 » créé par D. Lairez

3 solutions mères à base d'HPMC, d'HPMC-Si et d'HPMC-Si dialysé à une concentration de 1 mg.ml^{-1} ont été fraîchement préparées dans une solution aqueuse à 0.2 M de NaOH. L'eau millipore utilisée pour la préparation de ces solutions a été filtrée à travers un filtre Millex Millipore $0.22 \mu\text{m}$ avant l'ajout de la soude et du polymère. Les solutions mères ont été obtenues en dissolvant les polymères sous agitation magnétique dans des flacons neufs et fermés pendant 21 h à température ambiante. Une des deux solutions d'HPMC-Si a ensuite été dialysée deux fois (19 h + 2 h) dans une solution 0.09 M NaOH_{aq} en utilisant un sac de dialyse avec le seuil de coupure situé entre 6000 et 8000 g.mol^{-1} . Les dilutions de ces 3 solutions mères ont été faites par pesée avec de l'eau millipore filtrée.

Les cellules de mesure en verre ordinaire ont été placées dans une cellule remplie d'huile de vaseline. Cette dernière a le même indice de réfraction que le verre du flacon et on évite ainsi la réflexion de la lumière à l'interface air-verre. Les flacons ont été bien nettoyés avec des chiffons imbibés d'alcool pour faire disparaître toute trace de graisse des empreintes et des poussières. Toutes les mesures ont été faites à T ambiante.

Le toluène a été choisi comme une référence pour nos mesures d'intensité, parce que sa diffusion est isotrope (indépendante de l'angle), elle a été mesurée avant les échantillons $I_{\text{toluène}} = 1.375$. De plus, le rapport de Rayleigh de toluène est bien connu, $R_{\text{toluène}} = 4.27 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$. Sa constante $K = 4.36 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{mol.g}^{-2}$. La contribution de l'eau

à l'intensité détectée est environ 10 fois inférieure à celle de toluène. Si on veut obtenir uniquement l'intensité diffusée par nos polymères sans la contribution du solvant, l'intensité mesurée doit donc être corrigée par le facteur 0.1375 : $I(q) = I_{mesurée} - 0.1375$.

En mode statique, l'intensité diffusée à un angle de détection donné a été obtenue en moyennant 200 mesures d'une durée de 0.2 s chacune. Les mesures ont été faites à 20 angles de détection θ différents entre 21 et 151°, espacés régulièrement avec des pas en q^2 , le q étant le module du vecteur de diffusion $q = 4\pi n/\lambda \sin(\theta/2)$ en nm^{-1} . Nous avons pris $n = 1.33$ (la valeur pour l'eau même en présence de la soude) et $dn/dc = 0.146$ pour tous les polymères [12]. Pour une concentration donnée, deux mesures d'intensité ont été faites, pour obtenir 2 valeurs $I(0)$ avec lesquelles on a ensuite calculé une valeur $I(0)$ moyenne.

En mode dynamique, la fluctuation de l'intensité en fonction du temps a été mesurée uniquement pour la solution mère d'HPMC. Une mesure consistait en une accumulation de données pendant 180 s. Un fit exponentiel de la fonction d'auto-corrélation $G(\tau) \propto \exp(-2t/\tau) = \exp(-2tDq^2)$ nous a donné le coefficient de diffusion D . Avec celui-ci nous avons pu déterminer la valeur du rayon hydrodynamique R_H en s'appuyant sur la relation d'Einstein-Stokes $D = k_B T / 6\pi\eta R_H$, sachant que $k_B T / 6\pi\eta \approx 215 \text{ nm}^3 \cdot \mu\text{s}^{-1}$ pour l'eau ($\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ est la viscosité de l'eau à $T = 293.15 \text{ K}$ et $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$ est la constante de Boltzmann).

B – RMN du solide

Les données de la RMN MAS ^{29}Si ont été acquises à l'IMN sur le spectromètre Bruker AVANCE 500 MHz équipé d'une sonde CP/MAS 7 mm à une vitesse de rotation MAS de 5000 Hz et à température ambiante. Ils ont été traités sur le logiciel Dmfit 2010 disponible sur internet. Nous avons utilisé le TKS (tétrakis(triméthoxysilyl)silane) comme référence interne pour pouvoir définir le zéro sur l'axe des déplacements chimiques et pour quantifier le taux de silicium présent dans les échantillons. L'HPMC-Si dialysé et l'hydrogel d'HPMC-Si lyophilisé ont dû être découpés aux ciseaux au préalable pour obtenir des petits morceaux. Tous les échantillons ont été mélangés avec du TKS avant le

remplissage des rotors. Les proportions habituelles étaient : ~ 400 mg d'échantillon pour environ 20 mg de TKS.

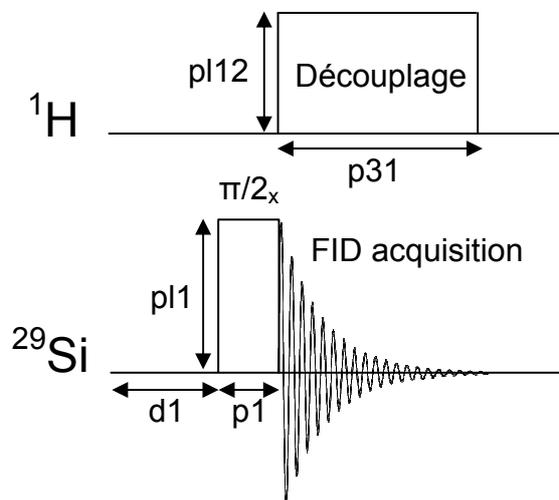


Figure 3.1 : Séquence de pulse HPDEC utilisée pour l'acquisition du signal de la FID provenant des atomes ^{29}Si dans l'HPMC-Si avec d_1 le temps de relaxation, p_1 et p_{l1} la durée et la puissance du pulse $\pi/2$ suivant l'axe x , p_{31} et p_{l12} la durée et la puissance du pulse de découplage sur le canal ^1H .

La séquence HPDEC est schématisée sur la figure 3.1. Le temps de relaxation employé pendant la séquence était de $d_1 = 150 \text{ s}$, la durée du pulse $\pi/2$ suivant l'axe x était de $p_1 = 2.2 \mu\text{s}$, et sa puissance $p_{l1} = 240 \text{ W}$. Le pulse de découplage avait la durée de $p_{31} = 7.6 \mu\text{s}$ et la puissance $p_{l12} = 160 \text{ W}$. Le spectre de l'HPMC-Si avant dialyse a été effectué avec 1096 scans, le spectre de l'HPMC-Si dialysé avec 1536 scans et le spectre de l'hydrogel d'HPMC-Si lyophilisé avec 1608 scans.

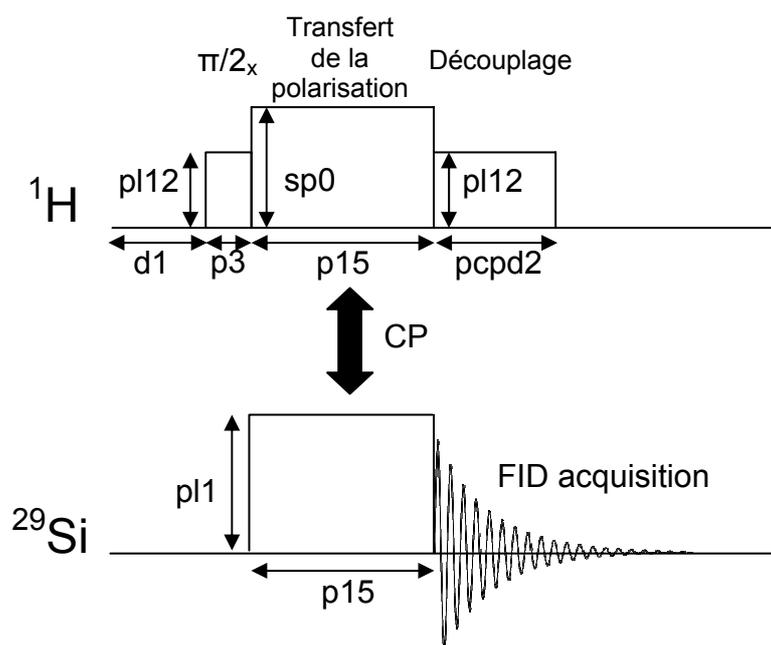


Figure 3.2 : Séquence de pulse CP utilisée pour l'acquisition du signal de la FID provenant des atomes ^{29}Si dans l'HPMC-Si avec $d1$ le temps de relaxation, $p3$ et $p12$ la durée et la puissance du pulse $\pi/2$ suivant l'axe x sur le canal ^1H , $p15$ et $sp0$ ($p11$) la durée et la puissance du pulse de la CP pour le proton (silicium), et $pcpd2$ et $p12$ la durée et la puissance du pulse de découplage sur le canal ^1H .

Le schéma de la séquence CP est présenté sur la figure 3.2 et le spectre de l'HPMC-Si obtenu avec cette séquence est montré sur la figure 3.3. Les paramètres employés pendant l'acquisition étaient les suivants : $d1 = 1 \text{ s}$, $p3 = 4 \mu\text{s}$, $p12 = 160 \text{ W}$, $p15 = 1000 \mu\text{s}$, $sp0 = 200 \text{ W}$, $p11 = 240 \text{ W}$, $pcpd2 = 7.6 \mu\text{s}$ et $ns = 2504$. Les paramètres d'acquisition du spectre de l'hydrogel d'HPMC-Si lyophilisé était les mêmes, à part le nombre de scans qui était $ns = 2560$.

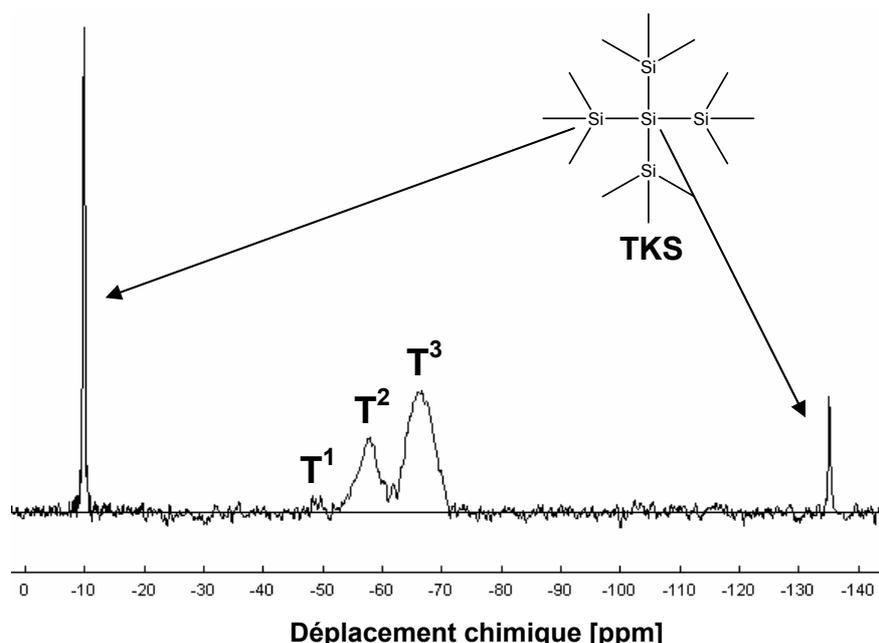


Figure 3.3 : Spectre RMN MAS ^{29}Si de l'HPMC-Si obtenu avec la séquence de pulse CP. Les T^1 , T^2 et T^3 indiquent les bandes des Si liées aux échantillons, les signaux de l'étalon interne TKS, la molécule est schématisée, sont indiqués par deux flèches.

C – RMN du liquide

Les expériences de la RMN du liquide ont été réalisées par Dr. S. Cérantola au Service de RMN– RPE de l'Université de Bretagne Occidentale à Brest. Les spectres 1D ont été obtenus sur le spectromètre Bruker AVANCE 500 MHz équipé d'une sonde 5 mm inverse CP TCI ^1H , les spectres 2D sur l'appareil Bruker DRX 500 MHz équipé d'une sonde 5 mm inverse TBI ^1H -B, à température ambiante.

Les poudres HPMC E4M et HPMC-Si ont été dissous dans une solution deutérée de soude deutérée (NaOD dans D_2O) à un pH 11-12. La séquence de pulse utilisée pour obtenir leurs spectres était une séquence de base de la RMN ^1H appelée « zg30 ». Elle est schématisée sur la figure 3.4 : il s'agit d'un pulse d'excitation qui bascule l'aimantation de 30° , ensuite une acquisition de la FID. Les paramètres de cette séquence étaient les suivants : $dl = 2\text{ s}$ (HPMC-Si) ou 4 s (HPMC), $pl = 8\ \mu\text{s}$, $pl1 = 12\ \text{dB}$. Le spectre de l'HPMC E4M a été fait en accumulant 191 scans, tandis que celui de l'HPMC-Si avec 224 scans.

Dans le cas de la solution d'HPMC-Si dialysée (préparée avec du D₂O et NaOD), elle a été diluée avec du D₂O et son spectre a été enregistré en utilisant la séquence de pulse appelée « zgpr ». Il s'agit d'une simple séquence « zg » avec la présaturation du canal ¹H. Cette séquence est schématisée sur la figure 3.5, elle consiste en une présaturation du signal provenant des protons, le basculement de leur aimantation de 90° et ensuite l'acquisition de leur signal. La présaturation nous permet de s'affranchir du signal provenant de l'eau (H₂O) résiduelle qui est tellement fort qu'il ne permet pas de ressortir des signaux faibles de l'échantillon. La puissance de la présaturation était $p19 = 65 \text{ dB}$, les autres paramètres : $d1 = 2 \text{ s}$, $p1 = 8 \mu\text{s}$, $p11 = 12 \text{ dB}$, $ns = 512$.

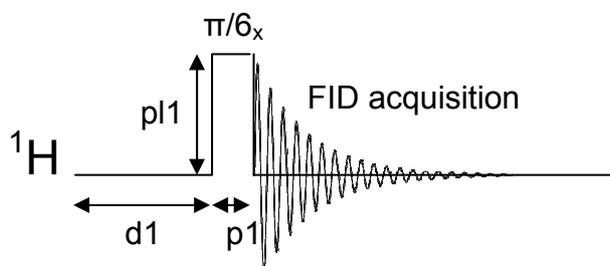


Figure 3.4 : Séquence de pulse « zg30 » utilisée pour l'acquisition du signal de la FID provenant des atomes ¹H des polymères avec $d1$ le temps de relaxation, $p1$ et $p11$ la durée et la puissance du pulse $\pi/6$ suivant l'axe x .

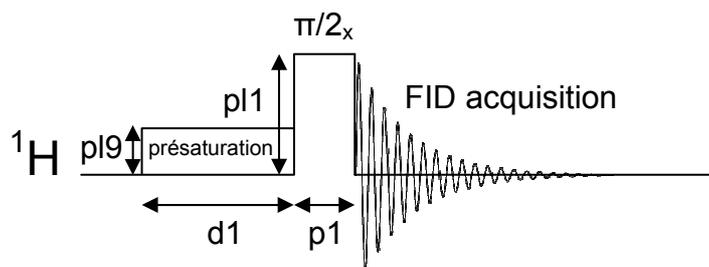


Figure 3.5 : Séquence de pulse « zgpr » utilisée pour l'acquisition du signal de la FID provenant des atomes ¹H du polymère HPMC-Si dialysé avec $d1$ le temps de relaxation, $p1$ et $p11$ la durée et la puissance du pulse $\pi/2$ suivant l'axe x , $p19$ la puissance du pulse de présaturation du signal ¹H.

Pour la réalisation des spectres 2D ²⁹Si-¹H, l'HPMC-Si avant dialyse a été dissous dans une solution deutérée de soude deutérée (NaOD dans D₂O) et la solution d'HPMC-Si dialysée (préparée avec du D₂O et NaOD) a été simplement diluée avec du D₂O. La séquence de pulse utilisée était une séquence HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) appelée « inv4gslplrnd » : elle est représentée sur la figure 3.6. Le premier

pulse de 90° appliqué sur le canal ^{29}Si après un temps $d2$, qui correspond à $1/(2 \ ^1J_{\text{SiH}})$, sert comme un filtre pour supprimer les corrélations entre les atomes de Si et les premiers protons voisins (à une distance d'une liaison chimique). Après un délai $d6$ correspondant à $1/(2 \ ^nJ_{\text{SiH}})$, le deuxième pulse crée la corrélation hétéronucléaire désirée entre les ^1H et ^{29}Si voisins espacés de plus d'une liaison chimique (couplage J à longue distance). Ce pulse enlève en même temps les signaux provenant des ^1H qui ne sont pas en couplage J avec les atomes de silicium.

Les paramètres expérimentaux de cette séquence étaient les suivants : $d1 = 2 \text{ s}$, $d2 = 0.00344828 \text{ s}$, $d6 = 0.06 \text{ s}$, $d13 = 3 \ \mu\text{s}$, $p1 = 10 \ \mu\text{s}$ (HPMC-Si dialysé) ou $13 \ \mu\text{s}$ (HPMC-Si avant dialyse), $p2 = 20 \ \mu\text{s}$ (HPMC-Si dialysé) ou $26 \ \mu\text{s}$ (HPMC-Si avant dialyse), $p3 = 13.5 \ \mu\text{s}$, $p11 = 0 \text{ dB}$, $p12 = -3 \text{ dB}$, $ns = 256$ (HPMC-Si dialysé) ou 160 (HPMC-Si avant dialyse).

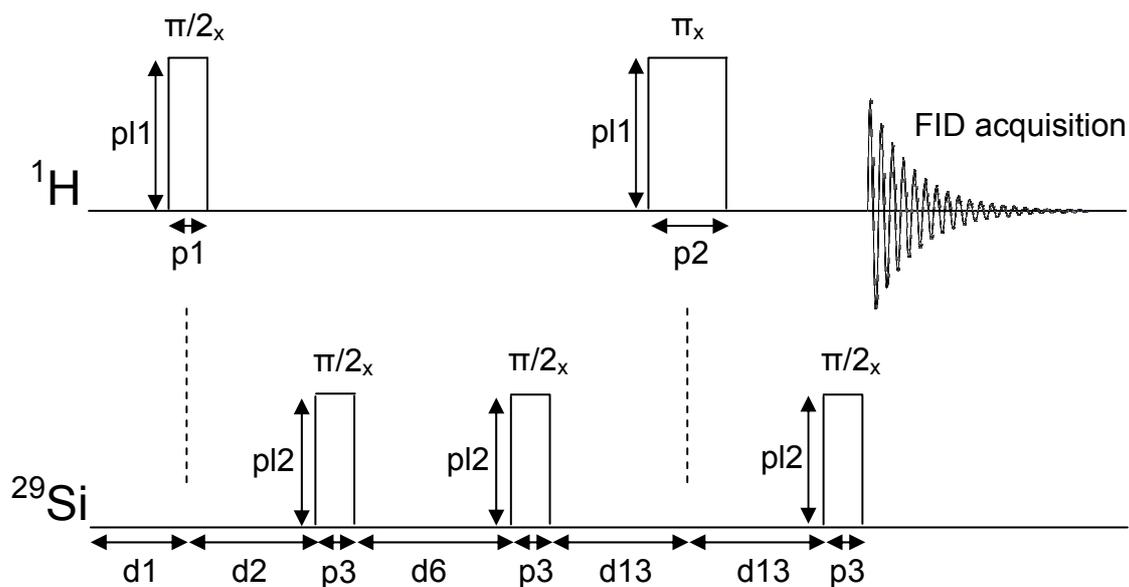


Figure 3.6 : Séquence de pulse HMBC 2D ^1H - ^{29}Si avec $d1$ le temps de relaxation, $p1$, $p2$ et $p3$ les durées des pulses sur le canal ^1H et ^{29}Si respectivement, $p11$ et $p12$ leurs puissances, et $d2$, $d6$ et $d13$ les délais entre les différents pulses.

D - Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images MEB des échantillons congelés et lyophilisés de manière classique ont été enregistrées à l'IMN sur le microscope JEOL 7600-F avec la tension d'accélération de

5 kV. Les échantillons congelés en isopentane ont été observés au LIOAD sur le microscope Zeiss SMT LEO 1450VP avec la tension d'accélération de 7 kV. Nous avons travaillé en mode électrons secondaires.

Les échantillons ont été collés sur des plots de MEB en laiton en utilisant une double-face en carbone. Ils ont été ensuite métallisés avec 2 couches de platine.

E - Cryo-microscopie électronique à balayage (Cryo-MEB)

La cryo-microscopie a été effectuée à la plateforme SCIAM de l'Université d'Angers avec l'aide de M. R. Mallet, sur le microscope Zeiss EVO LS10. La tension d'accélération appliquée était de 7 kV et la température dans la chambre d'observation du microscope était de -130 °C. Les images ont été obtenues en détectant les électrons secondaires.

Un morceau de chaque échantillon a été inséré dans une rayure sur un plot d'un MEB traditionnel. Le plot a été monté sur un porte échantillon et plongé dans de l'azote pâteux pendant quelques secondes. L'azote pâteux est obtenu à partir de l'azote liquide en abaissant sa pression. Le porte échantillon a ensuite été rapidement introduit dans la chambre de préparation du microscope, dont la température était à -130 °C et la pression à $\sim 10^{-4}$ Pa. La surface supérieure de l'échantillon congelé y a été découpée grâce à une guillotine. La glace superficielle a été sublimée pendant 10 min en augmentant la température à -87 °C, pour que les parois de polymère soient visibles sur la surface de l'échantillon. Puis, la température a été à nouveau ramenée à -130 °C et la surface de l'échantillon a été métallisée avec un plasma d'or créé directement dans la chambre de préparation en augmentant un peu la pression pendant 2 min. Le plasma (10 mA) crée une couche d'or d'environ 10 nm par minute. Finalement, l'échantillon ainsi préparé a été transféré dans la chambre d'observation du microscope dont la température était également à -130 °C et la pression à $\sim 10^{-4}$ Pa.

F – Diffusion de neutrons aux petits angles (SANS)

La diffusion de neutrons aux petits angles, dont le principe est décrit en Annexe 2-C, a été réalisée au LLB à Saclay avec Dr. D. Lairez. Les neutrons ont été générés par le réacteur nucléaire Orphée et les mesures s'effectuaient sur le spectromètre PACE équipé de multidétecteur (compteur à trifluorure de bore BF_3) composé de 30 anneaux concentriques larges de 1 cm (le diamètre du premier étant de 3 cm et le diamètre du dernier de 32 cm). Le schéma de ce spectromètre est présenté sur la figure 3.7. La longueur d'onde des neutrons a été sélectionnée grâce au monochromateur mécanique DORNIER avec $\Delta\lambda/\lambda$ entre 5 et 10 %.

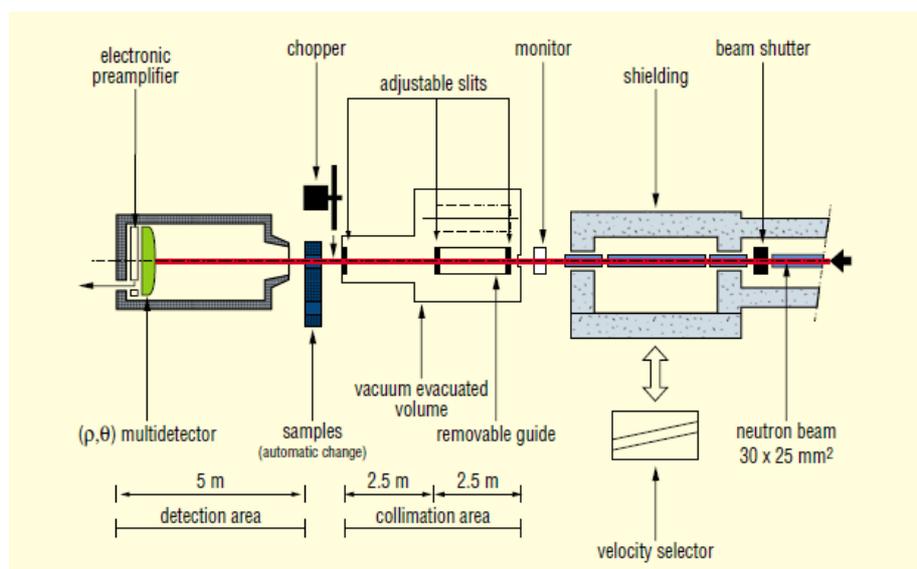


Figure 3.7 : Représentation schématique du spectromètre PACE au Laboratoire Léon Brillouin (CEA, Saclay) [13].

Tous les hydrogels d'HPMC-Si et les solutions d'HPMC ont été préparés en D_2O , les hydrogels contenant les NFs ont été également préparés en mélange $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (50 vol%/50 vol%). Les solutions précurseurs des hydrogels d'HPMC-Si ainsi que les solutions d'HPMC ont été injectées dans des cellules en quartz (Hellma, QS 100) de 5 mm d'épaisseur deux semaines avant les mesures. Les cellules ont été fermées hermétiquement pour éviter toute déshydratation et elles ont été stockées à température ambiante.

Comme pour la diffusion de la lumière, nous avons effectué les mesures des intensités diffusées par les échantillons en fonction de l'angle de diffusion θ , relié au module du vecteur de diffusion q par la relation $q = 4\pi n/\lambda \sin(\theta/2)$. Les mesures ont été faites dans les configurations suivantes :

- grands angles (valeurs de q comprises entre 0.04 et 0.4 \AA^{-1} , longueur d'onde $\lambda = 5 \text{\AA}$, distance détecteur-échantillon 1 m).
- moyens angles (valeurs de q comprises entre 0.01 et 0.1 \AA^{-1} , longueur d'onde $\lambda = 12 \text{\AA}$, distance détecteur-échantillon 1.5 m).
- petits angles (valeurs de q comprises entre 0.004 et 0.04 \AA^{-1} , longueur d'onde $\lambda = 12 \text{\AA}$, distance détecteur-échantillon 4.7 m).

Pour chaque configuration, la transmission de tous les échantillons (T_{ech}) ainsi que d'une cellule vide (T_{cel}) et d'une cellule remplie d'eau distillée (T_{eau} , H₂O : diffuseur incohérent) a d'abord été mesurée pendant 5 min, ensuite l'intensité diffusée (signal cohérent) pendant 60 min aux petits angles, 30 min aux moyens angles et 10 min aux grands angles ($I_{mesurées}$, I_{cel} , I_{eau}). Les transmissions ont été mesurées avec un atténuateur de faisceau de 10 mm d'épaisseur et sans le « beam stop ». Ce dernier est utilisé pour arrêter le faisceau direct sur le détecteur central lors de la mesure de la diffusion. Le faisceau direct étant trop intense par rapport aux intensités des faisceaux diffusés il empêcherait leur détection. La diffusion a donc été mesurée avec le « beam stop » et sans atténuateur. Aux petits angles, la diffusion et la transmission du cadmium (I_{Cd} , T_{Cd}) ont été faites pour obtenir le niveau du bruit de fond. Le signal provenant du faisceau vide (I_f , T_f) été mesuré quant à lui aux grands angles, car contrairement aux petits angles où le $\cos(\theta) \approx 1$, cette approximation n'est plus valable aux grands angles.

Les données ont été traitées sur le logiciel PAsidur créée par D. Lairez. Les intensités résultantes ont été obtenues comme :

$$I_{éch} = \frac{\frac{I_{mesurée}}{T_{éch}} - \frac{I_{cel}}{T_{cel}} - \frac{I_f}{T_f} - \frac{I_{Cd}}{T_{Cd}}}{\frac{I_{cel}}{T_{cel}} + \frac{I_{eau}}{T_{eau}} + \frac{I_{Cd}}{T_{Cd}} + \frac{I_f}{T_f}}$$

sachant que la correction par rapport au bruit de fond (cadmium) se fait uniquement aux moyens et petits angles et la correction par rapport à faisceau vide aux grands angles. La correction par rapport à un diffuseur incohérent (eau distillée) et nécessaire pour corriger les données par rapport aux variations d'efficacité des divers détecteurs (anneaux concentriques).

Un ajustement des spectres des hydrogels nanocomposites a été effectué par D. Lairez pour retrouver le rayon des nanofibres de silice. Puisque les nanofibres ont une forme cylindrique, l'ajustement des données a été fait en utilisant le facteur de forme d'un cylindre de rayon r , longueur $2l$ et orientation φ par rapport au vecteur q :

$$P_0(q, l, r, \varphi) = \left[\frac{\sin(ql \cos \varphi)}{ql \cos \varphi} \left[\frac{2J_1(qr \sin \varphi)}{qr \sin \varphi} \right]^2 \right]^2 \quad (3.1)$$

Pour une population polydisperse de nanofibres de rayon moyen R et de longueur moyenne $2L$ ayant des orientations aléatoires, le facteur de forme s'écrit :

$$P_0(q, R, \sigma_R, L, \sigma_L) = \int_0^\infty \int_0^{\frac{\pi}{2}} \int_0^{\frac{\pi}{2}} \int_0^{2\pi} P_0(q, l, r, \varphi) \sin \varphi r^4 l^2 p_r(r, R, \sigma_R) p_l(l, L, \sigma_L) \sin \varphi dr dl d\varphi d\phi \quad (3.2)$$

avec $p_x(x, X, \sigma_X)$ une fonction de distribution de x (par exemple une gaussienne) de moyenne X et écart type σ_X .

L'ajustement des données a été effectué avec la fonction suivante (pour $L \rightarrow \infty$) :

$$S(q, I_0, R, \sigma_R, I_{inc}) = I_0 P(q, R, \sigma_R, \infty, 0) + I_{inc} \quad (3.3)$$

Les 4 paramètres ajustables sont I_0 , I_{inc} , R et σ_R . I_0 dépend de la concentration en nanofibres et I_{inc} de la quantité de protons dans la solution. La fonction (3.3) est convoluée par la fonction de résolution instrumentale $\mathcal{R}(q', q, \sigma(q))$ (une fonction de distribution de q pour chaque point du spectre) pour calculer l'intensité théorique mesurée I_{th} :

$$I_{th}(q, I_0, R, \sigma_R, I_{inc}) = \int_0^{\infty} S(q', I_0, R, \sigma_R, I_{inc}) \mathcal{R}(q', q, \sigma(q)) dq' \quad (3.4)$$

Le but est de trouver les paramètres I_0 , I_{inc} , R et σ_R qui minimisent :

$$\chi^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[\frac{I_{th}(q_i) - I_{mes}(q_i)}{dI_{mes}(q_i)} \right]^2 \quad (3.5)$$

où n est le nombre de points I_{mes} mesurés et dI_{mes} l'erreur statistique sur chacun.

Un exemple d'ajustement des données obtenues sur l'hydrogel préparé en D_2O à base de 2 wt% d'HPMC-Si et contenant 3 wt% de NFs est présenté sur la figure 3.8.

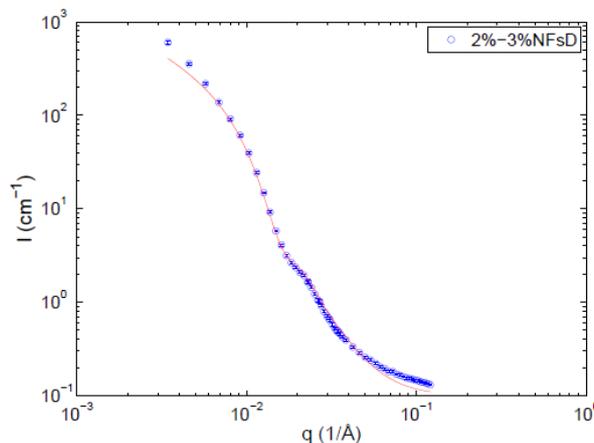


Figure 3.8 : Ajustement (ligne rouge) des données SANS (points bleus) obtenues sur l'hydrogel nanocomposite préparé en D_2O à base de 2 wt% d'HPMC-Si et contenant 3 wt% de NFs.

Le meilleur ajustement, effectué sur tous les hydrogels nanocomposites, a été obtenu pour $R = 20.8(\pm 0.7) \text{ nm}$ et $\sigma_R/R = 0.26(\pm 0.03)$. Le modèle n'est pas très bon à grandes valeurs de q , sur la figure 3.8 on voit que la courbe rouge s'écarte des points expérimentaux. Ceci est lié à la contribution du polymère qui n'est pas indépendante de q .

Pour s'affranchir de cet effet, il conviendrait de remplacer le I_{inc} dans l'équation (3.3) par une simple fonction de q . Mais cela nécessiterait beaucoup de travail, sachant que ça ne serait « que » pour obtenir la valeur du rayon des nanofibres de silices, connue grâce au MEB.

G - Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC a été effectuée par Dr. N. Boyard et Dr. C. Josset au laboratoire LTN à Polytech Nantes, sur l'appareil Q200 TA Instruments. Deux échantillons ont été étudiés : l'hydrogel d'HPMC-Si et la solution aqueuse « bulk » de la même composition que celle contenue dans l'hydrogel.

Les échantillons ont été pesés et introduits dans des creusets en aluminium fermés hermétiquement à température ambiante. Ensuite, une trempe rapide jusqu'à -50 °C a été réalisée à une vitesse d'environ 40 °C.min^{-1} . Puis, 10 cycles de -50 °C à 40 °C aller/retour ont été faits à une vitesse de 5 °C.min^{-1} . Puisque la forme de tous les cycles était reproductible, seulement les 4 derniers cycles ont été choisis pour être traités.

Les températures de fusion et de cristallisation ont été déterminées comme des températures moyennes sur les 4 maximas/minimas des pics respectifs. Les enthalpies de fusion et de cristallisation ont été obtenues en faisant la moyenne des 4 intégrales des surfaces sous les pics correspondants dans les graphiques représentant le flux de chaleur en fonction du temps. L'enthalpie de cristallisation a été choisie pour faire le calcul de la quantité de solution aqueuse « bulk » présente dans l'hydrogel, car les pics de cristallisation sont plus faciles à intégrer à cause de leurs limites bien définies.

H – Cryoporométrie

La cryoporométrie a été faite par Dr. P. Judeinstein au laboratoire ICMMO, Université Paris-Sud à Orsay. Il s'agit d'une technique RMN liquide dont le principe est décrit en Annexe 2-A. La cryoporométrie a été réalisée sur le spectromètre Bruker AVANCE 400 MHz équipé d'une sonde 4 mm QXO.

Les hydrogels ont été synthétisés en D₂O/NaOD pour cette étude pour pouvoir différencier les signaux provenant du polymère (¹H) et de la solution aqueuse (²H et aussi ¹H résiduels). Ils ont été préparés plus de deux semaines avant les mesures dans des petites boîtes plastiques et gardés à température ambiante et sous atmosphère humide jusqu'à leur utilisation. Des petits morceaux des hydrogels ont été découpés et insérés dans les tubes de la RMN liquide.

Tout d'abord, l'étalonnage de la température a été fait par tube méthanol/méthanol. Puis, une trempe des échantillons a été réalisée de la température ambiante à 220 K en quelques heures. Ensuite, les spectres des atomes d'hydrogène (¹H) et de deutérium (²H) ont été enregistrés en augmentant la température à une vitesse de 5-7 K.min⁻¹ jusqu'à 315 K. Le contrôle de la température a été assuré par flux d'azote et la stabilité de la température était de ± 0.2 °C. La relation entre la température réelle de l'échantillon et la température demandée est : $T_{\text{échantillon}} = -23.37 + 1.076 T_{\text{demandée}}$. Les valeurs des aires sous les pics dans les spectres ont été obtenues par l'intégration de ces derniers et elles ont été rapportées dans les graphiques en fonction de la température.

I – Diffusion quasi-élastique de neutrons (QENS)

La diffusion quasi-élastique de neutrons, dont le principe est décrit en Annexe 2-C, a été réalisée au LLB à Saclay par Dr. J.-M. Zanotti. Les neutrons ont été générés par le réacteur nucléaire Orphée et les mesures s'effectuaient sur le spectromètre à temps de vol appelé MIBEMOL, qui est schématisé sur la figure 3.9. La longueur d'onde utilisée était de 5.2 Å.

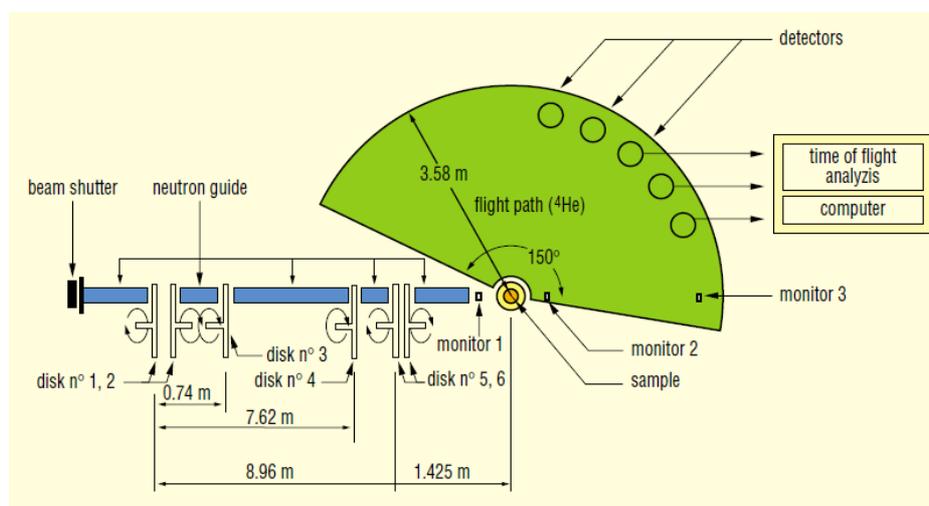


Figure 3.9 : Représentation schématique du spectromètre à temps de vol MIBEMOL au Laboratoire Léon Brillouin (CEA, Saclay) [13].

Les hydrogels d'HPMC-Si ont été préparés entièrement en H_2O ou en D_2O pour cette expérience. Les solutions précurseurs ont été injectées dans des cellules en aluminium, spécialement conçues pour la diffusion quasi-élastique de neutrons. L'épaisseur interne de la cellule contenant l'hydrogel préparé en H_2O est de 0.2 mm, l'épaisseur interne de la cellule contenant l'hydrogel en D_2O est de 2 mm. Les cellules, composées de deux morceaux, ont été fermées hermétiquement grâce au fil d'indium et aux vis serrées tout le long de la circonférence de chaque cellule. Les échantillons ont été stockés à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

Les mesures de la dynamique en fonction de la température (scan élastique) ont été faites sur l'hydrogel préparé en H_2O en refroidissant l'échantillon vers 50 K et en observant la variation du déplacement moyen $\langle u^2 \rangle$ des atomes d'hydrogène lors de la chauffe jusqu'à environ 300 K. Les données ont été comparées aux celles obtenues avec une cellule remplie d'eau distillée.

En mesurant la fonction de diffusion $S(q, \omega)$ à température ambiante (293 K) en fonction de ω et aux plusieurs angles de diffusion q pour les hydrogels en H_2O et en D_2O , nous avons pu obtenir une information qualitative sur la dynamique du polymère HPMC-Si. En effet, l'élargissement de la fonction S intégrée sur q est directement lié à la dynamique des atomes d'hydrogène dans les deux types d'échantillons.

J – RMN à gradient de champ pulsé (PGSE)

La PGSE a été réalisée au laboratoire ICMMO, Université de Paris-Sud à Orsay par Dr. P. Judeinstein. Il s'agit d'une technique RMN liquide dont le principe est décrit en Annexe 2-B. La PGSE a été réalisée à 300 K sur le spectromètre Bruker AVANCE 400 MHz équipé d'une sonde 5 mm BBOxyz.

Les hydrogels ont été préparés dans des petites boîtes plastiques plus de deux semaines avant les mesures et gardés à température ambiante et sous atmosphère humide jusqu'à leur utilisation. Des petits morceaux des hydrogels ont été découpés et insérés dans les tubes de la RMN liquide.

Le coefficient de diffusion D des molécules d'eau présentent dans les hydrogels a été déterminé en mesurant l'intensité I du signal provenant des atomes d'hydrogène en fonction de l'amplitude du gradient g_0 après avoir appliqué la série de pulse présentée sur la figure 2.2. Nous avons appliqué 16 valeurs d'amplitude du gradient g_0 allant de 0.674 à 32.030 G.cm⁻¹. L'intervalle de diffusion Δ a été fixé à 50 ms (200 ms pour l'hydrogel nanocomposite HPMC-Si + 3 wt% NFs) et la durée des gradients de champ appliqués était $\delta = 2.5$ ms. Le rapport gyromagnétique des atomes d'hydrogène est $\gamma_H = 267.5 \times 10^6$ rad.s⁻¹.T⁻¹. Le ou les coefficient(s) de diffusion D ont été déterminés en faisant un ou deux fit(s) exponentiel(s) de la fonction $I/I_0 = -D\gamma^2\delta^2g_0^2(\Delta-\delta/3)$.

K – Mesures du temps de gel

Les mesures du temps de gel ont été faites au LIOAD sur le rhéomètre Thermo HAAKE RheoStress 300 en configuration cône/plane (1° Ti/60 mm) à 23 °C.

Une mesure de temps de gel consistait à injecter 1.5 ml de solution précurseur de l'hydrogel sur le plateau du rhéomètre. Cette solution précurseur a été obtenue en mélangeant 1 ml de solution basique d'HPMC-Si avec 0.5 ml de solution TB dans deux seringues luer-lock interconnectées juste avant la mesure.

Les modules G' et G'' ont été mesurés pour 13 fréquences de cisaillement différentes allant de 1 à 22 Hz (sur une échelle logarithmique) pendant 30 s, ensuite une pause sans cisaillement de 30 s a été réalisée. Ces deux séquences ont été répétées pendant environ 1 h pour tous les échantillons. La variation du rapport $G''/G' = \tan \delta$ en fonction de la fréquence a été tracé au cours du temps. Le temps de gel a été déterminé comme le temps du milieu de la séquence de mesure pendant laquelle nous avons pu observer la non-variation de $\tan \delta$ avec la fréquence.

L – Mesures mécaniques

DMA

Pour cette étude, les hydrogels ont été préparés dans des puits plastiques destinés à la culture cellulaire suivant le protocole de l'Annexe 1-C deux semaines avant la mesure. Ils ont ensuite été démoulés à l'aide d'une spatule plastique, leurs dimensions ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et rentrées dans le logiciel utilisé pour la mesure. Ils ont eu une forme cylindrique d'un diamètre ~ 22 mm et d'une hauteur ~ 5.2 mm.

La DMA a été faite en mode compression uniaxial non confiné au LIOAD sur l'appareil ElectroForce® BOSE équipé d'un logiciel WinTest. Chaque échantillon a subi des déformations sinusoïdales à des fréquences allant de 0.1 à 10 Hz avec 3 points par décade sur une échelle logarithmique. Les vibrations sinusoïdales s'effectuaient autour de la position moyenne fixée à 5 % de la hauteur de l'échantillon avec une amplitude de ± 5 %. Pour chaque fréquence, les déformations sinusoïdales variaient donc de 0 à 10 % de la hauteur des échantillons (domaine linéaire). La valeur du module en compression E' a été prise à la fréquence de vibration de 1 Hz.

Les mesures s'effectuaient à 23°C et chaque type d'échantillon a été mesuré au moins deux fois pour obtenir un certain écart type.

Cisaillement

Comme pour l'étude précédente, les hydrogels ont été préparés dans des puits pour la culture cellulaire deux semaines auparavant. Les mesures s'effectuaient directement dans les puits sans démoulage préalable.

Les mesures du module en cisaillement ont été faites au LIOAD sur le rhéomètre Thermo HAAKE MARS III en configuration plan/plan (diamètre du disque de mesure en Ti : 20 mm) équipé d'un logiciel RheoWin. Le disque de mesure a été positionné sur la surface de chaque hydrogel en appliquant une force de 0.5 N pour assurer un contact suffisant et éviter le glissement lors du cisaillement. Les modules G' et G'' ont été mesurés pour des fréquences de cisaillement allant de 0.1 à 100 Hz avec 3 valeurs par décade (en échelle logarithmique) tout en appliquant une contrainte de 1 Pa. Ici encore, la valeur du module élastique en cisaillement G' a été prise à 1 Hz.

Les mesures s'effectuaient à 23 °C et chaque type d'échantillon a été mesuré au moins deux fois.

Relaxation de la contrainte

Les hydrogels ont été préparés dans des puits plastiques de la culture cellulaire deux semaines avant la mesure. Ils ont été démoulés à l'aide d'une spatule plastique et leurs dimensions ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. Ils ont eu une forme cylindrique d'un diamètre ~ 22 mm et d'une hauteur ~ 5.2 mm.

Les mesures ont été réalisées eu LIOAD sur l'appareil Stable Micro Systems en mode non-confiné avec un capteur de 5 kg, cylindre de compression en aluminium et de 20 mm de diamètre. Nous avons appliqué une force de contact de 5 g sur la surface de chaque échantillon, ensuite une déformation de 10 % de la hauteur de l'échantillon (pour rester dans le domaine linéaire) a été effectuée pendant 10 min. La relaxation de l'échantillon a été mesurée pendant ce temps, c'est-à-dire comment la contrainte évolue au cours du temps.

En calculant la différence en pourcents entre le maximum et le plateau de la courbe, représentant la variation de la force nécessaire pour appliquer la déformation en fonction du temps, il est possible d'évaluer la rigidité/élasticité d'un échantillon. Un pourcentage plus élevé indique une plus grande rigidité. Les mesures s'effectuaient à 23 °C, chaque type d'échantillon a été mesuré seulement une fois.

M – Diffraction des rayons X (DRX)

La DRX a été effectuée avec l'aide de P.-E. Petit sur l'appareil Siemens D5000 « Moxtek » en géométrie Bragg – Brentano $\theta/2\theta$ équipé d'un détecteur ponctuel résolu en énergie. La longueur d'onde des rayons X utilisés était celle de la ligne Cu K_{α} , c'est-à-dire $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$.

Les nanofibres ont été broyées dans un mortier et la poudre fine ainsi obtenue a été étalée sur un support pour la DRX et aplatie avec un verre lisse. Nous avons fait l'acquisition de l'intensité diffractée aux angles de diffraction allant de $2\theta = 1^{\circ}$ à $2\theta = 8^{\circ}$ avec un pas de 0.02° toutes les 10 secondes.

Notre diffractogramme contient 3 pics : à 2.86° , 4.9° et 5.6° . Il s'agit des pics correspondant aux plans de diffraction (100), (110) et (200), typiques d'une mésostructure hexagonale 2D (groupe d'espace $p6mm$)¹. En appliquant la loi de Bragg ($2d \sin\theta = n\lambda$) sur le pic (100), nous avons pu calculer la distance entre les plans de diffraction d , qui correspondent aux distances entre les centres des deux mésopores voisins dans les nanofibres. Sachant que l'ordre de diffraction est $n = 1$, nous avons $d \approx 3.1 \text{ nm}$.

N – Épifluorescence

La microscopie en épifluorescence a été réalisée à l'IMN avec l'aide de Dr. P. Bertoincini sur le microscope optique inversé Nikon Eclipse Ti-E équipé d'un objectif x10 sous atmosphère ambiante. L'excitation des échantillons se faisait avec une lampe UV dont la longueur d'onde se situait entre 330 et 380 nm, la détection a été faite grâce à un filtre passe-haut au-dessus de 450 nm.

Nous avons préparés 5 échantillons différents pour cette étude : l'hydrogel d'HPMC-Si pur, l'hydrogel d'HPMC-Si contenant un agrégat de NFs-dansyl laissé délibérément non-dispersé et 3 hydrogels nanocomposites avec 0.17, 0.33 et 1 wt% de NFs-dansyl. Les échantillons ont été préparés 2 semaines avant l'étude dans les boîtes de Petri non-fluorescentes faites en polystyrène (TPP Tissue Culture Dishes, Sigma Aldrich, 4 cm en diamètre, 2 mm en hauteur). Chaque échantillon a été déposé avec sa boîte directement sur le plateau du microscope pour pouvoir être observé. Plusieurs points dans le plan xy et en profondeur z ont été balayés afin de pouvoir comparer les intensités de la lumière émise aux différents endroits dans tout le volume de chaque hydrogel.

O – Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

La microscopie CLSM a été effectuée à l'INRA de Nantes avec l'aide de Mme B. Bouchet sur le microscope Nikon Eclipse Ti-A1 sous atmosphère ambiante. Le microscope a été équipé d'une source diode laser dont la puissance était de 16 mW et la longueur d'onde d'excitation $\lambda_{exc} = 375 \text{ nm}$. Nous avons utilisé un objectif x40 à immersion dans l'eau. La détection se faisait avec un filtre passe-haut laissant passer la lumière avec une longueur d'onde supérieur à 400 nm. L'ouverture numérique a été choisie de 1.25, ce qui correspond à la profondeur de champs de 0.66 μm .

Nous avons utilisé les mêmes hydrogels nanocomposites que pour l'épifluorescence. Un petit morceau de chaque échantillon a été découpé et déposé sur une lame de verre. Nous avons observé les deux surfaces de chaque échantillon pour savoir si la sédimentation des nanofibres a eu lieu au cours la gélification. Pour faire une reconstitution d'un volume en 3D, une série d'images a été réalisée suivant l'axe z (axe vertical) avec un pas de 0.5 μm .

Annexe 4 – Etude de la cytotoxicité

Avant toute étude de cytotoxicité, les solutions basiques d'HPMC-Si ainsi que les solutions tampon B contenant ou non les nanofibres de silice ont été stérilisées dans l'autoclave Aphaklave® 23 à 120 °C pendant 20 min sous atmosphère humide.

Culture cellulaire

Les cellules SW1353 et hASC ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Invitrogen Corp., France) au sein d'un incubateur à 5% de CO₂ et à 37 °C. Le milieu de culture a été enrichi avec 10% de FBS (Fetal Bovine Serum), 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de l-glutamine. Cette solution de culture a été changée tous les 2-3 jours.

Etude de la cytotoxicité en 2D

Les deux types de cellules ont été déposés avec le milieu de culture au fond des puits pour la culture cellulaire dans des plaques de 24-puits avec une densité finale de 10 000 cellules par cm². 24 h après, une fois que les cellules ont été bien attachées au fond, le milieu de culture a été enlevé et remplacé par la solution précurseur de chaque type d'hydrogel (500 µl/puits, la description de la préparation des hydrogels est décrite en Annexe 1). Ces échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 1 h avant que le milieu de culture soit rajouté (1 ml par puits). Après 1, 2, 3, et 6 jours d'incubation, le milieu de culture ainsi que les hydrogels ont été enlevés par aspiration. Pour chacun de ces temps d'incubation 4 exemplaires de chaque type d'échantillon ont été préparés afin de pouvoir faire une analyse statistique des résultats.

Les cellules ont également été cultivées sans hydrogel comme un contrôle positif de leur viabilité et prolifération. Les cellules cultivées en présence d'actinomycine D (5 µg.ml⁻¹) ont présenté un contrôle négatif : l'actinomycine D induit la mort des cellules.

L'ajout du bleu de trypan a été effectué pour pouvoir compter les cellules et l'essai avec le sel MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium ; Promega, USA) a été fait pour observer leur activité mitochondriale. La solution de MTS a été mise dans chaque puits pendant 1 h, en suivant les instructions du fabricant. La densité optique du formazan, le produit de la réduction du sel MTS par les enzymes mitochondriales des cellules vivantes, a été mesurée par le spectrophotomètre à 490 nm.

Etude de la cytotoxicité en 3D

Les cellules SW1353 et hASC ont été dispersées dans les solutions précurseurs des hydrogels dans les 5 min suivant leur préparation (la préparation des hydrogels est décrite en Annexe 1-B) et donc avant leur gélification à une concentration finale de 1 000 000 cellules par ml d'hydrogel. 500 μ l de chaque mélange ont été versés dans chaque puits d'une plaque de 24-puits pour la culture cellulaire et ils ont été incubés à 37 °C pendant 1 h pour obtenir une réticulation. Ensuite, 1 ml du milieu de culture DMEM a été rajouté par puits et les échantillons ont été incubés pendant 1, 2, 3 ou 6 jours. Chaque type d'échantillon a été préparé en 4 exemplaires pour chacun des temps d'incubation pour pouvoir faire une analyse statistique des résultats. Des échantillons d'hydrogel pur contenant 5 μ g.ml⁻¹ d'actinomycine D ont également été préparés comme contrôle négatif pour la mort cellulaire.

La viabilité cellulaire en 3D a été évaluée en utilisant le test Live&Dead Assay Kits® (Invitrogen, France) et l'analyse des images par microscopie confocale (CLSM). Pour cela, le milieu de culture dans chaque puits a été remplacé par 200 μ l de solution contenant 2,5 ml de DMEM avec 0,25 μ l de calcéine-AM et 5 μ l d'éthidium homodimère-1. 45 min après, le mélange des marqueurs fluorescents a été enlevé et les hydrogels ont été bien rincés avec la solution tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) avant leur observation au microscope confocal.

Les images CLSM ont été enregistrées sur un microscope Nikon D-eclipse C1 équipé avec un laser argon/krypton. Deux positions (*x,y,z*) ont été choisies au hasard pour

chaque échantillon et une série d'images a été prise suivant l'axe z . Les 210 images obtenues par échantillon ont été analysées à l'aide d'un quantimètre Q550 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Références bibliographiques

- [1] Rambaud, F. Elaboration de matériaux hybrides par procédé sol-gel pour application pile à combustible PEMFC. *Thèse de doctorat*, Université Pierre et Marie Curie, CEA, Paris, **2011**.
- [2] Rambaud, F.; Vallé, K.; Thibaud, S.; Julián-López, B.; Sanchez, C., One-Pot Synthesis of Functional Helicoidal Hybrid Organic-Inorganic Nanofibers with Periodically Organized Mesoporosity. *Advanced Functional Materials* **2009**, 19, (18), 2896-2905.
- [3] Strange, J. H.; Rahman, M.; Smith, E. G., Characterization of porous solids by NMR. *Physical Review Letters* **1993**, 71, (21), 3589-3591.
- [4] Jackson, C. L.; McKenna, G. B., The melting behavior of organic materials confined in porous solids. *The Journal of Chemical Physics* **1990**, 93, (12), 9002-9011.
- [5] Stejskal, E. O.; Tanner, J. E., Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics* **1965**, 42, (1), 288-292.
- [6] Canet, D.; Boubel, J.-C.; Canet-Soulas, E., *La RMN: Concepts, méthodes et applications*. 2 ed.; Dunod: Paris, **2002**.
- [7] Alba-Simionesco, C., Etude des propriétés dynamiques des fluides confinés par diffusion quasiélastique de neutrons. *Collection SFN* **2007**, 8, (Ecole Thématique Surfaces, Interfaces, Milieux Confinés par Diffusion de Neutrons), 43-60.
- [8] Raphaël, E.; Bellocq, A. M.; Cotton, J. P.; Hennion, M.; Mirebeau, I.; Lairez, D.; Calmettes, P.; Nallet, F.; Schmitt, V.; Mathon, M. H.; Novion, C. H.; Rawiso, M., Diffusion de Neutrons aux Petits Angles. *Journal de Physique IV* **1999**, 9, (PR1), 1-147.
- [9] Lairez, D.; Pelta, J., Diffusion de neutrons aux petits angles : application à l'étude des macromolécules biologiques en solution. *Journal de Physique IV France* **2005**, 130, 39-62.
- [10] Zanotti, J. M., Vibrations et relaxations dans les molécules biologiques. Apports de la diffusion incohérente inélastique de neutrons. *Journal de Physique IV* **2005**, 130, 87-113.

- [11] Bée, M., La diffusion quasi-élastique des neutrons; introduction et principes généraux. *Journal de Physique IV* **2000**, 10, (PR1), 1-14.
- [12] 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. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2001**, 12, (3), 201-205.
- [13] Laboratoire Léon Brillouin, CEA, Saclay. <http://www-llb.cea.fr/> (Consulté le **20 Septembre 2012**).

Résumé

Les hydrogels à base d'un dérivé cellulosique silanisé : hydroxypropylméthylcellulose silanisé (HPMC-Si) ont été développés en tant que biomatériaux pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. La dérivatisation inorganique par une fonction siloxane d'un polysaccharide permet d'obtenir un gel injectable polycondensant in situ. L'objectif de cette thèse était de disperser des nanofibres de silice (NFs) au sein de ces hydrogels afin d'améliorer leurs caractéristiques rhéologiques et mécaniques. A 3 wt% de NFs, les hydrogels nanocomposites possèdent un module en compression 5 fois supérieur à celui de l'hydrogel pur et restent cytocompatibles avec des chondrocytes et des cellules souches.

De manière parallèle, un travail sur la compréhension de la structure du polysaccharide silanisé lui-même ainsi que sur la description de la structure, la morphologie et la dynamique de l'eau dans les hydrogels d'HPMC-Si a été réalisé. Il a été déterminé que l'eau confinée dans les hydrogels d'HPMC-Si est présente sous deux formes : l'eau d'hydratation et l'eau dite « bulk ». L'eau d'hydratation est en interaction avec les parties hydrophiles du polymère via les liaisons hydrogène, tandis que l'eau « bulk » se comporte comme de l'eau volumique classique. Les mesures des coefficients de diffusion montrent qu'à 300 K, les molécules d'eau « bulk » diffusent sur les distances de l'ordre de 10 µm sans être affectées par la présence du réseau polymère. Nous pensons donc que les hydrogels d'HPMC-Si ont une morphologie hiérarchisée, avec des pores de taille micrométrique dont les parois sont constituées de maillage nanométrique d'HPMC-Si.

Mots clés : Hydrogels, nanocomposite, polysaccharide, nanofibres, ingénierie tissulaire du cartilage, structure, dynamique.

Abstract

The hydrogels based on a cellulosic derivative, silanized hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC), are developed as biomaterials for applications in articular cartilage tissue engineering. The inorganic derivatization of a polysaccharide utilizing a silane function provides an injectable gel which can polycondense in situ. Moreover, dispersion of silica nanofibers within the hydrogels enhances their rheological and mechanical properties. With 3 wt% of nanofibers the nanocomposite hydrogel's compressive modulus is 5 times higher than that of the pure hydrogel. Such a nanocomposite hydrogel remains cytocompatible with respect to chondrocytes and human stem cells.

At the same time, a study on silanized polysaccharide structure as well as a description of the structure and morphology of the gel, then a study of the water dynamics in the Si-HPMC hydrogels are realised. The water confined in Si-HPMC hydrogels is found to exist in two different forms: water of hydration and « bulk » water. The water of hydration interacts with the hydrophilic parts of the polymer by hydrogen bond formation, while the « bulk » water behaves as ordinary bulk water. The measurements of diffusion coefficient at 300 K show that the molecules of « bulk » water diffuse over distances in the order of 10 µm without being affected by the polymer network presence. Thus, the Si-HPMC hydrogels seem to have a hierarchically organized morphology with micrometer sized pores whose pore walls are made of a nanometric mesh.

Key words : Hydrogels, nanocomposite, polysaccharide, nanofibers, cartilage tissue engineering, structure, dynamics.