



HAL
open science

Viscoélasticité et structure de gels à base de chitosane - Relations avec les propriétés diffusionnelles de macromolécules dans ces biogels

Linda Payet

► **To cite this version:**

Linda Payet. Viscoélasticité et structure de gels à base de chitosane - Relations avec les propriétés diffusionnelles de macromolécules dans ces biogels. Dynamique des Fluides [physics.flu-dyn]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2005. Français. NNT : 2005PA077077 . tel-00011265

HAL Id: tel-00011265

<https://theses.hal.science/tel-00011265>

Submitted on 24 Dec 2005

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 7

SPECIALITE : PHYSIQUE MACROSCOPIQUE

Présentée par

Linda PAYET

Pour obtenir le titre de docteur de l'UNIVERSITE PARIS 7 – DENIS DIDEROT

Titre de la thèse :

**VISCOELASTICITE ET STRUCTURE DE GELS À BASE DE CHITOSANE -
RELATIONS AVEC LES PROPRIÉTÉS DIFFUSIONNELLES DE
MACROMOLECULES DANS CES BIOGELS**

Soutenu le : 17 juin 2005

devant la commission d'examen :

J. L. DOUBLIER	rapporteur
J. F. TASSIN	rapporteur
L. LÉGER	examineur
P. FLAUD	examineur
J. L. GROSSIORD	examineur
A. PONTON	directeur de thèse

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse :

- ❖ en particulier, Alain Ponton qui m'a guidée depuis mon stage de DEA et durant ma thèse. Je lui suis aussi reconnaissante du dévouement dont il fait preuve dans son travail et dont j'ai largement bénéficié,
- ❖ Jean-Louis Grossiord pour l'attention qu'il a porté à mon travail, de mon stage de DEA à ma thèse,
- ❖ Florence Agnely qui m'a aidé à maintes occasions à résoudre des problèmes expérimentaux et des questions de physico-chimie des polymères,
- ❖ Hubert Hervet et Liliane Léger qui m'ont initié à la technique de recouvrement par fluorescence après photolyse,
- ❖ Florence Noirez qui m'a permis de faire des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles et m'a aidé à traiter nos données,
- ❖ Jean-Louis Doublier et Jean-François Tassin qui ont accepté d'examiner ce mémoire et m'ont fait l'honneur de leur présence lors de la soutenance,
- ❖ Patrice Flaud qui en tant que Directeur du LBHP m'a accueilli chaleureusement en stage de DEA et puis en thèse,
- ❖ Pierre Colinart en premier lieu pour son amitié et pour son aide précieuse en chimie et dans la mise en œuvre de mon étude de la diffusion gel-gel de la caféine dans les gels de chitosane.

Je remercie chaleureusement tout le personnel administratif, les techniciens-ingénieurs et les chercheurs du LBHP pour leurs différents coups de mains et leur accueil.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont fait découvrir Paris et les joies d'y vivre.

Je remercie tout spécialement pour leur confiance, l'affection qu'ils me portent (depuis mon berceau pour certains), leur soutien dans tout ce que j'entreprends : ma mère, mon père, mes frères Jean-Luc et Jean-Yves, et mes amis Nicolas et Baptiste.

INTRODUCTION.....	4
CHAPITRE I. PRESENTATION DES SYSTEMES.....	8
I.1 PRESENTATION DU CHITOSANE.....	8
I.1.1 Définition	8
I.1.2 Le chitosane en solution	9
I.1.3 Propriétés et applications du chitosane	10
I.2 GENERALITES SUR LES GELS.....	11
I.3 GELS DE CHITOSANE.....	13
I.3.1 Gel de chitosane seul (gel de référence)	13
I.3.2 Réseau semi-interpénétré chitosane/poly(oxyéthylène)	14
I.4 UNE SONDE FLUORESCENTE : LE DEXTRAN-FITC.....	15
I.4.1 Dextran	15
I.4.2 FITC	16
I.4.3 Dextran-FITC	17
CHAPITRE II. CARACTERISATION DES ECHANTILLONS DE CHITOSANE.....	20
II.1 MATERIEL.....	20
II.2 DETERMINATION DE LA MASSE MOLAIRE PAR VISCOSIMETRIE.....	20
II.2.1 Méthode	20
II.2.2 Résultats	21
II.3 DETERMINATION DU DEGRE DE DEACETYLATION PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF).....	23
II.3.1 Méthode	23
II.3.2 Résultats	23
II.4 PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES SOLUTIONS DE CHITOSANE.....	25
II.4.1 Protocole	25
II.4.2 Résultats et interprétations des mesures en écoulement	26
II.4.3 Variations de la viscosité à très faible vitesse de cisaillement en fonction de la concentration	30
II.4.3.1 Comparaison du comportement des solutions de chitosane avec les prédictions théoriques.....	31
II.4.3.2 Comparaison des valeurs des exposants déterminées dans notre étude avec les données expérimentales de la littérature.....	34
II.4.3.3 Comparaison des concentrations d'enchevêtrements déterminées dans notre étude avec celles de la littérature.....	34
II.5 CONCLUSION.....	34
CHAPITRE III. ETUDE RHEOLOGIQUE DE LA CINETIQUE DE GELIFICATION DES RESEAUX DE CHITOSANE.....	38
III.1 THEORIE.....	39
III.1.1 Dynamique de la transition sol-gel	40
III.1.2 Gamme de fréquences	46
III.2 MATERIEL ET METHODES.....	47
III.2.1 Préparation des gels de chitosane	47
III.2.1.1 Matériel.....	48
III.2.1.2 Protocoles.....	48
a) <i>Dissolution du chitosane : préparation de la solution-mère</i>	48
b) <i>Solution de chitosane / POE</i>	49
c) <i>Gélification</i>	49
III.2.2 Géométrie et protocole de mesure	50
III.3 RESULTATS.....	50
III.3.1 Comportement général	51
III.3.2 Effet de la masse molaire	53
III.3.2.1 Variation du temps de gélification en fonction de la masse molaire.....	53
III.3.2.2 Variations de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au temps de gélification en fonction de la masse molaire.....	54
III.3.2.3 Évolutions de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au cours de la gélification en fonction de la masse molaire.....	56

III.3.2.4 Évolutions du temps de relaxation au cours de la gélification en fonction de la masse molaire.....	58
III.3.2.5 Évolutions du module d'équilibre au cours de la gélification en fonction de la masse molaire	59
III.3.2.6 Évolutions normalisées du temps de relaxation et du module d'équilibre au cours de la gélification	60
III.3.3 Effet de la concentration du chitosane.....	63
III.3.3.1 Variation du temps de gélification en fonction de la concentration de chitosane	63
III.3.3.2 Variations de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au temps de gélification en fonction de la concentration de chitosane.....	65
III.3.3.3 Évolutions de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au cours de la gélification en fonction de la concentration de chitosane	68
III.3.3.4 Évolutions du temps de relaxation au cours de la gélification en fonction de la concentration de chitosane.....	69
III.3.3.5 Évolutions normalisées du temps de relaxation et du module d'équilibre au cours de la gélification	70
III.3.4 Effet du pH.....	73
III.3.5 Effet de la teneur en POE	74
III.3.5.1 Influence de la concentration en POE sur le temps de gélification et la structure des réseaux au temps de gélification.....	75
III.3.5.2 Évolutions de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au cours de la gélification en fonction de la concentration de POE	76
III.3.5.3 Évolutions normalisées du temps de relaxation et du module d'équilibre au cours de la gélification	78
III.3.6 Discussion générale.....	80
III.3.6.1 Viscoélasticité à t_g	80
III.3.6.2 Viscoélasticité au cours de la gélification.....	82
CHAPITRE IV. CARACTERISATION STRUCTURALE DES RESEAUX DE CHITOSANE PAR DIFFUSION DE NEUTRONS AUX PETITS ANGLES.....	87
IV.1 MATERIEL ET METHODE.....	87
IV.1.1 Principe.....	88
IV.1.2 Exploitation d'un spectre de diffusion de neutrons pour un réseau de polymère.....	88
IV.1.3 Protocole.....	90
IV.2 RESULTATS ET DISCUSSION	91
IV.3 CONCLUSION.....	94
CHAPITRE V. DIFFUSION DE MOLECULES DE DEXTRAN DANS DES HYDROGELS DE CHITOSANE.....	97
V.1 MATERIEL ET METHODES.....	100
V.1.1 Matériel.....	100
V.1.2 Fluorimétrie en milieu acide.....	100
V.1.3 Étude cinétique de la gélification d'un réseau de chitosane chargé de dextran-FITC	101
V.1.4 Étude de la diffusion de dextran à l'aide de la technique de FRAP par réseau de franges.....	101
V.1.4.1 Principe du FRAP	101
V.1.4.2 Préparation des systèmes	103
V.1.4.3 Protocole de mesure.....	104
V.2 RESULTATS	104
V.2.1 Fluorimétrie en milieu acide.....	104
V.2.2 Étude cinétique de la gélification d'un réseau de chitosane chargé de dextran-FITC	107
V.2.3 Étude de la diffusion du dextran à l'aide de la technique de FRAP par réseau de franges.....	109
V.2.3.1 Diffusion de dextran dans l'eau.....	110
a) Les données de la diffusion dans l'eau	110
b) Exploitation des données de la diffusion dans l'eau	112
V.2.3.2 Diffusion dans les solutions de chitosane	116
a) Les données de la diffusion dans les solutions de polymères.....	116
b) Exploitation des données de la diffusion dans les solutions de polymères.....	118
V.2.3.3 Diffusion dans les gels de chitosane	121
a) Les données de la diffusion dans les gels.....	121

<i>b) Exploitation des données de la diffusion dans les gels</i>	125
<i>c) Modélisation de la diffusion</i>	127
V.3 CONCLUSION	130
CONCLUSION GENERALE	135
Annexes	138

INTRODUCTION

Les hydrogels de polymères sont une classe particulière de gels dans lesquels une certaine quantité d'eau est retenue par une quantité généralement beaucoup plus faible (0,1 à 10 %) de polymères ayant formé un réseau tridimensionnel. Ces systèmes combinent à la fois les propriétés d'un liquide et d'un solide. On dit que ce sont des matériaux viscoélastiques. Ils sont à la base de nombreuses applications industrielles dans l'agro-alimentaire, le biomédical, les cosmétiques, l'industrie pharmaceutique... Ils interviennent par exemple dans l'enrobage de médicaments, comme matrice pour immobiliser des enzymes ou comme support chromatographique. De plus, ces systèmes ont des propriétés chimiques et physiques modulables [Rodriguez (2003)] selon la structure moléculaire du polymère utilisé, la concentration, l'agent gélifiant... Par conséquent, ils sont souvent l'objet d'études pour optimiser leur utilisation. Actuellement, un certain nombre de travaux portent sur la mise au point de réseaux semi-interpénétrés ou interpénétrés à base d'un polymère principal réticulé de façon covalente et d'un polymère associé. Les chaînes du second polymère sont connectées soit par des liaisons physiques dans le premier type de réseau soit par des liaisons chimiques dans le second [Mi (2002)]. Ces associations de différents polymères confèrent aux réseaux de nouvelles propriétés.

En vue de ces différentes applications (pharmaceutiques, biomédicales...), il est important d'étudier les propriétés physiques et chimiques de ces réseaux. Ainsi, il est intéressant de comprendre l'évolution du matériau en cours de la gélification, de connaître la structure microscopique du gel et l'influence de celle-ci sur les propriétés de transport de masse en son sein.

L'objet de cette thèse est de mener ces études sur un hydrogel particulier à base de chitosane. Outre sa qualité de servir d'exemple d'hydrogel, le gel de chitosane possède des caractéristiques propres de grand intérêt. Le chitosane est un polyélectrolyte. On peut donc facilement moduler les paramètres structurels du gel, par exemple par modification du pH. C'est également un polysaccharide disponible en grande quantité à l'état naturel. Il est non toxique, biocompatible, biodégradable et non-fermentable. Dans ce travail, le réseau de chitosane est formé par liaisons covalentes. Par ailleurs, le chitosane peut être associé au polyoxyéthylène (POE) pour former des réseaux semi-interpénétrés de chitosane/POE. Le POE a été choisi parce qu'il est biologiquement inerte, biocompatible et de faible toxicité. De

ce fait, c'est un polymère déjà très utilisé pour des applications pharmaceutiques. Dans ces réseaux, le POE est supposé être connecté au réseau de chitosane par des liaisons strictement physiques [Khalid (1999)] [Khalid (2002)]. Dans ces travaux, Khalid a montré que le POE améliore les propriétés de gonflement des réseaux et renforce leurs propriétés mécaniques. La modulation de ces propriétés est justement importante dans le cadre de la fabrication de systèmes à libération contrôlée de médicaments par exemple.

La littérature montre qu'il existe de nombreux paramètres, en plus de la teneur en POE, permettant le contrôle du processus de gélification et les propriétés mécaniques et de gonflement du chitosane. Le premier objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la masse molaire du chitosane, de la concentration de chitosane, du pH et de la teneur en POE sur la formation des hydrogels de chitosane, leur cinétique de formation et leur structure à chaque instant. Le deuxième objectif est de comprendre les mécanismes de transport de masse dans les gels de chitosane en relation avec leur structure.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons en premier lieu étudié par spectroscopie mécanique les propriétés viscoélastiques des réseaux de chitosane seul (réseau de référence) et des réseaux semi-interpénétrés au cours de la gélification. Il est à noter que les études antérieures sur les réseaux semi-interpénétrés, en particulier, ont été réalisées sur des gels à l'équilibre. Aucune, à notre connaissance, n'a porté sur l'étude cinétique de la gélification de ces réseaux. Nous avons ainsi étudié l'influence de paramètres physico-chimiques (masse molaire et concentration de chitosane, pH et teneur en POE) sur la cinétique de réticulation et la structure des systèmes au cours de la gélification.

Une deuxième phase d'expériences a permis de déduire une taille de maille caractéristique des réseaux de chaînes de chitosane, réticulés chimiquement ou simplement enchevêtrés, par diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA). Au cours de celle-ci, nous avons étudié l'influence du pH, de la concentration de chitosane, de sa masse molaire et de la concentration de POE sur cette taille de maille.

Enfin, nous avons étudié les propriétés diffusionnelles de traceurs modèles au sein de ces gels en collaboration avec Liliane Léger et Hubert Hervet du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée au Collège de France. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique de recouvrement de fluorescence après photolyse par réseau de franges [Davoust (1982)]. Cette méthode expérimentale consiste à créer un profil de fluorescence sinusoïdal et à suivre l'évolution de la seconde harmonique du signal de recouvrement de fluorescence au cours du

temps pour mesurer la diffusion de particules sondes. Nous avons utilisé cette technique pour sonder les mailles des réseaux de chitosane du dextran-FITC. Cette molécule est adéquate dans l'étude des phénomènes de diffusion parce qu'elle existe dans une large gamme de masses molaires. Nous avons ainsi pu caractériser la diffusion de ces macromolécules de taille variable dans les réseaux de chaînes de chitosane réticulés de façon covalente ou simplement enchevêtrés.

Dans le détail, ce manuscrit est divisé en cinq chapitres. Le premier résume les propriétés et les nombreuses applications du chitosane, introduit les gels en général, celui de chitosane seul et ceux de réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE en particulier. Nous y présentons aussi le dextran-FITC qui est utilisé comme sonde de diffusion.

Le deuxième chapitre présente les caractéristiques des échantillons de chitosane utilisés dans nos différentes études (masse molaire, degré de déacétylation) et les propriétés rhéologiques de solutions aqueuses de chitosane. Ces caractéristiques sont nécessaires à la compréhension des processus de réticulation.

Le troisième chapitre expose d'abord les méthodes connues pour déterminer le temps de gélification et certains paramètres structuraux à partir de mesures rhéologiques, puis les protocoles mis en place pour la fabrication des échantillons. Enfin, nous y détaillons les résultats obtenus qui permettent de mettre en évidence l'influence de paramètres physico-chimiques sur ce temps de gélification et sur les paramètres structuraux.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude par diffusion de neutrons aux petits angles de la maille d'un réseau de chitosane réticulé chimiquement ou non en fonction de différents paramètres physico-chimiques. Cette étude a été effectuée au Laboratoire Léon Brillouin du CEA de Saclay en collaboration avec Laurence Noirez.

Le cinquième chapitre a pour objet l'étude de la diffusion de macromolécules de dextran dans les gels de chitosane après une présentation des propriétés de fluorescence du dextran-FITC en milieu acide et des résultats de l'étude cinétique de la gélification des réseaux de chitosane en présence de dextran-FITC.

L'ensemble de ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec Florence Agnely et Jean Louis Grossiord du Laboratoire de Physique Pharmaceutique UMR 8612 à l'Université Paris XI (France).

RÉFÉRENCES :

J. Davoust, P. F. Devaux, L. Léger, *Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules*, The EMBO Journal 1, 10, 1233-1238 (1982)

M. N. Khalid, L. Ho, F. Agnely, J. L. Grossiord, G. Couarraze, *Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network, comparaison with a chitosan reference gel*, S. T. P. Pharma Sciences, 9, 4, 349-364 (1999)

M. N. Khalid, *Synthèse, caractérisation, stérilisation et étude des propriétés de réseaux à base de chitosane. Application à la libération contrôlée pour l'administration orale et comme enrobage pour des prothèses endovasculaires*, Doctorat de l'Université Paris XI, Pharmacotechnie et Physico-chimie, Université Paris XI (2002)

F-L. Mi, H-W. Sung, S-S. Shyu, *Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent*, Carbohydrate Polymers, 48, 61-72 (2002)

R. Rodriguez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Cationic cellulose hydrogels : kinetics of the cross-linking process and characterization as pH- / ion-sensitive drug delivery systems*, Journal of Controlled Release, 86, 253–265 (2003)

Chapitre I. PRESENTATION DES SYSTEMES

I.1 PRESENTATION DU CHITOSANE

I.1.1 Définition

Le chitosane est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranose liés en β (1-4). C'est un polysaccharide tel la cellulose. Cette macromolécule est obtenue par N-déacétylation d'un des polymères naturels les plus abondants, la chitine, extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes [Muzzarelli (1977)]. La Figure 1 représente les motifs de la cellulose, de la chitine et du chitosane. Leurs structures diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C2 ; hydroxyle pour la cellulose, acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane.

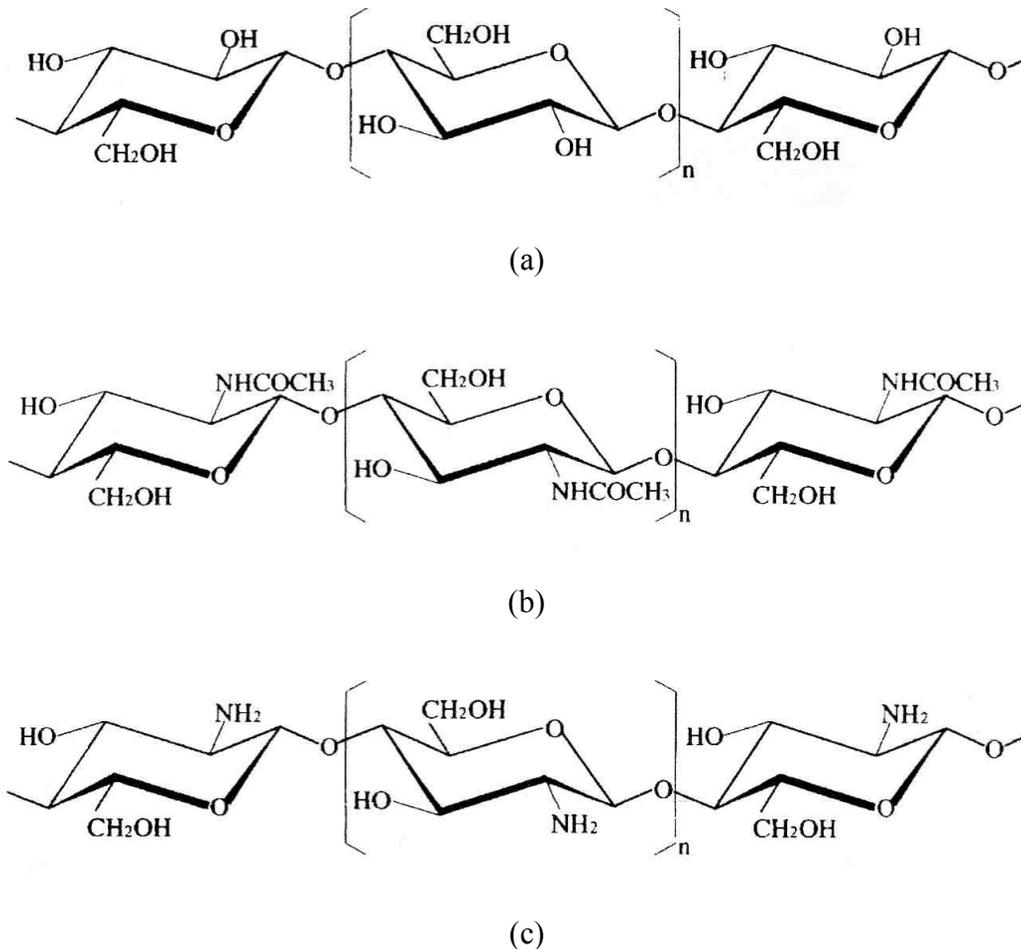


Figure 1 : Molécules de la cellulose (a), de la chitine (b) et du chitosane (c) [Okuyama (2000)]

Le procédé de N-déacétylation de la chitine consiste à hydrolyser les groupements aminoacétylés de la chitine en milieu alcalin fort [Muzzarelli (1977)]. La chitine étant insoluble dans l'eau et de nombreux autres solvants, on ne peut l'utiliser que sous forme de chitosane.

I.1.2 Le chitosane en solution

Les propriétés du chitosane sont dépendantes principalement de la masse molaire (qui est souvent très élevée comme pour tous les polysaccharides) et du degré de déacétylation (DDA) défini comme le pourcentage d'unités 2-acétamido-2-déoxy-glucopyranose de la chitine de départ qui sont, après déacétylation, des unités 2-amino-2-déoxy-glucopyranose. Le DDA varie considérablement selon le procédé de fabrication et sa valeur influence fortement la solubilité du chitosane.

En effet, le chitosane se dissout uniquement en milieu acide par protonation des groupes amine présents sur la macromolécule. L'équilibre suivant décrit l'état d'ionisation du polyélectrolyte en solution :



Le pKa du chitosane est approximativement 6,3. Ainsi, lorsque le DDA est peu élevé c'est-à-dire lorsque les groupements amine sont en petite quantité, le chitosane est peu soluble. En général, on utilise du chitosane avec un DDA supérieur à 70 % pour avoir une grande partie soluble.

De même, la conformation des chaînes du polymère en solution et donc la viscosité de ces solutions dépendent du pH et du DDA. En effet, ces deux paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère. Lorsque celle-ci est élevée, les chaînes de polymères sont très étendues et la viscosité est importante. En revanche, lorsque le polymère est peu chargé, les chaînes sont sous forme de pelotes statistiques caractérisées par une faible viscosité. Un certain nombre d'auteurs ont étudié l'effet du pH et du DDA sur la viscosité du chitosane en solution [Anthonsen (1993)], [Pa (2001)], [Rinaudo (1999)].

D'après Pa *et al*, les chaînes de chitosane, dont le DDA vaut 85%, sont flexibles pour des pH supérieurs à 3. Dans le cadre de notre travail (pH > 4), les chaînes de chitosane peuvent être considérées comme flexibles.

I.1.3 Propriétés et applications du chitosane

Les applications du chitosane sont variées et les nouvelles études pour en développer ne cessent de se multiplier à cause de ses propriétés physico-chimiques et biologiques [Muzzarelli (1988)]. Il est entre autres non fermentable, biocompatible, biodégradable et non toxique. De plus, son coût de fabrication est peu élevé.

A titre d'exemple, quelques propriétés utilisées dans les différents champs d'application du chitosane sont données dans le Tableau 1. Une description plus complète des applications du chitosane pourra être trouvée dans [Kumar (2000)].

Champ d'application	Applications	Propriétés
Pharmacie	Encapsulation de médicaments	Matériel absorbable avec possibilité de contrôle de libération de principes actifs (enzyme, médicament)
Clinique	Membrane de dialyse, pansements	Rétention d'eau, d'ions, stimulation de la régénération des tissus
Cosmétiques	Crème, shampooing, démêlant	Rétention de l'humidité, anti-électrostatique, surfactant
Industrie agro-alimentaire	Restructuration des purées de fruits, de légumes ou de viande	Formation de film, épaississant
Traitement des eaux	Agent flocculant de cations	Polyélectrolytes ; chélation de métaux

Tableau 1 : Quelques propriétés et applications des gels de chitosane

Il est donc d'un grand intérêt en pharmacie, dans l'industrie agro-alimentaire, pour les cosmétiques à cause de ces propriétés viscoélastiques qui peuvent varier de manière très significative même pour des petites quantités de polymère. Il peut donc être utilisé comme modificateur de texture, stabilisant...

Dans de nombreuses applications, le chitosane est utilisé sous forme d'hydrogels et plus précisément d'hydrogels chargés, le chitosane étant un polyélectrolyte en milieu acide. Les

gels de chitosane se sont avérés très intéressants pour immobiliser des médicaments [Chandy (1998)] ou des enzymes [Airoldi (2000)] et permettre une libération contrôlée de ces molécules selon le pH du milieu environnant.

Récemment, Ramanathan *et al.* [Ramanathan (2001)] ont montré que le chitosane est aussi intéressant pour produire des matrices à libération contrôlée sous l'effet d'un champ électrique. Elles pourraient être utilisées pour des libérations transdermales de médicaments.

I.2 GENERALITES SUR LES GELS

Les gels sont des réseaux tridimensionnels constitués par une faible quantité (0,1 à 10 %) d'une substance dans lesquels l'eau ou un autre solvant est retenue. Ils peuvent ainsi être obtenus à l'aide de tensioactifs, d'émulsions, de suspensions ou de polymères. Les gels dont il est question dans cette étude sont des hydrogels produits par réticulation à partir de chaînes de polymères.

Selon les interactions qui existent au sein du milieu, on classe les réseaux de macromolécules en deux principales catégories [Durand (1990)] : les gels non-permanents ou réversibles et les gels permanents ou irréversibles.

Pour les gels non-permanents, les noeuds de réticulation sont des associations intermoléculaires dues à des liaisons faibles réversibles (énergie de liaisons comprise entre 1 et 40 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [Israelachvili (1985)]) : ponts d'hydrogène (ex : $\text{H}-\text{O}\cdots\text{H}$), interactions électrostatiques de type Van der Waals, ponts ioniques (ex : $\text{COO}^-\cdots\text{Na}^+\cdots\text{OOC}$). Ces liaisons conduisent à la formation de zones de jonction (Figure 2) ayant une structure plus ou moins ordonnée.

Les gels permanents sont produits par liaisons covalentes (énergie de liaison comprise entre 150 et 900 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [Israelachvili (1985)]) entre chaînes linéaires préexistantes (vulcanisation) ou entre des unités de monomères dont certaines au moins ont une fonctionnalité supérieure à deux (polycondensation) ou encore par polymérisation en chaîne de monomères dont les groupes de réactifs sont des doubles liaisons. Ces trois cas sont représentés sur la Figure 3.

La Figure 4 représente pour sa part la structure générale d'un gel irréversible de polymères flexibles dans lequel apparaît, outre les points de réticulation, des boucles et des extrémités de chaînes pendantes. Ces réseaux sont très inhomogènes.

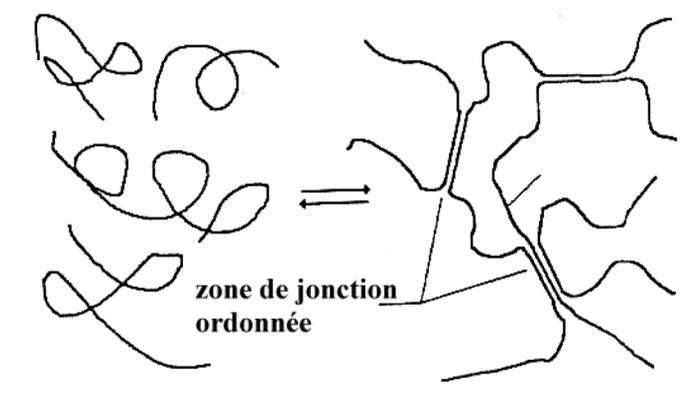
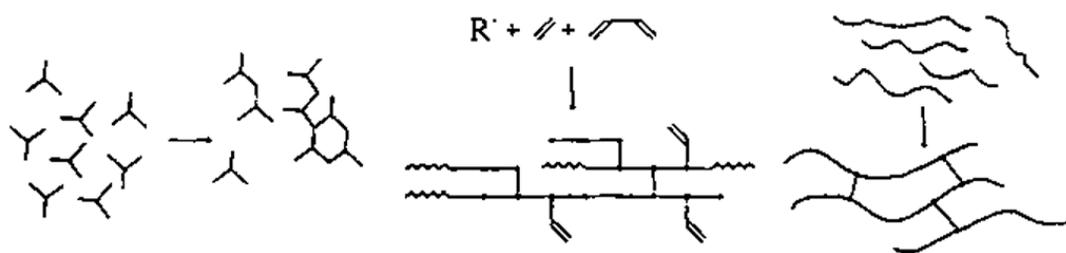


Figure 2 : Schéma de formation d'un gel réversible [Durand (1990)]



(a) Polycondensation

(b) Polymérisation en chaîne

(c) Vulcanisation

Figure 3. Schéma de formation de gels irréversibles [Durand (1990)]

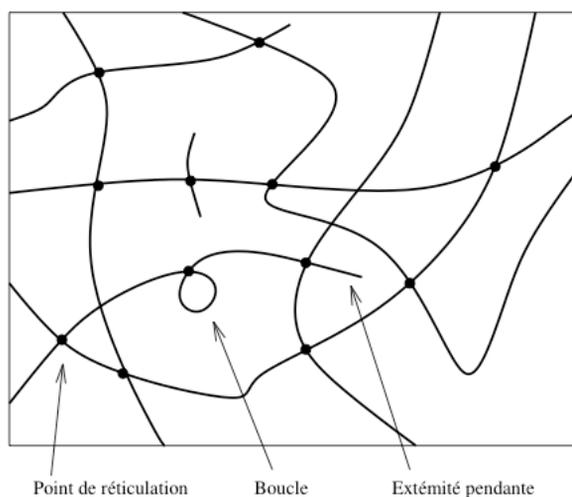


Figure 4 : Schéma d'un gel irréversible [De Gennes (1979)]

I.3 GELS DE CHITOSANE

I.3.1 Gel de chitosane seul (gel de référence)

Les hydrogels de chitosane peuvent se former par liaisons permanentes ou non-permanentes. Les différentes réticulations possibles et les applications associées ont été résumées par Berger *et al.* [Berger (2004)]. Le chitosane peut être réticulé par exemple en augmentant la concentration du polymère. Il y a alors formation de liaisons hydrophobes dues aux groupements acetamide conduisant à la formation d'un gel réversible. En fait, le chitosane est le plus souvent réticulé par liaisons covalentes en présence d'aldéhyde, tels le formol (CH₂O), le glyoxal (C₂H₂O₂) et le glutaraldéhyde (C₅H₈O₂) en milieu acide ou basique. La réaction régissant la réticulation consiste à former une base de Schiff (imine). En milieu acide, le mécanisme de la réaction est le suivant [Roberts 1989] :

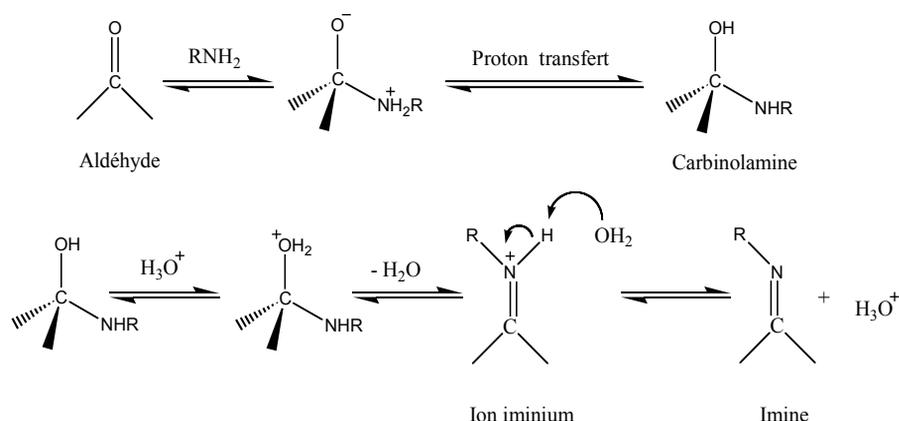


Figure 5. Mécanisme de réticulation du chitosane par formation de liaisons chimiques avec un aldéhyde [Guo (1998)]

C'est une réaction de condensation entre l'aldéhyde et une amine en présence d'hydrogène labile.

Les gels de chitosane permettent le transport d'un grand nombre de molécules thérapeutiques des plus simples telle la caféine aux plus complexes comme les protéines (BSA par exemple). La variété de ces molécules dont le chitosane peut être transporteur a été résumée par Kas [Kas (1997)].

Les propriétés physiques et chimiques des gels de chitosane sont modulables. Elles peuvent être contrôlées en particulier par le degré de déacétylation [Vachoud (2000), (2001)], l'acide utilisé pour dissoudre le polymère [Orienti (2002)] ou par l'ajout de POE (poly(oxyéthylène)) pour former des réseaux semi-interpénétrés de chitosane/POE [Khalid (1999)].

I.3.2 Réseau semi-interpénétré chitosane/poly(oxyéthylène)

Le POE est un polymère linéaire de formule $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$. Il appartient à la classe des polymères amphiphiles : il possède sur son squelette une partie hydrophobe ($-CH_2-CH_2-$) et une partie hydrophile ($-O-$). Il est donc soluble dans l'eau ainsi que dans les solvants organiques. Ces propriétés lui confèrent un grand intérêt dans les applications industrielles.

De plus, il est quasiment inerte en milieu physiologique et possède une toxicité qui peut être considérée comme nulle. C'est un polymère déjà très utilisé dans l'industrie pharmaceutique entre autres comme matrice d'immobilisation et qui suscite de nombreuses études [Biehl (2004)].

Le réseau semi-interpénétré chitosane/POE est un réseau covalent de chitosane dans lequel s'enchevêtrent des chaînes de POE (Figure 6). En effet, il a été montré à l'aide de la chromatographie par perméation de gel et de la viscosimétrie qu'il n'existe aucune liaison irréversible ni entre le chitosane et le POE, ni entre le POE et le glyoxal en solution [Khalid (2002)]. Il n'existe donc que des interactions physiques entre les deux polymères.

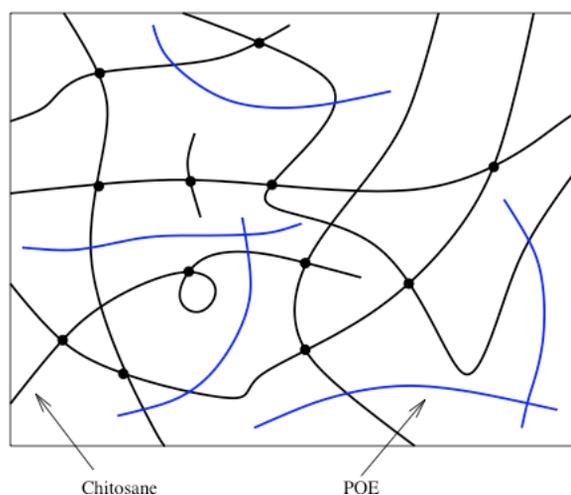


Figure 6. Schéma d'un réseau semi-interpénétré de chitosane/POE

Ces systèmes ont ainsi été développés pour produire des matrices à libération contrôlée de médicaments au niveau de l'estomac ($pH = 1,2$) et de l'intestin ($pH = 7,2$) [Patel (1996)]. La présence de POE, dont le caractère hydrophile favorise la pénétration du solvant, dans un gel de chitosane entraîne une augmentation des propriétés de gonflement du gel [Khalid (1999)]. Ceci entraîne alors la libération de médicament contrôlée par le pH du milieu de relargage.

Tout comme pour les réseaux de chitosane seul, les hydrogels constitués de ces deux polymères permettent le transport d'une grande variété de molécules [Calvo (1997)].

L'ajout de POE améliore aussi la résistance mécanique des gels de chitosane du fait des contraintes topologiques qui s'établissent entre les deux réseaux de polymères [Khalid (1999)]. À notre connaissance, il existe peu d'études portant sur la modulation des propriétés rhéologiques des réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE [Khalid (1999)].

I.4 UNE SONDE FLUORESCENTE : LE DEXTRAN-FITC

Pour étudier les propriétés de transport des réseaux de chitosane, nous avons utilisé du dextran-FITC (fluorescéine isothiocyanate).

I.4.1 Dextran

Le dextran est un polymère α -D-glucopyranose dont les liaisons entre les monomères se font en α -(1,6) et en partie en α -(1,3) (Figure 7).

C'est un polysaccharide hydrophile produit par la bactérie *Leuconostoc*. Il est soluble dans l'eau, neutre, de faible toxicité et relativement inerte. Il peut être oxydé en milieu alcalin.

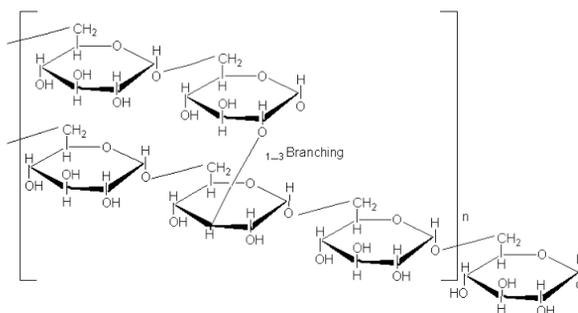


Figure 7. Macromolécule de dextran

La masse d'un monomère de dextran est de 162 g/mol. On utilise souvent cette macromolécule dans les études de diffusion en particulier parce qu'elle possède une large distribution de masses molaires. Les dextrans de masse molaire supérieure à 10000 g/mol sont hautement branchés et possèdent des propriétés de chaînes flexibles en solution. En revanche, les dextrans de masse molaire inférieure à 2000 g/mol ne sont quasiment pas branchés et sont plutôt rigides. La nature de ces branchements a été étudiée par Smit *et al.* [Smit (1992)]. Ces

auteurs ont montré que les dextrans possédaient non pas de courts branchements répartis sur la chaîne principale mais de longs branchements placés aléatoirement.

I.4.2 FITC

Le FITC (Fluorescéine IsoThioCyanate) est un dérivé de la fluorescéine. Sa molécule est représentée sur la Figure 8. Ces propriétés de fluorescence sont principalement celle de la fluorescéine.

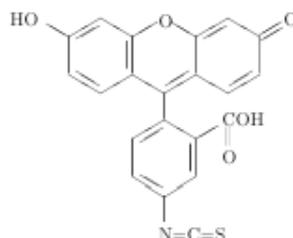


Figure 8. Molécule de fluorescéine isothiocyanate (FITC)

La fluorescéine est un colorant inerte. De part sa structure chimique, la fluorescéine est un indicateur de pH (Figure 9). En effet, selon le pH, l'ionisation de cette molécule est différente.

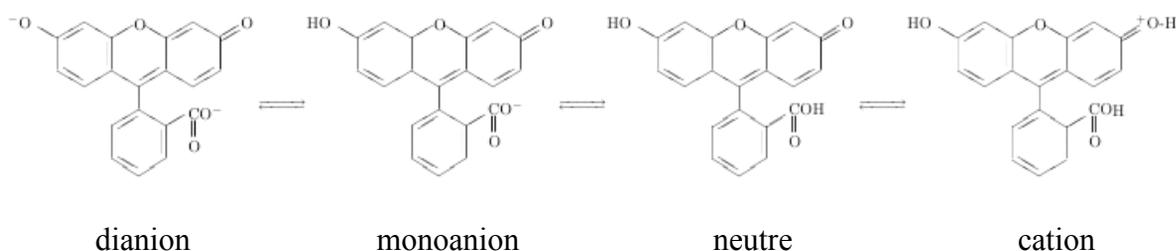


Figure 9. Structure de la fluorescéine selon le pH

Ainsi, à un pH supérieur à 9, la forme dianion domine. L'acidification de la solution conduit au monoanion ($pK_a \sim 6,4$) puis à la forme neutre ($pH < 5$) et enfin au cation ($pH \sim 2,1$). De plus, selon l'ionisation de la fluorescéine, le spectre de fluorescence varie. En particulier, les intensités d'absorbance et de fluorescence diminuent lorsque le pH diminue. Pour une valeur de pH proche du $pK_a \sim 6,4$, ses longueurs d'excitation et d'émission maximale sont 491 nm et 515 nm respectivement.

Par ailleurs, selon les dérivés de la fluorescéine, la longueur d'excitation varie de 490 à 512 nm, la longueur d'émission de 515 à 538 nm et le pKa est compris entre 6,4 et 6,9.

I.4.3 Dextran-FITC

Le dextran-FITC résulte de la liaison chimique de dextrans avec des groupes fluorescents de fluorescéine isothiocyanate (FITC). La fluorescéine conjuguée au dextran possède des longueurs d'excitation et d'émission maximale et un pKa pratiquement inchangé par rapport au colorant seul.

Bien que la macromolécule de dextran-FITC soit très utilisée pour des études de diffusion [Taylor (1989)], il existe très peu de données dans la littérature sur cette macromolécule fluorescente, en particulier sur sa fluorescence en fonction de paramètres physico-chimiques comme le pH [Andrieux (2002)].

Pour notre étude, ces données ont été nécessaires puisque ces molécules sont amenées à diffuser en milieu acide (gel de chitosane). Nous avons donc dû étudier les effets du pH en milieu acide sur la fluorescence du dextran-FITC.

RÉFÉRENCES

- C. Airoidi, O. A. C. Monteiro, *Chitosan-organosilane hybrids-syntheses, characterization, copper adsorption, and enzyme immobilization*, Journal of Applied Polymer Science, 77, 797-804 (2000)
- K. Andrieux, P. Lesieur, S. Lesieur, M. Ollivon, C. Gabrielle-Madelmont, *Characterization of fluorescein isothiocyanate-dextrans used in vesicle permeability studies*, Analytical Chemistry, 74, 20, 5217-5226 (2002)
- M. W. Anthonsen, K. M. Varum, O. Smidsrod, *Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation*, Carbohydrate Polymers, 22, 193-201 (1993)
- J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 57, 35-52 (2004)

- J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny, *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 57, 19–34 (2004)
- R. Biehl, X. Guo, R.K. Prud'homme, M. Monkenbusch, J. Allgeier, D. Richter, *Diffusion of compact macromolécules through polymer meshes : mesh dynamics and probe dynamics*, Physica B : Condensed Matter, 350, 1/3, 76-78 (2004)
- P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vita-Jato, M. J. Alonso, *Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers*, Journal of Applied Polymer Science, 63, 125-132 (1997)
- T. Chandy, D. L. Mooradian, G. H. R. Rao, *Chitosan/Polyethylene glycol-alginate microcapsules for oral delivery of hirudin*, Journal of Applied Polymer Science, 70, 2143-2153 (1998)
- P. G. de Gennes, *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell University Press, Ithaca, NY (1979)
- D. Durand, *Les réseaux macromoléculaires et les gels*, Groupe Français des Polymères, chap 5 (1990)
- B. Guo, A. Elgsaeter, B. T. Stokke, *Gelation kinetics of scleraldehyde-chitosan co-gels*, Polymer Gels and Networks, 6, 113-135 (1998)
- J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface forces*, Academic Press (1985)
- S. Kas, *Chitosan : properties, preparation and application to microparticule systems*, Journal of Microencapsulation, 14, 6, 689-711 (1997)
- M. N. Khalid, L. Ho, F. Agnely, J.L. Grossiord, G. Couarraze, *Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network comparison with a chitosan reference gel*, STP Pharma Sciences, 9 (4), 359-364 (1999)
- M. N. Khalid, *Synthèse, caractérisation, stérilisation et étude des propriétés de réseaux à base de chitosane. Application à la libération contrôlée pour l'administration orale et comme enrobage pour des prothèses endovasculaires*, Doctorat de l'Université Paris XI, Pharmaceutique et Physico-chimie, Université Paris XI (2002)
- M. N. V. R. Kumar, *A review of chitin and chitosan applications*, Reactive and functional polymers, 46, 1-27 (2000)

- A. Muzzarelli, A. Riccardo, *Chitin*, Pergamon Press, Oxford, chap 2 (1977)
- R. Muzzarelli, V. Baldassarre, F. Conti, P. Ferrara, G. Biagini, G. Gazzanelli, V. Vasi, *Biological activity of chitosan : ultrastructural study*, Biomaterials, 9, 247-252 (1988)
- K. Okuyama, K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, K. Ogawa, *Structural diversity of chitosan and its complexes*, Carbohydrate Polymers, 41, 237-247 (2000)
- I. Orienti, T. Cerchiara, B. Luppi, F. Bigguci, G. Zuccari, V. Zecchi, *Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery*, International Journal of Pharmaceutics, 238, 51-59 (2002)
- J-H Pa, T. L. Yu, *Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions*, Macromolecular Chemistry and Physics, 202, 985-991 (2001)
- V. R. Patel, M. M. Amiji, *pH-sensitive swelling and drug-release properties of chitosan-poly(ethylene oxide) semi-interpenetrating polymer network*, chap 17, ACS symposium series 627 (1996)
- S. Ramanathan, L. H. Block, *The use of chitosan gels as matrices for electrically-modulated drug delivery*, Journal of Controlled Release, 70, 109-23 (2001)
- M. Rinaudo, G. Pavlov, J. Desbrières, *Influence of acetic concentration on the solubilization of chitosan*, Polymer, 40, 7029-7032 (1999)
- G. A. F. Roberts, K. E. Taylor, *The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde*, Makromolekulare Chemie, 190, 951-960 (1989)
- J. A. M. Smit, J. A. P. P. Van Dijk, M. G. Mennen, M. Daoud, *Polymer size exponents of branched dextrans*, Macromolecules, 25, 3585-3590 (1992)
- D. L. Taylor, Y. Wang, *In fluorescence microscopy of living cells in culture*, Part B, quantitative fluorescence microscopy-imaging and spectroscopy methods in cell biology, Academic Press, 30 (1989)
- L. Vachoud, N. Zydowicz, A. Domard, *Physicochemical behaviour of chitin gels*, Carbohydrate Research, 326, 295-304 (2000)
- L. Vachoud, N. Zydowicz, A. Domard, *Sorption and desorption studies on chitin gels*, International Journal of Biological Macromolecules, 28, 93-101 (2001)

Chapitre II. CARACTERISATION DES ECHANTILLONS DE CHITOSANE

La masse molaire et le degré de déacétylation des chaînes de chitosane sont les principales caractéristiques qui déterminent leur conformation en solution [Anthonsen (1993)], [Berth (2002)], [Schatz (2003)] et par là même influencent la formation des gels [Draget (1996)], [Nyström (1999)]. Leur détermination est donc nécessaire.

Par ailleurs, les propriétés des réseaux de chitosane gélifiés dépendent, comme nous le verrons, des propriétés des solutions de polymères utilisées lors de leur préparation. Pour cette raison, il est important d'étudier les propriétés rhéologiques des solutions de chitosane. Cette étude a été menée en fonction de la concentration pour deux échantillons de chitosane de masse molaire différente.

II.1 MATÉRIEL

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé quatre échantillons de chitosane de masses molaires différentes. Ces échantillons sont nommés 04M, 06M, 1M et 2M. Les deux premiers échantillons proviennent de chez Fluka et les deux autres de chez Aldrich. La masse molaire a été donnée par le fournisseur pour le 04M et 06M. Pour les deux autres échantillons (1M et 2M) la masse molaire a été déterminée par viscosimétrie capillaire. Nous avons aussi déterminé les degrés de déacétylation (DDA) des différents échantillons de chitosane.

II.2 DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLAIRE PAR VISCOSIMÉTRIE

II.2.1 Méthode

La viscosimétrie capillaire consiste à déterminer la viscosité intrinsèque de la solution diluée de polymère qui est liée à la masse molaire moyenne viscosimétrique du polymère par l'équation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = kM_v^a \quad \text{Éq II.1}$$

où M_v est la masse molaire moyenne viscosimétrique du polymère, k et a sont les coefficients de Mark-Houwink dont les valeurs sont respectivement $1,81 \cdot 10^{-3}$ ml/g et 0,93 pour des solutions de chitosane préparées dans l'acide acétique 0,1M / NaCl 0,2M à 20°C [Roberts (1982)].

Pour mesurer la viscosité des solutions de chitosane, un viscosimètre capillaire de type Ubbelohde a été utilisé. La mesure consiste à déterminer le temps d'écoulement, t , d'un volume déterminé de solution dans un tube capillaire vertical à une température donnée. L'écoulement laminaire s'établit sous l'effet de la pesanteur. La viscosité absolue, η , de la solution se déduit du temps d'écoulement par la relation suivante :

$$\eta = \rho \cdot K_{\text{cap}} \cdot t \quad \text{Éq II.2}$$

où K_{cap} est une constante d'appareil caractéristique du capillaire utilisé qui vaut $0,0031 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ dans notre étude et ρ est la masse volumique de la solution qui est très peu différente de celle du solvant dans la gamme de concentration en polymère de l'étude. Pour chaque solution, les mesures de la viscosité sont répétées dix fois.

La viscosité réduite, η_{red} , de la solution diluée de polymère est reliée à la viscosité absolue (η) :

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s C} = \frac{t - t_s}{t_s C} \quad \text{Éq II.3}$$

où η_s est la viscosité du solvant et C la concentration en polymère. t et t_s représentent respectivement les temps d'écoulement d'un volume donné de la solution et du solvant.

On trace alors les variations de la viscosité réduite en fonction de la concentration en polymère. La viscosité intrinsèque, $[\eta]$, correspond à l'extrapolation linéaire de la viscosité réduite à concentration nulle.

Les mesures ont été effectuées pour des solutions de chitosane dissous sous agitation magnétique dans des solutions aqueuses d'acide acétique 0,1M / NaCl 0,2M. Les concentrations des solutions varient entre 0,1 et 1 mg/ml. Les solutions sont ensuite filtrées sur un support swinness 25 équipé d'un papier filtre sans cendre. La température de mesure est fixée à 20 °C.

II.2.2 Résultats

Nous avons représenté sur la Figure 1 les variations de la viscosité réduite (η_{red}) en fonction de la concentration en chitosane pour l'échantillon 1M.

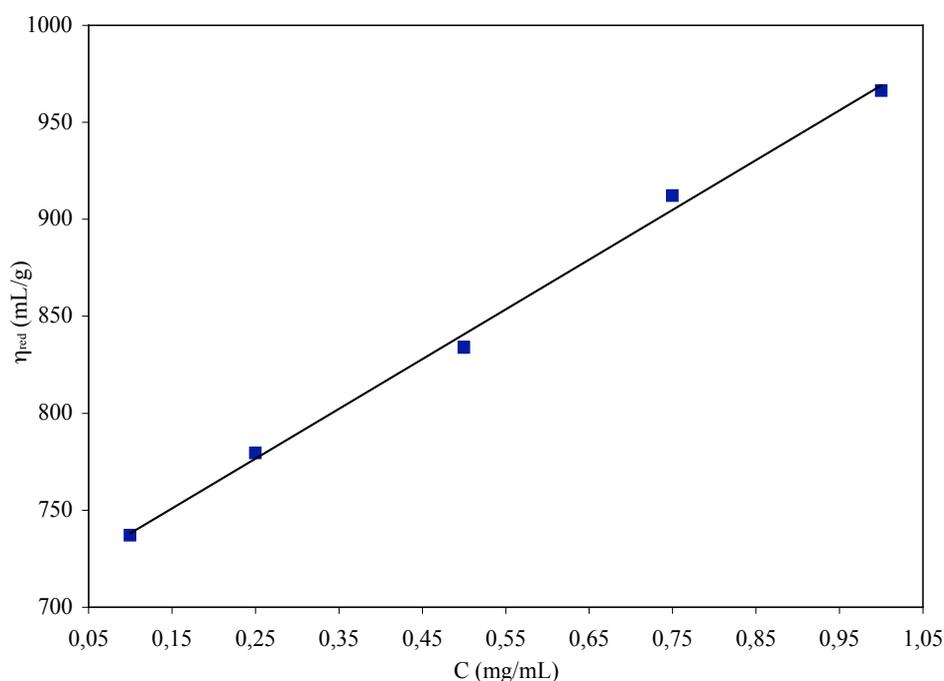


Figure 1. Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration de chitosane pour l'échantillon 1M à 20°C

L'extrapolation à concentration nulle de la variation de η_{red} en fonction de C permet de déterminer $[\eta]$ égale à 712,34 mL/g. À partir de cette valeur et de l'équation de Mark-Houwink (Éq II.1), on peut calculer la masse molaire du chitosane 1M.

De la même manière, nous avons déterminé la masse molaire de l'échantillon 2M. Les deux valeurs sont données dans le Tableau 1.

Les masses molaires des différents échantillons de chitosane sont rassemblées dans le Tableau 1.

Chitosane	04M	06M	1M	2M
M (g/mol)	$0,4 \cdot 10^6^*$	$0,6 \cdot 10^6^*$	$1,0 \cdot 10^6^{**}$	$2,1 \cdot 10^6^{**}$

Tableau 1. Masse molaire des différents échantillons de chitosane : * donnée fournisseur, ** caractéristique déterminée par viscosimétrie

II.3 DÉTERMINATION DU DEGRÉ DE DÉACÉTYLATION PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE À TRANSFORMÉE DE FOURIER (IRTF)

II.3.1 Méthode

Le degré de déacétylation (noté DDA dans la suite) est le pourcentage d'unités 2-acétamido-2-déoxy-glucopyranose de la chitine de départ, qui après déacétylation, sont des unités 2-amino-2-déoxy-glucopyranose (voir Figure 1 du Chapitre I). Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le DDA du chitosane. Les plus utilisées sont les méthodes basées sur l'électrochimie, la RMN ^1H , la spectrophotométrie UV [Brugnerotto (2001)]. La limite de ces techniques est la solubilité des matériaux en milieu aqueux. Pour pallier à cet inconvénient, on peut utiliser la RMN du solide qui ne permet de déterminer le DDA que dans un domaine limité ou la spectroscopie infrarouge qui permet la caractérisation des échantillons quel que soit leur DDA. C'est cette dernière technique que nous avons utilisé pour caractériser les échantillons de chitosane.

Nous avons donc déterminé les degrés de déacétylation des différents échantillons en utilisant un spectrophotomètre Nicolet Impact 420. Les spectres ont été enregistrés pour des nombres d'onde compris entre 800 et 4000 cm^{-1} .

Les spectres infrarouges ont été obtenus pour des pastilles de chitosane/KBr, la proportion de chitosane étant de 1 % p/p. Pour produire les pastilles, le chitosane est préalablement tamisé pour ne récupérer que les éléments de taille inférieure à 180 μm . Puis il est broyé en présence de KBr pour constituer un mélange homogène. Le mélange est ensuite comprimé sous une presse Perkin-Elmer avec une charge de 10 tonnes. Nous obtenons finalement des pastilles de 13 mm de diamètre qui sont mises à l'étuve pendant 24 H avant l'acquisition. Le blanc est fait avec des pastilles de KBr seul.

II.3.2 Résultats

Un exemple de spectre infrarouge pour le chitosane 1M est présenté sur la Figure 2. Pour analyser les spectres (tel celui de la Figure 2), nous nous sommes basés sur la méthode de Brugnerotto *et al* [Brugnerotto (2001)] qui calcule le degré de déacétylation d'un chitosane en déterminant le rapport des bandes d'absorption respectivement à 1320 et 1420 cm^{-1} . Le pic à 1320 cm^{-1} est caractéristique de la fonction amine acétylée ou amide tandis que celui qui est à 1420 cm^{-1} est choisi comme pic de référence. Les lignes de base sont celles qui ont été définies par Brugnerotto *et al*. [Brugnerotto (2001)], à savoir, pour chacun des deux pics, la

droite passant par leurs bases. L'équation proposée par ces auteurs de la droite de calibration du rapport des absorbances des deux pics en fonction du DDA, est la suivante :

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0,3822 + 0,03133 \cdot (100 - \text{DDA}) \quad \text{Éq II.4}$$

avec un coefficient de corrélation de 0,99.

Cette équation a été obtenue avec des échantillons de chitosane de DDA préalablement déterminé par les techniques de RMN du solide (^{13}C) pour les échantillons de DDA inférieur à 50% et de RMN du liquide (^1H) pour les échantillons de DDA supérieur à 50%.

Les degrés de déacétylation obtenus à partir des absorbances des bandes à 1320 et 1420 cm^{-1} de chaque spectre et de l'équation Éq II.4 sont donnés dans le Tableau 2.

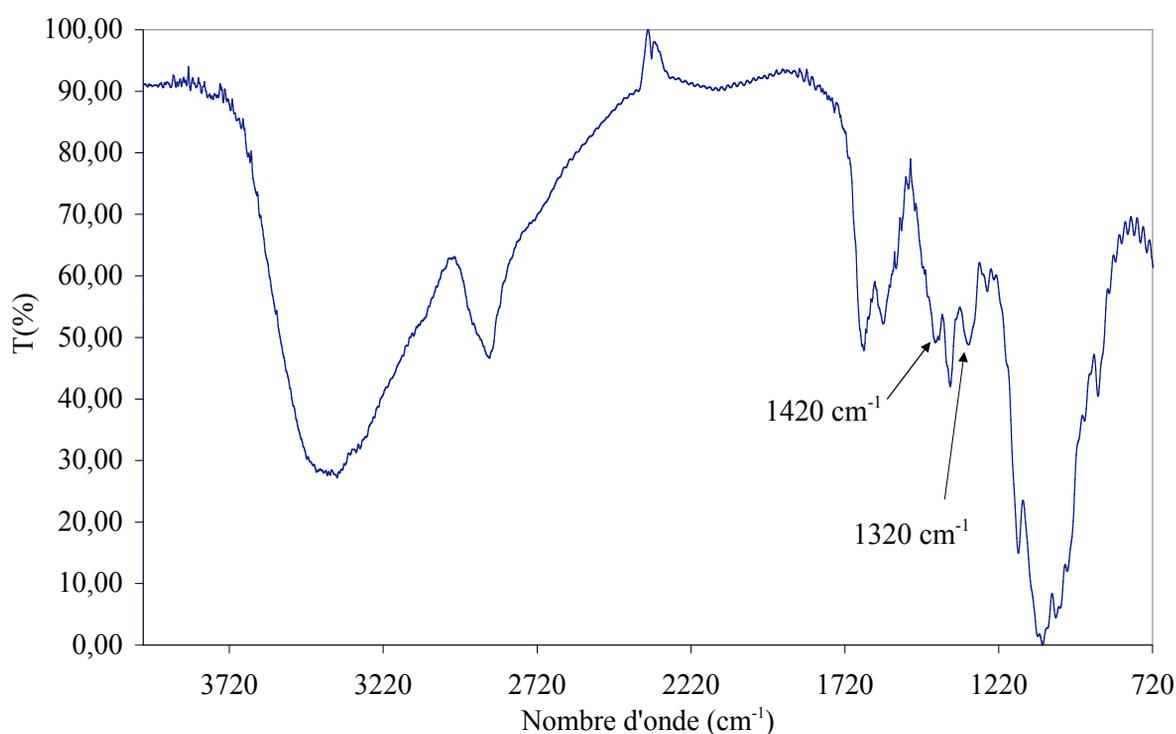


Figure 2. Spectre infrarouge du chitosane 1M (T : la transmittance)

Chitosane	04M	06M	1M	2M
DDA (%)	80 ± 3 %	82 ± 3 %	84 ± 3 %	85 ± 3 %

Tableau 2. Degrés de déacétylation des échantillons de chitosane déterminés par spectroscopie infrarouge

Les incertitudes correspondent à celles qui ont été déterminées par des tests de reproductibilité de mesures effectuées à l'aide du même appareil lors de travaux précédents [Martinez (2004)].

Pour les échantillons 1M et 2M, les degrés de déacétylation déterminés sont en très bon accord avec ceux qui ont été fournis par le producteur soit 84%. Pour le 04M et le 06M, les valeurs n'étaient pas données par le fournisseur.

Compte tenu des valeurs de DDA et des incertitudes expérimentales, nous considérons désormais que le DDA est le même (valeur moyenne : 83 ± 3 %) pour les quatre échantillons étudiés.

II.4 PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES DES SOLUTIONS DE CHITOSANE

Nous présentons dans cette partie l'étude des propriétés rhéologiques des solutions de chitosane pour les échantillons 06M et 1M en fonction de la concentration.

II.4.1 Protocole

Nous avons étudié les propriétés rhéologiques de solutions de chitosane dans de l'acide acétique 0,1 M en fonction de la concentration de polymère.

Dans un premier temps, une solution-mère de chitosane est préparée par dissolution de 2 % (g/g) de chitosane dans de l'acide acétique 0,1M. La dissolution et une bonne homogénéisation sont assurées par une agitation à l'aide d'une palette pendant 48 heures. La solution-mère est ensuite dissoute pour obtenir des solutions de concentration massique variant entre 0,05 et 2,00 %. Le pH des solutions de chitosane est de l'ordre de 4. Le pKa de l'acide acétique et du chitosane étant respectivement 4,75 et 6,3, à pH = 4 la concentration de groupes amine ionisés du chitosane est donc très élevée par rapport à la concentration de groupe amine totale en solution.

Cette étude a été effectuée à l'aide d'un rhéomètre MCR 500 de la société Anton Paar en utilisant une géométrie double cylindre DG 26.7 (Figure 3).

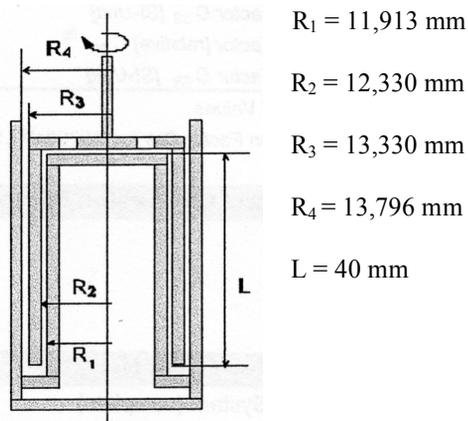


Figure 3. Géométrie de mesure double cylindre DG 26.7

La température de mesure est maintenue à 25°C grâce à une circulation d'eau thermostatée. Les mesures ont été réalisées sur une large gamme de vitesses de cisaillement variant de 0,01 à 3000 s⁻¹. Ces séries de mesure ont été réalisées deux fois pour chaque masse molaire avec des solutions-mères nouvelles chaque fois.

II.4.2 Résultats et interprétations des mesures en écoulement

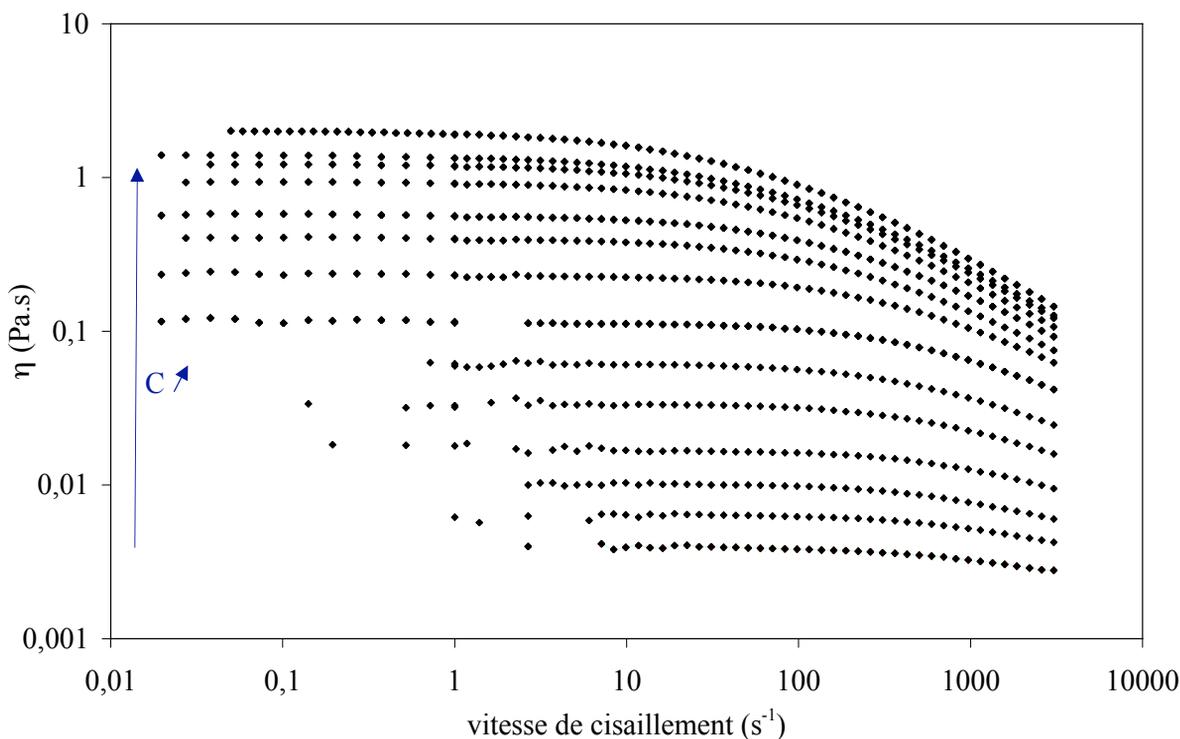


Figure 4. Évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour des solutions de chitosane 1M de concentration massique : 0,05 - 0,07 - 0,12 - 0,23 - 0,40 - 0,60 - 1,10 - 1,30 - 1,50 - 1,65 - 1,85 - 1,90 - 2,00 %

L'évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour différentes concentrations de chitosane pour l'échantillon 1M est représentée sur la Figure 4. On observe deux parties dans l'évolution de la viscosité : un premier domaine caractéristique d'un comportement newtonien (viscosité constante en fonction de la vitesse de cisaillement) et un deuxième typique d'un système rhéofluidifiant (diminution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement).

La rhéofluidification dans les solutions de polymères est généralement observée pour des solutions concentrées. Elle est liée en grande partie aux enchevêtrements des chaînes qui vont se défaire pour des vitesses de cisaillement élevées.

Il est notable dans la figure 4 que le comportement rhéofluidifiant soit observé sur toute la gamme de concentration. Or, nous verrons que pour des concentrations inférieures à 0,58 % pour le 1M, il ne devrait pas y avoir d'enchevêtrement (voir paragraphe II.4.3). La rhéofluidification observée pour cet échantillon 1M est donc liée à un autre phénomène. Par ailleurs, nous remarquons que le plateau newtonien est d'autant plus étroit que la concentration augmente.

Ce comportement de rhéofluidification dépendant de la concentration et présent même pour des solutions de faible concentration est typique des polymères. Il a été observé en particulier pour les polysaccharides semi-flexibles [Ren (2002), [Ren (2003)] et pour les polyélectrolytes [Krause (1999)] en milieu semi-dilué. La diminution de la viscosité à forte vitesse de cisaillement est liée à la réduction des enchevêtrements mais aussi à des liaisons hydrophobes au sein de la solution. En effet, lorsque la concentration de chitosane augmente, les enchevêtrements et les interactions hydrophobes inter ou intrachaines entre les groupes acétyle sont plus importants. L'existence de ces interactions hydrophobes pour les solutions de chitosane ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années [Amiji (1995)], [Argüelles (1998)], [Draget (1996)], [Desbrières (2004)], [Nyström (1999)]. À concentration élevée, les interactions hydrophobes s'établissent entre les chaînes qui s'enchevêtrent. Sous l'effet du cisaillement, il y a réorganisation des liaisons pour former plutôt des liaisons hydrophobes intrachaines ce qui explique le phénomène de rhéofluidification. Tandis qu'à faible concentration, les interactions hydrophobes se forment plutôt entre les monomères d'une même chaîne. Sous l'effet du cisaillement, le comportement est donc moins important.

Ces interactions hydrophobes sont en compétition avec les interactions électrostatiques. Les premières vont entraîner en régime dilué un repliement des chaînes par interactions

intrachaînes ou des liaisons physiques entre les chaînes (en milieu concentré). Les secondes vont contribuer à l'extension des chaînes par répulsions entre les segments de polymère.

Nos données expérimentales ont été analysées à l'aide de l'équation de Cross qui a souvent été utilisée pour décrire le comportement des polysaccharides en solution [Kluge (2000)], [Ren (2002)], [Ren (2003)] :

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (a\dot{\gamma})^p} \quad \text{Éq II.5}$$

où η_0 et η_{∞} sont respectivement les limites de la viscosité à très faible et à très grande vitesse de cisaillement. a est un temps de relaxation caractéristique de la solution de polymère. Il est défini comme l'inverse de la vitesse de cisaillement qui caractérise la transition entre le premier et le second régime newtonien. p est un exposant positif.

La viscosité η_{∞} n'est pas mesurée expérimentalement. Lors de l'ajustement des points expérimentaux par l'équation Éq II.5, η_{∞} est un paramètre ouvert que nous avons fait varier entre $3 \cdot 10^{-3}$ Pa.s (la plus faible viscosité mesurée obtenue pour la concentration la plus faible) et 10^{-3} Pa.s (la viscosité de l'eau). Nous avons observé que sa valeur dans cette gamme n'a pas d'influence sur la valeur des autres paramètres (a , η_0 et p). Nous avons donc fixé la valeur de η_{∞} à 10^{-3} Pa.s.

Nous avons observé que les données expérimentales sont très bien ajustées par l'équation de Cross dans toute la gamme de concentrations. La Figure 5 représente des exemples d'ajustements pour les concentrations 2,00 %, 1,40 % et 0,40 % pour l'échantillon 1M.

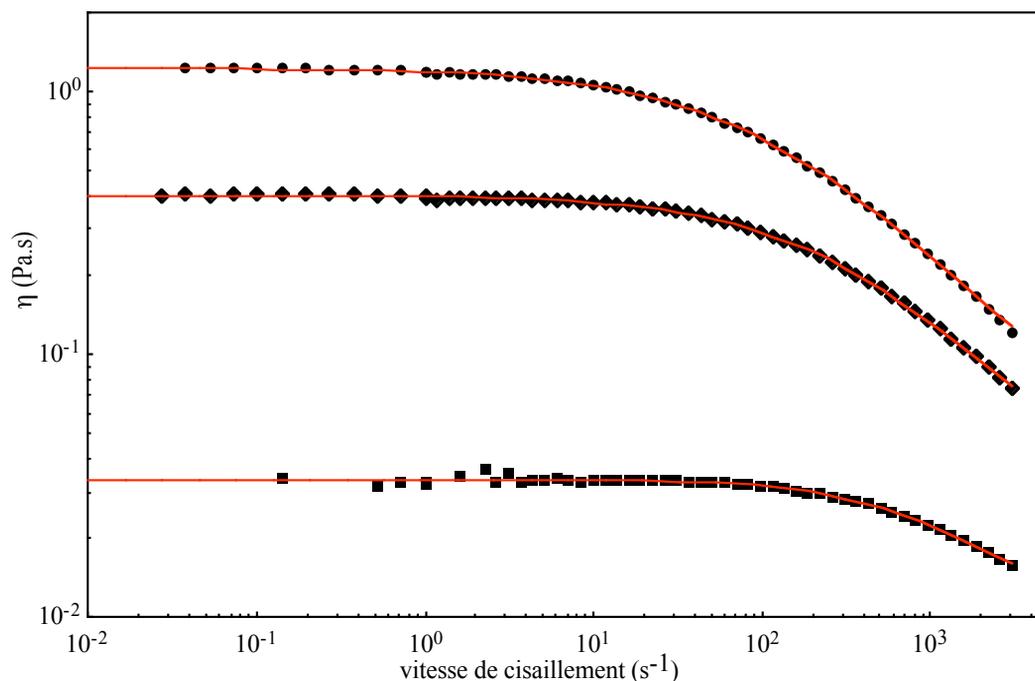


Figure 5. Exemples d'ajustement de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement par une loi de puissance de type Cross (Éq II.5) pour des solutions de 2,00 % (●), 1,40 % (◆) et 0,40 % (■) (p/p) des échantillons 1M

Les différents paramètres obtenus à partir de l'ajustement des courbes de la figure 3 sont donnés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Concentration %	η_0 (Pa.s)	a (s)	p
0,05	0,004	2.10^{-4}	0,70
0,07	0,006	2.10^{-4}	0,92
0,12	0,010	3.10^{-4}	0,81
0,23	0,017	3.10^{-4}	0,70
0,40	0,034	4.10^{-4}	0,82
0,60	0,062	6.10^{-4}	0,80
1,10	0,235	1.10^{-3}	0,75
1,30	0,406	3.10^{-3}	0,72
1,50	0,573	5.10^{-3}	0,72
1,65	0,942	6.10^{-3}	0,70
1,85	1,230	8.10^{-3}	0,70
1,90	1,401	9.10^{-3}	0,69
2,00	2,022	14.10^{-3}	0,68

Tableau 3. Paramètres rhéologiques déterminés par ajustement des évolutions de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour l'échantillon 1M d'après la loi de Cross (Éq II.5)

Nous observons que a qui caractérise la largeur de la plage newtonienne à faible vitesse de cisaillement augmente avec la concentration. En effet, lorsque la concentration augmente les enchevêtrements et les liaisons hydrophobes augmentent. Par conséquent, le cisaillement doit être plus élevé pour observer la rhéofluidification du système.

Par ailleurs, les valeurs de p sont bien différentes de 0 (0 caractérisant un comportement newtonien). Ceci confirme le comportement rhéofluidifiant très marqué quelle que soit la concentration. Ces valeurs (0,75 en moyenne) sont similaires à celles qui ont été déterminées par Kluge *et al.* [Kluge (2000)] dans les solutions de hyaluronane (0,76 en moyenne).

Les mêmes comportements ont été observés pour les solutions de l'échantillon 06M. Pour les deux échantillons 06M et 1M, les valeurs de η_0 sont exploitées dans le paragraphe suivant.

II.4.3 Variations de la viscosité à très faible vitesse de cisaillement en fonction de la concentration

À partir des valeurs de η_0 obtenues par ajustement à l'aide de l'équation Éq II.5 des courbes de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement, nous avons pu tracer l'évolution de la viscosité η_0 pour les solutions de chitosane 06M et 1M en fonction de la concentration en polymère (Figure 6).

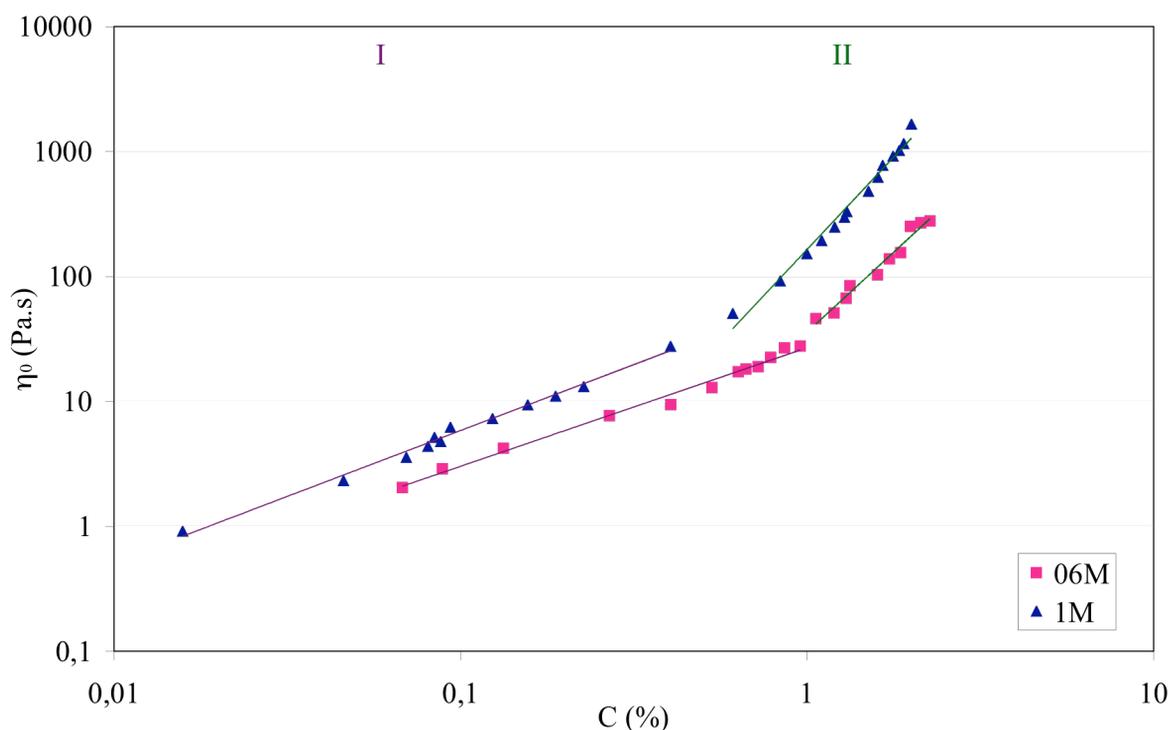


Figure 6. Évolution de la viscosité à très faible vitesse de cisaillement des solutions de chitosane en fonction de la concentration pour les échantillons 06M et 1M

D'une part, nous observons que la viscosité augmente en fonction de la concentration et de la masse molaire comme c'est généralement le cas pour les solutions de polymère. D'autre part, pour chaque masse molaire, nous observons deux domaines dans les variations de la viscosité en fonction de la concentration. Dans chaque domaine, la viscosité évolue en loi de puissance avec des exposants qui sont très proches pour les deux masses molaires étudiées. En revanche, la concentration critique qui sépare les deux domaines varie en fonction de la masse molaire : elle diminue quand la masse molaire augmente. Nous la notons C_e parce que comme nous le verrons plus loin, c'est la concentration d'enchevêtrement. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 4.

	Domaine de concentration I	C_e (% g/g)	Domaine de concentration II
06M	$\eta_0 \sim C^{0,94}$	0,86	$\eta_0 \sim C^{2,56}$
1M	$\eta_0 \sim C^{1,06}$	0,58	$\eta_0 \sim C^{2,78}$

Tableau 4. Loi de puissance de la viscosité et concentration d'enchevêtrement déterminées pour 1M et 06M

II.4.3.1 Comparaison du comportement des solutions de chitosane avec les prédictions théoriques

Ces comportements sont en accord avec les lois d'échelle qui régissent la conformation des polymères [De Gennes (1979)] ou des polyélectrolytes en solution [Rubinstein (1994)].

Ainsi, le modèle de De Gennes prédit en particulier que la viscosité évolue en loi de puissance avec la concentration avec des exposants qui dépendent du domaine de dilution des solutions qui sont au nombre de trois : dilué, semi-dilué non enchevêtré et semi-dilué enchevêtré.

Nous avons représenté sur la Figure 7 les différentes représentations des chaînes et les évolutions théoriques de la viscosité en fonction de la concentration selon le domaine de dilution pour les polymères [De Gennes (1979)] ou les polyélectrolytes en bon solvant [Dobrynin (1995)], [Rubinstein (1994)].

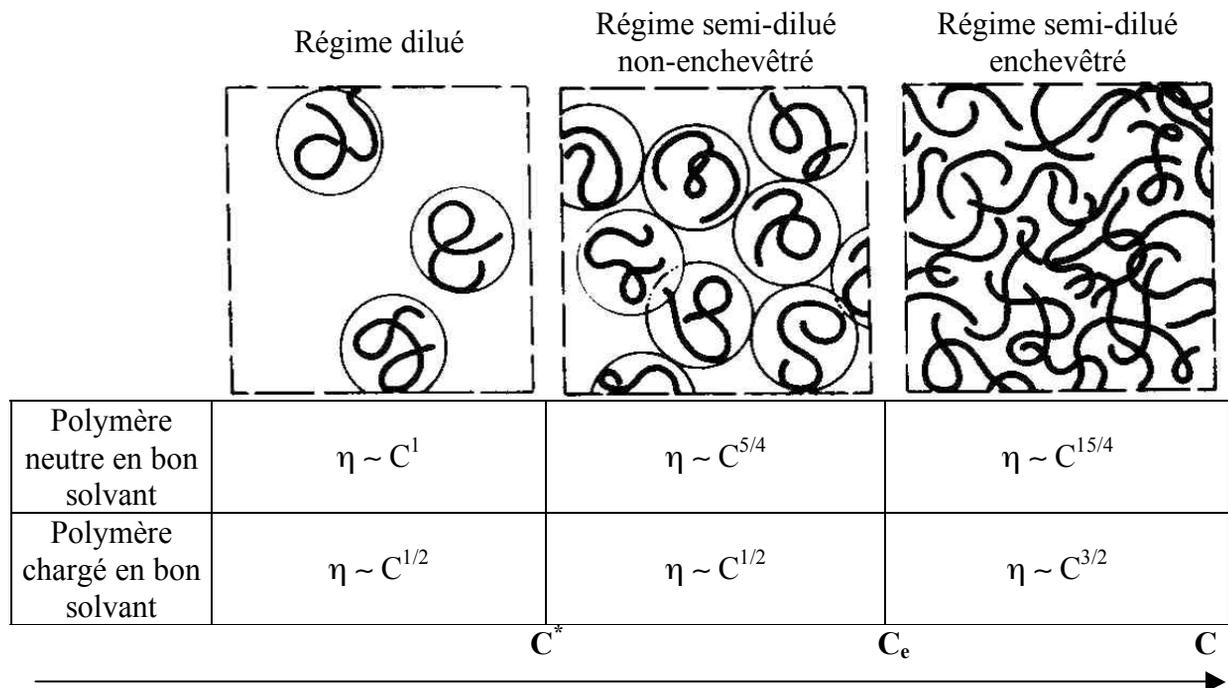


Figure 7. Représentation des polymères ou des polyélectrolytes en bon solvant et évolution de la viscosité selon le domaine de concentration (d'après [De Gennes (1979)], [Rubinstein (1994)], [Dobrynin (1995)])

En solution diluée, les chaînes sont éloignées et isolées les unes des autres. Quand la concentration augmente, les chaînes vont se rapprocher et commencer à se recouvrir à une concentration C^* , appelée concentration de recouvrement. Cette concentration définit la limite entre le régime dilué et le régime semi-dilué où les chaînes se recouvrent mais pas en quantité suffisante pour commencer à se gêner mutuellement dans leur mouvement [Dobrynin (1995)]. C'est à partir de C_e , appelée concentration d'enchevêtrement, que les polymères vont effectivement s'entremêler.

Les exposants pour les polyélectrolytes sont plus faibles que pour un polymère neutre. Ce comportement pourrait s'expliquer, du moins pour les solutions semi-diluées, par l'existence des répulsions électrostatiques qui s'opposent à l'enchevêtrement des polymères chargés [De Gennes (1976)] à l'origine de l'augmentation de la viscosité.

Par ailleurs, Dobrynin *et al.* ont proposé des lois de comportement pour les polyélectrolytes en solution en présence de sel [Dobrynin (1995)]. En particulier, pour de très faibles concentrations de sel, les auteurs prédisent des dynamiques identiques à celles qui sont prévues pour des dilutions en bon solvant. En revanche, une concentration en sel élevée induit dans le régime semi-dilué des comportements identiques à ceux des solutions de polymères neutres en réduisant les répulsions électrostatiques. Ainsi, pour des concentrations élevées en

sel, en régime semi-dilué non-enchevêtré, il est attendu un exposant égal à $5/4$, et en régime semi-dilué enchevêtré un exposant égal à $15/4$.

Les valeurs des exposants (Tableau 4) obtenues par ajustement de nos données expérimentales (Figure 6) sont comprises entre celles prédites pour les polymères neutres et pour les polyélectrolytes. Nous en déduisons que la dynamique des solutions de chitosane étudiées est plus proche de la dynamique d'un polymère neutre que celle d'un polymère chargé. Cependant, vu que notre étude a été effectuée en absence de sel, nous pouvons déduire que les répulsions entre chaînes n'empêchent que de manière limitée le rapprochement et l'enchevêtrement des chaînes de polymères qui entraînent une augmentation rapide de la viscosité en fonction de la concentration.

Les répulsions électrostatiques entre les chaînes de chitosane en solution sont donc relativement limitées par rapport à d'autres polyélectrolytes. Ceci peut se justifier par l'existence des interactions hydrophobes entre les chaînes de chitosane dont nous avons montré l'influence sur les propriétés d'écoulement précédemment (voir paragraphe III.4.1). Ces interactions interchaînes tendent à favoriser l'enchevêtrement des chaînes contrairement aux répulsions électrostatiques.

Par ailleurs, la valeur de l'exposant (environ 2,7) du domaine II de concentration permet de déduire qu'au-delà des concentrations critiques respectives des deux échantillons, les chaînes de polymères sont enchevêtrées. Ces concentrations critiques sont donc associées aux concentrations d'enchevêtrements (noté C_e dans le Tableau 4). En revanche, il n'apparaît pas dans notre étude de transition d'un régime dilué à un régime semi-dilué non enchevêtré. La concentration de recouvrement C^* , doit être bien inférieure aux concentrations de notre étude.

Enfin, nous observons que la concentration d'enchevêtrement augmente lorsque la masse molaire diminue. Cette variation est aussi prévue par les lois d'échelle selon lesquelles C_e doit évoluer suivant un exposant $-4/5$ en bon solvant et un exposant $-1/2$ en solvant θ en fonction de la masse molaire [De Gennes (1979)]. Bien que nous n'ayons des données que pour deux masses molaires, il est quand même intéressant de noter que nous avons trouvé pour ces deux échantillons une évolution en $M_v^{-0,68}$. Ainsi, la valeur de l'exposant est bien cohérente avec celle qui est attendue par la théorie. Nous pouvons par extrapolation estimer les concentrations d'enchevêtrements pour les échantillons de chitosane 4M et 2M (pour lesquels cette étude n'a pas été faite) qui sont respectivement 0,46 et 1,40 % g/g.

II.4.3.2 Comparaison des valeurs des exposants déterminées dans notre étude avec les données expérimentales de la littérature

Les valeurs de ces exposants sont aussi à comparer avec celles qui ont été déterminées pour différents polysaccharides. Ren *et al.* rapportent que pour les solutions de polysaccharides, en moyenne l'exposant de variations de η_0 en fonction de la concentration vaut 1,4 en milieu non-enchevêtré et 3,4 en milieu enchevêtré [Ren 2003]. Ces auteurs ont obtenu les exposants 1 et 3,6 en régime semi-dilué, respectivement non enchevêtré et enchevêtré, pour une solution de glucan. De même, nos valeurs sont très proches de celle (1,16) qui a été obtenue par Argüelles *et al.* dans des solutions semi-diluées de chitosane (de masse molaire $2,3 \cdot 10^5$ g/mol et de DDA 80 %) dans l'acide acétique 0,1 mol/L pour le domaine non-enchevêtré [Argüelles (1998)]. Nos valeurs sont donc cohérentes avec celles qui ont été obtenues pour un certain nombre de polysaccharides pour lesquels les exposants sont toujours un peu inférieurs à ceux prévus pour un polymère neutre.

II.4.3.3 Comparaison des concentrations d'enchevêtrements déterminées dans notre étude avec les données expérimentales de la littérature

Les concentrations d'enchevêtrement que nous avons déterminées sont cohérentes avec celle qui a été déterminée (0,032 mol/L soit 0,735 % (g/g)) pour du NaPAMS (poly(2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonate de sodium, un polyélectrolyte de masse molaire $9,5 \cdot 10^5$ g/mol) [Krause (1999)] dont les exposants sont ceux prédits par les modèles pour les polyélectrolytes en absence de sel. De même, Desbrières *et al.* [Desbrières 1996] pour des solutions de chitosane de masse molaire 190 000 g/mol et de DDA 98 % dans de l'acide acétique 0,2 mol/L trouve une concentration d'enchevêtrement de 0,7 % (g/g). Pour un dextran (polysaccharide neutre) dans l'eau de masse molaire 10^6 g/mol, la concentration de transition du régime dilué au régime semi-dilué est de l'ordre de 1,2% [Stancovic (1991)]. Les enchevêtrements apparaissent à une concentration inférieure pour le chitosane par rapport au dextran (0,58 % g/g pour 1M). Ceci peut s'expliquer en partie par la présence de charge sur les chaînes de chitosane qui entraîne un étirement du polymère plus important que pour dextran et donc une concentration d'enchevêtrement plus petite.

II.5 CONCLUSION

Nous avons déterminé les caractéristiques principales pour chacun des échantillons de chitosane utilisés dans nos travaux, à savoir la masse molaire et le degré de déacétylation. Nous faisons l'approximation que les degrés de déacétylation sont les mêmes pour tous les échantillons soit $83 \pm 3\%$.

Nous avons caractérisé le comportement en solution de ces macromolécules. Nous avons ainsi observé le comportement rhéofluidifiant des solutions de chitosane sous cisaillement et les lois d'échelle qui régissent la dynamique de ce polymère en régime semi-dilué selon la concentration. Les interactions hydrophobes entre les chaînes de polymères dans les solutions de chitosane limitent les répulsions électrostatiques et confèrent ainsi aux chaînes de chitosane une dynamique intermédiaire entre celle d'un polymère neutre et celle d'un polymère chargé.

Par ailleurs, nous avons déterminé la concentration de transition C_e entre le régime semi-dilué non-enchevêtré et le régime semi-dilué enchevêtré des solutions de chitosane pour les deux masses molaires 06M et 1M.

Enfin, nous avons observé que l'évolution de la concentration en fonction de la masse molaire est cohérente avec les lois d'échelle. La caractérisation de cette évolution nous permet de déduire les concentrations d'enchevêtrement pour les deux autres échantillons 04M et 2M.

Ces données sur les échantillons de chitosane étudiés et la connaissance des interactions existantes dans les solutions seront utiles pour comprendre l'évolution des propriétés rhéologiques au cours de la gélification de ces polymères.

RÉFÉRENCES :

- M.M. Amiji, *Pyrene fluorescence study of chitosan self-association in aqueous solution*, Carbohydrate Polymers, 26, 211-213 (1995)
- M. W. Anthonsen, K. M. Varum, O. Smidsrod, *Solution properties of chitosans : conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation*, Carbohydrate Polymers, 22, 193-201 (1993)
- W. Argüelles-Monal, F.M. Goycoolea, C. Peniche, I. Higuera-Ciapara, *Rheological study of the chitosan/glutaraldehyde chemical gel system*, Polymer Gels and Networks, 6, 429-440 (1998)
- G. Berth, H. Dautzenberg, *The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution*, Carbohydrate polymers, 47, 39-51 (2002)

- J. Brugnerotto, J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrières, M. Rinaudo, *An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization*, Polymer, 42, 3569-3580 (2001)
- J. Desbrières, C. Martinez, M. Rinaudo, *Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour*, International Journal of Biological Macromolecules, 19, 21-28 (1996)
- J. Desbrières, *Autoassociative natural polymer derivatives : the alkylchitosans. Rheological behaviour and temperature stability*, Polymer, 45, 3285-3295 (2004)
- A. Dobrynin, R. H. Colby, M. Rubinstein, *Scaling theory of polyelectrolyte solutions*, Macromolecules, 28, 1859-1871 (1995)
- K. I. Draget, *Associating phenomena in highly acetylated chitosan gels*, Polymer Gels and Networks, 4, 143-151 (1996)
- P. G. de Gennes, P. Pincus, R. M. Velasco, F. Brochard, *Remarks on polyelectrolyte conformation*, Le Journal de Physique, 37, 1461-1473 (1976)
- P. G. de Gennes, *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell University Press, Ithaca (1979)
- T. Kluge, A. Masuda, K. Yamashita, K. Ushida, *Concentration and molecular weight dependence of the quenching of $Ru(bpy)_3^{2+}$ by ferricyanide in aqueous solutions of synthetic hyaluronan*, Macromolecules, 33, 375-381 (2000)
- W. E. Krause, J. S. Tan, R. H. Colby, *Semidilute solution rheology of polyelectrolytes with no added salt*, Journal of Polymer Science : part B : Polymer Physics, 37, 3429-3437 (1999)
- L. Martinez, *Application du procédé de prilling pour la préparation de microréseaux à base de chitosane. Caractérisations physico-chimiques et utilisation dans la formulation de principes actifs pour la voie orale*, Doctorat de l'Université Paris XI, Pharmacotechnie et Physico-chimie, Université Paris XI (2004)
- B. A. Nyström, A. L. Kjøniksen, C. Iversen, *Characterization of association phenomena in aqueous of chitosan of different hydrophobicity*, Advances Colloid and Interface Science, 79, 81-103 (1999)
- J-H Pa, T. L. Yu, *Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions*, Macromolecular Chemistry and Physics, 202, 985-991 (2001)

- Y. Ren, P. R. Ellisa, I. W. Sutherland, S. B. Ross-Murphy, *Dilute and semi-dilute solution properties of an exopolysaccharide from Escherichia coli strain S61*, Carbohydrate Polymers, 52, 189–195 (2002)
- Y. Ren, P. R. Ellisa, S. B. Ross-Murphy, Q. Wang, P. J. Wood, *Dilute and semi-dilute solution properties of (1 → 3), (1 → 4)-β-D-glucan, The endosperm cell wall polysaccharide of oats (Avena sativa L.)*, Carbohydrate Polymers, 53, 401–408 (2003)
- G.A.F Roberts, J.G. Domszy, *Determination of the viscosimetric constants for chitosan*, International Journal of Biological Macromolecules, 4, 374-377 (1982)
- M. Rubinstein, R. H. Colby, A. Dobrynin, *Dynamics of semidilute polyelectrolyte solutions*, Physical Review Letters, 73, 20, 2776-2779 (1994)
- C. Schatz, C. Pichot, T. Delair, C. Viton, A. Domard, *Static light scattering studies on chitosan solutions : from macromolecular chains to colloidal dispersions*, Langmuir, 19, 9896-9903 (2003)
- R. I. Stankovic, S. Jovanovic, L. Ilic, E. Nordmeier, M. D. Lechner, *Study of aqueous dextran solutions under high pressures and different temperatures by dynamic light scattering*, Polymer, 32, 2, 235-240 (1991)

Chapitre III. ETUDE RHEOLOGIQUE DE LA CINÉTIQUE DE GÉLIFICATION DES RESEAUX DE CHITOSANE

Pour comprendre les processus de gélification, il est habituel d'étudier l'évolution d'un paramètre sensible à la transformation des propriétés du système. Ce paramètre peut être un temps de relaxation du système mesuré par exemple par diffusion de lumière [Martin (1989)], [Nyström (1999)] ou une grandeur viscoélastique. En général, les mesures de rhéologie sont privilégiées pour l'étude des systèmes concentrés à cause de leur opacité.

À l'aide des mesures de spectroscopie mécanique à différentes fréquences au cours de la gélification et d'une fonction étendue du module de relaxation $G(t)$, on peut déterminer des paramètres qui caractérisent la structure et la viscoélasticité des trois états du matériau au cours de ce processus : fluide viscoélastique, gel critique et solide viscoélastique (ces trois états sont définis dans la partie théorique). À partir de la mesure des propriétés viscoélastiques, nous avons étudié le processus de gélification des réseaux de chitosane en fonction de paramètres physico-chimiques qui permettent de moduler la structure de ces réseaux et leurs propriétés mécaniques.

À notre connaissance, ce type d'étude continue de la cinétique de gélification n'a pas été effectuée pour la formation de gels de chitosane et des réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE. Des mesures de viscosité dans la phase sol jusqu'à la formation du gel critique ont été réalisées dans des réseaux de chitosane [Roberts (1989)], [Brack (1997)] mais sans aucune information sur le système dans la phase solide viscoélastique.

Dans la première partie de ce chapitre, nous rappelons l'intérêt de l'étude de la cinétique de gélification à partir des propriétés viscoélastiques du matériau et en particulier pour déterminer la transition sol-gel. Nous rappelons aussi les différentes méthodes qui permettent de déterminer cette transition et justifions le choix de celle basée sur la mesure des modules viscoélastiques en fonction de la fréquence. Puis, nous présentons les paramètres viscoélastiques qui caractérisent la structure et les propriétés mécaniques du matériau au cours de la gélification. Nous décrivons ensuite les protocoles de fabrication des gels de chitosane et ceux utilisés pour les mesures de rhéologie.

Dans la dernière partie, nous analysons nos données rhéologiques du processus de gélification des réseaux de chitosane en fonction de la masse molaire, de la concentration en chitosane, du pH et de la concentration en POE pour les réseaux semi-interpénétrés.

III.1 THÉORIE

La gélification est la transition de phases entre un état liquide viscoélastique appelé « sol » et un état solide viscoélastique appelé « gel » [Durand (1990)]. Le sol est un milieu dispersé composé de chaînes de polymère, de particules ou d'agrégats de particules en suspension dans un liquide. Les interactions entre les composants dans le sol sont faibles, il est donc soluble dans de nombreux solvants classiques. Le gel est un réseau tridimensionnel poreux. Les pores contiennent le solvant et les composants qui n'ont pas participé à la formation du réseau. Les interactions au sein du gel sont fortes comparées à celles qui existent dans le sol, en particulier pour les gels chimiques. Le gel n'est alors pas soluble dans les solvants classiques.

Au cours du processus de gélification, on observe la formation d'amas dont la taille augmente avec le temps, cette taille n'étant limitée que par les dimensions du récipient. Au sein d'un amas, les composants sont reliés par des liaisons temporaires (enchevêtrements, liaisons d'hydrogène...) et/ou permanentes (liaisons chimiques ou ioniques) [Durand (1990)].

On caractérise l'évolution du système par le taux d'avancement noté p et défini comme le rapport entre le nombre de liaisons formées sur le nombre total de liaisons possibles. La structure du système varie de manière importante au voisinage d'une valeur critique de p , notée p_c . Pour cette valeur, le gel est alors appelé gel critique. Lorsque p tend vers p_c par valeur inférieure, la masse molaire moyenne en poids du plus gros amas augmente et diverge vers l'infini.

Au point critique, la distribution des masses est infiniment large ; toutes les tailles d'amas coexistent. Au-delà de p_c , la proportion de polymère en amas de taille infinie croît. Le gel critique n'a pas de taille intrinsèque, c'est-à-dire que si on effectue (par la pensée) un grossissement des petits amas, ils ne diffèrent pas des gros par leur structure. On dit qu'il est auto-similaire. Cette propriété permet de lui associer une dimension fractale (d_f) qui est définie par la relation entre le rayon, R , d'un amas et sa masse, M :

$$M \propto R^{d_f}$$

Éq III.1

Ce changement critique de structure induit un changement critique des propriétés rhéologiques qui se produit à un temps qu'on appelle le temps de gélification noté t_g .

Avant le temps de gélification, la viscosité de cisaillement croît et tend vers l'infini à t_g . Au-delà du temps de gélification, le système ne s'écoule plus, on ne peut plus donc lui associer de viscosité. En revanche, à partir de t_g , il apparaît dans le système une élasticité permanente qui croît tant que se forment des connexions au sein du milieu (Figure 1).

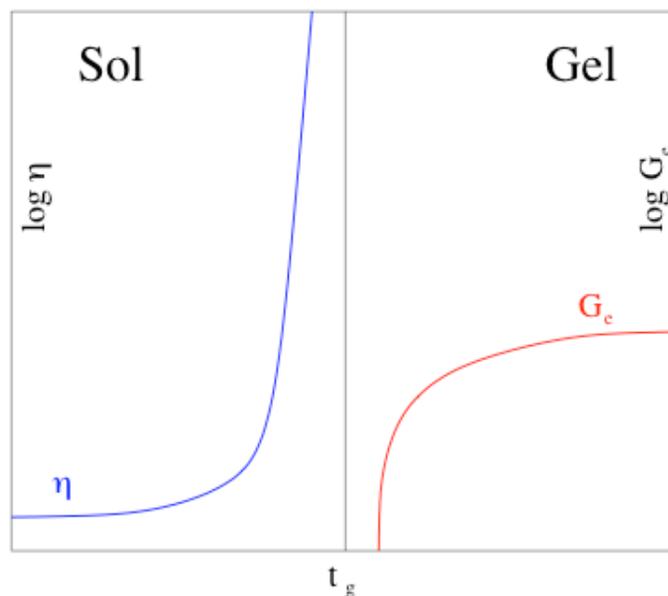


Figure 1 : Évolution en fonction du temps des propriétés mécaniques d'un polymère lors de sa réticulation. Les grandeurs représentées sont la viscosité de cisaillement, η , de la phase sol et l'élasticité d'équilibre G_e du gel. (D'après [Durand (1990)])

C'est cette modification des propriétés rhéologiques du système qui va permettre d'étudier la cinétique de gélification grâce à des mesures rhéologiques.

III.1.1 Dynamique de la transition sol-gel

Le principal objet de ce paragraphe est de présenter les lois de comportement des propriétés viscoélastiques du système près de la transition sol-gel.

Une première méthode pour déterminer le temps de gélification consiste à mesurer la viscosité de cisaillement de la phase sol en fonction du temps (à contrainte ou vitesse de cisaillement constante) (Figure 1). Le temps de gélification, t_g , est alors obtenu par extrapolation de la divergence de la viscosité en fonction du temps dont la mesure qui implique un cisaillement constant avec une possible déstructuration du gel fragile en cours de formation est difficile à réaliser dans des conditions stationnaires.

Pour éviter de perturber le milieu, il est préférable de faire des mesures en régime oscillant avec une contrainte de faible amplitude. On mesure alors le module d'élasticité G' et le module de perte G'' à fréquence fixe en fonction du temps. Ces deux quantités sont définies pour le sol et pour le gel, et varient continûment lors de la transition. Dans le sol, G'' est supérieur à G' , alors que pour un gel, G'' est inférieur à G' . Il a donc été proposé de déterminer le temps de gélification comme le temps où G' est égal à G'' [Tung (1982)]. Il a cependant été constaté que le temps de gélification déterminé suivant ce critère varie avec la fréquence d'oscillation [Winter (1986)]. La fréquence étant une donnée de l'appareil de mesure, et non pas du système comme t_g , le temps de gélification ne peut donc être défini comme le croisement de G' et G'' .

Chambon *et al.* [Chambon (1987)] ont proposé d'étudier la transition sol-gel en mesurant les modules G' et G'' en fonction du temps pour différentes fréquences. Selon cette approche expérimentale qui est une véritable spectroscopie mécanique, ces auteurs ont réalisé des mesures au cours de la formation de gels de PDMS (polydiméthylsiloxane) pour lesquels le processus de gélification était bloqué chimiquement à un temps donné du degré d'avancement de la réaction de réticulation. Ils ont observé expérimentalement pour le gel critique une même loi de puissance en fonction de la fréquence pour $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$.

$$G' \sim G'' \sim \omega^\Delta \quad \text{Éq III.2}$$

En fait, ces évolutions des modules de perte et de conservation en loi de puissance au temps de gélification traduisent une évolution du module de relaxation en loi de puissance qui s'écrit dans l'espace des temps viscoélastiques ¹ comme suit :

$$G(t) = St^\Delta \quad \text{à } t = t_g \quad \text{Éq III.3}$$

où Δ est appelé exposant de relaxation et S est un paramètre appelé amplitude de gel. Les valeurs de Δ sont comprises entre 0 et 1.

En effet, Δ ne peut être inférieur à 0, sinon le module de relaxation divergerait avec le temps viscoélastique ce qui ne peut être une réalité physique. Par ailleurs, la limite supérieure de 1 garantit la divergence de la viscosité de cisaillement au temps de gélification. Ces valeurs

¹ le temps viscoélastique est noté t alors que le temps réel (qui permet de mesurer l'évolution cinétique de la gélification) est noté t .

limites au temps de gélification sont associées à des comportements mécaniques élémentaires de solide de Hooke pour Δ égal à 0 ($G(t)$ est constant) et de fluide de Newton pour Δ égal à 1 ($G(t) \sim 1/t$).

La transition sol-gel pouvant être décrite comme le passage continu entre trois états viscoélastiques (état fluide viscoélastique pour $t < t_g$, état gel critique pour $t = t_g$ et état solide viscoélastique pour $t > t_g$), les travaux de Friedrich *et al.* [Friedrich (1988)], [Friedrich (1989)] ont permis d'étendre la description proposée par Winter valable uniquement au temps de gélification. Friedrich *et al.* ont en effet proposé une fonction de relaxation étendue qui permet de décrire l'évolution des propriétés viscoélastiques d'un système au cours de la gélification. Cette fonction s'écrit :

$$G(t) = St^{-\Delta} \exp(-t/\lambda) + G_e \quad \text{Éq III.4}$$

Le terme exponentiel du second membre décrit les phénomènes de relaxation de la phase sol en considérant un liquide de type Maxwell avec un temps de relaxation moyen λ qui évolue au cours de la gélification. À l'approche de la transition sol-gel, ce paramètre diverge quand la taille des amas croît. Le terme exponentiel tend alors vers 1 et l'équation Éq III.4 se réduit à celle qui a été proposée par Winter *et al.* (Éq III.3).

Après la transition, l'état gel est caractérisé par un module de relaxation d'équilibre G_e qui était nul dans la phase sol (Figure 1).

La Figure 2 résume l'évolution du module de relaxation en fonction du temps viscoélastique pour les trois états du matériau au cours de la gélification : sol (état fluide viscoélastique), gel critique, gel (état solide viscoélastique).

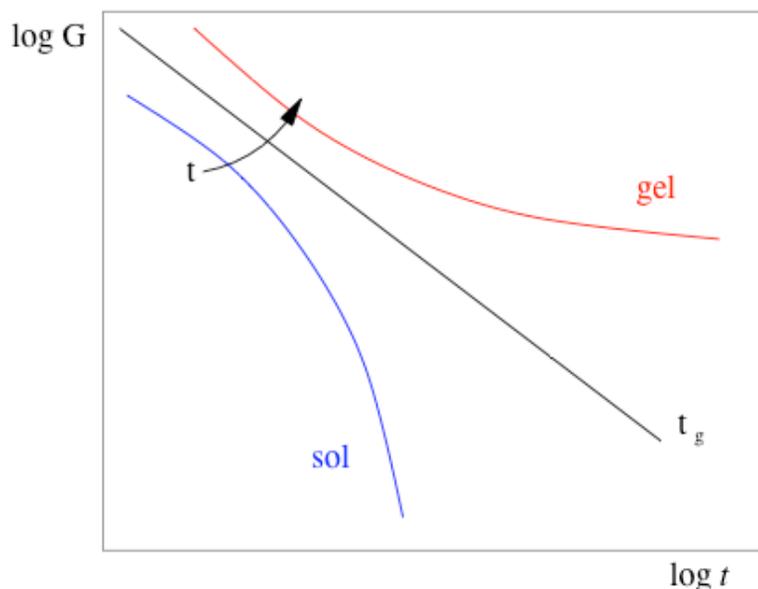


Figure 2. Évolution du module de relaxation en fonction du temps viscoélastique t pour les trois états sol, gel critique (à t_g), gel (d'après [Durand (1990)])

À partir de l'équation Éq III.4, on peut alors déterminer analytiquement les expressions de G' et G'' en fonction de la fréquence selon l'avancement de la réaction [Warlus (2003)]. Dans les équations suivantes, Γ est la fonction gamma.

Avant le temps de gélification (état fluide viscoélastique) :

$$G'(\omega) = \frac{S\Gamma(1-\Delta)\omega\lambda_m^\Delta \sin[(1-\Delta)\arctan(\omega\lambda_m)]}{\left[1 + (\omega\lambda_m)^2\right]^{\frac{1-\Delta}{2}}} \quad \text{Éq III.5}$$

$$G''(\omega) = \frac{S\Gamma(1-\Delta)\omega\lambda_m^\Delta \cos[(1-\Delta)\arctan(\omega\lambda_m)]}{\left[1 + (\omega\lambda_m)^2\right]^{\frac{1-\Delta}{2}}} \quad \text{Éq III.6}$$

Au temps de gélification (état gel critique) :

$$G'(\omega) = \frac{\pi S \omega^\Delta}{2\Gamma(\Delta) \sin\left(\frac{\Delta\pi}{2}\right)} \quad \text{pour } \omega_1 < \omega < \omega_0 \quad \text{Éq III.7}$$

$$G''(\omega) = \frac{\pi S \omega^\Delta}{2\Gamma(\Delta) \cos\left(\frac{\Delta\pi}{2}\right)} \quad \text{pour } \omega_1 < \omega < \omega_0 \quad \text{Éq III.8}$$

Après le temps de gélification (état solide viscoélastique) :

$$G'(\omega) = \frac{\pi S \omega^\Delta}{2\Gamma(\Delta) \sin\left(\frac{\Delta\pi}{2}\right)} + G_e \quad \text{Éq III.9}$$

$$G''(\omega) = \frac{\pi S \omega^\Delta}{2\Gamma(\Delta) \cos\left(\frac{\Delta\pi}{2}\right)} \quad \text{Éq III.10}$$

où ω est la pulsation pour les mesures en dynamique et ω_1 et ω_0 sont des fréquences de coupures explicitées par la suite.

À partir des équations Éq III.7 et Éq III.8, on obtient au temps de gélification la relation suivante :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} = \text{cst} = \tan\left(\frac{\Delta\pi}{2}\right) \quad \text{Éq III.11}$$

où δ représente le déphasage entre la contrainte et la déformation lors des expériences en oscillation. δ est aussi appelé angle de perte.

Le rapport des modules étant indépendant de la fréquence au temps de gélification, le gel critique peut donc être caractérisé expérimentalement par le point d'intersection des différentes courbes représentant les variations du rapport G''/G' en fonction du temps pour

différentes fréquences. Ainsi la projection de cette intersection sur l'axe des temps permet de déterminer le temps de gélification, t_g , tandis que l'exposant de relaxation (Δ) à t_g qui caractérise le gel critique est déduit de la projection du point de croisement des courbes sur l'axe des ordonnées (Figure 3).

Connaissant les valeurs de G' et G'' à t_g , on peut ensuite en déduire la valeur de S à partir des équations Éq III.7 et Éq III.8.

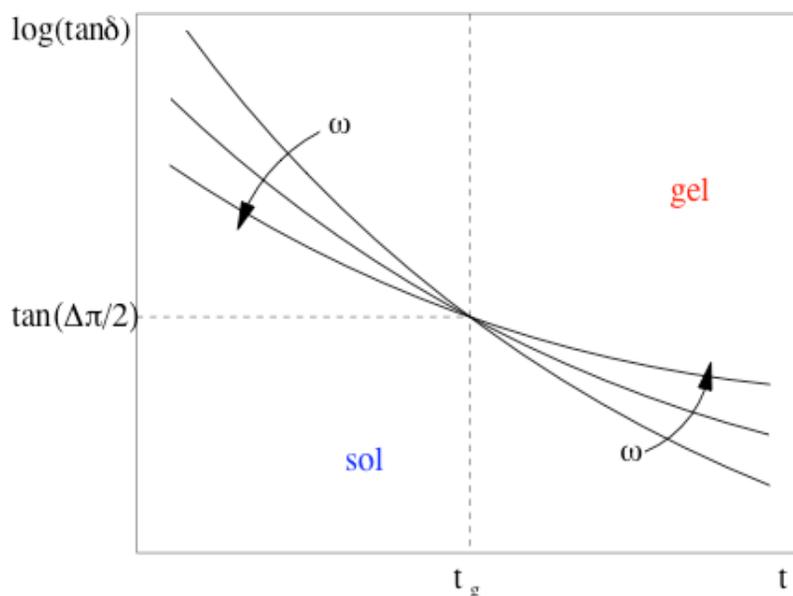


Figure 3 : Détermination des propriétés de l'état gel critique selon l'approche proposée par Winter

Par ailleurs, les paramètres Δ et S qui dépendent du temps peuvent aussi être déterminés avant et après t_g à partir des équations Éq III.5, Éq III.6, Éq III.9 et Éq III.10, tandis que λ est défini uniquement avant t_g et G_e n'est défini qu'après t_g . λ et G_e sont calculés en fonction du temps à partir respectivement des équations Éq III.5 et Éq III.6 et des équations Éq III.9 et Éq III.10. Ces paramètres ont été calculés par ajustement des données expérimentales.

Par ailleurs, Muthumakar s'est intéressé de manière théorique à l'exposant de relaxation Δ qui est relié à la dimension fractale, d_f , des amas de polymères [Muthumakar (1989)]. Il considère d'une part que la dynamique des chaînes de polymères polydisperses est régie par le modèle de Rouse. D'autre part, il s'appuie sur le modèle de percolation [de Gennes (1979)] pour la représentation spatiale des amas. En négligeant les effets de volume exclu pour les amas, l'expression de la dimension fractale (définie par l'équation Éq III.1) en fonction de l'exposant de relaxation est la suivante :

$$d_f = \frac{(d+2)(2\Delta-d)}{2(\Delta-d)} \quad \text{Éq III.12}$$

où d est la dimension de l'espace c'est-à-dire 3.

La dimension fractale donne des indications sur la géométrie du gel critique. Lorsqu'elle est entre 2 et 3, le gel occupe l'espace en trois dimensions. Plus la dimension est proche de 2, plus la structure est poreuse. Lorsque la dimension fractale est entre 1 et 2, le gel forme un réseau plutôt bidimensionnel. De même, plus la dimension est faible, plus il y a de « trous ».

Par continuité, nous associons l'exposant de relaxation défini par l'équation étendue du module de relaxation au cours de la gélification (Éq III.4) comme un paramètre décrivant la structure géométrique du système.

III.1.2 Gamme de fréquences

Le spectre des temps de relaxation $H(\lambda)$ d'un matériau est lié au module de relaxation $G(t)$ par la relation suivante :

$$G(t) = \int_0^{\infty} \frac{H(\lambda)}{\lambda} \exp(-t/\lambda) d\lambda \quad \lambda_0 < \lambda < \lambda_{\max} \quad \text{Éq III.13}$$

Une variation du module de relaxation en loi de puissance au temps de gélification se traduit aussi par une variation du spectre des temps de relaxation suivant une même loi de puissance :

$$H(\lambda) \sim \lambda^{-\Delta} \quad \lambda_0 < \lambda < \lambda_{\max} \quad \text{Éq III.14}$$

Cette distribution continue de temps de relaxation sans temps de relaxation caractéristique traduit les propriétés auto-similaires du gel critique.

La loi de puissance du spectre de relaxation (Éq III.14) n'est observée que pour des temps de relaxation supérieurs à λ_0 qui correspond aux temps de relaxation des plus petits amas constituant le gel critique. Dans le cas des polymères de masse molaire élevée, les temps inférieurs à λ_0 sont associés à la structure locale des amas correspondant à des échelles de longueur en dessous de laquelle la structure n'est plus auto-similaire [De Rosa (1994)].

Cette limite des temps de relaxation pour le spectre des temps de relaxation se traduit par l'existence d'une fréquence maximale ω_0 pour la variation des modules $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ en loi de puissance au temps de gélification.

En revanche, à la transition sol-gel le temps de relaxation du plus gros amas λ_{\max} diverge, les mesures ne devraient donc pas être limitées pour de faibles fréquences.

Cependant, il apparaît expérimentalement une fréquence de coupure ω_1 aux basses fréquences. Cette limite est déterminée par la condition suivante : le temps de mesure doit être très inférieur au temps d'évolution du système afin de pouvoir considérer le degré d'avancement des réactions négligeable pendant un balayage en fréquence. Cette condition peut être vérifiée expérimentalement en déterminant le nombre de mutation, N_{mu} , dont l'expression est :

$$N_{\text{mu}}(t) = \frac{2\pi}{\left(\frac{1}{F} \frac{\partial F}{\partial t}\right)_t^{-1} \omega} \quad \text{Éq III.15}$$

où F est le module élastique ou de perte [Mours (1994)]. N_{mu} est un nombre adimensionné défini par le rapport entre le temps de mesure ($2\pi/\omega$) et un temps caractéristique de l'évolution du matériau à un instant t . L'évolution du matériau est considérée comme négligeable si N_{mu} est inférieur à 0,1.

III.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.2.1 Préparation des gels de chitosane

Un protocole de réticulation du chitosane avait déjà été mis au point au Laboratoire de Physique Pharmaceutique [Khalid (1999)]. Il était donc intéressant de reprendre cette formulation pour compléter l'étude des gels de chitosane. Nous avons juste remplacé le glyoxal en poudre par du glyoxal en solution aqueuse. En effet, le glyoxal existe soit solution soit sous forme de poudre. Sous la forme liquide, l'homogénéisation de l'échantillon est rapide car le glyoxal est constitué de monomères. En revanche, le glyoxal en poudre se trouve sous forme de trimères. Dans ce cas, il existe deux étapes supplémentaires pour que les groupes aldéhydes soient disponibles pour la réticulation : la solubilisation et la dépolymérisation. Notre choix s'est donc porté sur le glyoxal en solution qui nous permet de

commencer rapidement l'étude de cinétique par rhéologie. L'homogénéisation de l'échantillon se fait alors pendant 1 min au lieu de 30 min avec le glyoxal en poudre [Khalid (1999)].

III.2.1.1 Matériel

Le glyoxal en solution aqueuse à 40 % en poids a été acheté chez RIEDEL-DE-HAEN. L'acide acétique pur provient de chez PROLABO. Nous avons utilisé de l'eau déminéralisée comme solvant principal. Le chitosane est dissous dans de l'acide acétique à 0,1 mol/L (0,6 % p/p) de pH = 2,7 à 25°C. Nous utilisons du POE de masse molaire 10⁶ g/mol provenant de chez Aldrich.

Les échantillons de chitosane que nous utilisons dans cette étude sont ceux dont nous avons déterminé les caractéristiques dans le chapitre II. Nous rappelons que les échantillons ont été fournis par Fluka pour le 04M et 06M et par SIGMA pour le 1M et 2M.

III.2.1.2 Protocoles

a) Dissolution du chitosane : préparation de la solution-mère

Nous avons dissous le chitosane dans de l'acide acétique 0,1 mol/L (pH = 2,7). Lorsque la concentration en polymère augmente, la dissolution est rendue difficile à cause de l'augmentation de la viscosité du milieu. De plus, la gélification du chitosane étant presque instantanée, l'étude de la cinétique de réticulation est impossible. Nous avons donc limité notre étude cinétique à des concentrations inférieures à 2 % (p/p). La concentration massique de chitosane pour la solution-mère est fixée à 2 % (p/p) pour toutes les études exceptées pour l'étude de la masse molaire pour laquelle la concentration massique de dissolution est de 1,5 % (p/p). Ces solutions de chitosane sont donc à des concentrations où les chaînes de polymères sont en régime semi-dilué et enchevêtré. La dissolution et une bonne homogénéisation sont assurées par une agitation pendant 48 heures à l'aide d'une palette. Le récipient de dissolution est placé dans un bain thermostaté.

De plus, nous avons observé que la température est un paramètre important pour la dissolution. Un abaissement de la température conduit à meilleure dissolution. Une dissolution totale est obtenue pour une température inférieure ou égale à 20°C. La température de dissolution a donc été fixée à 20°C, celle-ci étant imposée grâce à un bain thermostaté dans lequel est placé l'échantillon.

La solution est ensuite filtrée sur un support Swixness 25 équipé d'un papier filtre sans cendre afin d'éliminer les matières non dissoutes. La quantité de chitosane non dissous est de l'ordre de 5 %. On obtient ainsi la solution-mère de chitosane (à 2 ou 1,5 % p/p).

À partir de la solution-mère, nous préparons des solutions de concentrations différentes en chitosane. Afin d'obtenir des solutions de chitosane à des valeurs de pH différentes, la solution-mère est diluée soit avec de l'acide acétique (solutions finales de pH = 4) soit avec de l'eau (solutions finales de pH = 5).

b) Solution de chitosane / POE

Le POE est dissous dans l'eau déminéralisée sous agitation magnétique pendant 12 heures à température ambiante. La concentration des solutions de POE varie entre 0,5 et 3 % p/p.

Les solutions de chitosane / POE sont obtenues à partir de la solution-mère de chitosane à 2 % (p/p) et de solutions de POE à différentes concentrations. Les proportions en masse de solution-mère de chitosane et de solution de POE sont constantes. Par exemple, pour préparer une solution de chitosane / POE d'un volume total de 20 g, on mélange 5 g de solution de POE (quelle que soit la concentration initiale de POE), et 15 g de solution-mère de chitosane à 2 % p/p. Dans le mélange, la concentration de chitosane est toujours de 1,5% (p/p) et la concentration de POE varie de 0 à 0,75 % (p/p).

c) Gélification

La réticulation est initiée par l'ajout de la solution aqueuse de glyoxal dans une proportion de 20 μ l (soit environ 0,16 % p/p) pour 5 g de solution de chitosane ou de solution de chitosane / POE quelle que soit la variation des paramètres physico-chimiques (concentration en chitosane, masse molaire...). Cette proportion correspond à une stoechiométrie de 7-10 (c'est à dire 7 groupements d'aldéhyde pour 10 groupements amines) pour une concentration massique de 1,5 % en chitosane et un degré de déacétylation de 83 %.

L'homogénéisation se fait par agitation magnétique pendant 1 min. L'échantillon dans l'état liquide est placé immédiatement après cette homogénéisation dans la géométrie de mesure pour l'étude de la cinétique de gélification par rhéologie.

III.2.2 Géométrie et protocole de mesures rhéologiques

Les mesures rhéologiques ont été réalisées à l'aide d'un rhéomètre Haake RS150 fonctionnant à contrainte imposée. La géométrie utilisée est un cône/plateau en titane de 60 mm de diamètre, de 1° d'angle entre la génératrice du cône et le plateau et une distance entre le cône tronqué et le plateau de 0,052 mm (Figure 4). Le contrôle de température se fait par circulation d'eau issue d'un bain thermostaté. La température de mesure est fixée à 25°C . Pour limiter l'évaporation, un piège à solvant a été utilisé avec saturation en eau de l'atmosphère au-dessus du gel.

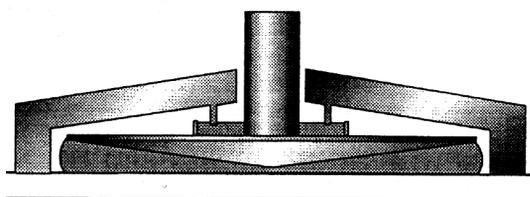


Figure 4. Géométrie de mesure cône/plateau avec le piège à solvant

Les mesures rhéologiques consistent en des cycles successifs de balayage en fréquence (f) de 0,25 à 1 Hz par pas de 0,15 Hz suivi d'un temps de repos de 30 s pour éviter des mesures en continu. La gamme de fréquences a été déterminée expérimentalement en prenant initialement des plages plus larges sachant qu'il existe, comme il a été montré dans la partie théorique, des fréquences de coupure. Ces fréquences limitent la plage de fréquences pour laquelle la variation des modules $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ en loi de puissance au temps de gélification est observée. Pour rester dans le domaine linéaire et éviter la perturbation du système lors des mesures, une contrainte de faible amplitude ($\tau_0 = 1 \text{ Pa}$) a été imposée en restant toutefois dans le domaine mesurable de l'appareil.

III.3 RÉSULTATS

Dans cette partie, nous présentons l'étude de la cinétique de gélification chimique des réseaux de chitosane seul et des réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE par spectroscopie mécanique. Sur ces derniers, il existe peu de travaux dans la littérature [Khalid (1999)]. D'une part, le temps de gélification est déterminé à partir du comportement en loi de puissance des modules élastique et visqueux à la transition sol-gel qui se traduit par une indépendance de l'angle de perte avec la fréquence à cet instant. D'autre part, à partir de la valeur de l'angle de

perte à t_g , nous caractériserons la structure du gel critique par l'exposant de relaxation, Δ , lié à une dimension fractale et par l'amplitude de gel, S , dépendant de Δ et des propriétés viscoélastiques du système. De plus, à l'aide des équations Éq III.5, Éq III.6, Éq III.9 et Éq III.10 peu utilisées jusqu'à présent, nous déterminons les quatre paramètres Δ , S , λ et G_e dont les variations, au cours de la gélification, traduisent l'évolution de la structure du matériau.

III.3.1 Comportement général

Les évolutions des modules élastique G' et de perte G'' ont été mesurées au cours de la gélification pour différentes fréquences variant de 0,25 à 1 Hz. La Figure 5 présente un exemple d'évolution pour une fréquence de 1 Hz lors de la formation d'un gel de l'échantillon 1M, de concentration massique 1,5 % et de pH = 4 (la solution-mère est préparée à 1,5 % (p/p)).

Aux temps courts, le module de perte est supérieur au module élastique alors que l'on observe le comportement inverse aux temps longs. Ceci est caractéristique de l'évolution d'un matériau viscoélastique d'un état liquide à un état solide. Toutefois, G'' tend vers une valeur limite alors que G' continue à augmenter au cours du temps. Ce comportement a été observé au cours d'études précédentes sur le chitosane [Argüelles (1998)], [Draget (1996)]. Draget *et al.* ont montré que ce phénomène était d'autant plus marqué que le degré d'acétylation est élevé. Ces auteurs ont alors suggéré que ce comportement pourrait s'expliquer par la formation de liaisons hydrophobes. Draget *et al.* ont aussi montré que ces liaisons sont favorisées par la réticulation chimique du chitosane avec du glutaraldéhyde (un agent réticulant du même type que le glyoxal). Ainsi, comme dans les solutions de chitosane (voir Chapitre II), les interactions hydrophobes se développent également dans les gels. Dans les gels, elles contribuent à l'élasticité du matériau. Ces interactions hydrophobes dépendent en particulier, comme nous l'avons vu pour les solutions, de la concentration et de la masse molaire du polymère.

On note une certaine dispersion des points expérimentaux pour G'' aux temps longs. Ceci peut s'expliquer par les faibles valeurs du déphasage δ , lorsque le réseau se solidifie, ce qui implique une détermination peu précise de G'' qui varie comme $\sin\delta$. Cette imprécision peut se répercuter aux temps longs sur les autres grandeurs calculées à partir de G'' (G_e , Δ , S).

La Figure 6 représente le rapport des modules en fonction du temps au voisinage de la transition sol-gel pour différentes fréquences pour une solution initiale de chitosane 1M, de concentration massique 1,5 % et de pH = 4 (la solution-mère est préparée à 1,5 % (p/p)).

Cette courbe est typique du comportement rhéologique des systèmes étudiés. Le temps de gélification est celui pour lequel ce rapport est indépendant de la fréquence. Il est égal pour cet échantillon à 2530 ± 20 s. Après avoir déterminé t_g , on peut calculer les valeurs de G' et G'' à t_g par interpolation linéaire entre deux données expérimentales puis le rapport G''/G' . À partir des équations Éq III.11 et Éq III.7, on en déduit respectivement l'exposant de relaxation ($\Delta = 0,56 \pm 0,01$) et le paramètre d'amplitude ($S = 2,2 \pm 0,1 \text{ Pa.s}^\Delta$) au temps de gélification. Δ caractérise la structure géométrique du gel ; il est relié à une dimension fractale du matériau ($d_f = 1,91 \pm 0,01$) (Éq III.1). En revanche, S traduit la viscoélasticité du système. Cette faible valeur de S caractérise un gel mou. Dans la suite, nous précisons les ordres de grandeur de ces paramètres selon les caractéristiques rhéologiques des matériaux en les comparant à ceux de la littérature.

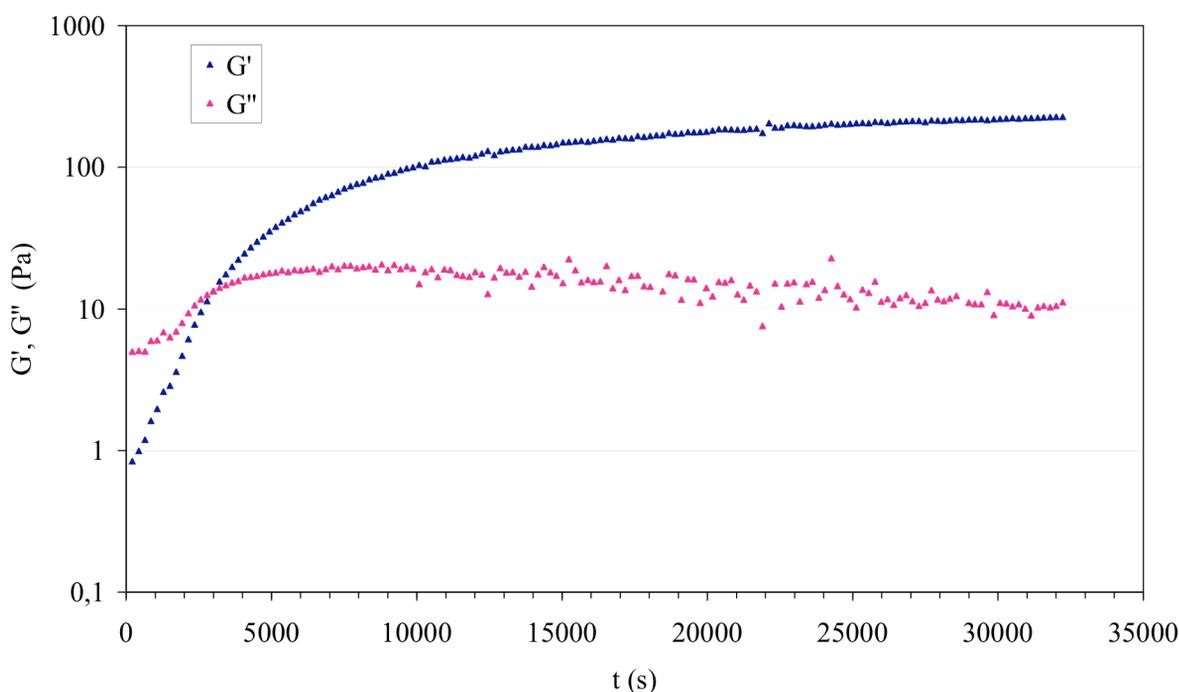


Figure 5. Évolutions de G' et G'' au cours de la gélification d'un réseau de chitosane 1M, de concentration massique 1,5 %, de pH = 4 et pour une fréquence de 1Hz

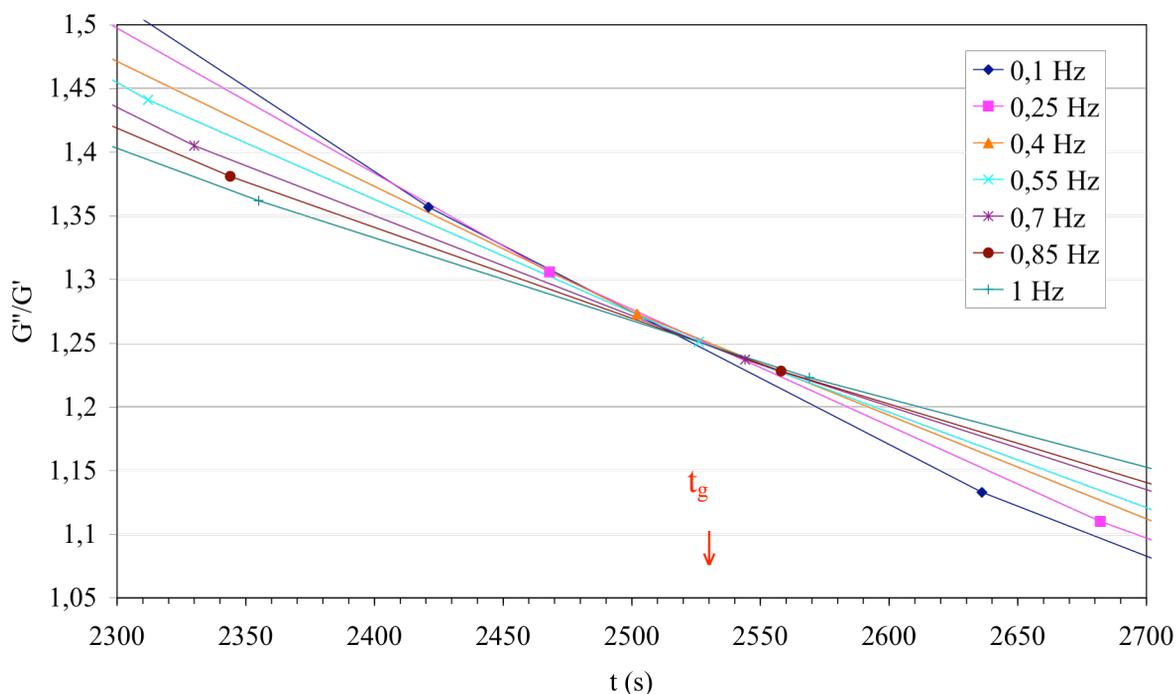


Figure 6. Évolution de G''/G' , au voisinage de la transition sol-gel, au cours de la gélification d'un réseau de chitosane 1M, de concentration massique 1,5 %, de pH = 4 pour différentes fréquences

Nous avons vérifié pour chaque échantillon étudié que les variations des modules élastique et de perte au cours d'un balayage de fréquence étaient négligeables. Pour cela, nous avons calculé le nombre de mutation tout au long de la gélification (Éq III.15). Pour toutes nos mesures, il est inférieur à 0,03 pendant la gélification.

III.3.2 Effet de la masse molaire

Dans cette partie, nous présentons les résultats de l'effet de la masse molaire sur la gélification de réseaux de chitosane. La concentration massique en chitosane est fixée à 1,5 % (p/p) et non à 2 % (p/p) comme pour les études suivantes de ce chapitre. Le pH a une valeur constante égale à 4. Nous avons étudié quatre masses molaires : 04M, 06M, 1M et 2M.

III.3.2.1 Variation du temps de gélification en fonction de la masse molaire

La Figure 7 représente la variation du temps de gélification en fonction de la masse molaire du chitosane. Nous observons que la cinétique est accélérée lorsque la masse molaire augmente. Rappelons que la densité d'enchevêtrement est indépendante de ce paramètre [De Gennes (1979)]. En fait, le temps de gélification, comme nous l'avons présenté dans la partie théorique (III.1.1) est le temps à partir duquel le système constitue un amas infini. Ce temps doit donc dépendre de la masse molaire. En effet, les échantillons de forte masse molaire vont

atteindre la « taille maximale » plus rapidement vu leur dimension déjà importante dès le départ.

Cet effet de la masse molaire sur la cinétique de gélification a été observé pour d'autres systèmes tels les gels de polybutadiène [De Rosa (1994)] et en particulier pour des gels de chitosane réticulés avec des ions de platine [Brack (1997)], le temps de gélification étant déterminé par extrapolation à partir de la divergence de la viscosité. À notre connaissance, il n'existe pas de modélisation de la cinétique de gélification de polymère en fonction de la masse.

Nous notons aussi que t_g semble tendre vers une valeur limite pour les masses molaires élevées.

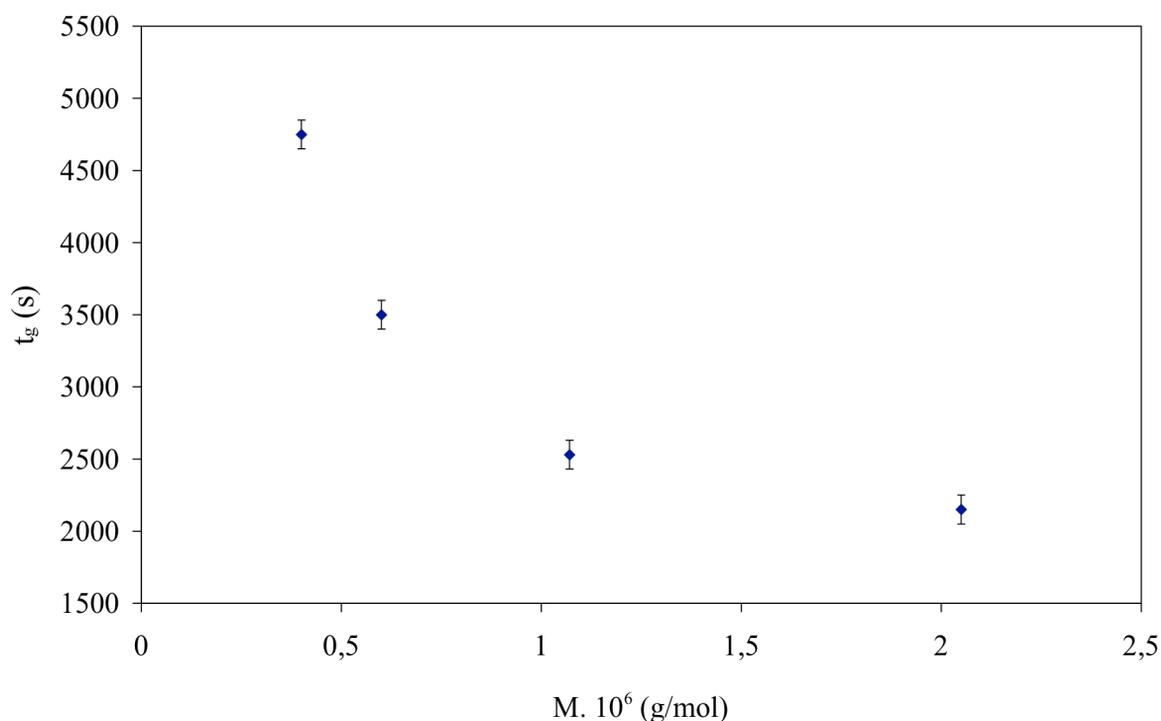


Figure 7. Variation du temps de gélification en fonction de la masse molaire ; C = 1,5 % (p/p), pH = 4

III.3.2.2 Variations de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au temps de gélification en fonction de la masse molaire

Pour étudier la structure du gel critique en fonction de la masse molaire, nous avons calculé l'exposant de relaxation et l'amplitude de gel pour les différents échantillons à t_g . La Figure 8 montre que l'exposant de relaxation diminue alors que l'amplitude de gel augmente quand la masse molaire du chitosane augmente.

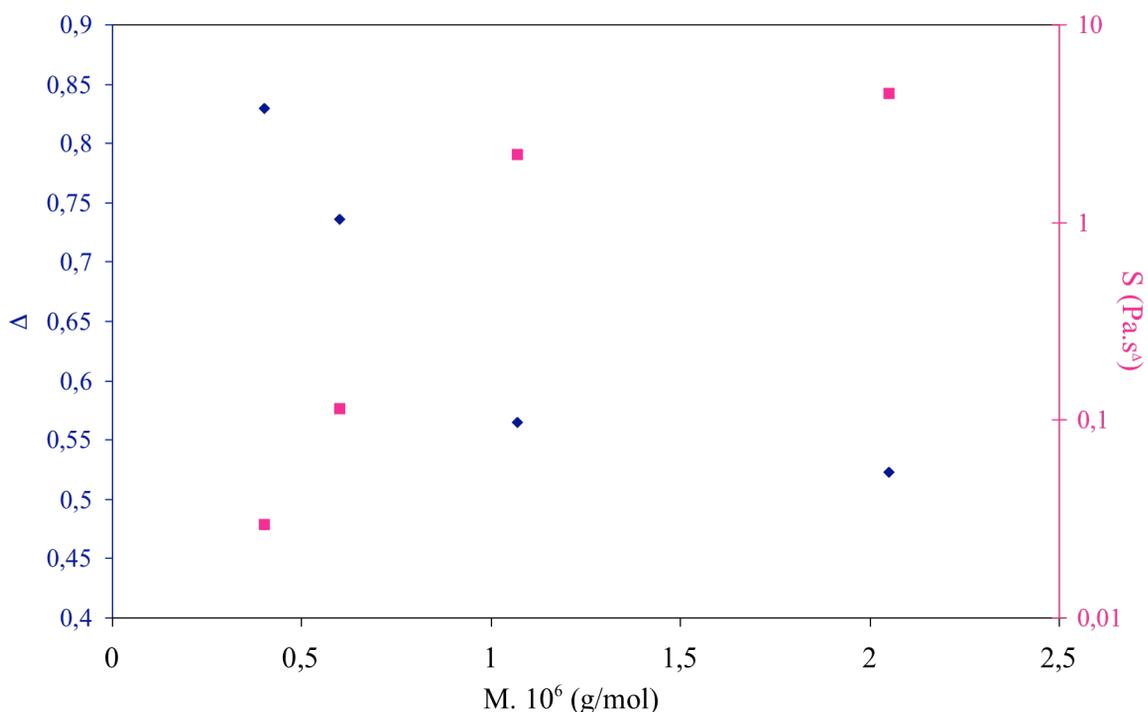


Figure 8. Variations de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel en fonction de la masse molaire ; C = 1,5 %, pH = 4

La diminution de Δ se traduit par une augmentation de la dimension fractale d_f avec lequel il est lié par l'équation Éq III.12. Cette variation correspond à une variation de d_f de 1,50 (pour 04M) à 1,98 (pour 2M).

Ce comportement de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel en fonction de la masse molaire apparaît dans de nombreuses études du gel critique [De Rosa (1994)], [Izuka (1994)], [Scanlan (1991)] pour des polymères de masse molaire élevée. Cet effet peut s'expliquer par la variation de la quantité de chaînes pendantes (Figure 4 du chapitre I) avec la masse molaire. En effet, ces chaînes ne participent pas à l'élasticité du système. Or, lorsque la masse molaire est plus élevée, la proportion de chaînes pendantes diminue, il y a donc plus de segments qui contribuent à la viscoélasticité qui est donc plus élevée. Ainsi, la structure du gel critique est d'autant plus ramifiée et plus rigide que la masse molaire est importante.

Aucune des études citées précédemment ne fait apparaître de variation particulière de S ou Δ en fonction de la masse molaire exceptée celle de De Rosa *et al.* [De Rosa (1994)]. Ces auteurs ont observé une loi d'échelle pour la variation de S avec M comme suit : $S \sim M^{z\Delta}$ avec Δ qui reste constante et z qui est l'exposant dans la loi d'échelle de la variation du temps de relaxation en fonction de la masse molaire pour les solutions de polymères enchevêtrées. Dans notre étude, nous observons un exposant de l'ordre de 3,6 pour la variation de S avec la

masse molaire. Nous avons montré dans le chapitre II que pour les masses molaires 0,6M et 1M, z est proche de 3 (sachant que la viscosité évolue en fonction de M avec une même loi que le temps de relaxation [De Gennes (1979)]). Δ serait alors supérieur à 1, ce qui est aberrant avec les limitations théoriques mais aussi les valeurs expérimentales de ce paramètre. Nous observons une variation particulière de S avec la masse molaire du chitosane, mais ne pouvons le décrire par un modèle.

III.3.2.3 Évolutions de l'exposant de relaxation et amplitude de gel au cours de la gélification en fonction de la masse molaire

À partir de l'expression étendue du module de relaxation $G(t)$ et des expressions de G' et G'' dans le domaine fréquentiel présentées dans la partie théorique de ce chapitre (III.1), nous avons calculé l'exposant de relaxation et l'amplitude de gel au cours de la gélification.

Les variations de ces paramètres en fonction du temps pour les différentes masses molaires sont représentées respectivement sur la Figure 9 et la Figure 10.

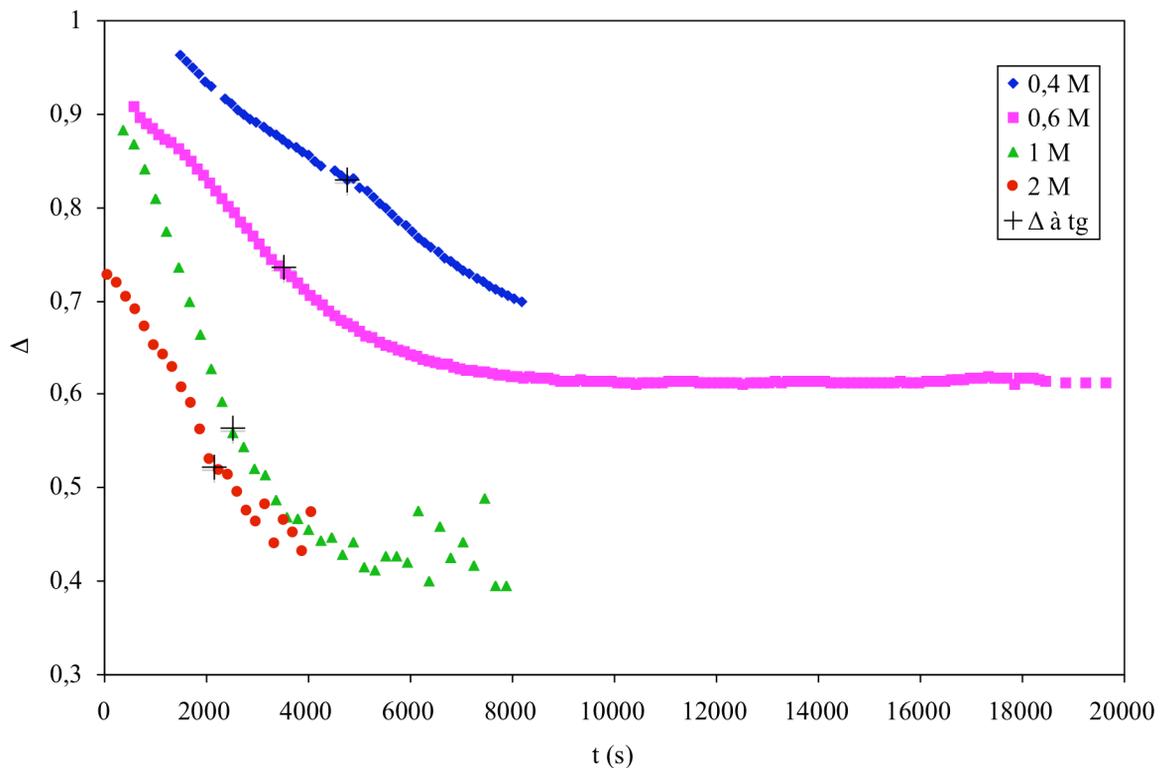


Figure 9. Évolution de l'exposant de relaxation en fonction du temps pour différentes masses molaires ; $C = 1,5 \%$ (p/p), $pH = 4$

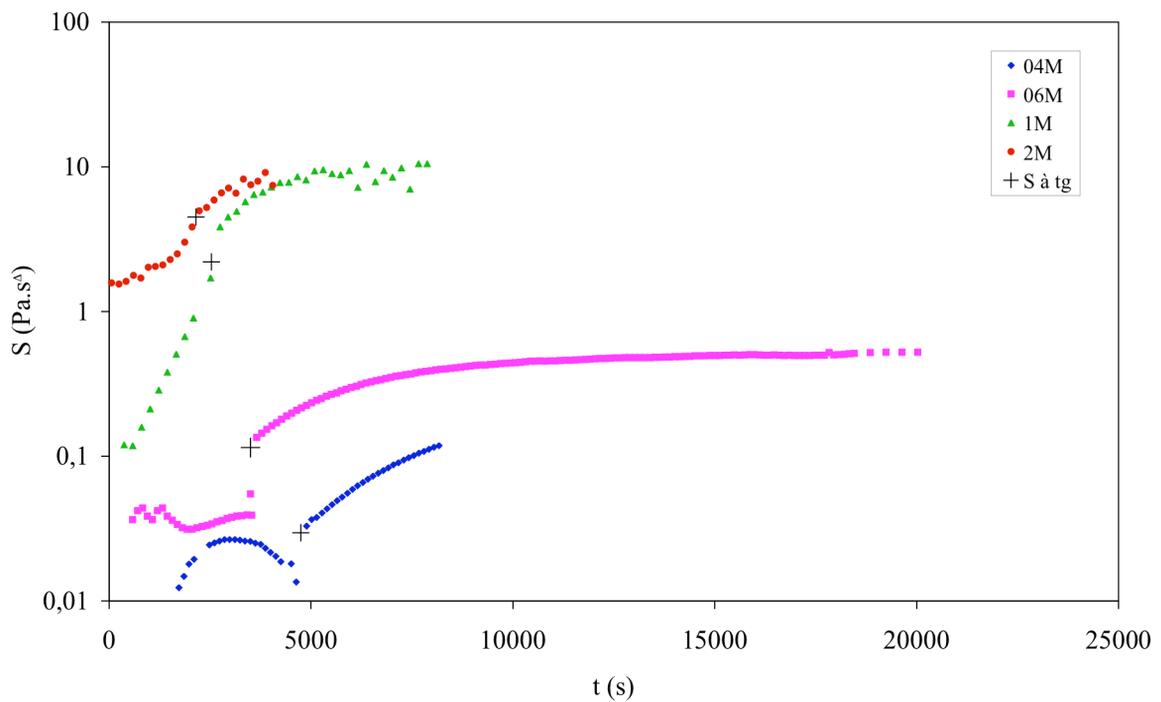


Figure 10. Évolution de l'amplitude de gel en fonction du temps pour différentes masses molaires ; $C = 1,5 \%$ (p/p), $pH = 4$

Au cours de la gélification, Δ diminue pour chaque masse molaire puis semble tendre vers des valeurs constantes après t_g . Ceci correspond à une structuration du matériau avec la réticulation ; le système semble atteindre une structure limite. Par ailleurs, plus la masse molaire est élevée, plus Δ est petit, excepté peut-être aux temps longs pour les échantillons 1M et 2M pour lesquels les valeurs de l'exposant de relaxation semblent tendre vers une même limite.

Symétriquement, nous observons (Figure 10) que S augmente au cours du temps pour chaque masse molaire. Pour les échantillons 04M et 06M, au début de la réticulation, les valeurs de S sont très faibles et donc peu précises. Aux temps longs, S tend comme Δ vers des valeurs limites pour chaque échantillon. Ces évolutions traduisent l'augmentation du caractère viscoélastique du matériau au cours de la gélification. De plus, S augmente lorsque la masse molaire augmente et comme pour Δ tend vers une même valeur finale pour les échantillons 1M et 2M.

Ainsi, les variations de ces paramètres (décroissance de Δ , augmentation de S) en fonction de la masse molaire tout au long de la gélification et en particulier à t_g traduisent une augmentation de la ramification du matériau et de la viscoélasticité du système dues, comme nous l'avons dit précédemment, à la diminution de la proportion des chaînes pendantes. Par

ailleurs, les évolutions symétriques de Δ et de S suggèrent une relation entre ces deux paramètres.

De plus, nous avons constaté que les valeurs déterminées de $\Delta(t_g)$ et $S(t_g)$ au temps de gélification (III.3.2.2) sont cohérentes avec ces évolutions continues de Δ et S avant et après t_g . Nous observerons ce même comportement lors de l'étude de l'influence des autres paramètres physico-chimiques sur la cinétique de gélification. La confrontation des équations établies par Friedrich et Heymann (Éq III.5 à Éq III.10) avec des mesures expérimentales a été très peu effectuée bien qu'il existe un certain nombre d'études de l'état gel critique caractérisé par un comportement en loi de puissance des modules viscoélastiques. Ces équations se sont avérées valides également pour des gels de PDMS [Friedrich 1988], [Friedrich 1989], et d'alcoxydes de silicium [Warlus (2003)].

III.3.2.4 Évolution du temps de relaxation au cours de la gélification en fonction de la masse molaire

λ est un temps de relaxation moyen caractéristique de la phase sol. Lorsqu'on s'approche de t_g , il diverge comme nous pouvons le voir sur la Figure 11 pour toutes les masses molaires étudiées, comme prévu par le modèle de percolation.

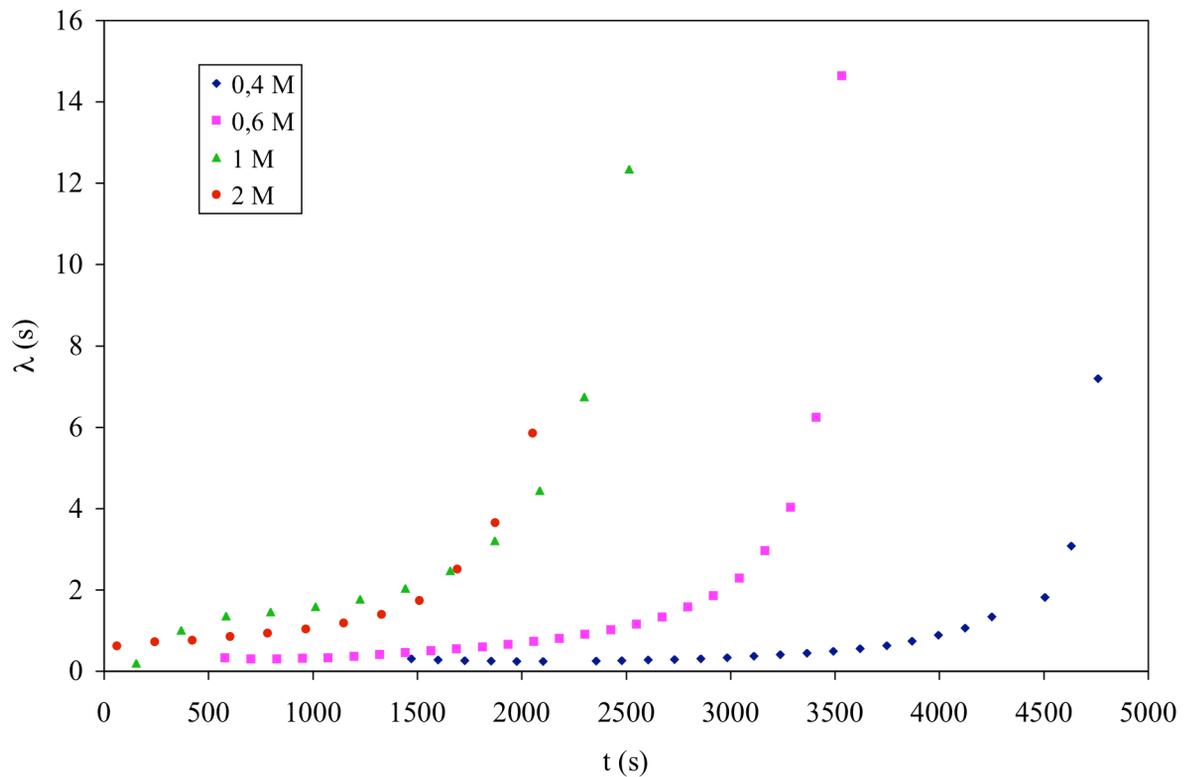


Figure 11. Évolution du temps de relaxation moyen en fonction du temps pour différentes masses molaires ; $C = 1,5 \%$ (p/p), $pH = 4$

Par ailleurs, il apparaît que, pour un temps donné, le temps de relaxation moyen augmente comme il a toujours été observé pour les solutions de polymères avec la masse molaire, excepté pour les échantillons 1M et 2M pour lesquels les courbes se superposent quasiment. Cette dernière observation est cohérente avec le fait que t_g semble tendre vers une valeur constante pour ces deux masses molaires élevées.

III.3.2.5 Évolution du module d'équilibre au cours de la gélification en fonction de la masse molaire

La Figure 12 représente l'évolution du module d'équilibre G_e pour le matériau en cours de gélification déterminé à l'aide de l'équation Éq III.9. Nous rappelons que G_e est nul dans la phase sol et n'apparaît qu'à partir du temps de gélification. Comme S après le temps de gélification, G_e augmente dans la phase solide viscoélastique. Cependant, comme G' , il ne se stabilise pas au temps long (voir Figure 5). Ceci peut s'expliquer par la formation de hydrophobes qui conduisent à un gel plus élastique comme nous l'avons déjà mentionné. Par ailleurs de même que S après t_g , G_e augmente avec la masse molaire.

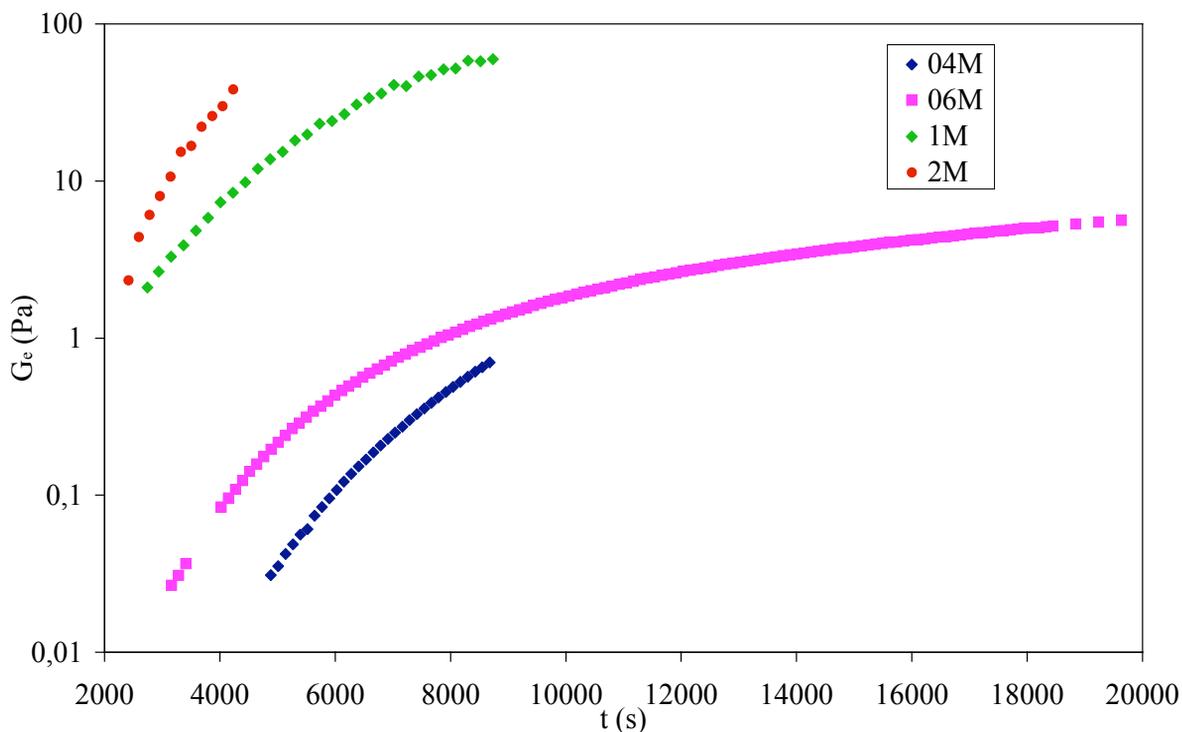


Figure 12. Évolution du module d'équilibre en fonction du temps pour différentes masses molaires ; $C = 1,5\%$ (p/p), $\text{pH} = 4$

III.3.2.6 Évolutions normalisées du temps de relaxation et du module d'équilibre au cours de la gélification

La Figure 13 et la Figure 14 représentent respectivement les variations de λ et de G_e pour des temps respectivement inférieurs et supérieurs à t_g en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé par rapport au temps de gélification ($\frac{|t-t_g|}{t_g}$). Sur la Figure 13, nous avons représenté l'axe des abscisses dans le sens décroissant de 1 à 0 pour mieux observer l'évolution de λ à l'approche du temps de gélification.

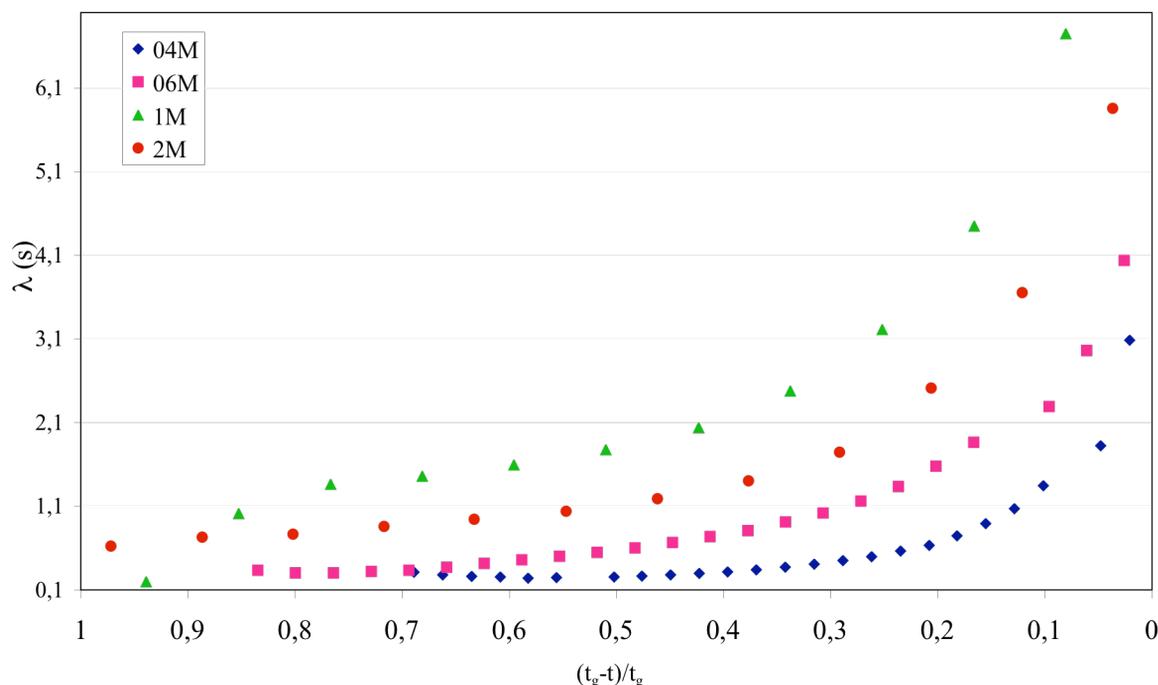


Figure 13. Évolution pour différentes masses molaires du temps de relaxation λ proche de la transition sol-gel ($t < t_g$) en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé ; $C = 1,5 \%$ (p/p), $\text{pH} = 4$

Nous observons que l'évolution du temps de relaxation moyen en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé dépend de la masse molaire. Plus précisément, pour un taux d'avancement donné de la réaction, le temps de relaxation du système augmente quand la masse molaire augmente pour les masses molaires inférieures à 10^6 g/mol (masse molaire de l'échantillon 1M). Ce comportement est analogue à celui d'une solution de polymère sans agent réticulant comme nous l'avons observé dans le deuxième chapitre en étudiant la variation de la viscosité en fonction de la concentration pour deux échantillons de masse molaire différente. Ainsi, l'effet de la masse molaire sur la dynamique des réseaux (non gélifié) de chitosane persiste au cours de la gélification dans la phase sol. Pour les échantillons 1M et 2M, la variation du temps de relaxation en fonction de la masse molaire est inversée. Ce comportement est lié à la quasi-égalité des valeurs de λ au cours de la réticulation pour les deux échantillons alors que le temps de gélification de l'échantillon 1M est supérieur à celui de l'échantillon 2M (Figure 11).

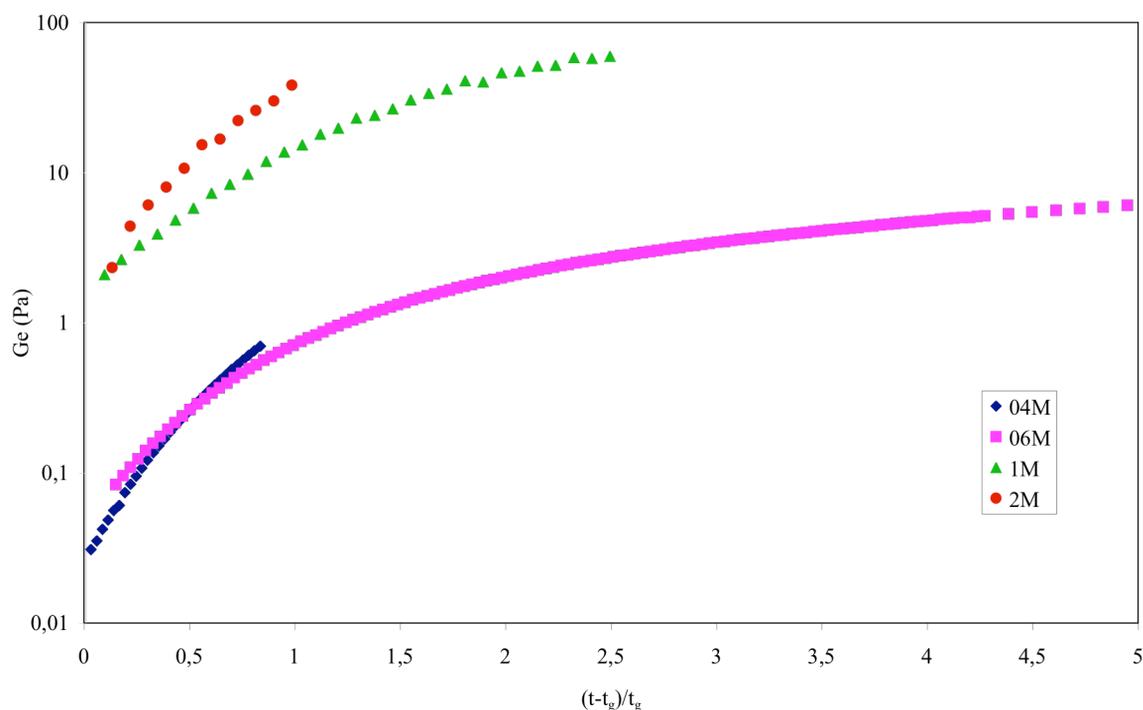


Figure 14. Évolution pour différentes masses molaires du module d'équilibre G_e proche de la transition sol-gel ($t > t_g$) en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé ; $C = 1,5 \%$ (p/p), $pH = 4$

De même que pour le temps de relaxation, l'évolution du module d'équilibre en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé varie avec la masse molaire. Ceci signifie qu'à un taux d'avancement donné de la réaction, l'élasticité du système dépend de la masse molaire. Ce comportement s'explique comme pour les paramètres S et Δ par la proportion de bouts de chaînes pendantes qui augmente quand la masse molaire diminue (paragraphe III.3.2.2). Nous constatons toutefois, que cet effet est négligeable entre les échantillons 04M et 06M.

Les modèles basés sur la percolation prédisent que le temps de relaxation moyen et le module d'équilibre proche de la transition sol-gel divergent selon les équations :

$$\lambda(p) \propto \left(\frac{p_c - p}{p_c} \right)^{-a} \quad \text{Éq III.16}$$

$$G_e(p) \propto \left(\frac{p - p_c}{p_c} \right)^{-b} \quad \text{Éq III.17}$$

où p , que nous avons défini dans la partie théorique, est l'avancement de la réticulation chimique que nous assimilons dans notre étude au temps d'avancement de la réaction. Nous n'avons pu vérifier ce type de loi parce que nous avons très peu de points expérimentaux proches de la transition sol-gel (soit à moins de 10 % de t_g).

III.3.3 Effet de la concentration du chitosane

L'étude de la cinétique de gélification a été réalisée pour des concentrations massiques comprises entre 1,2 % et 1,8 % (p/p) pour l'échantillon 1M. Le pH des solutions avant le début de la réticulation est 5. Pour tous nos systèmes, la concentration en groupement aldéhyde du glyoxal (0,0552 mol/L) est toujours inférieure à la concentration des groupements amine du chitosane (0,0593 mol/L pour une concentration de chitosane de 1,2 % (p/p)) (voir annexe 1).

III.3.3.1 Variation du temps de gélification en fonction de la concentration de chitosane

Des mesures préliminaires ont été effectuées pour des concentrations plus faibles que 1,2 %. À 1 % nous avons un gel qui se forme après plus de 12 heures. Plus la concentration diminue plus la transition de l'état sol à l'état gel est difficilement mesurable car les valeurs de G' augmentent très peu. Pour des concentrations massiques inférieures à 0,9 %, il n'y a pas apparition de gel détectable macroscopiquement. Il faut donc une concentration en polymère suffisante, soit une certaine densité d'enchevêtrements, pour qu'il y ait gélification. Nous avons trouvé dans la partie caractérisation que la concentration d'enchevêtrement est de l'ordre de 0,58 % pour le chitosane 1M. Cette valeur est légèrement inférieure à la concentration à partir de laquelle nous n'observons plus de gel. Pour des concentrations massiques supérieures à 1,8 % la gélification est quasiment instantanée, une étude rhéologique de la transition est donc impossible.

La variation du temps de gélification en fonction de la concentration massique du chitosane est représentée sur la Figure 15. Ces résultats montrent que la cinétique est accélérée quand la concentration en polymère augmente. Ce comportement s'explique par l'augmentation de la densité des enchevêtrements avec la concentration qui entraîne une augmentation de la probabilité de pontage entre deux chaînes de chitosane. Il a été observé également pour d'autres réseaux de chitosane formés par réticulation chimique avec du glutaraldéhyde [Roberts (1989)] ou par liaisons avec des ions de platine [Brack (1997)].

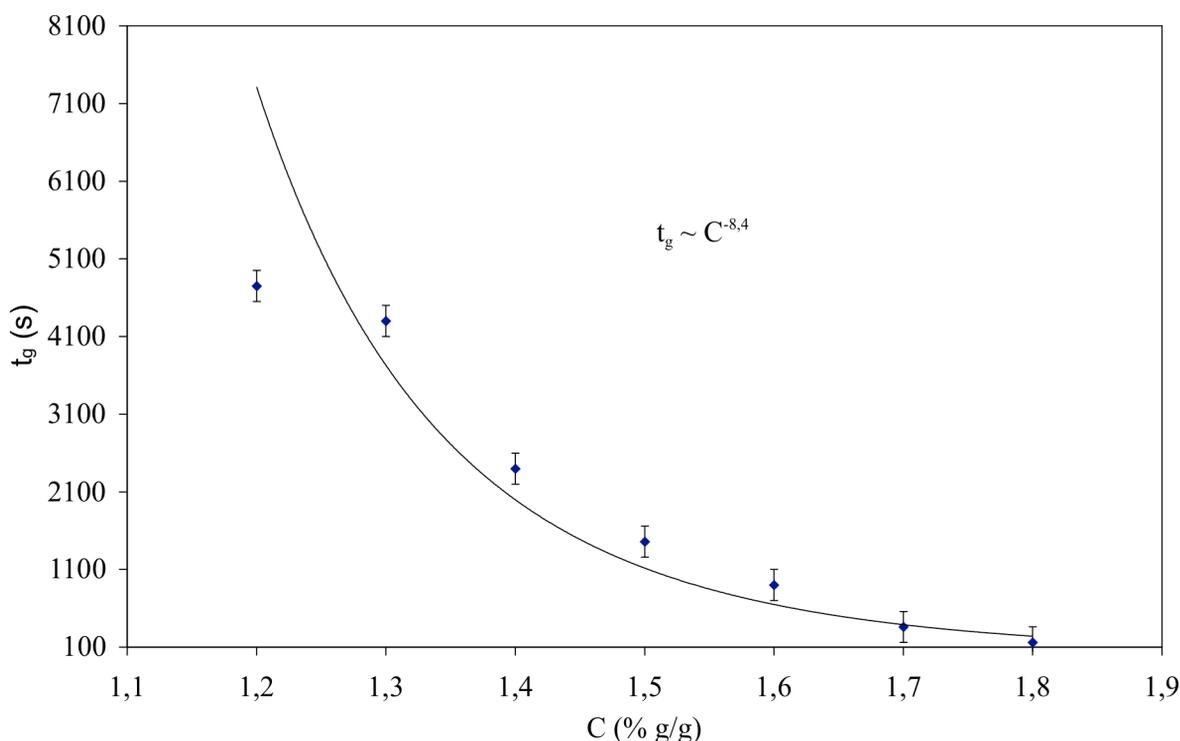


Figure 15. Variation du temps de gélification en fonction de la concentration massique du chitosane pour l'échantillon 1M, pH = 5 ajusté par une loi de puissance

La modélisation de la cinétique de gélification de biopolymères est rendue difficile en raison de leur polydispersité, de la répartition non uniforme des sites réactifs ou encore du nombre important des processus (interactions hydrophobes par exemple) qui s'ajoutent à la réaction principale pour conduire à la formation du gel. Un certain nombre de modèles a été proposé pour décrire l'influence de la concentration en polymère sur la vitesse de réaction [Ross-Murphy (1991)], [Tobitani (1997)]. En particulier, *Tobitani et al.* ont développé un modèle dans lequel le mécanisme de gélification peut aussi bien être décrit par la théorie de champ moyen ou par celle de la percolation. Contrairement aux autres auteurs, ils ont étudié l'effet de la concentration parallèlement à celui de la température en se basant sur le modèle d'Arrhenius qui relie celle-ci à la vitesse de gélification. Ils ont montré que le temps de gélification évolue en fonction de la concentration et de la température de la manière suivante :

$$t_g \propto a_1 C^{(a_2 + a_3 T)} \exp(a_4 T) \quad \text{Éq III.18}$$

où a_1 , a_2 , a_3 et a_4 sont des coefficients dépendant de l'ordre de la réaction et de la densité de jonctions minimales pour avoir un gel critique. T est la température à laquelle se fait la

gélification. Pour une température donnée, t_g évolue donc en fonction de la concentration suivant une loi de puissance décroissante.

Nous observons ce type de comportement dans nos systèmes (Figure 15). À partir de la Figure 15, nous déduisons que l'exposant de l'évolution du temps de gélification t_g en fonction de la concentration de chitosane est proche de 8. À partir des courbes expérimentales de la publication de *Tobitani et al.*, portant sur la gélification de la BSA (sérum albumine bovine) induite par la température, nous avons estimé ce même exposant. Nous trouvons qu'il varie entre 5 et 10 lorsque la température augmente de 56 °C à 66 °C. La comparaison de l'exposant obtenu dans notre étude avec ceux qui ont été déterminés dans la littérature n'est pas évidente. En effet, on connaît rarement les conditions de température ou les autres paramètres dont dépendent les coefficients a_1 , a_2 , a_3 et a_4 pour ce type d'expériences.

III.3.3.2 Variations de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au temps de gélification en fonction de la concentration de chitosane

La Figure 16 représente l'influence de la concentration en chitosane sur l'exposant de relaxation et l'amplitude de gel au temps de gélification.

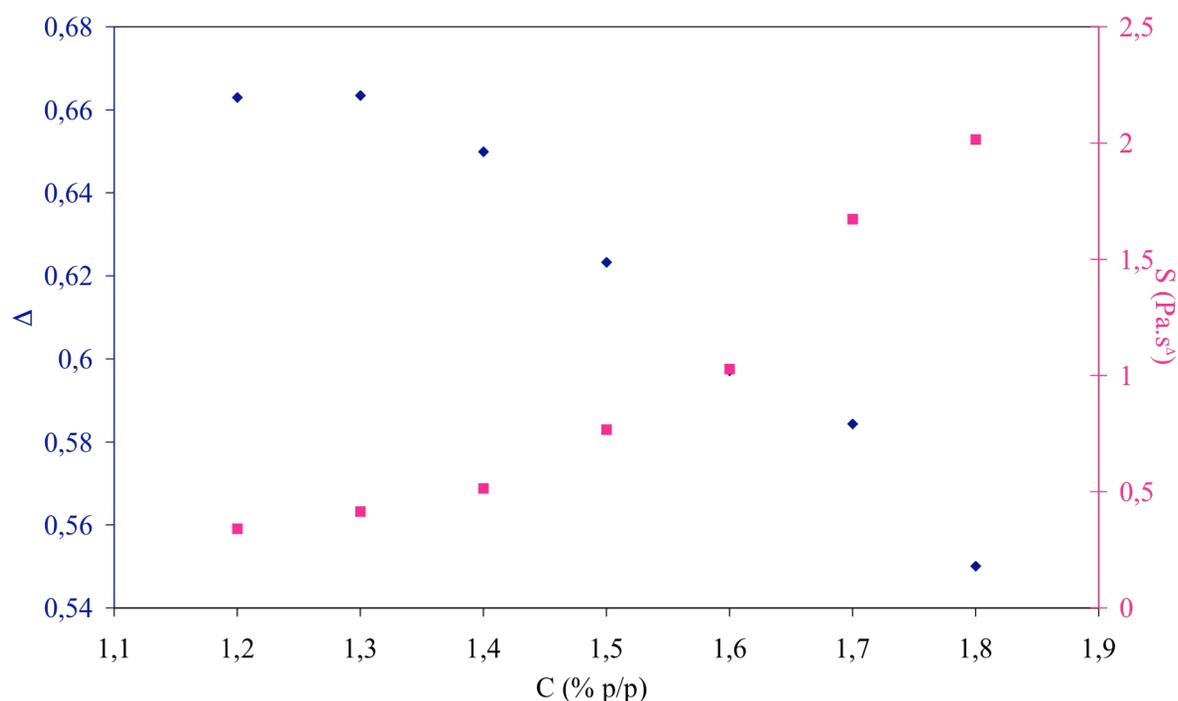


Figure 16. Variations de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel en fonction de la concentration massique du chitosane pour l'échantillon 1M, le pH est fixé à 5

En augmentant la concentration massique de 1,2 % à 1,8 % l'exposant de relaxation varie entre 0,66 et 0,55. Il y a donc une augmentation de la ramification du matériau avec la

concentration en polymère. Symétriquement, l'amplitude du gel critique augmente pour obtenir une structure plus viscoélastique. En supposant que tout le glyoxal réagit, le nombre de points de réticulation est le même pour tous les échantillons. Cette variation de S avec la concentration peut s'expliquer alors par l'augmentation de la densité d'enchevêtrements [de Gennes (1979)]. En effet, l'élasticité est liée à la densité de jonctions (physique ou chimique) qui augmente avec la concentration de polymères ; les enchevêtrements entraînent une structure plus rigide et plus ramifiée, d'une part parce qu'ils confèrent une plus grande connexité au réseau et d'autre part parce qu'ils favorisent l'apparition de liaisons hydrophobes. Cet effet des enchevêtrements sur les propriétés viscoélastiques du gel critique a aussi été observé par Nyström *et al.* [Nyström (1999)] et [Desbrières (2004)] pour des gels physiques de chitosane formés par liaisons hydrophobes. Ils ont montré que les enchevêtrements étaient prépondérants par rapport aux liaisons hydrophobes pour former un gel critique élastique.

Les résultats précédents montrent que les variations de Δ et de S sont liées. À partir de résultats sur la gélification de PDMS, Scanlan *et al.* [Scanlan (1991)] ont observé la relation suivante :

$$S = G_0 \lambda_0^\Delta \quad \text{Éq III.19}$$

où G_0 et λ_0 ont les dimensions respectivement d'un module viscoélastique et d'un temps de relaxation.

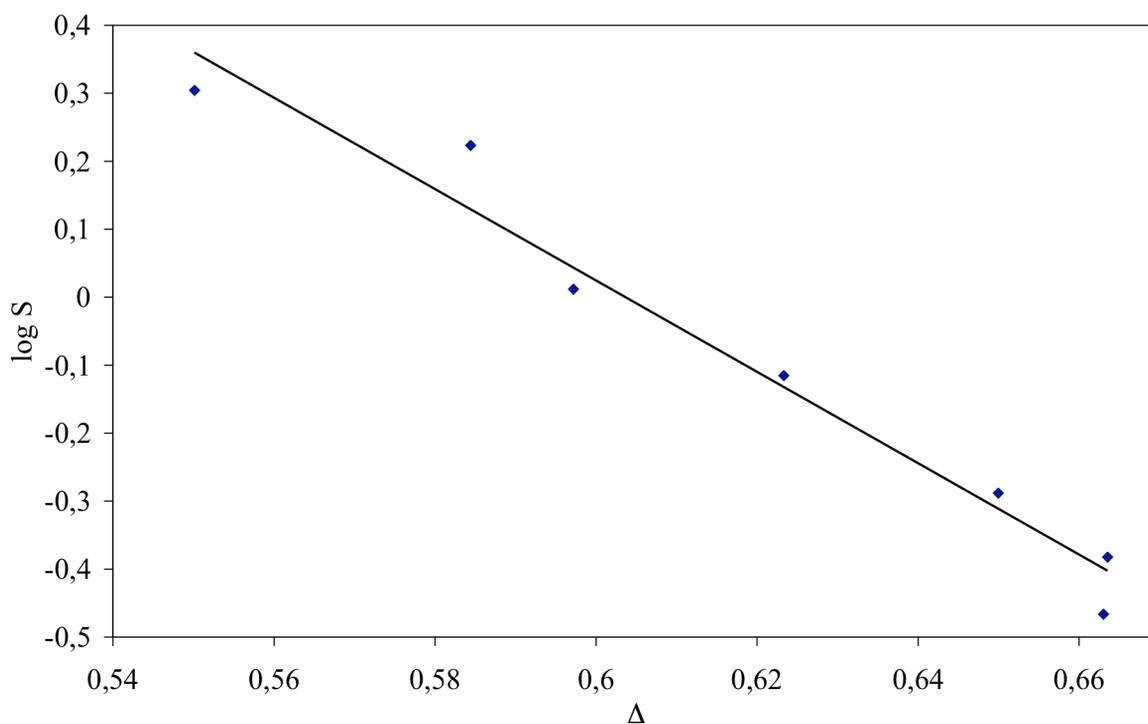


Figure 17. Variation en coordonnées semi-logarithmes de l'amplitude de gel S en fonction de l'exposant de relaxation Δ déterminé au temps de gélification pour les différentes concentrations de chitosane ajustée par l'équation Éq III.19

La Figure 17 représente l'évolution de S en fonction de Δ à t_g . Nous observons que l'équation Éq III.19 est vérifiée. L'ajustement des points expérimentaux conduit à déterminer G_0 de l'ordre de $11 \cdot 10^3$ Pa et λ_0 à $2 \cdot 10^{-7}$ s.

Dans ce cas, λ_0 représenterait le temps de relaxation des chaînes de polymères en régime dilué. G_0 serait le module d'un fondu de chitosane avec une densité fixée de nœuds de réticulation chimique. En effet, lorsque la concentration en polymère décroît, on tend vers un comportement d'un fluide visqueux sans élasticité ($\Delta \rightarrow 1$ et $S \sim G_0 \cdot \lambda_0$). En revanche, quand la concentration est très élevée, le milieu devient fortement élastique ($\Delta \rightarrow 0$ et $S \sim G_0$).

La valeur de G_0 déterminée est du même ordre de grandeur que celle qui caractérise les fondus de polystyrène (10^4 Pa) [Tassin (2001)]. Quant à la valeur de λ_0 , il est plus difficile de la comparer à des données de la littérature. Scanlan *et al.* ont déterminé des temps de relaxation qui variaient entre $5 \cdot 10^{-4}$ et $4 \cdot 10^{-7}$ s selon que le système était un réseau de PDMS de fonctionnalité 2 ou un mélange de ce même polymère avec un PDMS inerte.

III.3.3.3 Évolutions de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au cours de la gélification en fonction de la concentration de chitosane

Les évolutions de l'exposant de relaxation et d'amplitude de gel en fonction du temps pour différentes concentrations massiques de chitosane sont représentées respectivement sur la Figure 18 et la Figure 19.

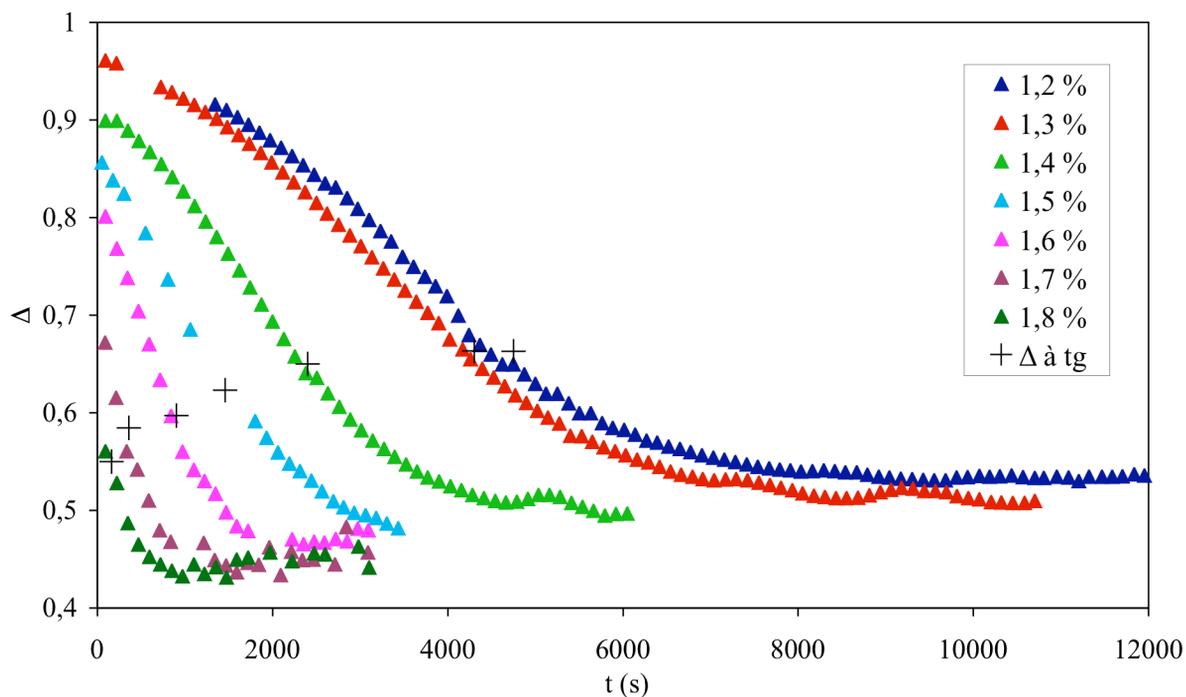


Figure 18. Évolution de l'exposant de relaxation en fonction du temps pour différentes concentrations massiques de chitosane de l'échantillon 1M, pH = 5

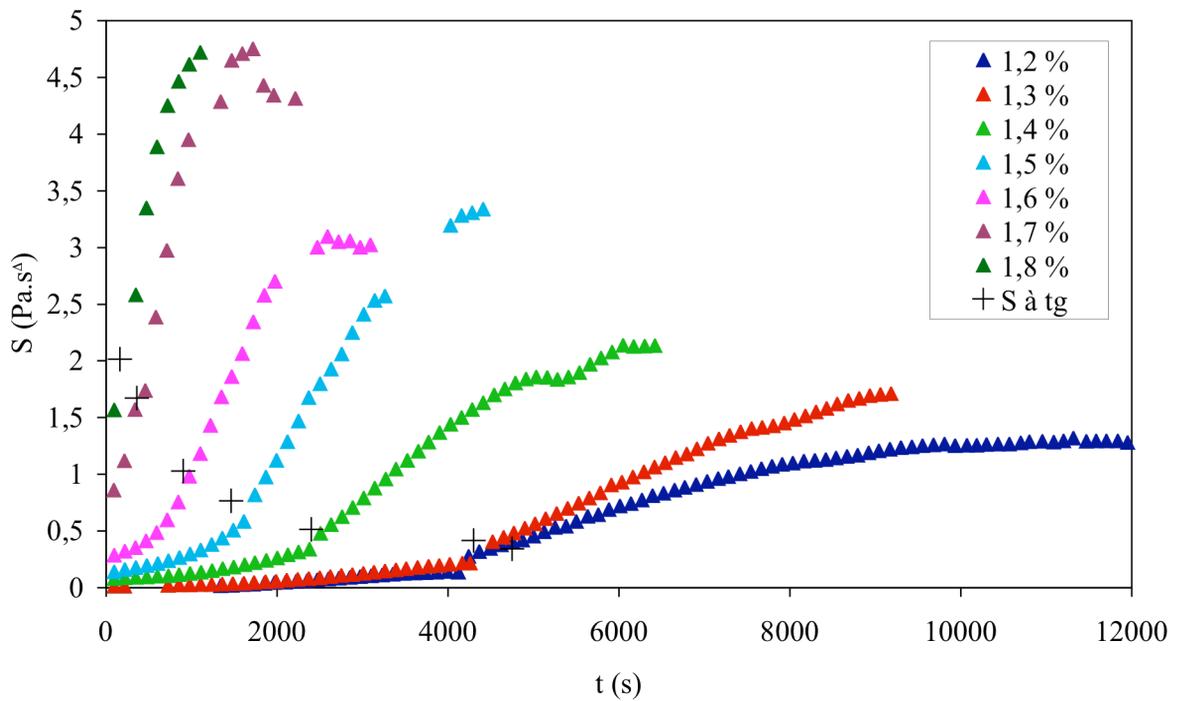


Figure 19. Évolution de l'amplitude de gel en fonction du temps pour différentes concentrations massiques de chitosane de l'échantillon 1M, pH = 5

Nous retrouvons ici les mêmes évolutions générales de Δ et S au cours de la gélification que celles obtenues dans l'étude de l'influence de la masse molaire. Ainsi, pour toutes les concentrations étudiées, Δ diminue et S augmente continûment au cours du temps pour atteindre respectivement des valeurs constantes après t_g . Ces évolutions traduisent la structuration et l'augmentation de la viscoélasticité du matériau avec la réticulation. De même, nous avons constaté que les valeurs déterminées de $\Delta(t_g)$ et $S(t_g)$ au temps de gélification (III.3.2.2) sont cohérentes avec les évolutions continues de Δ et S avant et après t_g .

Par ailleurs, nous observons que, pour un temps donné, durant tout le processus de gélification, Δ diminue et S augmente quand la concentration augmente. Comme pour le gel critique, ces comportements s'expliquent par l'augmentation de la densité d'enchevêtrements avec la concentration. Cette augmentation de la densité d'enchevêtrements entraîne une augmentation de l'élasticité et de la connexité au sein du matériau.

III.3.3.4 Évolution du temps de relaxation au cours de la gélification en fonction de la concentration de chitosane

La Figure 20 représente l'évolution du temps de relaxation moyen au cours de la gélification pour différentes concentrations de chitosane.

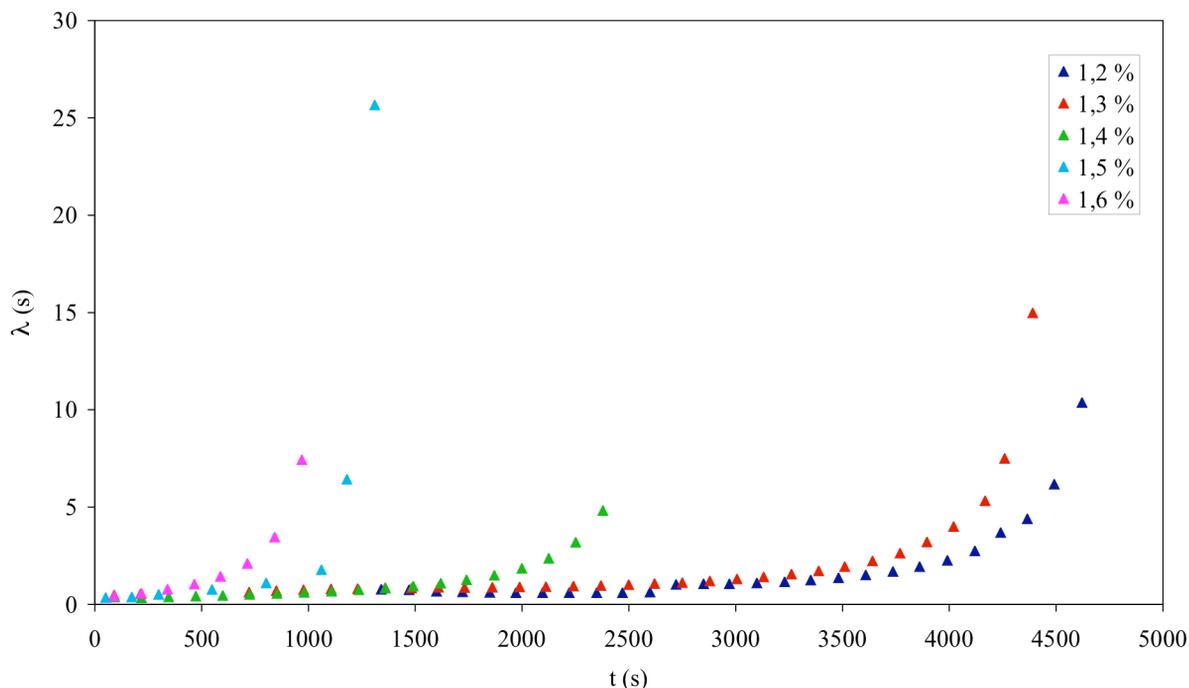


Figure 20. Évolution du temps de relaxation moyen en fonction du temps pour différentes concentrations pour l'échantillon 1M, pH = 5

Nous observons ici encore la divergence de λ à l'approche de la transition sol-gel. Celle-ci se produit d'autant plus rapidement que la concentration augmente comme nous l'avons vu en déterminant le temps de gélification.

III.3.3.5 Évolutions normalisées du temps de relaxation et du module d'équilibre au cours de la gélification

De même que pour l'étude de la masse molaire, nous avons tracé les évolutions de λ en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé par rapport au temps de gélification (Figure 21). L'axe des abscisses est tracé dans l'ordre décroissant. Il apparaît pour toutes ces évolutions à différentes concentrations une courbe maîtresse.

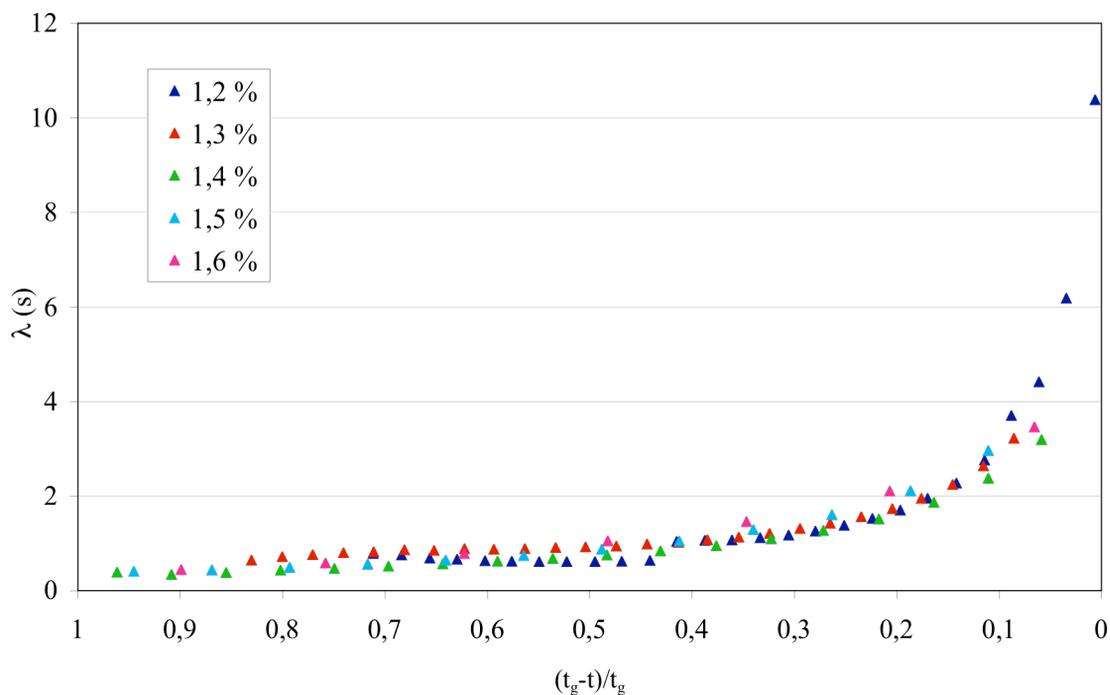


Figure 21. Évolution du temps de relaxation λ proche de la transition sol-gel ($t < t_g$) en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé et pour différentes concentrations massiques de chitosane pour l'échantillon 1M, pH = 5

L'évolution du temps de relaxation moyen en fonction de l'avancement de la réaction est donc indépendante de la concentration. Or, nous avons vu dans la partie II.4 que la dynamique d'un réseau de chitosane en solution dépendait de la concentration et donc de la densité d'enchevêtrements. Nous pensons donc d'une part qu'au début de la réaction, la variation de la concentration dans la gamme étudiée est trop faible pour observer un effet détectable par ces mesures sur le temps de relaxation. D'autre part, lorsque la densité de nœuds de réticulation augmente, celle-ci va prédominer par rapport à la densité d'enchevêtrements pour ralentir la dynamique du système à un écart au temps de gélification donné. Cela implique donc que dans la gamme de concentration étudiée, pour un écart au temps de gélification donné, la densité de réticulation est la même quelle que soit la concentration en polymère dans la phase sol.

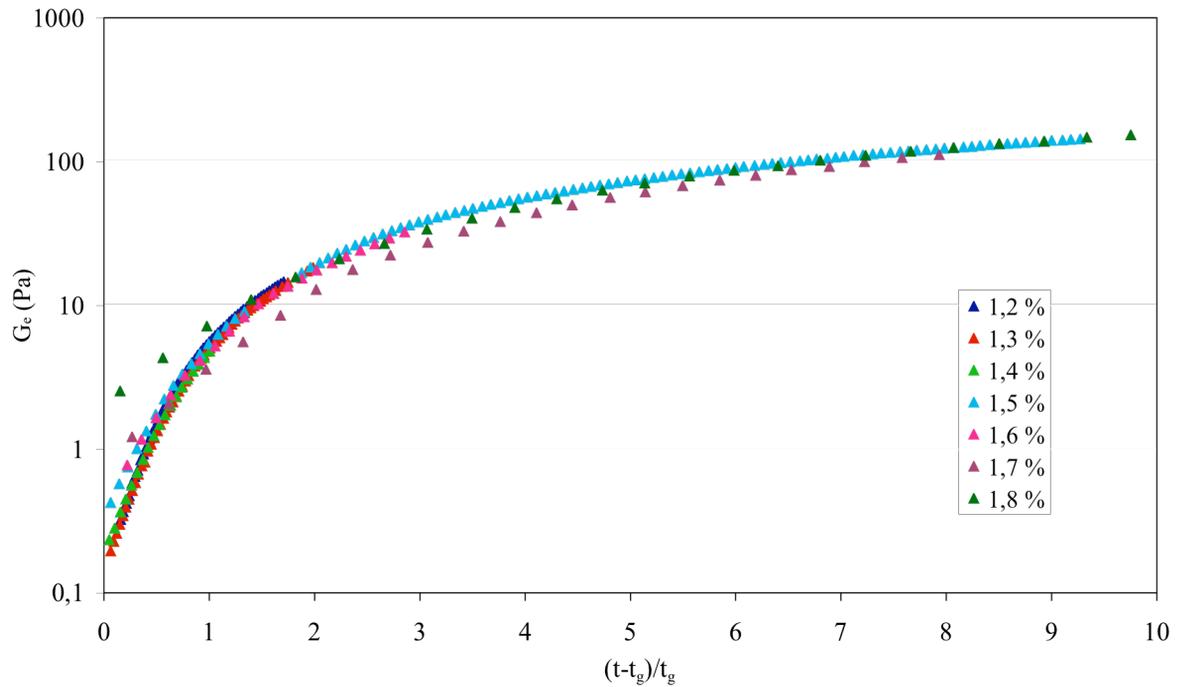


Figure 22. Évolution du module d'équilibre proche de la transition sol-gel ($t > t_g$) en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé et pour différentes concentrations massiques de chitosane pour l'échantillon 1M, pH = 5

La Figure 22 représente l'évolution du module d'équilibre en fonction de l'écart au temps de gélification pour différentes concentrations de chitosane. Il semble que les évolutions du module d'équilibre en fonction de la concentration suivent une courbe maîtresse excepté proche de la transition sol-gel. Cet écart à une courbe maîtresse peut s'expliquer par l'évolution rapide du module d'équilibre proche de t_g ce qui entraîne d'importantes incertitudes sur la valeur de ce paramètre proche de la transition. L'incertitude est d'autant plus importante que la concentration de chitosane est élevée. Ainsi, pour un échantillon de concentration 1,8 % (p/p), l'incertitude est de l'ordre de 30 % proche de t_g et diminue pour devenir inférieure à 10 % pour un écart relatif au temps de gélification supérieur à 1. Pour un échantillon de concentration 1,2 % (p/p), l'incertitude est de l'ordre de 30 % et est inférieure à 10 % pour un écart au temps de gélification supérieure à 0,4. Ces incertitudes sur la détermination du module d'équilibre peuvent justifier la dispersion des valeurs de G_e en fonction de la concentration de chitosane proche de t_g en particulier pour l'échantillon 1,8 % dont les valeurs sont bien supérieures à celles des autres échantillons pour un écart au temps de gélification donné.

Comme pour le temps de relaxation dans la phase sol, en tenant compte des incertitudes de détermination de G_e , nous pouvons donc considérer qu'il n'y a pas de variation de G_e en

fonction de la concentration d'enchevêtrements pour un écart au temps de gélification donné dans la phase solide. L'effet des enchevêtrements de chitosane serait négligeable par rapport à la densité de réticulation sur l'élasticité du système dans la gamme de concentration étudiée.

III.3.4 Effet du pH

Le chitosane étant un polyelectrolyte, on peut s'attendre à un éventuel effet du pH sur la cinétique de formation et la structure des gels. Pour étudier l'influence de ce paramètre, nous avons réalisé des mesures de viscoélasticité au cours de la gélification de réseaux de chitosane à partir de solutions de l'échantillon 1M de $\text{pH} = 4,0 \pm 0,2$ et de $\text{pH} = 5,0 \pm 0,2$. La concentration massique de chitosane est fixée à 1,5 %.

Les valeurs des paramètres de cinétique et de structure pour l'état gel critique des deux réseaux sont données dans le Tableau 1.

	t_g (s)	Δ (t_g)	S (t_g) (Pa.s ^{Δ})
pH = 4	6600 ± 200	$0,68 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,1$
pH = 5	1460 ± 100	$0,62 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,1$

Tableau 1. Valeurs des paramètres caractérisant la viscoélasticité du gel au temps de gélification pour les deux valeurs de pH étudiées

Nous remarquons que la diminution du pH s'accompagne d'une augmentation du temps de gélification. Cet effet du pH sur la cinétique de gélification s'explique par la réaction chimique. Cette réaction se produit entre les groupements amine du chitosane et les groupements aldéhyde du glyoxal. La diminution du pH entraîne la protonation des groupements amine, ce qui défavorise la réticulation. La cinétique est alors ralentie. Ce comportement a aussi été observé par [Brack (1997)] et [Roberts(1989)].

Dans cette étude de l'influence du pH, nous avons observé les mêmes évolutions générales de Δ , S, λ et G_e en fonction du temps que dans les études de l'influence de la masse molaire et de la concentration. Nous ne les avons pas représentées excepté pour Δ . Pour le système à pH 5 l'évolution de chacun de ces paramètres est représentée dans la partie concernant la concentration et aussi dans l'étude de l'influence du POE ci-dessous (III.3.5).

La Figure 23 présente l'évolution de l'exposant de relaxation en fonction du temps de réaction pour les deux réseaux de chitosane étudiés. Nous observons que l'exposant de relaxation augmente quand le pH diminue en particulier à t_g (voir Tableau 1). Ce comportement s'explique par l'augmentation de la proportion de charges présentes sur les chaînes lorsque le pH augmente. En effet, plus les chaînes sont chargées, plus elles se repoussent ce qui fait diminuer les contacts entre chaînes et les interactions hydrophobes intermoléculaires. La structure du gel est ainsi plus poreuse et moins élastique quand le pH diminue. Ceci est confirmé par une diminution de S quand le pH diminue (qui n'est pas représentée ici).

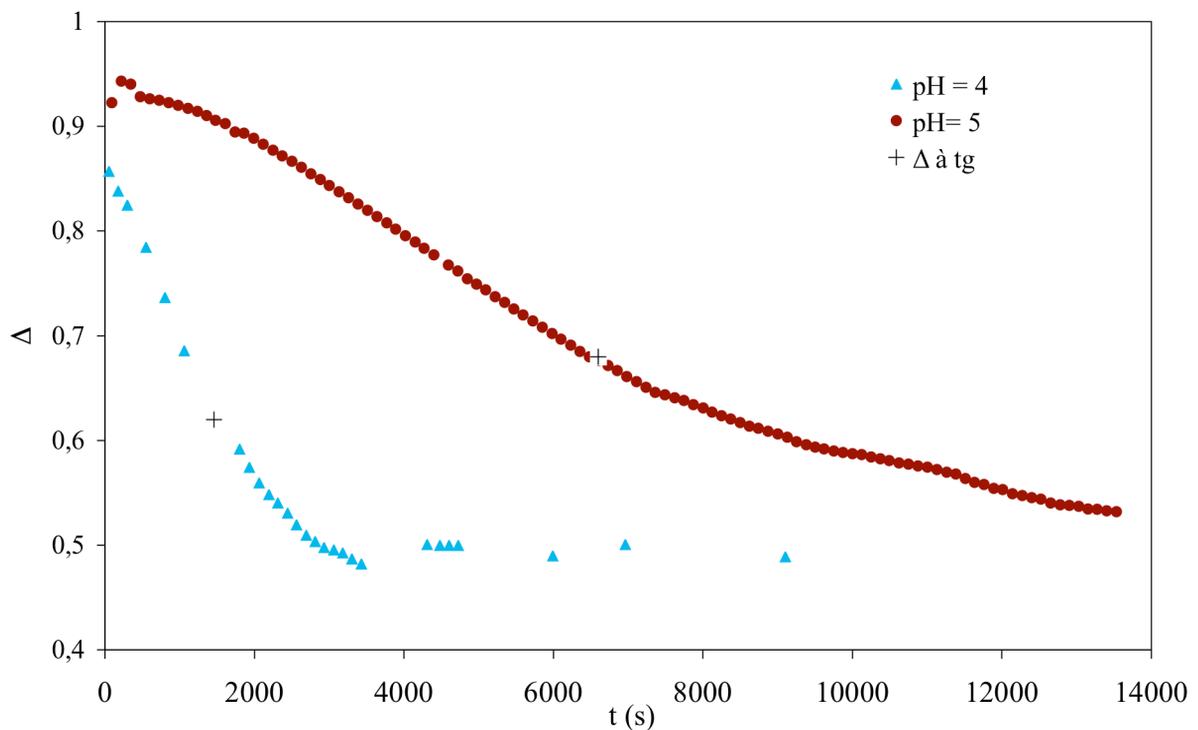


Figure 23. Évolution de l'exposant de relaxation en fonction du temps pour des réseaux à pH = 4 et pH = 5 de l'échantillon 1M, C = 1,5 % (p/p)

III.3.5 Effet de la teneur en POE

Cette étude a été réalisée pour des systèmes de concentrations massiques constantes en chitosane soit 1,5 %. La concentration massique en POE varie de 0,13 à 0,75 %. Le pH est fixé à 5.

III.3.5.1 Influence de la concentration en POE sur le temps de gélification et la structure des réseaux au temps de gélification

Dans le Tableau 2 suivant, nous avons regroupé le temps de gélification, les valeurs des exposants de relaxation et l'amplitude de gel en fonction de la quantité de POE ajouté pour former un réseau semi-interpénétré de chitosane/POE. Le système de concentration nulle en POE est le réseau de référence de chitosane similaire à celui des études de l'influence de la concentration et du pH pour une concentration massique de chitosane de 1,5 %. Les incertitudes données dans le tableau correspondent à la reproductibilité des mesures pour des échantillons provenant de solution-mères différentes.

[POE] % (p/p)	0	0,13	0,20	0,25	0,40	0,50	0,63	0,75
t_g (s) ± 200 s	1460	1250	1640	1410	1200	1660	1440	1100
$\Delta(t_g)$ $\pm 0,01$	0,62	0,59	0,58	0,56	0,53	0,52	0,50	0,48
$S(t_g)$ $\pm 0,1$ (Pa.s ^{Δ})	0,9	1,1	1,9	2,3	3,7	4,1	6,1	6,8

Tableau 2. Valeurs des paramètres caractérisant la viscoélasticité du gel au temps de gélification en fonction de la concentration de POE

Du Tableau 2, nous pouvons déduire que le POE n'a pas d'influence particulière sur le mécanisme de gélification. Ceci signifie que le POE n'intervient pas sur la cinétique de gélification dans la gamme de concentration étudiée. Ce résultat confirme ce qu'ont observé Khalid *et al.* par des expériences de GPC : il n'existe pas de liaisons chimiques entre le chitosane et le POE, ni entre le glyoxal et le POE [Khalid (1999)]. De plus, les mailles des réseaux doivent être très larges par rapport à la taille des molécules de glyoxal (58 g/mol) aussi bien pour les gels de référence que pour les gels semi-interpénétrés. L'ajout de POE doit donc avoir un effet négligeable sur la densité de réticulation chimique de l'agent réticulant (ceci sera confirmé dans le chapitre V). Ceci a aussi été observé par L. Martinez qui a étudié la quantification de la réticulation des gels de chitosane et chitosane/POE par spectroscopie IRTF (infrarouge à transformée de Fourier) [Martinez (2004)].

En revanche, le POE influence notablement la structure du gel au temps de gélification (Tableau 2) et durant toute la gélification comme nous le verrons au paragraphe suivant.

De même que pour la concentration en chitosane, nous avons observé une évolution symétrique de Δ et de S en fonction de la concentration de POE (annexe 2, Figure 1) suggérant une relation entre ces paramètres. Nous observons que cette relation est du type de l'équation Éq III.19 (annexe 2, Figure II). Ainsi, on détermine une valeur de 13 000 Pa pour G_0 et 2.10^{-7} s pour λ_0 . G_0 est un peu plus élevé dans cette étude que pour l'étude de l'effet de la concentration en chitosane (11 000 Pa) mais λ_0 est le même. Dans ce cas, λ_0 peut toujours être associé au temps de relaxation à partir duquel le comportement en loi de puissance est observé. En revanche, G_0 traduirait le module plateau d'un fondu de polymère pour lequel la concentration de POE est prédominant.

III.3.5.2 Évolutions de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel au cours de la gélification

La Figure 24 et la Figure 25 représentent respectivement les évolutions de Δ et S au cours du temps pour un réseau de chitosane seul et pour deux réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE de concentration de POE différente (0,25 et 0,75 %). Nous observons les mêmes allures pour les réseaux semi-interpénétrés que pour les réseaux de chitosane seul. Δ diminue tandis que S augmente et ces deux paramètres tendent vers des valeurs constantes après le temps de gélification.

Par ailleurs, plus la quantité de POE est importante, plus Δ est petit et S grand durant la gélification : le POE favorise donc la ramification du matériau et augmente sa viscoélasticité. Sachant que la concentration en chitosane est toujours la même, ce renforcement de la structure est dû à l'augmentation de la densité d'enchevêtrements de POE. Comme pour le chitosane, les enchevêtrements du POE favorisent donc une plus grande structuration du matériau.

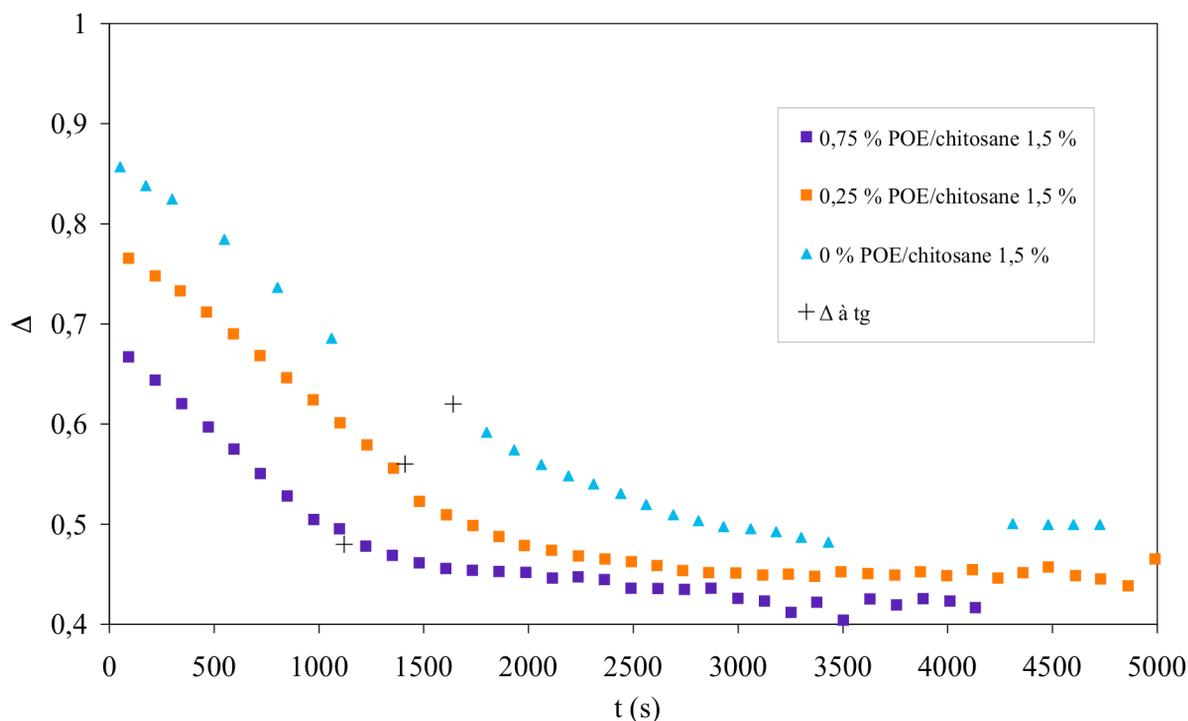


Figure 24 Évolution de l'exposant de relaxation en fonction du temps pour différentes concentrations de POE dans un réseau de l'échantillon 1M, C = 1,5 %, pH = 5

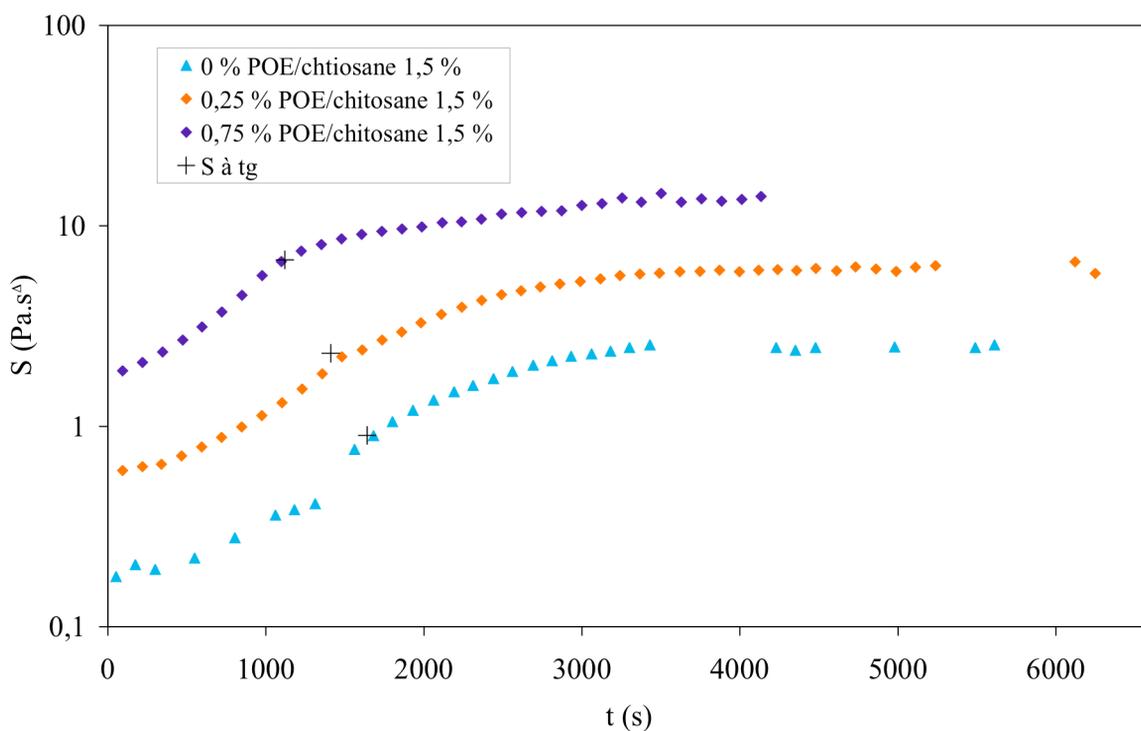


Figure 25. Évolution de l'amplitude de gel en fonction du temps pour différentes concentrations de POE dans un réseau de l'échantillon 1M, C = 1,5 %, pH = 5

III.3.5.3 Évolutions normalisées du temps de relaxation et du module d'équilibre au cours de la gélification en fonction de la concentration de POE

La Figure 26 et la Figure 27 représentent respectivement les évolutions de λ et G_e en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé pour deux réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE et un réseau de chitosane seul.

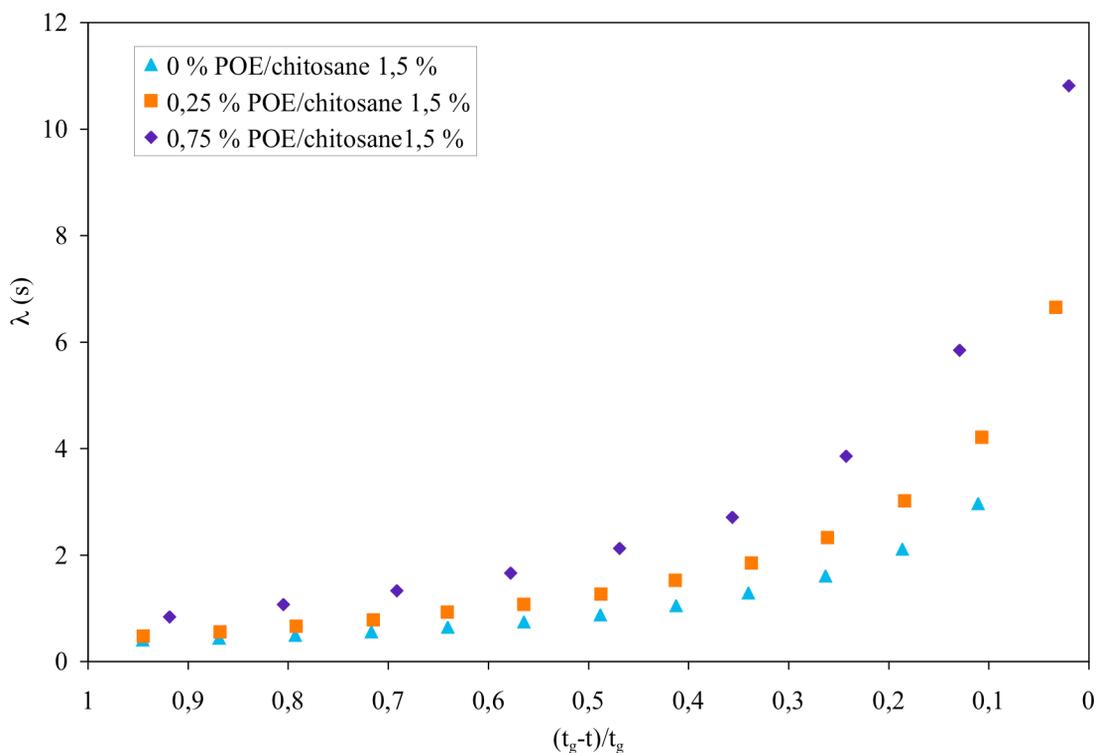


Figure 26. Évolution du temps de relaxation λ proche de la transition sol-gel ($t < t_g$) en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé pour un réseau de chitosane seul et pour deux réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE de concentrations massiques différentes en POE 0,25 % et 0,75 %

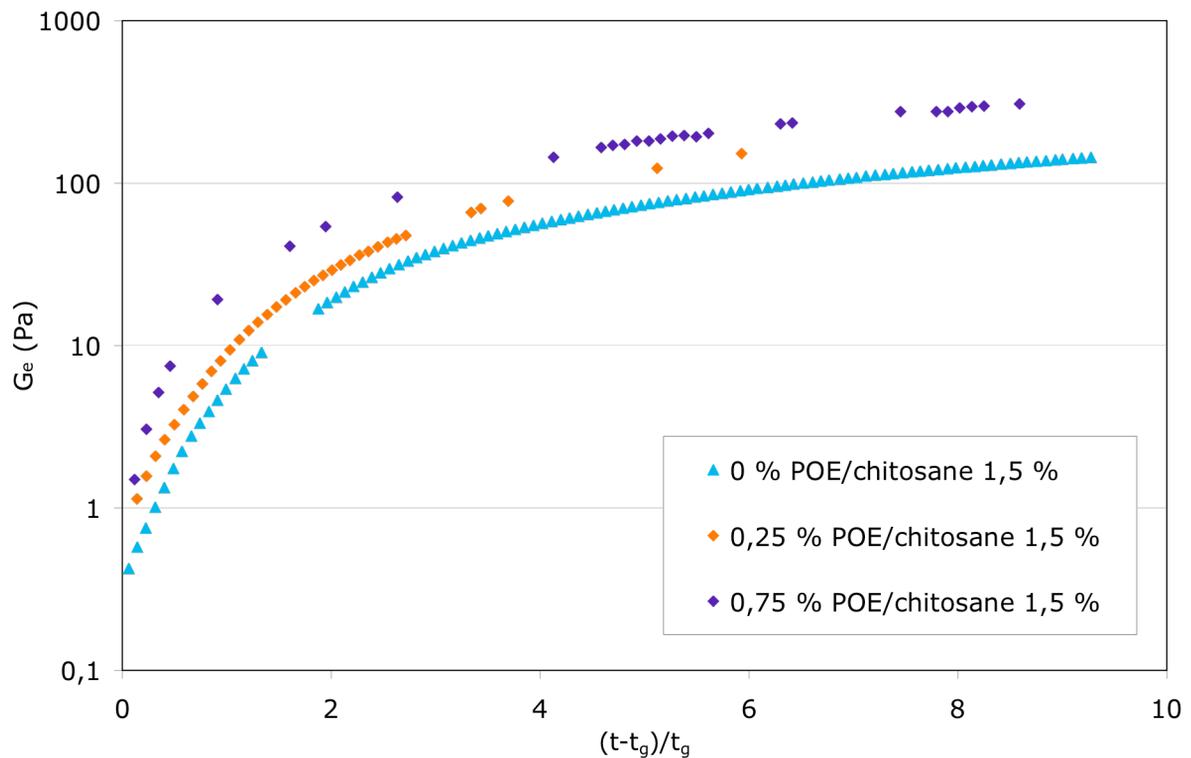


Figure 27. Évolution du module d'équilibre G_e proche de la transition sol-gel ($t > t_g$) en fonction de l'écart au temps de gélification normalisé pour un réseau de chitosane seul et pour deux réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE de concentrations massiques différentes en POE 0,25 % et 0,75 %

L'allure générale des courbes est la même pour les réseaux semi-interpénétrés et de chitosane seul. L'effet du POE est très bien visible dans la phase sol (Figure 26) et dans la phase gel (Figure 27). Alors que λ et G_e sont sensiblement les mêmes pour différentes valeurs de concentration de chitosane à un certain avancement de la gélification (voir Figure 21 et Figure 22, où les courbes obtenues se confondent), un ajout de POE permet d'obtenir une dynamique plus lente et une élasticité supérieure pendant toute la gélification (voir Figure 26 et Figure 27). L'augmentation de λ et G_e avec la concentration de POE pourrait s'expliquer par une variation plus importante de la concentration totale en polymère (concentration totale en polymère comprise entre 1,2 et 1,8 % pour les réseaux de chitosane seul et entre 1,5 et 2,25 % pour les réseaux semi-interpénétrés). Mais cette explication ne suffit pas car pour une concentration totale de polymère de 1,75 % (0,25 % de POE) dans un réseau semi-interpénétré le module est supérieur à celui d'un réseau de référence de concentration 1,8 %. Ainsi, les chaînes de POE induisent une viscoélasticité supplémentaire au matériau, qu'on ne peut obtenir en rajoutant du chitosane seul (c'est à dire des enchevêtrements) dans la gamme de concentration considérée. Ceci peut s'expliquer par le caractère neutre et la structure chimique peu encombrante des chaînes de POE (contrairement au caractère polyélectrolyte

(en solution) et la structure de polysaccharide des chaînes de chitosane) qui lui assure une plus grande flexibilité par rapport au chitosane et favorise donc les enchevêtrements.

Des mesures en oscillation et en indentation sur des gels à l'équilibre gonflés à pH = 1,2 [Khalid (1999)] ont aussi permis de montrer que l'élasticité des réseaux semi-interpénétrés est renforcée par rapport aux gels de référence : 380 Pa pour le réseau de référence (concentration massique de chitosane à 2 %) et 1000 Pa pour le réseau semi-interpénétré (chitosane 1,33 % et POE 0,27 %). Sachant que nos protocoles de gélification sont les mêmes mis à part le pH du milieu dont nous avons étudié l'influence sur la structure du réseau, la comparaison de ces valeurs aux nôtres (Tableau 3) suggère que nos réseaux sont encore bien loin du gel à l'équilibre. C'est bien ce que nous avons observé ; même au bout de deux jours, le module élastique continue à évoluer.

	POE 0 %	POE 0,25 %	POE 0,75 %
G_e (Pa) pour $(t-t_g/t_g)=8,6$	134	200	308

Tableau 3. Valeur de G_e maximale mesurée au cours de nos expériences pour deux réseaux semi-interpénétrés de concentration différentes en POE et pour un réseau de chitosane seul

III.3.6 Discussion générale

Dans cette étude, nous avons évalué d'une part l'effet de la masse molaire, de la concentration et du pH des solutions de chitosane initiales sur la cinétique de gélification de réseau de chitosane. D'autre part, nous avons confirmé que le POE ne réagissait pas chimiquement avec le chitosane ou le glyoxal ; il n'a aucune influence sur la cinétique de réticulation des réseaux covalents de chitosane, en revanche, par ces enchevêtrements, il contribue à augmenter l'élasticité du gel.

III.3.6.1 Viscoélasticité à t_g

Nous avons pu caractériser la structure du gel critique et mis en évidence l'influence de la masse molaire et de la concentration de chitosane, du pH et de la proportion de POE sur cette structure. Comme un certain nombre de travaux, nous avons montré que la structure du gel critique dépend de ces paramètres. Ainsi, nous avons montré que selon les paramètres physico-chimiques, l'exposant de relaxation du gel critique varie entre 0,83 (pour 04M,

pH = 4, 1,5 % de chitosane, 0 % de POE) à 0,50 (pour 1M, pH = 5, 1,5 % de chitosane, 0,75 % de POE). Et parallèlement, S varie de 0,03 à 5,40 Pa.s^Δ (pour exactement les mêmes échantillons). La structure du gel critique dépend principalement de la masse molaire du chitosane, des enchevêtrements, des interactions hydrophobes et du pH.

Pour un gel physique de chitosane ($M_w = 193\ 000$ g/mol, DDA = 88 %) de concentration 40 g/L (soit plus de 20 fois supérieure à nos concentrations), Desbrières a déterminé un exposant de relaxation de 0,41 [Desbrières (2004)]. Nyström *et al.* ont déterminé pour un gel physique de chitosane ($M_w = 400\ 000$ g/mol, DDA = 84 %) de concentration 3,9 % un exposant de 0,36 [Nyström (1999)].

De façon générale, les gels critiques de chitosane peuvent donc avoir une variété de structure géométrique selon les paramètres physico-chimiques comme un certain nombre d'autres systèmes, tels les alcoxydes de silice [Ponton (2002)], sachant que Δ est théoriquement compris entre 0 et 1 [paragraphe III.1.1]. Les modèles de percolation prédisent (Tableau 4) des valeurs de $\Delta(t_g)$ comprises entre 0,66 et 1.

	Dynamique de Rouse	Dynamique de Zimm	Analogie avec les réseaux électriques	Martin <i>et al.</i>
$\Delta(t_g)$	0,67	1	0,72	0,66 - 1

Tableau 4. Valeurs de l'exposant de relaxation pour gel critique selon les modèles de percolation [Martin (1989)]

Le modèle de Rouse suppose que les interactions hydrodynamiques sont complètement écrantées alors que le modèle de Zimm prend en compte ces effets. Martin *et al.* [Martin (1989)] ont montré que $\Delta(t_g)$ est limité en fonction des interactions hydrodynamiques et que ces limites correspondent aux cas particuliers des travaux de Rouse et Zimm. Par ailleurs, De Gennes a proposé une analogie entre les réseaux gélifiants et les réseaux électriques [De Gennes (1979)]. Ces derniers sont constitués de résistance dont la connexion fait croître la conductivité comme la formation des liens entre les molécules fait croître les propriétés viscoélastiques. Ainsi, les chaînes pendantes sont supposées ne pas contribuer au module élastique. En fait, il s'est avéré dans les nombreuses études expérimentales que les modèles basés sur la percolation décrivent très bien la statique de la transition sol-gel telles la

distribution du poids moléculaire ou la divergence du poids moléculaire du plus gros amas dans le matériau. En revanche, ces modèles ne sont pas vérifiés dans les études dynamiques de cet état critique : comme nous venons de le voir dans cette étude l'exposant de relaxation dépend des paramètres physico-chimiques contrairement aux prédictions théoriques.

Les valeurs que nous observons pour S sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour la gélatine [Hsu (1993)], pour du 1,3 :2,4-bis-O-(*p*-méthylbenzylidène)-D-sorbitol [Takenaka (2001)] ou l'alkoxide de silice [Warlus (2003)]. En revanche, ces valeurs sont très faibles par rapport aux gels physiques de chitosane ($M_w = 400\ 000$ g/mol, DDA = 84 %, C = 3,9 %, $S = 232$ Pa.s^Δ) obtenus par Nyström *et al.* [Nyström (1999)], aux gels chimiques de poly(diméthylsiloxane) (de l'ordre de 10^3 Pa.s^Δ) [Scanlan (1991)] ou de polybutadiène (de l'ordre de 10^3 Pa.s^Δ) [De Rosa (1994)]. Comme pour Δ , S est très dépendant des paramètres physico-chimiques. Dans nos conditions expérimentales, nous obtenons des gels critiques plutôt mous en comparaison à ceux de la littérature.

III.3.6.2 Viscoélasticité au cours de la gélification

Nous avons vu que les équations de Friedrich *et al.* [Friedrich (1988, 1989)] nous permettent de déterminer 4 paramètres : Δ et S pendant toute la gélification, λ dans la phase fluide viscoélastique et G_e dans la phase gel.

Il existe très peu de données dans la littérature sur les valeurs de Δ et S à des temps différents de t_g . On observe toujours dans nos systèmes que Δ diminue et S augmente pendant que les liaisons chimiques se forment, qu'ils évoluent de manière continue et qu'au voisinage de t_g les valeurs déterminées sont en accord avec celles qui ont été obtenues à l'aide du comportement en loi de puissance.

En ordre de grandeur, comme pour leurs valeurs à t_g , Δ peut prendre différentes valeurs à chaque moment de la gélification selon les conditions physico-chimiques. Par exemple, au début de la gélification, quand la concentration massique augmente de 1,3 % à 1,8 %, Δ varie de 0,96 à 0,56. Après la gélification, Δ décroît toujours avec la concentration mais avec des écarts moins importants : de 0,54 à 0,44.

Ce qui est notable aussi c'est que S et Δ atteignent symétriquement des valeurs limites aux temps longs de la gélification. Ce comportement a été également observé par Warlus durant sa thèse [Warlus (2004)]. Ceci suggère que ces paramètres sont liés.

Pour nos études, au début de la réaction, S varie de 0 (0,4M, pH = 4, C = 1,5 % (p/p)) à 5,42 Pa.s^A (0,75 % POE/chitosane 1,5 %) et aux temps de longs de la gélification de 0,3 à 14 Pa.s^A pour les mêmes systèmes. Ces valeurs comme celles à t_g sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les réseaux d'alkoxide de silice [Warlus (2003)] mais bien plus faibles que pour les réseaux de PDMS [Friedrich (1988) (1989)].

Les évolutions générales de λ (temps moyen de relaxation) et G_e (module élastique d'équilibre) en fonction du temps sont similaires à celles qui ont été déterminées lors de la formation des gels d'alkoxide de silice [Warlus (2004)] et de PDMS [Friedrich (1988) (1989)]. En particulier, nous avons bien observé la divergence du temps de relaxation et l'apparition du module élastique d'équilibre au voisinage de la transition sol-gel comme il est classiquement observé dans les différents travaux et prévu par les modèles théoriques de la gélification. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer des exposants de divergence proche de cette transition par manque de points expérimentaux près de t_g . Par ailleurs, nous avons observé que ces paramètres évoluent en fonction de la masse molaire du chitosane et la concentration de POE, mais semblent peu influencés par la concentration dans les gammes étudiées quel que soit le taux d'avancement. De plus, l'élasticité continue à croître très longtemps après la transition sol-gel en raison des associations hydrophobes.

III.4 RÉFÉRENCES :

W. Argüelles-Monal, F.M. Goycoolea, C. Peniche, I. Higuera-Ciapara, *Rheological study of the chitosan/glutaraldehyde chemical gel system*, Polymer Gels and Networks, 6, 429-440 (1998)

H. P. Brack, S. A. Tirmizi, W. M. Risen, *A spectroscopic and viscosimetric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan*, Polymer, 38, 10, 2351-2362 (1997)

F. Chambon, H.H. Winter, *Linear viscoelasticity at the gel point of a crosslinking PDMS with imbalanced stoichiometry*, Journal of Rheology, 31 (8), 683-697 (1987)

P. G. de Gennes, *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell University Press, Ithaca (1979)

- M. E. De Rosa, H. H. Winter, *The effect of entanglements on the rheological behavior of polybutadiene critical gels*, *Rheology Acta*, 33, 220-237 (1994)
- J. Desbrières, *Autoassociative natural polymer derivatives : the alkylchitosans. Rheological behavior and temperature stability*, *Polymer*, 45, 3285-3295 (2004)
- K. I. Draget, *Associating phenomena in highly acetylated chitosan gels*, *Polymers Gels and Networks*, 4, 143-151 (1996)
- D. Durand, *Les réseaux macromoléculaires et les gels*, Groupe français d'étude et d'application des polymères, chap 5, 121-182 (1990)
- C. Friedrich, L. Heymann, *Extension of a model for crosslinking polymer at the gel point*, *Journal of Rheology*, 32(3), 235-241 (1988)
- C. Friedrich, L. Heymann, H.R. Berger, *Evolution of time constants during sol-gel transition*, *Rheologica Acta*, 28, 535-539 (1989)
- S-H. Hsu, A. M. Jameison, *Viscoelastic behavior at the thermal sol-gel transition of gelatin*, *Polymer*, 34, 12, 2602-2608 (1993)
- A. Izuka, H. H. Winter, *Temperature dependence of viscoelasticity of polycaprolactone critical gels*, *Macromolecules*, 27, 6883-6888 (1994)
- M. N. Khalid, L. Ho, F. Agnely, J. L. Grossiord, G. Couarraze, *Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network, comparaison with a chitosan reference gel*, *S. T. P. Pharma Sciences*, 9, 4, 349-364 (1999)
- J. E. Martin, D. Adolf, J. P. Wilcoxon, *Viscoelasticity near the sol-gel transition*, *Physical Review A*, 39, 3, 1325-1332 (1989)
- L. Martinez, *Application du procédé de prilling pour la préparation de microréseaux à base de chitosane. Caractérisations physico-chimiques et utilisation dans la formulation de principes actifs pour la voie orale*, Doctorat de l'Université Paris XI, Pharmacotechnie et Physico-chimie, Université Paris XI (2004)
- M. Mours, H. H. Winter, *Time resolved rheometry*, *Rheology Acta*, 33, 385-397 (1994)

- M. Mours, H. H. Winter, *Relaxation patterns of nearly critical gels*, *Macromolecules*, 29, 7221-7229 (1996)
- M. Muthukumar, *Screening effect on viscoelasticity near the gel point*, *Macromolecules*, 22, 4656-4658 (1989)
- B. Nyström, A. L. Kjoniksen, C. Iversen, *Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity*, *Advance Colloid and Interface Science*, 79, 81-103 (1999)
- A. Ponton, S. Warlus, P. Griesmar, *Rheological study of the sol-gel transition in silica alkoxides*, *Journal of Colloid and Interface Science*, 249, 209-216 (2002)
- G. A. F. Roberts, K. E. Taylor, *The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde*, *Makromolekulare Chemie*, 190, 951-960 (1989)
- S. B. Ross-Murphy, *Incipient behavior of gelatin gels*, *Rheology Acta*, 30, 401-411 (1991)
- J. C. Scanlan, H. H. Winter, *Composition dependence of the viscoelasticity of end-linked poly(dimethylsiloxane) at the gel point*, *Macromolecules*, 24, 47-54 (1991)
- M. Takenaka, T. Kobayashi, T. Hashimoto, M. Takahashi, *Time evolution of dynamic shear moduli in a physical gelation process of 1,3 :2,4-bis-O-(p-methylbenzylidene)-D-sorbitol in polystyrene melt : critical exponent and gel strength*, 65, 041401, 1-7 (2001)
- J. F. Tassin, N. El Kissi, B. Ernst, B. Vergnes, *De la macromolécule aux matières plastiques*, *Comprendre la rhéologie - De l'écoulement du sang à la prise du béton*, P. Coussot et J.L. Grossiord (Eds), EDP Sciences, Ouvrage collectif du GFR (2001)
- A. Tobitani, S. B. Ross-Murphy, *Heat-induced gelation of globular proteins. 1. Model for the effects of time and temperature on the gelation time of BSA gels*, *Macromolecules*, 30, 4845-4854 (1997)
- C. Y. M. Tung, P. J. Dynes, *Relationship between viscoelastic properties and gelation in thermosetting systems*, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 27, 569-574, 1982
- S. Warlus, A. Ponton, A. Leslous, *Dynamic viscoelastic properties of silica alkoxide during the sol-gel transition*, *The European Physical Journal E*, 12, 275-282 (2003)

S. Warlus, *Étude cinétique et modélisation des propriétés rhéologiques pendant la transition sol-gel : application aux alcoxydes de silicium*, Doctorat de l'Université Paris VII (2004)

H. H. Winter, P. Morganelli, F. Chambon, *Stoichiometry effects on rheology of model polyurethanes at the gel point*, *Macromolecules*, 21, 532-535 (1988)

Chapitre IV. CARACTERISATION STRUCTURALE DES RESEAUX DE CHITOSANE PAR DIFFUSION DE NEUTRONS AUX PETITS ANGLES

Dans le chapitre III, nous avons montré que les propriétés viscoélastiques et la structure des gels de chitosane dépendaient de paramètres physico-chimiques tels que la concentration en chitosane, sa masse molaire, la teneur en POE. Afin de confirmer ces différences de structures et pour comprendre les processus de diffusion (présentés par la suite) dans les hydrogels de chitosane, nous avons besoin en particulier de connaître la taille moyenne des mailles de ces réseaux. Pour déterminer celle-ci, il existe différentes méthodes. Il existe d'une part des méthodes basées sur les mesures du module d'Young ou du taux de gonflement à l'équilibre qui sont liés à la taille de la maille [Bell (1996)]. Ces méthodes nécessitent la connaissance d'un certain nombre de paramètres physico-chimiques (paramètres d'interaction de Flory, masse molaire des monomères...) pour pouvoir résoudre les équations liant la taille de la maille aux paramètres mesurés. D'autre part, la RMN (résonance magnétique nucléaire) et les techniques de diffusion de lumière, rayons X et neutrons sondent la structure à des échelles de longueur microscopique ou inférieure. Ils permettent donc de mesurer plus directement les dimensions structurales des matériaux. Nous utilisons dans ce travail la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) pour déterminer cette taille de maille caractéristique des réseaux. Lors d'une expérience de diffusion de neutrons, les atomes sont les centres diffusants. Cette technique permet de caractériser la structure de matériaux amorphes ou cristallins à des échelles inférieures (0,5 à 100 nm) à celles de la diffusion de lumière (10 nm à 1 μ m). Son grand avantage est de permettre l'étude des échantillons opaques pour lesquels la diffusion de lumière n'est pas applicable. Le développement de cette technique a contribué en particulier à la compréhension théorique de la physique des polymères [De Gennes (1979)].

À l'aide de la DNPA, nous déterminerons donc la taille des mailles de réseaux de chitosane et nous observerons les paramètres physico-chimiques qui font varier cette dimension.

IV.1 MATERIEL ET METHODE

Les expériences de diffusion de neutrons ont été réalisées à l'aide du spectromètre PAXE au sein du Laboratoire Léon Brillouin du CEA de Saclay en collaboration avec Laurence Noirez.

IV.1.1 Principe

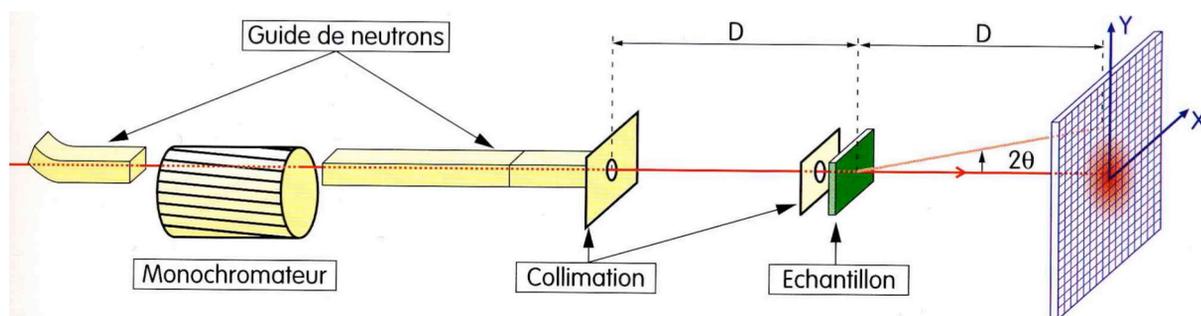


Figure 1. Schéma d'un spectromètre neutronique pour la diffusion aux petits angles (extrait de la plaquette de présentation des activités du Laboratoire Léon Brillouin au CEA)

La figure 1 représente schématiquement un spectromètre neutronique pour la diffusion aux petits angles. Le faisceau incident de neutrons monochromatique et collimaté bombarde l'échantillon. À la sortie de l'échantillon, le multidétecteur permet de mesurer la distribution de l'intensité diffusée en fonction de l'angle de déviation 2θ des neutrons par rapport au faisceau incident. Nous obtenons alors le spectre de l'intensité diffusée $I(\theta)$. Le paramètre physique du processus est le vecteur de diffusion q qui dépend de la longueur d'onde λ et de θ selon la relation suivante :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad \text{Éq IV.1}$$

Sa dimension est l'inverse d'une longueur. La plage des valeurs du vecteur de diffusion lors d'une expérience doit donc être du même ordre de grandeur que celui de l'inverse des dimensions à mesurer. Elle est fixée par la longueur d'onde incidente (typiquement 1 à 20 Å pour les neutrons) et la distance D entre l'échantillon et le multidétecteur. Pour le spectromètre PAXE, D peut varier entre 1 et 7 m. Les grandes valeurs de D permettent de faire des mesures de diffusion aux petits angles (inférieurs à 5°) et donc d'atteindre les plus faibles valeurs de q . D doit être d'autant plus grand que l'on veut mesurer des objets de grosses tailles. Cependant le choix de D doit aussi se faire pour avoir un signal suffisamment important.

IV.1.2 Exploitation d'un spectre de diffusion de neutrons pour un réseau de polymère

Pour des gels constitués de chaînes flexibles, l'intensité diffusée peut être écrite comme la somme de deux composantes respectivement dynamique et statique :

$$I(q) = I_{\text{dyn}}(q) + I_{\text{stat}}(q) = \frac{A}{1 + q^2 \xi^2} + \frac{B}{(1 + q^2 \Xi^2)^2} \quad \text{Éq IV.2}$$

où A et B sont des facteurs d'amplitude décrivant respectivement les fluctuations thermiques dynamique et les fluctuations de concentration statique. ξ et Ξ sont respectivement les longueurs de corrélation dynamique et statique des réseaux (Figure 2).

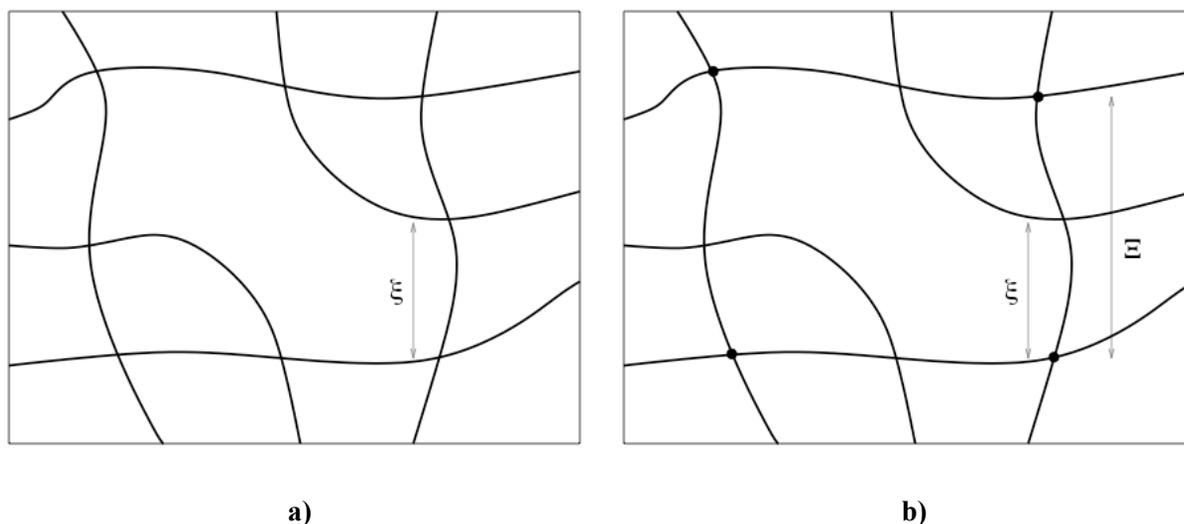


Figure 2. Réseaux de référence de chitosane : a) réseau de polymères dans lequel les chaînes de chitosane ne sont pas réticulées, mais simplement enchevêtrées. b) réseau de polymères dans lequel les chaînes de chitosane sont en partie réticulées (• : point de réticulation)

La première composante de l'équation Éq IV.2 correspond à l'expression d'Ornstein-Zernike qui décrit les fluctuations thermiques d'une solution semi-diluée de polymères pour laquelle ξ est la longueur de corrélation entre deux jonctions physiques ou chimiques [De Gennes (1979)]. La deuxième composante décrit les fluctuations de concentration statiques liées aux réticulations dans les gels [Horkay (2000)]. En fait, dans nos gels, nous avons constaté par ajustement des spectres à l'aide de l'équation Éq IV.2 que le deuxième terme est négligeable par rapport au premier. Ceci signifie que $q\Xi$ est très grand par rapport à $q\xi$. Ainsi, la distance entre deux points de réticulation est très grande en comparaison de la distance entre deux points d'enchevêtrement. L'équation Éq IV.2 se réduit donc à l'équation d'Ornstein-Zernike :

$$I(q) = \frac{I(0)}{1 + q^2 \xi^2} \quad \text{pour } q\Xi \gg 1 \quad \text{Éq IV.3}$$

avec $I(0) = \Delta\rho^2 k T \varphi^2 M_{0s}^{-1}$

$I(0)$ dépend ainsi de la fraction volumique totale en polymère φ , du module osmotique longitudinal M_{0s} (caractérisant l'équilibre de pression au sein des systèmes) et du facteur de contraste entre le solvant et le polymère $\Delta\rho^2$. k et T sont respectivement la constante de Boltzman et la température.

Ainsi, l'équation d'Ornstein-Zernike (Éq IV.3) caractérise les fluctuations thermiques de concentration au sein des systèmes semi-dilués de polymère pour $q\xi \gg 1$ [De Gennes (1979)]. Cette équation s'est avérée pertinente dans de nombreuses études pour décrire la structure des solutions et des gels de polymères flexibles sur des plages de vecteur de diffusion très grandes par rapport à la taille caractéristique du système [Horkay (2000)], [Nicolai (2001)], [Mathon (1999)], [Peng (2004)].

IV.1.3 Protocole

Les différents réseaux ont été préparés selon le protocole présenté dans le chapitre III (paragraphe III.1.2) en remplaçant l'eau distillée par de l'eau deutérée afin de diminuer la diffusion incohérente de l'échantillon et d'augmenter ainsi le contraste. Les expériences de diffusion de neutrons ont été effectuées pour des réseaux de chitosane réticulés et non-réticulés à différentes concentrations de chitosane et pour des réseaux semi-interpénétrés chitosane/POE avec différentes concentration de POE. Nous avons aussi étudié l'effet de la masse molaire et du pH.

Nos mesures ont été effectuées pour une longueur d'onde incidente égale à 14 Å et une distance échantillon/multidécteur de $D = 5$ m.

L'intensité diffusée mesurée doit être traitée en tenant compte du bruit de fond des échantillons et de leur transmission. Aux spectres de diffusion de neutrons bruts obtenus, il faut donc dans un premier temps soustraire la diffusion de la cellule de mesure à vide. Puis, il faut déterminer le bruit de fond de l'échantillon qui est de la diffusion incohérente (qui ne dépend que de la diffusion de chaque diffuseur isolé) provenant principalement des atomes d'hydrogène de l'échantillon. Pour cela, nous savons que le signal de diffusion est à peu près de la forme :

$$I(q) = \frac{A}{q^2 \xi^2} + B \tag{Éq IV.4}$$

où B est le bruit de fond de l'échantillon. En traçant $I(q)$ en fonction de $1/q^2$, on obtient une droite dont l'ordonnée à l'origine est B . La valeur de ce bruit de fond est soustraite des spectres. On obtient finalement le spectre de la diffusion cohérente (liées aux interférences entre toutes les paires de centres diffusants dans le système) qui contient l'information structurale de l'échantillon.

IV.2 RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure 3 présente le spectre de diffusion cohérent obtenu pour un réseau semi-interpénétré chitosane (1,5 % p/p)/POE (0,75 % p/p). Cette variation de l'intensité de diffusion est caractéristique de la diffusion neutronique dans nos échantillons pour une longueur d'onde de 14 Å. Les points expérimentaux sont ajustés à l'aide de l'équation d'Ornstein-Zernike (Éq IV.3).

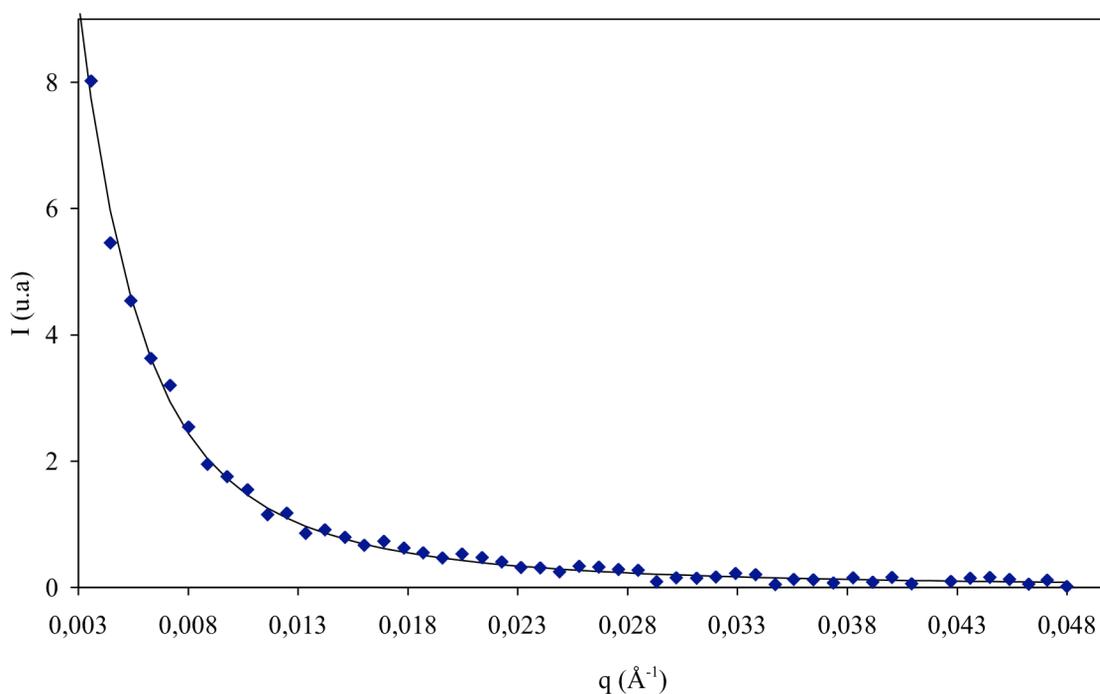


Figure 3. Spectre de diffusion de neutrons pour un réseau semi-interpénétré chitosane (1,5 %)/POE(3 %) gélifié, $\lambda = 14$ Å ajusté avec l'équation d'Ornstein-Zernike

[Chitosane] %	pH	ξ (Å)
1,5	4	616 \pm 84
	5	549 \pm 44
1,8	4	679 \pm 81
	5	635 \pm 82

Tableau 1. Longueurs de corrélation en fonction du pH pour du chitosane 1M, C = 1,5 % et C = 1,8 % réticulé en absence de POE

Chitosane	Réticulé	[Chitosane] %	[POE] %	ξ (Å)
1M	non	1,5	0	512 \pm 30
	oui	1,2	0	1320 \pm 440
		1,5	0	549 \pm 44
			0,25	372 \pm 19
			0,50	362 \pm 16
		0,75	304 \pm 12	
		1,8	0	635 \pm 82
	2,0	311 \pm 14		
2M	oui	1,0	0	779 \pm 30
		1,5		556 \pm 64

Tableau 2. Longueurs de corrélation pour différents échantillons à pH = 5

Les Tableaux 1 et 2 rassemblent les longueurs de corrélation, ξ , déterminées et les paramètres physico-chimiques correspondants des différents systèmes étudiés.

L'étude de ces tableaux nous permet de déduire la variation des dimensions structurales des systèmes en fonction des paramètres physico-chimiques. Le système de référence comme pour les autres études de ce travail est le gel de chitosane 1M de concentration massique 1,5 % dont le pH est 5. La longueur de corrélation (ξ) de cet échantillon est égale à 549 \pm 44 Å.

Pour suivre cette discussion, il est plus simple d'avoir en vue la Figure 2 et la Figure 4 qui représentent l'image que nous avons des différents réseaux de chitosane réticulés chimiquement ou non, de référence ou semi-interpénétré avec du POE.

D'une part (voir Tableau 1), il est délicat d'en déduire une influence particulière du pH sur la taille du réseau gélifié de chitosane vu les incertitudes. En fait, nous nous attendions à observer une augmentation de ξ lorsque le pH diminue car l'augmentation de l'acidité entraîne une augmentation des charges sur la chaîne et devrait donc provoquer le gonflement du réseau. La variation du pH n'est peut-être pas suffisante pour observer un effet sur la longueur de corrélation.

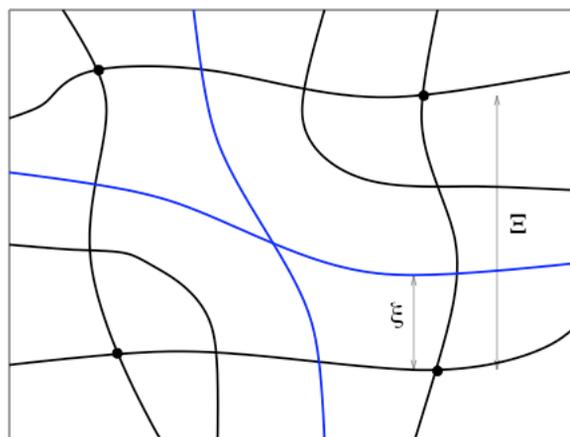


Figure 4. Réseau de chaînes de chitosane (chaînes noires) en partie réticulées (• : points de réticulation) dans lequel s'enchevêtrent en plus par rapport aux réseaux de référence (C = 1,5 %) des chaînes de chitosane ou de POE (chaînes bleues), la concentration totale en polymère étant supérieure à 1,5 %

Nous observons (Tableau 2) d'autre part que la réticulation ne fait pas varier la longueur de corrélation. Ainsi, pour une solution ou un gel de concentration massique 1,5 %, ξ est du même ordre de grandeur soit environ 530 Å. Ceci confirme l'hypothèse faite que le terme statique de l'expression de l'intensité diffusée (Éq IV.2) est négligeable devant le terme dynamique et que la distance déterminée à partir des mesures de neutrons est la distance séparant deux points d'enchevêtrement. Les nœuds de réticulation vont donc se former à la place de certains enchevêtrements de la solution initiale sans faire varier la longueur de corrélation du système (Figure 2).

L'examen du Tableau 2 montre aussi que l'augmentation de la concentration de chitosane pour un pH = 5 du gel entraîne une diminution de la taille de la maille. Ceci s'explique par l'augmentation de la densité d'enchevêtrements lorsque la concentration augmente et conforte nos explications sur les variations des paramètres viscoélastiques Δ et S en fonction de la concentration aux temps longs (III.3.3.3). Ce comportement a souvent été observé dans les réseaux de polymères semi-dilués enchevêtrés en solution ou gélifiés [Nicolai (2001)], [Peng (2004)].

Par ailleurs, nous observons que la taille de la maille ne varie pas en fonction de la masse molaire du chitosane. Ceci se justifie par le fait que la concentration des échantillons étudiés est supérieure à la concentration d'enchevêtrement. Celle-ci a été déterminée dans le chapitre II pour l'échantillon 1M (0,58 %). À 1,5 %, pour les deux échantillons, on est donc en régime semi-dilué enchevêtré. Ainsi, la longueur de corrélation ne dépend pas de la masse molaire,

mais seulement de la concentration. Ceci est une des hypothèses de la relation en loi d'échelle entre ξ et la concentration dans les solutions semi-diluées enchevêtrées proposée par De Gennes [De Gennes (1979)].

Enfin, le dernier paramètre dont nous avons étudié l'influence sur la taille des mailles dans un gel de chitosane est la teneur en POE. Nous observons que la présence de chaîne de POE dans un réseau de chitosane réduit la longueur de corrélation (Figure 4). La diminution de ξ quand la concentration de POE augmente confirme que les chaînes de POE ne se forment pas des microdomaines dans les mailles du réseau, mais qu'elles s'enchevêtrent dans le réseau de chitosane comme ont permis de le suggérer les travaux antérieurs sur les réseaux semi-interpénétrés [Khalid (1999)]. Les chaînes de POE contribuent donc à la formation de jonctions, ce qui justifie l'augmentation de l'élasticité du système que nous avons observée en rhéologie (paragraphe III.2.5). Pour confirmer ces observations sur la répartition du POE dans les réseaux réticulés de chitosane, il serait intéressant d'effectuer des mesures de diffusion de neutrons avec du POE deutéré. De plus, comme pour les propriétés mécaniques, nous observons que l'ajout de POE influence de manière plus importante la structure du réseau que l'ajout de chitosane.

Ainsi, selon les conditions de gélification, ξ varie entre 300 et 1320 Å dans nos systèmes. Dans la littérature, suivant les systèmes et leurs conditions de préparation, la taille des mailles des réseaux est aussi variable. Pour des réseaux de copolymère d'acide métacrylique et d'éthylène glycol respectivement réticulés et non-réticulés, ξ est de l'ordre de 330 à 10 Å [Bell (1996)]. Ces valeurs ont été calculées à partir de la détermination du taux de gonflement des réseaux. Pour les réseaux de protéine de β -lactoglobuline gélifiés par augmentation de la température, il a été déterminé par diffusion de lumière des tailles de maille variant entre 400 et 1450 Å lorsque la concentration massique varie entre 2 et 0,1 % [Nicolai (2001)]. De même dans les gels de polyéthylène glycol pour des concentrations variant entre 20 et 60 %, ξ diminue de 20 à 10 Å [Peng (2004)] (détermination par DNPA). Enfin, Krajewska *et al.* ont déterminé pour un réseau de chitosane (de concentration massique 1 %, de masse molaire $3,3 \cdot 10^5$ g/mol, DDA = 70 %, avec ajout de sel) réticulé avec du glutaraldéhyde une taille de maille de l'ordre de 15 Å. Celle-ci a été déterminée à l'aide de l'équation empirique de Renkin qui relie les propriétés de transport des gels à la taille de la maille [Krajewska (1996)]. Au vu des ordres de grandeur de ξ déterminés dans les travaux précédents, nous déduisons que les réseaux de chitosane que nous préparons sont plutôt gonflés.

IV.3 CONCLUSION

Nous avons déterminé les distances entre nœuds d'enchevêtrements pour les réseaux de chitosane en fonction de différents paramètres physico-chimiques à l'aide de la diffusion de neutrons aux petits angles. Il est apparu que celles-ci sont les mêmes pour un réseau non-réticulé ou réticulé. La distance entre nœuds de réticulation chimique est pour sa part trop grande pour être mesurée par cette technique. Par ailleurs, nous avons observé que les gels de chitosane étudiés dans ce travail étaient des réseaux microporeux dont les mailles ont une taille variant entre 300 et 1320 Å. Cette grandeur varie de manière significative avec la concentration en chitosane et en POE. L'augmentation de la concentration de ces polymères dans les réseaux entraîne une augmentation de la densité d'enchevêtrements et donc une diminution de ξ . Ces résultats sont cohérents avec les variations des paramètres viscoélastiques en fonction de la concentration des deux polymères présentées au chapitre III. En revanche, la masse molaire n'a pas d'effet sur la taille de la maille en accord avec le modèle de De Gennes. Enfin, nous n'avons pas observé d'influence notable de la variation du pH de 4 à 5 sur la taille de la maille par ces mesures.

Ces résultats seront utilisés pour la discussion des données expérimentales sur la diffusion de sondes marquées dans les gels de chitosane présentées dans le chapitre suivant.

RÉFÉRENCES :

- C. L. Bell, N. A. Peppas, *Water, solute and protein diffusion in physiologically responsive hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol)*, *Biomaterials*, 17, 1203-1218 (1996)
- P. G. de Gennes, *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell University Press, Ithaca (1979)
- F. Horkay, P. J. Basser, A. Hecht, E Geissler, *Osmotic and SANS observations on sodium polyacrylate hydrogels in physiological salt solutions*, *Macromolecules*, 33, 8329-8333 (2000)
- M. N. Khalid, L. Ho, F. Agnely, J. L. Grossiord, G. Couarraze, *Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network, comparaison with a chitosan reference gel*, *S. T. P. Pharma Sciences*, 9, 4, 349-364 (1999)
- B. Krajewska, A. Olech, *Pore structure of gel chitosan membranes. I. Solute diffusion measurements*, *Polymer Gels and Networks*, 4, 33-43 (1996)

M. H. Mathon, C. H. de Novion, *De l'intensité à la structure des matériaux*, Journal de Physique IV, 9, 127-146 (1999)

T Nicolai, C Urban, P Schurtenberger, *Light scattering study of turbid heat-set globular protein gels using cross-correlation dynamic light scattering*, Journal of Colloid and Interface Science 240, 419–424 (2001)

S. Peng, J. C. Selser, R. Bogoslovov, G. Piet, *An investigation of a sol-gel/melt transition: the poly(ethylene oxide)/methanol/LiClO₄ system*, Journal of Chemical Physics, 120, 18, 8841-8852 (2004)

Chapitre V. DIFFUSION DE MOLECULES DE DEXTRAN DANS DES HYDROGELS DE CHITOSANE

De nombreuses études sur les réseaux de chitosane ont pour objectif de produire un excipient pharmaceutique avec ces multiples avantages cités précédemment dans le chapitre I. En particulier, ils permettent le contrôle de la libération de principes actifs. Dans de tels systèmes, le diffusant est en général réparti de manière homogène dans le réseau. Lors du relargage, les molécules doivent donc d'abord diffuser à travers le réseau de polymère. De ce fait, la connaissance des propriétés de transport de masse des principes actifs au sein de ces réseaux est nécessaire. Dans le cadre du développement de ce type d'excipient, il est important de connaître les facteurs limitant ce transport afin d'étudier la mise à disposition du principe actif pour l'organisme.

Il est courant en pharmacie d'étudier le transport de soluté dans un gel en le mettant en contact avec un solvant [Kuijpers (2000)], [Varshosaz (2001)]. À partir de la mesure cinétique de l'échange de soluté entre les deux phases (gel et liquide), on peut déterminer les propriétés de diffusion du réseau [Amsden (2002)] si les conditions expérimentales sont telles que le milieu récepteur (liquide) n'influe pas sur la diffusion. Ces conditions sont expérimentalement difficiles à vérifier, telles les conditions « sink » (concentration nulle à l'interface entre le gel et le liquide) pour lesquelles sont obtenues les équations théoriques permettant de caractériser la diffusion. Ces conditions sont irréalisables car il existe un coefficient de partage du soluté entre les deux milieux. De plus, il peut y avoir des échanges de solvant entre la phase liquide et la phase gel. Ainsi, cette technique décrit plutôt les mécanismes de diffusion-libération du gel que la diffusion pure du principe actif au sein du gel.

Afin de caractériser uniquement les propriétés de diffusion du soluté au sein du gel en s'affranchissant des interactions avec un milieu récepteur liquide, des expériences de diffusion gel-gel ont été réalisées. Ces expériences consistent à juxtaposer des gels chargé et non-chargé en soluté et d'observer le profil de concentration ou un front de diffusion dans un milieu continu. Ceci suppose que le principe actif ne perturbe pas la structure du gel. Les difficultés de cette technique viennent de la mesure du gradient de concentration. Différentes méthodes peuvent être utilisées : l'interférométrie [Zierenberg (1983)], le suivi de molécules radioactives [Couarraze (1989)], [Conrath (1989)], opalescentes [Leclerc (1989)], fluorescentes etc...

Pendant cette thèse, nous avons utilisé cette technique de diffusion gel-gel. Une description du protocole expérimental et une présentation des résultats sont données en annexe (voir annexe 3). Le profil de concentration a été déterminé par dosage UV de prélèvements du gel après quelques jours de diffusion à différentes hauteurs. Nous avons ainsi déterminé le coefficient de diffusion de la caféine dans un gel de chitosane. Cette technique s'est avérée lourde à mettre en oeuvre. En particulier, les expériences se font sur plusieurs jours et nécessitent donc de bonnes conditions de stockage du gel pour le préserver de l'évaporation.

Enfin, il existe des techniques qui permettent de suivre in situ le mouvement de particules réparties à tout instant de manière homogène dans le milieu de diffusion. Ces techniques présentent ainsi l'avantage de ne pas avoir d'interface entre un milieu récepteur et un milieu donneur. Citons par exemple la RMN à gradient de champ pulsé [Matsukawa (1999)] ou la diffusion dynamique de la lumière [Shibayama (1999)], [Teraoka (1993)]. Néanmoins, l'application de cette dernière technique peut-être limitée par l'opacité des milieux. Aujourd'hui, l'une des techniques les plus couramment utilisées et qui ne cesse d'être améliorée est celle du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) [Davoust (1982)], [De Smedt (1997)], [Kosto (2004)]. Toutes ces techniques permettent de suivre le mouvement des particules sur des distances qui peuvent atteindre le micromètre. La mesure de coefficient de diffusion de l'ordre de 10^{-10} cm²/s peut donc se faire en moins de 24 H, alors que toutes les techniques de diffusion gel-gel citées ci-dessus nécessitent des mesures sur une semaine, pour des coefficients de diffusion de 10^{-6} cm²/s [Couarraze (1989)] ou 10^{-11} cm²/s [Zierenberg (1983)].

Pour notre part, nous avons utilisé la technique de FRAP pour évaluer les propriétés diffusionnelles de molécules modèles au sein de nos réseaux. Cette technique consiste à créer un profil de fluorescence dans le milieu diffusant et à suivre ensuite le recouvrement de fluorescence. Les méthodes d'application du FRAP diffèrent entre elles par le type de profil créé dans le milieu ou la technique d'acquisition du signal. Dans cette étude, nous utilisons la technique de FRAP par réseaux d'interfrange. Le principe de l'expérience est détaillé dans le paragraphe V.1.4.1. Cette technique de FRAP par réseau de franges a été surtout utilisée pour étudier la diffusion de molécules en solution, de macromolécules dans des solutions de polymères [Cheng (2002)] voire dans les fondus [Davoust (1982)], [Léger (1996)], mais pas à notre connaissance dans les gels.

La diffusion des particules dans un réseau de polymère dépend des interactions ioniques et des frictions entre le soluté et la matrice [Vachoud (2001)], de la taille relative des particules par rapport à la maille du réseau [Bell (1996)], de la géométrie des particules (sphère, chaîne de polymère,...) [Cheng (2002)] ou encore de la fluctuation des mailles du réseau par rapport à la vitesse de diffusion des particules (« constraint release » ou « tube renewal ») [Cheng (2002)]. Différents modèles théoriques et physiques de diffusion de masse dans les solutions de polymères ou dans les gels ont été proposés. L. Masaro *et al.* [Masaro (1999)] ont fait une revue de ces différents modèles classés selon trois concepts physiques de la diffusion sur lesquels ils sont basés : les effets d'obstruction (liés à la présence d'une matrice considérée comme figée par rapport à la molécule diffusante), les effets de frictions (interactions solvant/monomère, monomère/monomère, solvant/diffusant) et les effets de volume libre.

Dans les réseaux de chitosane, les études de diffusion n'ont été effectuées à notre connaissance que par la technique de diffusion-libération du gel vers un solvant [Krajewska (1996)], [Vachoud (2001)]. Ainsi, Vachoud *et al.* ont mesuré les coefficients de diffusion de petites molécules (la caféine, la vitamine B1 et la vitamine PP) de taille inférieure à 10 Å dans des gels physiques de chitosane. Ils ont observé un léger ralentissement de la diffusion de ces molécules dans les gels par rapport à leur diffusion dans l'eau dû aux interactions hydrodynamiques mais très peu aux effets stériques. Pour des gels de chitosane réticulé par du glutaraldéhyde, Krajewska *et al.* ont observé l'effet de la taille relative des molécules diffusantes (2,5 à 14 Å) par rapport à la taille des mailles du réseau sur le processus de diffusion.

Notre étude a été effectuée en collaboration avec L. Léger et H. Hervet du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée au Collège de France. Nous avons utilisé la technique de FRAP pour mesurer les coefficients de diffusion de macromolécules de dextran marquées par un groupement fluorescent (dextran-FITC) dans les réseaux de chitosane réticulés et non-réticulés. Nous avons choisi ces macromolécules de dextran comme sondes en raison de leur taille variable offrant ainsi la possibilité d'explorer les différentes tailles caractéristiques des réseaux étudiés. L'objectif est de mieux comprendre le processus de diffusion dans les réseaux de chitosane en comparant nos résultats à ceux qui sont prédits par les différents modèles existants. Nous avons étudié en parallèle par rhéologie l'influence de la présence du dextran sur les cinétiques de gélification des systèmes.

V.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

V.1.1 Matériel

Nous utilisons dans cette partie l'échantillon de chitosane 1M dont les caractéristiques sont données dans le chapitre II.

Les dextran-FITC dénommés 4D, 20D, 40D, 70D, 150D et 280D ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Leur nom fait référence à leur masse molaire : un dextran 4D est un dextran dont la masse molaire est approximativement 4000 g/mol. Les masses molaires effectives, fournies par le producteur ont été déterminées par perméation de gel et diffusion de lumière aux petits angles (LALLS) excepté pour le 150D. Pour ce dernier, la masse molaire n'est donc qu'une approximation déduite de son appellation. De même, la densité de groupements de FITC par monomère de glucose a été donnée par le fournisseur.

Les caractéristiques de ces macromolécules avec leur dénomination sont regroupées dans le Tableau 1. Le fournisseur ne donne la valeur de l'indice de polydispersité, égale à 1,7, que pour l'échantillon 40D.

Dextran-FITC	4D	20D	40D	70D	150D	280D
M_w (g/mol)	4400	19500	43200	77000	~ 150000	282000
FITC/glucose (mol/mol)	0,004	0,006	0,01	0,013	inconnu	0,009

Tableau 1. Masse molaire des dextrans étudiés et leur densité de groupements FITC par monomère de glucose (données du fournisseur)

V.1.2 Fluorimétrie en milieu acide

Les gels de chitosane devant contenir les sondes fluorescentes sont préparés à pH acide. Pour définir le protocole des expériences de diffusion, il a donc fallu étudier l'influence du pH sur les spectres de fluorescence et d'absorbance du FITC-dextran. Nous avons aussi étudié l'effet de la concentration de cette molécule sur ces spectres. Ce colorant est très utilisé, mais très peu d'études ont porté sur l'influence de paramètres physico-chimiques sur ces propriétés de fluorescence [D. L. Taylor (1989)].

Nous avons utilisé dans cette étude le dextran 280D. Le dextran est dissous dans l'eau par agitation magnétique pendant 5 min à une concentration massique de 0,1 % ou 0,01 %. La

solution ainsi préparée est de $\text{pH} = 7$. À partir de la solution de concentration 0,1 %, nous avons préparé des solutions de $\text{pH} = 2, 3, 4, 5$ et 6 par ajustement avec une solution de HCl 0,1 mol/L.

Les mesures ont été faites à l'aide d'un fluorimètre qui mesure l'intensité de la lumière émise. Expérimentalement, on obtient soit un spectre d'émission (longueur d'onde d'excitation fixe et longueur d'onde d'émission variable) soit un spectre d'excitation (longueur d'onde d'émission fixe et longueur d'onde d'excitation variable). Les longueurs d'onde varient entre 400 et 520 nm pour les spectres d'excitation et de 500 à 640 nm pour les spectres d'émission. La précision sur les longueurs d'onde est de 0,2 nm.

V.1.3 Étude cinétique de la gélification d'un réseau de chitosane chargé de dextran-FITC

Les solutions et les gels sont préparés de manière générale comme ceux du chapitre III. Le dextran est ajouté aux solutions de chitosane avant l'initiation de la gélification. Pour préparer 5 g d'une solution de chitosane/Dextran-FITC, nous mélangeons 0,0050 g de dextran à 3,7500 g de solution-mère de chitosane de concentration massique 2 %. Puis, nous complétons avec de l'eau déminéralisée. L'homogénéisation se fait par agitation magnétique pendant 10 min. La concentration finale en chitosane est 1,5 % (p/p) et le $\text{pH} = 5$. La concentration finale en dextran est 0,1 % (p/p). La gélification est initiée, comme dans le chapitre III, par l'ajout de 20 μl de solution de glyoxal à 40 % en poids. Le protocole de mesure rhéologique est exactement le même que celui qui est décrit dans le chapitre III. Cette étude rhéologique a été effectuée avec l'échantillon de dextran 150D.

V.1.4 Étude de la diffusion du dextran à l'aide de la technique de FRAP par réseau de franges

V.1.4.1 Principe du FRAP

Le recouvrement de fluorescence après photolyse par réseau de franges (FRAP) a été utilisé pour étudier la mobilité des macromolécules de dextran dans les gels de chitosane. Le principe de la technique et le descriptif de l'expérience ont été présentés par Davoust *et al.* [Davoust (1982)]. Cette expérience consiste à créer un profil de concentration de fluorescence sinusoïdal dans un échantillon.

Pour cela, les macromolécules sondes doivent être marquées par des groupements fluorescents et photolysables : lorsqu'on les illumine avec une puissance lumineuse très forte, ils perdent leur fluorescence de façon irréversible. Le dextran-FITC possède ces propriétés.

La technique consiste à créer dans l'échantillon un réseau de franges d'interférences à l'aide de deux faisceaux laser atténués (Figure 1).

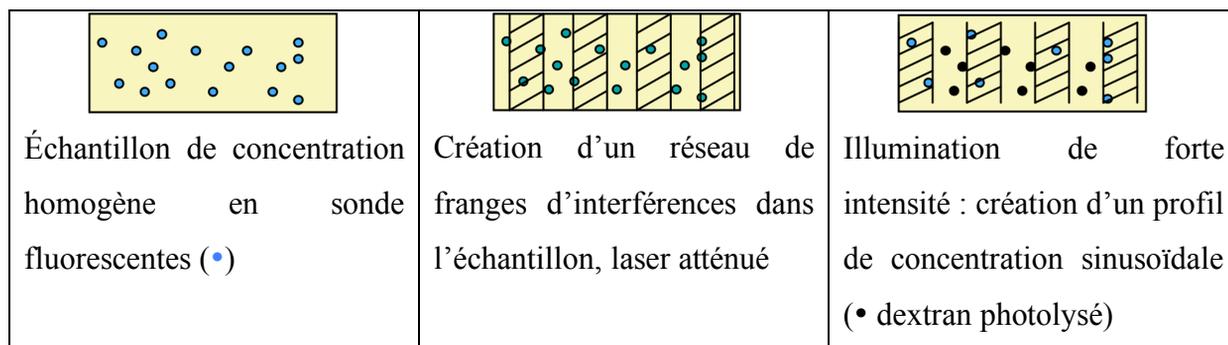


Figure 1. Création d'un profil sinusoïdal de concentration dans un échantillon chargé de sondes fluorescentes, les régions hachurées correspondent aux zones sombres du réseau de franges d'interférences

Ensuite, par une illumination de forte intensité pendant un court instant (de l'ordre de la centaine de ms), une fraction des particules fluorescentes dans les zones brillantes du réseau de franges sont photolysées. Il se forme alors un profil sinusoïdal de concentration de fluorescence. Enfin, l'intensité des faisceaux est de nouveau atténuée et le recouvrement de fluorescence est enregistré pendant que la position spatiale des franges est modulée à une fréquence $\omega/2\pi$. Le signal de recouvrement de fluorescence peut être décomposé en série harmonique de fréquence fondamentale égale à celle de la modulation spatiale. Si la modulation de la position spatiale des franges est symétrique par rapport à la position des franges photolysées et possède une amplitude de moitié celle de l'interfrange, l'intensité de fluorescence est alors modulée à une fréquence ω/π . L'amplitude de la seconde harmonique (composante du signal à une fréquence ω/π) est proportionnelle à l'amplitude de la modulation spatiale de la concentration des particules fluorescentes due à la photolyse. Quand le profil de concentration s'estompe à cause de la diffusion des sondes fluorescentes, l'amplitude de la seconde harmonique décroît monoexponentiellement en fonction du temps avec un temps caractéristique τ . Le coefficient de diffusion de translation D peut alors être déterminé à l'aide de la relation suivante :

$$D = \frac{i^2}{4\pi^2\tau} \quad \text{Éq V.1}$$

où i est l'interfrange du réseau d'interférence.

V.1.4.2 Préparation des systèmes

Nous avons étudié la diffusion du dextran dans l'eau, dans des solutions aqueuses de chitosane et enfin dans les gels de chitosane. Dans tous ces systèmes, la concentration massique du dextran a été fixée à 0,1 % pour deux raisons. D'une part, cette valeur est inférieure à la concentration de recouvrement des chaînes de dextran C^* que l'on peut calculer à l'aide de l'équation suivante [Tuinier (2003)] :

$$C^* = \frac{3M}{4\pi R_g^3 N_A} \quad \text{Éq V.2}$$

où M et R_g sont respectivement la masse molaire et le rayon de giration du polymère.

On peut montrer à l'aide des valeurs de rayon de giration (R_g) de la littérature [Andrieux (2002)], [Tuinier (2003)] que pour les masses molaires étudiées, 0,1 % est bien inférieure à leur concentration d'enchevêtrement. Par exemple, pour un dextran de masse molaire 150 000 g/mol dissous dans l'eau, le rayon de giration est de l'ordre de 7,7 nm et C^* est donc environ de 1,3 %.

D'autre part, à l'aide des mesures de fluorimétrie, nous avons vérifié que les signaux de fluorescence et d'absorbance étaient détectables dans une certaine gamme de concentrations massiques [0,01 % - 0,1 %]. Enfin, des tests préliminaires de diffusion ont été effectués pour déterminer la concentration pour laquelle le signal à traiter était suffisant.

Pour l'étude de la diffusion dans l'eau, le dextran est dissous dans l'eau par agitation magnétique pendant 5 min. La préparation des solutions et gels de chitosane contenant du dextran-FITC est décrite au paragraphe V.1.3. Pour les mesures de diffusion, nous avons choisi de travailler à $\text{pH} = 5$ pour avoir une absorbance et une fluorescence maximales.

Les mesures de diffusion dans les gels ne sont effectuées que 3 H après l'initiation de la gélification. Nous verrons dans le paragraphe V.2.2 que le temps de gélification des réseaux de chitosane chargés de dextran-FITC est de 1400 s et que la structure de nos réseaux continue à évoluer même après 12 H comme pour tous les autres réseaux de chitosane de notre travail. Nous avons donc dû vérifier l'effet du vieillissement du gel sur les mesures de diffusion. Pour les dextrans de masse inférieure à 70 000 g/mol, nous avons observé que la diffusion ne variait pas même après 48 H lorsque l'échantillon est mis dans un milieu saturé en eau pour éviter l'évaporation. En revanche, pour les deux plus grosses masses, les mesures

doivent être effectuées dans les 10 H suivants l'initiation de la gélification. Ceci sera justifié dans la partie résultat. Ainsi, les mesures de diffusion ont été effectuées entre 3 et 48 H pour les dextrans de faibles masses (4D, 20D, 40D et 70D), et entre 3 et 13 H pour ceux dont les masses sont élevées (150D et 280D).

V.1.4.3 Protocole de mesure

Le dispositif expérimental est décrit en annexe (annexe 4). La longueur d'onde d'excitation λ a été fixée à 488 nm en tenant compte des données de l'étude de la variation des spectres du dextran-FITC en fonction du pH et des longueurs d'onde que pouvait émettre le laser utilisé dans l'expérience. La puissance du laser est fixée à 200 ± 10 mW. La formation du réseau d'interférences est vérifiée par observation à l'aide d'un objectif microscopique. La mesure de l'interfrange se fait en mesurant sur un écran placé à une distance L du point de croisement des faisceaux la distance d entre les deux faisceaux :

$$i = \frac{\lambda L}{d} \quad \text{Éq V.3}$$

L'incertitude sur i est de l'ordre de 2 %. La plage de l'interfrange accessible est comprise entre 4 et 30 μm , compte tenu des conditions expérimentales. Les mesures sont faites successivement pour huit positions différentes dans l'échantillon et les données sont moyennées. Ceci permet d'une part de diminuer l'influence du bruit sur les points expérimentaux et d'autre part de négliger les hétérogénéités de l'échantillon.

V.2 RÉSULTATS

V.2.1 Fluorimétrie en milieu acide

Dans un premier temps, nous avons déterminé les longueurs d'onde d'excitation et d'émission auxquelles les expériences devaient être menées. Celles-ci doivent être de l'ordre des longueurs d'onde pour lesquelles les intensités respectivement d'excitation et d'émission des solutions sont maximales. Pour cela, plusieurs acquisitions ont été effectuées en faisant varier la longueur d'onde d'excitation et celle d'émission à laquelle on mesure l'intensité. Ainsi, à partir de spectres tels ceux représentés sur la Figure 2 et la Figure 3, les longueurs d'onde des expériences ont été définies. Pour les solutions de $\text{pH} = 5, 6$ et 7 et de concentration de dextran $0,1 \%$, le spectre d'excitation a été obtenu pour une longueur d'onde d'émission ($\lambda_{\text{ém}}$) de 524 nm . Pour les solutions de $\text{pH} = 3, 4$ de concentration $0,1 \%$ et la solution de concentration $0,01\%$ ($\text{pH} = 7$), $\lambda_{\text{ém}}$ est fixée à 518 nm . Dans tous les cas, le spectre d'émission

est tracé pour une longueur d'excitation (λ_{exc}) de 488 nm. La Figure 2 et la Figure 3 représentent respectivement les spectres d'excitation et les spectres d'émission obtenus dans les conditions citées ci-dessus pour les différentes solutions.

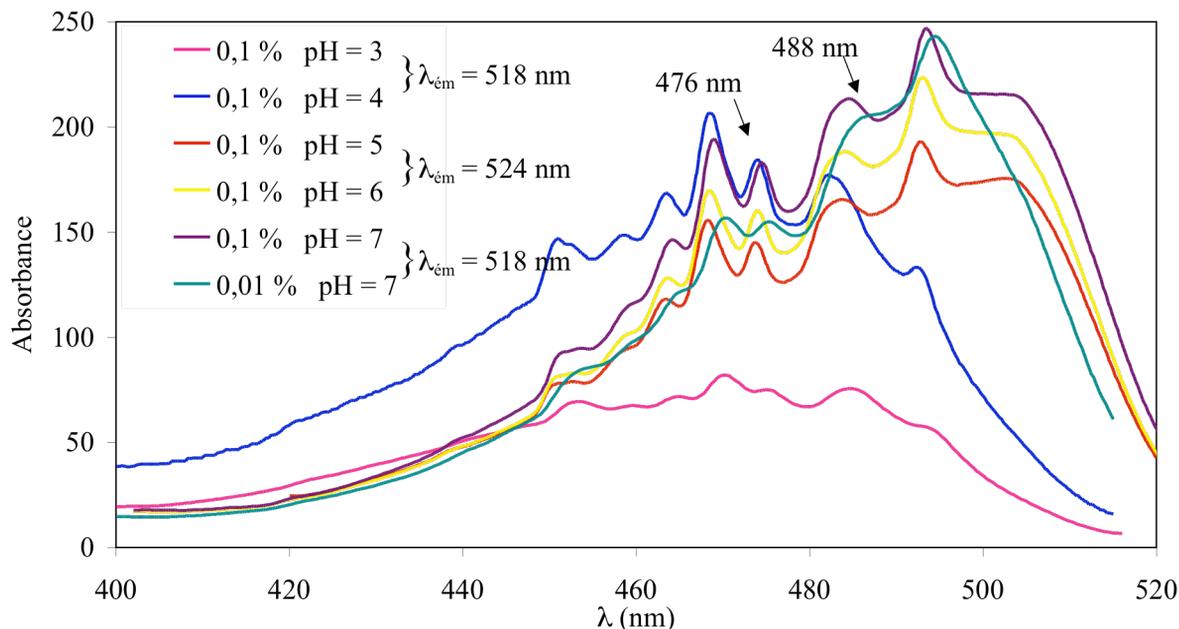


Figure 2. Spectre d'excitation du dextran-FITC D280 dans l'acide chlorhydrique à différents pH et concentrations de dextran, longueur d'onde d'émission : 524 nm ou 518 nm selon les solutions

Il apparaît sur les spectres d'excitation plusieurs pics d'intensité. Nous nous intéressons à deux d'entre eux : ceux qui sont proches de 488 et 476 nm parce que ce sont les longueurs d'onde que peut émettre le laser d'émission utilisé pour l'expérience de FRAP.

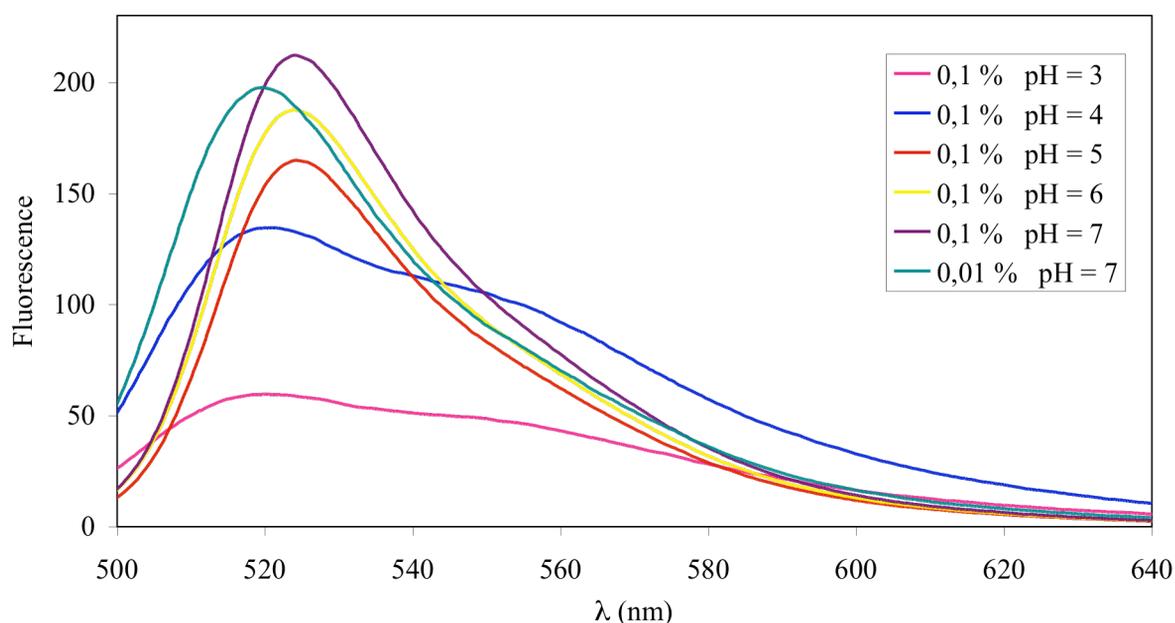


Figure 3. Spectre d'émission du dextran-FITC D280 dans l'acide chlorhydrique à différents pH et concentrations de dextran pour une longueur d'onde d'excitation de 488 nm

Contrairement aux spectres d'excitation, les spectres d'émission ne présentent qu'un pic d'intensité.

À partir de ces spectres, nous avons déterminé respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales des différentes solutions. Celles-ci sont regroupées dans le Tableau 2.

Échantillon	0,1 % pH = 3	0,1 % pH = 4	0,1 % pH = 5	0,1 % pH = 6	0,1 % pH = 7	0,01 % pH = 7
$\lambda_{\text{excitation}}$	470,2	469,0	484,6	484,2	484,4	488,0
$\pm 0,2$ (nm)	484,6	482,2	492,8	493,4	493,4	494,4
$\lambda_{\text{émission}}$	521,2	521,2	524,2	523,8	524,0	519,6
$\pm 0,2$ (nm)						

Tableau 2. Longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximale de solutions de dextran-FITC dans l'acide chlorhydrique en fonction de la concentration de dextran et du pH

D'une part, on observe du fait de la structure chimique pH dépendant de la fluorescéine (paragraphe I.4.2), que la variation du pH entraîne un décalage des pics d'émission et d'excitation. Il apparaît deux groupes distincts pour une même concentration en dextran (0,1 %) : les solutions de pH = 5, 6 et 7 et les solutions de pH = 3 et 4. C'est surtout entre ces

deux groupes qu'apparaît une variation des propriétés de fluorescence en fonction du pH. En revanche, la diminution du pH entraîne une diminution des intensités d'absorbance et de fluorescence sur toute la gamme de pH étudiée. Ainsi le pic d'absorbance aux environs de 493 nm s'estompe lorsque le pH diminue jusqu'à ne plus exister à pH = 3.

D'autre part, les spectres dépendent aussi de la concentration de dextran donc de FITC. Ainsi, la diminution de la concentration à pH fixé s'accompagne d'une augmentation des longueurs d'onde d'excitation et d'une diminution de la longueur d'onde d'émission.

Les valeurs de longueur d'onde de l'ordre de 520 et 493 nm respectivement pour l'émission et l'excitation maximales sont cohérentes avec celles qui ont été obtenues pour d'autres dérivés de fluorescéine [D. L. Taylor (1989)] et celles déterminées pour ce même dérivé, FITC-dextran à pH = 7,4 par Andrieux *et al.* [Andrieux (2002)]. Il apparaît en revanche d'autres maxima dans le spectre d'excitation dont ne fait pas mention la littérature. Par ailleurs, la même variation de $\lambda_{\text{ém}}$ avec la concentration a aussi été observée par Andrieux *et al.* [Andrieux (2002)]. Ces auteurs ont montré qu'il y a une diminution continue de l'intensité des spectres en fonction de la concentration dans une plage plus étendue que celle étudiée dans cette thèse.

Ces résultats nous ont aidés à établir le protocole expérimental pour les mesures de diffusion par la technique de FRAP. Ils nous ont permis de déterminer la longueur d'onde d'excitation qui nous permet de travailler le plus efficacement en milieu acide (aux environs de 484 nm). Nous avons aussi pu constater que nous pouvions travailler à des concentrations de dextran variant entre 0,01% et 0,1% sans trop influencer les spectres de fluorescence et d'absorption surtout en intensité. Enfin, ces données montrent que, pour avoir un maximum de fluorescence et d'absorbance, le milieu doit être à pH supérieur ou égal à 5. L'étude de la diffusion du dextran a donc été effectuée pour des gels de pH = 5 pour avoir des systèmes similaires à ceux utilisés dans nos études exposées précédemment. De plus, le pKa du chitosane étant de l'ordre de 6, nous ne pouvions envisager des mesures à des pH trop proches de cette valeur pour laquelle la dissolution du chitosane est impossible.

V.2.2 Étude cinétique de la gélification d'un réseau de chitosane chargé de dextran-FITC

Nous avons réalisé cette étude pour un réseau de chitosane chargé de dextran-FITC pour savoir si la présence de cette sonde modifie la cinétique de gélification et la structure des réseaux. L'étude a été effectuée à partir d'une solution de chitosane de 1,5 % (p/p) dans

laquelle est dissous du dextran 150D à une concentration finale de 0,1 % p/p. Le pH de l'échantillon est égal à 5. Dans le Tableau 3, nous avons regroupé les différents paramètres caractérisant la transition sol-gel de ces mêmes réseaux. La signification de ces paramètres a été donnée dans le chapitre III.

	t_g (s)	Δ (t_g)	S (t_g) ($\text{Pa}\cdot\text{s}^\Delta$)
Chitosane seul	1460 ± 100	$0,62 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,1$
Chitosane avec 150D	1400 ± 100	$0,61 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,1$

Tableau 3. Paramètres caractérisant un réseau de chitosane à la transition sol-gel avec et sans dextran (C = 1,5 % p/p)

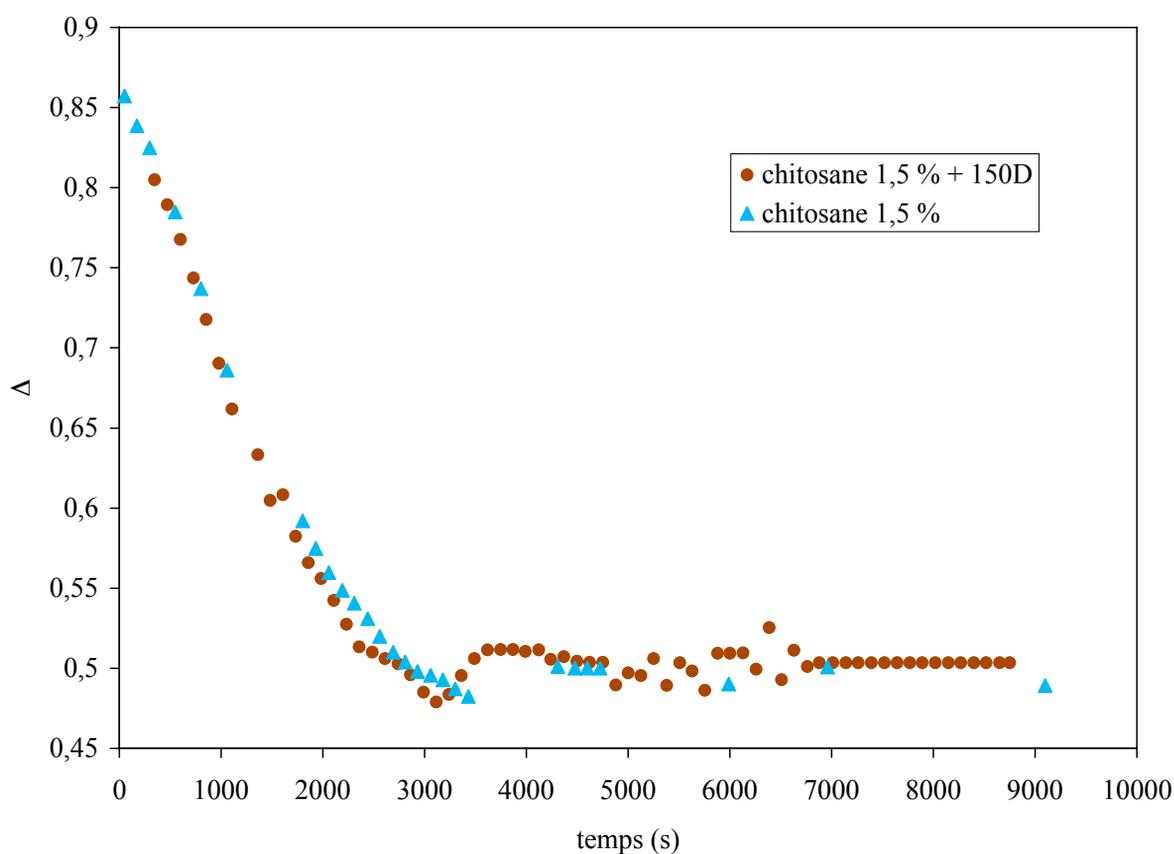


Figure 4. Variation de l'exposant de relaxation caractéristique au cours de la gélification pour un réseau de chitosane de concentration massique 1,5 % avec ou sans dextran (150D)

Sur la Figure 4, nous avons représenté la variation des exposants de relaxation au cours de la gélification pour des réseaux de chitosane avec et sans dextran.

Nous n'observons donc pas de différence significative de comportement de ces différents paramètres pour les deux réseaux. Ceci a été par ailleurs observé pour tous les autres paramètres S , G_e , λ que nous permettent de déterminer les mesures de rhéologie.

Nous pouvons donc déduire de ces résultats que le dextran-FITC n'a aucune influence sur la cinétique de gélification ni sur la structure au cours de la gélification. Nous supposons donc qu'il n'existe pas de liaisons chimiques entre ces molécules fluorescentes et les éléments mis en jeu dans la gélification : les chaînes de chitosane et le glyoxal.

V.2.3 Étude de la diffusion du dextran à l'aide de la technique de FRAP par réseau de franges

Des mesures préliminaires ont été réalisées pour observer les paramètres qui influencent la diffusion du dextran dans les gels de chitosane. Le Tableau 4 regroupe les valeurs des coefficients de diffusion du dextran 40D pour différents réseaux de chitosane réticulé de concentration différente et pour un réseau semi-interpénétré également réticulé. Le pH est égal à 5 dans toute l'étude. Les résultats bruts de diffusion et la méthode d'exploitation des données seront détaillés dans les paragraphes suivants.

Réseau (concentration massique)	Chitosane seul (1,2 %)	Chitosane seul (1,5 %)	Chitosane seul (2 %)	Chitosane/POE (1,5 % / 0,75 %)
$D_g \cdot 10^7$ (cm ² /s)	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,87 ± 0,08	1,1 ± 0,1

Tableau 4. Coefficients de diffusion D_g de l'échantillon 40D dans des gels de chitosane seul de concentrations différentes et pour un gel semi-interpénétré

De l'étude du Tableau 4, nous déduisons que la diffusion du dextran 40D n'est influencée ni par la concentration de chitosane (excepté peut-être à partir de 2 %) ni par la présence de chaîne de POE dans le réseau gélifié dans les gammes de concentrations étudiées. Précisons que dans ces réseaux, la densité de nœuds de réticulation est fixée par la quantité de glyoxal qui est constante. En revanche, les mesures de diffusion des neutrons aux petits angles ont montré que la taille de la maille du réseau enchevêtré variait selon ces paramètres. Celle-ci ne semble donc pas avoir d'influence notable sur la diffusion du dextran 40D. Ce résultat confirme que la diffusion de glyoxal (molécule bien plus petite que la maille des réseaux) ne

doit pas être plus ralentie dans un réseau semi-interpénétré par rapport à celui de référence (chapitre III paragraphe III.2.5.1).

En revanche, la masse molaire du dextran a , comme nous le verrons, a une influence notable sur la diffusion dans les réseaux de chitosane. C'est l'influence de ce paramètre sur la diffusion que nous allons étudier pour sonder les mailles des réseaux de chitosane.

Pour connaître l'influence de la réticulation chimique du chitosane sur la diffusion des macromolécules de dextran, nous avons d'abord étudié la diffusion du dextran dans l'eau et dans les solutions de chitosane. Cette étude se divise donc en trois parties. La première partie concerne la diffusion de dextran dans l'eau. La deuxième porte sur la diffusion de dextran dans les solutions de chitosane et enfin la diffusion de ces mêmes molécules dans les gels de chitosane est présentée dans la dernière partie.

V.2.3.1 Diffusion de dextran dans l'eau

Nous notons D_0 le coefficient de diffusion du dextran dans l'eau. La diffusion étant rapide et la fluorescence diminuant avec l'acidité, il est plus pratique de travailler à des pH neutres. L'étude de la diffusion du dextran a donc été menée dans l'eau et non dans l'acide acétique qui constitue le solvant dans les réseaux de chitosane. Les coefficients de diffusion de dextran en solution diluée ont été fréquemment mesurés [Andrieux (2002)], [Bu (1994)], [Smit (1992)], [Stankovic (1991)]. Mais pour obtenir des valeurs de référence à l'aide de notre dispositif pour les différents dextrans étudiés, ceux-ci ont été de nouveau mesurés. Ceci nous a permis, entre autres, de caractériser les dextrans utilisés en solution diluée.

a) Les données de la diffusion dans l'eau

La Figure 5 représente l'évolution de la seconde harmonique du signal de recouvrement de fluorescence en fonction du temps pour les dextrans 20D et 280D dans l'eau. L'interfrange était respectivement de 28,9 μm et 22,3 μm . La durée des photolyses était de 50 ms et la puissance du laser de 200 mW pour ces deux mesures.

Avant la photolyse, les mesures permettent de déterminer les lignes de base de la seconde harmonique. Les lignes de base diffèrent pour les deux échantillons étudiés. Ces différences peuvent avoir diverses origines : la variation de concentration de FITC entre deux dextrans, l'incertitude sur la puissance du laser (P) qui est de 10 mW ou encore l'incertitude sur la position du photomultiplicateur qui n'est pas exactement placé de la même manière devant l'échantillon pour chaque mesure. Après la photolyse, les secondes harmoniques décroissent

monoexponentiellement en fonction du temps pour tendre vers les valeurs initiales (avant la photolyse). Ce retour à la ligne de base caractérise une diffusion totale des particules. Les temps de relaxation caractéristiques τ sont $0,146 \pm 0,006$ s et $0,359 \pm 0,006$ s respectivement pour 20D et 280D. Les incertitudes sont celles qui correspondent à l'interpolation des points expérimentaux à l'aide d'une exponentielle.

À l'aide de l'équation Éq V.1, nous déterminons alors les coefficients de diffusion, $D_0 = 0,145 \pm 0,006.10^{-5}$ cm²/s et $D_0 = 0,352 \pm 0,006.10^{-6}$ cm²/s pour les échantillons 20D et 280D respectivement.

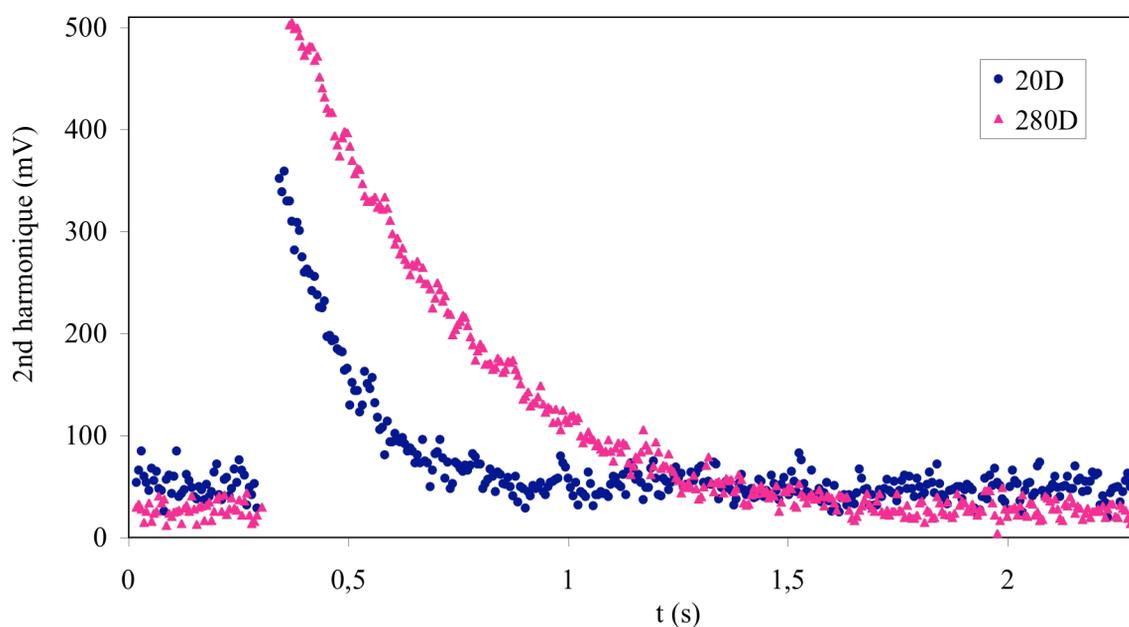


Figure 5. 2nd harmonique du signal de recouvrement de fluorescence pour les dextrans 20D ($i = 28,9 \mu\text{m}$) et 280D ($i = 22,3 \mu\text{m}$) dans l'eau, temps de photolyse = 50 ms, P = 200 mW

L'expérience a été réalisée à différents interfranges i pour chaque masse molaire. Sur la Figure 6, est représentée pour chaque masse molaire (20D, 40D, 70D, 150D et 280D) la variation du temps de relaxation caractéristique τ , en fonction de i^2 . Nous observons que le temps de relaxation est proportionnel à i^2 . Cette relation est caractéristique d'une simple diffusion de masse et signifie que le FITC a été photolysé de manière irréversible. Chaque courbe permet aussi de déterminer un coefficient de diffusion à partir du coefficient directeur de la relation linéaire en utilisant l'équation Éq V.2. C'est le coefficient de diffusion déterminé de cette façon qui est privilégié dans la suite parce qu'il représente un plus grand nombre de mesures et à différentes positions dans le réseau. Il caractérise donc mieux la diffusion moyenne dans les différentes matrices.

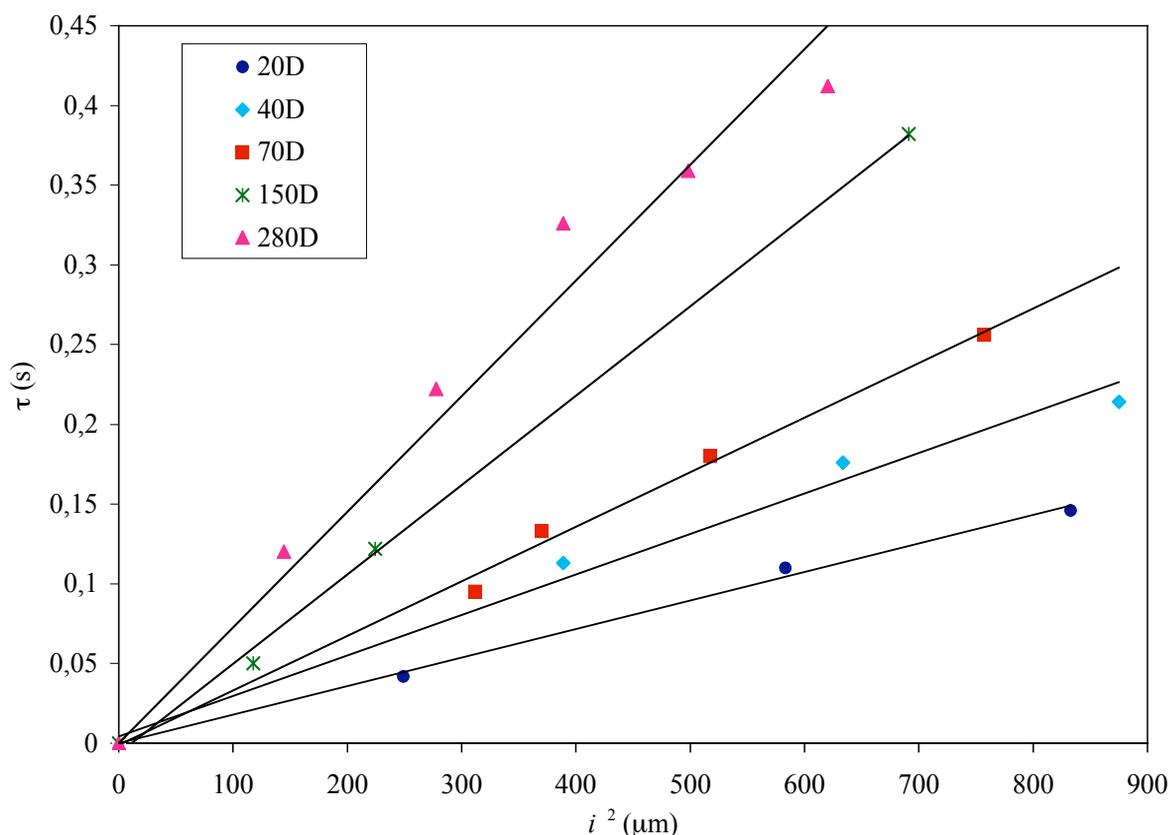


Figure 6. Variation de τ en fonction de i^2 pour différentes masses molaires de dextran dans l'eau.

b) Exploitation des données de la diffusion dans l'eau

En solution diluée, les chaînes de dextrans sont indépendantes et peuvent être considérées comme des particules sphériques caractérisées par un rayon hydrodynamique R_H . La diffusion de ces particules de concentration inférieure à la concentration d'enchevêtrement dans un solvant de viscosité η est gouvernée par la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k_B T}{f \pi \eta D_0} \quad \text{Éq V.4}$$

où k_B est la constante de Boltzmann et η est la viscosité de l'eau. Dans cette équation, f est égal à 4 pour des solutés de taille proche de celle du solvant (eau : 1,85 Å) et 6 pour les solutés de taille plus grosse [Amsden (2002)]. Dans notre cas, f est égal à 6. D_0 est le coefficient de diffusion de la molécule dans l'eau.

À partir de l'équation Éq V.4, nous déterminons les rayons hydrodynamiques des dextrans dans l'eau. Les valeurs des coefficients de diffusion mesurées par FRAP et des rayons

hydrodynamiques calculés pour les différentes masses molaires sont regroupées dans le Tableau 5.

La diffusion du dextran 4D dans l'eau n'a pu être étudiée par cette technique compte tenu de la plage d'interfrange limitée (voir le paragraphe V1.4.3). Les mesures de temps de relaxation inférieurs aux temps de photolyse sont en effet impossibles.

Échantillon de dextran	D_0 10^6 cm^2/s	R_H (Å)	$R_{\text{linéaire}}$ (Å)
4D	3,1 ¹	7	140
20D	1,41 \pm 0,01	16	600
40D	1,00 \pm 0,01	22	1230
70D	0,75 \pm 0,02	29	2380
150D	0,45 \pm 0,05	48	4540
280D	0,36 \pm 0,03	60	8700

Tableau 5. Coefficient de diffusion D_0 , rayon hydrodynamique R_H du dextran dans l'eau et longueurs calculées des chaînes de dextran complètement déployées en fonction de M_w

On peut aussi calculer la longueur des chaînes de dextran complètement étirées à l'aide de la relation :

$$R_{\text{linéaire}} = N.a \quad \text{Éq V.5}$$

où N est le degré de polymérisation (sachant que la masse molaire moyenne d'un monomère de dextran est égale à 162 g/mol) et a la dimension d'un monomère. La dimension d'une unité de glucose constituant une macromolécule de cellulose dans l'eau est de l'ordre de 5 Å [Baker (1998)]. Nous avons donc pris a égal à 5 Å pour estimer $R_{\text{linéaire}}$. Les valeurs de $R_{\text{linéaire}}$ sont rassemblées dans le Tableau 5.

Les valeurs de R_H déduites du coefficient de diffusion du dextran dans l'eau (Tableau 5) sont bien comprises entre la taille d'un monomère et la taille du polymère complètement étiré. De

¹ Valeur calculée indirectement dont la détermination est expliquée plus loin dans ce même paragraphe

plus, les valeurs de D_0 et de R_H sont du même ordre de grandeur que celles qui sont données pour du dextran provenant également de chez Sigma par Bu *et al.* [Bu (1994)].

Sur la Figure 7 est représentée la variation des coefficients de diffusion dans l'eau en fonction de la masse molaire.

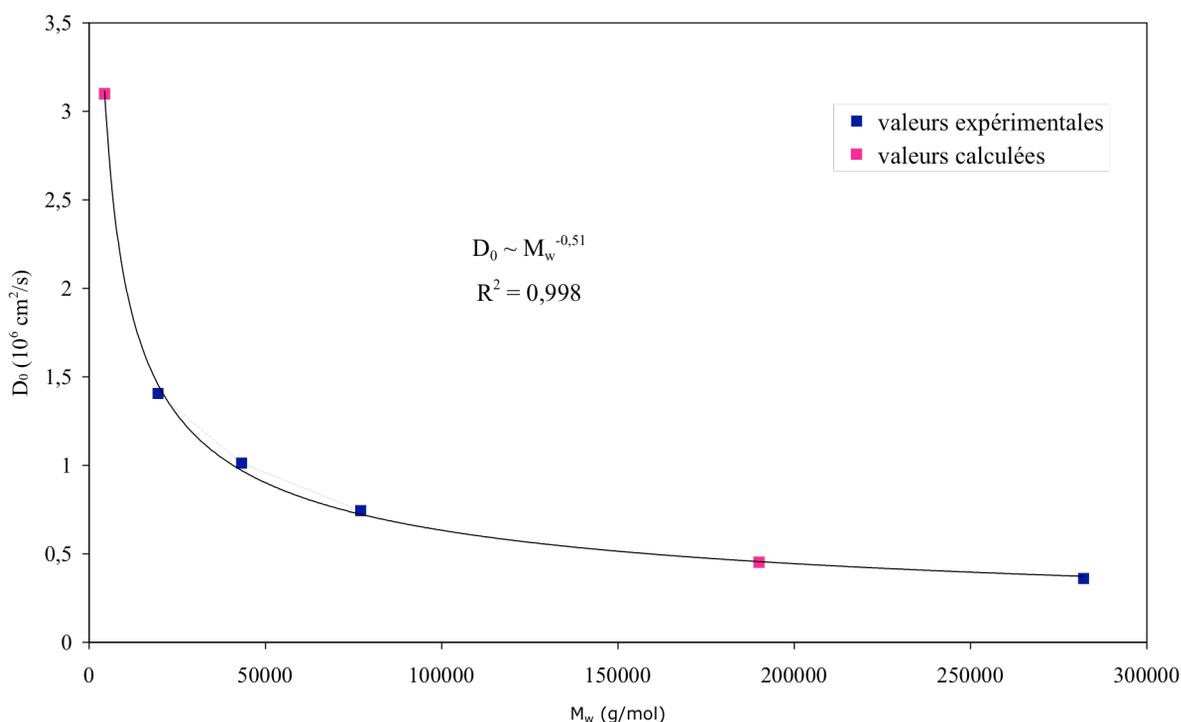


Figure 7. Variation du coefficient de diffusion des dextrans en fonction de leur masse molaire dans l'eau ajustée par une loi de puissance

Nous observons que D_0 suit une loi de puissance en fonction de M_w . L'exposant déterminé est de l'ordre de 0,51. Cette valeur est en bon accord avec celles qui ont été obtenues par des travaux précédents résumés par Smit *et al.* [Smit (1992)] et retrouvées par Bu *et al.* [Bu (1994)]. Un exposant de 0,5 correspond en général à la diffusion de molécules dans un solvant θ . Cependant l'eau devrait être un bon solvant pour le dextran vu sa structure chimique. Smit *et al* ont montré qu'un exposant proche de 0,5 correspondait théoriquement à la diffusion de polymères aléatoirement branchés en bon solvant. Il apparaît donc que les dextrans étudiés dans ce travail possèdent vraisemblablement une structure aléatoirement branchée.

À partir de la courbe de la Figure 7, nous avons pu obtenir la valeur de la masse molaire du dextran 150D (non fournie par le producteur et fixée arbitrairement par celui-ci à 150 000 g/mol) et du coefficient de diffusion du dextran 4D dans l'eau (qui n'a pu être mesuré comme il a été noté précédemment).

Les paramètres de la courbe d'ajustement ont été déterminés à l'aide des quatre échantillons 20D, 40D, 70D et 280D pour lesquels nous avons à la fois les valeurs des masses molaires et les coefficients de diffusion. Nous avons ensuite pu calculer par extrapolation la masse molaire du dextran 150D (190000 g/mol) et le coefficient de diffusion du dextran 4D ($D_0 = 3,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, valeur reportée dans le Tableau 5).

Par ailleurs, nous avons tracé sur la Figure 8 la variation de la masse molaire en fonction des rayons hydrodynamiques (calculés à partir de l'équation Éq V.4) des macromolécules de dextran. La masse molaire évolue en loi de puissance avec le rayon hydrodynamique pour ces macromolécules.

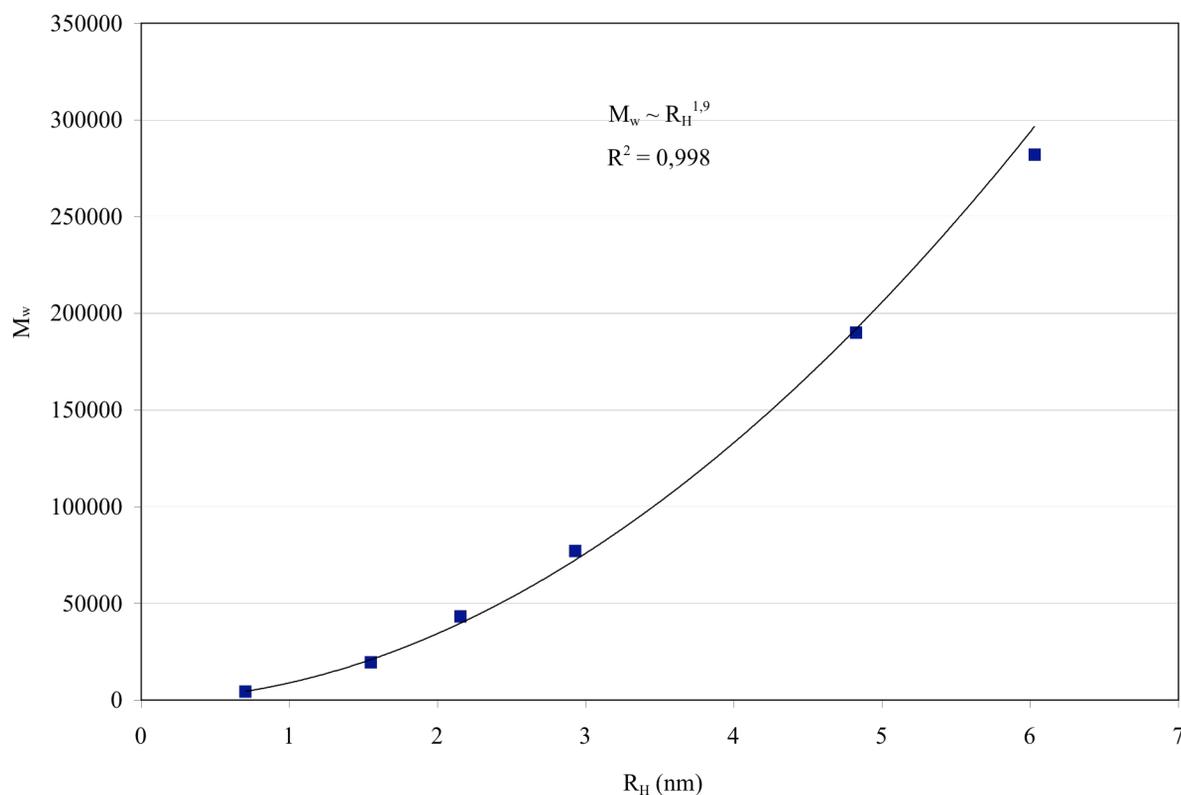


Figure 8. Variation de la masse molaire des dextrans en fonction de leur rayon hydrodynamique ajustée par une loi de puissance

Les macromolécules de dextran peuvent être décrites par leur dimension fractale d_f définie par la loi d'échelle :

$$M \propto R^{d_f}$$

Éq V.6

où M et R sont respectivement leur masse et leur rayon. À partir de la Figure 8, nous pouvons donc déterminer leur dimension fractale ($d_f = 1,9$). Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle déterminée par Cheng *et al.* pour des dextrans dans l'eau ($d_f = 2,3$) également par la technique de FRAP par réseaux de franges [Cheng (2002)]. Cette dimension fractale est supérieure au $5/3$ prévu pour un polymère linéaire en bon solvant par de Gennes [de Gennes (1979)] mais largement inférieure à 3, valeur qui caractérise une sphère rigide. Les dextrans étudiés sont donc vraisemblablement faiblement branchés et flexibles comme nous l'avons déjà noté à partir de la variation de D_0 en fonction de M_w .

V.2.3.2 Diffusion dans les solutions de chitosane

a) *Les données de la diffusion dans les solutions de polymères*

Nous présentons dans cette partie la diffusion de dextran pour quatre masses molaires (20D, 40D, 150D et 280D) dans les solutions de chitosane ($C = 1,5$ % p/p, pH = 5) en l'absence d'agent réticulant. Nous notons D_S le coefficient de diffusion de dextran dans ces solutions de chitosane.

Sur la Figure 9 est représentée l'évolution de la seconde harmonique du signal de recouvrement de fluorescence en fonction du temps pour le dextran 280D dans une solution de chitosane à $C = 1,5$ % (p/p). Cette mesure a été faite pour un interfrange de $6,3$ μm , un temps de photolyse de 50 ms et une puissance laser de 200 mW. Une évolution monoexponentielle avec retour à la ligne de base est observée après la photolyse. Ceci est caractéristique de l'auto-diffusion totale des macromolécules de dextran dans une solution de chitosane : les sondes ne sont pas piégées dans les mailles du réseau physique de chitosane.

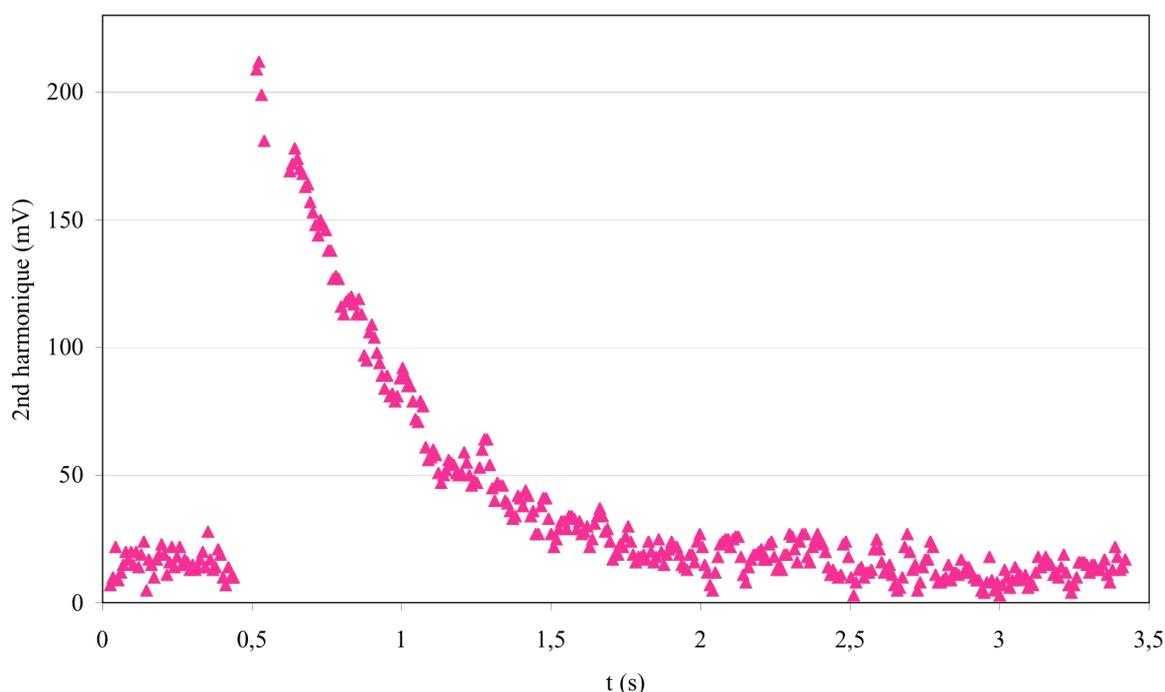


Figure 9. 2nd harmonique du signal de recouvrement de fluorescence pour l'échantillon 280D dans une solution de chitosane à $C = 1,5\%$ (p/p), $i = 6,3\ \mu\text{m}$, temps de photolyse = 50 ms, $P = 200\ \text{mW}$

Nous obtenons un temps de relaxation caractéristique $\tau = 0,41 \pm 0,01\ \text{s}$, soit un coefficient de diffusion $D_s = 0,025 \pm 0,009 \cdot 10^{-6}\ \text{cm}^2/\text{s}$ à l'aide de l'équation Éq V.1.

Comme pour la diffusion des dextrans dans l'eau, nous avons vérifié la relation linéaire entre le temps de relaxation caractéristique τ et i^2 pour l'échantillon 280D (Figure 10) diffusant dans une solution de chitosane. Pour les échantillons 40D et 150D, nous avons réalisé les mesures pour deux interfranges différents et effectué deux fois l'expérience pour un même interfrange ($i = 19,72\ \mu\text{m}$) pour le 40D (Figure 10). Nous observons que dans les solutions de chitosane, les chaînes de dextran 40D, 150D et 280D se déplacent donc par simple diffusion et la photolyse est toujours irréversible. Nous supposons qu'il en est de même pour l'échantillon 20D pour lequel l'expérience n'a été réalisée que pour une valeur d'interfrange.

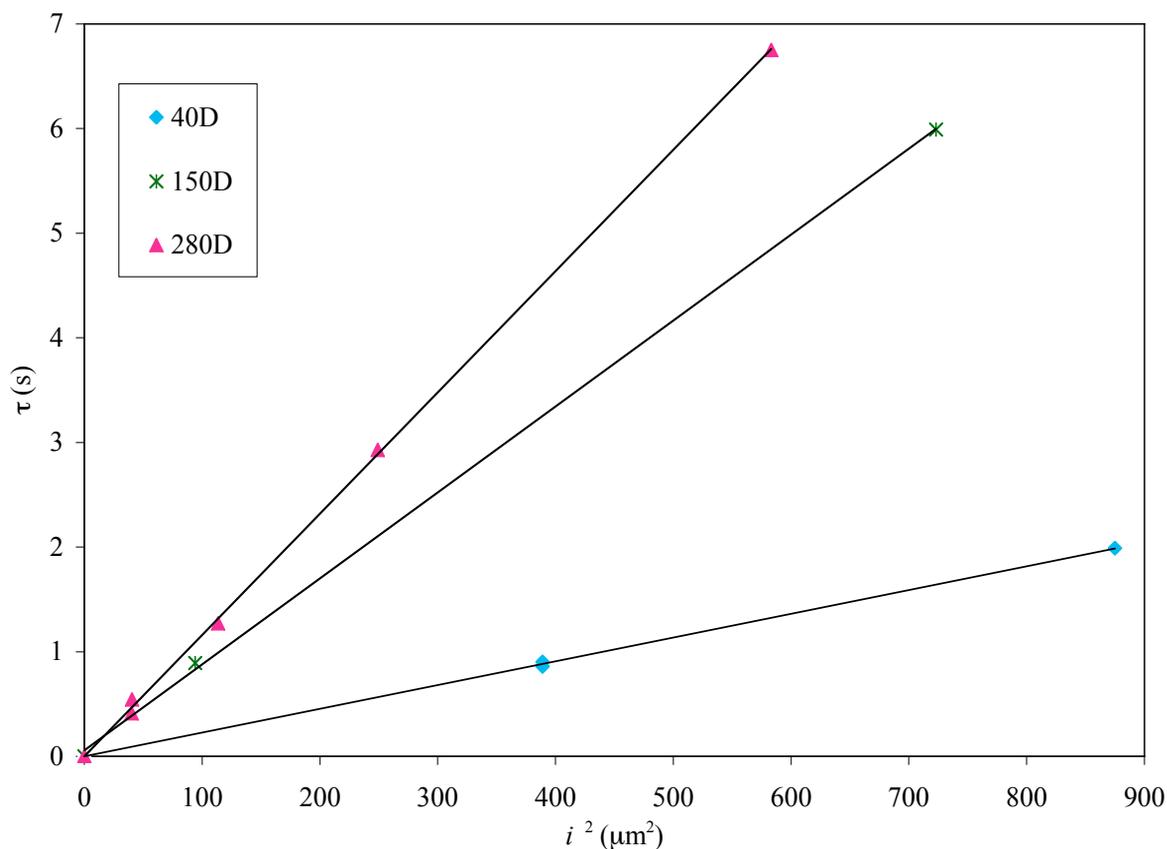


Figure 10. Temps de relaxation caractéristique en fonction de i^2 pour 280D, 40D et 20D dans les solutions de chitosane (1,5% p/p)

b) Exploitation des données de la diffusion dans les solutions de polymères

Dans le Tableau 6 sont regroupés les coefficients de diffusion calculés à partir des relations linéaires de la Figure 10 pour les masses molaires 40D, 150D et 280D et d'une seule expérience de mesure du temps de diffusion pour l'échantillon 20D. Nous y avons aussi rassemblé le rapport entre les coefficients de diffusion dans les solutions de chitosane noté D_s et dans l'eau noté D_0 .

Échantillon de dextran	D_s ($10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$)	D_s/D_0
20D	$0,37 \pm 0,01$	0,26
40D	$0,111 \pm 0,002$	0,11
150D	$0,031 \pm 0,002$	0,07
280D	$0,022 \pm 0,001$	0,06

Tableau 6. Coefficient de diffusion D_s des dextrans dans des solutions de chitosane ($C = 1,5 \%$ p/p) et rapport entre celui-ci et le coefficient de diffusion D_0 des dextrans dans l'eau

En comparant les coefficients de diffusion des dextrans dans les solutions et dans l'eau, nous en déduisons que la diffusion de dextran dans les solutions de chitosane est ralentie par rapport à la diffusion dans l'eau avec un rapport des coefficients de diffusion entre les deux milieux variant de 0,26 (20D) à 0,06 (280D). Ceci est dû à l'augmentation de la viscosité et de l'encombrement stérique induits par les chaînes de chitosane.

Ces valeurs sont cohérentes en ordre de grandeur avec celles qui ont été déterminées pour la diffusion de dextran dans des solutions de HPC (hydroxypropyl cellulose C = 4%) [Bu (1994)], dans les solutions de POE [Cheng (2002)] ou encore dans les solutions de guar (ce dernier étant comme le chitosane un polysaccharide) [Cheng (2002)]. Les coefficients de diffusion que nous avons déterminés sont en fait caractéristiques de la diffusion de particules dont la taille est de quelques nanomètres dans des solutions de polymères semi-diluées enchevêtrées dont la longueur de corrélation est de quelques dizaines de nanomètres [Masuda (2001)]. Ces dimensions correspondent effectivement à ce que nous avons déterminées aussi bien pour la taille caractéristique des dextrans (voir Tableau 5) que la longueur de corrélation des solutions de chitosane (Tableau 2 du Chapitre IV).

La variation des coefficients de diffusion du dextran dans les solutions de chitosane en fonction de la masse molaire des dextrans est représentée sur la Figure 11.

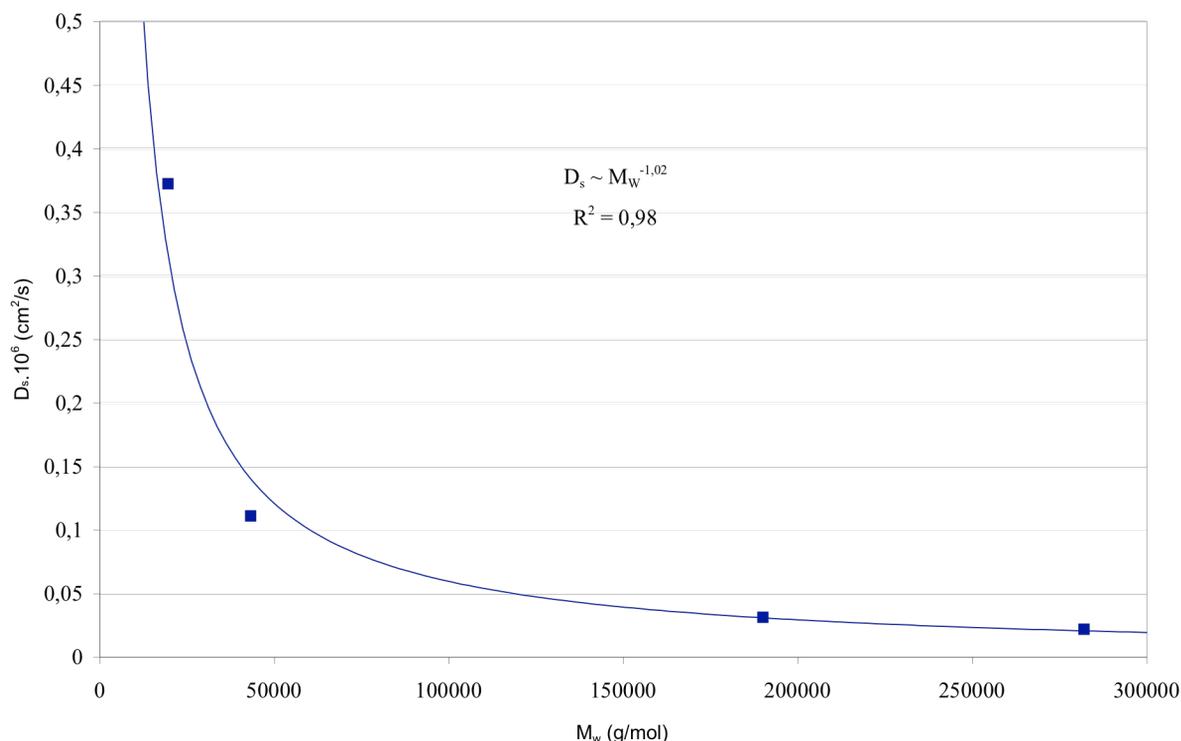


Figure 11. Coefficient de diffusion de dextran en fonction de la masse dans les solutions de chitosane 1,5 % (p/p)

Nous obtenons une variation en loi de puissance dont l'exposant est proche de -1. Ceci suggérerait une diffusion de type Rouse, c'est-à-dire une diffusion au cours de laquelle les interactions hydrodynamiques sont négligeables à cause de la viscosité macroscopique élevée de la solution de polymère [Doi (1986)]. Ce comportement est généralement observé pour des chaînes de polymères de tailles inférieures à la maille du réseau [Léger (1996)], ce qui est le cas dans cette étude. En effet, les mesures de neutrons au chapitre IV ont permis de déterminer la distance séparant deux points d'enchèvètements dans une solution de chitosane non-réticulés ($C = 1,5$ % p/p). Cette distance est environ égale à 512 Å. Dans le Tableau 7, nous avons regroupé les rapports entre ξ et le rayon hydrodynamique du diffusant R_H déterminée dans le paragraphe V.2.3.1. Nous supposons donc que les dimensions des dextrans sont les mêmes dans l'eau et dans les solutions de chitosane. Cette hypothèse est forte puisque le pH et la force ionique varient entre les deux milieux de dissolution. Mais cela nous permet d'avoir un ordre de grandeur des rapports entre ξ et R_H dans les réseaux de chitosane non-réticulés.

Échantillon de dextran	4D	20D	40D	70D	150D	280D
ξ / R_H	73	32	23	18	11	9

Tableau 7. Rapport entre la longueur de corrélation d'un réseau de chitosane non-réticulés et le rayon hydrodynamique du diffusant (dextran)

Le rapport entre la taille de la maille et les rayons hydrodynamiques est au moins égale à 9 et augmente lorsque la taille de la molécule diffusante diminue. La taille des sondes est donc toujours très inférieure à la maille du réseau de chitosane. Cette remarque sera importante pour comprendre la diffusion dans les réseaux chimiques de chitosane.

Nous avons tenté de calculer les valeurs des rayons hydrodynamiques des dextrans dans les solutions de chitosane à partir de la relation de Stokes-Einstein (Éq V.4). Pour cela, nous avons fixé la viscosité du milieu à 0,58 Pa.s, c'est-à-dire la valeur de la viscosité déterminée dans le chapitre II pour les solutions de chitosane 1M à pH = 4 et une concentration massique de chitosane de 1,5 %. La valeur du rayon hydrodynamique pour le dextran 280D par exemple est de 1,9 Å. Ainsi, pour toutes les masses molaires de dextrans, ces valeurs sont bien inférieures à la longueur d'un monomère (environ 5 Å) ce qui est aberrant. Le modèle de Stokes-Einstein ne s'applique donc pas pour ces diffuseurs dans les solutions semi-diluées de chitosane. L'échec de l'application de ce modèle a été observé par de nombreux auteurs en solution de polymère semi-diluée. Bu *et al.* [Bu (1994)] ont montré que la diffusion du dextran tout comme des particules sphériques de latex ne peut être décrite par l'équation de Stokes-Einstein dans les solutions concentrées de HPC. Cheng *et al.* [Cheng (2002)] à la suite de nombreux autres auteurs justifient cet écart des résultats expérimentaux avec le modèle de Stokes-Einstein du fait que les particules ne voient pas la solution de polymères comme un milieu continu (ce qui constitue une hypothèse du modèle). La diffusion prévue par la relation d'Einstein est alors plus lente que celle qui est observée expérimentalement. Ce comportement est d'autant plus observé que la masse molaire de la sonde augmente.

V.2.3.3 Diffusion dans les gels de chitosane

a) Les données de la diffusion dans les gels

Les coefficients de diffusion des dextrans dans les gels sont notés D_g . La Figure 12 et la Figure 13 représentent la seconde harmonique du signal de recouvrement de fluorescence pour les échantillons 20D et 280D respectivement. Ces échantillons correspondent

respectivement à l'une des plus petites et à la plus grosse masse de dextran étudiées. Les mesures ont été faites pour des interférences de 25,2 et 10,7 μm respectivement.

Les mêmes évolutions de la seconde harmonique du signal de recouvrement de fluorescence ont été observées pour tous les autres échantillons de dextran. Comme dans les réseaux de chitosane non-gélifiés, l'évolution de cette seconde harmonique en fonction du temps caractérise l'auto-diffusion totale des chaînes de dextran dans les gels (Figure 12).

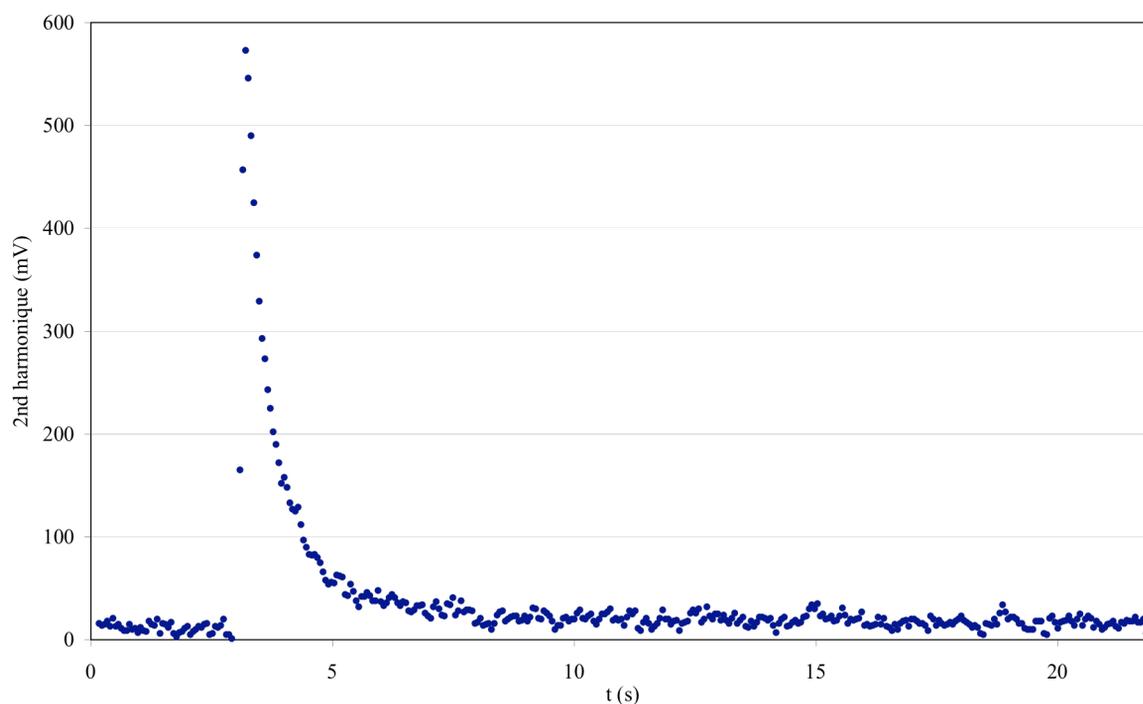


Figure 12. 2nd harmonique du signal de recouvrement de fluorescence pour l'échantillon 20D dans un gel de chitosane $C = 1,5 \%$ (p/p), $i = 25,2 \mu\text{m}$, temps de photolyse = 50 ms, $P = 200 \text{ mW}$

Pour le dextran 20D, le temps de relaxation caractéristique est égal à $\tau = 0,59 \pm 0,02 \text{ s}$ et le coefficient de diffusion correspondant est $D_g = 0,27 \pm 0,01 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Figure 12).

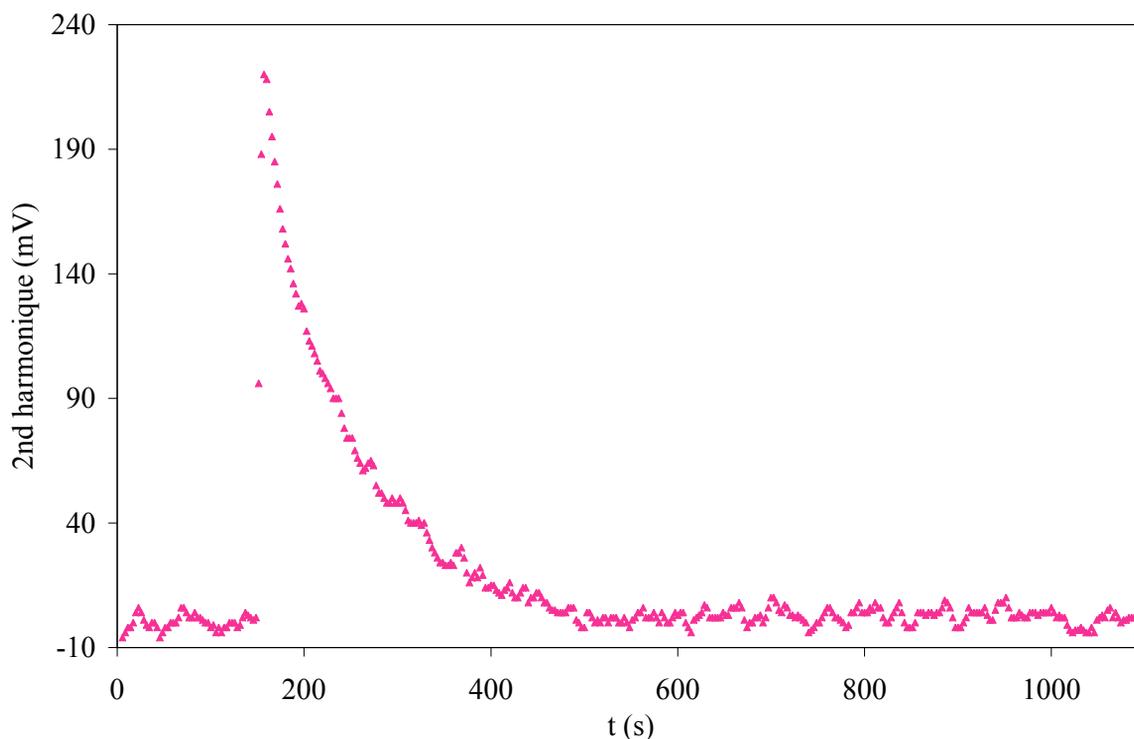


Figure 13. 2nd harmonique du signal de recouvrement de fluorescence pour l'échantillon 280D dans un gel de chitosane 1,5 % (p/p), $i = 10,7 \mu\text{m}$, temps de photolyse = 50 ms, $P = 200 \text{ mW}$

Pour l'échantillon 280D, le temps de relaxation caractéristique (Figure 13) est égal à $93 \pm 2 \text{ s}$ ce qui correspond à un coefficient de diffusion de $0,31 \pm 0,01 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Dans le Tableau 8 sont regroupées les valeurs de τ et D_g déduites de l'étude des secondes harmoniques pour le 40D, le 150D pour différentes interfranges pour illustrer la reproductibilité des mesures avec les échantillons 40D et 150D.

Dextran	i (μm)	τ (s)	D_g (cm^2/s)
40D	22,8	$1,11 \pm 0,03$	$0,12 \cdot 10^{-6} \pm 0,03$
40D	22,8	$1,26 \pm 0,05$	$0,106 \cdot 10^{-6} \pm 0,004$
40D	22,8	$1,11 \pm 0,04$	$0,121 \cdot 10^{-6} \pm 0,004$
150D	9,7	50 ± 2	$0,48 \cdot 10^{-9} \pm 0,02$
150D	9,7	57 ± 1	$0,42 \cdot 10^{-9} \pm 0,09$

Tableau 8. Temps de relaxation caractéristique de la diffusion et coefficient de diffusion des dextrans 20D, 40D, 150D et 280D dans les gels de chitosane ($C = 1,5 \text{ \% p/p}$) pour différentes interfranges. Les incertitudes du tableau correspondent aux ajustements des courbes expérimentales par une simple exponentielle

Les variations des temps de relaxation caractéristiques en fonction de i^2 sont représentées sur la Figure 14 pour les échantillons 20D, 40D et 70D, et sur la Figure 15 pour l'échantillon

280D. Ces résultats ont été tracés sur des figures différentes car les échelles sont très différentes.

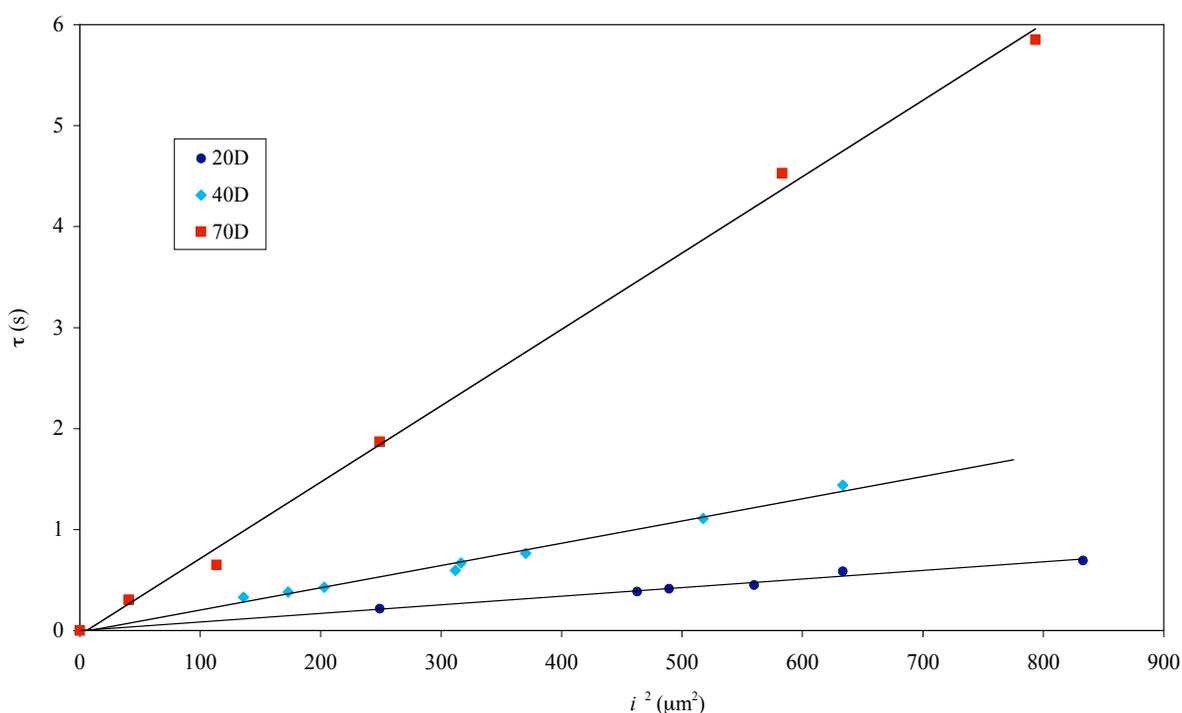


Figure 14. Variation du temps de relaxation caractéristique en fonction de i^2 pour 20D, 40D, 70D dans un gel de chitosane ($C = 1,5 \%$ p/p) ajustée par une fonction linéaire

Nous vérifions à nouveau la proportionnalité du temps de relaxation caractéristique des dextran-FITC en fonction de i^2 . La diffusion dans les gels des macromolécules des dextrans 20D, 40D, 70D et 280D est donc, comme dans les solutions de chitosane, auto-diffusive et la photolyse des groupes fluorophores est irréversible. Nous supposons qu'il en est de même pour l'échantillon 150D pour lequel l'expérience n'a été réalisée que pour une valeur d'interfrange.

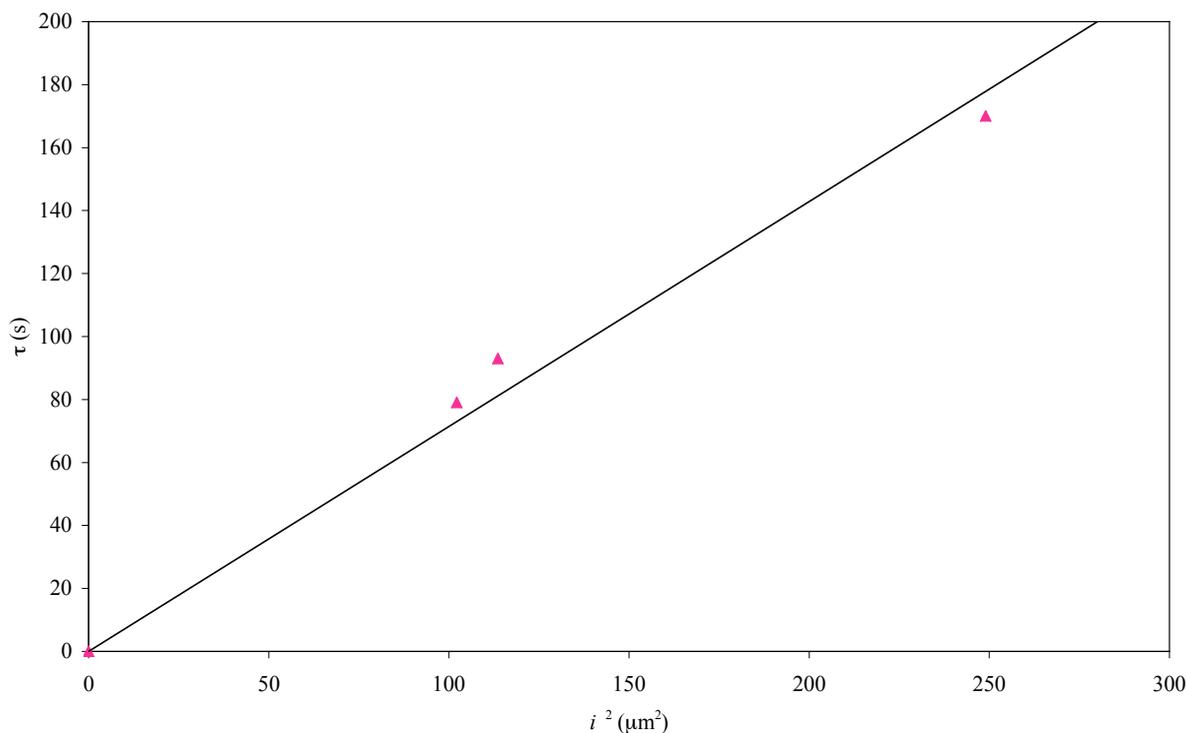


Figure 15. Variation du temps de relaxation caractéristique en fonction de i^2 pour 280D dans un gel de chitosane ($C = 1,5$ % p/p) ajustée par une fonction linéaire

b) Exploitation des données de la diffusion dans les gels

Dans le Tableau 9 est résumé l'ensemble des coefficients de diffusion mesurés pour les différentes masses molaires de dextrans dans des gels à partir des relations linéaires de τ et de i^2 excepté pour les échantillons 150D et 4D pour lesquels les mesures n'ont été faites que pour un interfrange.

Échantillon de dextran	$D_g \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$	D_g/D_s
4D	$0,99 \pm 0,01$	
20D	$0,28 \pm 0,02$	1,3
40D	$0,12 \pm 0,01$	0,9
70D	$0,033 \pm 0,02$	
150D	$0,00045 \pm 0,00003$	69
280D	$0,00033 \pm 0,00004$	67

Tableau 9. Coefficients de diffusion des dextrans D_g dans un gel de chitosane et rapport D_g/D_s des coefficients de diffusion de ces macromolécules dans les gels et dans les solutions de chitosane

Pour suivre cette discussion, il faut avoir en tête la Figure 2 du chapitre IV.

De même que pour les solutions de chitosane non réticulées, nous observons que le coefficient de diffusion dans les gels diminue avec la masse molaire de dextran. Par ailleurs, pour étudier l'influence du réseau de chitosane gélifié chimiquement sur la diffusion, nous comparons les coefficients de diffusion des dextrans entre un réseau réticulé et non-réticulé. Nous remarquons que pour les échantillons 20D et 40D, la diffusion dans les gels et dans les solutions est du même ordre de grandeur. La présence des noeuds de réticulation chimique au sein du réseau de chitosane ne gêne donc que très peu les déplacements des plus petites macromolécules dans les gels.

En revanche, pour les échantillons 150D et 280D, le coefficient de diffusion est près de 70 fois plus petit dans le cas d'un chitosane réticulé. La diffusion est donc notablement ralentie du fait de la présence des nœuds de réticulation pour ces masses. Nos expériences de diffusion de neutrons n'ont pas permis de mesurer la distance entre les nœuds de réticulation (chapitre IV). Elles ont montré que ces nœuds apparaissent à l'endroit de certains enchevêtrements sans réduire la longueur de corrélation mesurable. Les tableaux rassemblant les rapports entre la longueur de corrélation d'un réseau de chitosane et le rayon hydrodynamique du dextran sont donc identiques pour des chaînes réticulées et des chaînes simplement enchevêtrées (Tableau 7). D'un autre côté, les mesures de rhéologie ont bien mis en évidence la différence de dynamique entre un réseau de chitosane réticulé ou non. Ainsi, par des comparaisons effectuées ci-dessus, on peut supposer que le rapport entre la taille des macromolécules et des mailles de réticulation est suffisamment élevé pour que la diffusion des dextrans soit ralentie. Ce n'est pas le cas pour les petites macromolécules. La diffusion des dextrans est donc dépendante de la taille de celle-ci et de la dynamique du réseau de chitosane.

De Smedt *et al.* [De Smedt (1997)] ont observé un comportement similaire pour la diffusion de dextran dans des matrices de méthacrylate de dextran. Ainsi, les auteurs ont montré que la différence de diffusion dans des solutions et dans les gels dépendait de la taille du diffusant pour une même concentration de polymère et que cette différence augmentait avec la concentration en polymère. De même, les expériences de Bell *et al.* [Bell (1996)] ont aussi mis en évidence l'effet de la taille relative de la particule par rapport à la taille de la maille sur la diffusion de POE dans les hydrogels de poly(acide-g-éthylène glycol méthacrylique).

c) Modélisation de la diffusion

Variation du coefficient de diffusion avec la masse molaire de la sonde

De même que pour la diffusion dans l'eau et dans les solutions de chitosane, nous avons tenté de modéliser la variation de la dynamique de diffusion dans un gel en fonction de la masse molaire des macromolécules diffusantes. Nous avons pour cela représenté la variation du coefficient de diffusion des dextrans dans les gels de chitosane en fonction de la masse molaire des macromolécules sur la Figure 16.

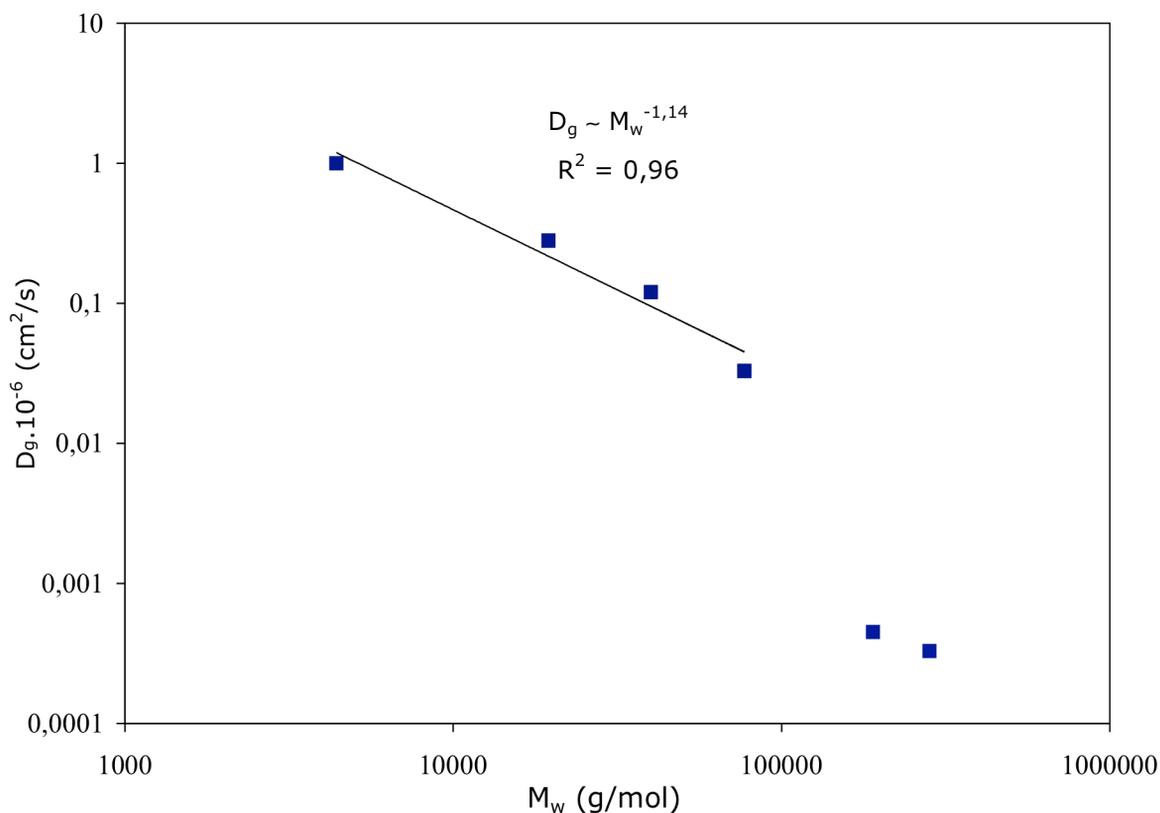


Figure 16. Variation du coefficient de diffusion en fonction de la masse molaire de dextran dans un gel de chitosane (C = 1,5 % p/p). Pour les quatre plus petites masses (4D, 20D, 40D, 70D), les données expérimentales sont ajustées par une loi de puissance.

La diminution brutale du coefficient de diffusion des dextrans pour les deux masses molaires les plus importantes suggère deux régimes de diffusion. Dans le cas des polymères fondus de PDMS (poly(diméthyle)siloxane) [Léger (1996)], il a été montré que la diffusion de macromolécules (également du PDMS) de faibles masses molaires est décrite par le modèle de Rouse tandis que pour les masses molaires élevées c'est plutôt le modèle de reptation qui est adapté.

L'ajustement de nos données expérimentales pour les quatre plus petites masses par une loi de puissance permet de déterminer un exposant égal à $-1,14$, valeur proche de la valeur théorique -1 caractérisant une dynamique de Rouse. La diffusion dans les gels pour les plus faibles masses serait donc une diffusion de type Rouse où les interactions hydrodynamiques sont écrantées. En revanche le mécanisme de reptation ne peut expliquer la diminution du coefficient de diffusion pour les deux masses molaires de dextran les plus élevées. En effet D_g ne varie pas en loi de puissance avec un exposant -2 (caractéristique de la reptation) pour ces 2 masses molaires.

Variation du coefficient de diffusion avec la taille de la sonde

Il existe d'autres modèles que ceux de Rouse et de la reptation qui ont été proposés pour décrire la diffusion dans les réseaux de polymère [Masuda (2001)], en particulier des modèles qui relient les coefficients de diffusion des sondes et leur taille. C'est ce que nous étudions dans cette partie. Nous supposons qu'en présence de la matrice de chitosane, les chaînes de dextran ne changent pas de conformation (ni contraction, ni gonflement) c'est-à-dire que les rayons hydrodynamiques du diffusant sont les mêmes dans l'eau (paragraphe V.2.3.1) et dans les gels. Nous représentons alors la variation de D_g en fonction de R_H déterminé dans l'étude de la diffusion des dextrans dans l'eau (Figure 17). Les données expérimentales sont ajustées par une fonction exponentielle.

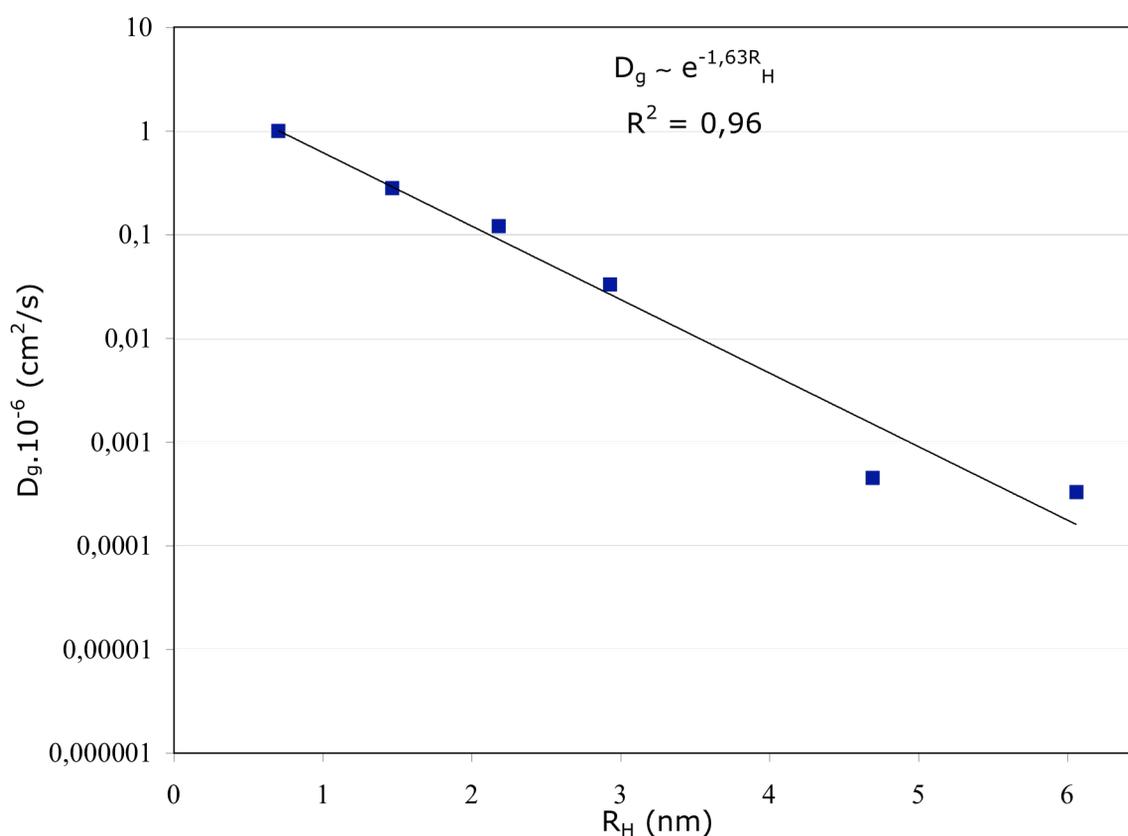


Figure 17. Variation de D_g en fonction de R_H ajusté par une fonction exponentielle

Ce type de comportement est en accord avec le modèle de Cukier [Cukier (1984)] qui prévoit une variation du coefficient de diffusion en fonction du rayon hydrodynamique du diffusant suivant l'équation :

$$D_g = D_0 \exp(-\kappa R_H) \quad \text{Éq V.7}$$

où κ représente les frictions entre le soluté et le polymère en régime semi-dilué et D_0 le coefficient de diffusion du diffusant à dilution infinie. Cukier a développé cette équation pour décrire la diffusion de sphères dans les solutions semi-diluées basée sur les interactions hydrodynamiques entre le réseau de polymère et la particule diffusante. Ceci a été vérifié pour des diffusants de petites tailles par rapport aux tailles caractéristiques des matrices [Masaro (1999)]. Les diffusants sont alors considérés comme des sphères de rayon R_H .

Comme le modèle de Rouse, le modèle de Cukier pourrait décrire la diffusion des dextrans de petites tailles dans les réseaux de chitosane mais beaucoup moins bien la diffusion des dextrans de tailles élevées. Rappelons que dans notre étude, le rapport entre ξ (longueur de corrélation entre deux points d'enchevêtrement) et le rayon hydrodynamique des molécules de

dextran est compris entre 73 et 9 (Tableau 7). De plus, ce rapport doit être plus élevé si nous considérons non pas la longueur de corrélation entre deux points d'enchevêtrement mais entre deux points de réticulation (voir Chapitre V). Klepko et al ont également montré que la diffusion de molécules d'eau dans les gels de gélatine est décrite par le modèle de Cukier [Klepko (1996)]. Dans leur étude, le rapport entre ξ^* (la distance entre deux points de réticulation) et R (la dimension de la molécule d'eau) varie entre 24 et 71. Park *et al* ont observé les limites de l'équation de Cukier à décrire la diffusion de molécules de benzospiropyran ou de BSA dans des gels de polyacrylamide [Park (1990)]. Ces auteurs ont déterminé un rapport ξ^*/R inférieur ou égal à 15 dans leur étude. Il serait intéressant de déterminer expérimentalement (par diffusion de neutrons par exemple) les dimensions des chaînes de dextran dans les solutions et les gels de chitosane pour revoir l'ajustement des valeurs des coefficients de diffusion déterminées par le modèle de Cukier. En effet, la variation de la force ionique et du pH entre l'eau et une solution ou gel de chitosane doit entraîner une variation de R_H , ce qui n'a pas été pris en compte ici.

Pour compléter cette étude de la diffusion des dextrans dans les réseaux de chitosane, il faudrait mettre en place un protocole de production de solutions de chitosane à des concentrations plus importantes que celles de notre étude. En effet, les modèles décrivant la diffusion de sonde dans les réseaux de polymères prédisent en général une variation des coefficients de diffusion avec la concentration de polymère formant le réseau. En particulier, nous pourrions vérifier si le modèle de Cukier est adapté pour décrire cette diffusion en regardant la dépendance de la constante κ de l'équation Éq 7 en fonction de la concentration. Cette dépendance d'après Cukier serait du type : $\kappa \sim C^{1/2}$.

V.3 CONCLUSION

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du pH et de la concentration sur les spectres de fluorescence et d'excitation des dextran-FITC en solution. Ceci nous a permis de déterminer les conditions de pH, de concentration et de longueur d'ondes d'excitation pour lesquelles une étude de diffusion par mesure d'un profil de fluorescence était possible. Puis, nous avons montré que le dextran-FITC n'avait aucune influence sur la cinétique de gélification d'un réseau de chitosane. Ceci signifie qu'il n'existe aucune interaction chimique ni entre les sondes fluorescentes et le chitosane, ni entre celles-ci et le glyoxal. Enfin, nous avons pu utiliser la technique de FRAP par réseaux de franges pour étudier la diffusion de dextrans dans l'eau, dans les solutions et dans les gels de chitosane. Le déplacement des sondes dans ces différentes matrices est auto-diffusif. Il est apparu clairement que la

dynamique du dextran est ralentie quand la masse molaire augmente quel que soit le milieu de diffusion. De même, l'augmentation de la viscosité et de l'encombrement stérique induit par le réseau de polymère non gélifié ou gélifié réduit la mobilité des macromolécules. En revanche, la diffusion n'est pas forcément perturbée par la formation de liaisons chimiques, cela dépend de la taille de la particule. Nous avons aussi montré que dans les solutions de chitosane, quelles que soient les masses molaires étudiées, la diffusion des chaînes de dextran pourrait être décrite par le modèle de Rouse, qui néglige les interactions hydrodynamiques. En revanche, dans les gels de chitosane, la modélisation de la diffusion des dextrans n'est pas évidente : il apparaît deux régimes de diffusion selon la masse molaire. Pour les faibles masses molaires, la diffusion pourrait être de type Rouse. Nous avons montré également que pour l'ensemble des masses molaires, les résultats expérimentaux sont ajustés par le modèle de Cukier avec des écarts élevés pour les deux plus importantes masses molaires. Pour modéliser la diffusion de macromolécules de dextrans dans les gels de chitosane, des expériences supplémentaires sont nécessaires.

RÉFÉRENCES :

- B. Amsden, K. Grothier, D. Angl, *Influence of polymer ionization degree on solute diffusion in polyelectrolyte gels*, *Macromolecules*, 35, 8, 3179-3183 (2002)
- B. Amsden, *Modulating solute diffusion in aqueous polymer solutions*, *Polymer*, 43, 1623-1630 (2002)
- K. Andrieux, P. Lesieur, S. Lesieur, M. Ollivon, C. Gabrielle-Madellmont, *Characterization of fluorescein isothiocyanate-dextrans used in vesicle permeability studie*, *Analytical Chemistry*, 74, 20, 5217-5226 (2002)
- A. A. Baker, W. Helbert, J. Sugiyama, M. J. Miles, *Surface structure of native cellulose microcrystals by AFM*, *Applied Physics A*, 66, 559-563 (1998)
- C. L. Bell, N. A. Peppas, *Water, solute and protein diffusion in physiologically responsive hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol)*, *Biomaterials*, 17, 12, 1203-1218 (1996)
- Z. Bu, P. S. Russo, *Diffusion of dextran in aqueous (Hydroxypropyl)cellulose*, *Macromolecules*, 27, 1187-1194 (1994)

- Y. Cheng, R. K. Prud'homme, J. L. Thomas, *Diffusion of mesoscopic probes in aqueous polymer solutions measured by Fluorescence Recovery After Photobleaching*, *Macromolecules*, 35, 8111-8121 (2002)
- G. Conrath, B. Leclerc, F. Falson-Rieg, J. P Devissaguet, G. Couarraze, *In situ determination of the diffusion coefficient of a solute in a gel system using a radiotracer*, *Journal of Controlled Release*, 9, 159-168 (1989)
- G. Couarraze, B. Leclerc, G. Conrath, F. Falson-Rieg, F. Puisieux, *Diffusion of a dispersed solute in a polymeric matrix*, *International Journal of Pharmaceutics*, 56, 197-206 (1989)
- R. I. Cukier, *Diffusion of brownian spheres in semidilute polymer solutions*, *Macromolecules*, 17, 252-255 (1984)
- J. Davoust, P. F. Devaux, L. Léger, *Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules*, *The EMBO Journal* 1, 10, 1233-1238 (1982)
- P. G. de Gennes, *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell University Press, Ithaca, NY (1979)
- S. C. De Smedt, T. K. L. Meyvis, J. Demeester, *Diffusion of macromolecules in dextran methacrylate solutions and gels as studied by Confocal Scanning Laser Microscopy*, *Macromolecules*, 30, 17, 4863-4870 (1997)
- M. Doi, S. F. Edwards, *The theory of polymer dynamics*, Oxford University Press (1986)
- A. M. Huntz, *Équilibres acido-basiques en solution aqueuse*, pH, édité par Masson (1980)
- A. J. Kujipers, G. H. M. Engbers, T. K. L. Meyvis, S. S. C. de Smedt, J. Demeester, J. Krijgsveld, S. A. J. Zaat, J. Dankert, J. Feijen, *Combined gelatin-chondroitin sulfate hydrogels for controlled release of cationic antibacterial proteins*, *Macromolecules*, 33, 3705-3713 (2000)
- K. B. Kosto, S. Panuganti, W. M. Deen, *Equilibrium partitioning of Ficoll in composite hydrogels*, *Journal of Colloid Science and Interface Science*, sous presse (2004)

- B. Krajewska, A. Olech, *Pore structure of gel chitosan membranes. I. Solute diffusion measurements*, Polymer Gels and Networks, 4, 33-43 (1996)
- B. Leclerc, G. Conrath, F. Falson-Rieg, G. Couarraze, *Evaluation of diffusion in a polymeric system by measurement of the displacement of the solubility front*, European Polymer Journal, 25, 12, 1203-1208 (1989)
- L. Léger, H. Hervet, P. Auroy, E. Boucher, G. Massey, *The reptation model : tests through diffusion measurements in linear polymer melts*, Rheology for Polymer Melt Processing, Edité par J. M. Piau et J. F. Agassant (1996)
- L. Masaro, X. X. Zhu, *Physicals models of diffusion for polymer solutions, gels and solids*, Progress in Polymer Science, 24, 731-775 (1999)
- A. Masuda, K. Ushida, H. Koshino, K. Yamashita, T. Kluge, *Novel distance dependence of diffusion constants in hyaluronan aqueous solution resulting from its characteristic nano-microstructure*, American Chemical Society, 123, 11468-11471 (2001)
- S. Matsukawa, H. Yasunaga, C. Zhao, S. Kuroki, H. Kurosu, I. Ando, *Diffusion processes in polymer gels as studied by pulsed field-gradient spin-echo NMR spectroscopy*, Progress in Polymer Science, 24, 995-1044 (1999)
- I. H. Park, C. S. Johnson, D. A. Gabriel, *Probe diffusion in polyacrylamide gels as observed by means of holographic relaxation methods: search for a universal equation*, Macromolecules, 23, 1548-1553 (1990)
- M. Shibayama, Y. Isaka, *Dynamics of probe particles in polymer solutions and gels*, Macromolecules, 32, 7086-7092 (1999)
- J. A. M. Smit, J. A. P. P. Van Dijk, M. G. Mennen, M. Daoud, *Polymer size exponents of branched dextrans*, Macromolecules, 25, 3585-3590 (1992)
- R. I. Stankovic, S. Jovanovic, Lj. Ilic, E. Nordmeier, M. D. Lechner, *Study of aqueous dextran solutions under high pressures and different temperatures by dynamic light scattering*, Polymer, 32, 2, 235-240 (1991)

D. L. Taylor, Y. Wang, *In fluorescence microscopy of living cells in culture, Part B, quantitative fluorescence microscopy-imaging and spectroscopy methods in cell biology*, Academic Press, 30 (1989)

I. Teraoka, K. H. Langley, F. E. Karasz, *Diffusion of polystyrene in controlled pore glasses : transition from the dilute to the semidilute regime*, *Macromolecules*, 26, 287-297 (1993)

R. Tuinier, A. Brûlet, *On the long-range attraction between proteins due to nonabsorbing polysaccharide*, *Biomacromolecules*, 4, 28-31 (2003)

L. Vachoud, N. Zydowicz, A. Domard, *Sorption and desorption studies on chitin gels*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 93-101 (2001)

J. Varshosaz, M. Falamarzian, *Drug diffusion mechanism through pH-sensitive hydrophobic/polyelectrolyte hydrogel membranes*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 51, 235-240 (2001)

B. Zierenberg, *Experimental and theoretical studies on the diffusion of drugs in polymer films*, *Drug development and industrial pharmacy*, 9, 117-137 (1983)

CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux hydrogels de chitosane réticulé à l'aide d'un dialdéhyde, le glyoxal. Nos objectifs étaient de décrire l'évolution de la structure des réseaux de chitosane au cours de la gélification en fonction de certains paramètres physico-chimiques pour des réseaux de chaînes de chitosane seules ou semi-interpénétrées avec du POE et d'étudier les propriétés de transport de masse dans les gels formés.

À l'aide des mesures rhéologiques dynamiques, nous avons étudié la cinétique de gélification des réseaux de chitosane. Nous avons montré d'une part que la masse molaire du polymère, la concentration et le pH des solutions initiales contrôlaient la vitesse de réaction. En revanche, le POE qui n'a pas d'interaction chimique ni avec le chitosane ni avec le glyoxal n'a aucun effet sur la vitesse de réaction. Par ailleurs, nous avons observé que la fonction étendue du module de relaxation proposée par Friedrich *et al.* permet de décrire de manière continue les propriétés structurales et viscoélastiques des systèmes en cours de gélification [Friedrich (1988, 1989)]. Ces équations définissent quatre paramètres : l'exposant de relaxation (relié à la structure fractale), l'amplitude de gel, le temps de relaxation moyen et le module d'équilibre du matériau. À partir de l'étude de la variation de ces paramètres, il apparaît que le processus de gélification est contrôlé par la masse molaire du chitosane, les contraintes topologiques, les interactions hydrophobes et le pH. Ces mesures ont mis en évidence l'influence relative de ces paramètres sur les propriétés mécaniques des réseaux en cours de gélification. En particulier, nous avons observé que pour des gammes de concentration totale en polymère similaires, les réseaux semi-interpénétrés ont des propriétés mécaniques plus importantes que ceux de référence quel que soit le degré d'avancement de la réticulation. De plus, nous avons observé une dépendance de l'amplitude de gel (S) et de l'exposant de relaxation (Δ) de type $S = G_0 \lambda_0^\Delta$ à la transition sol-gel. G_0 serait le module plateau d'un fondu de polymère (chitosane ou chitosane/POE) et λ_0 le temps de relaxation à partir duquel un comportement en loi de puissance du module de relaxation est observé.

Les mesures de diffusion de neutrons aux petits angles ont permis de mesurer une longueur de corrélation qui s'avère être caractéristique de la distance entre deux nœuds d'enchevêtrements. Cette longueur ne varie pas entre un réseau réticulé chimiquement ou non. Ceci suggère que la distance entre nœuds de réticulation est la même ou plus grande que celle entre nœuds d'enchevêtrements. Celle-ci est comprise entre 300 et 1000 Å selon la composition des systèmes. Ces expériences ont montré en particulier un effet très visible de

l'ajout de POE sur la structure microscopique. Dans les réseaux semi-interpénétrés, la taille de la maille des réseaux est inférieure à celle des réseaux de référence avec des concentrations totales de polymère identiques. Ces résultats sont cohérents avec ceux qui ont été observés dans l'étude des propriétés rhéologiques : les chaînes de POE s'enchevêtrent dans les réseaux de chitosane ce qui entraîne une diminution de la taille caractéristique des mailles du réseau et une augmentation de l'élasticité du système.

Enfin, nous avons pu utiliser la technique de FRAP par réseaux de franges pour étudier la diffusion de molécules de dextran dans les gels de chitosane. Cette étude a été menée en comparant la diffusion de ces mêmes macromolécules dans l'eau et dans les solutions de chitosane. Le déplacement des sondes dans les différents réseaux est auto-diffusif. Il est réduit par l'augmentation de la viscosité et par l'encombrement stérique induit par le réseau de polymère réticulé chimiquement ou non. Par ailleurs, il est apparu clairement que la mobilité des macromolécules du dextran est réduite quand la masse molaire du dextran augmente quel que soit le milieu de diffusion. En revanche, la diffusion n'est pas forcément perturbée par la formation de liaisons chimiques, cela dépend de la taille de la molécule de dextran. Les mesures ont montré que dans les solutions de chitosane le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la masse molaire de la sonde. Ceci suggère une diffusion de type Rouse c'est-à-dire que les interactions hydrodynamiques sont négligeables quelles que soient les masses molaires étudiées. Dans les gels, la diffusion semble mieux décrite par le modèle de Cukier : les écarts entre le modèle et les résultats expérimentaux existent toujours mais sont moins importants que ceux obtenus avec le modèle de Rouse en particulier pour les particules de taille élevée. Le modèle de Cukier décrit la diffusion de particules sphériques dans un milieu poreux en tenant compte des interactions hydrodynamiques. Ce modèle prédit une variation du coefficient de diffusion suivant une exponentielle décroissante en fonction du rayon hydrodynamique de la molécule diffusante.

En résumé, nous avons mis en évidence l'importance relative de chaque paramètre, masse molaire et concentration de chitosane, pH et proportion de POE, dans la modulation de la structure des réseaux de chitosane. Il serait intéressant de faire des mesures de diffusion de neutrons dans des réseaux semi-interpénétrés avec du POE deutéré pour confirmer que les chaînes de POE ne forment pas des microdomaines dans les réseaux de chitosane, mais s'enchevêtrent dans les mailles de ces réseaux. Les données que nous avons obtenues dans ce travail de thèse seront utiles dans le cadre de la production d'hydrogels à libération contrôlée de médicaments. Cependant, au vu de la diffusion rapide des petites molécules telle la caféine

(annexe 3), cette application ne peut être envisagée que pour des molécules de taille élevée telles les protéines (par exemple insuline de masse molaire 6 000 g/mol). Mais, il faudrait alors utiliser un autre agent réticulant qui ne contienne pas de groupements aldéhydes car ceux-ci réagissent avec les protéines et les dénaturent. Récemment, il a été montré que la génipine (une biomolécule) est un bon candidat pour remplacer les aldéhydes comme agent réticulant [Mi (2003)]. Par ailleurs, pour mieux comprendre le mécanisme de diffusion de masse dans les gels de chitosane, il serait judicieux d'étudier l'influence de la concentration en chitosane sur cette diffusion pour des gammes de concentrations plus larges que celle de notre étude. En effet, dans le processus de diffusion dans les réseaux de polymères, la concentration de polymère s'avère en général un paramètre limitant dont les modèles prédisent l'influence.

RÉFÉRENCES :

C. Friedrich, L. Heymann, *Extension of a model for crosslinking polymer at the gel point*, Journal of Rheology, 32(3), 235-241 (1988)

C. Friedrich, L. Heymann, H.R. Berger, *Evolution of time constants during sol-gel transition*, Rheologica Acta, 28, 535-539 (1989)

Fwu-Long Mi , Hsing-Wen Sung, Shin-Shing Shyu, Chia-Ching Su, Chih-Kang Peng, *Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin cocrosslinked chitosan gel beads*, Polymer, 44, 6521–6530 (2003)

Annexe 1

Calcul de la concentration en groupement amine [-NH₂]

Le degré de déacétylation du chitosane : DDA = 83 %.

La masse molaire d'un motif déacétylé : $M_d = 161$ g/mol.

La masse molaire d'un motif acétylé : $M_a = 203$ g/mol.

La masse molaire d'un motif moyen de chitosane compte tenu du degré de déacétylation est donc:

$$M = M_d \cdot 0.83 + M_a \cdot (1-0.83) = 168 \text{ g/mol.}$$

Pour une solution de concentration C_p en chitosane, la concentration en groupement amine du chitosane est :

$$[-\text{NH}_2] = C_p \cdot \text{DDA} / (100 \cdot M) \text{ où } M \text{ est la masse molaire d'un motif moyen}$$

Pour $C_p = 1,2$ % (p/p), $[-\text{NH}_2] = 0,0593$ mol/L.

Calcul de la concentration en glyoxal

Au volume V de solution de chitosane ($V = 5$ ml), on ajoute un volume v de glyoxal ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$) liquide à 40% en poids.

On en déduit la masse molaire, M_{glyoxal} et la concentration molaire de la solution de glyoxal, C_{glyo} :

$$M_{\text{glyoxal}} = 58 \text{ g/mol}$$

$$C_{\text{glyo}} = 6,9 \text{ mol/L}$$

Après ajout de cette solution de glyoxal à la solution de chitosane, la nouvelle concentration en glyoxal est :

$$[\text{glyoxal}] = C_{\text{glyo}} \cdot v/V \text{ avec } v \ll V$$

Une molécule de glyoxal possède deux groupements aldéhyde susceptibles chacun de réagir avec un groupement amine du chitosane.

Dans notre étude, v est égal à 20 μl . La concentration en groupement aldéhyde est donc égale à 0,0552 mol/L.

Annexe 2

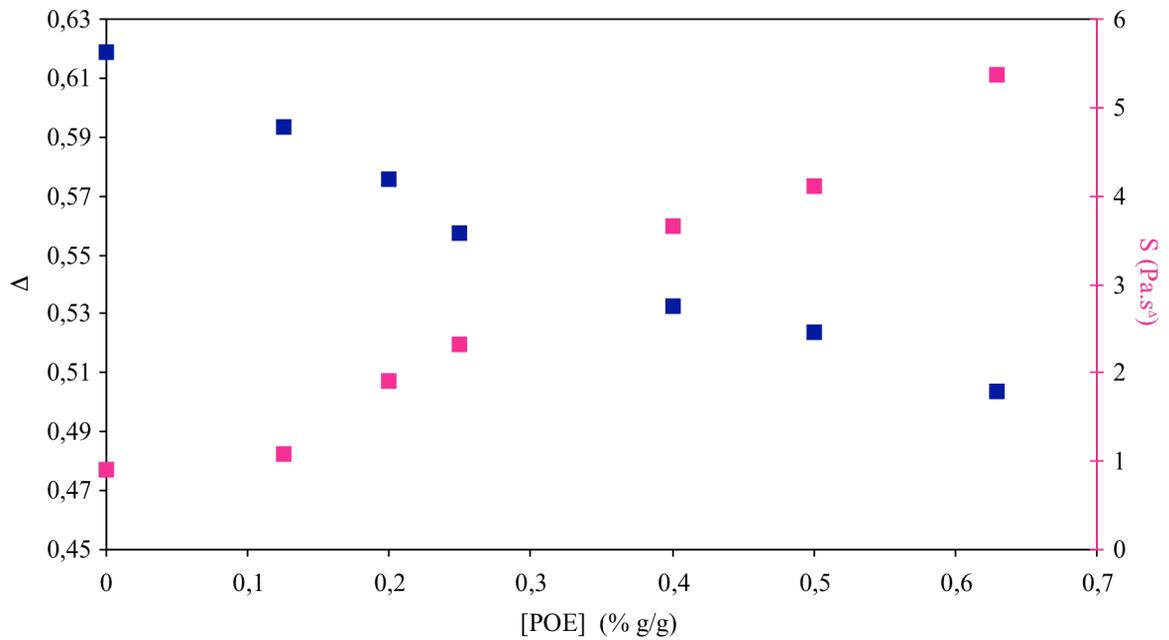


Figure 1. Évolution de l'exposant de relaxation et de l'amplitude de gel en fonction de la concentration en POE pour les réseaux semi-interpénétrés

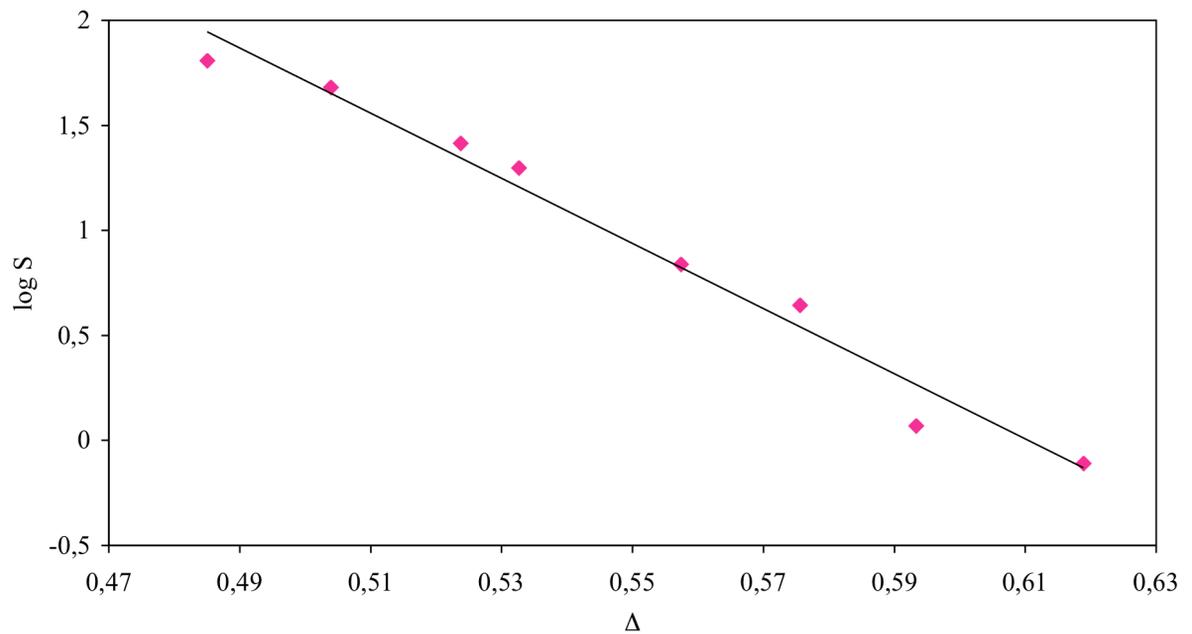


Figure 2. Variation en coordonnées semi-logarithmiques de l'amplitude de gel S en fonction de l'exposant de relaxation Δ déterminé au temps de gélification pour les différentes concentrations de POE ajustée par l'équation Éq III.19

Annexe 3

Pour étudier la diffusion d'un principe actif dans un gel de chitosane, nous avons réalisé, dans le cadre d'une étude préliminaire, une expérience de diffusion gel-gel dans laquelle le milieu récepteur est le même gel initialement non chargé en principe actif. La cellule de diffusion (Figure 1), fabriquée au laboratoire, est en plexiglass et de forme cylindrique (30 cm de diamètre intérieure et 80 cm de hauteur intérieure). Elle est percée de six trous de diamètre 0,4 cm. On coule d'abord sur une hauteur de 5,6 cm une solution de polymère non chargée en principe actif en cours de réticulation. Le gel se forme et est laissé au repos pendant deux jours. Puis, on rajoute sur celui-ci une solution de polymère chargée également en cours de gélification sur une hauteur de 1,3 cm. Les prélèvements (0,2 g environ) se font par carottage au niveau des trous à l'aide de baguette de verre. Les prélèvements sont ensuite laissés dans de l'eau (20 à 50 ml) où la caféine est libérée. On suppose que la concentration de principes actifs dans le gel et dans l'eau est la même après plus de 24 h, vu les volumes mis en jeu et les temps de libération de la caféine dans l'eau [Vachoud (2001)]. La concentration est mesurée après plus de 30 h par dosage en spectroscopie UV à 272 nm. Au préalable une courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la concentration de la molécule a été établie à partir de prélèvements sur des gels de concentration en caféine connue.



Figure 1. Cellule de diffusion gel-gel

Les mesures de concentration du principe actif dans le gel sont analysées dans le cadre théorique de la diffusion d'une molécule dans un milieu homogène semi-infini d'une région de concentration initiale C_0 vers une région de concentration initiale nulle en principe actif. Dans le cas particulier d'une diffusion monodimensionnelle suivant l'axe ox d'un cylindre et compte tenu des conditions initiales :

$$t = 0, 0 < x < a : C(x,t) = C_0 \quad \text{Éq.1}$$

La résolution de l'équation de Fick conduit au profil de concentration suivant :

$$C(x,t) = \frac{1}{2} C_0 \left[\operatorname{erf} \frac{x+a}{2\sqrt{Dt}} + \operatorname{erf} \frac{x-a}{2\sqrt{Dt}} \right] \quad \text{Éq.2}$$

où erf est la fonction erreur et D le coefficient de diffusion.

Nous avons réalisé des mesures de diffusion dans un réseau de chitosane 1M ($C = 1,5\%$ (p/p), $\text{pH} = 4$ voir chapitre III). Les prélèvements ont été effectués à 24h et 48h pour deux cellules différentes. Les variations de concentration en fonction de la distance de prélèvement sont données sur la Figure 2.

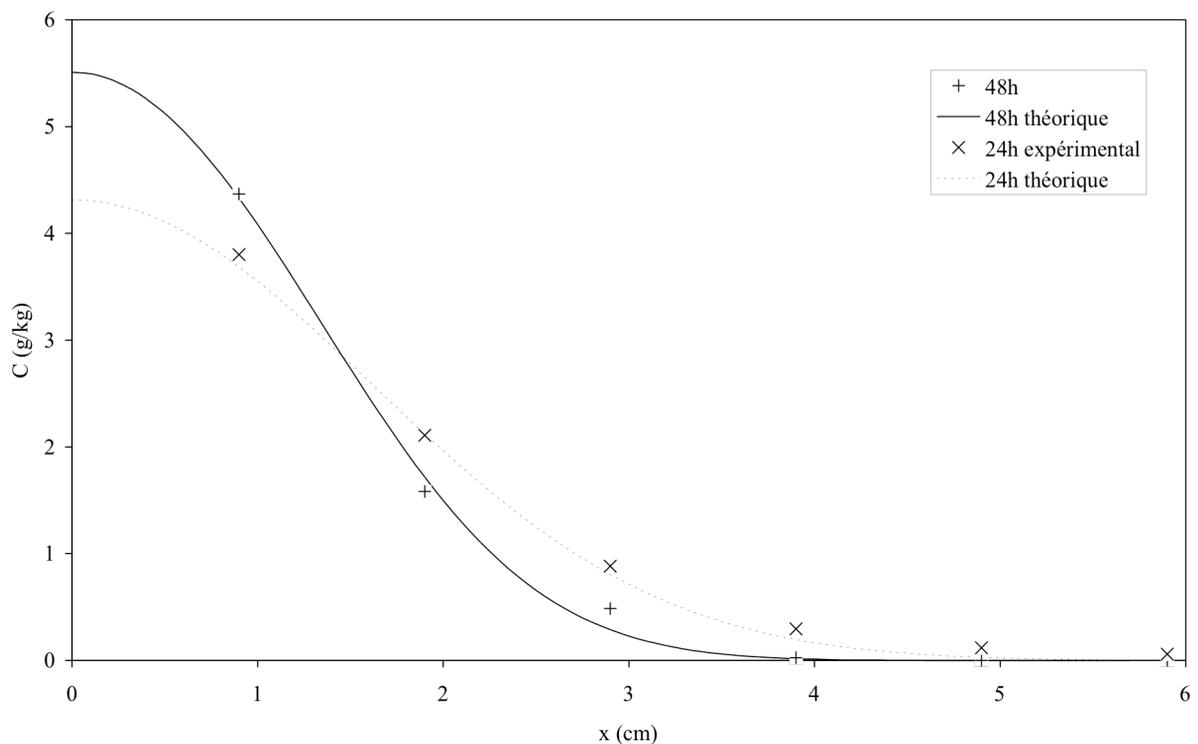


Figure 2 : Profil de concentration de caféine dans un gel de référence pour $M_w = 10^6$ g/mol à $t = 24h$ et $t = 48h$

L'hypothèse de milieu semi-infini est vérifiée pour les deux dates de prélèvement puisque la concentration en caféine à une distance de 5,9 cm est d'environ 0,06 g/kg soit à peu près de

l'ordre de l'incertitude de mesure de la concentration (0,066g/kg). L'ajustement des données expérimentales par l'équation Éq.2 permet de calculer les valeurs des coefficients de diffusion de la caféine : $D = 5,1.10^{-6} \pm 0,3.10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour 24 h et $D = 5,5.10^{-6} \pm 0,3.10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour 48 h. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celle qui a été calculée pour la diffusion de la caféine dans l'eau pure à 25°C à partir de l'équation de Stokes-Einstein ($D = 5,9.10^{-6} \pm 0,1.10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) [Wilke (1955), Origlia-Luster (2002)]. D'autre part ces valeurs concordent avec celles qui ont été obtenues dans l'étude de diffusion en fonction de la taille de la molécule pour les hydrogels formés de poly(acide méthacrylique) et de poly(éthylène glycol) [Bell (1996)]. Le ralentissement de la diffusion de la caféine n'est donc pas notable dans un gel de chitosane par rapport à la diffusion dans l'eau.

RÉFÉRENCES :

C. L. Bell, N. A. Peppas, *Water, solute and protein diffusion in physiologically responsive hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol)*, *Biomaterials*, 17, 1203-1218 (1996)

M. L. Origlia-Luster, B. A. Patterson, E. M. Woolley, *Thermodynamics for self-association of caffeine in water: apparent molar volumes and apparent molar heat capacities of aqueous caffeine at temperatures from 278.15 to 393.15K and at the pressure 0.35MPa*, *Journal of Chemical Thermodynamics*, 34, 1909-1921 (2002)

L. Vachoud, N. Zydowicz, A. Domard, *Sorption and desorption studies on chitin gels*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 93-101 (2001)

C. R. Wilke, P. Chang, *Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions*, *American Institute of Chemical Engineers*, 1, 264-270 (1955)

Annexe 4

Le dispositif expérimental du FRAP par réseau de franges est représenté sur la Figure 1.

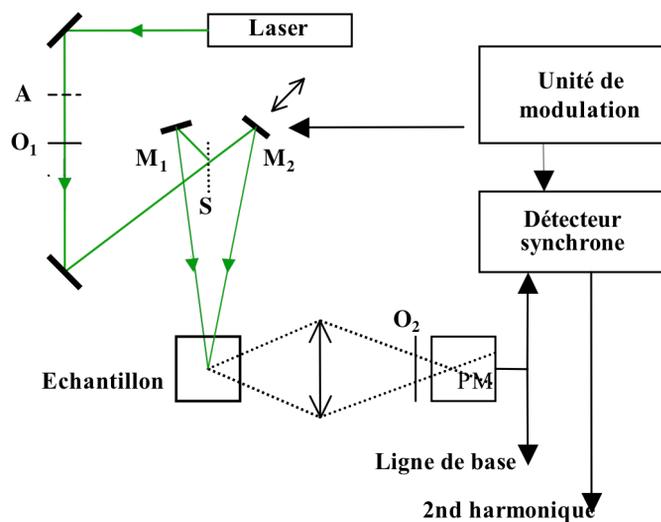


Figure 1. Représentation schématique du dispositif optique et électronique [Davoust (1982)]

La source d'émission lumineuse est un laser à argon ionisé. L'intensité du faisceau incident est modulée par déplacement sous contrôle électronique d'un atténuateur A constitué d'un filtre. O₁ est un obturateur contrôlé par ordinateur. La lame séparatrice S permet de diviser le faisceau laser initial en deux. L'interféromètre est constitué des miroirs M₁ et M₂. S, M₁ et M₂ sont réglés de telle sorte que les faisceaux se recombinent dans l'échantillon. Le déplacement du miroir M₂, monté sur une céramique piezoélectrique, dans la direction normale à sa surface permet la modulation de la position spatiale. Le déplacement latéral du porte-échantillon est contrôlé par ordinateur pour faire successivement des mesures à différentes positions dans le gel. Le photomultiplicateur PM (construit au Collège de France) est constitué d'une lentille pour enregistrer la fluorescence et d'un obturateur O₂ qui protège le PM pendant la photolyse. L'unité de modulation (également construite au Collège de France) contrôle les obturateurs, l'atténuateur, le déplacement du miroir M₂ et le déplacement du porte-échantillon. Enfin, le signal provenant du PM est traité par le détecteur synchrone programmé pour fournir la seconde harmonique du signal de fluorescence et un oscilloscope digital (non représenté sur le schéma) pour le filtrage et le redressement du signal.

L'expérience de diffusion est menée de la manière suivante. Durant la première étape (détermination du signal de base), A est en position d'atténuation de l'intensité lumineuse, O₁ et O₂ sont ouverts. Pendant la seconde étape (la photolyse), A laisse passer complètement le

faisceau, O₁ est ouvert et O₂ est fermé. La durée de la photolyse peut varier d'une expérience à l'autre. Elle ne doit pas être trop courte pour avoir un profil de concentration suffisamment important et ainsi un signal exploitable. Mais elle est limitée aussi par le temps caractéristique de la diffusion. Elle doit être au moins deux fois supérieure à τ pour pouvoir observer le recouvrement de fluorescence. Dans notre étude, elle varie de 50 à 200 ms. Finalement, pour enregistrer le signal de recouvrement, A est de nouveau en position d'atténuation et O₁ et O₂ sont ouverts. La modulation est maintenue pendant l'enregistrement des signaux de base et de recouvrement. Elle est éteinte pendant la photolyse. La fréquence de modulation est limitée par le temps caractéristique de diffusion de l'échantillon et surtout par les signaux parasites de basses fréquences. Elle est fixée à 6421 Hz et l'amplitude de modulation est 680 mV. Le détecteur synchrone et l'oscilloscope traitent le signal de fluorescence issu du PM durant l'expérience.

RÉFÉRENCE :

J. Davoust, P. F. Devaux, L. Léger, Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules, *The EMBO Journal* 1, 10, 1233-1238 (1982)

Résumé :

Dans ce travail, nous présentons une étude de biogels à base de chaînes de chitosane (polyélectrolyte naturel de la famille des polysaccharides) réticulées chimiquement en solution aqueuse. Notre objectif est double : caractériser la structure de ces gels et comprendre comment s'y déroule la diffusion de masse. À partir de mesures de spectroscopie mécanique, nous avons montré que l'on pouvait moduler la cinétique de formation et la structure de ces hydrogels en fonction de la masse molaire et la concentration de chitosane, du pH et de la teneur en POE (polyoxyéthylène). Ces résultats ont été confirmés par la détermination de la longueur de corrélation entre points d'enchevêtrements des hydrogels à l'aide de mesures de diffusion de neutrons aux petits angles. Nous avons ensuite étudié la diffusion de macromolécules fluorescentes de dextran en fonction de leur masse molaire dans les réseaux de chitosane réticulé ou non-réticulé à l'aide de la technique de recouvrement de fluorescence après photolyse par réseau de franges (FRAP). L'évolution du coefficient de diffusion avec la masse molaire de dextran en loi de puissance avec un exposant -1 dans les solutions de chitosane a permis de proposer une diffusion de type Rouse. Dans les gels de chitosane, nous avons clairement mis en évidence le passage entre une diffusion semblable à celle dans les solutions et une dynamique bloquée à partir d'une masse molaire critique de dextran.

Abstract :

In this work, we study biogels of chemically crosslinked chitosan coils - a natural polyelectrolyte in the family of polysaccharides - in water. We have two related goals : characterizing the structure of the gels and understanding mass transport in it. Using mechanical spectroscopy measurements, we show that we can change the kinetics of formation and the structure of those hydrogels, according to the molecular weight and concentration of chitosan, the pH and the POE (polyoxyethylene) concentration. These results are confirmed by determining the correlation length between entanglement points of the hydrogel using neutron diffusion at small angles. We then study the diffusion of fluorescent dextran macromolecules according to their molecular weight in crosslinked and uncrosslinked chitosan using fluorescence recovery after photobleaching by interference pattern (FRAP). Noticing that the diffusion coefficient versus the molecular weight of dextran is a power law of exponent -1, we suggest a Rouse type diffusion. In chitosan gels, we clearly establish a difference between a solution type diffusion and a blocked dynamics when the molecular weight of dextran reaches a critical value.