



**HAL**  
open science

# Elaboration et caractérisation de microsphères hybrides kappa-carraghénane/silice

Michel Boissiere

► **To cite this version:**

Michel Boissiere. Elaboration et caractérisation de microsphères hybrides kappa-carraghénane/silice. Matériaux. Université Montpellier I, 2004. Français. NNT : . tel-00011426

**HAL Id: tel-00011426**

**<https://theses.hal.science/tel-00011426>**

Submitted on 19 Jan 2006

**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.

**UNIVERSITE DE MONTPELLIER I**

*Unités de formation et de recherche pharmaceutiques*

# **Elaboration et caractérisation de microsphères hybrides kappa- carraghénane/silice**

Thèse présentée pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I**

ECOLE DOCTORALE : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (EDA 168) CBS<sup>2</sup>  
FORMATION DOCTORALE : Interface chimie-biologie. Systèmes moléculaires à visée  
thérapeutique.

N° DISCIPLINE : 50

N° DE SECTION DU CNU : 39<sup>ème</sup>

SPECIALITE : Sciences physico-chimique et technologique pharmaceutique

**Par**

**Michel BOISSIERE**

Soutenue le 10 septembre 2004

**JURY :**

Professeur J.P.BENOIT, Université ANGERS, **Rapporteur**

Professeur J.M. DEVOISSELLE, Université MONTPELLIER I, Directeur de thèse

Professeur S. GUILBERT, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de MONTPELLIER

Professeur J. LIVAGE, Collège de FRANCE, **Rapporteur**

Professeur F.RODRIGUEZ, Université TOULOUSE

Ce travail a été effectué au laboratoire des matériaux catalytique et catalyse en chimie organique UMR 5618 UM1 et UM2. Je tiens à remercier très vivement le directeur Bernard COQ de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour cette thèse.

Je remercie Monsieur S.GUILBERT, professeur à l'école nationale supérieure agronomique de MONTPELLIER d'avoir présidé le jury de cette thèse.

Je suis très reconnaissant envers les membres du jury d'avoir accepté de considérer ce travail :

Professeur J.P.BENOIT, Université ANGERS,

Professeur J.M. DEVOISSELLE, Université MONTPELLIER I, Directeur de thèse

Professeur J. LIVAGE, Collège de FRANCE,

Professeur F.RODRIGUEZ, Université TOULOUSE

J.P. Benoît et J. LIVAGE ont bien voulu être rapporteurs de ce travail ; je les en remercie vivement.

J'exprime ma profonde gratitude à J.M. DEVOISSELLE, pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant cette étude. L'intérêt qu'il a porté à mon travail, tout au long de son évolution, a été un encouragement des plus efficaces. Ses qualités scientifiques et humaine ont fait de ce travail un divertissement quotidien et passionnant, merci Jean-Marie.

Que Françoise QUIGNARD sans qui les choses n'auraient pas été, trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance. Je lui suis reconnaissant pour m'avoir fait confiance et m'avoir donné l'opportunité de m'investir dans une voie peu développée au laboratoire, la synthèse de matériaux à partir de polysaccharides.

Au cours de ma thèse, j'ai particulièrement apprécié les discussions avec F. DI RENZO. Il m'a appris, que face à la complexité des systèmes, il était parfois utile d'oublier un peu la chimie pour pouvoir se faire une représentation simple des objets que l'on traite. J'ai tenté de me prêter au jeu, d'autant plus volontiers, que j'y étais invité par un savant.

Je tiens également à remercier Daniel Brunel. Son aide m'a été très précieuse tout au long des trois années passées au laboratoire. Une culture scientifique immense, curiosité et ouverture d'esprit à des problèmes de tous ordres, gentillesse et affabilité ne suffisent pas pour décrire cet homme.

Je ne saurais oublier toute l'équipe du labo de pharma, je pense bien sûr à Monsieur DELONCA, Madame MAIHOLS, Jean-Pierre, Jean-Paul pour m'avoir appris une multitude de petits trucs informatique, Gilberte, Renée et Françoise un trio indissociable, toutes trois d'une grande gentillesse, ainsi que Sylvie et Corinne qui m'ont fait l'amitié de me supporter lors des GTRV passés ensemble.

Madame SOULAS notre secrétaire de charme pour avoir mis un peu de fraîcheur dans le laboratoire et pour m'avoir aidé à affronter les corvées administrative.

Je tiens tout particulièrement à associer l'aboutissement de ce travail mademoiselle Sophie GIROD maître de conférence à toulouse. Ce fût une réelle joie de partager sa passion pour la recherche. Je lui suis reconnaissant pour avoir su communiquer ses connaissances scientifiques, pour sa compétence et sa constante disponibilité et ce malgré son départ précipité. Nos discussions ont toujours été productives et sa patience exemplaire.

Je tiens enfin à exprimer mes remerciements à mon ami Pradial pour son dévouement et son habileté pour résoudre tous les tracas techniques du laboratoire.

Pour n'oublier personne, je vais adresser un grand merci collégial pour leur générosité quotidienne. Voici les prénoms en bouquet : les Philippe, Romain, les Nicolas, Audrey, Carolina, Hugo, Olivier, Karine, Christine, Markus, Daisy, Jean-Marie, Pierre-Marie, Julien, Anne, Marie-France, Hélène, Claudette, Paul, David, Ramzy, Cathy, Christophe, Julio, Jorge, Salah, Jocelyne

**A**  
**Mes parents**  
**Ma sœur**  
**Mes grands parents**  
**et**  
**Mon épouse**

# **SOMMAIRE**

1	Introduction générale .....	1
---	-----------------------------	---

## PARTIE I :BIBLIOGRAPHIQUE

I.	LES MICROSPHERES .....	3
1	Introduction.....	3
2	Généralités .....	3
3	Formation de particules par polymérisation : .....	5
3.1	La polymérisation en suspension .....	6
3.2	Polymérisation en émulsion.....	7
3.3	Polymérisations en précipitation et dispersion .....	8
4	Formation de particules par gélification .....	10
4.1	Généralités et intérêts .....	10
4.2	Procédés de formation de particules par gélification .....	11
5	formation de particules par polycondensations.....	13
5.1	Particules de gel de silice .....	14
5.2	Microbilles de silice .....	15
5.2.1	<i>Gélification suspension .....</i>	<i>15</i>
5.2.2	<i>Polycondensation suspension .....</i>	<i>15</i>
5.2.3	<i>Microencapsulation.....</i>	<i>16</i>
5.2.4	<i>La pulvérisation séchage .....</i>	<i>16</i>
5.2.5	<i>Polymérisation de gouttes de monomères extrudées.....</i>	<i>17</i>
6	Conclusion .....	17
II.	LES HYDROGELS : .....	19
1	Généralités .....	19
1.1	Définition d'un gel.....	19
1.2	Classification.....	21
1.2.1	<i>Formation des gels physiques.....</i>	<i>22</i>
1.2.2	<i>Techniques courantes d'étude des hydrogels : .....</i>	<i>24</i>
III.	LES CARRAGHENANES .....	26
1	Obtention des carraghénanes et composition chimique.....	26
2	La transconformation pelote-hélice dans les solutions diluées et dans les gels.....	30

3	Formation du gel et structure .....	34
4	La synérèse.....	37
5	Influence de différents paramètres physico-chimiques sur le comportement des carraghénanes.....	37
5.1	Influence de la concentration .....	38
5.2	Influence de la température.....	38
5.3	Influence du temps .....	39
5.4	Effet des ions sur la transconformation .....	39
6	Conclusion .....	42
<b>IV. LES MATERIAUX HYBRIDES :</b> .....		<b>43</b>
1	Introduction.....	43
2	La synthèse sol-gel.....	43
2.1	Mécanisme réactionnel .....	44
2.1.1	<i>Une réaction d'hydrolyse :</i> .....	44
2.1.1.1	Influence du pH sur l'hydrolyse .....	45
2.1.1.2	D'autres paramètres influencent l'hydrolyse : .....	46
2.1.2	<i>Des réactions de polycondensation :</i> .....	46
2.2	Croissance des particules et influence du milieu sur le mécanisme .....	48
3	Materiaux hybrides organique/inorganique .....	50
3.1	Supports polymériques synthétiques .....	50
3.2	Supports polymériques naturels ou biomimétiques. ....	52
3.2.1	<i>Hybrides protéines/silice.</i> .....	53
3.2.1.1	Hybrides protéines naturelles/silice. ....	53
3.2.1.2	Hybrides protéines synthétiques/silice. ....	54
3.2.2	<i>Hybrides polysaccharides/silice.</i> .....	55
3.2.2.1	Hybrides alginate/silice.....	55
3.2.2.2	Hybrides chitosan/silice .....	57
3.2.2.3	Hybrides carraghénane/silice.....	59
3.2.2.4	Hybrides combinaison polysaccharides/polyélectrolyte/silice.....	60
4	Conclusion .....	61

## PARTIE II : EXPERIMENTALE

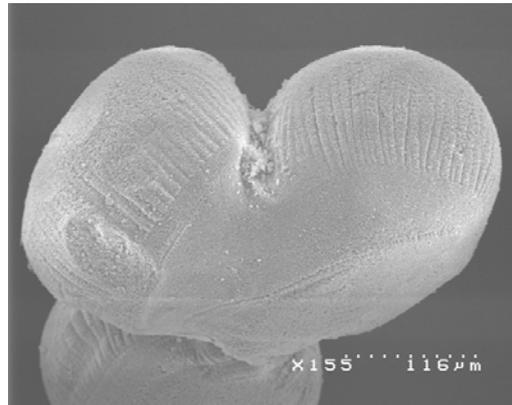
I. TECHNIQUES DE CARACTERISATION :	63
------------------------------------	----

1	Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	63
2	Microanalyse électronique par rayons X (MEB + microsonde) .....	64
3	Granulométrie laser.....	65
4	Microscopie optique à fluorescence.....	67
5	Microscopie confocale .....	69
6	Mesure de la surface spécifique par adsorption N <sub>2</sub> .....	72
6.1	Calcul de la surface spécifique : la théorie BET .....	73
6.2	Calcul de la surface – Courbe t .....	76
6.2.1	<i>Isotherme de référence expérimentale pour le tracé de la courbe t</i> .....	77
6.2.2	<i>Courbe de référence théorique pour le tracé de la courbe t</i> .....	77
6.2.3	<i>Utilisation de la courbe t</i> .....	78
6.3	Conclusion .....	78
7	Analyse thermogravimétrique ATG : .....	78
<b>II. ELABORATION DE MICROSPHERES : .....</b>		<b>80</b>
1	Fabrication des billes de $\kappa$ -carraghénane.....	81
1.1	introduction .....	81
1.2	Matériels et méthodes.....	81
1.2.1	<i>Produits</i> .....	81
1.2.2	<i>Formation des microbilles de gel</i> .....	82
1.2.2.1	Extrusion.....	82
1.2.2.2	Recouvrement des microbilles par une couche de PLL .....	83
1.2.2.3	Séchage par lyophilisation .....	83
1.2.2.4	Séchage en milieu CO <sub>2</sub> super-critique .....	83
1.2.3	<i>Caractérisation des microbilles</i> .....	85
1.2.3.1	Examens morphologiques et texturaux des matériaux.....	85
1.2.3.2	Mesure de la vitesse de gonflement .....	86
1.2.3.3	Localisation de la poly-L-lysine sur les microsphères de $\kappa$ -carraghénane.....	87
1.3	Résultats et discussion.....	87
1.3.1	<i>Extrusion des microbilles</i> .....	87
1.3.2	<i>Maturation des microbilles</i> .....	88
1.3.3	<i>Comparaisons des cryogels et aérogels de <math>\kappa</math>-carraghénane</i> .....	89
1.3.4	<i>Effet du recouvrement des microsphères par la PLL</i> .....	93
1.3.4.1	Examens morphologique et textural des microsphères revêtues de PLL .....	93
1.3.4.2	Mesure de la surface spécifique.....	94
1.3.4.3	Microscopie de fluorescence optique confocale .....	95
1.3.4.4	Mesure du gonflement.....	95
1.4	Conclusion .....	97

2	Elaboration de microsphères hybrides organique/inorganique.....	98
2.1	introduction .....	98
2.2	Matériels et méthodes.....	99
2.2.1	<i>Produits</i> .....	99
2.2.2	<i>Elaboration des microsphères hybrides</i> .....	100
2.2.2.1	Extrusion.....	100
2.2.2.2	Mélange réactionnel.....	100
2.2.2.3	Agitation .....	100
2.2.2.4	Séchage.....	101
2.2.3	<i>Caractérisation des microsphères hybrides</i> .....	101
2.3	Résultats et discussion.....	102
2.3.1	<i>Influence du précurseur silicique</i> .....	102
2.3.1.1	Etude morphologique.....	102
2.3.1.2	Analyses thermogravimétriques.....	110
2.3.1.3	Analyses volumétriques .....	113
2.3.1.4	Conclusion .....	115
3	Etude de l'influence des divers paramètres liés à la condensation de la silice sur la synthèse de microsphères hybrides.....	117
3.1	Objectifs .....	117
3.2	Hybrides carraghénanes/silice .....	118
3.2.1	<i>Influence du catalyseur d'hydrolyse-condensation NaF versus KF sur la composition des hybrides</i> .....	118
3.2.2	<i>Synthèse catalysée par NaF en milieu saturé en KCl</i> .....	123
3.2.3	<i>Influence du catalyseur d'hydrolyse-condensation NaF versus KF sur la morphologie et la texture des hybrides</i> .....	128
3.3	Hybrides carraghénane/PLL/Silice .....	131
3.3.1	<i>Influence du rapport TEOS/H<sub>2</sub>O sur les propriétés morphologiques des microsphères</i> .....	131
3.3.2	<i>Conclusion</i> .....	138
4	Synthèse de microsphères hybrides à partir de mélange de précurseurs silicique mixte et homodesmique.....	139
	III. CONCLUSION GENERALE .....	143
	IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	145
	V. ANNEXES .....	153
	Annexe A .....	153

Annexe B .....	154
1 Les différentes isothermes de physisorption :.....	154
2 Les différents types d'hystérésis dans les isothermes d'adsorption/désorption selon De Boer : .....	155
3 Les différents types d'hystérésis dans les isothermes d'adsorption/désorption selon l'IUPAC : .....	156

# INTRODUCTION GENERALE



# 1 Introduction générale

Les matériaux hybrides "organique-inorganique" représentent actuellement un gros potentiel de travaux. Ils sont l'objet d'un intérêt immense, en permettant d'allier à la fois certaines propriétés d'un matériau inorganique, et certaines propriétés d'un polymère. Cette symbiose entre deux mondes de la chimie trop longtemps considérés comme antagonistes peut aussi amener à des propriétés complètement nouvelles et ouvre un vaste champ d'investigations pour le chimiste. Les applications de ces matériaux "nouveaux" couvrent des champs aussi variés que les propriétés de résistance mécanique, l'optique, l'électronique et l'ionique du solide et biomatériaux. Parmi ces domaines d'applications, nombreux sont ceux qui sont susceptibles d'utiliser des matériaux hybrides sous forme de microparticules sphériques de taille homogène présentant une mésoporosité. C'est pourquoi mon travail de thèse aura comme objectif de fabriquer des microsphères hybrides kappa-carraghénane/silice présentant ces caractéristiques morphologiques et texturales. Pour cela nous utiliserons des microsphères de kappa-carraghénane comme objet structurant « template ».

Dans la partie bibliographique nous nous sommes attachés à décrire les techniques et procédures les plus couramment employées pour l'élaboration de microsphères. La majorité de ces procédures ont été développées pour la synthèse de microsphères à base de polymères synthétiques. Cependant toutes ces techniques seront utilisables pour l'élaboration de microsphères de k-carraghénane moyennant quelques adaptations.

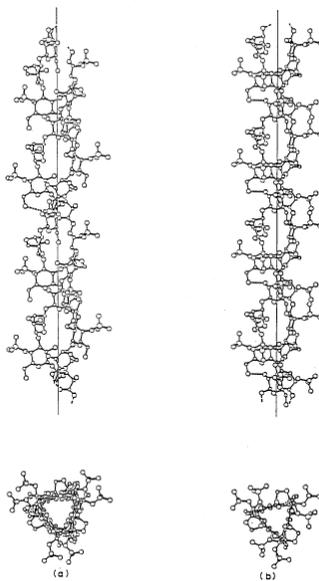
Les billes ou microsphères sont typiquement formées dans une procédure en deux étapes impliquant dispersion et durcissement. Nous décrirons chacune de ces procédures et réunirons ces descriptions dans un chapitre nommé LES MICROSPHERES.

L'étude des propriétés de gélification du k-carraghénane seront décrites dans les deux chapitres qui suivent. Ceci nous permettra d'adapter la procédure d'élaboration des microsphères aux propriétés physico-chimiques du k-carraghénane. Par la suite nous étudierons et relaterons dans un chapitre nommé LES MATERIAUX HYBRIDES, les

travaux de synthèses de matériaux hybrides sur les-quels nous nous sommes appuyés pour élaborer des nouveaux matériaux hybrides.

Dans la partie expérimentale il sera présenté les stratégies de synthèses des différentes particules hybrides. Nous décrirons comment à partir de microsphères de k-carraghénane revêtues ou non d'un polyélectrolyte de charge opposée (poly-L-lysine) nous pourrions contrôler la morphologie des particules hybrides. L'influence sur la morphologie de la source silicique, la force ionique et du catalyseur présent dans le milieu réactionnel sera également étudiée.

# PARTIE I : BIBLIOGRAPHIQUE



# I. Les microsphères

---

## 1 Introduction

Historiquement la recherche sur les microsphères a débuté dans les années 20 du siècle précédant dans le domaine biomédical. Les premiers scientifiques à se pencher sur le problème n'ont pas découvert le concept mais l'ont seulement emprunté à la nature qui produit des microsphères depuis des millions d'années. A partir de 1946, lorsqu'a débuté la recherche sur la synthèse de polymères synthétiques, la préparation de particules par polymérisation en émulsion et suspension a été systématiquement étudiée. Les années 60 ont vu émerger les premières études de préparation de microsphères à base de polymère naturel ou extrait de substances naturelles, comme les microsphères de gel d'agarose (chromatographie). Toutes ces études ont mené à différents modes de préparation et ce chapitre est destiné à donner l'état de l'art sur les divers procédés employés à l'élaboration des microsphères.

## 2 Généralités

Les microsphères peuvent être appelées billes ou microbilles, suivant le procédé de fabrication. Les microsphères sont souvent décrites comme étant des objets sphériques uniformes du cœur à la surface de taille comprise entre 20 nm et 2000  $\mu\text{m}$ , composées de un ou plusieurs matériaux polymériques. Les microcapsules sont sensiblement similaires aux microsphères, mais elles sont constituées d'une substance

cœur comprenant le composé actif et d'une matrice polymère formant une capsule ou paroi (barrière protectrice ou excipient). Les microsphères sont préparées soit à partir de molécules inorganiques et/ou organiques se présentant sous forme de monomères, soit à partir de polymères d'origine naturelle, semi synthétique ou synthétique. Elles sont fabriquées par une large variété de techniques de polymérisation que nous allons détailler par la suite. Ces nombreuses méthodes donnent naissance à des microsphères de taille, forme, texture (porosité et surface spécifique), structure (réseau, rigidité), différentes. Les microsphères préparées peuvent présenter des propriétés spécifiques soit par elles même, ou bien par le jeu d'encapsulation de molécules ou particules présentant ces propriétés (fluorescence, radioactivité ou magnétisme) avec des degrés de porosité variables et des coefficients de diffusion différents.

La préparation de microsphères polymériques est usuellement décrite en terme de procédé de formation (suspension, émulsion, dispersion, précipitation) ou par les matériaux précurseurs (monomères ou polymères). (Figure 1).

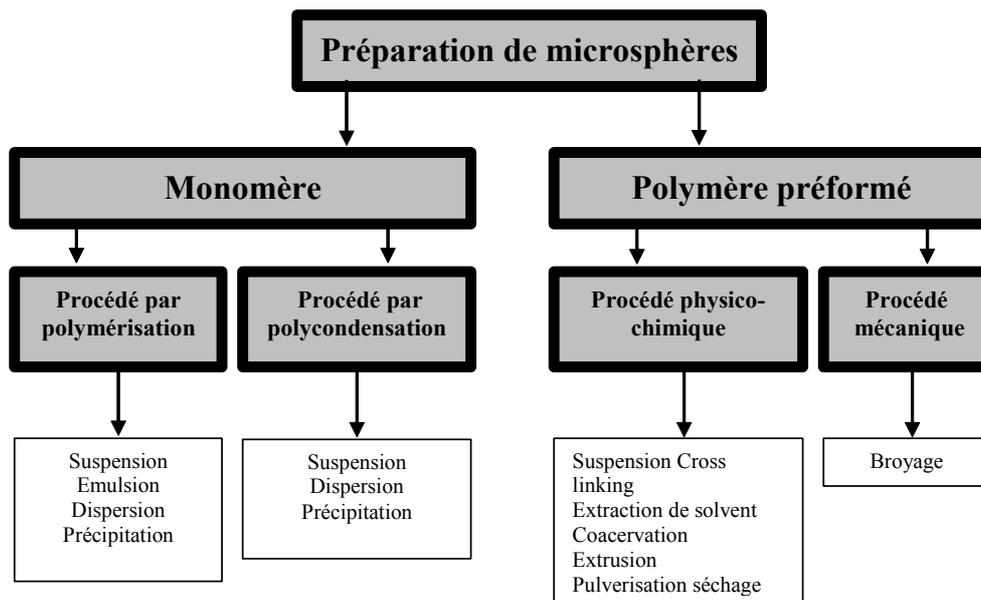


Figure 1 : Méthodes de fabrication des microsphères. [1]

Le terme polymérisation est utilisé pour décrire la formation de chaînes polymères par croissance et réaction de monomères tels que les styrènes et acrylamides. La polycondensation réfère à la formation de chaîne polymérique par croissance et réaction de monomères bi-fonctionnels tels que les acides amino-caproïque, diacide avec diamine, phénols avec les formaldéhydes et diisocyanates avec les diols.

### 3 Formation de particules par polymérisation :

Les mélanges permettant de former des particules par polymérisation sont usuellement des systèmes biphasiques, comprenant les précurseurs (monomères) et/ou le polymère résultant de la réaction. Ce mélange se présente sous forme d'une fine dispersion dans le cas où il y a non miscibilité des liquides dans le milieu. Le produit amorceur de la polymérisation peut être soluble dans le monomère ou le liquide non miscible, et il peut ou ne pas être présent dans les particules polymériques durant leur formation. En plus des monomères et de l'amorceur de polymérisation, un ou plusieurs additifs peuvent être ajoutés au milieu réactionnel. Ces additifs peuvent servir à la dispersion du monomère ou à la stabilisation de gouttes de polymère issues de la polymérisation.

Il y a quatre différentes techniques employées pour la fabrication de particules par polymérisation (Figure 1) [2]. Elles sont désignées par les termes « émulsion » et « suspension » en fonction de la taille des particules produites. Le procédé de polymérisation où apparaissent des précipités polymériques est appelé « polymérisation par précipitation ». Le mot « dispersion » est utilisé pour décrire en général les dispersions liquide/solide, mais aussi pour les procédés qui peuvent être assimilés comme « polymérisation par précipitation stabilisée ».

Autrement dit, la distinction entre les termes suspension, émulsion, précipitation, et dispersion sont très vagues, et pas toujours adéquats pour décrire les différents procédés de polymérisation.

**Arshady** [2] a récemment suggéré que les termes « suspension », « émulsion », « dispersion » et « précipitation » peuvent être clairement distingués en se basant sur quatre critères.

- L'état initial du mélange de polymérisation.
- La cinétique de polymérisation.
- Le mécanisme de formation des particules.
- La forme et la taille des particules.

La figure 2 illustre la différence entre ces procédés en fonction de leur cinétique et de la taille des particules obtenues.

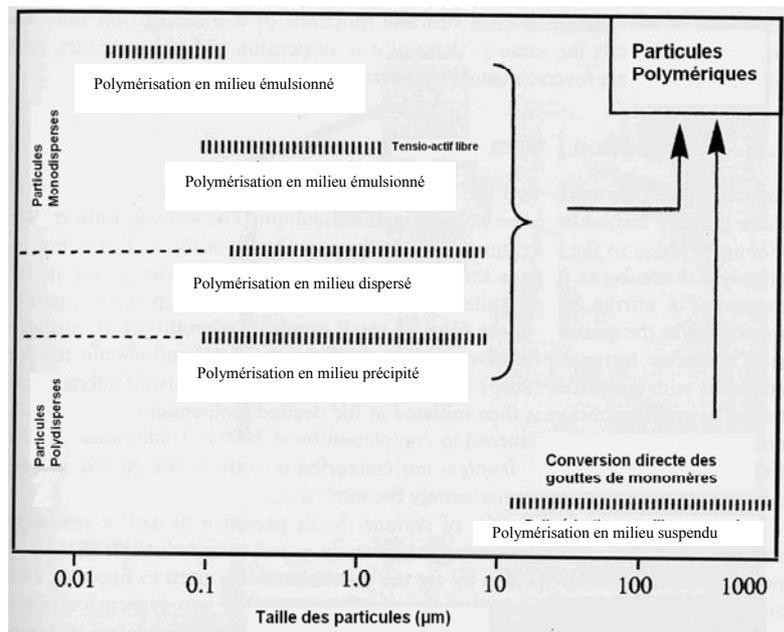


Figure 2 : Différents procédés de fabrication de particules en fonction de leur gamme de taille et de leur cinétique. [1]

### 3.1 La polymérisation en suspension

Dans la polymérisation en suspension, [3, 4] l'amorceur est soluble dans le monomère et ils sont tous les deux insolubles dans le milieu de polymérisation. Le monomère, au moyen d'un agitateur et d'un agent de suspension (stabilisateur) approprié est suspendu dans le milieu sous forme de petites gouttelettes (microgouttes). L'agent stabilisateur forme une couche ou film protecteur autour des gouttes. Mais celui-ci ne peut pas être assimilé à un agent émulsifiant (tensio-actif) qui a un rôle différent dans la polymérisation en émulsion. Souvent la polymérisation est activée par un effet thermique (20-100°C), et ainsi laissée à une température constante jusqu'à un accomplissement total de la polymérisation. Dans ces conditions, les microgouttes de monomère sont converties directement en microsphères polymériques de taille sensiblement identique.

Ce procédé est utilisé pour la fabrication de microsphères de polystyrène en présence d'amorceur comme les peroxydes, avec des agents stabilisateurs hydrophiles comme

les polyvinyl-alcool (PVA) ou polyvinylpyrrolidone (PVP) qui sont de loin les plus utilisés pour des suspensions huile dans eau H/E [5]. A l'inverse, de nombreuses particules sont synthétisées dans des suspensions eau dans huile E/H, les acrylamides solubles dans l'eau et certains acrylates ont récemment servi à la préparation de microsphères par copolymérisation avec des bisacrylamides [6]. Pour stabiliser ces suspensions, l'ethylcellulose, l'acétate de cellulose et différents oligomères amphiphiles tels que le *span* et le *tween* sont utilisés.

Les difficultés principales de cette technique de préparation de microparticules résident dans le choix de l'agent stabilisateur, du mode d'agitation, de la forme du réacteur et de toutes les opérations qui gouvernent la stabilité de la suspension. En pratique, tous ces paramètres restent difficiles à contrôler.

### 3.2 Polymérisation en émulsion

Dans la plupart des cas le monomère est insoluble dans le milieu de la polymérisation, il est donc émulsionné à l'aide d'un tensioactif. Ainsi le monomère se présente sous forme de gouttes (1-10  $\mu\text{m}$ ) avec un recouvrement micellaire (0,05-0,1  $\mu\text{m}$ ) dépendant de la nature du tensioactif et de sa concentration. L'amorceur est introduit dans le milieu mais n'est pas présent dans les gouttes de monomère. Donc, l'état initial du mélange de polymérisation en émulsion est très différent de celui de la polymérisation en suspension ce qui implique un mécanisme de formation des particules complètement différent [7, 8].

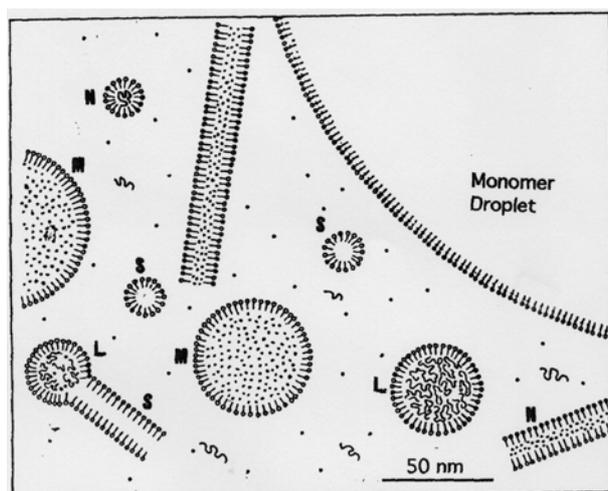


Figure 3 : Illustration schématique des différents objets présents dans le milieu de polymérisation : M, micelles contenant des monomères ; S, micelles ; N, molécules de polymère ; L, particules en croissance ; •, monomères ;  $\Lambda$ , macroradicaux en croissance. [1]

La polymérisation est activée à une température comprise entre 40 et 80°C. Au départ de la réaction le milieu contient de nombreux objets différents (Figure 3) qui vont s'organiser et former des particules de polymère entourées de tensioactif. Ainsi, après une période de croissance/nucléation jusqu'à épuisement des monomères présents dans le milieu, les particules peuvent atteindre une taille comprise entre 50 et 300  $\mu\text{m}$ . Autrement dit le développement des particules et leur croissance dépendent fortement des conditions de polymérisation, dont la température, la concentration en monomère, l'amorceur de la réaction ainsi que la nature de l'émulsifiant [7, 8]. Dans le cas des émulsions huile dans eau H/E (styrène ou méthyl méthacrylate dans l'eau), le peroxydisulfate de potassium et le dodécylsulfonate de sodium sont communément utilisés respectivement comme amorceur et émulsifiant. Dans certains cas, des émulsifiants ioniques et non-ioniques sont combinés. Par exemple le dodécylsulfonate de sodium et le triton X-100. Un exemple courant d'émulsion polymérisation eau dans l'huile E/H est la polymérisation des acrylamides en présence de peroxyde de benzoyle comme amorceur.

### 3.3 Polymérisations en précipitation et dispersion

Dans la précipitation polymérisation, le mélange de la réaction est initialement homogène.

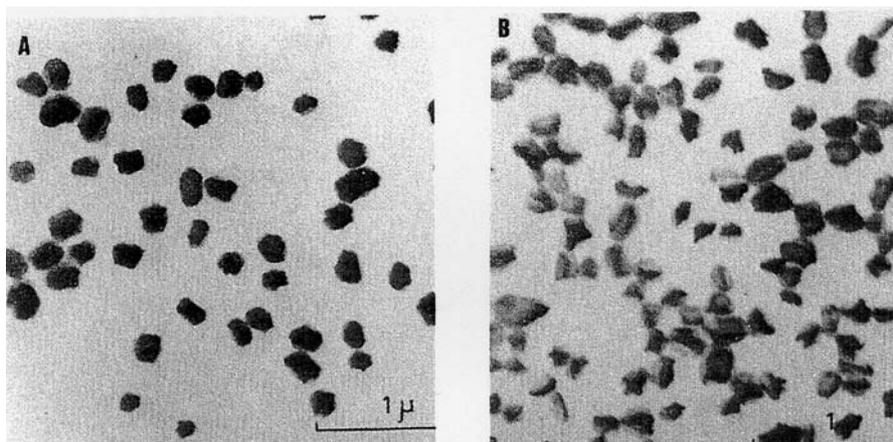


Figure 4 : Exemples de particules obtenues par précipitation polymérisation. A, 30 min de polymérisation ; B, 60 min de polymérisation. [1]

Cependant le milieu de polymérisation utilisé dissout le monomère et précipite le polymère. Donc, les molécules de polymères initiales vont collapser et coaguler dans le milieu en formant des particules « nucléons ». Ces « nucléons » (particules primaires) flocculent graduellement pour mener à la formation de particules précipitées d'où le terme polymérisation en précipitation.

De cette nucléation continue, résultent des précipités dont la forme est irrégulière et de taille polydisperse. La figure 4 montre le type de morphologie obtenue par la polymérisation du tétrafluoroéthylène dans l'eau.

Dans la dispersion polymérisation [9], l'état initial du mélange de polymérisation est le même que pour la polymérisation précipitation, mais dans ce cas le milieu de polymérisation est un mauvais solvant (pas un précipitant) pour le polymère formé. Ainsi les chaînes polymériques s'accroissent, avant de précipiter dans le milieu. La nucléation et la formation des particules primaires sont pratiquement identiques à la polymérisation précipitation, la seule différence réside dans le fait que les particules primaires sont solubles dans le milieu de polymérisation. Donc, ces conditions de polymérisation (sans particule individuelle) mènent à la formation de particules monodisperses de taille comprise entre 0,1 et 10  $\mu\text{m}$ .

## 4 Formation de particules par gélification

### 4.1 Généralités et intérêts

L'immobilisation de matériel biologique consiste à confiner ou localiser sur un support ou au sein d'une matrice tridimensionnelle ce matériel avec rétention de son activité biologique [10, 11]. Parmi les différentes techniques d'immobilisation, la bioencapsulation est apparue comme efficace en laboratoire et utilisable dans les applications industrielles. Cette dernière repose sur le piégeage de composés biologiques, qu'ils s'agissent de peptides, de cellules ou de microorganismes au sein de microparticules, microcapsules ou microsphères. Ce support d'immobilisation se présente sous forme de particules plus ou moins sphériques à l'intérieur desquelles un liquide ou une suspension est enfermé par un film polymère dense semi-perméable [12].

Les avantages de la bioencapsulation sont multiples. En effet, le complexe immobilisé prend les caractéristiques physiques du support améliorant ainsi ses propriétés de manipulation [13]. D'un point de vue industriel, la bioencapsulation permet donc une nette diminution des coûts. En effet, le recyclage du matériel biologique est souvent onéreux. On mentionne également la possibilité de travailler avec des vitesses de flux élevées, une amélioration de la vitesse et une diminution des risques de contamination. La capsule entourant les catalyseurs biologiques joue également un rôle protecteur d'un point de vue mécanique mais aussi vis-à-vis des toxines et inhibiteurs. C'est ainsi qu'on note une amélioration de la stabilité des plasmides encapsulés par rapport aux plasmides libres [14]. Parmi les nombreux bénéfices de la bioencapsulation, on peut encore citer l'amélioration des processus de contrôle, la possibilité de découpler les phases de croissance cellulaire et de production, la facilité de stockage du matériel encapsulé. Finalement, notons aussi qu'un atout de la bioencapsulation est la possibilité de relargage régulier et contrôlé de substances encapsulées [15].

## 4.2 Procédés de formation de particules par gélification

Beaucoup de techniques d'encapsulation ont été développées et leur importance économique dans les applications industrielles se traduit par une recherche considérable. Ainsi, les gels de polyacrylamide ont été les premières matrices utilisées mais la toxicité du monomère diminue la viabilité cellulaire. Les polymères synthétiques obtenus par polycondensation comme les résines époxy et le polyuréthane ont également été testés. Toutefois, un problème semblable de toxicité des réactifs est rencontré. Des résultats similaires en terme de viabilité ont été obtenus par des méthodes de liaisons covalentes de polymères naturels comme le collagène, l'albumine ou la gélatine en raison de la toxicité des agents de couplage [16]. Récemment, les polysaccharides naturels ont gagné en importance pour l'encapsulation dans des gels. Ces derniers présentent l'avantage de la non-toxicité, la biocompatibilité et la biodégradabilité [17]. Les plus favorables en raison des conditions particulièrement douces de gélification sont les alginates, les chitosans et les carraghénanes [18-20]. L'alginate est un polycarboxylate extrait d'algues brunes qui gélifie par pontages cationiques en présence d'ions multivalents. Ce dernier présente certains inconvénients par rapport au carraghénane dans les applications de bioencapsulation. En effet, son coût est plus élevé [21], considération non négligeable dans les utilisations à grande échelle. La stabilité mécanique dépend fortement des conditions ioniques du milieu. En effet, l'intégrité des billes de gel d'alginate est vulnérable à la présence d'agents chélatants comme le phosphate ou le citrate. Finalement, après séchage et stockage, ses performances sont moins bonnes que celles des carraghénanes qui regonflent une fois remis en milieux aqueux [14].

**Tosa et coll.** [22] publient les premiers, une étude des conditions de gélification du kappa-carraghénane dans le cadre de son utilisation en tant que matrice de pré-encapsulation d'enzymes, et induisent la gélification par simple refroidissement ou par contact avec des ions métalliques, mono, di et trivalents, des amines, des dérivés d'acides aminés ou encore des solvants organiques miscibles à l'eau (méthanol, éthanol, acétone). Les gels sont obtenus sous forme de cubes, billes ou de films.

Actuellement, étant donné que l'immobilisation au sein de matrice provoque souvent des limitations de transfert de masses, les sphères sont préférées, aux films en raison d'une augmentation de l'aire de surface [16].

Les billes ou microsphères sont typiquement formées dans une procédure à deux étapes impliquant dispersion et durcissement. Les méthodes de dispersion se font soit par extrusion sous force gravitationnelle [23], sous liquide coaxial ou jet d'air [20], soit par émulsion [19]. De nouvelles méthodes comme la gélification interne couplée à l'émulsion, le pontage interfacial ou la polymérisation interfaciale ont également été proposés.[17].

L'extrusion consiste à faire tomber goutte à goutte la solution polymérique (ou suspension à encapsuler) dans un bain où est réalisée la gélification des gouttes. En général les microsphères formées sont sphériques et de taille homogène. Leur taille peut varier selon l'évolution de la technique de 100  $\mu\text{m}$  à 3000  $\mu\text{m}$ . Cette méthode est simple et très largement utilisée. Au niveau des carraghénanes, une solution de 2 à 5% de kappa-carraghénane est chauffée pour être mélangée au matériel biologique à encapsuler. Le mélange ainsi obtenu est extrudé goutte à goutte dans une solution de KCL 0,3 à 0,75 M [14, 24].

Il existe des variantes à la méthode d'extrusion permettant une production des billes à plus grande échelle. En effet, au lieu de presser la solution aqueuse à travers une seringue avec une faible vitesse de flux pour former des gouttes à l'orifice de l'aiguille, il est également possible d'obtenir un jet à la sortie de l'aiguille par passage de la solution à une vitesse élevée. Ensuite, une vibration sinusoïdale à une certaine fréquence est transférée au liquide via une membrane. Il en résulte l'interruption du jet en gouttelettes homogènes[25].

La méthode de formation des billes par émulsion bien que plus facilement transposable à l'échelle industrielle est moins répandue. De plus, les billes présentent une large distribution de taille. Cette dernière méthode implique la dispersion de la phase aqueuse formée par le polymère en une émulsion d'eau dans l'huile. Les gouttes dispersées sont durcies par refroidissement ou par addition d'un agent gélifiant [16]. Pratiquement, une solution de carraghénane est versée sous agitation dans un bain d'huile à 30°C. Une diminution progressive de la température du bain conduit à la formation de billes qui, après lavage sont transférées dans une solution froide de KCl 0,3 M [24].

## 5 formation de particules par polycondensations

Différents modes de polymérisation condensation (polycondensation) mènent à la production de microsphères polymériques, ils sont classés sur la figure 5 suivante. Ces méthodes sont généralement appliquées à la formation de microsphères organiques [26] et inorganiques [27, 28]. En particulier, les polycondensations suspension et dispersion sont des méthodes de choix pour la préparation de microsphères inorganiques.

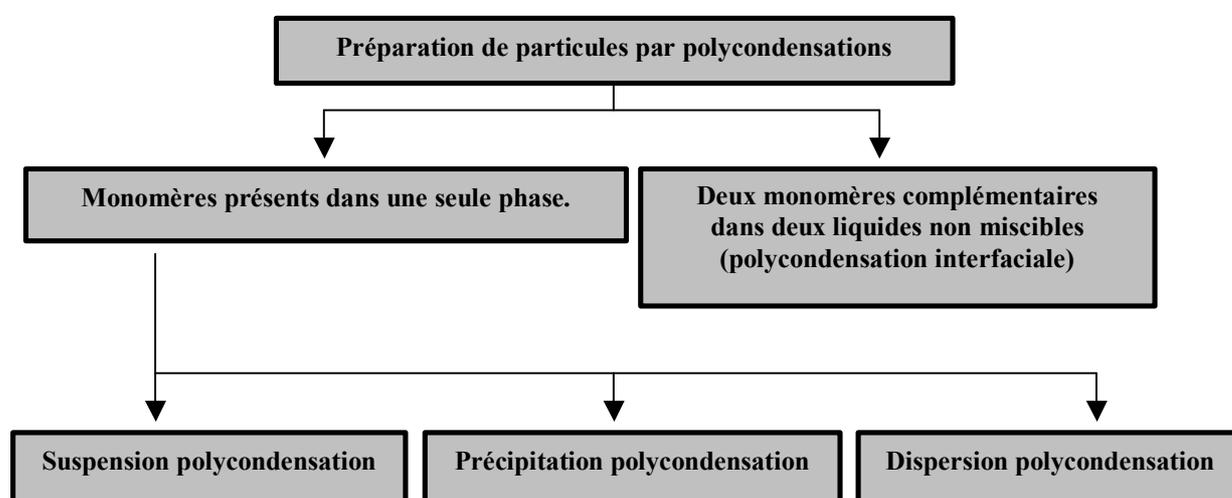


Figure 5 : Méthodes pour la fabrication de microsphères par polycondensation hétérogène [1]

Le mécanisme de formation des particules et leur stabilisation en suspension et dispersion polycondensation sont largement similaires aux homonymes en polymérisation. Bien que les technologies sol-gel (cf. **chapitre V, p.43**) ne soient pas usuellement décrites comme des procédés de polycondensation dispersion leur mécanisme peut être décrit en tant que tel. On peut aussi noter que l'émulsion polycondensation n'existe pas, par le fait qu'il n'y pas d'amorceur de réaction. Par contre, l'utilisation de deux monomères complémentaires (par exemple un diacide avec une diamine), chacun soluble dans un des deux liquides non miscibles, mène à une polycondensation interfaciale dans le mélange de polycondensation. Ce mode de

polycondensation est fréquemment utilisé pour la préparation de microcapsules plutôt que pour la conception de microsphères.

## 5.1 Particules de gel de silice

Le terme spécifique « silice » réfère au composé de stœchiométrie  $\text{SiO}_2$ . Cependant, les particules à base silice dont la fabrication est décrite dans la figure 6 contiennent différentes proportions d'eau ( $\text{SiO}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_x$ ). Ces particules sont produites par des procédés conventionnels sol-gel.

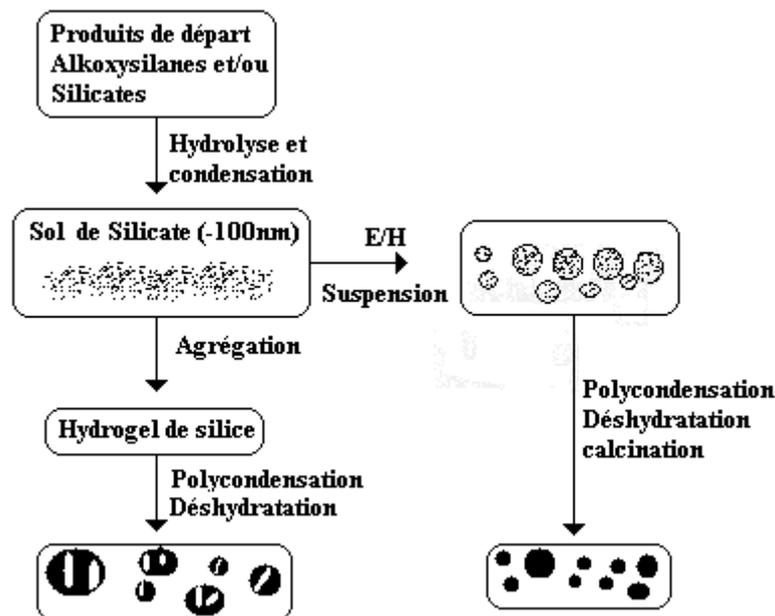


Figure 6 : Procédés sol-gel pour la préparation de particules siliciques. [1]

Ces procédés impliquent la formation d'une série de silices intermédiaires, incluant du silicate de sodium (obtenu par dissolution de sable en milieu alcalin), des acides siliciques, des « sol de silices », des hydrogels de silice et finalement des xerogels de silice. Le terme « sol de silice » est employé pour décrire une dispersion aqueuse de particules de silice nanométriques (10-100 nm, silice colloïdale), obtenues par polycondensation d'acide silicique. Donc l'acidification d'une solution de silicate de sodium mène à une polycondensation et la formation de poly(acide silicique). Cette polycondensation peut être considérée comme polycondensation précipitation, avec formation de particules primaires. Ces particules primaires deviennent plus tard de taille colloïdale et par conséquent forment le « sol de silice ». La croissance des particules de silice colloïdales dans le sol de silice peut être contrôlée par de

nombreux paramètres, notamment la concentration en silicate, le pH, la température et la stabilisation électrolytique (ajout d'un polyélectrolyte). Alors que le nombre et la taille des particules croissent, elles coagulent et forment de plus grosses particules (1 $\mu$ m), entre lesquelles se forment des liaisons interparticulaires. Le « vieillissement » du procédé mène graduellement à la coagulation en masse et donne naissance à la formation d'un gel de silice aqueux, ou hydrogel de silice. Le volume de gel produit dans le procédé sol-gel est converti en silice sèche poreuse (xerogel) par déshydratation thermique. Une observation intéressante dans cette étape de séchage est que l'échange de l'eau par un solvant organique (souvent l'éthanol) suivi d'un séchage en milieu CO<sub>2</sub> supercritique augmente considérablement la porosité des particules dans ce cas on parle d'aérogels. Finalement les particules sont mélangées et tamisées pour donner des particules dont le diamètre peut aller de 5  $\mu$ m à 2 mm.

## 5.2 Microbilles de silice

Les microbilles de silice ont été étudiées pour la première fois dans les années 1970. Encouragées par la popularité des billes de polymères organiques comme supports en chromatographie, plusieurs techniques basées sur la production de billes polymériques organiques ont été développées.

### 5.2.1 Gélification suspension

Cette procédure est sensiblement la même que le procédé sol-gel, excepté la gélification, qui est effectuée avec le sol de silice sous forme de petites gouttes dans un liquide organique (milieu de suspension). Après la conversion sol-gel les billes d'hydrogel de silice sont séparées, lavées, séchées et calcinées pour obtenir des microbilles sèches de silice.

### 5.2.2 Polycondensation suspension

Dans cette méthode, une molécule de bas poids moléculaire, un polyéthoxysilane (PES) est d'abord préparée par une hydrolyse partielle de tétraéthoxysilane (TEOS).

Le PES est agité dans un mélange eau-alcool pour former des gouttes en suspension, suivi d'une addition d'un catalyseur (ammoniac, NaF, KF...) de polycondensation. Ce qui aboutit à la formation de microbilles de silice.

### 5.2.3 Microencapsulation

Cette méthode implique l'inclusion de gouttes de sol de silice dans une matrice organique, suivi d'une agglomération et de la calcination de la matrice organique. Par exemple, du formaldéhyde et de l'urée sont ajoutés à une bonne dispersion de sol de silice, en ajustant le pH on peut simultanément polycondenser le sol de silice et les monomères organiques. Autrement dit c'est une polycondensation dispersion dans laquelle un réseau de nanoparticules de silice sont encapsulées dans un réseau de taille micrométrique d'un polycondensat organique. Ensuite les microcapsules sont soumises à un traitement thermique pour éliminer le polymère organique.

### 5.2.4 La pulvérisation séchage

Dans cette procédure, des petites gouttes de sol de silice sont pulvérisées dans un four à 400°C. Il en résulte une évaporation de l'eau et la polycondensation dans les gouttes. Les particules sphériques obtenues par cette voie sont sujettes à une modification de porosité par un traitement hydrothermique. La préparation de microsphères siliciques par le procédé de spray-drying comporte deux étapes dont l'obtention d'un sol puis ce sol est directement traité par spray-drying. Les paramètres de température et de flux sont ajustés de telle sorte à obtenir des particules de taille homogène et non agrégées. Ce procédé a été appliqué à l'encapsulation d'un principe actif et ces microsphères présentent des propriétés intéressantes de libération contrôlée [29]. Plus récemment, une étude décrit le mode d'obtention de microsphères siliciques monodisperses de texture mésoporeuse [30]. Le procédé comporte les étapes déjà décrites ainsi qu'une étape supplémentaire qui consiste à faire passer les gouttelettes formées dans un tube porté à 500°C permettant ainsi la formation du matériau. Cette technique relève d'un processus complexe récemment décrit par l'équipe de **C. Sanchez** [31]. Enfin des microsphères de porosité hiérarchique peuvent être préparées par spray drying. Elles sont formées grâce à ce procédé après

l'agglomération de nanoparticules siliciques mésoporeuses sous la forme de microsphères [32].

### 5.2.5 Polymérisation de gouttes de monomères extrudées

Les technologies d'extrusion sont largement employées dans la production de microcapsules et l'encapsulation de cellules entières, et aussi simplement pour la production de microsphères de polymères et monomères. Par exemple **Carturan et coll.** [33] ont développé et décrit une technique spéciale d'extrusion pour la synthèse de microcapsules monodisperses composites à base d'alginate et de silice chargées en cellules animales. Une suspension de cellules animales ou d'agrégats de cellules dans une solution d'alginate est extrudée sur un flux d'air saturé par des vapeurs d'alkoxydes siliciques (Figure 7).

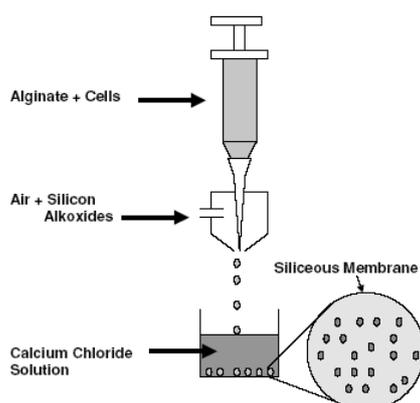


Figure 7 : Schéma de fabrication de microsphères de Ca-alginate-SiO<sub>2</sub> [33]

La formation immédiate d'une membrane sol-gel silicique sur la surface des microgouttes avant la réaction avec le Ca<sup>2+</sup>, mène à des microcapsules de Ca-alginate de 200µm de diamètre.

## 6 Conclusion

Nous venons de voir que la conception de microparticules peut être abordée par de nombreuses voies de synthèses. Quel que soit le procédé de fabrication, il demande

une mise au point rigoureuse et une parfaite connaissance des propriétés physico-chimiques des réactifs.

Dans le cadre de la formation de particules à base kappa-carraghénane nous pouvons envisager quasiment chacun des procédés décrits précédemment. Or notre objectif étant d'élaborer des microsphères dont la taille doit être voisine de 500  $\mu\text{m}$  nous avons choisi un des procédés qui est le plus adaptable à cet objectif. En effet l'extrusion d'une solution de polymère en gouttes et la dispersion de celles-ci dans un bain de gélification offre un grande souplesse d'utilisation et de multiples possibilités de réglages. C'est pourquoi nous avons opté pour cette méthode de fabrication de microsphères d'hydrogel.

Nous avons aussi montré que la fabrication de microparticules inorganiques est parfaitement connue et aisément réalisable par des procédés sol-gel. Cependant notre but étant d'élaborer des microparticules hybrides carraghénane/silice en utilisant des microsphères de kappa-carraghénane, celles-ci conservant la structure de l'hydrogel. En effet, ces microsphères vont servir d'objet structurant, lors de la synthèse du matériau hybride par voie sol-gel, la silice pourra alors s'organiser autour du k-carraghénane. Il est donc important de connaître toutes les caractéristiques physico-chimiques du gel. Cette connaissance doit être approfondie notamment sur les hydrogels en général et sur le k-carraghénane plus particulièrement.

## II. Les hydrogels :

---

### 1 Généralités

#### 1.1 Définition d'un gel

Le terme de colloïde a été introduit en 1861 par **Graham** [34] par analogie avec les colles, pour désigner toute substance dont la solution ne peut dialyser, par opposition aux cristalloïdes.

La définition des colloïdes selon **Graham** devint rapidement obsolète et il fallut attendre le début du XX<sup>ème</sup> siècle pour que les observations ultramicroscopiques de **Freundlich** [35], **Ostwald** et **Zsigmondy** leur permettent de définir les solutions colloïdales comme des dispersions de particules très fines, de dimensions inférieures au micromètre. Parmi elles se trouvent les gels dont la définition a évolué dans le temps parallèlement aux progrès technologiques :

En 1949, **Bungenberg de jong** [36] définit un gel comme un système à caractère solide, dans lequel les particules colloïdales sont agencées de manière à former une structure cohérente et la même année, **Herman** [37] donne des gels une définition en trois points :

- Un gel est un système cohérent composé d'au moins deux composants.
- Un gel présente des propriétés mécaniques caractéristiques de l'état solide.
- Dans un gel, à la fois le composant sous forme dispersée et le dispersant s'étendent continuellement à travers le système entier.

Dans l'ensemble, les auteurs s'accordent à reconnaître aux gels une structure continue aux dimensions macroscopiques.

**Flory** [38] en 1974 donne une classification des gels en 4 catégories selon le type de structure microscopique et les interactions responsables de leur cohérence :

- Les structures lamellaires bien ordonnées (savons, argiles...).

- Les réseaux de polymères covalents désordonnés, c'est à dire sans aucune région ordonnée, ni micelles ou agrégats structurés.
- Les réseaux de polymères formés par agrégation physique, essentiellement désordonnés mais localement ordonnés.
- Les structures de particules désordonnées, comme les gels d'acides siliciques et les gels de pentoxyde de vanadium.

Encore aujourd'hui, on parle de l'état colloïdal comme d'un véritable état de la matière [39] désignant des matériaux hétérogènes mono ou polydispersés. Ces matériaux s'écoulent mais peuvent devenir solides, diffractent la lumière et contiennent des entités structurales dont au moins une dimension linéaire se situe entre 1 nm et 1  $\mu$ m. Un système constitué de particules, solides de taille inférieure à 1  $\mu$ m environ, en suspension dans un milieu liquide, est appelé **dispersion colloïdale ou sol**. Si le milieu de dispersion est aqueux, le colloïde est un hydrosol ou hydrocolloïde. Les colloïdes macromoléculaires, constitués de polymères ou de macro-ions dispersés dans un solvant sont souvent appelés **solutions colloïdales** car considérés comme des solutions vraies au sens thermodynamique. Un colloïde dont le milieu de dispersion est liquide, mais qui présente les propriétés globales d'un solide est appelé un gel. Malgré de nombreux efforts de clarification de la part des auteurs, cette notion de "gel" demeure encore aujourd'hui discutable et discutée. Beaucoup d'entre eux se réfèrent encore à la définition très simple de **Ferry** [40] qui désigne par le terme gel «**tout système dilué qui ne présente pas d'écoulement continu** ». La définition d'un gel [41], que l'on peut donner aujourd'hui, s'appuie à la fois sur une description microscopique et une connaissance des propriétés mécaniques de ces systèmes. Elle comprend trois critères essentiels :

- Il s'agit de systèmes contenant au moins deux constituants : l'un, très fortement majoritaire, le solvant liquide et l'autre une substance que l'on peut appeler solide, présente en très faible quantité et finement dispersée à l'intérieur du solvant.
- La phase liquide (solvant) et la phase solide sont continues. La phase solide constitue une sorte de filet ou de charpente qui emprisonne le solvant et l'empêche de s'écouler.

- Le milieu dans son ensemble se comporte comme un solide mou, facile à déformer ou une pâte. Le gel est souvent transparent, car le maillage est très fin (taille des mailles et diamètre des filaments de l'ordre de 1 à 100 nm).

Actuellement la rhéologie en mode dynamique permet d'étudier l'état de gel et de le caractériser de manière indiscutable par la mesure des modules élastique  $G'$  et visqueux  $G''$ .

## 1.2 Classification

Il existe différentes façons de classer les gels :

- En fonction de la nature du liquide constituant le solvant. Si le solvant est l'eau, on parlera alors **d'hydrogel**.
- En fonction du mécanisme responsable de la prise en gel. Bien qu'ils soient variés et dépendants du système étudié, on peut très schématiquement les classer en deux types :
  - Les gels chimiques

Ils sont dus à la formation de liaisons covalentes qui conduit à la création d'un réseau permanent de type caoutchoutique. Ces gels peuvent se déformer d'une manière très importante sous l'action d'une force extérieure faible et retrouver leur forme initiale très rapidement lorsque la force est supprimée. Leur élasticité est de nature entropique et est directement liée à la conformation des chaînes de polymères sous forme de pelotes statistiques. Ils ont la particularité d'absorber de grandes quantités de liquide, comme des éponges, qu'ils n'expulsent cependant pas sous l'effet d'une pression modérée.

- Les gels physiques

Pour ceux-ci, différents mécanismes participent à la formation d'un réseau réversible ou labile en fonction de paramètres tels que la température, le pH, la force ionique ou les contraintes mécaniques. Ces systèmes peuvent donc repasser à l'état liquide après modification de ces paramètres, ce qui entraîne la désagrégation du réseau et la redispersion des particules,

➤ En fonction de leur origine :

Les polymères dits synthétiques, obtenus par réaction chimique selon divers mécanismes (radicalaire, condensation ...) conduisent à la formation de gels chimiques par création de liaisons covalentes entre chaînes.

Les polymères dits d'origine naturelle, c'est-à-dire obtenus par extraction, sont en majeure partie des gels physiques. Ces macromolécules naturelles, appelées biopolymères, ont été les premiers gels connus : il s'agit le plus souvent de polysaccharides ou de protéines en milieu aqueux. Parmi les polysaccharides, les plus connus sont les pectines issues de fruits, les carraghénanes extraits d'algues rouges et les alginates extraits d'algues brunes, mais aussi le chitosan extrait des carapaces de mollusques. Les protéines sont principalement le collagène, le collagène dénaturé ou gélatine et des protéines globulaires dénaturées comme le blanc d'œuf.

### 1.2.1 Formation des gels physiques

La formation du gel passe par une étape appelée **transition sol-gel**, correspondant au passage de l'état liquide à l'état solide obtenu quand le réseau tridimensionnel formé par la structuration de la matière dispersée est de taille infinie.

Avant gélification, les molécules du polymère forment une solution vraie ; les macromolécules ne sont pas organisées les unes par rapport aux autres : c'est **l'état sol**.

**L'état gel** apparaît quand suffisamment de chaînes se sont associées pour former un réseau ou un gel de consistance élastique.

Après le passage de la transition sol-gel, le nombre de zones de jonction augmente et des restructurations peuvent se produire suivant les conditions du milieu (température,

temps, qualité du solvant, solutés, contraintes mécaniques... ). Au fur et à mesure que les chaînes s'organisent entre elles, le gel devient de plus en plus rigide. Un phénomène de synérèse peut survenir : le gel se contracte et exsude une partie de la phase liquide.

Dans le cas de ces gels, une agrégation réversible apparaît lorsque l'on fait varier un paramètre physique ou physico-chimique tel que température, pH, force ionique, contrainte mécanique. Les gels dont la transition sol-gel est induite par une variation de température sont dits **thermoréversibles**, ce qui est le cas des gels de  $\kappa$ -carraghénanes que nous avons utilisés. La variation de température produit une modification de l'état conformationnel du biopolymère allant dans le sens d'une plus grande organisation qui induit un phénomène d'association des chaînes et, si la concentration est suffisante, une gélification.

Sur le plan physico-chimique, le phénomène de gélification implique, au niveau local, des mécanismes permettant de créer des interactions entre chaînes macromoléculaires. Contrairement aux gels chimiques dont la cohésion est assurée par des jonctions ponctuelles constituées par des liaisons covalentes, les gels physiques formés de chaînes étendues sont structurés par des liaisons de faible énergie regroupées au niveau d'une zone de jonction (Figure 8) sur une distance suffisante permettant la création d'un effet coopératif stabilisateur. Ce phénomène nécessite une régularité stéréochimique du polymère ou d'un segment assez étendu du polymère pour permettre le rapprochement des chaînes.

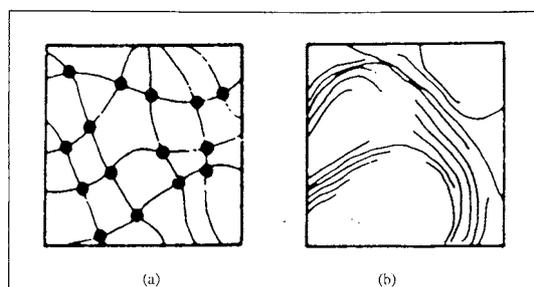


Figure 8 : Modèles de gélification par jonctions ponctuelles (a) (gels chimiques) et par zones de jonction(b) (gels physiques). [42]

Du fait de la nature même des liaisons mises en jeu, les gels physiques sont des systèmes thermodynamiquement instables. En effet, les liaisons intervenant dans la structuration du réseau sont de nature plus faible que les liaisons covalentes présentes dans les gels chimiques, les chaînes gardant leurs capacités à se réarranger tant qu'elles ne sont pas dénaturées. Si le polymère possède une structure uniforme, les zones de jonction sont très étendues et le gel obtenu sera rigide et cassant. En revanche, s'il possède quelques éléments introduisant périodiquement ou au hasard une irrégularité structurale, le gel sera plus élastique.

Certaines grandeurs, comme par exemple la taille des mailles ou la distance moyenne entre deux zones de jonction, permettent de caractériser parfaitement les réseaux de polymères synthétiques dont tous les paramètres sont connus et contrôlés. Elles sont par contre difficilement applicables aux gels physiques, très souvent d'origine naturelle, en raison de la structure et de la labilité des zones de jonction.

### 1.2.2 Techniques courantes d'étude des hydrogels :

Les différentes techniques d'étude des hydrogels permettent d'accéder à divers niveaux dans l'échelle spatio-temporelle de l'organisation des chaînes :

Le **niveau moléculaire** où sont étudiés les phénomènes de transconformation pelote hélice et de formation des zones de jonction,

Le **niveau macromoléculaire** où est étudiée l'organisation spatiale des chaînes reliées entre elles notamment par les zones de jonction, la création d'amas de plus en plus importants au cours de la formation du gel et la structure du réseau,

Le **niveau supramoléculaire** où sont étudiées les propriétés globales des systèmes avant, pendant et après la transition sol-gel.

Le Tableau 1 résume les différentes techniques correspondant à chaque domaine :

Méthodes structurales		Méthodes mécaniques		
Echelle spatiale (nm)		Echelle temporelle (s)		
$10^6$	Microscopie optique	Domaine supramoléculaire	Rhéologie	$10^5$
$10^4$	Diffusion de la lumière	Domaine Macromoléculaire	Diffusion quasi-élastique de la lumière	$10^{-3}$
$10^3$	Diffusion de neutrons aux petits angles		Biréfringence	$10^{-4}$
	Diffusion de rayons X aux petits angles		RMN Spin Echo	
	Microscopie électronique			
$10^1$	Spectroscopies : RMN, IR, UV, Raman	Domaine moléculaire	Spectroscopie de neutrons	$10^{-6}$
	Polarimétrie		Spin Echo	
$10^{-1}$	Dichroïsme circulaire		Ultasons	
	Méthodes thermodynamiques: Analyse calorimétrique Différentielle			$10^{-15}$

Tableau 1 : Techniques d'étude des hydrogels

### III. Les carraghénanes

---

Le terme carraghénane désigne une classe de polysaccharides polysulfatés qui constituent la matrice cellulaire de nombreuses espèces d'algues rouges (algues marines de la classe des Rhodophycées). Leur nom dérive de celui du lichen Carageen dont ils furent initialement extraits.

Ces composés présentent la propriété de modifier le comportement rhéologique des milieux aqueux, cette modification de texture pouvant aller du simple épaissement jusqu'à la gélification. Mieux connus des consommateurs européens sous l'appellation E407, les carraghénanes sont largement utilisés comme agent de texture dans les produits de consommation courante (desserts lactés, sauces) mais aussi dans l'industrie chimique et pharmaceutique pour stabiliser les émulsions ou les dispersions. Mais aussi, du fait de leur biocompatibilité et de leurs capacités de bioadhésion, les carraghénanes susceptibles de former des hydrogels suscitent un grand intérêt dans l'élaboration de systèmes microparticulaires de délivrance de principe actifs. Nous pourrions établir que parmi ces carraghénanes, les kappa-carraghénanes présentent un processus de gélification iono- et thermosensible. Ces caractéristiques en font de bons candidats à la préparation de microsphères par gélification ionotropique. Nous verrons que ce type de carraghénane et la nature des ions présents dans la solution durcissante sont les paramètres clefs de la fabrication de ces microsphères.

#### 1 Obtention des carraghénanes et composition chimique

Les carraghénanes sont essentiellement extraits d'algues de l'espèce *Eucheuma*. **L'extraction** s'effectue en deux étapes. La première est une macération à chaud (90°C) à pH basique afin d'améliorer son rendement, de modifier la structure des

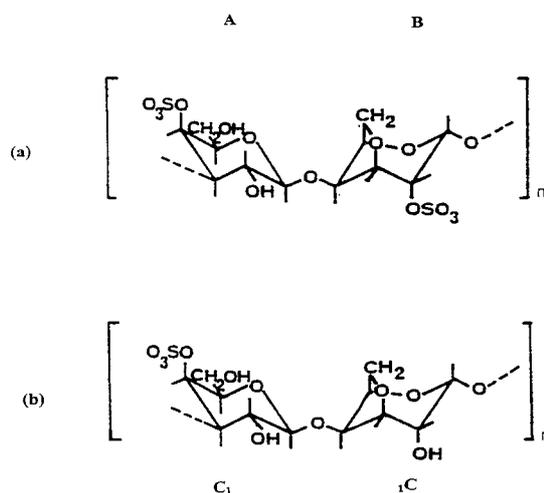
chaînes précurseurs et d'améliorer les propriétés gélifiantes tout en limitant l'hydrolyse acide.

La deuxième étape de l'extraction, qui consiste à séparer les différents types de carraghénanes entre eux, repose sur leurs différences de solubilité dans différents alcools. Après séchage, les échantillons obtenus sont de masse moléculaire élevée (de  $10^5$  à  $10^6$  D), très polydisperses et de composition variable en fonction de l'espèce et de l'âge de l'algue considérée, du lieu et de la saison de la récolte [43].

**Au niveau chimique**, les carraghénanes sont des polysaccharides sulfatés linéaires, dont le motif de répétition est un disaccharide constitué de deux résidus galactoses plus ou moins sulfatés, le second présentant ou non un pont 3,6-anhydro [44]. En fonction de ces deux paramètres, on distingue 3 classes de carraghénanes : les kappa ( $\kappa$ ), les iota ( $\iota$ ) et les lambda ( $\lambda$ ) carraghénanes.

Dans la suite de ce travail, nous ne nous intéresserons pas qu'au kappa carraghénane mais aussi au iota carraghénane qui est présent en tant qu'impureté dans le kappa carraghénane.

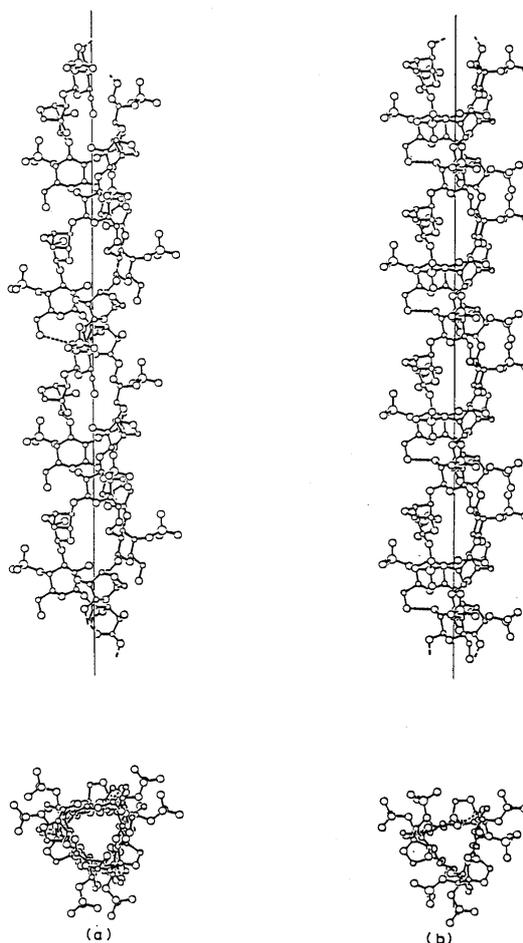
La structure "idéale" de ces produits a été déterminée par **Rees et coll.** [45] qui ont fait la distinction entre iota et kappa carraghénanes (Figure 9).



**Figure 9 : Structure chimique des iota (a) et des kappa (b) carraghénanes dont le motif de répétition (AB)<sub>n</sub> est un disaccharide [42]**

Le kappa carraghénane présente un β-D-galactose-4-sulfate (noté résidu A ou cycle C<sub>1</sub>) lié en 1,3 et un 3,6-anhydro-α-D-galactose lié en 1,4 (noté résidu B ou cycle 1C) alors que le iota carraghénane porte un groupement sulfate sur le résidu B.

L'orientation et la valeur des angles de la liaison osidique dans l'enchaînement des cycles  $1C$  et  $C1$  autorisent un enroulement des chaînes en spirale régulière sous forme d'hélice droite [46, 47], celle des kappa carraghénanes présentant un pas de 24,6 Å légèrement inférieur à celle des iota carraghénanes (26,4 Å) en raison d'une contraction de la structure primaire (Figure 10).



**Figure 10: Enroulement des chaînes de kappa (a) et de iota (b) carraghénanes sous de doubles hélices droites forme d'hélices droites. [48]**

Cependant, il n'est pas rare que l'enchaînement disaccharidique présente des irrégularités de structure ou de substitution [49], entraînant une composition et/ou une conformation différente des chaînes.

Ces irrégularités ou défauts peuvent provenir de deux origines :

- D'une part sont présentes dans l'algue deux fractions supplémentaires : mu ( $\mu$ ) et nu ( $\nu$ ), précurseurs biologiques des fractions kappa et iota respectivement. Ces précurseurs biologiques ne comportent pas de pont anhydro-galactose ; la transformation de l'unité galactose en anhydro-galactose est obtenue par élimination

d'un groupement sulfate soit sous l'action d'une enzyme contenue dans l'algue, soit au cours du traitement industriel. Cette transformation peut être incomplète.

- D'autre part, il faut aussi savoir qu'un échantillon de carraghénane n'est jamais pur : à titre d'exemple, un échantillon de kappa-carraghénane contient de 3 à 15% en masse de iota-carraghénane. Cette proportion "d'impuretés" présente dans l'échantillon est un facteur important à prendre en compte. En effet, **Landry** [50] a démontré que la présence dans un extrait de kappa carraghénanes issus d'*Eucheuma Cotonii* ayant 10% de contamination iota, soit 5% de cycles anhydro-galactose ne représentant pas la structure kappa, suffit à changer certaines propriétés mécaniques des gels.

Quelle que soit son origine, une irrégularité de structure ou de substitution entraîne un changement de conformation de la chaîne qui a pour conséquence une modification de sa flexibilité lorsqu'elle est à l'état désordonné en solution et une interruption de sa structure hélicoïdale à l'état ordonné.

La grande densité des groupements sulfate confère aux chaînes de carraghénanes un caractère fortement anionique. La forme acide libre, fragile, est instable et insoluble. Les carraghénanes sont, par conséquent, commercialisés sous forme stable de sels de sodium, de potassium et de calcium (l'un dominant quantitativement). Comme nous le verrons par la suite, ces cations associés ont une grande influence sur les propriétés texturantes ou gélifiantes des carraghénanes.

La solubilité des carraghénanes est régie par la présence et le nombre des groupements sulfates, la présence du pont 3,6-anhydro-galactose, la force ionique et le type d'ions en solution. Les kappa-carraghénanes ne sont par conséquent solubles qu'à chaud, à une température d'autant plus élevée que la force ionique est élevée. Les iota-carraghénanes, avec deux sulfates par disaccharide, sont partiellement solubles à froid et totalement à chaud à force ionique modérée. Ces différences de solubilité entre carraghénanes, liées à leur structure chimique, vont de pair avec l'aptitude des chaînes à s'associer entre elles pour former des gels.

## 2 La transconformation pelote-hélice dans les solutions diluées et dans les gels

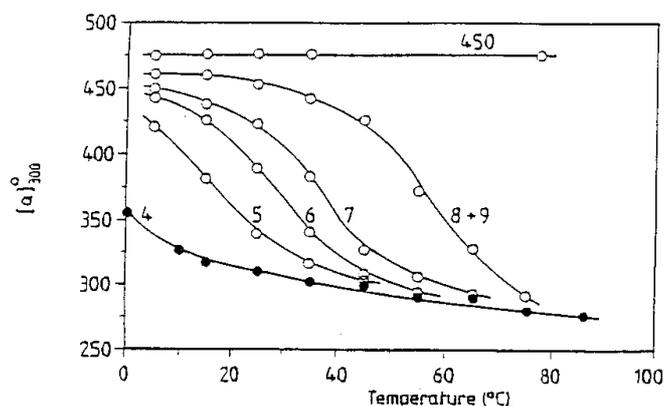
La notion de transconformation pelote-hélice des chaînes est commune à la plupart des polysaccharides et aux carraghénanes, mais elle est plus complexe dans le cas des carraghénanes. Il apparaît que la nature des électrolytes en solution et leur concentration jouent un rôle non négligeable dans la transconformation, bien que cette dernière soit toujours induite par un abaissement de la température. De plus, il existe des différences de comportement entre les iota et les kappa carraghénanes. Pour ces raisons, la composition exacte de l'échantillon étudié, c'est-à-dire son taux d'impuretés en d'autres types de carraghénanes et la forme saline sous laquelle il se présente, ainsi que le solvant choisi pour l'étude, ont une grande influence sur les résultats obtenus. Malheureusement, l'importance de la connaissance de ces paramètres n'est apparue clairement que depuis peu, notamment grâce aux progrès scientifiques en spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$ , d'où les résultats apparemment contradictoires obtenus auparavant en raison des différentes conditions opératoires employées.

*En solution diluée*, les changements de conformation des carraghénanes ont été étudiés par de nombreuses techniques, notamment la variation du pouvoir rotatoire, la calorimétrie, la conductivité et la spectroscopie.

La transconformation est étroitement liée à la concentration ionique totale en polyélectrolyte et en électrolytes ajoutés dans la solution et est très rapide. **Rochas et Landry** [51] ont montré par mesure de la conductivité que le changement conformationnel induit par la température ne peut être mesuré en fonction du temps que si la concentration ionique totale est suffisamment basse.

La présence d'une transconformation et la température à laquelle elle se produit dépendent elles aussi du type d'électrolyte présent en solution (certains auteurs pensent qu'il existe une spécificité des carraghénanes pour les ions  $\text{K}^+$ ) et de sa concentration. A conditions opératoires identiques, la masse moléculaire des échantillons joue aussi un rôle. **Rochas et coll.** [52] ont démontré, par mesure de

l'évolution du pouvoir rotatoire [53] avec la température sur des oligomères de carraghénanes en solution dans du KCl (Figure 11), l'existence d'une transition hélice pelote pour des températures variant entre 0 et 75°C en fonction de leur degré de polymérisation (de 4 à 9). Dans le cas de polymères de carraghénanes avec un degré de polymérisation de 450, la structure hélicoïdale s'est maintenue jusqu'à plus de 75°C.



**Figure 11: Dépendance en température du pouvoir rotatoire d'oligomères ou de polymères de carraghénanes en présence de 2,5 mol/l de KCl (Les nombres notés près des courbes représentent les degrés de polymérisation des échantillons) [52]**

L'évolution du pouvoir rotatoire est réversible dans le cas des iota carraghénanes, mais présente une forte hystérésis en ce qui concerne les kappa carraghénanes.

*Dans les gels*, la transconformation moléculaire et la gélification apparaissent comme deux phénomènes séparés bien que liés.

La formation d'hélices dans les gels de iota et de kappa-carraghénanes a été mise en évidence par des expériences de diffraction aux rayons X [54-56]. **Rees et coll.** ont montré que la gélification implique une transition préalable pelote-hélice des chaînes, mise en évidence par polarimétrie et analyse calorimétrique différentielle (ACD). Le changement conformationnel dans les solutions ou dans les gels a pu être étudié en établissant un diagramme de phase en fonction de la température et de la salinité. Par exemple, **Rochas et Rinaudo** [57] ont établi un diagramme de phase pour des kappa-carraghénanes sous forme de sel de potassium et en présence d'ions potassium, en traçant la variation de la concentration ionique totale  $C_T$  en fonction de l'inverse de la température de transition conformationnelle  $T_m^{-1}$  en montée et descente en température (Figure 12).

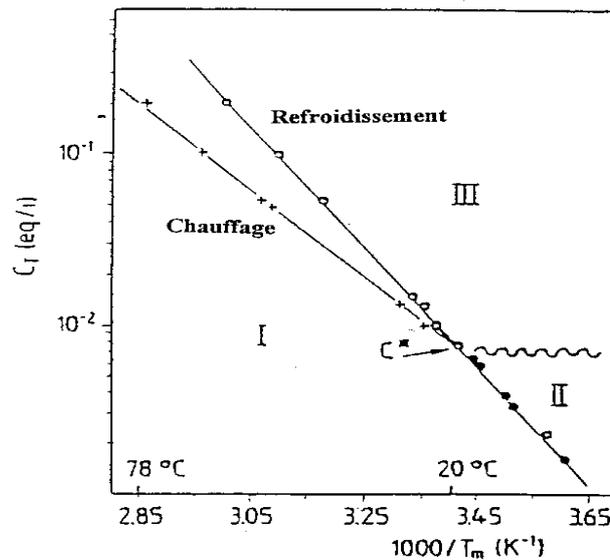


Figure 12: Diagramme de phase des kappa carraghénanes établi à partir de la température de transition conformationnelle et de la concentration totale en potassium libre [57]

La présence ou l'absence d'un changement conformationnel dans les solutions et les gels étudiés leur a permis de distinguer 4 régions :

Pour une température  $T$  supérieure à  $T_m$  (domaine I), les chaînes de kappa carraghénanes ont une conformation non ordonnée sous forme de pelotes macromoléculaires ; *la solution macromoléculaire est à l'état de sol.*

Pour  $C_T$  supérieure à une concentration critique  $C^*$  qui correspond à la concentration définie comme le rapport entre la masse d'une mole et le volume de liquide équivalent au volume occupé par cette même mole. ( $C^* = 7.10^{-3}$  eq/l) et  $T$  inférieur à  $T_m$  (domaine II), les chaînes de kappa carraghénanes présentent une conformation ordonnée, sous forme d'hélices et la solution macromoléculaire est dans un état gel. Les hélices sont agrégées et la transition conformationnelle présente une hystérésis.

La région III, issue de l'intersection des domaines I (chauffage) et II (refroidissement) correspond à cette hystérésis (écart entre les températures de transition au chauffage et au refroidissement).

Pour  $C_T < C^*$  et  $T < T_m$  ( $C^* = 7.10^{-3}$  eq/l et  $T_m = 20^\circ\text{C}$ ), les chaînes de kappa carraghénanes présentent une conformation ordonnée (hélices ou dimères d'hélices non agrégés) alors que *la solution reste à l'état sol.* La transition conformationnelle

entre les domaines II et III, mal définie et pour cette raison indiquée de façon imprécise, se fait sans hystérésis.

En dessous de la concentration critique  $C^*$ , la formation d'un gel est impossible, que les chaînes soient sous une conformation ordonnée ou non.

Le diagramme de phase obtenu pour les iota-carraghénanes est légèrement différent de celui obtenu dans le cas des kappa carraghénanes (Figure 13).

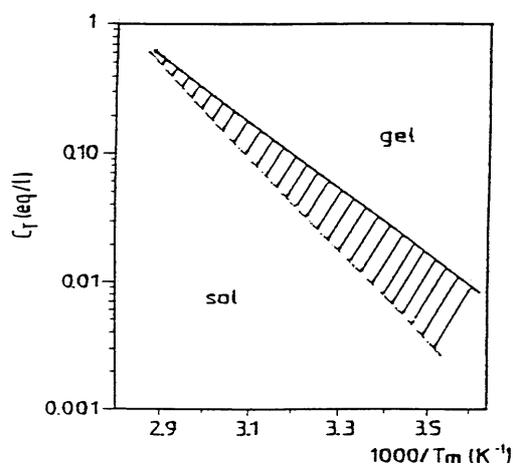


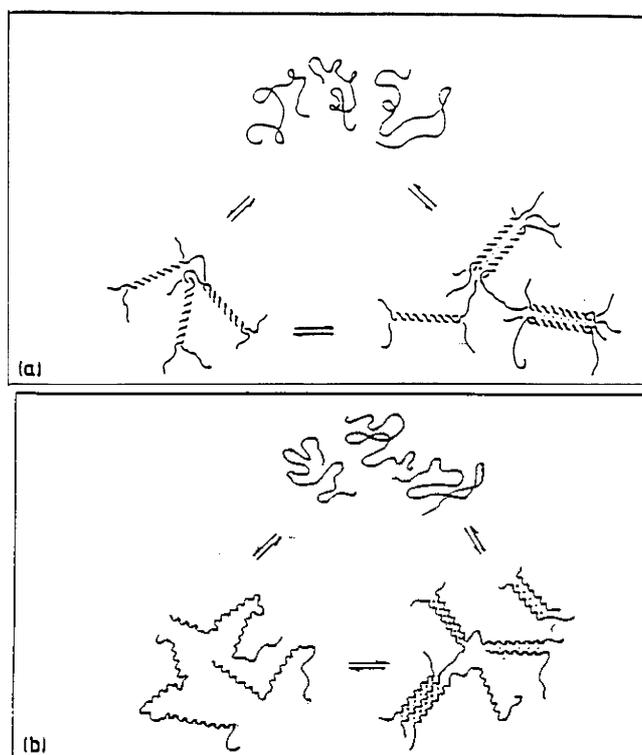
Figure 13: Variation de la température de gélification avec la concentration en contre-ion potassium libre pour les kappa et les iota carraghénanes [57]

Il découle de cette comparaison que la transconformation des chaînes et la gélification des kappa carraghénanes se font plus facilement : il existe un domaine de concentration en KCl et de température dans lequel les kappa carraghénanes sont sous forme d'hélices à l'état gel alors que les iota sont encore sous forme désordonnée (état sol). Des possibilités d'association inter ou intra chaînes ont été mises en évidence par une étude en microscopie électronique de solutions très diluées de iota carraghénanes [58]. Cette technique a permis de visualiser des chaînes isolées, longues et fines, mais aussi des chaînes associées en doubles hélices intermoléculaires sur toute leur longueur ou sur certaines portions et d'autres en doubles hélices intra-chaînes avec formation de cycles ou d'épingles à cheveux. Un rapprochement entre doubles hélices a également été observé mais les auteurs parlent de super hélices plutôt que d'agrégation.

### 3 Formation du gel et structure

Si les équipes travaillant sur la gélification des carraghénanes sont d'accord sur la formation d'hélices impliquant toutes les chaînes de la solution, le mécanisme d'association de ces chaînes, c'est-à-dire la formation du gel est encore mal élucidée.

Au cours de ces dernières années, plusieurs modèles d'organisation ont été proposés, reposant sur différents mécanismes d'association de doubles (Figure 14 modèle de **Rees**) [43, 46, 59], voire même de simples hélices (Figure 14 modèle de **Smidrod**) [60], en fonction de l'environnement ionique.



**Figure 14 : Principaux modèles proposés pour la gélification des carraghénanes : (a) modèle d'association de doubles hélices de Rees [46] (b) modèle d'association de simples hélices de Smidrod [60]**

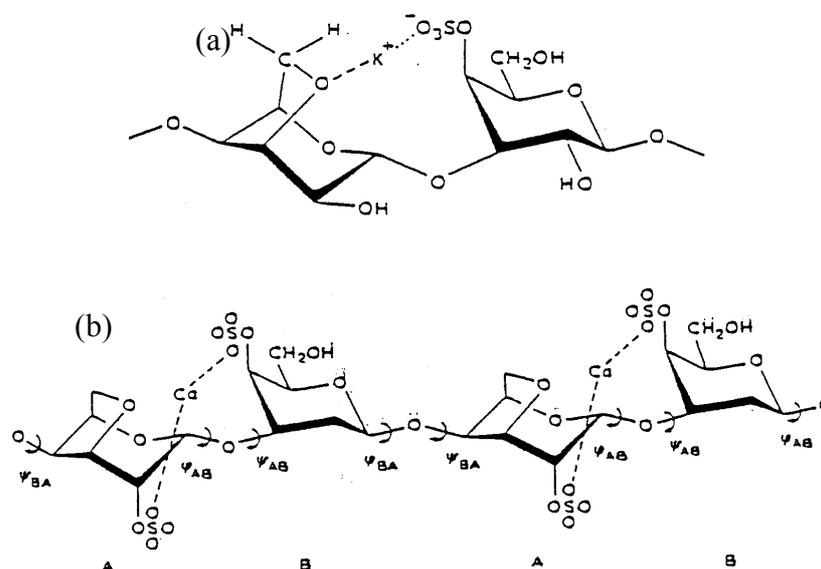
L'hypothèse des doubles hélices demeure cependant la plus défendue. Selon **Rees** [62], cette double hélice serait stabilisée par la présence de trois liaisons hydrogènes inter-chaînes par pas d'hélice.

La gélification est étroitement liée à la structure et à la conformation moléculaire des carraghénanes. Comme nous l'avons déjà vu, la persistance dans leur structure de

motifs précurseurs  $\alpha$ -D-Galactose-6-sulfate ou  $\alpha$ -D-Galactose-2,6-disulfate non transformés à l'issue de l'extraction perturbe la régularité de l'hélice polysaccharidique du fait de leur conformation C<sub>1</sub>. La présence de ces défauts ou "kinks" [62] fait dévier la chaîne macromoléculaire dans une direction différente. Le coude ainsi formé va jouer un rôle important dans la formation des nœuds ou zones de jonction à l'origine de la structure tridimensionnelle des gels de carraghénanes (Figure 14). En effet, des études par diffraction de rayons X, [62, 63] de la structure des gels de carraghénanes ont mis en évidence une organisation des doubles hélices en structures hexagonales, les sommets étant constitués de segments coudés ou "kink segments". Au niveau de ces coudes, les deux brins de la double hélice se sépareraient pour s'associer à nouveau ensuite avec des chaînes voisines. Si ces irrégularités de chaînes sont supprimées, on observe une perte du pouvoir gélifiant et la diffusion de la lumière met en évidence une dimérisation des chaînes au refroidissement. Ainsi, l'absence de "points d'arrêt" de la structure hélicoïdale limite la possibilité pour les chaînes de former des jonctions avec plusieurs partenaires [64].

Certaines équipes [60, 62] proposent une étape ultime d'association des chaînes sous formes d'agrégats soit par des liaisons de type ionique plus ou moins spécifiques, soit par des liaisons de plus faible énergie. Selon les auteurs, cette étape ferait partie intégrante du processus de gélification ou apparaîtraient au cours du vieillissement des gels. Un modèle d'association des doubles hélices impliquant des ions potassium a été proposé par **Rees** [62] pour les kappa carraghénanes afin d'explicitier la tendance des chaînes à former spontanément des agrégats. Un mécanisme d'agrégation des doubles hélices a aussi été proposé dans le cas des iota carraghénanes par **Arnott** [56] en réponse à l'observation de structures cristallines en présence d'ions divalents par diffraction de rayons X. Cette dernière hypothèse demeure cependant discutée par de nombreux auteurs [43, 58] qui considèrent la présence d'agrégats dans les gels de iota carraghénanes comme la conséquence de la présence d'impuretés de type kappa carraghénanes en plus ou moins grande proportion. De plus, les possibilités d'association des doubles hélices entre elles sous forme d'agrégats seraient limitées dans le cas des iota carraghénanes du fait des répulsions électrostatiques entre les groupes sulfates situés à l'extérieur de la double hélice, ce qui n'est pas le cas pour les kappa carraghénanes dont l'agrégation serait de ce fait facilitée. Cependant, **Tako** a

récemment proposé un mécanisme de pontage ionique spécifique des carraghénanes par les ions  $K^+$  dans le cas des kappa et par les ions  $Ca^{2+}$  dans le cas des iota (Figure 15).



**Figure 15: Formation de ponts intramoléculaires spécifiques de certains cations le long des chaînes de carraghénanes en solution aqueuse à basse température: (a) cas des kappa carraghénanes en présence d'ions potassium ; (b) cas des iota carraghénanes en présence d'ions calcium - les pointillés (...) figurent les liaisons de type ionique et les tirets (----) les forces d'attraction électrostatique [65]**

Ainsi, la qualité du gel obtenu dépend de la structure même des polysaccharides : dans les mêmes conditions de concentration en sels et en polymère, un gel de iota carraghénanes est plus élastique qu'un gel de kappa carraghénanes. En raison des faibles possibilités d'agrégation de leurs hélices, les iota carraghénanes conduisent à l'obtention d'un gel élastique, transparent et thixotrope. Au contraire, les nombreux agrégats présents dans le cas des gels de kappa carraghénanes les rendent cassants et donnent lieu à un phénomène de synérèse.

Le passage des solutions macromoléculaires de carraghénanes de l'état désordonné à l'état ordonné serait bien décrit par la loi du "tout ou rien", le système passant d'un état à l'autre rapidement et complètement en étant à l'équilibre avant et après la transition sol-gel. Les spectres obtenus par RMN du  $^{13}C$  à différentes températures pour un système aqueux de iota carraghénanes [66] montrent qu'à  $15^\circ C$ , la mobilité

des résidus est réduite par rapport à celle observée à 80°C, où les chaînes sont à l'état désordonné.

Des résultats obtenus par RMN du  $^1\text{H}$  [50] ont mis en évidence, comme dans le cas de la gélatine, la relaxation d'une certaine proportion de molécules d'eau placées à l'intérieur des nœuds de la double hélice. Cette eau de structure, en interaction forte avec les macromolécules, jouerait un rôle important dans la stabilisation des hélices et de la structure macromoléculaire, en plus des liaisons hydrogène et ioniques.

## 4 La synérèse

La synérèse correspond à l'expulsion du solvant (eau) contenu dans le gel au cours du temps. Elle se traduit par une instabilité des grandeurs physiques du gel (diminution de sa masse et de son volume), ce qui représente un inconvénient pour les éventuelles applications du matériau.

Dans la littérature, le terme de synérèse est utilisé aussi bien pour qualifier l'expulsion spontanée de liquide dans les peintures à base de latex contenant des épaississants type cellulosique ou uréthane [67], que la contraction de gels provoquée par un changement de pH [53] ou par l'application d'un champ électrique [68].

Dans les gels de biopolymères, la synérèse est décrite comme un processus spontané et thermodynamique conduisant le gel d'un état hors équilibre vers un état plus stable [69]. Il est supposé que la synérèse s'accompagne de la création et la rupture de liaisons dans le réseau macromoléculaire, entraînant une évolution des zones de jonction. De manière générale, le phénomène est d'autant plus important que la concentration en polymère est faible [69, 70].

## 5 Influence de différents paramètres physico-chimiques sur le comportement des carraghénanes

## 5.1 Influence de la concentration

Les carraghénanes possèdent la propriété d'augmenter considérablement la viscosité du milieu à de très faibles concentrations, inférieures à 1%. Ce comportement est la traduction macroscopique de l'existence d'enchevêtrements macromoléculaires qui apparaissent au-delà d'une concentration critique en polymère  $C_{cr}$  qui est une fonction inverse de la viscosité intrinsèque [71] :

$$C_{cr} = k / [\eta]$$

La constante  $k$  serait de l'ordre de 4 dans le cas des kappa carraghénanes.

La rigidité du gel augmente suivant une loi exponentielle avec la concentration en iota carraghénanes. Cependant la présence d'impuretés kappa non quantifiées peut entraîner la formation d'agrégats et fausser les résultats.

## 5.2 Influence de la température

Une gélification par diminution de la température d'un système aqueux de iota carraghénanes, avec des paliers de température suffisamment longs pour que le système atteigne l'équilibre avant de passer à la température suivante, montre que la rigidité du milieu ( $G'$  module conservatif ou élastique, traduit la composante élastique du milieu) augmente au cours de la gélification, d'abord rapidement au voisinage de la transition sol-gel puis de plus en plus lentement au fur et à mesure que la température diminue pour tendre vers un plateau [72]. La rigidité étant directement liée au niveau de réticulation du système, l'organisation du réseau de carraghénane dépend de la température et pratiquement pas du temps. **A une température donnée correspond un degré d'organisation (réticulation) du réseau de carraghénanes.**

Les valeurs de la température de transition sol-gel [73] pour un système aqueux de iota carraghénanes (contenant 0,15 M de NaCl) se situent dans le domaine 60-65°C, et entre 40-45°C pour des kappa carraghénanes, ces valeurs dépendant largement de la concentration en ions. A titre d'exemple, dans les résultats décrits par **Rochas** et ses collaborateurs [74], lorsque la concentration en KCl augmente de 0,1 à 0,4 M, la température de transition sol-gel du iota carraghénane augmente de 40 à 64°C.

### 5.3 Influence du temps

Le temps n'a que peu d'influence sur la gélification des carraghénanes. En effet, les modules élastique  $G'$  et dissipatif ou visqueux  $G''$  d'un système aqueux de kappa carraghénanes semblent atteindre un équilibre au bout d'un temps relativement court à une température inférieure à la température de gélification [73].

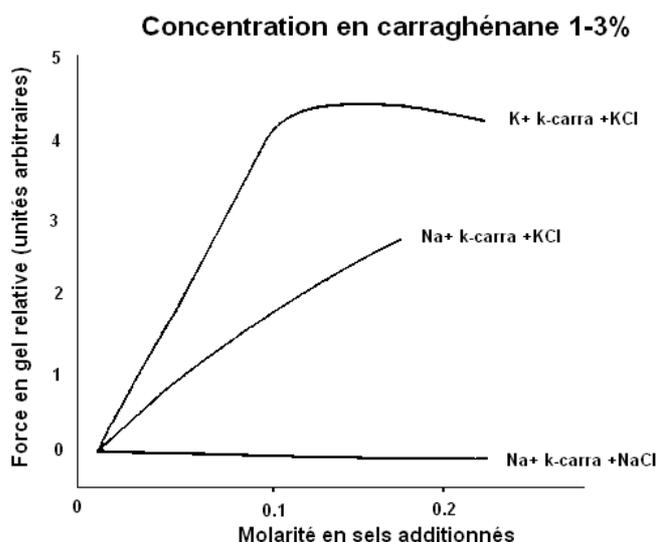
Des spectres en fréquence effectués après 2 et 60 heures de maturation ont globalement la même allure ascendante, comme si le gel était encore en phase d'évolution rapide, bien que le niveau de  $G'$  soit légèrement supérieur après 60 heures. Les gels de kappa carraghénanes se forment et acquièrent rapidement des caractéristiques proches de celles des gels à l'équilibre.

### 5.4 Effet des ions sur la transconformation

Les carraghénanes sont des polyélectrolytes anioniques. Contrairement aux électrolytes simples dont les propriétés sont bien modélisées à partir de lois idéales lorsque la concentration est faible, la dilution des solutions de polyélectrolytes provoque une forte perturbation des propriétés du système. Comme nous l'avons dit, les carraghénanes sont commercialisés sous forme de sels de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Mis en solution, ces contre-ions ne se dissocient pas dans leur totalité mais d'environ la moitié [74]. Les conformations étendues sont favorisées par des densités de charge élevées ; les macro-ions sont alors assimilables localement à des bâtonnets plus ou moins rigides en fonction de leur structure primaire, conformation favorisée par la présence de liaisons hydrogènes. Une variation de pH, de la température ou de la qualité du solvant peut induire un changement de conformation. Les caractéristiques du gel obtenu sont donc fonction du type d'ion présent dans la solution.

L'effet des ions (concentration, valence), de la température, de la concentration en poly-ions sur la transconformation du iota carraghénane a été étudié par polarimétrie [75-77]. Il ressort de ces travaux que :

La température de début de transconformation dépend de la concentration en sel [57] dont la présence est nécessaire pour induire un début de transconformation lorsque les systèmes sont très dilués.



**Figure 16 : Influence des ions sur la force des gels de carraghénanes [56]**

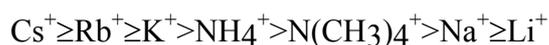
Une augmentation de la concentration en ion entraîne une augmentation de la stabilité des hélices et donc une augmentation de la température de transconformation [56, 58]. La gélification dépend donc du type d'ions présents dans la solution. A concentrations identiques en sel et en polymère, un gel préparé dans une solution de NaCl sera plus "mou" qu'un gel préparé dans une solution de KCl (**Figure 16**).

La taille du cation compensateur influence notablement la stabilité de la conformation de la molécule et la gélification. En présence de potassium, les gels de carraghénanes sont en effet très stables, même à température élevée. Dans les mêmes conditions de température et de concentration en sel et en polymère, il est très difficile d'obtenir un gel en présence d'ion  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Li}^+$ . Il existerait des sites spécifiques de fixation des contre-ions sur les chaînes de kappa carraghénanes. Cette sélectivité du kappa carraghénane a été expliquée par **Bayley** [54] à partir de clichés de rayons X : elle serait due à la taille de l'ion, bien adaptée à l'arrangement moléculaire. Par absorption d'ondes ultrasonores, **Rinaudo et coll** [78] ont montré la fixation sélective du

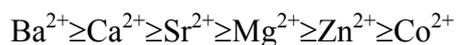
potassium avec formation de paires d'ions sur les kappa carraghénanes sous forme de pelote, réduisant la charge nette du polymère ainsi que sa solubilité. Ceci explique que le potassium induise très facilement la transition conformationnelle pelote-hélice et ensuite la formation du gel. Ces sites n'existeraient pas sur les chaînes de iota carraghénanes, toute spécificité observée dans ce cas provenant de fractions d'impuretés kappa [59, 79].

La valence des ions présents en solution semble jouer un rôle important sur la stabilité des hélices.

L'influence de l'addition de cations monovalents  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cs}^+$  sur les propriétés viscoélastiques de gels de carraghénanes a été étudiée [80]. L'ajout d'ions écrante les charges liées aux groupements sulfates des kappa carraghénanes. En l'absence de répulsions électrostatiques, les hélices stabilisées peuvent alors former des agrégats, ce qui a pour effet d'augmenter le module de **Young** (module d'élasticité). Cependant, celui-ci augmente davantage en présence de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cs}^+$  en raison de la plus grande mobilité des molécules qui les entourent et permet à ces cations de s'associer aux sulfates beaucoup plus efficacement. Par mesure des températures de transition, des classifications de l'effet des ions monovalents sur la stabilité de la conformation ont été proposées [81, 82]. On obtient par ordre décroissant :



Avec les ions bivalents, cette sélectivité ionique est moins marquée. Outre la taille de ceux-ci, il faudrait vraisemblablement tenir compte des pontages ioniques intermoléculaires. Une classification, selon laquelle l'ion baryum serait le plus favorable à la stabilité conformationnelle, a été donnée [83]. Mais la différence entre cations bivalents reste faible:



A faible concentration, il a été montré que les anions n'avaient pas d'influence [83] ; en revanche, utilisés à forte concentration, ils peuvent perturber la transition conformationnelle [71].

## 6 Conclusion

La composition chimique des carraghénanes est bien établie. La succession d'unités répétitives permet la formation d'une hélice droite dans des conditions de température et de solvant appropriées. Il existe cependant des **irrégularités ou défauts** dans la structure ou la substitution en différents points de la chaîne qui provoquent dans la conformation hélicoïdale des perturbations qui ont une grande importance dans le processus de gélification. La proportion et la nature de ces défauts, dont la connaissance date des progrès scientifiques en spectroscopie RMN du  $^{13}\text{C}$ , est un paramètre primordial à connaître car il détermine les propriétés de l'échantillon. Il a été reconnu par de nombreux auteurs que la méconnaissance de ce facteur dans de nombreuses publications rend l'interprétation des résultats obtenus sujette à caution.

Le processus de gélification des carraghénanes est encore sujet à controverses, notamment au niveau des possibilités d'association des chaînes entre elles (formation de doubles ou de simples hélices, agrégation ou formation de super-hélices) et au niveau du rôle et de la spécificité des ions.

Les carraghénanes présentent la capacité de former des gels thermoréversibles avec des domaines de transition sol-gel situés à des températures élevées. Cependant, le couple **composition ionique/température** aurait un rôle prédominant sur les gels. La composition et la force ionique du milieu conditionnent la conformation et les capacités de gélification des systèmes carraghénanes. De plus, l'évolution des structures de ces polysaccharides dans le temps est rapide : un état final stationnaire est atteint rapidement et conduit certains auteurs à parler de loi du "tout ou rien".

Nous venons de voir que le type de carraghénane et la nature des ions présents dans la solution durcissante ainsi que la température sont les paramètres clefs dans l'obtention d'un gel et donc, dans la fabrication de microsphères et que les plus satisfaisantes sur le plan morphologique et le plan mécanique seront obtenues à partir de kappa-carraghénane en présence de  $[\text{KCl}]$  0,6 M. Le choix de ces divers paramètres sera déterminant pour la suite du travail où la morphologie et la texture de l'hydrogel sera transmise à la matière inorganique au sein d'un matériau hybride carraghénane/silice.

## IV. Les matériaux hybrides :

---

### 1 Introduction

La possibilité de combiner les propriétés de composés organiques et inorganiques dans un matériau unique est un vieux « challenge » qui a débuté avec l'ère industrielle. Certains hybrides les plus représentatifs sont issus et dérivent de l'industrie des peintures et des polymères, où des pigments inorganiques ou des « agents de charge » sont dispersés dans des composants organiques (solvants, tensioactifs, polymères...) afin d'améliorer les propriétés optiques et mécaniques. Cependant le concept de matériaux « hybrides organiques-inorganiques » est apparu seulement très récemment avec la naissance de la « chimie douce » [84] qui a décalé la recherche vers des nanocomposites plus sophistiqués et des structures originales avec une valeur ajoutée plus grande. En effet, la chimie de sol-gel [85] permet de combiner au niveau nanométrique des composants inorganiques et organiques ou bioactifs dans un composé hybride simple, permettant ainsi d'accéder à un nouveau secteur très vaste de la science des matériaux [86].

### 2 La synthèse sol-gel

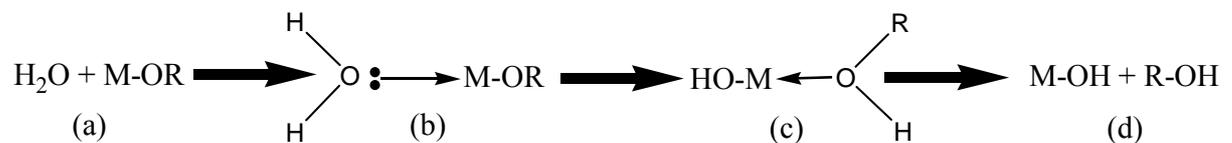
La synthèse sol-gel s'effectue en milieu liquide et repose sur des processus de nucléation et de croissance. Elle conduit, à partir de précurseurs moléculaires dilués dans un solvant (un **sol**), à la formation d'une structure solide et poreuse gonflée de liquide : appelé **gel**. Du mode de séchage de ce gel dépend la porosité du matériau sec finalement obtenu. Ce schéma général peut être détaillé dans le cas de la silice qui est au coeur des matériaux présentés dans ce travail.

## 2.1 Mécanisme réactionnel

Pour la silice, les précurseurs sont des alkoxydes de formule générale  $\text{Si}(\text{OR})_4$  où R est un groupement organique alkyl  $\text{C}_n \text{H}_{2n+1}$ . Ce précurseur de base peut présenter de nombreuses variations. Les quatre fonctions, non nécessairement identiques, peuvent ainsi ne pas être toutes réactives :  $(\text{RO})_3\text{-Si-R}'$  ou  $(\text{RO})_3\text{-Si-R}'\text{-Si}(\text{OR})_3$ . Dans ce cas, l'obtention d'un réseau solide est conditionnée par le nombre de fonctions alkoxydes par monomère et par les caractéristiques de la chaîne R' (longueur, enchevêtrement, fonctions internes). Toute la variété des systèmes obtenus repose en fait sur deux réactions chimiques :

### 2.1.1 Une réaction d'hydrolyse :

L'hydrolyse d'un alkoxyde métallique a lieu lorsqu'il se forme des groupements hydroxo M-OH en présence d'eau.



- Addition nucléophile d'une molécule d'eau sur l'atome métallique chargé positivement.
- Etat de transition dans lequel le degré de coordination du métal a augmenté d'une unité.
- Le proton de la molécule d'eau est transféré sur l'atome d'oxygène d'un groupement (OR) chargé négativement. Dans cet état de transition, le groupe partant sera celui portant la plus grande charge positive.

Ce mécanisme (a)→(d) est un mécanisme de substitution nucléophile. La distribution des charges régit la thermodynamique et la cinétique de cette réaction qui sera fortement favorisée lorsque :

- Le caractère nucléophile de la molécule entrante et le caractère électrophile de l'atome métallique sont forts :  $\delta(\text{O}) \ll 0$  et  $\delta(\text{M}) \gg 0$  ( $\delta$ =charge partielle)
- Le caractère nucléofuge de la molécule partante est fort :  $\delta(\text{ROH}) \gg 0$

- La différence d'énergie entre le degré maximum de coordination du métal avec son état d'oxydation (N-z) est élevé (faible énergie d'activation pour l'étape a).

- Le caractère acide du proton est fort (faible énergie d'activation dans l'étape b).

Evidemment ce mécanisme est fortement influencé par le pH et il diffère alors par les espèces mises en jeu.

#### 2.1.1.1 Influence du pH sur l'hydrolyse

La figure 17 illustre l'influence du pH sur la vitesse d'hydrolyse et condensation des alkoxydes. En milieu **acide**, un groupe alkoxyde se protone, et diminue l'électronégativité de l'atome de silicium qui le porte. L'eau procède alors à une attaque nucléophile sur cet atome selon un processus de type SN2. Le mécanisme réactionnel associatif donne lieu à un état de transition penta-coordiné, qui défavorise la présence de substituants à fort encombrement stérique (empêchant l'approche du nucléophile) ou accepteurs d'électrons (défavorisant la présence de charges positives). L'hydrolyse du premier groupe alkoxy est donc plus rapide que celle des groupes suivants. Pour la même raison, l'hydrolyse du TétraMéthoxyOrthoSilane (TMOS) est plus rapide que celle du TétraEthoxyOrthoSilane (TEOS) elle-même beaucoup plus rapide que celle du TétraButoxyOrthoSilane (TBOS).

En milieu **basique**, l'eau se dissocie pour former des ions hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ) qui peuvent attaquer l'atome de silicium selon un mécanisme de type SN2. L'état de transition est penta-coordiné et porte une charge négative qui se répartit sur la totalité des ligands du silicium. Ce processus inductif est donc sensible aux effets stériques des substituants. L'hydrolyse est favorisée par des substituants à faibles encombrements stériques ou accepteurs d'électrons (tel que  $-\text{OH}$  ou  $-\text{OSi}$ ). Contrairement à ce qui a lieu en milieu acide, c'est l'hydrolyse du premier substituant qui est l'étape limitante de l'hydrolyse d'un tétraalkoxysilane. L'ordre de vitesse d'hydrolyse du TMOS, TEOS et du TBOS reste le même qu'en milieu acide (TMOS > TEOS > TBOS).

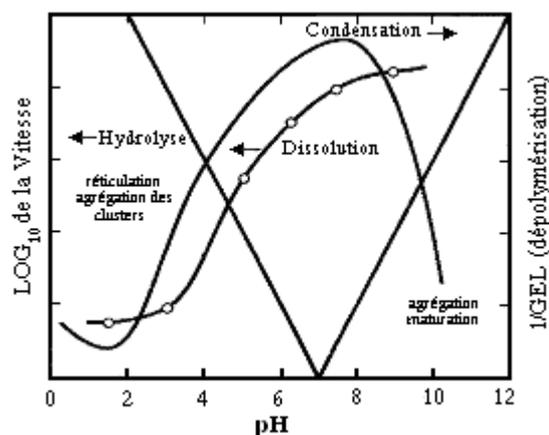


Figure 17: Influence du pH sur les vitesses d'hydrolyse et de condensation d'alkoxydes de silice et de dissolution de silice. La vitesse de condensation est reportée comme l'inverse du temps de formation de gel. [87, 88]

### 2.1.1.2 D'autres paramètres influencent l'hydrolyse :

La quantité d'eau (notée  $R = H_2O / Si$ ) influence fortement la vitesse d'hydrolyse et /ou l'avancement de la réaction pour de faible valeur de  $R$ .

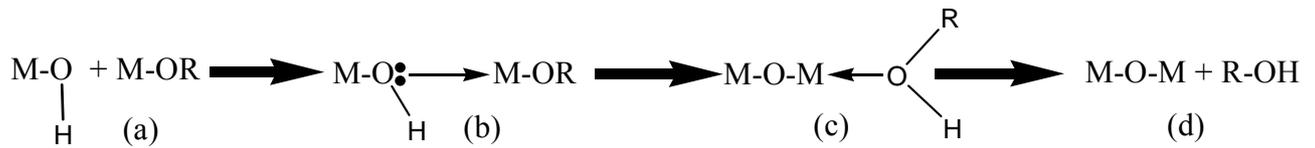
La réaction peut être accélérée par l'ajout de catalyseurs tels que des acides minéraux, l'ammoniaque (très souvent utilisée dans les procédés sol gel), l'acide acétique, KOH, les amines, et des fluorures de type NaF, KF ou HF.

Les co-solvants permettent d'éviter une séparation de phase liquide-liquide lors des premiers instants de l'hydrolyse et sont aussi souvent utilisés pour faciliter le séchage des gels formés. Leur nature n'est cependant pas sans effet sur les cinétiques d'hydrolyse. En effet, un solvant protique (méthanol, éthanol, formamide) forme des liaisons hydrogènes avec les ions  $OH^-$  ou  $H^+$ , réduit leur activité catalytique et ralentit l'hydrolyse. Inversement, un solvant aprotique (DMF, THF) renforce les propriétés nucléophiles de  $OH^-$  et électrophiles de  $H^+$  et favorise l'hydrolyse.

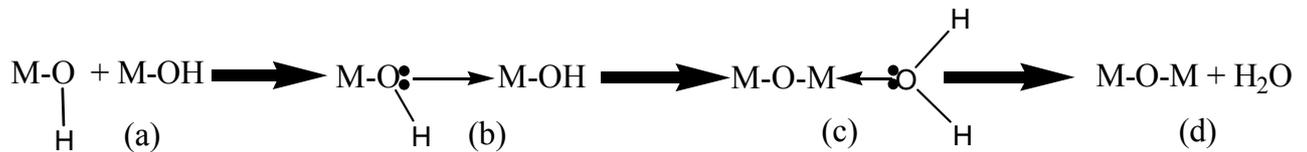
### 2.1.2 Des réactions de polycondensation :

L'étape de condensation est également un mécanisme complexe qui a lieu dès que des groupements hydroxo sont formés. On doit considérer lors de la condensation, trois mécanismes compétitifs : l'alcoxolation, l'oxolation et l'olation.

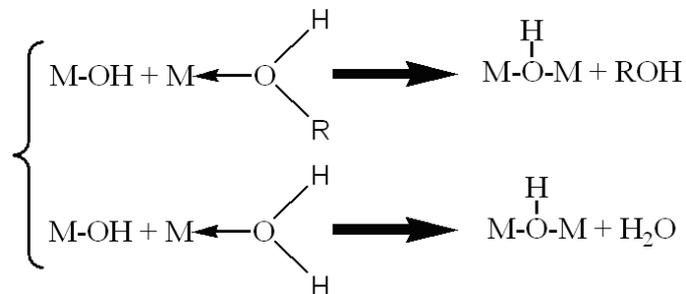
**L'alcoxolation** est une réaction dans laquelle une molécule d'alcool est éliminée lors de la condensation. Il en résulte la formation d'un pont « oxo » entre deux atomes métalliques (liaison M-O-M). Le mécanisme réactionnel est identique à celui de l'hydrolyse en remplaçant le proton (H) par un atome métallique (M).



**L'oxolation** suit le même mécanisme que l'alcoxolation mais, le groupe R de la molécule partante est un proton. Donc on aura élimination d'une molécule d'eau = condensation par déshydratation.



**L'olation**, par contre, aura lieu si l'atome métallique sous sa forme alkoxyde n'a pas atteint son degré de coordination maximum. Il se crée alors des ponts « hydroxo » entre les atomes métalliques (liaison M-OH-M) par l'élimination d'une molécule de solvant. Cette dernière peut être soit H<sub>2</sub>O soit ROH ce qui dépendra de la concentration en eau dans le milieu réactionnel.



La thermodynamique de cette substitution nucléophile est régie par les distributions de charges. La réaction est fortement favorisée si le caractère électrophile du métal et le caractère nucléophile du groupe entrant sont forts :  $\delta(\text{O}) \ll 0$  et  $\delta(\text{M}) \gg 0$ . ( $\delta(\text{Si}) = 0.32$  dans le cas de l'alkoxyde Si(OEt)<sub>4</sub>) [85].

Ces quatre réactions (l'hydrolyse, l'alcoxolation, l'oxolation et l'olation) jouent un rôle déterminant lors de la transformation du précurseur métallique en un réseau d'oxyde métallique. En effet la structure et la morphologie de cet oxyde dépendent de la contribution relative à chaque réaction. De ce fait la nature du groupement R de l'alcoxyde, va avoir une répercussion différente sur chacune des réactions. Les paramètres externes comme la température, la concentration, le type de solvant, ou le rapport eau/alcoxyde, vont aussi avoir une grande influence sur tous les mécanismes réactionnels.

## 2.2 Croissance des particules et influence du milieu sur le mécanisme

Ces réactions assurent la croissance d'architectures moléculaires dont la brique de base est un tétraèdre au centre duquel se trouve un atome de silicium, brique également constitutive de la silice massive [89]. La compétition entre hydrolyse et condensation [87, 88] conditionne l'équilibre entre le grossissement de particules denses et leur collage [90]; elle détermine ainsi, **à l'échelle du nanomètre**, la géométrie des structures formées. Cette compétition est contrôlable chimiquement par le pH et la salinité des solutions, lesquels modifient la vitesse des réactions et la charge superficielle des particules formées. En milieu modérément acide ( $\text{pH} > 1$ ), l'hydrolyse est rapide devant la condensation (Figure 18). Il y a alors formation rapide de petites particules nanométriques (0,5 - 2 nm) par cyclisation de chaînes. Ces particules s'agrègent ensuite pour former des amas polymériques ramifiés. A l'inverse, en milieu basique ou neutre, l'hydrolyse est la réaction limitante et les particules formées par condensation sont progressivement alimentées en monomères. Ce mécanisme favorise alors la croissance de particules denses (10 - 100 nm). La phase d'agrégation des particules en amas est indispensable pour obtenir la gélification. En effet, les amas issus du collage entre particules sont poreux et la fraction volumique qu'ils occupent croît avec leur taille. Lorsque cette fraction avoisine 1, les amas atteignent leur taille maximale et leur connexion engendre un réseau tridimensionnel qui occupe tout l'échantillon, lequel devient

macroscopiquement solide. C'est le phénomène de gélification, qui génère un réseau solide emprisonnant des solvants : un **gel**.

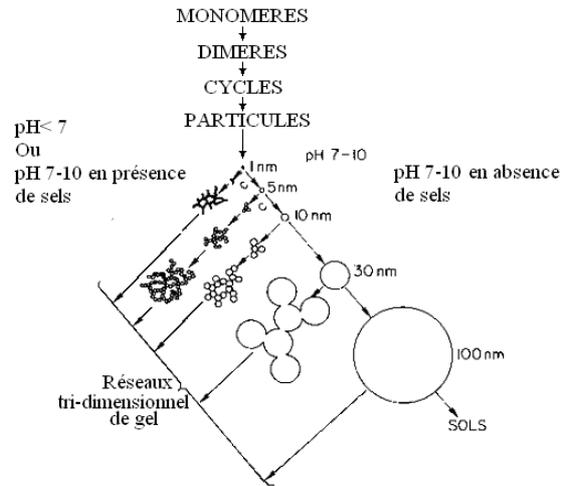


Figure 18: Mécanismes de polymérisation de la silice en solution aqueuse selon les conditions expérimentales utilisées [90]

Ce réseau présente une porosité dont la distribution s'échelonne de la taille des particules à celle des amas. Cette porosité est contrôlable par la taille et la concentration des particules initiales ainsi que par le mécanisme d'agrégation qui détermine le degré de ramification. Au-delà de la gélification, les réactions chimiques se poursuivent et modifient la distribution en taille des pores du gel. Enfin, l'obtention d'un matériau passe par une étape de séchage qui consiste à évacuer le solvant en dehors du réseau polymérique. Cette opération s'effectue généralement à température ambiante elle conduit à un gel sec (ou *xerogels*) transparent. En condition supercritique elle conduit à un gel sec (ou *aérogel*).

Donc la synthèse sol-gel et l'optimisation du procédé a permis le développement des matériaux multifonctionnels. Ce qui a eu un impact important dans des applications concernant plusieurs domaines comme, l'optique, l'électronique, ioniques, mécanique, membranes, enduits protecteurs, catalyse, sondes, biologie [86, 91]. La compréhension et la maîtrise des interactions entre le système moléculaire « invité » et la matrice « hôte » permet de contrôler les propriétés de ces matériaux hybrides.

Quelques produits issus des matériaux hybrides sont déjà en applications. Par exemple Toshiba a commercialisé plusieurs millions de téléviseurs équipés d'un écran recouvert de colorants inclus dans une matrice de silicate /zirconium.

Certains groupes de recherche ont développé des matériaux hybrides organique /inorganique. Néanmoins leur but premier n'était pas la synthèse d'hybrides mais de transférer la structure de composés organiques à des composés inorganiques et ensuite d'éliminer la phase organique. Cependant il s'agit bien de synthèses de matériaux hybrides. Les « templates » utilisés peuvent être de nature synthétique, ou des polymères naturels.

### 3 Matériaux hybrides organique/inorganique

Nous avons volontairement réduit l'étude bibliographique aux matériaux hybrides avec un support (template) organique ou biominéral car le domaine des hybrides et matériaux composites est très vaste. En effet, notre but étant au départ d'utiliser le kappa-carraghénane comme support, nous nous sommes attachés à comprendre et étudier l'état de l'art sur les interactions polysaccharides/silice et le biomimétisme. Cependant, nous avons vu que certains concepts de synthèse, basés sur des supports synthétiques pouvaient être adaptés à notre problématique. De plus une autre limitation à cette étude est due au fait que notre objectif est d'élaborer **des matériaux sous forme de microsphères**.

#### 3.1 Supports polymériques synthétiques

De nombreux polymères synthétiques ont été utilisés comme support et principalement sous forme de particules colloïdales pour la préparation de matériaux inorganiques structurés. Beaucoup de méthodes différentes ont été développées pour le recouvrement de ces particules, l'élimination du support organique et généralement faite par dissolution ou calcination. Le support le plus couramment utilisé est le polystyrène sous forme de nanoparticules synthétisé par miniémulsion ( consiste à de petites gouttes de 30-300nm d'huile ou d'eau) (Figure 19). Ensuite, les, particules sont recouvertes de différentes substances inorganiques comme des oxydes métalliques ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$ ...) [92-96].

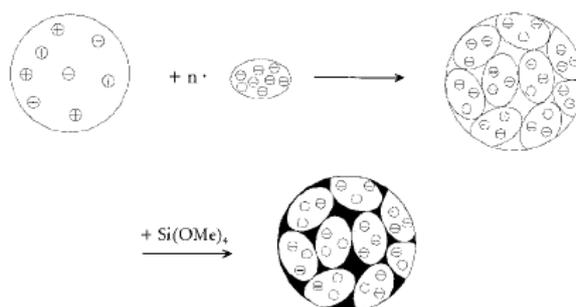


Figure 19 : Schéma de synthèse de nanoparticules hybrides de polystyrène/ $\text{Si}(\text{OMe})_4$  par miniémulsion [92].

Un autre concept de synthèse d'hybrides en plusieurs étapes a été développé par l'équipe de **F.Caruso** [97]. Leur travail consiste à recouvrir des particules colloïdales organiques par des substances inorganiques grâce à un phénomène d'adsorption (Figure 20).

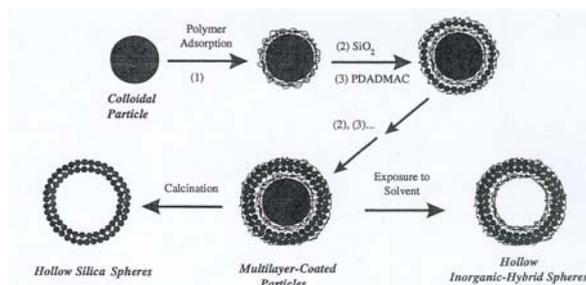


Figure 20 : Illustration de la procédure pour la préparation de sphères hybrides ( PDADMAC = poly(diallyldiméthylammonium chloride) ) [97].

Des nanoparticules de latex sont aussi utilisées par **Okuyama et coll** [98] pour créer de nouvelles particules de silice mésoporeuses.(Figure 21)

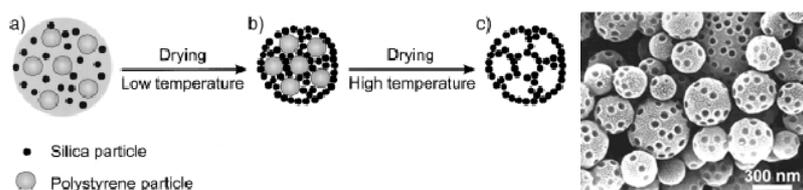


Figure 21 : Formation de particules de silices mésoporeuses et image MEB des particules de silice obtenues [98].

Un mélange de particules de latex et de silice sont pulvérisées dans un réacteur vertical (a). Après évaporation du solvant de pulvérisation les particules s'auto-organisent (b) ; pour finir, un séchage à haute température conduit à des particules de silice mésoporeuse (c).

L' équipe de recherche de **Z. Yang** [99] a montré que des sphères à base de polystyrène sulfoné par une solution d'acide sulfurique, suivi d'une polymérisation de

monomères d'aniline en surface, conduit après condensation en voie sol-gel d'un précurseur silicique à un matériau hybride silice/polyaniline (Figure 22).

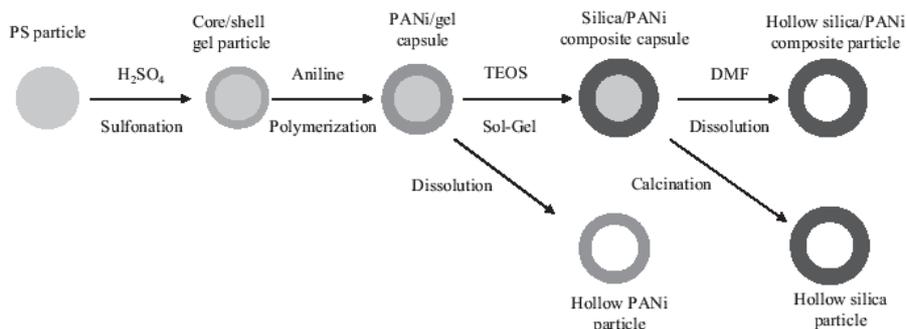


Figure 22 : Représentation schématique de la préparation de capsules hybrides de polyaniline/silice et de sphères creuses de silice [99].

Dans leurs travaux, ils ont montré que des groupements  $\text{SO}_3^-$  favorisaient l'adsorption de monomères d'aniline qui elle-même induisait la condensation de précurseurs siliciques pour former un matériau hybride.

Il existe de nombreux autres concepts et voies de synthèses de matériaux hybrides basés sur des supports synthétiques, mais ceux qui nous intéressent sont basés sur des supports polymériques extraits de substances naturelles organiques.

### 3.2 Supports polymériques naturels ou biomimétiques.

Le biomimétisme est un apport de la biologie au domaine des matériaux avancés se basant sur le savoir-faire de certains organismes vivants dans l'élaboration de systèmes. Son étude peut conduire, via la transcription des règles et des modes de construction, au développement de matériaux et systèmes nouveaux ou plus performants. Le biomimétisme est donc un concept de première importance, dans la mesure où les matériaux avancés s'affirment comme un domaine technologique de caractère stratégique. Il est cependant des domaines d'applications privilégiés comme tout matériau destiné à recueillir un organisme vivant (cellule) et les biomatériaux implantables destinés à remplacer un tissu ou un organe défaillant. C'est pourquoi la plupart des matériaux biomimétiques ont été développés à partir de macromolécules d'origine naturelle comme les polypeptides, protéines et les polysaccharides.

### 3.2.1 Hybrides protéines/silice.

Dans cette catégorie d'hybride nous pouvons considérer deux familles. En effet les protéines peuvent être extraites directement d'un organisme vivant, on les nommera protéines naturelles et dans le cas contraire protéines synthétiques.

#### 3.2.1.1 Hybrides protéines naturelles/silice.

Les interactions entre protéine et précurseur silicique ont été modérément mais régulièrement étudiées depuis plus de 50 ans [90]. Pour donner un exemple **Holt et coll** furent les pionniers en 1954 en étudiant les interactions entre méthémoglobine, insuline, albumine, gélatine, collagène et l'acide silicique  $\text{Si}(\text{OH})_4$  en solution.

Plus récemment **Osaka Akiyoshi et coll** [100] ont travaillé sur une nouvelle approche pour fabriquer des hybrides poreux à base de gélatine et de siloxane. En effet, ils ont combiné par voie sol-gel de la gélatine et du 3-(glycidoxypropyl) triméthoxysilane (GPSM). Les résultats montrent que les molécules de GPSM pontent les chaînes de gélatine. La densité de ces pontages est en relation directe avec la vitesse de dégradation de la gélatine dans le composé hybride. De plus, ils ont montré que la température de congélation lors du séchage par lyophilisation a une forte influence sur la porosité de l'hybride. Il s'avère que la température de congélation permettrait de contrôler la taille des pores de l'hybride : à  $-17^\circ\text{C}$  des pores de 300-500  $\mu\text{m}$ , à  $-80^\circ\text{C}$  des pores de 30-50  $\mu\text{m}$  et à  $-196^\circ\text{C}$  des pores de 5-10  $\mu\text{m}$ . Cette modularité des pores pourrait permettre d'envisager de nombreuses applications notamment dans la régénération de tissus cellulaires.

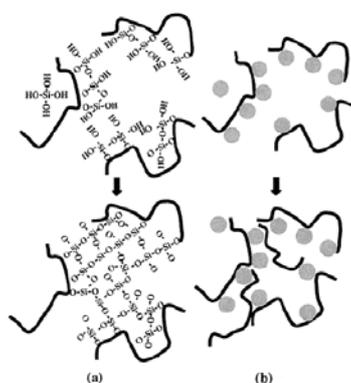
**J. Livage et coll** ont montré en étudiant des phénomènes de biominéralisation que les diatomées sont capables de synthétiser un squelette composé à 75% de  $\text{SiO}_2$  à partir de la silice dissoute dans l'eau de mer et dans des conditions (concentration, pH, température) qui ne permettraient pas de réaliser une telle synthèse en laboratoire [101, 102].

Certaines de leurs études récentes mettent en évidence l'intervention de certaines protéines qui favorisent la condensation de la silice [103]. En effet leurs travaux mettent en évidence que les interactions du lysozyme et l'albumine bovine avec des solutions diluées de silicate de sodium à pH 7,2 et 4,7 conduisent à la formation d'agrégats de silice incorporant du lysozyme, alors que l'albumine bovine favorise la formation d'un gel composite silicate-BSA. Ils ont étudié l'influence d'acides aminés

(lysine, serine, proline, ...) et ont observé une faible interaction avec les précurseurs siliciques aqueux [102].

### 3.2.1.2 Hybrides protéines synthétiques/silice.

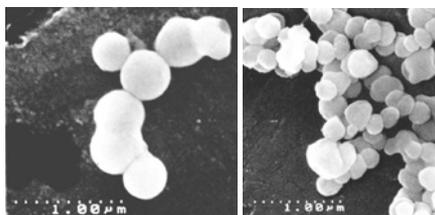
Après avoir choisi un système modèle constitué d'une solution diluée de silicate de sodium mise en présence d'acides aminés ou d'homopeptides, **J Livage et coll** ont montré que deux peptides, la poly-L-lysine et la poly-arginine, favorisaient la condensation de la silice [101, 102]. Ces études, menées en fonction du pH et de la longueur de la chaîne polymère les ont amenés à proposer un modèle d'activation mettant en jeu l'adsorption des silicates sur les peptides, ces silicates servant de sites de nucléation pour la formation du gel de silice. L'interprétation de ce processus repose sur l'existence d'interactions faibles (liaison hydrogène, attraction électrostatique) entre les précurseurs de silice et certaines fonctions ( $\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{OH}\dots$ ) des acides aminés. Autrement dit, c'est sans doute la chaîne peptidique qui rapproche les précurseurs et favorise leur condensation. Cette étude a été étendue à des nanoparticules de silice (LUDOX) qui peuvent être, en présence des mêmes peptides, assemblées en chapelets sur les chaînes de polymère avant de former un solide hybride [101]. (Figure 23)



**Figure 23 : Illustration schématique de modèles de gélification et de floculation (a) gélification pour un mélange de silicate/Poly-L-Lysine , (b) floculation pour un mélange Ludox/Poly-L-Lysine.**

**Shinkai et coll** [104] ont optimisé la confection de cavités sphériques siliciques en voie sol-gel par recouvrement d'agrégats de poly-L-lysine et de différentes amines. Ils ont montré que les agrégats avaient une forte dépendance à la lipophilicité des amines employées, ce qui induit la formation ou pas de sphères de silice. Certains groupes comme celui de **Patwardhan**, ont eux aussi étudié la synthèse de matériaux hybrides

bioinspirés [105]. Ils ont démontré à leur tour que la poly-L-lysine facilite la silification à pH neutre ainsi que la formation de structures particulières de formes de particules sphériques et hexagonales en pétales et feuillets (figure 24).



**Figure 24 : Agrégats de particules sphériques et hexagonales issue de biosilification en présence de PLL [106].**

Ils ont continué leurs investigations en étudiant l'influence sur la biosilification de composés dont la poly-L-Arginine, la poly-L-Histidine, mais aussi des composés comme la poly-allylamine hydrochloride et même une séquence de 19 acides aminés [107-110].

### **3.2.2 Hybrides polysaccharides/silice.**

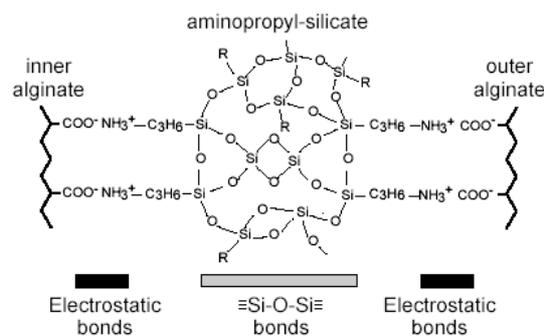
L'association de biopolymères et de composés minéraux est commune à de nombreux matériaux naturels. Une telle combinaison assure une cytocompatibilité et mène souvent à des propriétés mécaniques exceptionnelles [111]. Parmi ces composés bioorganiques les polysaccharides sont les plus utilisés. En effet, ils peuvent être utilisés comme support pour la phase minérale et lui induire sa forme et sa morphologie [112]. Dans ce contexte, de récentes études ont été menées pour comprendre le rôle de la biomolécule sur la polymérisation silicique de plusieurs microorganismes [113-115]. En parallèle, une approche biomimétique des matériaux à base de silice a été développée pour la synthèse de matériaux bio-hybrides afin de concevoir de nouveaux matériaux pour l'immobilisation d'enzymes et de cellules. [116]. Pour cela, nous avons choisi d'étudier les principaux polysaccharides représentés par les alginates et carraghénanes chargés négativement et les chitosans chargés positivement.

#### **3.2.2.1 Hybrides alginate/silice**

L'équipe de **J. Livage** a étudié la formation et les propriétés de biocomposites à base de silice et d'acide alginique [117]. Ce copolymère d'acides L-gulonique et D-

mannuronique peut être gélifié par addition d'ions métalliques divalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et dissous avec un agent complexant (citrate). Pour éviter au maximum les dommages sur d'éventuelles entités biologiques ils ont utilisé une solution de silicate de sodium comme source de silice, plutôt que les alkoxides. Ils ont montré que la synthèse de nouveaux biocomposites organique inorganique est possible et laisse présager une bonne activité dans la biomorphogénèse de solides.

Pour favoriser les interactions électrostatiques entre l'acide alginique chargé négativement à  $\text{pH} = 7$  ( $\text{pK}_{\text{a}}_{\text{alginate}} = 5$ ) et la silice, le groupe de **Sakai** [118-122] a utilisé des précurseurs siliciques de type aminopropyl-silicate. Ils ont proposé un mécanisme d'auto-assemblage électrostatique représenté schématiquement ci-dessous (Figure 25).



**Figure 25 : Schéma représentatif des interactions électrostatiques entre l'alginate et l'aminopropyl-silicate [118].**

Cette interaction a permis la synthèse de microcapsules renfermant des îlots de Langerhans pour jouer le rôle de pancréas bioartificiel. **Sakai et coll** ont montré que la paroi Alg/AS/Alg de ces microcapsules présenterait une perméabilité optimum : c'est-à-dire qu'elle laisse passer les nutriments cellulaires et les catabolites et empêcherait tout échange de macromolécules (ex : immunoglobulines) ce qui est requis pour une membrane de microcapsule servant de pancréas artificiel.

Une autre approche similaire du concept de microsphères d'alginate chargées avec des cellules animales et recouvertes de silice a été présentée par l'équipe de recherche de **Carturan** [123]. Ils présentent une nouvelle technologie de microencapsulation de cellules animales dont le schéma est représenté sur la figure suivante.

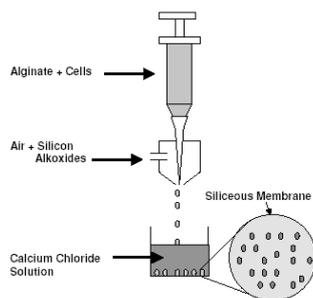


Figure 26 : Schéma de fabrication des capsules de Ca-alginate + SiO<sub>2</sub> [123].

Cette nouvelle technologie leur a permis l'obtention de capsules avec un cœur d'alginate et une enveloppe de silice qui améliore la stabilité mécanique et chimique tout en préservant les cellules encapsulées, traduisant ainsi, le potentiel de la chimie douce et permettant le maintien des fonctions vitales des organismes ainsi encapsulés.

### 3.2.2.2 Hybrides chitosan/silice

**Pedroni et coll** ont synthétisé pour la première fois un matériaux silicique poreux via une hydrolyse hydrothermique (140°C pendant 48h) de silicate de sodium, utilisant le chitosan comme support [124]. Leurs travaux ont mené à la synthèse de fibres macroscopiques étant formées par un réseau silicique en éponge (spongelike) avec des pores de 0,57  $\mu\text{m}$ . Cette structure semble être due à l'agrégation des hélices hydratées de chitosan en paquets de fibres parallèles avec différentes tailles et la gélification du système. Cette agrégation pourrait être induite par l'addition du silicate.

**S. Mann** et coll ont beaucoup travaillé sur la compréhension des phénomènes de biominéralisations et sur le biomimétisme en général. Parmi leurs nombreuses communications, une a retenu notre attention [125]. Dans cette étude ils décrivent une stratégie biomimétique pour la production de matériaux composites siliciques présentant des chambres ordonnées macroporeuses. Pour cela, ils ont utilisé une matrice organique isolée à partir d'os de seiche *Sepia officinalis*. L'os de seiche est une structure (coquille) interne très organisée constituée de carbonate de calcium associée avec de la chitine. Cette coquille a une architecture spongieuse (porosité de 93% vol ; densité de 0,19) arrangée en feuillets parallèles (Figure 27a).

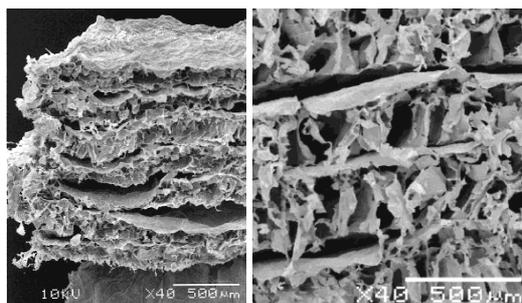


Figure 27 : a) Structure spongieuse en feuillets parallèles de l'os de seiche ; b) Structure macroporeuse de la réplique silicique. [125]

Ils ont montré que la chitine de l'os de seiche peut être utilisée comme support hautement organisé avec une porosité macroscopique pour préparer une réplique analogue en silice-polysaccharide structurée en forme de boîtes en trois dimensions interconnectées (Figure 27b). Leurs résultats indiquent que le contenu inorganique et la réplique composite peuvent être contrôlés en utilisant des solutions alcalines éthanoliques avec diverses concentrations de silicate. La spécificité du support organique dépend aussi du degré d'acétylation de la chitine.

Un nouveau type de matériaux hybrides silice sol-gel/organique a été développé pour la fabrication de biocapteurs ampérométriques. Ces matériaux sont conçus à partir de chitosan et utilisés sous forme de film pour immobiliser des enzymes [126-128]. La synthèse de l'hybride se distingue des autres méthodes couramment employées, par l'utilisation d'un agent de réticulation jouant le rôle de pont entre le chitosan et l'agent de silication (Figure 28).

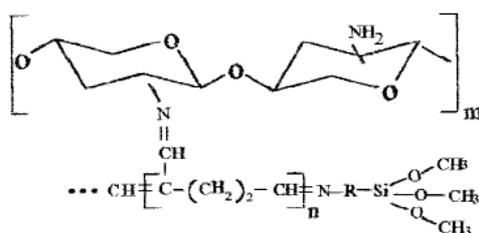


Figure 28 : Représentation schématique du pontage covalent du glutaraldéhyde entre le chitosan et l'organosilane [126].

L'organosilane est de la forme  $(\text{CH}_3)_3\text{-Si-R-NH}_2$  avec R pouvant varier  $-(\text{CH}_2)_3-$  ;  $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-(CH}_2)_2-$  ;  $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-(CH}_2)_2-$ .

Le groupe de recherche de **A. J. Hunt** [129] a développé un hybride chitosan/silice en utilisant une solution acide de chitosan pour catalyser l'hydrolyse et la condensation des tétraéthylorthosilicates. Mais ce qui rapproche leurs travaux aux nôtres, c'est la voie d'obtention de l'hybride sec. En effet ils procèdent eux aussi à un séchage en

milieu CO<sub>2</sub> super-critique pour obtenir des aérogels à haute surface spécifique (470 à 750 m<sup>2</sup>/g).

Dans le cadre de la mise au point de nouveaux systèmes catalytiques énantiosélectifs, nous avons élaboré des matériaux à base de chitosan et de silice sous forme de billes. (Figure 29)

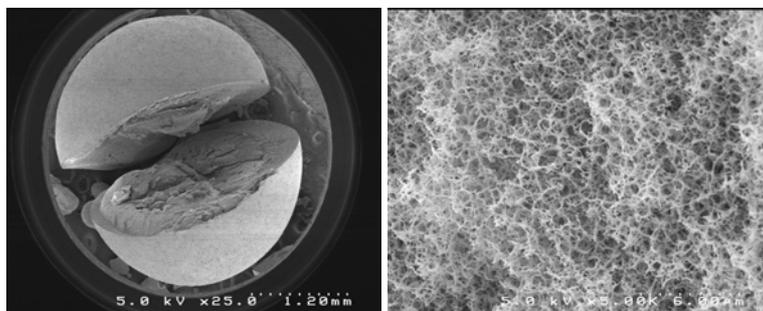


Figure 29 : Images de microscopie électronique à balayage du matériaux hybride chitosane/silice. a) bille sectionnée. b) vue agrandie de la surface interne.

L'objectif étant de transmettre à la silice et donc au matériau hybride la chiralité spatiale du biopolymère. Ces travaux font l'objet d'une publication soumise et acceptée dans *Chemistry of Materials*.

### 3.2.2.3 Hybrides carraghénane/silice

La littérature reste encore très pauvre sur la description et la synthèse de matériaux hybrides à base de carraghénane et silice. En effet, **Y.A.Shchipunov** décrit la synthèse en voie sol-gel de biomatériaux à base de silice et carraghénane [130]. L'objectif de cette étude était d'examiner le THEOS (tétrakis(2-hydroxyethyl) orthosilicate) comme précurseur silicique pour préparer des biomatériaux hybrides avec du carraghénane et étudier la formation, les propriétés et la structure des nanocomposites en fonction de la nature du carraghénane. Ils se sont appuyés sur des études calorimétriques (DSC) et rhéologiques dynamiques tout en examinant des clichés de microscopie à balayage électronique (Figure 30).

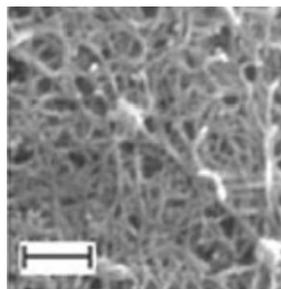
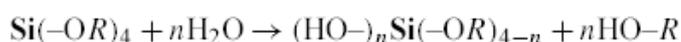


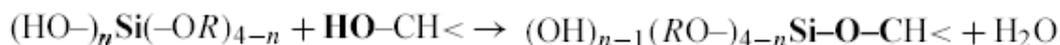
Figure 30 : Image du réseau de fibres issu de l'aérogel du biocomposite à base de 0,5% de  $\kappa$ -carraghénane et de silice [130].

Il suggère donc que la formation des biomatériaux de silice avec du carraghénane peut être représentée par trois étapes.

i) Hydrolyse du précurseur silicique d'après la réaction suivante :



ii) Condensation des monomères formés sur une macromolécule de polysaccharide en suivant la réaction suivante :



HO-CH représente un groupe hydroxyle de la macromolécule de polysaccharide.

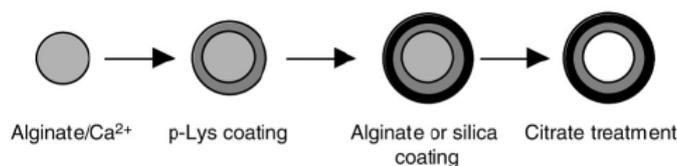
iii) Polycondensations des silanols liés aux macromolécules de polysaccharides avec les silanols issues de la réaction d'hydrolyse du précurseur THEOS. Ce qui abouti à une coquille de silice entourant des macromolécules de polysaccharide.

Ainsi ces travaux sont complémentaires à notre étude mais différent.

#### 3.2.2.4 Hybrides combinaison polysaccharides/polyélectrolyte/silice

Des études préliminaires sur les interactions entre des polypeptides et des solutions aqueuses de silicates ont permis à **J. Livage et coll** de mieux comprendre l'effet de la poly-L-lysine utilisée comme un recouvrement sur des billes de gel d'alginate elles-même utilisées comme support pour la formation de sphères hybrides organique/silice (Figure 31) [131].

Ils ont montré que le recouvrement de la bille d'alginate par de la silice et la PLL renforce considérablement les propriétés mécaniques de celle-ci. De plus, ils ont démontré l'applicabilité de ces sphères, dans l'encapsulation de  $\beta$ -galactosidase avec 60% à 70% de rétention d'activité enzymatique.



**Figure 31 : Représentation schématique étape par étape de la formation des billes creuses [131].**

Ce dernier concept de synthèse nous a paru être le plus approprié à la synthèse de matériaux hybride carraghénane/silice. Etant donné que le kappa-carraghénane et l'alginate sont tous deux chargés négativement, l'un par des entités  $\text{SO}_3^-$  et l'autre par  $\text{COO}^-$ . La poly-L-lysine devrait avoir une affinité pour le carraghénane voisine de celle avec l'alginate. C'est pourquoi nous avons calqué notre travail de synthèse sur ces travaux.

## 4 Conclusion

Nous pouvons retenir de cette étude que la chimie sol-gel demande une bonne maîtrise des paramétrages pour aboutir à une gélification adéquate des précurseurs siliciques. Mais cette connaissance de la chimie sol-gel nous ouvre de nouvelles voies de synthèse par chimie douce et nous permet de contrôler chimiquement l'évolution des espèces tout au long de la chaîne qui va du précurseur moléculaire au solide.

La littérature présente une multitude de nouveaux matériaux hybrides organique/inorganique dans de nombreux domaines. Mais les mécanismes d'autoassemblage restent encore assez mal connus. Cependant il est clairement défini que les protéines sont impliquées dans la structuration de l'hybride de par leurs structures propre (hélices, feuillettes, pelotes...) mais aussi par leur nature chimique qui peut favoriser la condensation des précurseurs siliciques. En effet des études, menées en fonction du pH et de la longueur de la chaîne polymère ont amené à proposer un modèle d'activation mettant en jeu l'adsorption des silicates sur les peptides, ces silicates servant de sites de nucléation pour la formation du gel de silice. L'interprétation de ce processus repose sur l'existence d'interactions faibles (liaison hydrogène, attraction électrostatique) entre les précurseurs de silice et certaines

fonctions ( $\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{OH}\dots$ ) des acides aminés. De la même manière nous pouvons affirmer que les polysaccharides peuvent jouer un rôle identique dans la biominéralisation d'où l'intérêt d'associer un polysaccharide avec un polypeptide.

## PARTIE II : EXPERIMENTALE

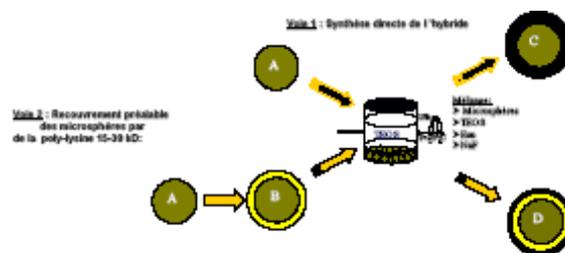


Figure 60 : Illustration schématique des deux voies de synthèses d'hybrides.

# I. Techniques de Caractérisation :

## 1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique repose sur le même principe que la microscopie optique, à la différence près que le rayon incident est constitué par un faisceau d'électrons au lieu d'un rayon de lumière visible. La microscopie électronique à balayage (MEB) Figure 32 permet d'obtenir une image réfléchie (agrandie jusqu'à 100 000 fois ou plus) de l'échantillon, mettant en évidence des détails (" l'effet profondeur ") impossibles à déceler autrement et de dimensions excessivement réduites. La technique par réflexion est devenue essentielle pour l'étude des matériaux. La technique d'analyse MEB est employée pour l'étude des métaux, des pierres, et autres matériaux. Les clichés ont été réalisés sur un MEB à effet de champ Hitachi. Les échantillons ont été fixés à l'aide de colles conductrices sur des plots métalliques. Les échantillons ont ensuite été métallisés (recouverts d'une fine couche ~ 1-2 nm de métal) par pulvérisation de platine. Ce procédé permet d'augmenter l'intensité en électrons secondaires et d'éliminer des effets de charges (qui viendraient concurrencer et altérer le contraste topographique).

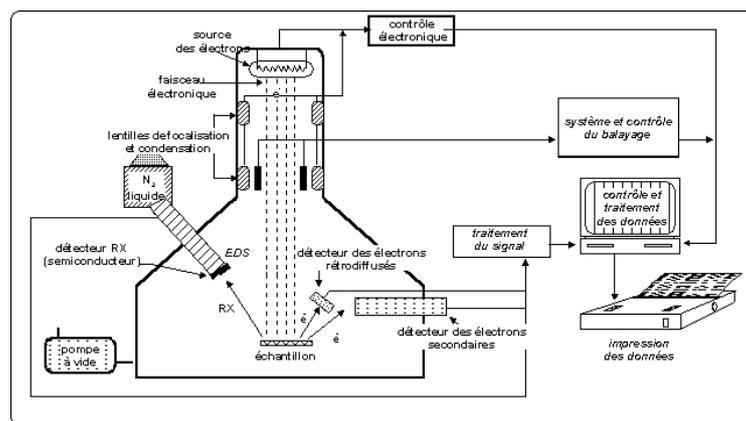


Figure 32 : Principe de la microscopie électronique à balayage et microanalyse (EDX)

## 2 Microanalyse électronique par rayons X (MEB + microsonde)

De façon complémentaire, cet outil est d'une grande utilité pour l'étude des surfaces ; il s'agit de la " microsonde à rayons X " couplée sur le MEB (Figure 32). Elle consiste en un système uni à un microscope électronique, où le faisceau ponctuel d'électrons envoyé sur l'échantillon génère des rayons X de fluorescence. Ce dispositif permet la microanalyse chimique du matériau avec une sensibilité qui varie notablement selon qu'il s'agit d'analyse d'éléments légers, moyens, ou lourds, par exemple 1% pour le bore, 0,1 % pour le carbone et 0,01 % pour l'uranium. La surface de l'échantillon concernée est de quelques  $\mu\text{m}^2$  et l'on peut effectuer des balayages pour chaque  $\mu\text{m}$ . On peut également, entre autres, établir des cartes de distribution séparées de chaque élément qui seront caractéristiques des différents matériaux. Ces analyses trouvent des applications particulières dans l'étude des matériaux métalliques et des soudures, des céramiques, des fibres, des verres, des pierres, des pigments des peintures. En général, la détermination se fait en observant au microscope la zone intéressée et en dirigeant le faisceau électronique de mesure sur la zone retenue comme la plus intéressante pour l'analyse élémentaire. Par cette méthode, on peut analyser, par exemple, les constituants de la surface des différentes microsphères hybrides. Dans notre cas, l'analyse EDX sera exclusivement destinée à déterminer le pourcentage de silicium dans les différentes microsphères hybrides. Afin de s'affranchir des problèmes de faible détection des rayons X produits par les transitions des électrons de cœur du carbone, on examine les transitions des électrons de cœur du soufre présent une fois sur chaque monomère de  $\kappa$ -carraghénane (Figure 33).

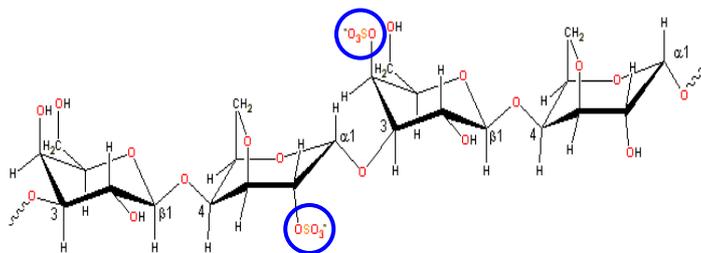


Figure 33 : Formule développée de deux monomères de  $\kappa$ -carraghénane

Donc à un atome de soufre détecté correspond un monomère  $\kappa$ -carraghénane.

L'équation 1 nous permet de déterminer le pourcentage molaire de silice dans le matériau en fonction de sa position géographique sur l'échantillon. En effet, la technique ne nous permet pas de déduire directement le taux de silice. Par contre, les taux de soufre et silicium sont estimés avec une incertitude acceptable. Mais les résultats acquis par cette technique ne sont exploitables qu'à titre de comparaison, entre différents hybrides de même nature.

$$\frac{1}{\frac{\%S}{\%Si} * \frac{MSiO_2}{MCarra} + 1} = \%MolaireSiO_2 \quad (\text{Équation 1})$$

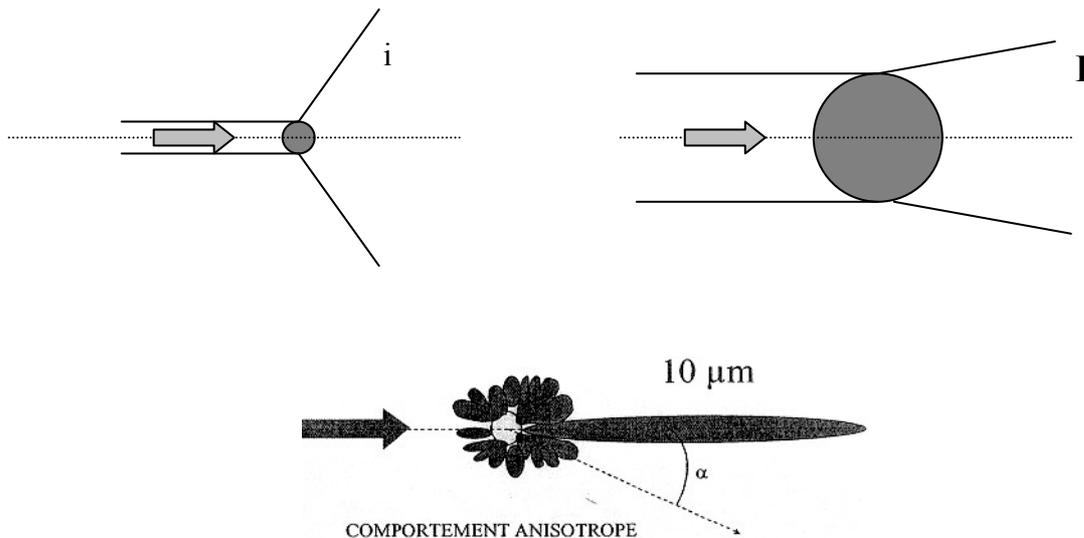
**Équation 1 : Calcul du pourcentage molaire de SiO<sub>2</sub> contenu dans l'hybride avec : %S = pourcentage relatif atomique du Soufre, %Si = pourcentage relatif atomique du Silicium, M<sub>SiO<sub>2</sub></sub> = Masse molaire de la silice, M<sub>carra</sub> = masse molaire d'un monomère de κ-carraghénane.**

L'analyse de surface de chaque échantillon est effectuée sur des microsphères entières et sectionnées par leur diamètre.

### 3 Granulométrie laser

Cette technique permet d'obtenir la répartition granulométrique d'un solide divisé dans un intervalle de taille allant de 0,5 à quelques dizaines de µm.

Une particule sphérique donne un motif de diffraction lorsqu'elle est éclairée par un faisceau parallèle de lumière cohérente et monochromatique. La figure de diffraction varie en fonction de la taille de la particule : de petites particules donneront un grand motif de diffraction de faible intensité tandis que de grosses particules donneront un petit motif de diffraction de forte intensité (Figure 34 ). De plus, cette diffraction n'est pas isotrope pour des particules supérieures à 50 nm (cf. Figure 34 pour une particule de 10µm). D'autres composantes (rétro-diffusion, réflexion, transmission,) s'ajoutent à la lumière diffractée et la variation de l'intensité diffractée en fonction de l'angle est donnée par la théorie de **Mie** dérivée des équations de **Maxwell**. La distribution granulométrique est ensuite extraite des mesures d'intensité à différents angles par des algorithmes propres à chaque constructeur. Il est donc courant d'obtenir des distributions différentes mais reproductibles sur des appareils différents.



**Figure 34 : Représentation schématique de l'angle de diffraction en fonction de la taille de la particule. Figure de diffraction d'une particule de 10  $\mu\text{m}$  [31].**

Les mesures ont été effectuées sur un appareil Mastersizer 2000 (Malvern). Les particules ont été introduites à l'intérieur de l'appareil et la quantité introduite est ajustée afin d'éviter des phénomènes de diffractions multiples. Ensuite, une pluie de particules passe devant le laser et la cellule de mesure.

L'appareil mesure une distribution granulométrique en volume. Pour des particules non sphériques, la taille obtenue sera le diamètre de la sphère équivalente en volume. La distribution de taille peut alors être exprimée soit en volume, soit en nombre selon l'information recherchée. Sachant qu'une particule de 10  $\mu\text{m}$  sera équivalente en volume à 1000 particules de 1  $\mu\text{m}$ , la distribution en volume sera utilisée pour mettre en évidence les grosses particules comme par exemple pour le suivi de phénomènes d'agrégation entre particules.

A titre d'exemple, les deux types de distributions sont donnés figure 34 pour un échantillon présentant une distribution large de taille de particules.

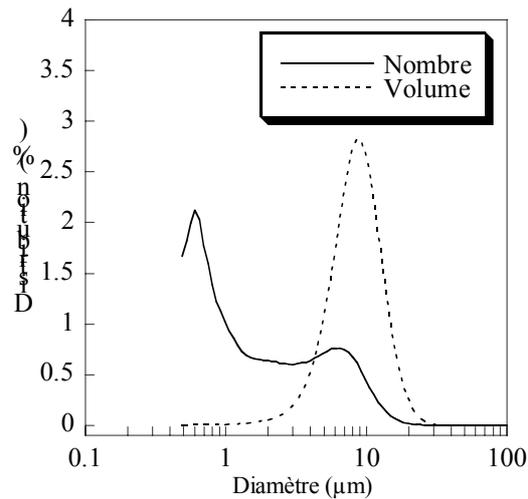


Figure 35 : Distribution granulométrique en nombre et en volume pour un échantillon possédant des particules élémentaires isolées et agrégées.

## 4 Microscopie optique à fluorescence

La fluorescence est un phénomène éphémère,  $10^{-6}$  seconde. Afin qu'une molécule émette de la lumière, il faut qu'elle passe d'un état électronique excité  $S_1'$  à un état d'énergie basal  $S_0$  (principe de Bohr). En ce sens, pour faire passer un atome voire une molécule d'un état d'énergie basal à un état excité, il faut leur fournir une quantité d'énergie équivalente à la différence entre ces deux niveaux (Figure 36). En fait, selon la théorie de la physique quantique pour des molécules complexes, les niveaux  $S_0$  et  $S_1'$  sont multiples, on a donc des spectres d'énergie possible pour faire passer la molécule de son état fondamental vers l'état excité (excitation) et de même pour son passage de l'état excité vers l'état fondamental (émission). Toutefois, l'énergie émise est toujours plus faible que celle d'excitation puisqu'il y a des pertes au sein de la molécule, passage de  $S_1'$  vers  $S_1$ .

Par conséquent : Energie émise  $E_{em} = h\nu_{em} = h/\lambda_{em} <$  Energie d'excitation  $E_{ex} = h\nu_{ex} = h/\lambda_{ex}$  ( $n$ : fréquence,  $\lambda$  : longueur d'onde), la longueur d'onde de la lumière émise est donc toujours plus grande que celle d'excitation. Le spectre lumineux visible allant du bleu, pour les plus petites longueurs d'onde ( $\lambda_b = 400$  nm), vers le rouge ( $\lambda_r = 750$  nm), une molécule excitée dans le bleu, émettra de la lumière jaune, verte, voire orange (selon le glissement de Stokes), une excitée dans le vert émettra dans le rouge.

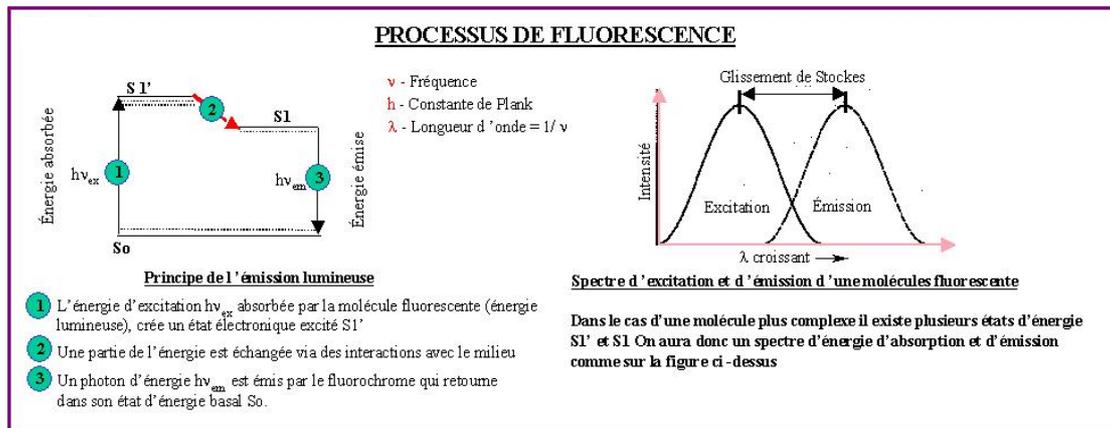


Figure 36 : Processus de fluorescence.

Exemples : La fluorescéine 5-isothiocyanate FITC, le maximum du spectre d'excitation  $Em_{ex} = 494$  nm (bleu), le maximum du spectre d'émission  $Em_{em} = 518$  nm (vert).

La Figure 37 (a) représente les spectres d'excitation et d'émission de fluorochromes fréquemment utilisés pour marquer un échantillon organique. On peut voir que les trois raies lumineuses émises par le laser Ar/Kr permettent d'exciter de manière efficace ces trois molécules. De même, les spectres d'émission sont bien séparés et se chevauchent peu. Comme le montre la Figure 37 (b), cela permet par un choix judicieux de filtres passe-bande ou passe-haut dans chaque canal, d'enregistrer dans chacun des canaux verts, rouge et bleu, le signal émis par une seule des molécules. La partie des spectres d'émission hachurée représente la plage de longueur d'onde du spectre que les filtres laissent passer. Par exemple, le filtre BP530/30 est un filtre Passe-Bande (BP : Band-Pass) qui laisse passer les signaux dont les longueurs d'onde sont comprises entre 515 et 545 nm. Le filtre LP 665 est un Passe-Haut (LP:Long-Pass) est transparent aux longueurs d'onde supérieures à 665 nm. C'est cette partie du spectre qui va représenter le signal enregistré par les PMT.

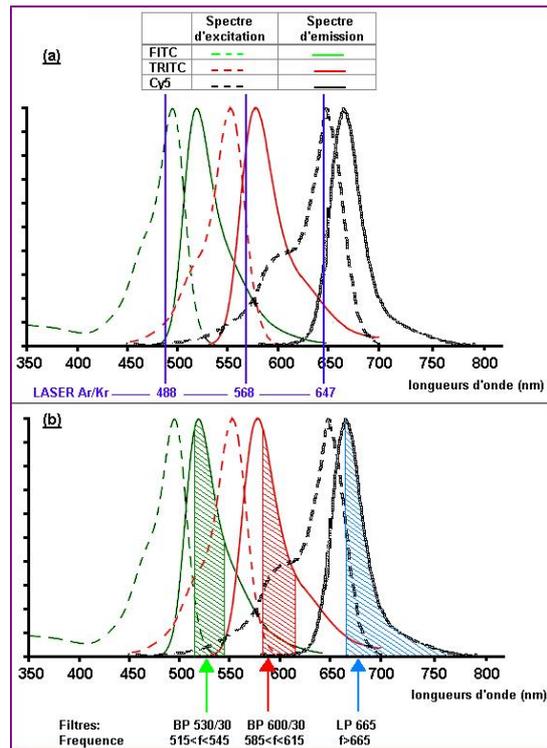


Figure 37 : Spectres d'excitation et d'émission de trois marqueurs fluorescents.

Dans notre cas, les marqueurs fluorescents sont la fluorescéine 5-isothiocyanate FITC et la rhodamine B. (Figure 38)

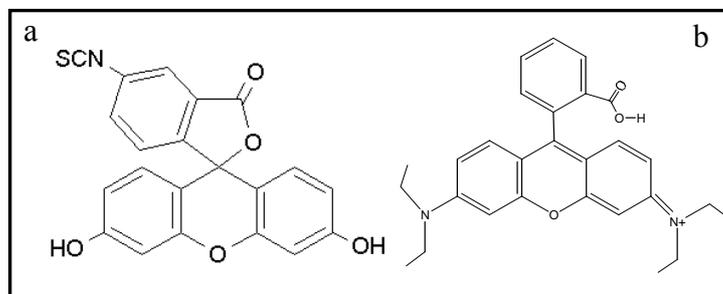


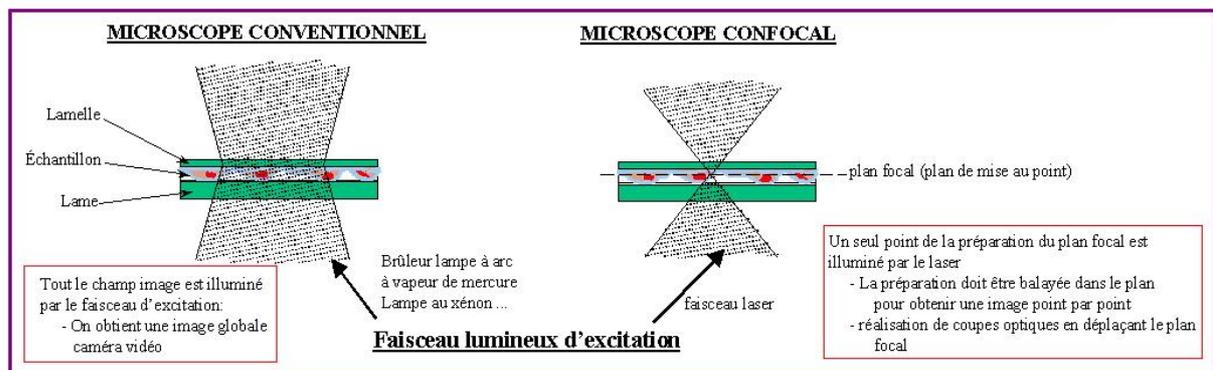
Figure 38 : a) Formule de la fluorescéine 5-isothiocyanate FITC et b) Formule de la Tetraethylrhodamine.

## 5 Microscopie confocale

Une des limitations de la microscopie classique est, la faible profondeur de champ de l'image. La zone observée de mise au point est nette, les zones immédiatement au-dessus

et au-dessous sont floues et perturbent l'image observée. La microscopie confocale permet de contourner ce problème.

Le microscope confocal est essentiellement utilisé en fluorescence. La Figure 39 ci-dessous, illustre la grande différence entre la microscopie à fluorescence canonique et la microscopie confocale. En fait, dans le premier cas, la préparation est illuminée dans son ensemble, sur toute l'épaisseur, par un faisceau lumineux d'intensité homogène. En microscopie confocale, un seul point de la préparation est illuminé par le faisceau laser focalisé. De manière plus précise, on peut dire que tous les points situés dans le cône de lumière (voir dessin Figure 39) sont illuminés. De plus, à cause du phénomène de diffraction de la lumière le point de focalisation n'a pas une dimension nulle mais est représenté par une tâche de Airy (Figure 40). Toutefois, l'intensité lumineuse décroît de manière inversement proportionnelle à la distance au point de focalisation. Ainsi cette intensité est rapidement trop faible pour exciter les molécules fluorescentes situées en dehors de la tâche de diffraction et les signaux émis par les points situés hors du point de focalisation sont éliminés grâce à la présence du pinhole de sortie placé devant le détecteur PMT (figure 40). On obtient ainsi, en déplaçant la préparation dans le plan horizontal, une image reconstituée point par point représentant une coupe de faible épaisseur de l'échantillon.



**Figure 39 : Différence entre la microscopie à fluorescence canonique et la microscopie confocale.**

La figure 40 détaille le schéma de principe du confocal. La lumière d'excitation émise par le laser (Laser Ar/Kr) passe un "pinhole" d'excitation qui réduit la source à un point lumineux.

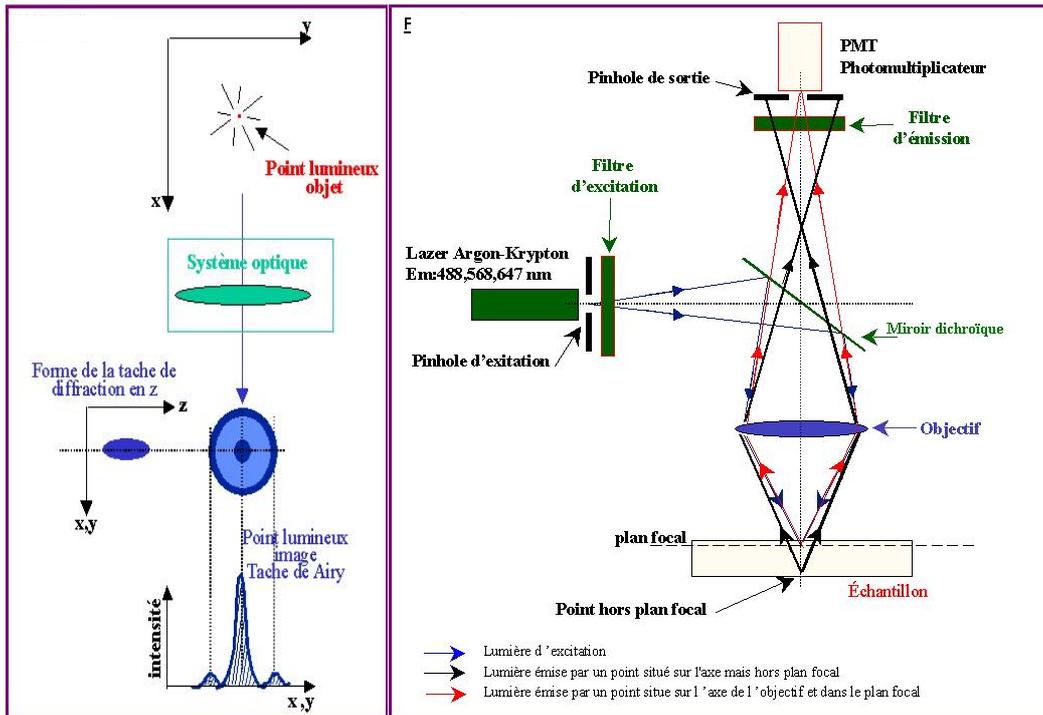


Figure 40 : Tache de AIRY

Figure 41 : Schéma de principe du confocal

Le faisceau est ensuite filtré (filtre d'excitation) de manière à sélectionner la ou les raies d'excitation utiles ainsi que leurs intensités respectives. Il est ensuite réfléchi sur un miroir dichroïque qui réfléchit sélectivement la lumière d'excitation et est transparent pour la lumière émise par les fluorochromes. La lumière d'excitation est alors focalisée en un point de la préparation via l'objectif du microscope (flèches bleues). Ce dernier capte alors la lumière émise par les fluorochromes excités. Celle émise par le point situé sur le plan focal de l'objectif est focalisée via l'objectif sur le capteur (photomultiplicateur, PMT) qui transforme le signal lumineux en signal électrique (flèches rouges montantes). Par contre celle émise par des fluorochromes situés au-dessus et au-dessous du plan focal est filtrée à l'entrée du détecteur par la présence d'un "pinhole de sortie".

L'observation des échantillons ne demande pas de préparation préalable particulière si ce n'est évidemment que les microsphères soient marquées par un marqueur fluorescent.

## 6 Mesure de la surface spécifique par adsorption N<sub>2</sub>

Les isothermes d'adsorption/désorption d'azote à 77K permettent de caractériser les propriétés texturales des matériaux, *i.e.* la taille des pores, la surface spécifique et le volume poreux. Dans notre cas, seule la surface spécifique sera déterminée.

Les isothermes d'adsorption/désorption d'azote ont été réalisées par un appareil Micromeritics ASAP 2010. Les échantillons sont préalablement dégazés pendant un minimum de 8h à une température de 50°C. Les microsphères sont dégazées à  $3 \cdot 10^{-3}$  Torr. La mesure est effectuée sur environ 50 mg de microsphères sèches pesées au  $1/10^{\text{ème}}$  de mg près.

Les microsphères présentent une isotherme typique (Figure 42), de type IV selon la classification de **Brunauer** [132]

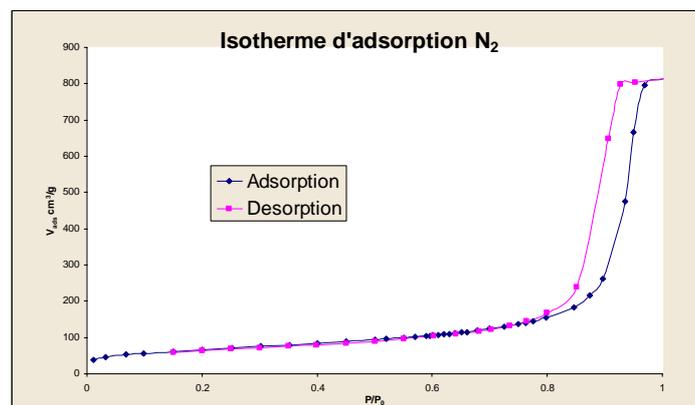


Figure 42 : Isotherme d'adsorption/désorption d'azote à 77 K typique de microsphères. (allure commune à toutes les microsphères préparées)

Cette isotherme comprend différentes zones à différentes pressions partielles correspondant aux phénomènes suivants :

- $p/p_0 < 0,3$  : Adsorption monocouche-multicouche sur la totalité de la surface du matériau. Cette zone nous renseigne sur la surface totale du matériau. Il faut noter que pour des matériaux microporeux, le remplissage des micropores se produit à  $p/p_0$  inférieure à 0,05. Cette adsorption ne s'effectue pas par adsorption monocouche-multicouche et rend impossible la mesure précise de la surface.

- $0,3 < p/p_0 < 0,8$  : L'adsorption se poursuit sur la surface externe du matériau.
- $p/p_0 \sim 0,8$  : Remplissage des pores par condensation capillaire caractérisé par une augmentation du volume pour une même pression. L'ensemble des pores d'un même diamètre est rempli à même pression partielle selon la loi de KELVIN. Pour une distribution étroite de pores, ce phénomène se traduit donc par une marche abrupte dans l'isotherme. La position de cette marche nous renseigne sur la taille des pores.(voir annexe B)
- $p/p_0 > 0,9$  : partie linéaire liée à la croissance de la multicouche exclusivement sur la surface externe des microsphères. Cette portion peut être suivie d'une seconde augmentation importante due à la condensation capillaire de  $N_2(g)$  dans l'espace interparticulaire.

### 6.1 Calcul de la surface spécifique : la théorie BET

Cette théorie a été formulée en 1938 par **Brunauer, Emmet** et **Teller** afin de formaliser les phénomènes d'adsorption multicouches sur une surface [133]. Cette théorie décrit la surface comme un ensemble de sites d'adsorption possédant la même énergie d'adsorption. Chaque molécule adsorbée joue le rôle d'un nouveau site d'adsorption dans la couche suivante. L'adsorption est donc décrite comme un remplissage de différentes couches de sites d'adsorption possédant deux niveaux d'énergie d'adsorption :  $E_1$  pour les sites d'adsorption de la surface (correspondant à la première couche) et  $E_L$  pour les sites de toutes les couches suivantes. Cette théorie aboutit alors à l'équation, dite BET :

$$\frac{\frac{p}{p_0}}{V_{\text{ads}} \left(1 - \frac{p}{p_0}\right)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \times \frac{p}{p_0}$$

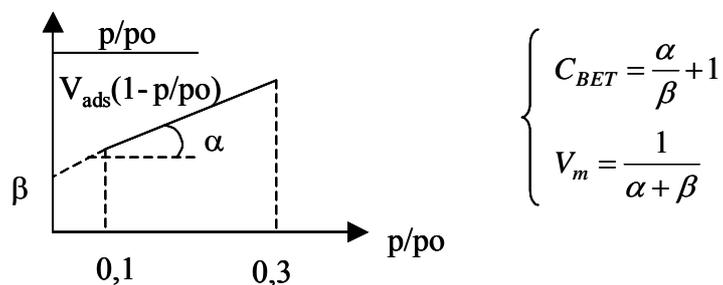
où  $V_m$  est le volume de la monocouche

et  $C$  est le coefficient BET qui peut être approximé par l'équation suivante:

$$C = \exp\left(\frac{E_1 - E_L}{RT}\right)$$

où  $E_1$  est donc l'énergie d'adsorption de la première couche et  $E_L$  l'énergie d'adsorption des couches suivantes.  $E_L$  est pris égale à l'énergie de liquéfaction de l'azote.

L'application de cette équation est couramment utilisée pour calculer la surface spécifique d'un solide. La zone de validité de l'équation est limitée à l'adsorption monocouche-multicouche. Ce domaine est souvent reporté en littérature comme correspondant à  $0,05 < p/p_0 < 0,35$ . En pratique, il est souvent nécessaire de réduire ce domaine à  $0,1 < p/p_0 < 0,3$ . Le tracé de l'équation BET en fonction de  $p/p_0$  donne une droite :



L'ordonnée à l'origine  $\beta$  et la pente  $\alpha$  de la droite permettent de calculer les valeurs de  $C_{BET}$  et  $V_m$ . Dans la suite de l'étude, les résultats issus de ces calculs ne seront donnés que pour des coefficients de régression linéaire  $R$  proches de 0,9999. En effet, une faible déviation sur la droite peut entraîner de grandes variations de  $C_{BET}$ .

Le calcul de la surface BET ( $S_{BET}$ ) à partir du volume de la monocouche ( $V_m$ ) est le suivant :

$$S_{BET} = V_m A_m N_A / V_{N_2}$$

où  $V_{N_2}$  est le volume molaire de l'azote (22.4 l)

$N_A$  est le nombre d'Avogadro ( $6.022 \cdot 10^{23}$ )

$A_m$  est la surface recouverte par une molécule d'azote dans un arrangement compact sur la surface ( $0.162 \text{ nm}^2$ ).

La surface recouverte par une molécule d'azote adsorbée  $A_m$  dépend fortement de l'interaction entre la molécule et la surface [134]. Sur une surface de silice, où l'interaction avec la molécule d'azote est forte,  $A_m$  sera pris égal à  $13,5 \text{ \AA}^2$ . La surface corrigée sera

alors notée  $S^*$ . Par contre, sur une surface organique, la valeur classique de  $16,2 \text{ \AA}^2$  [129] sera utilisée.

L'interaction de l'azote avec la surface peut être quantifiée par la valeur de  $C_{\text{BET}}$ , qui dépend de l'énergie d'adsorption de l'azote sur cette surface. L'énergie d'interaction avec la surface peut comprendre différents termes correspondant aux différents types d'interactions. L'énergie d'une molécule d'azote à une distance  $z$  de la surface peut être décomposée ainsi [135]:

$$\Phi(z) = \Phi_{\text{D}} + \Phi_{\text{R}} + \Phi_{\text{P}} + \Phi_{\text{F}\mu} + \Phi_{\text{FQ}}$$

avec  $\Phi_{\text{D}} + \Phi_{\text{R}}$  qui dérivent des forces dites "de dispersion", à la fois attractives ( $\Phi_{\text{D}}$ ) et répulsives à très courtes distances ( $\Phi_{\text{R}}$ ), décrites par le potentiel de **Lennard-Jones**

$\Phi_{\text{P}}$  qui traduit la polarité induite par une surface polaire sur la molécule

$\Phi_{\text{F}\mu}$  qui traduit l'interaction entre une surface polaire et une molécule polaire

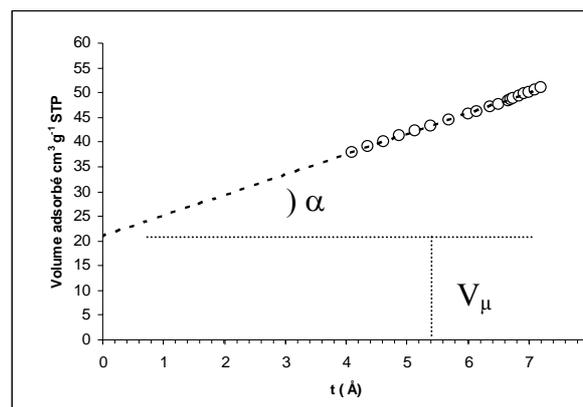
$\Phi_{\text{FQ}}$  qui traduit l'interaction quadrupolaire.

La molécule d'azote possède un moment quadrupolaire mais pas de dipôle permanent, donc  $\Phi_{\text{F}\mu} = 0$  pour l'azote.

La variation de l'énergie d'adsorption et donc du paramètre  $C_{\text{BET}}$  est reliée pour un même adsorbat à un changement de la nature de la surface. Si la surface est beaucoup moins polaire les termes  $\Phi_{\text{P}}$  et  $\Phi_{\text{FQ}}$  diminuent fortement ou s'annulent. De même, plusieurs études ont montré que l'énergie de dispersion ( $\Phi_{\text{D}} + \Phi_{\text{R}}$ ) diminue avec la présence de molécules organiques en surface. Dans certain cas, le paramètre  $C_{\text{BET}}$  est utilisé comme indicateur de la qualité du recouvrement de surface silicique par des molécules organiques [136]. Classiquement, pour une interaction forte avec la surface, le  $C_{\text{BET}}$  est voisin de 100 (cas d'une surface de silice hydroxylée). Pour une interaction faible avec une surface, le  $C_{\text{BET}}$  doit diminuer = 20 (cas d'une surface organique).

## 6.2 Calcul de la surface – Courbe t

Cette courbe consiste à reporter le volume de gaz en fonction de l'épaisseur moyenne de la multicouche d'azote (notée  $t$ ). La courbe  $t$  permet de distinguer la surface externe de la surface interne et de mettre en évidence la présence de microporosité. Une courbe  $t$  de microsphères hybrides est représentée (Figure 43). Aux faibles valeurs de  $t$ , la courbe est linéaire et ne passe pas par l'origine, montrant ainsi la présence de microporosité. Les évolutions linéaires pour les faibles et les grandes valeurs de  $t$  correspondent à une adsorption multicouche sans phénomène de condensation capillaire. Le volume adsorbé est alors proportionnel à l'épaisseur d'azote et à la surface recouverte. Cette surface est proportionnelle à la pente de la courbe moyennant une constante permettant la correction de densité de l'azote entre l'état gazeux et l'état condensé. La surface totale (en  $m^2/g$ ) est ainsi obtenue pour des faibles valeurs de  $t$  par  $S_{\text{totale}} = 15,47 \alpha$ . L'extrapolation de la droite donnant la surface totale à  $t=0$  permet de connaître le volume microporeux.



**Figure 43 : Courbe  $t$  représentative de celles obtenues avec des microsphères hybrides calculée avec le modèle FHH modifié.**

L'avantage (dans notre cas) du tracé de la courbe  $t$  est qu'elle permet de mettre en évidence la présence de microporosité. En effet, si nous ne sommes pas certains que les solides analysés par adsorption/désorption d'azote à 77 K soient mésoporeux, le tracé de la courbe  $t$  nous permettra de justifier ou non le calcul de la surface effectué par la théorie BET.

Le tracé d'une courbe  $t$  nécessite une courbe de référence pour effectuer la transformation de la pression relative en épaisseur d'azote. Cette courbe de référence peut être théorique

ou expérimentale. De ce fait, toute la difficulté réside dans l'obtention d'une fonction permettant à partir des données expérimentales ou théoriques de convertir  $P/P_0$  en  $t$  en tenant compte de la surface étudiée.

### 6.2.1 Isotherme de référence expérimentale pour le tracé de la courbe $t$

Afin de rendre compte des interactions entre l'azote (adsorbât) et le support (adsorbant) pour le calcul de l'épaisseur de la couche d'azote en fonction de la pression relative, les chercheurs utilisent des solides de référence. Au laboratoire, la plupart des analyses effectuées en adsorption/désorption d'azote à 77K se font sur des surfaces siliciques. De ce fait, les solides de références sont des silices non poreuses. Cependant, dans la littérature, il existe déjà des références. En effet **Sing et coll** [135] proposent d'utiliser un solide silicique afin d'estimer l'épaisseur de la couche adsorbée en fonction de la pression relative. Dans notre étude certains matériaux vont effectivement être silicique mais hybride, c'est pourquoi nous avons préféré utiliser une isotherme de référence théorique.

### 6.2.2 Courbe de référence théorique pour le tracé de la courbe $t$

La modélisation de l'épaisseur de la couche d'azote peut être obtenue par différentes équations :

Le modèle **Harkins et Jura** :  $t = \sqrt{\frac{13.99}{0.34 - \log(p/p_0)}}$

Le modèle de **Halsey** :  $t = 3.54 \left( \frac{-5}{\ln(p/p_0)} \right)$

Le modèle de **Frankel, Halsey et Hill** (FHH) :  $t = 3.54 \left( \frac{-b}{\ln(p/p_0)} \right)^{1/s}$

On constate que le modèle de **Halsey** est un cas particulier du modèle FHH dans lequel  $b =$  paramètre énergétique pour l'adsorption de la monocouche et  $s$  compris entre 2 et 3 ou plus bas pour des surfaces non polaires.

### 6.2.3 Utilisation de la courbe t

Dans notre étude l'utilisation de la courbe t n'est pas systématique mais elle sera nécessaire lorsque nous aurons un doute quant à la vraie mésoporosité des solides. En théorie la surface spécifique calculée par la théorie BET est valable pour des matériaux présentant une isotherme de type IV. Lorsque les solides présentent des isothermes de type I dont la porosité est à la limite de la mésoporosité, il sera en effet intéressant de savoir si la surface accessible est une surface provenant d'une microporosité ou bien une surface externe.

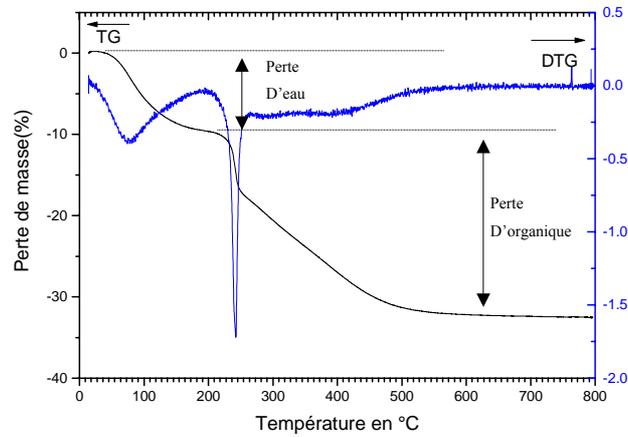
## 6.3 Conclusion

L'utilisation d'adsorption/désorption d'azote comme technique de volumétrie permet d'évaluer avec précision le volume poreux des matériaux. Elle s'avère être une méthode efficace pour le calcul de la surface spécifique pour des matériaux mésoporeux présentant une isotherme de type IV. Cependant il faut faire attention quant à l'utilisation de la théorie BET. Nous avons vu que cette théorie est valable dans un certain domaine de pression seulement. Si le matériau analysé possède des pores entre la micro- et mésoporosité, il faudra être très prudent lors du calcul de la surface spécifique. En effet pour les solides microporeux, l'allure de l'isotherme ne permet pas d'appliquer la théorie BET, il est donc nécessaire pour chaque analyse de se placer dans le domaine de validité de cette technique de calcul.

## 7 Analyse thermogravimétrique ATG :

L'analyse thermogravimétrique permet d'évaluer les pertes de masse engendrées par un traitement thermique sous flux de gaz. Les appareils utilisés pour cette étude sont un SETERAM 90C et un NETZSCH TG 209.

Le traitement thermique utilisé communément pour l'analyse des matériaux composites est une rampe en température de 25°C à 800°C sous flux d'air. La vitesse de montée en température est de 3°C par minute (Figure 44).



**Figure 44 : Analyse thermogravimétrique représentative de l'ensemble des microsphères hybrides préparées (perte de masse TG en noir et dérivée DTG en bleue).**

Cette analyse permet d'estimer la quantité d'eau et de matière organique présentes dans le matériau :

- $T < 200^{\circ}\text{C}$  : déshydratation
- $200^{\circ}\text{C} < T < 250^{\circ}\text{C}$  : Une décomposition brutale de certains composés organiques.
- $T > 250^{\circ}\text{C}$  : élimination de tous les composés issus d'une oxydation partielle de certains composés organiques.

## II. Elaboration de microsphères :

---

Contexte : La combinaison d'entités organiques et inorganiques au sein d'une même phase a pour but de créer des matériaux à propriétés spécifiques, issues de la synergie entre les propriétés des sous-réseaux individuels. Notre objectif est d'élaborer des microsphères hybrides carraghénane/silice, soit à partir de carraghénane seul, soit à partir de microsphères revêtues d'une couche de polymère polycationique (Poly-L-lysine). Des microparticules hybrides carraghénane/silice sphériques, de taille monodisperse, présentant une grande surface spécifique et une mésoporosité qui soient susceptibles d'être employées dans une multitude de domaines d'applications. C'est pourquoi, nous nous sommes imposés ces critères morphologiques, structuraux et texturaux pour choisir le mode d'élaboration des particules hybrides.

Les microsphères de k-carraghénane devraient servir d'objets structurants « template » à la silice et ainsi transmettre leur morphologie aux matériaux hybrides. Dans un premier chapitre nous allons décrire l'optimisation de la fabrication et du séchage des microsphères de k-carraghénane afin d'obtenir des particules sphériques, de taille homogène et qui présentent des propriétés de gonflement dans l'eau contrôlées.

le 2<sup>ème</sup> chapitre regroupe les travaux qui constituent la majeure partie de mon mémoire de thèse. Les différentes voies de synthèse de microsphères hybrides carraghénane/silice y seront décrites. Différents paramètres seront testés : nature du précurseur silicique, rapport précurseur/eau, pH, catalyseur. Les caractéristiques morphologiques, texturales et structurales des microsphères avant et après calcination à 550°C, seront déterminées par microscopie à balayage électronique, analyse thermogravimétrique, microscopie optique à fluorescence confocale, microanalyse électronique par rayon X (EDX) et par adsorption d'azote.

# 1 Fabrication des billes de $\kappa$ -carraghénane

## 1.1 Introduction

Les microbilles de gel sont issues de *l'extrusion* d'une solution aqueuse de  $\kappa$ -carraghénane. Le premier objectif va donc consister à optimiser l'extrusion. Pour cela, il faut étudier plusieurs paramètres comme, la température et la concentration de la solution de  $\kappa$ -carraghénane, la concentration en KCl, le temps de maturation des microsphères ainsi que les conditions d'extrusion, ceci afin d'obtenir des microsphères relativement sphériques et de taille monodisperse. Dans un deuxième temps, nous devons procéder à un *séchage des microsphères*. Cette procédure doit mener à des particules ayant une morphologie sphérique ainsi qu'une texture poreuse. Deux techniques nous ont paru pertinentes, la lyophilisation et le séchage en milieu CO<sub>2</sub> super-critique, ces deux techniques étant couramment employées pour le séchage de gels. La lyophilisation d'un gel conduit à un cryogel, qui dans certains cas peut être très poreux. Le séchage en fluide super-critique d'un gel donne un aérogel, qui est quasiment considéré comme une réplique sèche du gel. Les particules issues de ces deux techniques seront comparées. Le troisième objectif, est de déterminer l'influence d'un *recouvrement par de la poly-L-lysine* 15-30 KD sur les microsphères de  $\kappa$ -carraghénane. La poly-L-lysine est un polypeptide qui possède une charge positive à pH neutre, ce qui permet une forte interaction avec le  $\kappa$ -carraghénane négatif. Cette interaction peut modifier la texture et la morphologie des microsphères. Ainsi, nous devons comparer les microsphères issues de cette interaction à celles vierges de toute interaction.

## 1.2 Matériels et méthodes

### 1.2.1 Produits

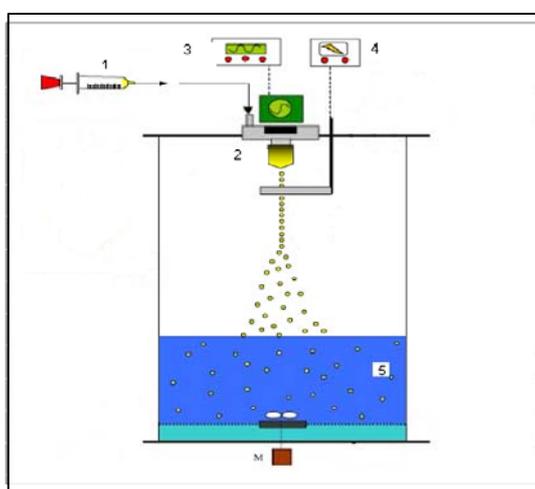
- $\kappa$ -carraghénane issu de *eucheuma cottonii* du lot n° lot 99HO886 de SIGMA avec 90% de pureté.
- Chlorure de potassium pur à 99,5% lot 1210512 de SDS
- Poly-L-lysine 15-30 kD pure lot 071k5120 de SIGMA.

- Poly-L-lysine 15-30 kD marquée FITC pure lot 071K5330 de SIGMA.

## 1.2.2 Formation des microbilles de gel

### 1.2.2.1 Extrusion

L'appareillage utilisé pour la fabrication des billes est un microencapsulator (Inotech, Suisse, Figure 45). Le principe de cet appareil est basé sur la segmentation d'un jet de liquide laminaire en gouttes. L'appareil impose une vibration à la buse (300 $\mu$ m) pendant l'extrusion, ce qui implique la formation de gouttes. La fréquence de cette vibration influence fortement la taille des gouttes. Le principe de la formation des microsphères est basé sur les propriétés de gélification thermique et ionotropique du kappa-carraghénane. C'est pourquoi les microsphères sont plongées dans une solution saline froide de KCl. Directement à la sortie de la buse se trouve un dispositif en forme d'anneau qui délivre une haute tension (1,5 KV), il a pour but de charger identiquement toutes les microsphères qui passent dans l'anneau. Cette charge étant donc répulsive, elle évite ainsi l'agglomération des microsphères.



- 1) Seringue thermostatée à 80°C, solution de k-carraghénane à 2,5% P/V
- 2) Buse 300 $\mu$ m
- 3) Unité de vibration
- 4) Unité de haute tension

Figure 45: Schéma du microencapsulator (inotech, SUISSE)

En pratique, pour éviter une gélification prématurée du kappa-carraghénane, la solution est injectée avec une seringue maintenue à 80°C par une circulation d'eau chaude. L'ensemble des pièces métalliques qui sont en contact avec la solution visqueuse sont aussi au préalable chauffées. La solution est ensuite injectée à un débit compris entre 5 et

10 ml/minute selon la viscosité de la solution. Pour finir, les microsphères sont réceptionnées dans 400 cm<sup>3</sup> d'une solution de KCl à 5°C (SDS 99,5% lot 150792) légèrement agitée pendant 10 minutes, suivie d'une étape de maturation dans cette même solution saline à froid 5°C pendant 12 h sans agitation.

#### **1.2.2.2 Recouvrement des microbilles par une couche de PLL**

Les microsphères ainsi préparées ont fait l'objet d'un recouvrement par de la Poly-L-lysine. Afin de procéder à cette interaction, de la poly-L-lysine 15-30 kD a été dissoute dans le bain de durcissement de KCl après l'extrusion de la solution de k-carraghénane ( $C_{PLL} = 0,075$  g/l). Pendant 2 heures, le mélange est agité à 40 rpm. La période de maturation des microsphères reste inchangée (12 heures à 5°C sans agitation).

#### **1.2.2.3 Séchage par lyophilisation**

La lyophilisation, ou séchage à froid, est un procédé qui permet de retirer l'eau contenue dans un produit par sublimation afin de le rendre stable à la température ambiante et ainsi faciliter sa conservation.

Dans le cas du séchage d'un hydrogel, l'opération de lyophilisation effectuée dans un appareil de marque RP2 consiste à :

- Congeler l'hydrogel à 77 K pour que l'eau qu'il contient soit sous forme de glace.
- Sublimiser la glace directement en vapeur d'eau, sous l'effet d'un vide ( $P = 2 \cdot 10^{-3}$  bar).
- Récupérer cette vapeur d'eau.
- Une fois que toute la glace est sublimée, nous obtenons un cryogel que l'on peut retirer de l'appareil.

#### **1.2.2.4 Séchage en milieu $CO_2$ super-critique**

Cette technique consiste à sécher dans des conditions supercritiques le gel sans détruire sa porosité de façon à récupérer un matériau sec aussi poreux que le gel qui lui a donné naissance. Un composé pur peut se trouver sous trois états physiques ou phases (Figure 46) : liquide, solide et gaz, décrits par trois variables d'état, la température (T), la pression (P) et le volume molaire (V). Ces trois états sont séparés par des courbes de transition

solide-gaz, liquide-gaz et solide-liquide où les deux états coexistent. Le point critique correspond à la fin de la courbe de changement d'état liquide-gaz.

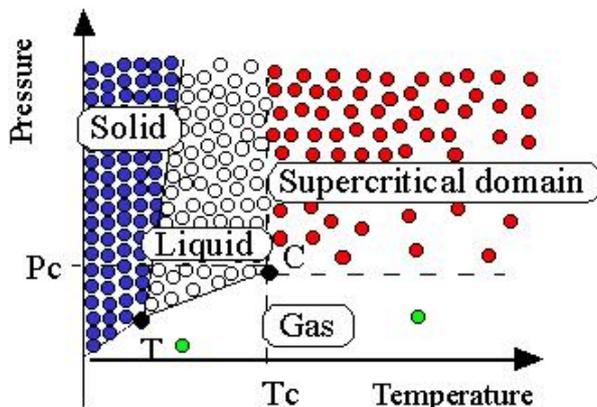
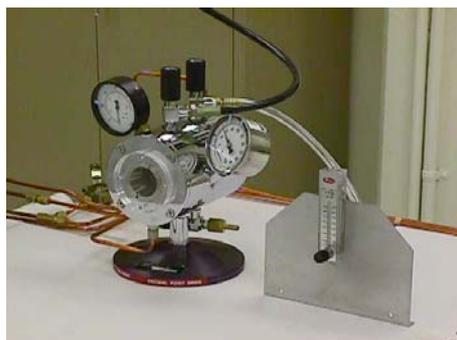


Figure 46: Schéma du principe du séchage en milieu  $\text{CO}_2$  super-critique

Au delà de ce point, défini par une pression ( $P_c$ ) et une température ( $T_c$ ) critique, se situe le domaine super-critique (SC). Il est possible de passer de l'état liquide à l'état gazeux de façon continue, c'est à dire sans franchir la ligne de transition liquide-gaz, en contournant le point critique. Le séchage supercritique se fait dans un autoclave à une température légèrement supérieure à la température critique du  $\text{CO}_2$ . Ainsi, le passage de la phase liquide à la phase vapeur se produit sans apparition d'interface. L'existence d'une interface dans un milieu poreux lors du séchage du gel par évaporation classique, développe des forces de tension superficielle énormes sur la paroi des pores entraînant l'effondrement de la structure.

Le fait que l'eau et le  $\text{CO}_2$  liquide ne soient pas parfaitement miscibles rend le séchage en milieu  $\text{CO}_2$  super-critique impossible. Par contre, l'éthanol est parfaitement miscible avec le  $\text{CO}_2$  liquide. C'est pourquoi une étape de déshydratation dans des bains successifs d'éthanol dont la concentration croît (10, 30, 50, 70, 90 et 100%  $V/V$ ) est nécessaire. Chaque bain dure quinze minutes. Après égouttage, les microsphères sont introduites dans un autoclave (polaron critical point drier (Figure 47)) et sont plongées dans du  $\text{CO}_2$  liquide (50 bar, 20°C).



**Figure 47 : Photographie de l'autoclave Critical point drier de polaron utilisé pour le séchage en milieu CO<sub>2</sub> super-critique.**

Cette étape permet d'échanger l'éthanol contenu dans les microsphères par du CO<sub>2</sub> liquide. Une purge permet ensuite d'éliminer l'éthanol du milieu. La montée en température jusqu'à 31°C augmente la pression à 73 bars ce qui a pour effet le changement d'état du CO<sub>2</sub> liquide à l'état supercritique. La dernière étape consiste à évacuer le CO<sub>2</sub> super-critique pour récupérer les microsphères sèches.

### **1.2.3 Caractérisation des microbilles**

Afin d'optimiser les paramètres d'extrusion de la solution de carraghénane, les microsphères sont caractérisées en terme de texture, morphologie et porosité. La forme et la tenue des microbilles sont examinées au microscope optique. La qualité du séchage est déterminée par l'analyse des microsphères. Dans les premier temps nous observons la morphologie et la texture de celles-ci par microscopie électronique à balayage. La diffraction de la lumière nous permet de connaître la distribution de taille des particules. Ensuite la surface spécifique est déterminée par adsorption d'azote à 77 K. Enfin l'étude de la cinétique de gonflement nous informe sur la capacité des microsphères à reprendre leur état de gel. Par la suite, des mesures de fluorescence optique confocale nous permettrons de localiser la poly-L-lysine au sein des particules.

#### **1.2.3.1 Examens morphologiques et texturaux des matériaux**

##### **➤ Examen de la forme des microsphères d'hydrogel**

Les microsphères sont positionnées sur une lame de verre et sont directement observées à l'aide d'un microscope optique de marque AXIOLAB, ZEISS, les images sont capturées par une caméra HAMAMASTU de définition 512x512.

➤ Examen structural du cryogel et aérogel

La microscopie électronique à balayage nous permet de comparer l'aspect des microsphères sèches. Les clichés ont été réalisés sur un MEB à effet de champ HITACHI. Les échantillons ont été fixés à l'aide de colles conductrices sur des plots métalliques. Les échantillons ont ensuite été métallisés (recouverts d'une fine couche ~ 1-2 nm de métal) par pulvérisation de platine (cf.p 63).

➤ Examen de la texture du cryogel et de l'aérogel.

Pour la détermination et l'évaluation des critères d'ordre textural, nous avons réalisé des isothermes d'adsorption/désorption d'azote à 77 K. Nous avons utilisé un appareil Micromeritics ASAP 2010. Les échantillons sont préalablement dégazés pendant un minimum de 8h à une température de 50°C sous  $3.10^{-3}$  Torr. La mesure est effectuée sur environ 50 mg de microsphères sèches pesées au  $1/10^{\text{ème}}$  de mg près (cf p 72 ).

### 1.2.3.2 Mesure de la vitesse de gonflement

Afin de déterminer la vitesse de gonflement nous avons étudié le comportement de microsphères sèches introduites dans une solution aqueuse de bleu de méthylène ( $MB^+$ ). Le test du gonflement a été fait en utilisant un microscope optique ( AXIOLAB, ZEIZZ ) et les images capturées par une caméra ( Hamamastu, Japon ). La solution de  $MB^+$   $2,5 \cdot 10^{-5} M$  est préparée à température ambiante sous agitation pendant une heure. Cette solution aqueuse colore les billes ce qui permet de suivre leur gonflement.

Les microsphères sont déposées sur une cellule MALASSEZ leur taille est précisément mesurée dans leur état sec ( $S_0$ ) et sont mouillées par quelques gouttes de solution aqueuse de  $MB^+$ . Dès que les microsphères sont mouillées, le gonflement est mesuré à intervalles de temps précis ( $S_t$ ). Le ratio de gonflement  $R_s$  pour chaque intervalle de temps est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$R_s = (S_t - S_0) / S_0$$

Où  $S_t$  et  $S_0$  sont respectivement la taille des billes au temps t et à l'état sec.

### **1.2.3.3 Localisation de la poly-L-lysine sur les microsphères de k-carraghénane.**

La microscopie à fluorescence optique confocale est un outil qui nous permet de localiser précisément des molécules fluorescentes au sein d'un système. Dans notre cas le système est une microsphère de k-carraghénane revêtue de poly-L-lysine. C'est pourquoi, nous avons utilisé de la poly-L-lysine marquée FITC. La fluorescéine 5-isothiocyanate (FITC) est un chromophore dont la longueur d'onde d'excitation est de  $\lambda_{ex} = 494$  nm et l'émission de  $\lambda_{em} = 512$  nm. Nous avons utilisé un microscope HITACHI avec un grossissement  $\times 10$ , équipé d'une caméra NIKON pour l'acquisition d'images. Le marquage est réalisé par addition de la poly-L-lysine marquée (\*) à la poly-L-lysine non marquée à un taux =  $PLL^*/PLL = 3\%$ . Puis les microsphères d'hydrogel sont recouvertes de ce mélange. Une fois les microsphères sèches, elles sont positionnées sur une lame de verre. Ainsi les microsphères sont exposées à la lumière d'excitation émise par un laser à l'argon. La fluorescence est mesurée sur des plans focaux dont la profondeur augmente de  $1\mu\text{m}$  par plan.

## **1.3 Résultats et discussion**

### **1.3.1 Extrusion des microbilles**

Plusieurs paramètres sont à optimiser dans le processus de formation des billes de gel par extrusion. Le choix de la température s'est porté sur  $80^\circ\text{C}$ . Rappelons qu'il est nécessaire de chauffer la solution de carraghénane afin de la fluidiser et permettre son passage à travers les tubulures et la buse.

La viscosité de la solution est déterminée par la concentration en carraghénane et ne doit pas être trop élevée afin de ne pas colmater ni les tubulures, ni la buse. Il ne faut pas non plus, qu'elle soit trop faible car dans ce cas, il n'est pas possible d'obtenir des sphères. La concentration de carraghénane adaptée est de  $25\text{ g/l}$ .

Le débit influence non seulement la vitesse de formation des microbilles de gel mais aussi leur taille. En effet, lorsque celui-ci diminue, il se forme des gouttes plus volumineuses à la sortie de la buse. Mais deux autres paramètres influencent aussi la taille des microbilles. En effet la fréquence et l'amplitude de vibration qui segmentent le jet de carraghénane sont en relation directe avec la taille des microgouttes. Si la fréquence augmente, la taille

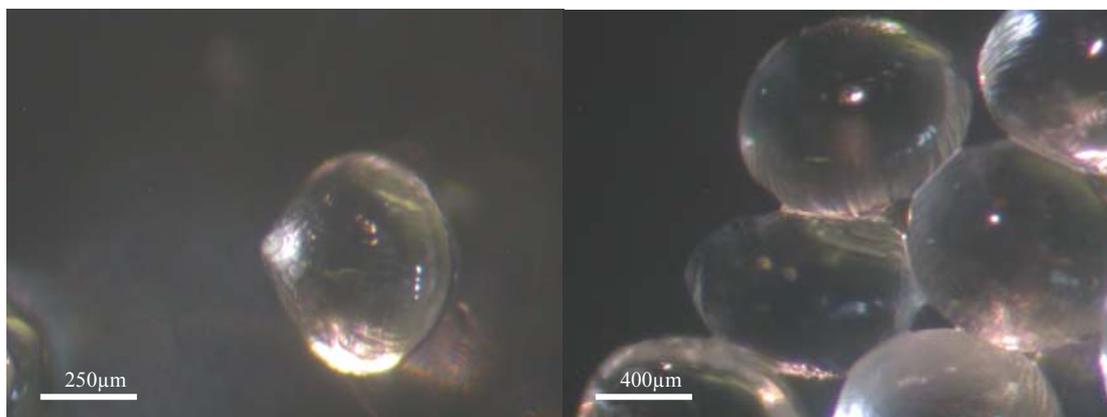
des microgouttes diminue [25]. Les réglages optimums sont de 10ml/min pour le débit de la solution et 700Hz pour la vibration de segmentation.

Nous observons que la distance entre la buse et la solution saline va gérer la sphéricité des microbilles : lorsqu'elle est trop élevée, les microgouttes vont s'écraser au contact de la solution saline et former des disques plats. Par contre si la distance buse-surface de la solution saline est trop faible, la microgoutte n'aura pas le temps de prendre sa forme de bille et portera la marque de la buse. La distance optimisée pour des microbilles sphériques est de 10 cm.

L'agitation lente de la solution de formation est fixée à environ 40 rpm. Celle-ci n'est effectuée que pour assurer un léger brassage de la solution et éviter que les microbilles de gel ne s'agrègent les unes aux autres par contact.

La concentration de la solution saline quant à elle doit être suffisante pour provoquer la gélification de la goutte de polymère. Dans la littérature le choix de la concentration saline est corrélé à celui de la concentration du polymère, elle varie souvent entre 0,3 et 1M [19, 23]. La nature des ions présents dans la solution influence considérablement la gélification. Nous avons choisi le  $K^+$  souvent présenté comme le gélifiant idéal pour le  $\kappa$ -carraghénane.

L'aspect des billes de gel obtenue après l'extrusion de la solution et maturation est observé par microscopie optique (figure 48 ci-dessous)



**Figure 48 : Photographie optique de microsphères après optimisation de l'extrusion**

Nous observons que les billes conservent la morphologie d'une goutte et présente des stries. La taille des billes est comprise entre 600  $\mu\text{m}$  et 700  $\mu\text{m}$ .

### 1.3.2 Maturation des microbilles

Dans la bibliographie, le temps de maturation optimal prend en compte la synérèse de l'hydrogel qui est maximum après environ 10 heures [23]. Nous avons choisi pour des raisons pratiques une durée de maturation de 12h.

### 1.3.3 Comparaisons des cryogels et aérogels de k-carraghénane.

#### ➤ Aspect général des microsphères après séchage

Pour comparer les microsphères, nous les avons observées par microscopie électronique à balayage.

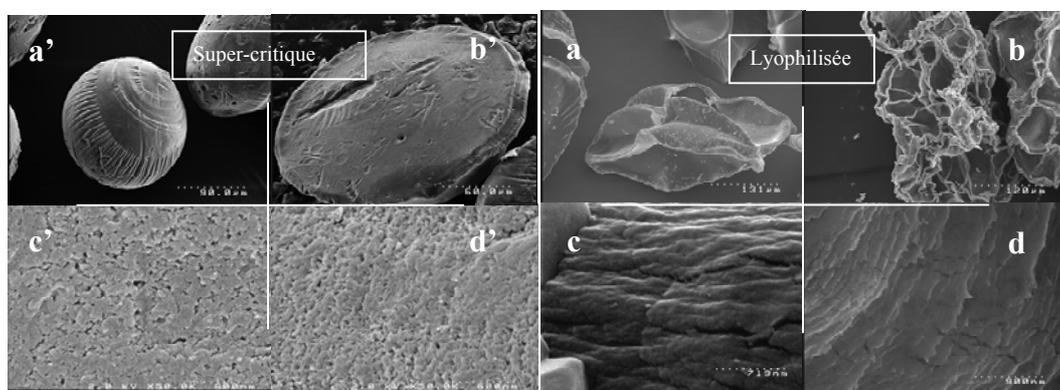


Figure 49 : Clichés de microscopie électronique à balayage.

On peut observer sur la Figure 49, l'aspect microscopique de la surface des microsphères de gel séchées par lyophilisation ou en milieu CO<sub>2</sub> super-critique.

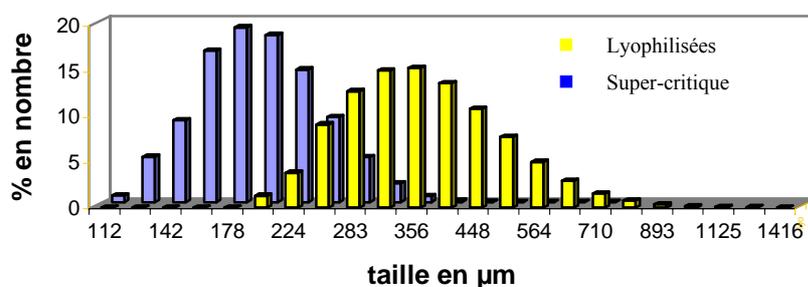
Le cliché **a'** est une microsphère séchée en milieu super-critique. Nous voyons que la morphologie est similaire à celle d'une microsphère avant séchage (voir figure 48), seule la taille diffère. En effet les microsphères séchées mesurent en moyenne 180  $\mu\text{m}$  alors que les billes d'hydrogel mesurent en moyenne 650  $\mu\text{m}$ . Nous constatons des stries en périphérie de la surface, attribuées à une contraction du gel au cours de la maturation. Ceci est dû au phénomène de synérèse du gel. Des phénomènes semblables apparaissent sur des gels d'acrylamide soumis au gonflement. **Tanaka et coll** [137] rapportent l'apparition de structures striées à la surface des gels acrylamide durant le processus de gonflement de ceux-ci. Le phénomène est expliqué par la tension mécanique exercée au niveau d'une fine couche en surface du gel. Cette couche soumise au gonflement par effet osmotique est libre de s'étendre coté extérieur alors que du coté intérieur du gel, elle est retenue par le cœur du gel. La couche de surface est donc soumise à des demandes opposées : d'une part,

une surface externe en expansion et d'autre part, une surface intérieure fixe. On peut imaginer un phénomène semblable dans le cas du carraghénane. Le cliché **b'** est la vue d'une microsphère sectionnée à l'aide d'un scalpel et séchée en milieu super-critique. Nous constatons que la microsphère est pleine et que la texture est homogène sur tout le diamètre. Les clichés **c'** et **d'** sont respectivement des agrandissements des surfaces externe et interne des clichés **a'** et **b'**. Il est difficile d'établir des différences entre ces deux clichés, car ils présentent chacun une surface poreuse similaire.

Le cliché **a** représente une microparticule lyophilisée. Cette particule n'a plus sa sphéricité et présente une structure membranaire. Le cliché **b** est la vue d'une particule sectionnée à l'aide d'un scalpel. Ce cliché révèle des cavités macroscopiques. Bien que l'ensemble de la bille soit expansé, on constate sur les clichés **c** et **d** qui sont respectivement des agrandissements des surfaces externe et interne des clichés **a** et **b**, une densification des parois de chaque cavité.

➤ Distribution de taille des microsphères sèches

Le graphique suivant nous donne la distribution de taille des microsphères séchées par lyophilisation et de celles séchées en milieu CO<sub>2</sub> super-critique.(Figure 50)



**Figure 50 : Histogramme représentant la distribution de taille en nombre des différentes particules sèches. (lyophilisées ou aérogel)**

L'histogramme des particules séchées en milieu super-critique, présente une distribution plus étroite que celle des particules lyophilisées. De plus la taille moyenne des microsphères séchées en milieu super-critique est plus faible (180µm) que la taille moyenne des particules lyophilisées (350 µm). Ceci peut s'expliquer de deux manières.

Soit, les particules lyophilisées sont de taille supérieure soit, elles ne présentent pas une morphologie sphérique. En effet la non sphéricité peut être un handicap dans la mesure granulométrique par diffusion de la lumière. Pour des particules non sphériques, la taille obtenue sera le diamètre de la sphère équivalente en volume (cf. p 65).

➤ Evaluation de la surface spécifique

Les microsphères séchées par lyophilisation présentent une isotherme ne permettant pas de calculer la surface spécifique par la théorie BET, tandis que pour les microsphères séchées en milieu CO<sub>2</sub> super-critique on observe une isotherme de type IV dans la classification IUPAC (Figure 51). Cette isotherme est caractéristique d'un solide mésoporeux et la surface spécifique calculée par la théorie BET est égale à 180m<sup>2</sup>/g.

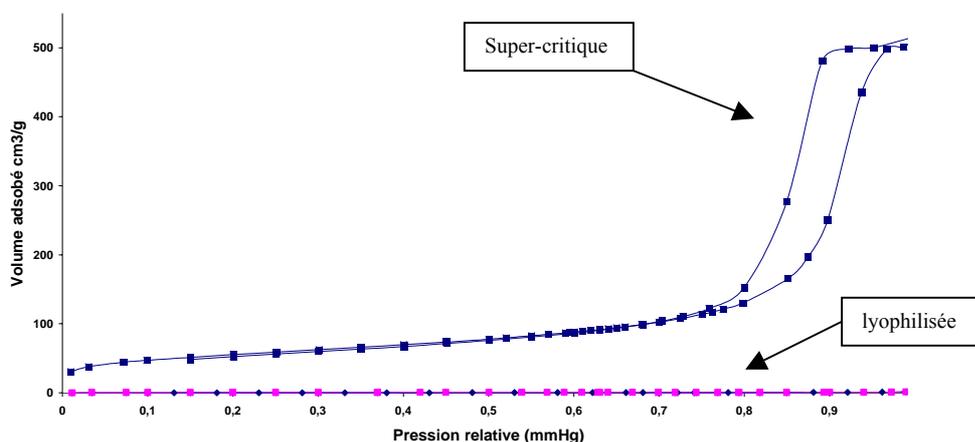
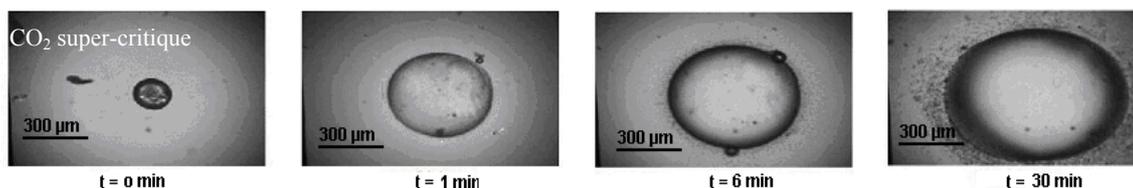


Figure 51 : Isothermes d'adsorption/désorption d'azote à 77 K sur les deux types de microsphères

➤ Cinétique de gonflement

Les photos suivantes illustrent le gonflement en fonction du temps de billes séchées par lyophilisation et en milieu CO<sub>2</sub> super-critique (Figure 52).



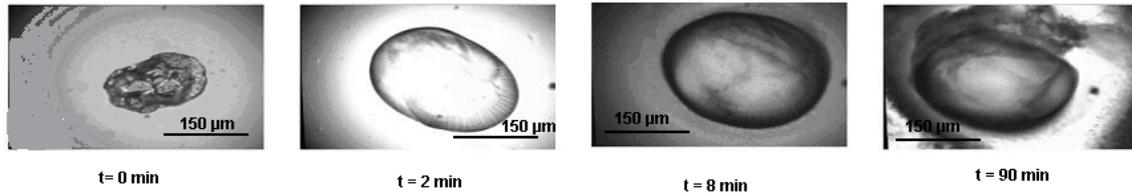


Figure 52 : Photos illustrant les cinétiques de gonflement des différentes microsphères.

Ces photographies nous permettent de constater que le gonflement est uniforme dans deux directions de l'espace.

Mais aussi de mesurer le gonflement des particules en fonction du temps. Ainsi nous avons pu déterminer le ratio de gonflement des particules. Nous avons ainsi tracé le graphique suivant (Figure 53).

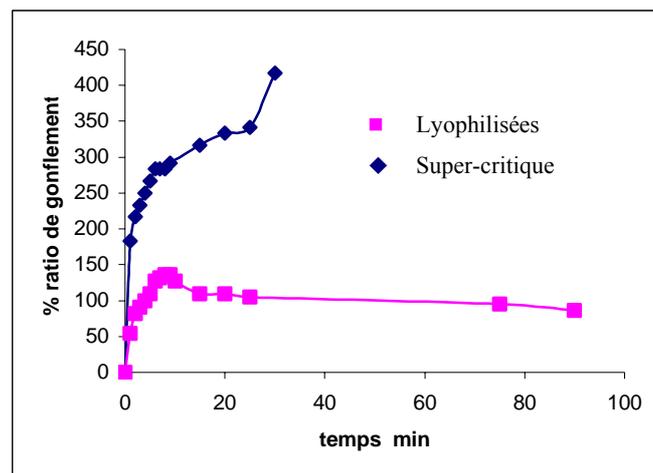


Figure 53 : Courbes illustrant le gonflement (après séchage) des microsphères en milieu aqueux en fonction du temps

Le profil de gonflement en fonction du temps des microsphères lyophilisées présente plusieurs régimes. Le premier régime est rapide et la microsphère double sa taille en 5 minutes. Le deuxième semble montrer une stabilité de quelques minutes, suivi d'une chute brutale, que nous pouvons attribuer à une érosion. Puis la taille diminue progressivement. Globalement, nous pouvons décrire le gonflement comme étant faible et limité.

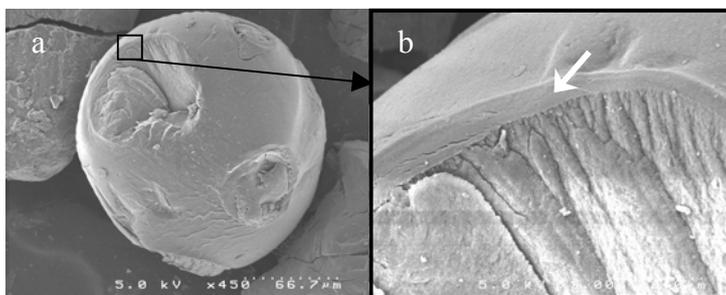
Le profil de gonflement des microsphères séchées en milieu super-critique, présente un seul régime de gonflement très rapide et la taille des microsphères quadruple jusqu'à désintégration de la particule.

Nous pouvons déduire de ces comportements traduisant probablement que les microsphères séchées en milieu CO<sub>2</sub> super-critique possèdent une structure proche de celle de l'hydrogel de départ. Tandis que les particules lyophilisées ne semblent pas retrouver cet état. Si nous faisons la relation avec les résultats d'analyse volumétrique nous pouvons penser que la porosité des microsphères séchées en milieu super-critique est proche de celle du gel.

### 1.3.4 Effet du recouvrement des microsphères par la PLL

Les tests ont été effectués sur des microsphères séchées en milieu CO<sub>2</sub> super-critique.

#### 1.3.4.1 Examens morphologique et textural des microsphères revêtues de PLL



**Figure 54 :** Clichés de microscopie électronique à balayage. a) vue générale d'une microsphère de  $\kappa$ -carraghénane ayant subi un recouvrement de PLL ; b) agrandissement d'une zone du cliché (a).

Cliché **a** : l'échelle est de 66,7 $\mu$ m. La taille et la forme des microsphères restent identiques aux microsphères de carraghénane d'origine. Nous pouvons observer une cavité sur la surface. Celle-ci a été creusée manuellement à l'aide d'une pointe métallique. Cela nous a permis de constater que la microsphère est pleine.

Cliché **b** : l'échelle est de 10 $\mu$ m. Cette photo est un agrandissement de la zone encadrée en noir sur la photo **a**. Nous pouvons observer une zone marquée par une flèche blanche. Cette zone est d'une texture plus dense et a une épaisseur qui varie de 3  $\mu$ m à 6  $\mu$ m.

Nous pouvons penser que cette couronne est la conséquence d'un coacervat entre le  $\kappa$ -carraghénane et la poly-L-lysine.

### 1.3.4.2 Mesure de la surface spécifique

La figure 54 suivante représente les isothermes d'adsorption/désorption d'azote à 77 K, des microsphères séchées en milieu super-critique avec et sans recouvrement de PLL. Pour les microsphères revêtues de PLL l'isotherme d'adsorption d'azote à 77 K représentée est de type IV mésoporeux dans la classification IUPAC. La surface spécifique calculée par la théorie BET est de 130 m<sup>2</sup>/g. Cette valeur reste une grande surface spécifique proche de la surface des microsphères de k-carraghénane séchées en milieu super-critique (180m<sup>2</sup>/g).

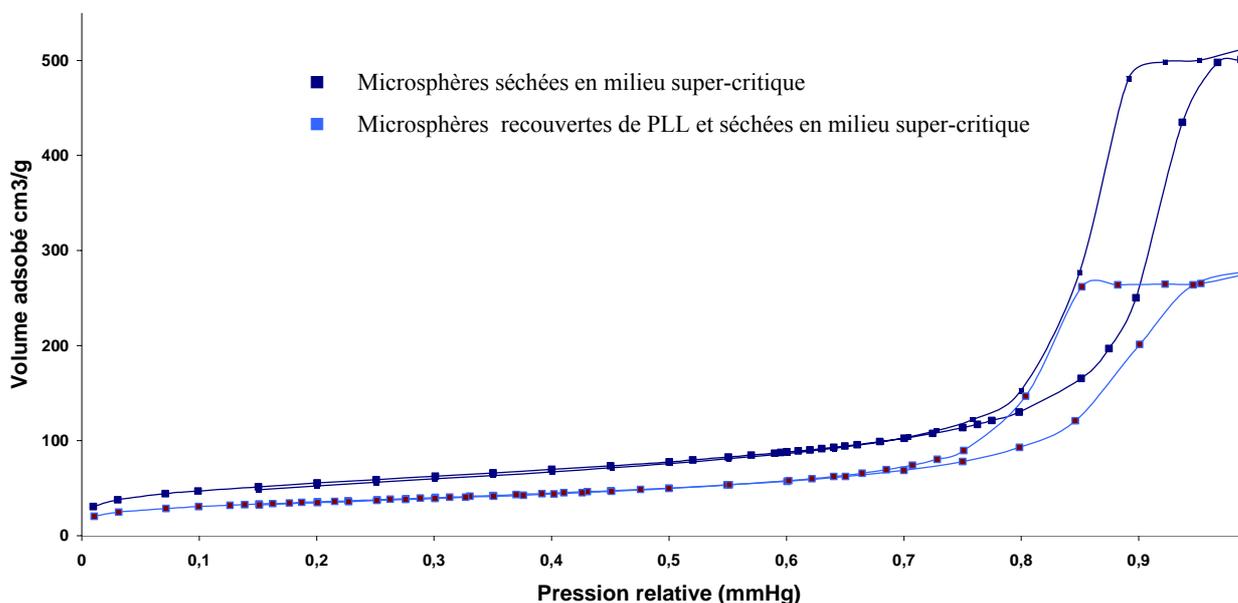


Figure 55 : Isothermes d'adsorption/désorption d'azote à 77 k

La comparaison des deux isothermes nous permet de dire que le volume mésoporeux est inférieur dans le cas des microsphères recouvertes de PLL. Nous avons établi que la quantité de PLL adsorbée/gramme de k-carraghénane est d'environ de 3,5 mg/g (voir annexe A). Si nous ramenons le volume adsorbé/gramme de solide au volume adsorbé/gramme de k-carraghénane, nous ne constatons pas de modification significative sur l'isotherme d'adsorption des microsphères recouvertes de PLL. Ceci implique que la PLL joue un rôle dans la porosité des microsphères.

### 1.3.4.3 Microscopie de fluorescence optique confocale

Cette technique nous permet d'évaluer la distribution radiale de la concentration en poly-L-lysine au sein des microsphères.(cf. figure 56)

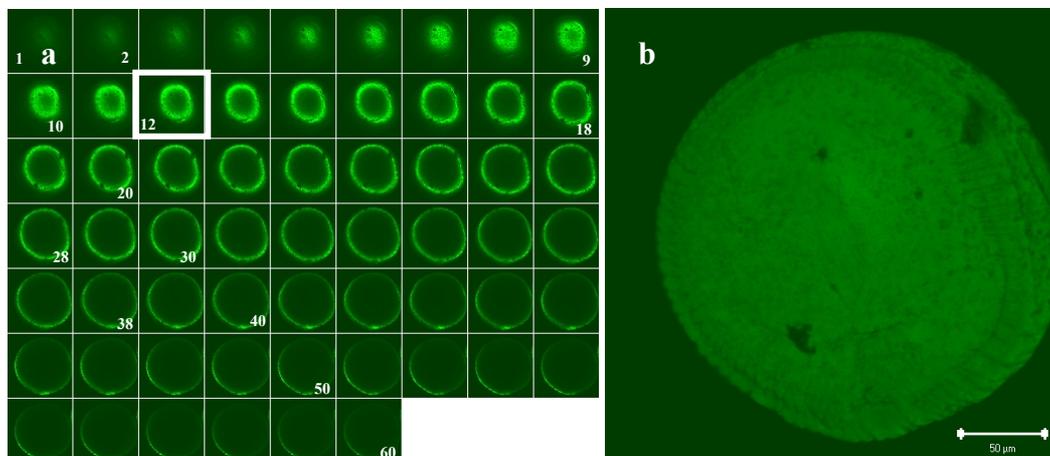


Figure 56 : a) Images des plans confocaux de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur d'une microsphère de k-carraghénane avec recouvrement de la surface par de la PLL marquée en FITC ; b) Image du cumul de tous les plans confocaux.  $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$ .

Sur l'image (a), nous avons disposé une succession de plans confocaux espacés d'une profondeur de 1  $\mu\text{m}$  l'un de l'autre. Le plan numéroté 1 correspond au plan confocal situé sur la surface externe de la microsphère. Le plan n°2 correspond à une coupe située à 2  $\mu\text{m}$  de profondeur par rapport la surface de la microsphère, le plan n°10 à 10  $\mu\text{m}$  et ainsi de suite. A partir du plan n°12 le plan représente un cercle donc nous pouvons considérer que la couche de PLL a une épaisseur proche de 12  $\mu\text{m}$ . Ce qui pourrait indiquer que la poly-L-lysine diffuse dans l'hydrogel jusqu'à cette profondeur. L'image (b) est un cumul de tous les plans confocaux superposés. Cette superposition donne une représentation fidèle de la surface externe de la microsphère. Celle-ci apparaît similaire aux clichés de microscopie électronique à balayage.

### 1.3.4.4 Mesure du gonflement

La mesure de gonflement est effectuée dans les mêmes conditions que pour les microsphères de carraghénane, quelque soit le type de séchage.(cf. Figure 57) Le profil de gonflement des microsphères recouvertes de PLL présente au moins deux régimes. Le premier est un régime très rapide dans lequel la microsphère double quasiment de taille.

Le deuxième a une cinétique de gonflement très lente, jusqu'à une quasi stabilité. Ce qui implique que la poly-L-lysine évite ou ralentit l'érosion de la microsphère.

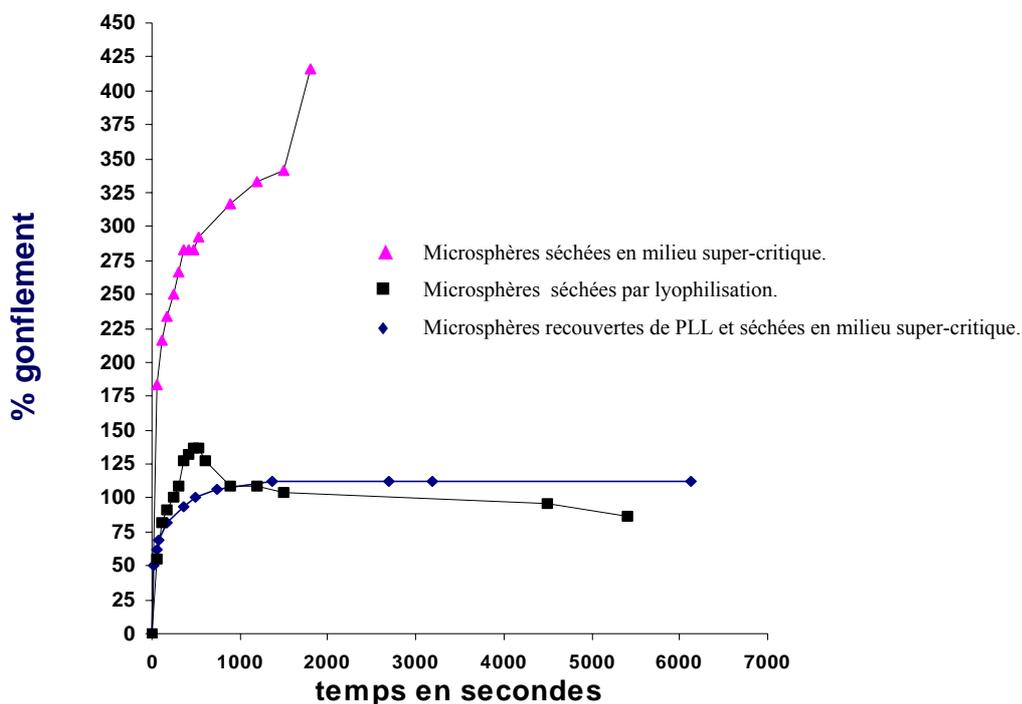


Figure 57 : Courbes illustrant le gonflement des microsphères sèches en milieu aqueux en fonction du temps.

En effet, la comparaison des différents profils de gonflement met en évidence l'érosion des microsphères aussi bien dans le cas des microsphères séchées en milieu super-critique que pour les microsphères lyophilisées. Dans le cas des microsphères séchées en milieu super-critique nous avons déjà vu que cette érosion se caractérise par une rapide désintégration. Dans le cas des microsphères lyophilisées, l'érosion se caractérise par une diminution régulière de la taille en fonction du temps. Dans le cas des microsphères recouvertes de PLL l'absence d'érosion se caractérise par un plateau stable dans le temps. Nous constatons que la nature du séchage a une forte influence sur le profil de gonflement. Ces constatations renforcent l'idée que la poly-L-lysine a un rôle déterminant dans le comportement des microsphères vis-à-vis du gonflement. Nous pensons qu'un tel comportement est la conséquence d'un coacervat entre la PLL et le carraghénane de surface des microsphères, un phénomène que nous avons déjà observé sur un mélange de iota-carraghénane et de poly-L-lysine [138].

## 1.4 Conclusion

A partir de techniques d'observation et en multipliant les expériences nous avons réussi à optimiser l'extrusion de la solution de k-carraghénane. Nous avons obtenu des microsphères de taille relativement monodisperse (environ 250  $\mu\text{m}$ ) et de forme quasi sphérique. Le tableau 2 suivant récapitule les principales caractéristiques des microsphères sèches. Ces résultats nous ont permis de choisir la technique de séchage en milieu super-critique comme étant la plus adaptée à nos exigences. A savoir que nous voulions des particules sèches sphériques avec une grande porosité et une bonne stabilité.

	Surface spécifique	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Taille	Gonflement
<b>Lyophilisées</b>	Faible	Non sphériques membranaires	Spongieuses	350 $\mu\text{m}$	Faible
<b>Super-critique</b>	180m <sup>2</sup> /g	Sphériques	Poreuses	180 $\mu\text{m}$	Fort et rapide
<b>Carraghénane + PLL</b>	130 m <sup>2</sup> /g	Sphériques	Poreuses	180 $\mu\text{m}$	Faible

Tableau 2 : Récapitulation des principales caractéristiques des microsphères sèches.

En effet les microsphères lyophilisées ont une surface spécifique faible qui est proche de la surface spécifique du carraghénane en poudre avant gélification. Celle-ci ne présente aucune porosité. A contrario, le séchage en milieu CO<sub>2</sub> super-critique produit des microsphères ayant une grande surface spécifique avec une isotherme d'adsorption d'azote à 77 K de type IV (mésoporeuse).

La distribution de taille très large des microsphères lyophilisées corrobore l'aspect macroscopique non sphérique de celles-ci. La courbe du gonflement en fonction du temps, montre la capacité des microsphères à retrouver leur état d'hydrogel. Donc on peut établir que les microsphères séchées en milieu CO<sub>2</sub> super-critique présentent une structure proche de celle de l'hydrogel et que la technique de séchage en milieu super-critique est la plus adaptée à l'exigence de nos perspectives de travail. De plus, le tableau récapitule aussi les principales caractéristiques des microsphères recouvertes de poly-L-lysine. Nous pouvons établir que la poly-L-lysine n'a pas d'influence sur la morphologie et la taille de la bille, que la surface spécifique est légèrement diminuée. Le profil de la courbe de gonflement

met en évidence que la PLL joue un rôle dans la vitesse d'érosion des microsphères. Ceci peut être la conséquence d'un renforcement du gel en périphérie des microsphères par la formation d'un coacervat. Cette caractéristique pourra certainement influencer la synthèse des matériaux hybrides.

## 2 Elaboration de microsphères hybrides organique/inorganique.

### 2.1 Introduction

Dans le chapitre précédant nous avons décrit l'optimisation de la fabrication et du séchage des microsphères de k-carraghénane afin d'obtenir des particules sphériques, de taille homogène et qui présentent une mésoporosité.

Le chapitre suivant décrit les différentes voies de synthèse de microsphères hybrides carraghénane/silice où des microsphères de k-carraghénane vont servir d'objets structurants « template » à la silice et ainsi transmettre leur morphologie aux matériaux hybrides. Différents paramètres seront testés : nature du précurseur silicique, rapport précurseur/eau, pH, catalyseur. Les caractéristiques morphologiques, texturales et structurales des microsphères avant et après calcination à 550°C, seront déterminées par microscopie à balayage électronique, analyse thermogravimétrique, microscopie optique à fluorescence confocale, microanalyse électronique par rayon X (EDX) et par adsorption d'azote.

Le premier objectif est de mettre au point une méthode simple, reproductible et applicable au sein du laboratoire pour élaborer des microsphères hybrides. A l'issue de la synthèse, les microsphères hybrides devront avoir conservées une morphologie similaire aux microsphères de k-carraghénane. La première difficulté sera de concilier la fragilité d'un hydrogel avec un processus chimique qui peut exiger et comporter de nombreuses entités incompatibles avec un polysaccharide comme le k-carraghénane. Le concept qui semble le plus compatible à un tel objectif est *la chimie douce* [80]. C'est pourquoi, dès le départ, nous avons orienté nos études vers un procédé sol-gel.

Dans la littérature, il existe de nombreux précurseurs siliciques qui possèdent chacun des propriétés chimiques et physiques propres. Leurs différences sont principalement dues aux ligands alkyls qui peuvent varier en longueur, voire en nature. Les principaux sont le tétraméthoxysilane (TMOS), le tétraéthoxysilane (TEOS) et le tétrabutoxysilane (TBOS), mais aussi des précurseurs mixtes comme le triéthoxysilane-propylamonium et le triéthoxysilane-propylamine. Dans un premier temps, nous comparerons l'influence de la nature du précurseur silicique (TMOS et TEOS) sur les principales caractéristiques des microsphères hybrides. Cette comparaison nous permettra de déterminer le précurseur silicique le plus apte à former des matériaux hybrides correspondants à nos exigences morphologiques et texturales (particules sphériques, de taille homogènes et mésoporeuses).

Le choix du précurseur n'est pas le seul paramètre influençant les caractéristiques de l'hybride. En effet, l'homogénéisation du milieu réactionnel doit être maximale, mais les contraintes mécaniques doivent être réduites à leur minimum, afin d'éviter l'altération des microsphères de  $\kappa$ -carraghénane. Donc, l'objectif second sera d'optimiser la procédure, notamment la méthode d'agitation du système.

Enfin, nous avons établi précédemment que le recouvrement des microsphères de carraghénane par la PLL avait une influence sur le comportement de celle-ci vis-à-vis d'une solution aqueuse et de la cinétique de gonflement. Nous étudierons l'influence du recouvrement de PLL sur les caractéristiques principales des microsphères hybrides élaborées à partir de différent précurseurs et ce dans toutes les conditions d'agitation.

## 2.2 Matériels et méthodes

### 2.2.1 Produits

- Le tétraméthoxysilane lot n° S11516-222 pur à 99% (ALDRICH).
- le tétraéthoxysilane lot n° S15454-483 pur à 98% (ALDRICH).
- NaF (ALDRICH)
- Eau miliQ ultrapure

## 2.2.2 Elaboration des microsphères hybrides

### 2.2.2.1 Extrusion

L'élaboration des microparticules hybrides commence toujours par la fabrication de microsphères de k-carraghénane. Ainsi la procédure d'extrusion de la solution de k-carraghénane est parfaitement identique à celle décrite page 82.

### 2.2.2.2 Mélange réactionnel

Le milieu réactionnel doit comporter :

- Les microsphères de k-carraghénane ou de k-carraghénane recouvertes de PLL,
- Le précurseur silicique,
- L'eau,
- Le catalyseur de la réaction de polycondensation du précurseur silicique.

Après leur période de maturation de 12 heures, 2 g de microsphères de  $\kappa$ -carraghénane sont prélevés de la solution saline, puis lavés à l'eau froide (5°C). Après essorage, les microsphères sont disposées au fond d'un pilulier de 25 ml type Wheaton. Les microsphères sont ensuite inondées par un mélange eau/précurseur silicique. Le volume du mélange est d'environ 17 ml comprenant 0,27 mole d'eau ultra pure (miliQ) et 0,0566 mole de précurseur silicique. Pour catalyser la réaction de polycondensation du précurseur, 50 mg de NaF (ALDRICH) sont ajoutés au mélange.

### 2.2.2.3 Agitation

Deux types d'agitation du système ont été envisagés. Le premier consiste en une agitation avec un barreau magnétique et le second par rotation de tout le réacteur. Pour cela nous avons utilisé un agitateur (Heidolph Reax2) mécanique qui le met en rotation autour de son axe horizontal et ceci pendant 12 heures (Figure 58).

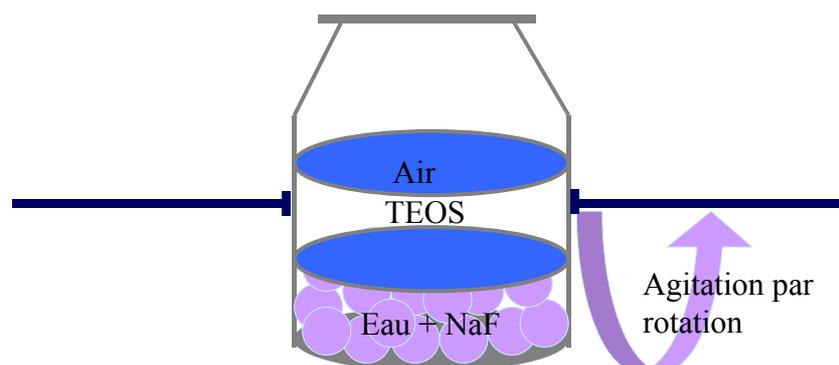


Figure 58 : Schéma du modèle d'agitation par rotation

#### 2.2.2.4 Séchage

Nous avons choisi de sécher les microsphères par le procédé en milieu CO<sub>2</sub> super-critique que nous avons développé pour les microsphères de k-carraghénane. Cependant, la procédure de déshydratation préalable au séchage diffère. En effet, celle-ci doit être plus brutale, nous procédons à l'échange eau/éthanol directement dans des bains d'éthanol pur, ceci afin d'éviter le gonflement du polymère au sein de l'hybride.

#### 2.2.3 Caractérisation des microsphères hybrides

Le type de précurseur silicique, la méthode d'agitation et la nature des microsphères utilisés lors de la synthèse, ont une influence sur la morphologie et la texture des hybrides produits. Afin de déterminer l'influence de ces conditions, nous avons procédé à des vérifications qualitatives. Dans les premiers temps, nous observons la morphologie et la texture des microparticules issues des différentes voies de synthèse. Pour cela, nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage. Le conditionnement des échantillons et le matériel utilisés ont été décrits précédemment à la page 63. Par la suite, nous avons établi par adsorption d'azote à 77 K la surface spécifique calculée d'après la théorie BET. Ces matériaux étant des hybrides, nous pensons que la valeur de la surface spécifique est due à une combinaison de deux sous réseaux, organique (k-carraghénane) et inorganique (silice). C'est pourquoi nous avons procédé à une calcination de chaque type d'hybride ainsi qu'à des analyses thermogravimétriques afin de pouvoir déterminer la contribution à la surface spécifique de la matière inorganique. La calcination a été faite sous air à 550°C et

l'analyse thermogravimétrique poursuivie jusqu'à 800°C sous atmosphère naturelle. Enfin, nous avons examiné des photos prises en microscopie optique à fluorescence confocale dans les conditions décrites page 67. Ces clichés nous ont permis de localiser chaque entité présente au sein de chaque type d'hybride.

## 2.3 Résultats et discussion

### 2.3.1 Influence du précurseur silicique

Notre choix s'est orienté vers deux précurseurs qui sont le TEOS et le TMOS. Chacun est associé aux microsphères de k-carraghénane avec et sans PLL pour conduire à des matériaux hybrides différents. La comparaison et l'étude de ces hybrides nous permettent de déterminer l'influence des précurseurs et ainsi de choisir celui qui nous permet d'aboutir au matériau adapté à notre cahier des charges.

#### 2.3.1.1 Etude morphologique

Dans un souci de clarté et dans l'espoir d'être succinct nous avons choisi des clichés de microscopie électronique à balayage les plus représentatifs et explicites du point de vue morphologique. C'est pourquoi certains clichés ne représentent qu'une zone de particule ou que certaines sont des particules sectionnées. (cf. tableaux 3,4,5,6)

Du point de vue morphologique, la comparaison des particules obtenues à partir de TEOS (clichés **a** et **c**, tableau 3) et de TMOS (clichés **b** et **d**), fait apparaître deux types fondamentalement différents. Le cliché **a** représente une zone d'une microparticule hybride issue d'un milieu réactionnel agité par un barreau magnétique. Cette microparticule fait partie d'un ensemble de particules dont la taille moyenne globale est voisine de 300  $\mu\text{m}$ . Elles ne présentent pas de sphéricité et n'ont pas de ressemblance avec les microsphères de k-carraghénane d'origine (cf. p.89, figure 49 **a'**). Cependant, elles présentent tout de même des caractéristiques fossiles de la microsphère organique d'origine. La flèche blanche souligne ces caractéristiques.

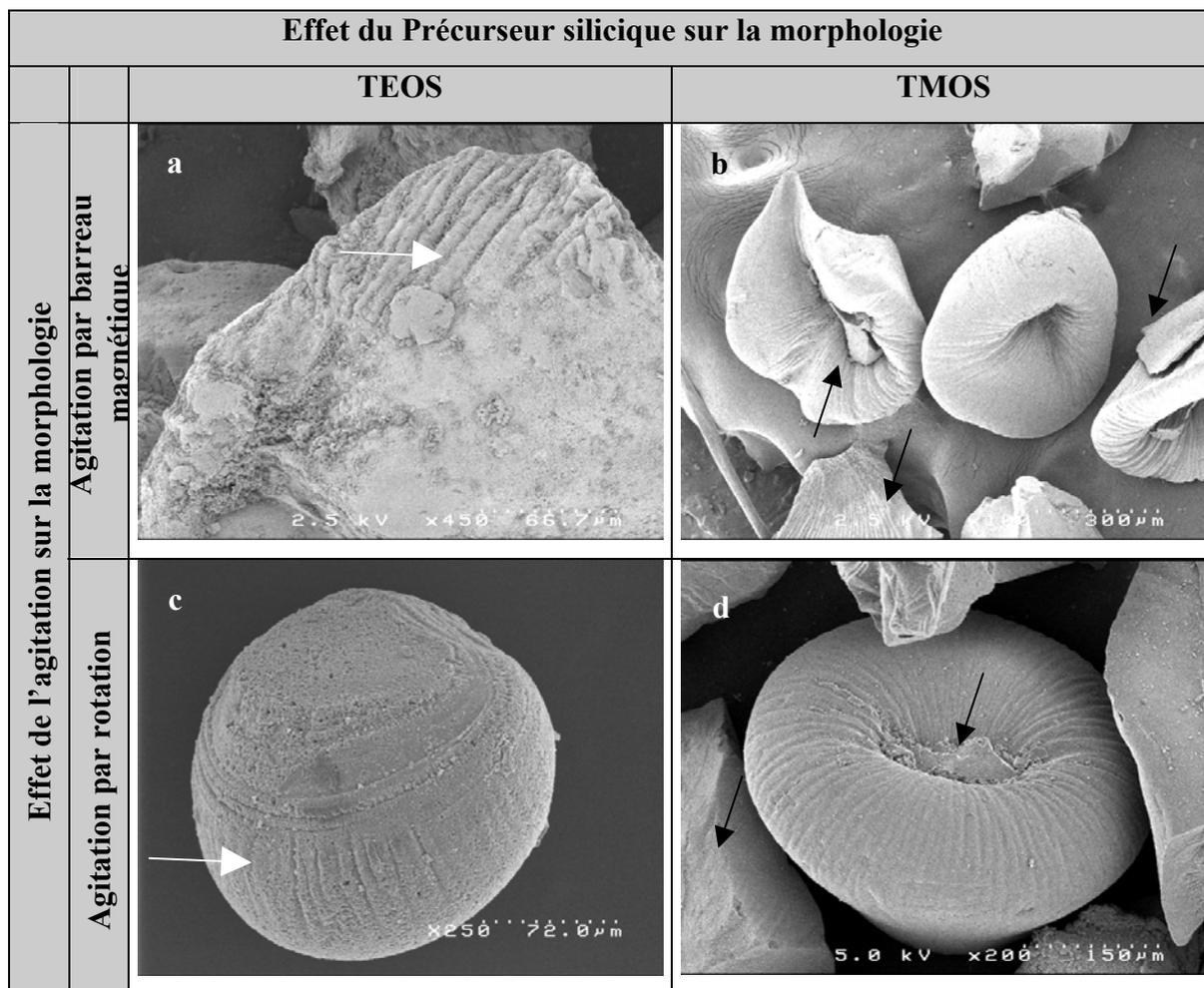


Tableau 3 : Illustration des différences morphologiques de microsphères hybrides élaborées par deux types d'agitation à partir de billes de k-carraghénane et de deux précurseurs siliciques.

Le cliché **b** représente plusieurs microparticules hybrides issues d'un milieu réactionnel agité par barreau magnétique. La taille moyenne de ces microparticules est de 350  $\mu\text{m}$ . Il semblerait que toutes les particules présentent une morphologie identique, avec un effondrement structural du cœur de chacune. Les stries présentes à la surface des particules correspondent à celles observées sur les microsphères organiques d'origine (cf. p 89, figure 49 **a'**). Nous savons que ces stries sont dues à des phénomènes de synérèse au sein des microsphères d'hydrogel. Ces considérations nous amènent à penser que l'effondrement des microparticules peut-être dû à un phénomène de synérèse du gel. Celui-ci pourrait être favorisé par le fait que la TMOS est immiscible à l'eau contenue dans le gel, le TMOS pourrait alors chasser l'eau du gel et ainsi forcer une synérèse de l'eau. Sur le même cliché nous observons aussi des agrégats (marqués par des flèches noires), ceux-ci sont sans nuls doutes issus de la gélification du TMOS dans le milieu

réactionnel. Ces agrégats sont présents aussi bien dans la cavité des microparticules hybrides qu'en surface de celles-ci. Nous observons la présence de stries sur les agrégats mais celles-ci semblent être moulées sur les stries des microparticules hybrides.

Comparons maintenant les clichés de microparticules issues d'un même milieu réactionnel mais agités par deux méthodes différentes, les clichés **a** et **c** ainsi que les clichés **b** et **d**.

Dans le cas où le milieu réactionnel contient du TEOS (clichés **a** et **c**), nous n'avons aucune similitude morphologique entre les deux types de microparticules hybrides.

Le cliché **c** représente une microsphère hybride issue d'un milieu réactionnel agité par rotation. La taille de la particule est d'environ 150 $\mu\text{m}$ . La particule semble homogène et sphérique. Par ailleurs, nous avons vérifié en sectionnant la particule que celle-ci n'est pas creuse. Cette microsphère hybride a une grande similitude morphologique avec la microsphère organique représentée sur le cliché **a'** de la figure 49 page 89.

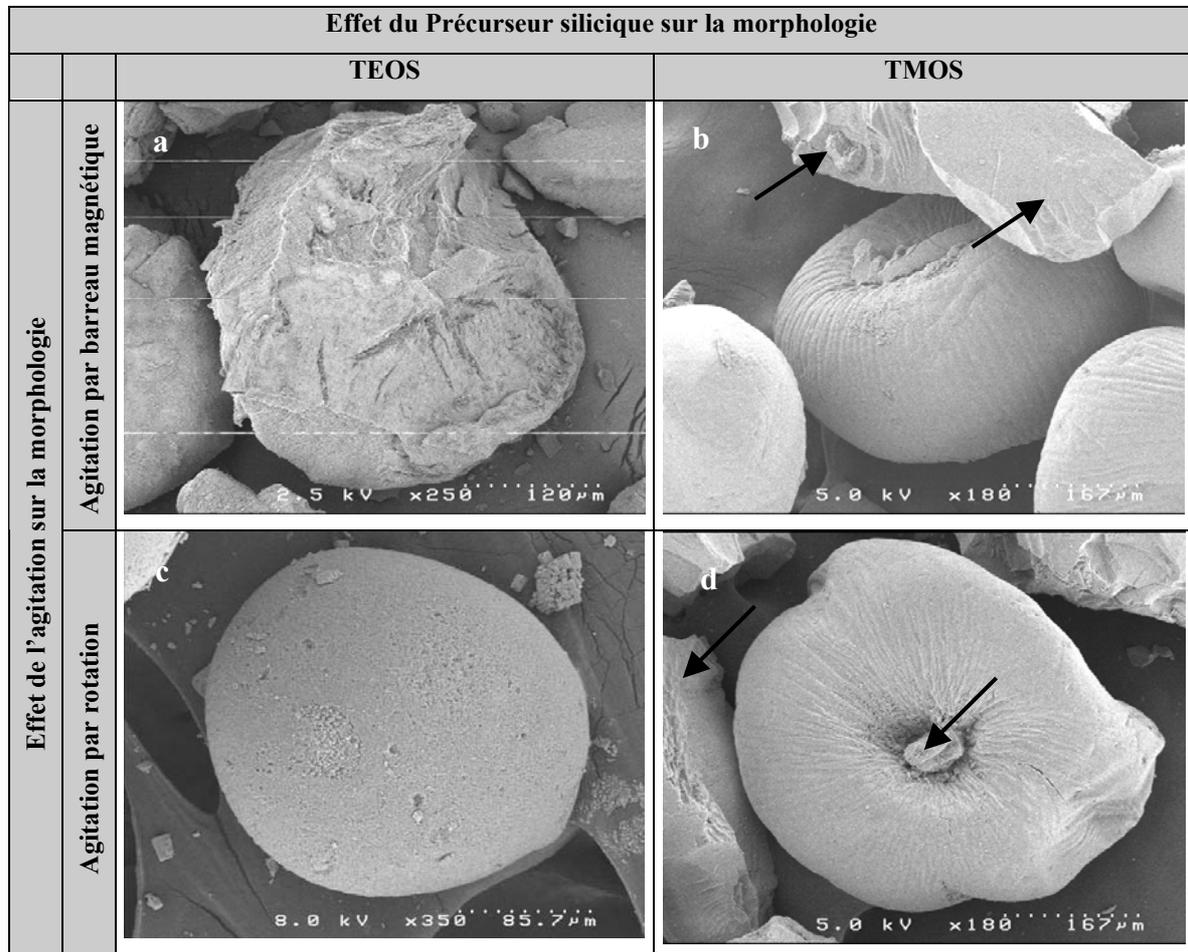
Donc, dans le cas des particules hybrides synthétisées dans un milieu contenant du TEOS, l'agitation par un barreau magnétique donne naissance à une particule difforme. Par contre l'agitation par rotation amène à une particule sphérique pleine et homogène.

Dans le cas où le milieu réactionnel contient du TMOS (clichés **b** et **d**), nous observons une grande similitude morphologique entre les deux clichés. Le cliché **d** représente une microsphère hybride issue d'un milieu réactionnel agité par rotation. La taille de la particule est d'environ 350  $\mu\text{m}$ . La morphologie non sphérique avec un cœur effondré laisse apparaître des stries caractéristiques des microsphères de k-carraghénane d'origine. Les flèches noires indiquent la présence d'agrégats, certainement de particules nanométriques siliciques. La comparaison entre les deux clichés (**b** et **d**) ne révèle pas de différences notables.

**Dans le but de préciser la morphologie due à la partie inorganique, nous avons calciné les microparticules.**

Le tableau 4 illustre la différence de morphologie de microsphères hybrides calcinées à 550°C sous air. Les photos **a** et **b** représentent chacune une particule issue de la synthèse d'un hybride élaboré à partir respectivement de TEOS et TMOS et de microsphères de k-carraghénane. L'homogénéisation du milieu réactionnel a été faite par un barreau magnétique. Les photos **c** et **d** représentent des particules hybrides issues des mêmes conditions de synthèse, le milieu réactionnel est agité par rotation.

En examinant les quatre clichés suivants, nous pouvons considérer que la calcination n'affecte pas la morphologie macroscopique des particules. En effet, si nous comparons le tableau 3 au tableau 4, nous ne constatons pas de différence majeure entre les particules calcinées et celles qui ne le sont pas, et ce, quelque soit la procédure d'agitation.

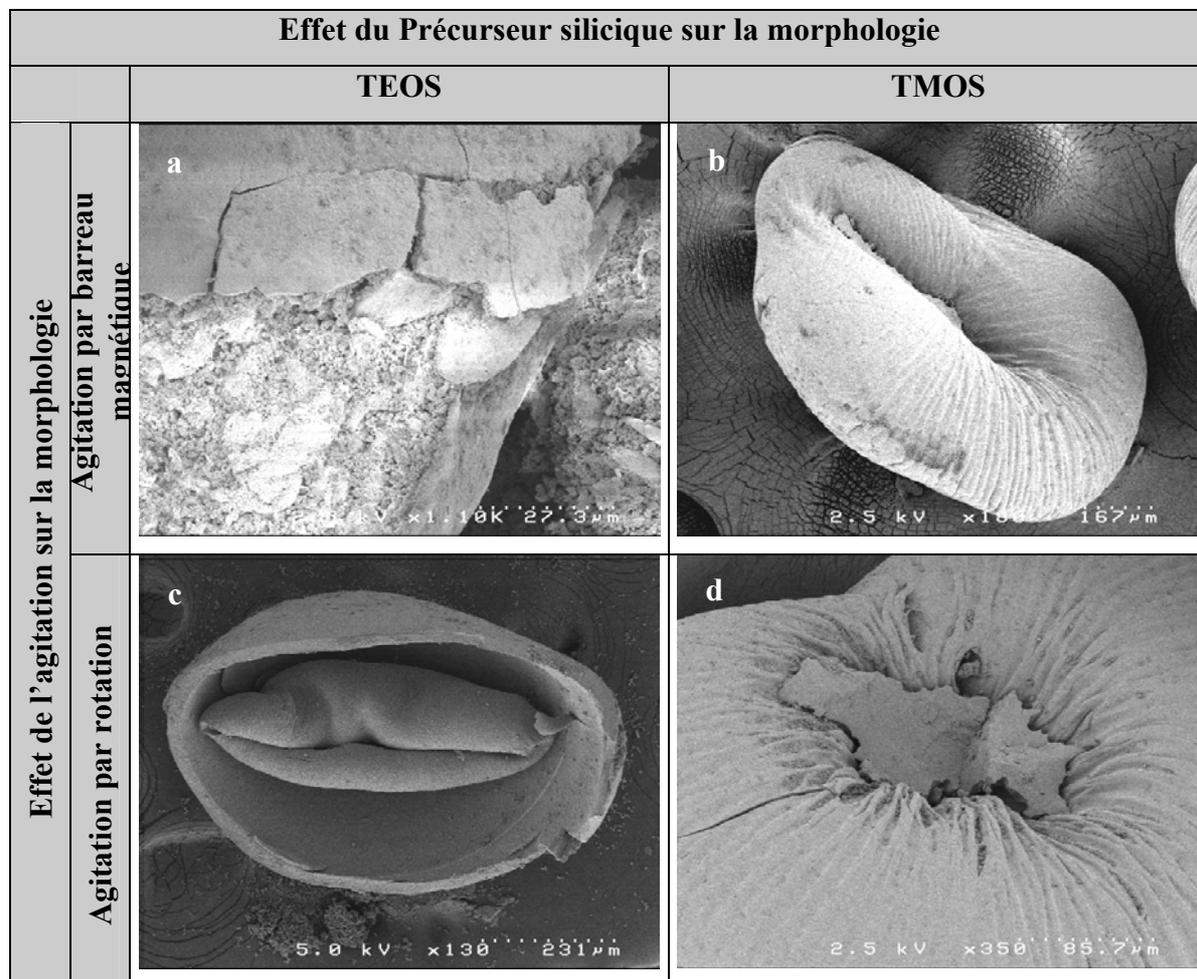


**Tableau 4 : Illustration des différences morphologiques de microsphères hybrides calcinées à 550°C, élaborées par deux types d'agitation à partir de billes de k-carraghénane et de deux précurseurs siliciques.**

Les flèches noires inscrites sur les clichés **b** et **d** marquent des amas de particules nanométriques de silice. Ceux-ci n'ont pas été altérés par la calcination.

De la même façon, le tableau 5 suivant illustre la différence morphologique de microparticules hybrides issues de microsphères de k-carraghénane recouvertes de poly-L-lysine. Les photos **a** et **b** représentent chacune une particule issue de la synthèse d'un hybride élaboré à partir de précurseurs siliciques, (TEOS ou TMOS) et de microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL. L'homogénéisation du milieu réactionnel de synthèse

de l'hybride a été faite par la rotation d'un barreau magnétique. Les photos **c** et **d** représentent des particules hybrides issues de mélanges réactionnels identiques aux clichés **a** et **b** à la seule différence que le milieu réactionnel est agité par rotation autour d'un axe.



**Tableau 5 : Illustration des différences morphologiques de microsphères hybrides élaborées par deux types d'agitation à partir de billes de k-carraghénane recouvertes de PLL et de deux précurseurs siliciques.**

Le cliché **a** représente une zone d'une microparticule hybride élaborée à partir de TEOS, il met en évidence plusieurs caractéristiques :

- La morphologie de la particule ne présente pas de ressemblance avec les microsphères de k-carraghénane d'origine (Cf. p93, figure 54 **a**).
- La Poly-L-lysine semble induire la formation d'une couche dense en surface de la particule. Celle-ci apparaît comme une coquille de quelques micromètres d'épaisseur. Cependant elle présente une fragilité dans les conditions de préparation et le passage par une étape de séchage en milieu CO<sub>2</sub> super-critique. La zone qui n'est plus recouverte par

la coquille présente une texture rugueuse. Cette rugosité est un agglomérat de nanoparticules formant ainsi une surface poreuse interparticulaire.

Le cliché **b** illustre une microparticule hybride issue d'une microsphère de k-carraghénane recouverte de PLL traitée par du TMOS. Le milieu réactionnel est agité par un barreau magnétique. Cette particule a une morphologie similaire aux particules des clichés **a** et **b** du tableau 3. En effet, la taille moyenne est d'environ 350  $\mu\text{m}$ . La particule présente une structure striée caractéristique des microsphères de k-carraghénane et le cœur de la particule est effondré. Il est important de préciser que nous avons contrôlé que la section de la particule est pleine et homogène.

Le cliché **c** représente une section d'une microparticule hybride issue d'un milieu réactionnel agité par rotation. Le mélange réactionnel est composé de microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL et de TEOS. Ce cliché met en évidence une particule sphérique de taille moyenne de 700  $\mu\text{m}$  avec une structure cœur couronne. Autrement dit nous sommes en présence d'une particule sphérique creuse avec une coquille rigide et un cœur rétréci désolidarisé de celle-ci. La coquille a une épaisseur variable qui oscille entre 5  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$ . L'origine de cette couronne est certainement due à l'interaction entre la poly-L-lysine et le précurseur silicique. **J livage et coll** [97,98] ont montré que la poly-L-lysine favorise la condensation de la silice par des études menées en fonction du pH et de la longueur de la chaîne polypeptidique. Ils ont proposé un modèle d'activation mettant en jeu l'adsorption des silicates sur les peptides, ces silicates servant de sites de nucléation pour la formation du gel de silice. De plus une autre étude portant sur la fabrication de sphères creuse de silice a mis en évidence qu'un recouvrement de billes d'alginate par de la poly-L-lysine induit, dans un milieu contenant des silicate, la formation d'une couronne silicique autour des billes d'alginate [127].

Le cœur semble être la conséquence du rétrécissement d'une particule organique qui devait remplir le volume intérieur de la coquille.

Le cliché **d** représente un agrandissement d'une zone d'une microparticule hybride issue d'un milieu réactionnel mélangé par rotation. Le mélange réactionnel contient des microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL et du TMOS. Sur cette image, nous observons des caractéristiques que nous avons rencontré à plusieurs reprises. En effet, la morphologie de la particule est similaire aux particules vues sur les clichés **b** et **d** du

tableau 4 mais aussi du cliché **b** de ce tableau. Ici, le cliché met en évidence un amas dans la cavité de la particule. Nous pensons que cet amas est la conséquence d'une agrégation de nanoparticules de silice.

**Dans le but de préciser la morphologie due seulement à la partie inorganique, nous avons calciné les microparticules.**

De la même façon, le tableau 6 suivant illustre la différence de morphologie de microsphères hybrides calcinées à 550°C sous air. Les photos **a** et **b** représentent chacune une particule issue de la synthèse d'un hybride élaboré à partir de précurseurs siliciques, TEOS, TMOS et de microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL. L'homogénéisation du milieu réactionnel de synthèse de l'hybride a été faite par un barreau magnétique. Les photos **c** et **d** représentent les mêmes particules hybrides à la seule différence que le milieu réactionnel est agité par rotation autour d'un axe.

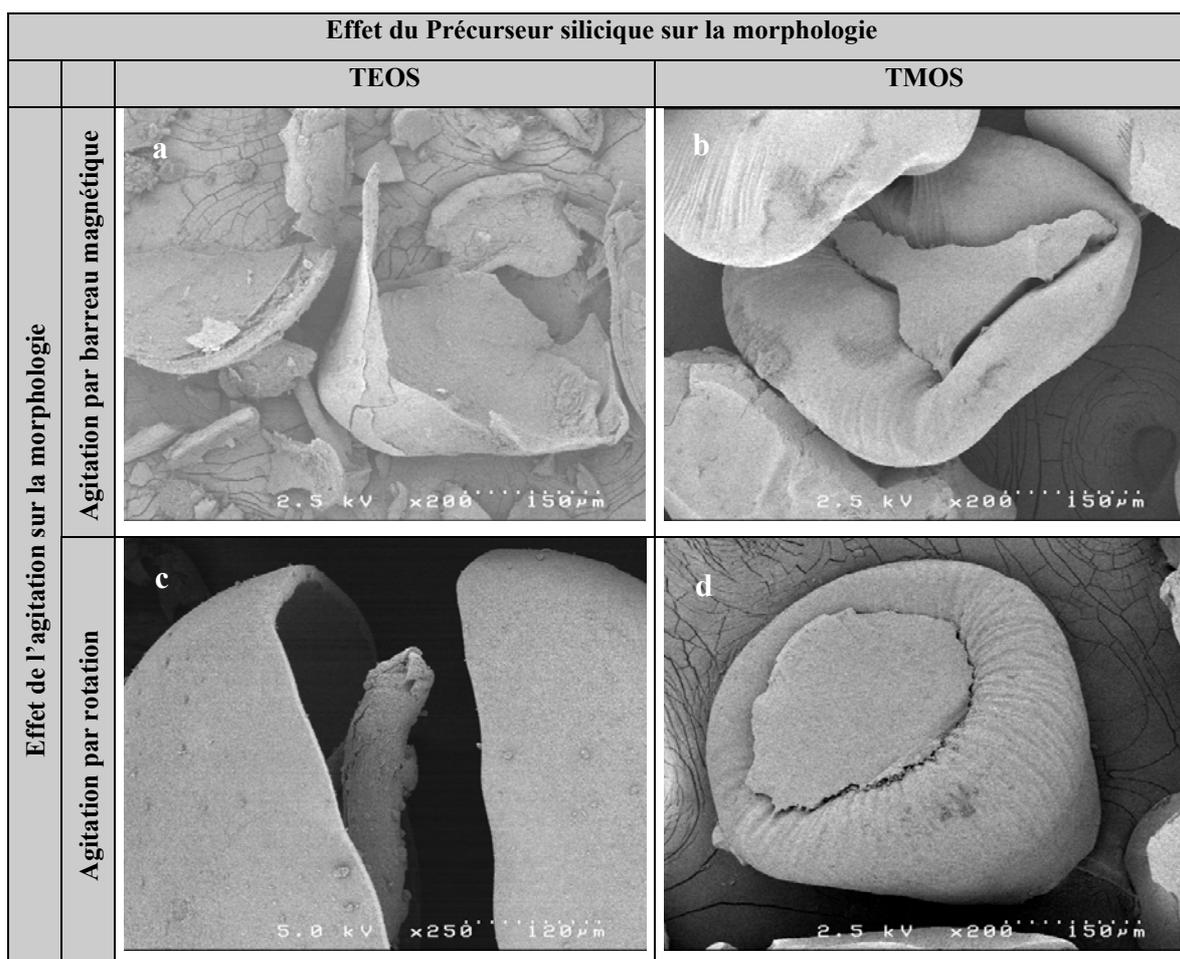


Tableau 6 : Illustration des différences morphologiques de microsphères hybrides calcinées à 550°C, élaborées par deux types d'agitation à partir de billes de k-carraghénane recouvertes de PLL et de deux précurseurs siliciques.

A partir du cliché **a**, nous constatons que la particule se réduit à une coquille silicique effritée creuse. Alors que le cliché **a** du tableau 5 montrait une particule pleine habillée d'une coquille friable. Le cœur de celle-ci semblait être de nature hybride avec des nanoparticules de silice. Ce cœur disparaît après calcination. Il semblerait que le k-carraghénane jouerait le rôle de ciment en solidarissant les nanoparticules de silice en un bloc formant le cœur de la microparticule. Une fois le k-carraghénane éliminé, le bloc se déstructure et se disperse.

Dans le cas des autres hybrides, la calcination aboutit à des microparticules, dont la morphologie reste inchangée par rapport à leur morphologie avant calcination.

Nous avons rassemblé dans le tableau 7 suivant les principales caractéristiques morphologiques de chaque type d'hybride avant et après calcination.

Types d'agitation	Types d'hybride	Morphologie avant calcination	Morphologie après calcination
<b>Agitation par un barreau magnétique</b>	TEOS	Non sphérique, pleine, Taille > 300µm	Morphologie conservée
	PLL/TEOS	Non sphérique, pleine, taille>300µm, coquille friable.	Perte de la morphologie
	TMOS	Non sphérique, pleine, taille>300 µm, structure effondrée	Morphologie conservée
	PLL/TMOS	Non sphérique, pleine, taille>300 µm, structure effondrée	Morphologie conservée
<b>Agitation par rotation</b>	TEOS	Sphérique, pleine, taille <300 µm	Morphologie conservée
	PLL/TEOS	Sphérique, <b>creuse</b> , Taille > 300µm, coquille rigide	Morphologie conservée
	TMOS	Non sphérique, pleine, taille>300 µm, structure effondrée	Morphologie conservée
	PLL/TMOS	Non sphérique, pleine, taille>300 µm, structure effondrée	Morphologie conservée

**Tableau 7 : Récapitulatif des principales caractéristiques morphologiques des particules hybrides avant et après calcination en fonction du type d'agitation.**

D'un point de vue morphologique, les particules correspondant à notre objectif sont les particules hybrides élaborées à partir de microsphères de k-carraghénane et de TEOS avec le milieu réactionnel agité par rotation, à savoir, des particules micrométriques, sphériques, homogènes et résistantes à de faibles contraintes mécaniques.

De plus, nous avons constaté indépendamment du type d'agitation, la formation d'une coquille rigide en périphérie des microparticules hybrides issues des synthèses utilisant des microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL. Cette constatation n'est valable que pour les synthèses dont le milieu réactionnel contient du TEOS.

Cependant, d'autres analyses physico-chimiques doivent être menées pour conforter ou non ce choix, notamment des analyses thermogravimétriques.

### 2.3.1.2 Analyses thermogravimétriques

Les analyses thermogravimétriques des différents matériaux présentent un profil similaire qui leur est caractéristique. A titre d'exemple, la figure 59 suivante est le thermogramme typique obtenu à la suite d'une analyse thermogravimétrique effectuée sur 50 mg de microsphères hybrides élaborées à partir de microsphères de  $\kappa$ -carraghénane et de TEOS avec une agitation par rotation. Le thermogramme donne accès à la quantité de matière organique présente au sein de l'hybride.

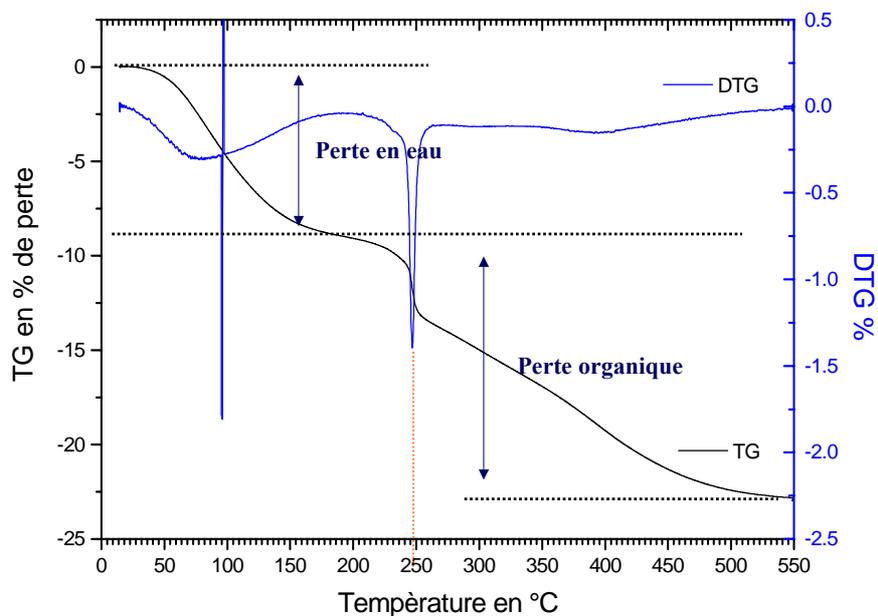


Figure 59 : Thermogramme du matériau hybride élaboré à partir de billes de k-carraghénane et de TEOS.

Il présente un profil avec deux pertes massiques consécutives. La première constitue la perte en eau à environ 100°C. En effet, les hybrides contiennent encore de l'eau malgré le séchage. Les matériaux, une fois séchés, présentent une forte hygroscopie de par leur nature polysaccharidique et réadsorbent de l'eau au contact de l'air ambiant. La deuxième perte massique est attribuée à l'oxydation du k-carraghénane, les produits de cette oxydation sont des composés volatiles évacués à partir de 250°C. Le tableau suivant rassemble les taux de substance organique (k-carraghénane) présent au sein de chaque type d'hybride en fonction du type d'agitation.

Types d'agitation	Types d'hybride	% organique
<b>Agitation par un barreau magnétique</b>	TEOS	27
	PLL/TEOS	23
	TMOS	7
	PLL/TMOS	9
<b>Agitation par rotation</b>	TEOS	17
	PLL/TEOS	15
	TMOS	7
	PLL/TMOS	9

**Tableau 8 : Récapitulation du taux de matière organique dans les matériaux hybrides en fonction du type d'agitation.**

La formation de ces matériaux hybrides s'avère difficile à maîtriser de par l'élément structurant (polymère d'origine naturelle) et par les phénomènes complexes concourant à la condensation de la silice autour du polymère. Cette formation de matériau inorganique-organique pourrait être gouvernée par des phénomènes différents se déroulant avec des cinétiques qui leur sont propres, ces mêmes cinétiques pouvant varier selon les conditions de synthèse. Trois cinétiques se déroulent dans le milieu réactionnel :

- l'hydrolyse du précurseur silicique au départ immiscible dans l'eau et conduisant à des dérivés plus hydrophiles. Cette cinétique est connue pour être différente dans le cas du TEOS comparé au TMOS [87]. En effet, celle-ci est beaucoup plus rapide dans le cas du TMOS,
- la polycondensation silicique résultante des espèce présentes,

- la capacité de diffusion de ces espèces au sein de l'hydrogel de carraghénane formant la microsphère.

Dans le cadre de ce travail, seuls les paramètres tels que la nature du précurseur, et le procédé d'agitation ont été testés sans pour autant permettre de maîtriser ces aspects cinétiques. Cependant les résultats obtenus permettent de mettre en évidence leur incidence.

➤ Les matériaux synthétisés à partir de TEOS, présentent un taux de matière organique (k-carraghénane) plus fort que ceux élaborés à partir de TMOS et ceci quelque soit le procédé d'agitation. Ceci peut s'expliquer par la différence de cinétique d'hydrolyse de chacun des deux précurseurs. Plus la cinétique d'hydrolyse est lente plus le taux de silice au sein du matériau hybride est faible.

➤ Quelque soit le type d'agitation et le précurseur utilisés, la présence de la PLL n'influence pas significativement le taux de matière organique contenue dans les particules.

➤ Le procédé d'agitation a une influence sur le taux matière organique contenue dans les hybrides élaborés à partir de TEOS. Ceci pourrait être la conséquence directe de la dépendance du procédé sol-gel à la diffusion des produits issue de l'hydrolyse du TEOS au sein de l'hydrogel. En effet, la vitesse de diffusion est fonction du nombre de molécules qui doivent diffuser mais aussi du transport. Ce dernier est d'autant plus grand que l'agitation du milieu réactionnel est bonne. Dans notre cas la vitesse d'hydrolyse est maximisée par l'ajout d'un catalyseur (NaF) [87,88]. Donc le facteur limitant de la synthèse semble être la diffusion des molécules issues de l'hydrolyse du TEOS. Or l'agitation par rotation est plus efficace que l'agitation par un barreau magnétique. Par conséquent une meilleure agitation induit une plus grande diffusion et ainsi un plus grand taux de silice au sein de l'hydrogel.

➤ Dans le cas du TMOS le procédé d'agitation n'a pas d'influence sur le taux matière organique contenue dans les hybrides. Il semblerait que la diffusion ne soit pas dépendante du transport des molécules, sachant de plus que la cinétique d'hydrolyse est très rapide.

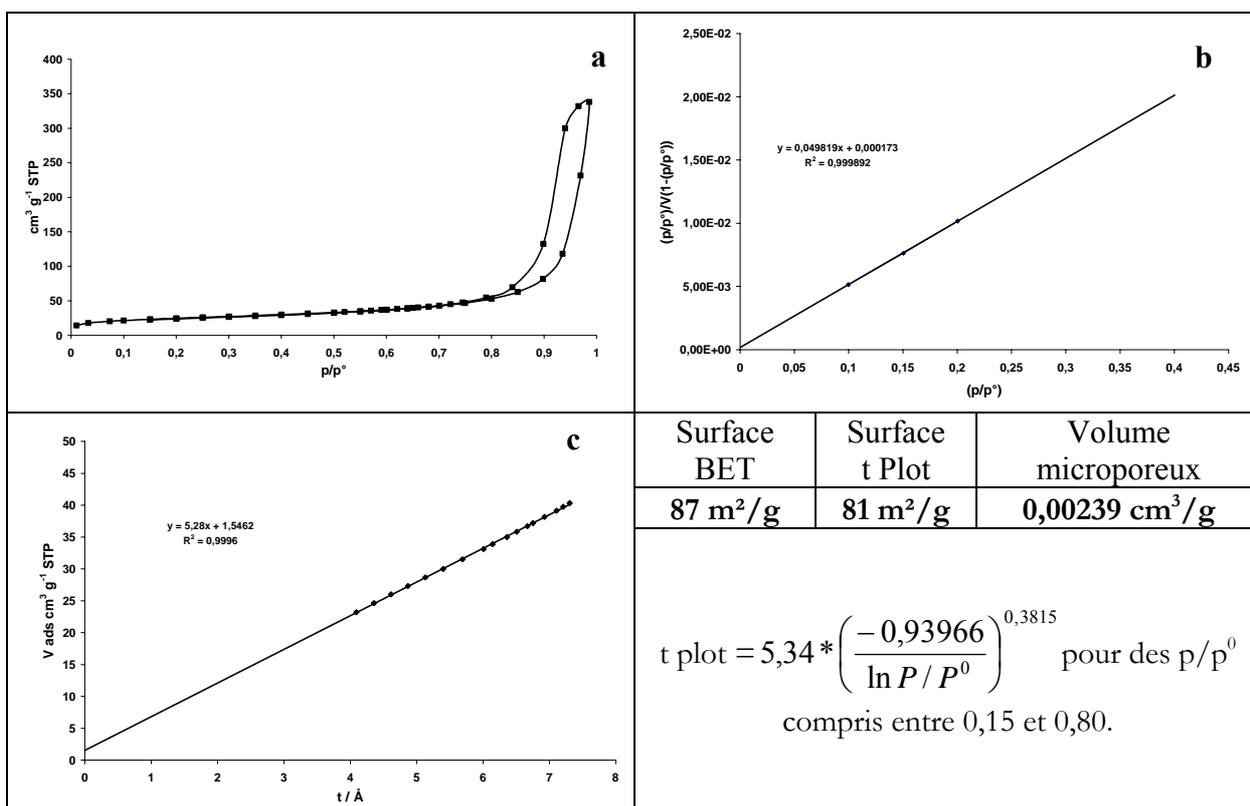
Pour résumer il semblerait que la synthèse utilisant du TEOS soit influencée par le type d'agitation et mènerait à des hybrides plus ou moins organique. Tandis que l'agitation n'a

pas d'influence sur le taux de matière organique présente dans les hybrides élaborés à partir de TMOS.

Nous venons de voir l'influence du type de précurseur et du procédé d'agitation sur la morphologie et le taux de matière organique présente au sein de l'hybride. Une étude comparative des différentes textures obtenues avec chaque précurseur et agité par chaque procédé pourrait nous informer sur l'influence de ceux-ci. C'est pourquoi nous avons procédé à des analyses volumétriques par adsorption/désorption d'azote à 77 K.

### 2.3.1.3 Analyses volumétriques

A titre d'exemple nous avons réuni dans le tableau suivant les courbes et les résultats de calculs de surface spécifique du matériau hybride élaboré à partir de microsphères de k-carraghénane en présence de TEOS avec une agitation par rotation.



**Tableau 9 :** a) Isotherme d'adsorption/désorption d'azote à 77 K de microsphères hybrides préparées à partir de TEOS et de microsphères de k-carraghénane ; b) Courbe BET ; c) Courbe t-plot calculée par FHH modifiée.

L'image a illustre une isotherme d'adsorption/désorption d'azote à 77 K de microsphères hybrides préparées à partir de TEOS. Cette isotherme est de type IV. La forme de

tel-00011426, version 1 - 19 Jan 2006

l'hystérésis rend compte d'une porosité grande et régulière (annexe B). De plus la forme de l'hystérésis nous montre que les cavités poreuses sont relativement uniformes. Cependant la position de l'hystérésis dans les gammes de pressions élevées et la fin de l'adsorption ne nous permettent pas de distinguer la grande mésoporosité de la porosité interparticulaire.

Le graphique inscrit dans la case **b** du tableau représente la droite tracée à partir du modèle BET. L'ordonnée à l'origine et la pente de la droite régression nous donne directement accès au volume de la monocouche. Ainsi nous pouvons déduire la surface spécifique. Pour un calcul précis de la surface spécifique, il a été utilisé pour chaque isotherme l'intervalle de pression donnant le meilleur coefficient de régression linéaire.

La case **c** du tableau représente la courbe *t*. Cette courbe consiste à porter le volume de gaz en fonction de l'épaisseur moyenne de la multicouche d'azote (notée *t*). le tracé de cette courbe nécessite une courbe de référence pour effectuer la transformation de la pression relative en épaisseur d'azote. Nous avons choisi une courbe de référence théorique basée sur le modèle de Frankel, Halsey et Hill modifié, dont l'expression est inscrite dans le tableau précédent. L'avantage du tracé de la courbe *t* est qu'elle permet de calculer la surface totale et de mettre en évidence la présence de microporosité.

Les données issues des analyses de volumétrie sont reportées dans le tableau ci-dessous

Types d'agitation	Types d'hybride	Surface BET m <sup>2</sup> /g	Surface t-plot m <sup>2</sup> /g	Volume microporeux cm <sup>3</sup> /g	Surface BET Après calcination	Volume microporeux Après calcination
Agitation par un barreau magnétique	TEOS	227	241	0,000185	40	0,00099
	PLL/TEOS	152	131	0,000429	53	0,00485
	TMOS	752	569	0,1631	521	0,0307
	PLL/TMOS	857	594	0,09885	500	0,0741
Agitation par rotation	TEOS	87	81	0,00239	74	0,000163
	PLL/TEOS	155	146	0,007431	97	0,00266
	TMOS	634	602	0,1354	425	faible
	PLL/TMOS	417	308	0,21360	268	faible

**Tableau 10** Récapitulation des surfaces spécifiques calculées par la théorie BET et par le t-plot de chaque type d'hybride

Le type d'agitation a une influence sur la surface spécifique des matériaux issues des synthèses contenant des microsphères de k-carraghénane et du TEOS. En effet, une forte diminution de la surface spécifique est observée, la surface varie de 230 à 90 m<sup>2</sup>/g. Ceci peut être corrélé à la quantité de matière organique présente au sein des particules (Tableau 8). En effet le ratio de matière organique diminue dans le même sens que la valeur de la surface spécifique. La surface calculée par le t plot n'est pas trop différente de la surface BET donc il n'y a pas de microporosité. En revanche, les particules hybrides issues de microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL obtenues en présence de TEOS, ne présentent pas de valeurs de surfaces spécifiques notablement différentes en fonction du type d'agitation, alors que nous avons observé une forte variation du ratio de matière organique lors des analyses thermogravimétriques (Tableau 8). De plus, dans ces deux cas, la calcination aboutit à des particules de silice qui ont des valeurs de surfaces spécifiques faibles, voisines les unes des autres, et ce quelque soit le type d'agitation. Cette constatation, nous conduit à penser que la surface spécifique des matériaux hybrides non calcinés est en grosse partie due à la matière organique.

Les matériaux hybrides issue de microsphères de k-carraghénane et de TMOS ont une surface spécifique très élevée. Cependant la courbe t-plot met en évidence la présence de microporosité, ce qui rend le calcul de la surface spécifique par la théorie BET non valide (parties hachurées du tableau 10). Par contre le calcul de la surface par le t-plot prend en compte la surface due aux micropores, c'est pourquoi nous nous sommes basé sur ces calculs pour estimer la surface spécifique. Le type d'agitation n'a pas de répercussion sur la surface spécifique, ceci est peut être relié au fait que les microparticules hybrides présentent un taux de matière organique similaire quelque soit le type d'agitation (voir Tableau 8). La calcination aboutit à des particules hybrides dont la porosité est faiblement microporeuse avec des surfaces spécifiques très élevées.

Globalement nous pouvons conclure que le TMOS engendre des particules hybrides microporeuses et ce quelque soit le type d'agitation, alors que le TEOS engendre des particules hybrides mésoporeuses.

#### **2.3.1.4 Conclusion**

➤ La microscopie électronique à balayage nous a permis d'étudier la morphologie des microparticules hybrides. En étudiant les clichés nous avons conclu que le précurseur silicique a une très grande influence sur la morphologie de celles-ci. De plus, nous avons

établi une influence du procédé d'agitation sur la morphologie des hybrides préparés avec le TEOS. En résumé, nous pensons que la synthèse utilisant du TMOS est intéressante car indépendante du type d'agitation, mais la morphologie des particules hybrides ne correspond pas à nos critères de choix. De plus on observe la présence d'amas de silice indésirables. La synthèse utilisant du TEOS est fortement dépendante de l'agitation, mais nous avons vu que l'agitation par rotation nous permet d'obtenir des microsphères correspondantes à nos critères de choix. En présence de PLL les matériaux présentent une coquille rigide en périphérie des particules, ceci indépendamment du type d'agitation.

➤ L'analyse thermogravimétrique nous a permis de connaître l'influence du précurseur silicique et du type d'agitation sur le taux de matière organique au sein des particules hybrides. La synthèse utilisant du TEOS aboutit à des matériaux hybrides plus chargés en polymère que celle utilisant du TMOS. Nous avons aussi constaté que l'agitation a une forte influence sur la synthèse utilisant du TEOS. En effet, le taux de matière organique diminue quand le milieu réactionnel est agité par rotation.

➤ L'analyse volumétrique a mis en évidence une forte microporosité des particules hybrides issues de la synthèse par du TMOS, quelque soit le type d'agitation. Dans le cas des particules hybrides obtenues à partir de TEOS l'agitation influence la surface spécifique, mais seulement sur les particules hybrides élaborées à partir de microsphères de k-carraghénane nues.

Notre objectif étant d'élaborer des microparticules hybrides sphériques avec une texture mésoporeuse, nous avons choisi d'optimiser les synthèses qui mettent en jeu le TEOS et la procédure d'agitation par rotation.

### 3 Etude de l'influence des divers paramètres liés à la condensation de la silice sur la synthèse de microsphères hybrides.

Précédemment, nous avons fait l'étude des caractéristiques morphologiques et texturales de différents types de microparticules hybrides. Cette étude nous a permis de choisir, le TEOS comme précurseur silicique et le procédé d'agitation par rotation. De plus nous avons étudié l'hybridation de microsphères de k-carraghénane nues et de k-carraghénane recouvertes de poly-L-lysine. Rappelons que dans le cas des microsphères de k-carraghénane vierges nous obtenons des microparticules sphériques et pleines, mais que la synthèse d'hybrides à partir de microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL conduit à des particules sphériques creuses de type cœur-couronne. Le schéma suivant résume ces deux voies de synthèses.

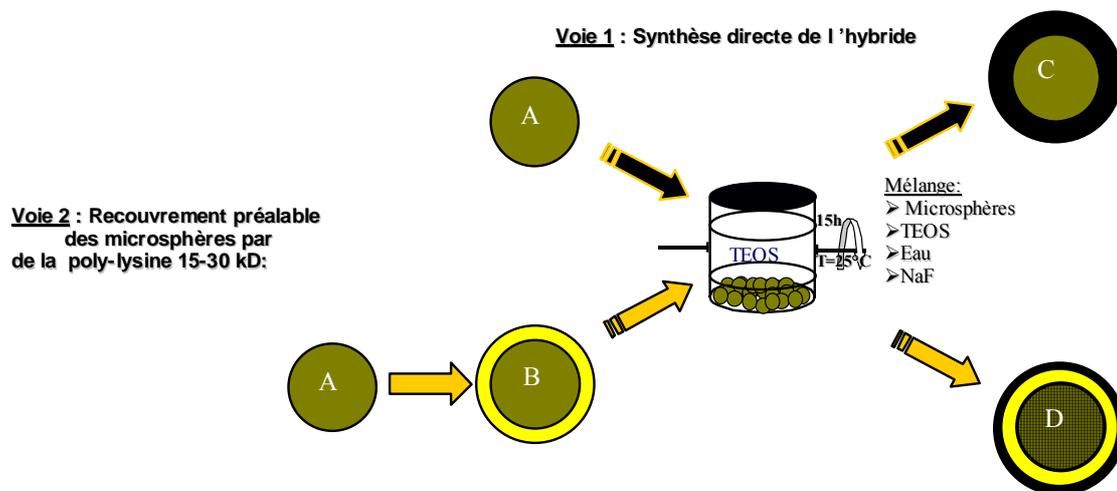


Figure 60 : Illustration schématique des deux voies de synthèses d'hybrides.

#### 3.1 Objectifs

Nous savons que la synthèse en milieu sol-gel est influencée par plusieurs facteurs parmi lesquels le mélange eau/TEOS qui est déterminant pour la cinétique et la taille des particules obtenues par condensation [87-90]. De plus, la réaction peut être catalysée de plusieurs manières et nous avons choisi, au début de cette étude, l'ion fluorure sous forme

sodique (NaF) et potassique (KF). Nous savons que les ions  $F^-$  agissent sur la cinétique d'hydrolyse du TEOS par un mécanisme de type SN2 [87]. Dans de la suite de notre travail, nous nous attacherons à optimiser les deux voies de synthèses et de déterminer l'influence du catalyseur de condensation sur les principales caractéristiques morphologiques de chaque type de matériaux hybrides ainsi conçus. Pour cela, des analyses thermogravimétriques nous permettront de connaître le taux de matière au sein des matériaux hybrides. L'analyse EDX nous renseignera sur la distribution massique spatiale de la silice sera comparée sur chaque type d'échantillon. Enfin la morphologie de chaque type de particule sera déterminée par des analyses couplées d'adsorption/desorption d'azote à 77K et microscopie électronique à balayage.

### 3.2 Hybrides carraghénanes/silice

#### 3.2.1 Influence du catalyseur d'hydrolyse-condensation NaF *versus* KF sur la composition des hybrides

La voie de synthèse n°1 (Figure 60) consiste à introduire des microsphères d'hydrogel de k-carraghénane dans un milieu réactionnel contenant du TEOS, de l'eau et un catalyseur d'hydrolyse-condensation. Afin d'étudier certains facteurs influençant la synthèse, nous avons fait varier la composition du milieu réactionnel. Les tableaux 11 et 12 suivants récapitulent les proportions de chaque constituant.

N° de lots	Masse de TEOS milieu réactionnel	Rapport TEOS/H <sub>2</sub> O en masse	Masse de billes de $\kappa$ -carraghénane	Catalyseur NaF
1	3,96 g	0,46	1,9891 g	50 mg
2	5,12 g	0,77	2,0234 g	50 mg
3	5,55 g	1	2,0132 g	50 mg
4	7,7 g	1,7	1,9907 g	50 mg

Tableau 11 : proportions de réactifs présents dans le milieu. (Catalyseur NaF)

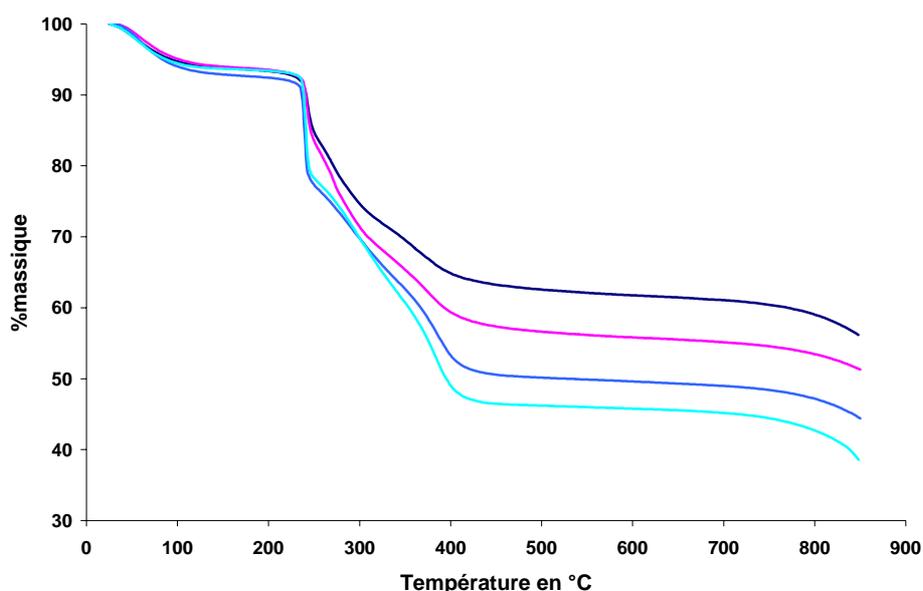
N° de lots	Masse de TEOS	Rapport TEOS/H <sub>2</sub> O en masse	Masse de billes de $\kappa$ -carraghénane	Catalyseur KF
1'	4 g	0,46	1,9892 g	50 mg
2'	5,1 g	0,77	2,0143 g	50 mg
3'	5,6 g	1	2,0144 g	50 mg
4'	7,6 g	1,7	1,9969 g	50 mg

Tableau 12 : Proportions de réactifs présents dans le milieu. (Catalyseur KF)

Sachant que la synthèse sol-gel catalysée par des ions fluorures atteint son équilibre à partir de 12 heures de réaction [87], nous avons stoppé la synthèse après 15 heures d'agitation.

Il faut noter que lors de la réaction, tout le TEOS ne réagit pas avec les microsphères de  $\kappa$ -carraghénane : une partie du TEOS condense dans le milieu réactionnel pour former des agrégats nanométriques de silice amorphe tandis que le reste est en excès. Donc nous éliminons par des lavages toutes les sources indésirables de silice avant de sécher et procéder aux analyses thermogravimétriques. Ainsi nous sommes assuré que la quantité de silice déterminée par l'analyse thermogravimétrique est bien celle qui est solidaire du  $\kappa$ -carraghénane.

Le graphique de la figure 61 ci-dessous montre les quatre thermogrammes obtenus dans les mêmes conditions d'analyse pour les lots 1 à 4. Ils sont représentatifs de tous les thermogrammes .



**Figure 61 : Effet du rapport TEOS/eau sur la composition des matériaux hybrides.**

On observe une première perte massique aux alentours de 100°C est suivie d'une forte perte en masse débutant à environ 250 °C. La première chute correspond à une perte d'eau qui semble constante quelque soit la composition du milieu réactionnel. La deuxième est une perte de matière organique qui évolue en fonction de la composition du milieu réactionnel.

Afin d'exploiter au mieux les données issues de ces thermogrammes, il convient de préciser un certain nombre d'éléments

- Rappelons que les billes de gel contiennent chacune 2,5% en poids de k-carraghénane. Par conséquent l'hydrogel contient 97,5 % d'eau. Ce qui veut dire que la masse d'eau rajoutée dans le milieu réactionnel doit être corrigée de la quantité contenue dans la masse de bille introduite dans le milieu réactionnel. Par exemple, pour une masse de bille de 2g, nous avons 1,95g d'eau. Cette eau doit être comptabilisée dans le calcul du rapport TEOS/H<sub>2</sub>O.
- Le rapport TEOS/k-carra correspond, à la quantité (moles) de TEOS ajoutée au milieu réactionnel sur le nombre de moles de monomères constituant les chaînes polymériques de k-carraghénane. La masse moléculaire d'un monomère de k-carraghénane est de 360 g/mole.
- Le rapport SiO<sub>2</sub>/k-carra, est le nombre de mole de SiO<sub>2</sub> sur le nombre de mole de k-carraghénane constituant l'hybride. Nous avons considéré que la perte de masse située au-delà de 200°C (TG>200°C) correspond à la quantité de matière organique. Cependant nous avons retiré à cette masse la contribution du sel de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le κ-carraghénane contient une entité SO<sub>3</sub><sup>-</sup> par monomère et la gélification est sensée équilibrer les charges avec le K<sup>+</sup>. Donc à l'issue de la calcination il devrait rester ½ de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ainsi pour calculer le rapport SiO<sub>2</sub>/κ-carra nous avons réduit la masse moléculaire du κ-carraghénane de 360 g/mole à 273 g/mole.

Les tableau 13 et 14 suivants récapitulent ces résultats.

N° de lots	Rapport TEOS/H <sub>2</sub> O en masse corrigé	Rapport TEOS/κ-carra en mole	Perte en masse <200 °C	Perte en masse >200 °C	% massique résiduel	Rapport SiO <sub>2</sub> /κ-carra en mole
1	0,375	137,07	0,0977	0,234	0,6683	11,54
2	0,595	177,23	0,0917	0,1714	0,7369	18,11
3	0,74	192,11	0,0734	0,122	0,8046	28,55
4	1,18	266,53	0,0821	0,113	0,8049	30,96

**Tableau 13 : Résultats d'analyses thermogravimétriques en fonction des conditions expérimentales catalysé par NaF.**

N° de lots	Rapport TEOS/H <sub>2</sub> O en masse corrigé	Rapport TEOS/ $\kappa$ -carra en mole	Perte en masse <200 °C	Perte en masse >200 °C	% massique résiduel	Rapport SiO <sub>2</sub> / $\kappa$ -carra en mole
1'	0,37	138,46	0,0808	0,3907	0,5285	4,70
2'	0,59	176,53	0,0712	0,3704	0,5584	5,40
3'	0,74	193,84	0,0805	0,3649	0,5546	5,46
4'	1,18	263,07	0,1015	0,2344	0,6641	11,44

Tableau 14 : Résultats d'analyses thermogravimétriques en fonction des conditions expérimentales catalysés par KF.

La perte en masse avant 200°C reflète l'hygroscopicité des différents matériaux hybrides (figure 62). Ce graphique montre que malgré le séchage en milieu CO<sub>2</sub> super-critique, nous retrouvons 7 à 10% d'eau dans chacun des hybrides. Mais la nature chimique du catalyseur n'a pas d'influence sur les propriétés hygroscopiques des microsphères.

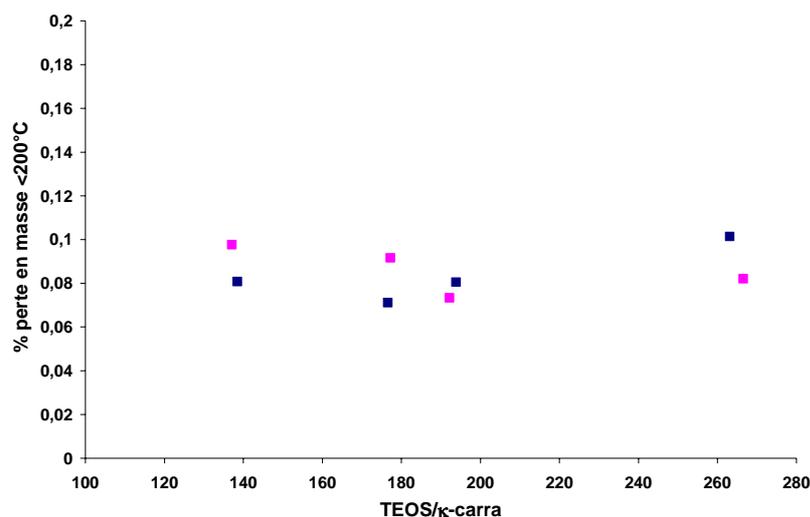


Figure 62 : Pourcentage massique d'eau contenue dans les hybrides en fonction du rapport TEOS/ $\kappa$ -carra introduit dans le milieu réactionnel (catalyseurs - ■ KF ■ NaF).

En revanche nous pouvons constater sur le graphique suivant (Figure 63) où le rapport SiO<sub>2</sub>/ $\kappa$ -carra (au sein des hybrides) est porté en fonction du rapport TEOS/ $\kappa$ -carra (milieu réactionnel) qu'il existe une grande différence entre les deux types de synthèse.

Dans le cas d'une catalyse par NaF la variation suit une courbe de tendance dont la pente (0,15) représente le rendement de la réaction. Dans le cas d'une catalyse par KF le taux de SiO<sub>2</sub> au sein des microsphères hybrides est quasiment trois fois inférieur.

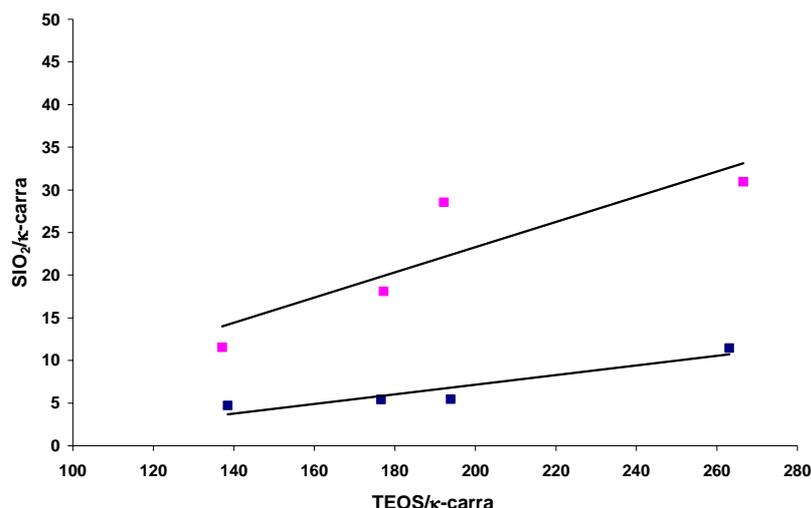


Figure 63 : Taux de silice au sein de l'hybride en fonction du rapport TEOS/k-carra introduit dans le milieu réactionnel (catalyseurs - ■ KF ■ NaF)

Ce résultat pourrait être expliqué par plusieurs phénomènes dus au rôle du cation:

- Les sels KF et NaF ont des constantes de solubilité dans l'eau différentes. Le  $K^+$  a un caractère polarisant moins fort que le  $Na^+$ . Ceci pourrait engendrer un changement du comportement catalytique de l'ion fluorure.
- A concentration identique en sel et en polymère, un gel préparé dans une solution de NaCl sera plus "mou" qu'un gel préparé dans une solution de KCl [52]. Dans notre travail, l'hydrogel est préparé avec du KCl, mais les conditions de synthèse peuvent favoriser des échanges de cations par effet osmotique. Dès lors, un échange d'un  $K^+$  par un  $Na^+$  se ferait au profit d'une perte de dureté du gel. La modification du gel engendrerait une plus grande labilité des espèces siliciques en son sein et ainsi augmenterait le taux de silice dans l'hybride.

Ces deux hypothèses sont pertinentes et les effets qu'elles impliquent peuvent être concomitants dans la baisse du taux de silice au sein de l'hybride. Afin de déterminer le rôle éventuel des deux cations lors du processus d'hybridation des microsphères, nous avons ajouté à un milieu réactionnel catalysé par NaF une solution de KCl.

### 3.2.2 Synthèse catalysée par NaF en milieu saturé en KCl

Le mélange réactionnel est constitué de TEOS, de microsphères de  $\kappa$ -carraghénane et du catalyseur NaF. Le milieu réactionnel contient la même quantité d'eau que pour les synthèses précédentes. La différence majeure réside dans le fait que nous avons remplacé l'eau pure par une solution aqueuse de KCl à 0,6M. Les proportions de chaque constituant sont récapitulés dans le tableau 15 ci-dessous.

N° de lots	Masse de TEOS	Rapport TEOS/H <sub>2</sub> O en masse	Masse de billes de $\kappa$ -carraghénane	Catalyseur NaF
A	7,7 g	0,77	2,0573 g	50 mg
B	5 g	0,5	1,9607 g	50 mg
C	3 g	0,3	2,1 g	50 mg
D	1 g	0,1	2,037 g	50 mg

Tableau 15 : Proportions de réactifs présents dans le milieu.

Comme dans les cas précédents les microsphères hybrides sont séchées en conditions super-critique. Ensuite nous avons procédé à des analyses thermogravimétriques dont les résultats sont rassemblés dans le tableau 16 ci-dessous. Les calculs de chaque rapport présenté sont identiques à ceux des tableaux 13 et 14.

N° de lots	Rapport TEOS/H <sub>2</sub> O en masse corrigé	Rapport TEOS/ $\kappa$ -carra en mole	Perte en masse <200 °C	Perte en masse >200 °C	% massique résiduel	Rapport SiO <sub>2</sub> / $\kappa$ -carra en mole
A	0,64	266,53	0,0637	0,2516	0,6847	10,93
B	0,41	173,07	0,0633	0,3761	0,5606	5,33
C	0,25	103,84	0,0621	0,4246	0,5133	4,05
D	0,08	34,61	0,0732	0,4825	0,4443	2,73

Tableau 16 : Résultats d'analyses thermogravimétriques en fonction des proportions de chaque réactif présent dans le milieu réactionnel catalysé par NaF en milieu KCl.

Les thermogrammes de chaque hybride issu de toutes les synthèses présentent un profil identique à ceux des matériaux élaborés dans un milieu réactionnel ne contenant pas de KCl et catalysé par NaF.

A partir des analyses thermogravimétriques nous avons établi le graphique ci-dessous (figure 64) où le pourcentage de perte massique observé avant 200°C est tracé en fonction du rapport TEOS/ $\kappa$ -carra incorporé dans le milieu réactionnel.

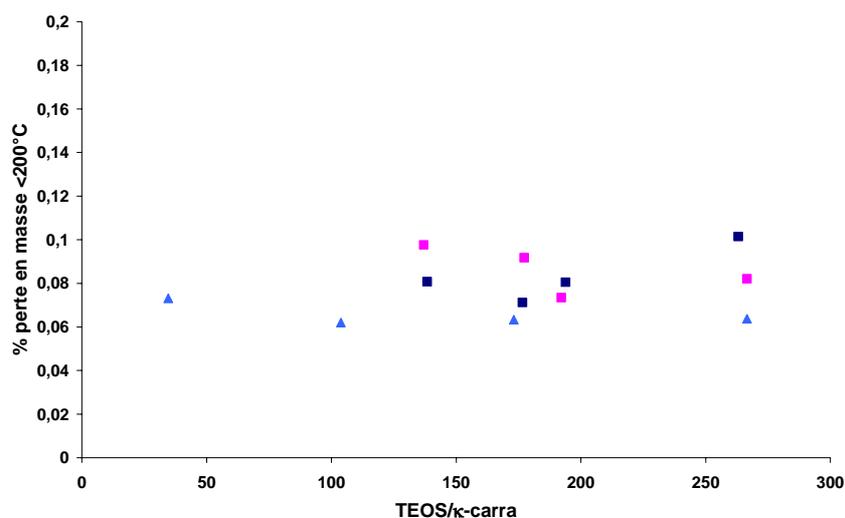


Figure 64 : Pourcentage massique d'eau contenue dans les hybrides en fonction du rapport TEOS/k-carra introduit dans le milieu réactionnel. (catalyseurs - ■ KF, ▲ NaF en milieu KCl et ■ NaF seul).

Les différentes synthèses aboutissent chacune à des hybrides dont l'hygroscopicité est similaire. Les pourcentages d'eau sont compris dans un intervalle de 7% à 10%. L'ajout de KCl dans le milieu réactionnel n'a pas d'influence sur le caractère hygroscopique des hybrides.

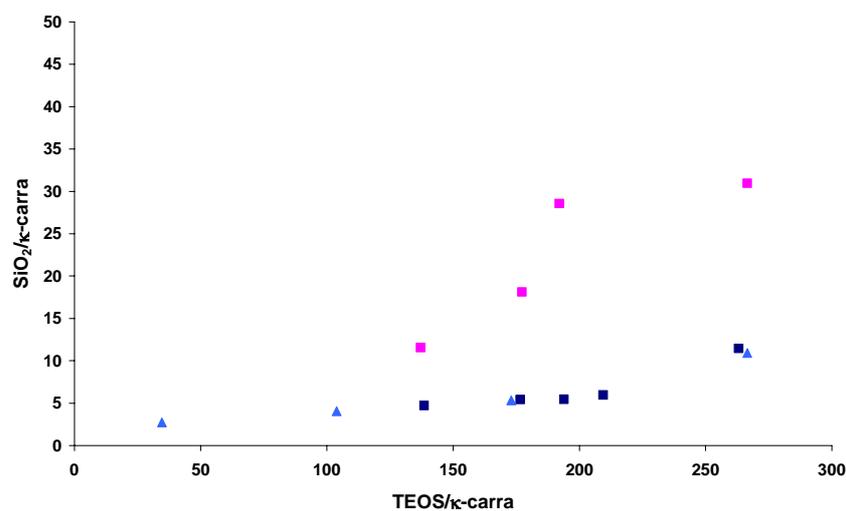


Figure 65 : Taux de silice au sein de l'hybride en fonction du rapport TEOS/k-carra introduit dans le milieu réactionnel (catalyseurs - ■ KF, ▲ NaF en milieu KCl et ■ NaF seul).

La teneur en matière organique des hybrides élaborés dans le milieu réactionnel contenant du KCl est parfaitement similaire à celle de la synthèse catalysé par KF (Figure 65). Ceci est en parfaite adéquation avec l'hypothèse que c'est le cation  $K^+$  qui est le facteur responsable de la variation du taux de matière organique au sein de l'hybride. Cependant, il faut noter que l'ajout de KCl dans le milieu, fixe la force ionique à 0,6M. Or nous savons que la force ionique a une influence sur la cinétique d'hydrolyse du TEOS [87], il s'opère donc une compétition entre l'influence du catalyseur, celle de la force ionique et celle du  $K^+$ .

Les analyses thermogravimétriques ne permettent d'obtenir qu'une composition globale organique/inorganique. Afin d'étudier la distribution topographique de la silice dans chacun des types d'hybrides, nous avons utilisé la microanalyse électronique par rayons X (cf. p 64). Les microsphères hybrides ont été sectionnées en leur milieu et fixées à l'aide de colle conductrice sur des plots métalliques. Rappelons que la microanalyse électronique par rayons X consiste à envoyer un faisceau ponctuel d'électrons sur la surface de la section d'une microparticule, celui-ci génère des rayons X de fluorescence. Ceux-ci sont caractéristiques de l'élément bombardé. Ainsi il est possible d'établir la carte de distribution séparée de chaque élément. Dans cette étude nous avons choisi le soufre comme élément caractéristique de la composante organique, et le silicium comme élément caractéristique de la composante inorganique des hybrides. En effet le carbone est un élément trop léger pour être analysé avec suffisamment de précision. Par contre le soufre permet une mesure plus précise et nous pouvons considérer que la quantité de soufre en mole est égale à la quantité de monomère de k-carraghénane en mole.

Les figures 66,67 et 68 rassemblent les résultats sous forme de graphique où le pourcentage molaire de silice est porté en fonction de la distance relative au centre de chaque type de microsphères hybrides et ce pour deux taux TEOS/carraghénane.

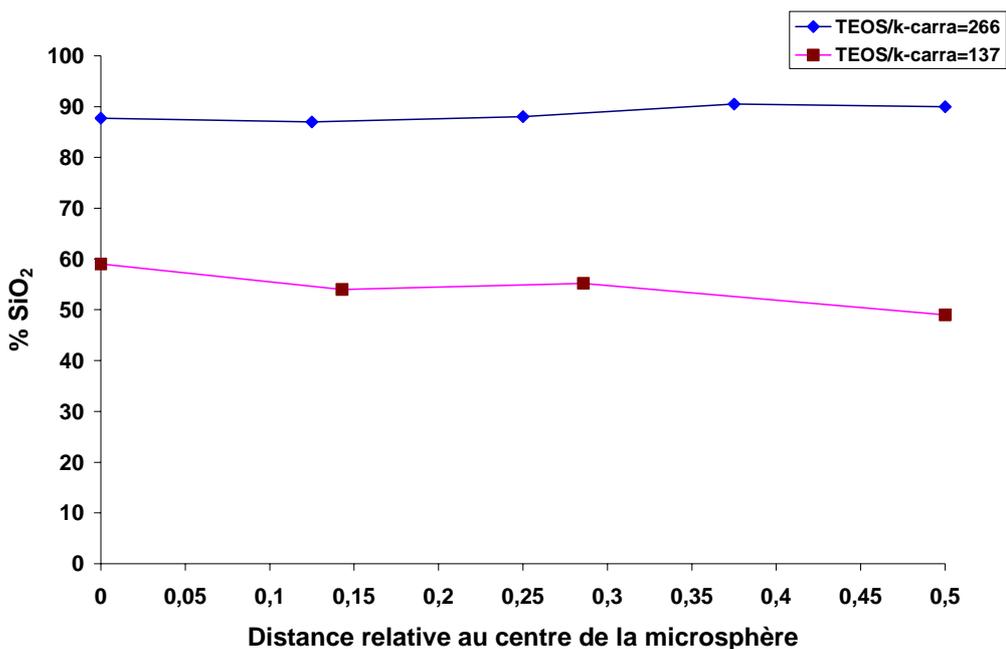


Figure 66 : Analyse par EDX du pourcentage molaire en Silice en fonction de la distance au cœur de la microsphère relative à la taille de celle-ci . (catalyseur NaF).

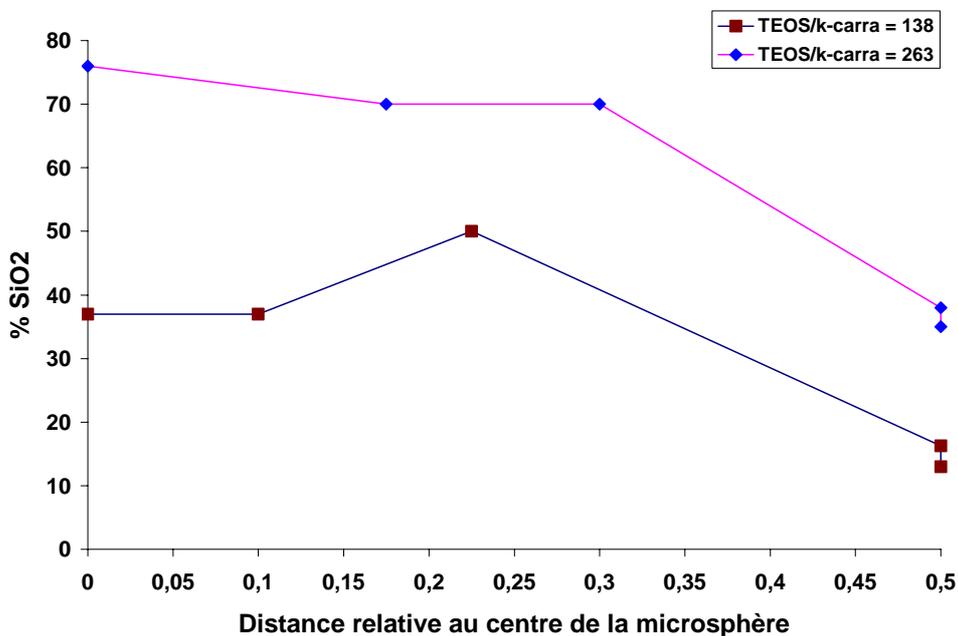


Figure 67 : Analyse par EDX du pourcentage molaire en Silice en fonction de la distance au cœur de la microsphère relative à la taille de celle-ci . (catalyseur KF).

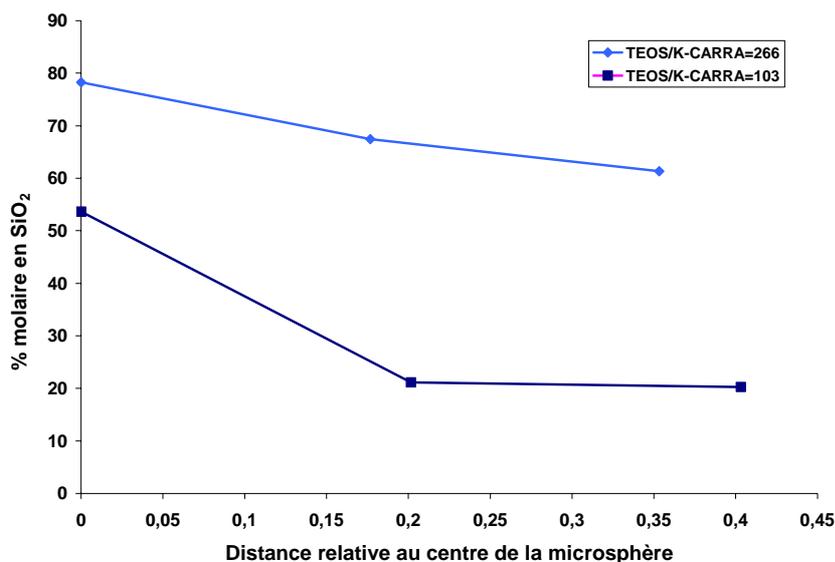


Figure 68 : : Analyse par EDX du pourcentage molaire en Silice en fonction de la distance au cœur de la microsphère relative à la taille de celle-ci . (catalyseur NaF en milieu KCl).

Nous pouvons constater que quelque soient les conditions réactionnelles, le taux de silice présent au sein de chaque microsphère hybride est croissant avec le rapport TEOS/k-carr.. Par contre la distribution de la composante inorganique est fortement influencée par la nature des cations présents dans le milieu de synthèse  $\text{K}^+$  ou  $\text{Na}^+$ .

Les microsphères élaborées par synthèse catalysée par NaF ont un taux de silice constant sur tout leur rayon (figure 66). Autrement dit la synthèse catalysée par NaF aboutit à des microsphères dont la répartition organique/inorganique est homogène et constante sur toute la microsphère, c'est à dire du cœur à la périphérie.

Il en est différemment pour les microsphères synthétisées par la réaction catalysée par KF (figure 67). Dans ce cas, le taux de silice diminue quand on s'éloigne du centre de la microsphère. Il semblerait que la répartition organique/inorganique n'est pas homogène et présente une diminution brutale lorsque la moitié du rayon de la microsphère est parcourue. A priori cette caractéristique peut être imputée à la présence du cation  $\text{K}^+$ . De plus, le fait que cette diminution soit brutale pourrait être expliqué par la faible quantité de KF (50 mg) présente dans le milieu. Alors seule la périphérie des microsphères serait en contact avec suffisamment de cations pour modifier sa dureté. Il ne pourrait se former qu'une couronne de gel plus dur d'épaisseur limitée. Cette dureté favoriserait les interactions et/ou limiterait la diffusion des espèces siliciques à travers cette barrière ? entre le k-carraghénane et les molécules siliciques.

Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus sur les hybrides synthétisés dans un milieu plus fortement concentré en KCl et catalysé par NaF (figure 68). Nous observons une décroissance progressive du taux de silice en fonction de la distance au cœur de la microsphère hybride. Dans ce cas, la concentration en  $K^+$  est grande, il y a suffisamment de cations pour permettre la diffusion jusqu'au cœur de la microsphère

### 3.2.3 Influence du catalyseur d'hydrolyse-condensation NaF *versus* KF sur la morphologie et la texture des hybrides

Nous analyserons tout d'abord comment le rapport  $SiO_2/k\text{-carr.}$  influence la morphologie des microsphères hybrides. A titre d'exemple nous avons rassemblé des clichés de microscopie électronique à balayage (Tableau 17) pris sur des microsphères hybrides préparées en présence de NaF.

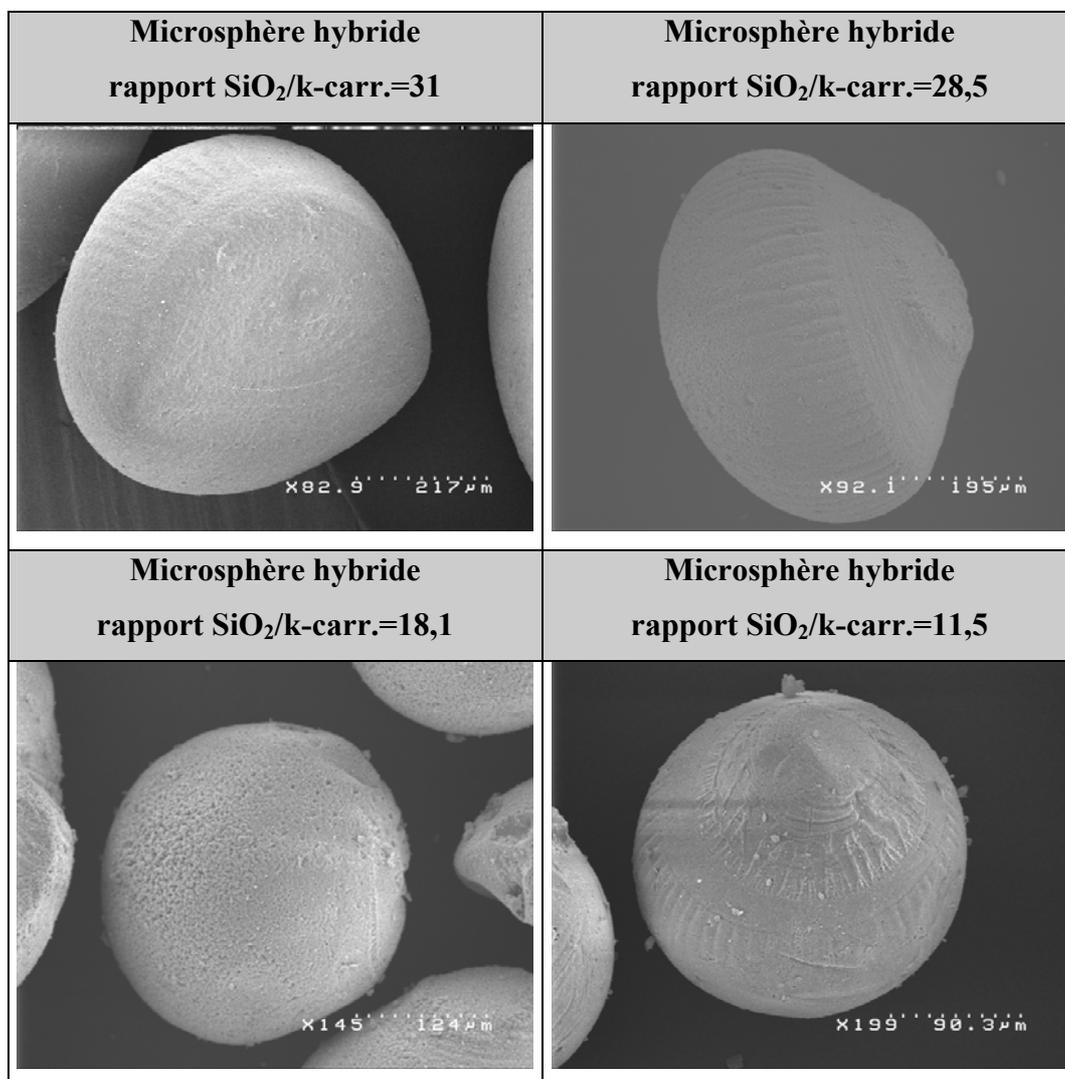


Tableau 17 : Clichés de microscopie électronique à balayage de microsphères issue de différents rapports TEOS/eau. (catalyseur NaF).

Toutes les particules présentent une morphologie relativement sphérique identique. Les stries présentes à la surface des particules correspondent à celles observées sur les microsphères organiques d'origine (cf. p 89, figure 49 a'). La taille moyenne de chaque microsphère est portée dans le tableau 18 suivant.

	Rapport SiO <sub>2</sub> /k-carra	Taille moyenne en µm
<b>Microsphères synthétisées en milieu catalysé par NaF</b>	11,54	200
	18,11	250
	28,55	430
	30,96	540
<b>Microsphères synthétisées en milieu catalysé par KF</b>	4,70	170
	5,40	180
	5,46	180
	11,44	220
<b>Microsphères synthétisées en milieu KCl catalysé par NaF</b>	10,93	200
	5,33	180
	4,05	180
	2,73	160

Tableau 18 : Taille moyenne des microsphères hybrides en fonction du rapport SiO<sub>2</sub>/k-carra

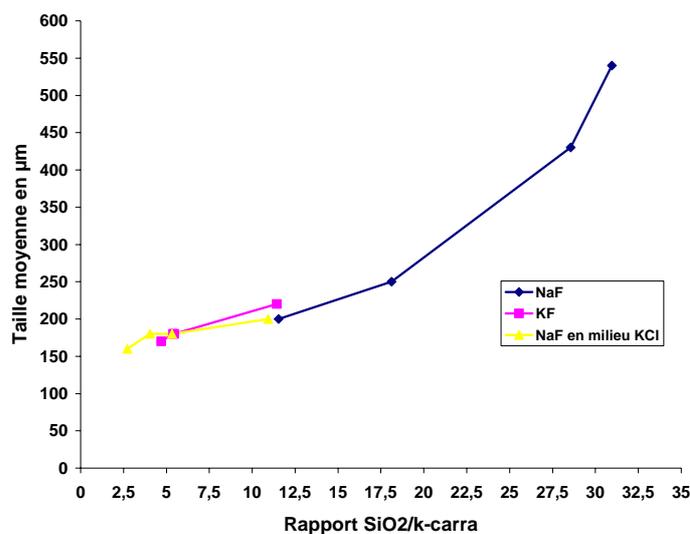
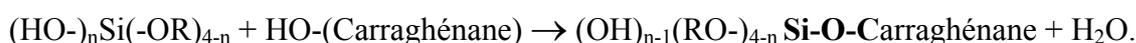


Figure 69 : Taille moyenne des microsphères en fonction du rapport SiO<sub>2</sub>/k-carra

A noter que la taille moyenne de tous les types de microsphères hybrides avant séchage est de l'ordre de celle des microsphères d'hydrogel de k-carraghénane avant séchage, soit environ 600  $\mu\text{m}$ .

Nous observons une relation entre la taille des microsphères hybrides et le rapport  $\text{SiO}_2/\text{k-carra}$ . Une augmentation du rapport  $\text{SiO}_2/\text{k-carra}$  induit une augmentation de la taille moyenne de la particule hybride. Ceci peut s'expliquer par le fait que la silice remplit le réseau polymérique et limite ainsi le repliement de celui-ci au séchage. Nous nous sommes basés sur les travaux de **Y.A. Shchipunov** [130] qui suggère que la formation de ce type de matériau hybride est due à des liaisons covalentes entre le k-carraghénane et la silice en établissant la réaction de condensation suivante :



On considère que le réseau silicique ne se rétracte pas au séchage. Du point de vue structurel les microsphères hybrides présentent toutes une mésoporosité et une isotherme de type IV. Nous avons rassemblé dans le tableau 19 ci-dessous les résultats des analyses volumétriques.

Lots	Surface spécifique BET	Rapport $\text{SiO}_2/\text{k-carr. en mole}$
<b>Microsphères synthétisées en milieu catalysé par NaF</b>	88 $\text{m}^2/\text{g}$	11,54
	100 $\text{m}^2/\text{g}$	18,11
	86 $\text{m}^2/\text{g}$	28,55
	97 $\text{m}^2/\text{g}$	30,95
<b>Microsphères synthétisées en milieu catalysé par KF</b>	146 $\text{m}^2/\text{g}$	4,70
	123 $\text{m}^2/\text{g}$	5,40
	149 $\text{m}^2/\text{g}$	5,46
	87 $\text{m}^2/\text{g}$	11,44
<b>Microsphères synthétisées en milieu KCl catalysé par NaF</b>	184 $\text{m}^2/\text{g}$	10,93
	170 $\text{m}^2/\text{g}$	5,33
	74 $\text{m}^2/\text{g}$	4,05
	223 $\text{m}^2/\text{g}$	2,73

Tableau 19 : Surface spécifique des microsphères hybrides en fonction du rapport  $\text{SiO}_2/\text{k-carr.}$

Il est difficile de trouver une relation directe entre le taux de silice présent au sein de chaque type de matériaux hybrides et la surface spécifique. Globalement la surface spécifique varie de 70 m<sup>2</sup>/g à 220 m<sup>2</sup>/g indépendamment du taux de silice.

### 3.3 Hybrides carraghénane/PLL/Silice

La voie de synthèse n°2 consiste à mélanger des microsphères de k-carraghénane recouvertes de Poly-L-Lysine avec du TEOS, de l'eau et un catalyseur pour l'hydrolyse-condensation.

Comme nous l'avons vu précédemment cette synthèse aboutit à des microsphères hybrides de type cœur-couronne. Le cœur se présente sous forme d'un résidu effondré que nous appellerons « chips » et la couronne sous forme de coquille sphérique. Cette morphologie (cœur-couronne) présente un intérêt majeur pour d'éventuelles applications dans le domaine de l'encapsulation. Cependant l'effondrement du cœur de la microsphère n'est pas souhaitable.

Cette perte de cohésion entre la couronne et le cœur n'est effective qu'après le séchage. Ceci peut être inhérent à la différence de composition des deux protagonistes. En effet nous avons établi que la proportion de matière silicique au sein du matériaux hybride a une influence directe sur la rétraction au séchage du matériau (cf. tableau 18 p129). Or dans la première partie du travail nous avons synthétisé cet hybride à partir d'un mélange TEOS/Eau = 2,4. Nous avons aussi établi qu'une diminution du rapport TEOS/Eau dans le milieu réactionnel induit une diminution du rapport SiO<sub>2</sub>/k-carra au sein du matériaux hybride.

Pour ce type de microsphère l'objectif est de minimiser la rétractation durant le séchage du cœur des microsphères par une étude des conditions expérimentales de synthèse. Nous avons donc procédé à des changements de proportions de chaque constituant et étudié les principales caractéristiques des hybrides obtenus

#### 3.3.1 Influence du rapport TEOS/H<sub>2</sub>O sur les propriétés morphologiques des microsphères.

Nous n'avons pas dépassé le rapport TEOS/k-carra=211, car au-delà il est impossible de discerner les microsphères des amas de silice amorphes produits de façon concomitante.

N° de lots	Masse de TEOS milieu réactionnel	Rapport TEOS/H <sub>2</sub> O en masse	Masse de billes de $\kappa$ -carraghénane	Rapport TEOS/ $\kappa$ -carra en masse	Catalyseur NaF
1	5,12 g	0,77	2,0234 g	101	50 mg
2	5,55 g	1	2,0132 g	110	50 mg
3	7,7 g	1,7	1,9907 g	154	50 mg
4	10,8 g	2,4	2,0512 g	210	50 mg

Tableau 20: Proportion de chaque constituant du milieu réactionnel.

Dans un premier temps nous avons comparé la morphologie des microsphères hybrides sèches à l'aide de clichés de microscopie optique (Tableau 21).

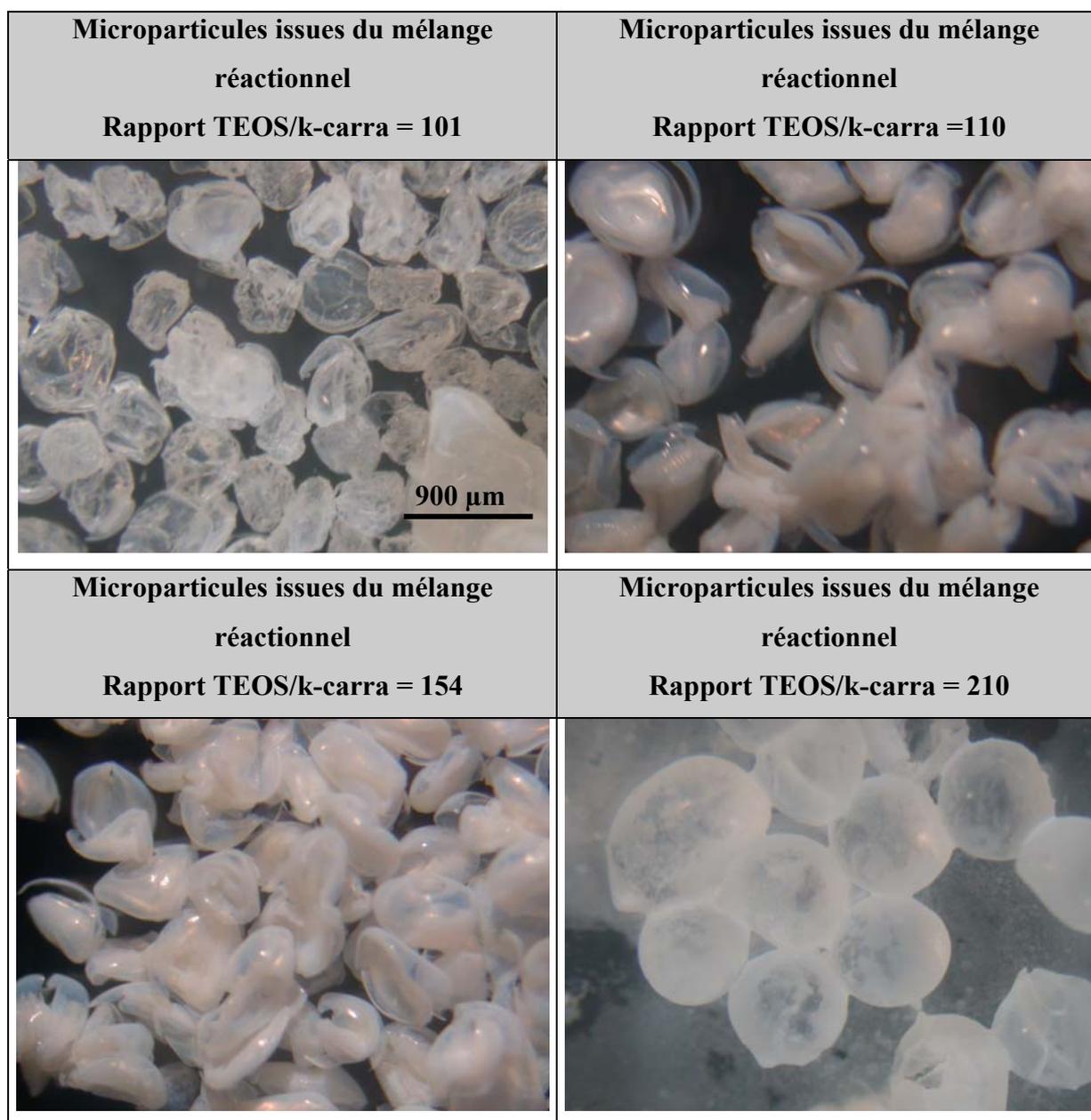


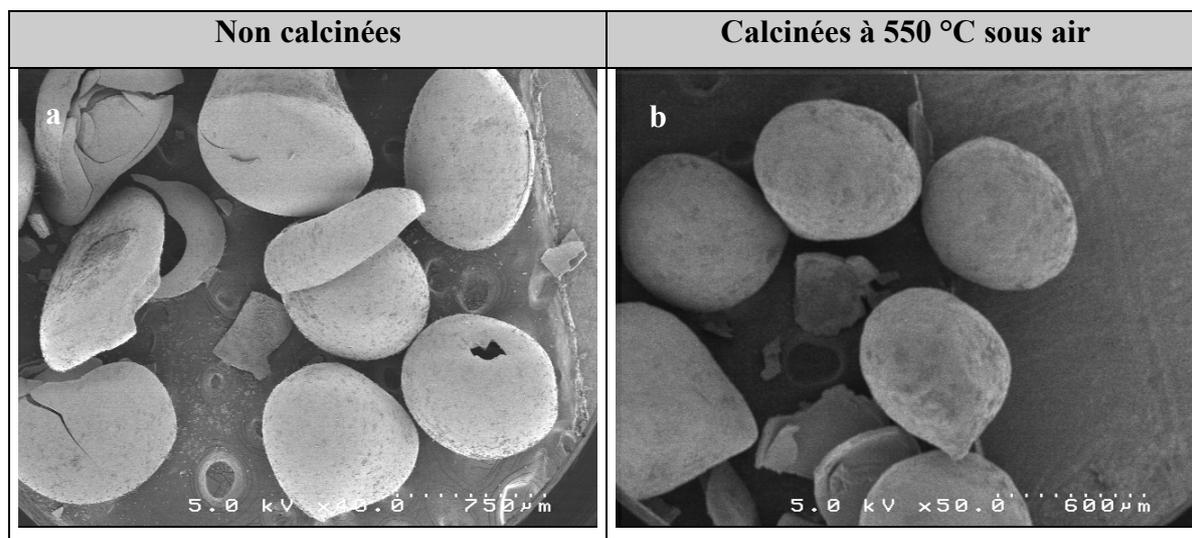
Tableau 21 : Clichés de microscopie optique des matériaux hybrides secs élaborés à partir de différents rapport TEOS/Eau.

Toutes les photographies ont la même échelle, représentée par la barre noire de 900 $\mu\text{m}$ .

Plusieurs remarques peuvent être émises en observant ces clichés :

- Seules les microsphères hybrides issues d'un milieu réactionnel dont le rapport TEOS/k-carra= 210 présentent une morphologie sphérique.
- Si nous établissons un classement par ordre croissant du rapport TEOS/k-carra, il semble que la morphologie des microparticules tend vers des microparticules de plus en plus sphériques.
- La même constatation peut être faite sur la taille des microparticules. Ceci est certainement due à l'augmentation du taux de silice dans chaque hybride.

Fort de ces constatations nous avons restreint les caractérisations aux microparticules présentant une bonne sphéricité. La microscopie électronique à balayage nous permet de comparer l'aspect des microsphères avant et après calcination à 550°C et ainsi connaître la morphologie de la partie minérale de l'hybride. Le tableau 22 suivant rassemble des clichés pris sur des microsphères hybrides dont le milieu réactionnel contient un rapport TEOS/k-carra = 210.



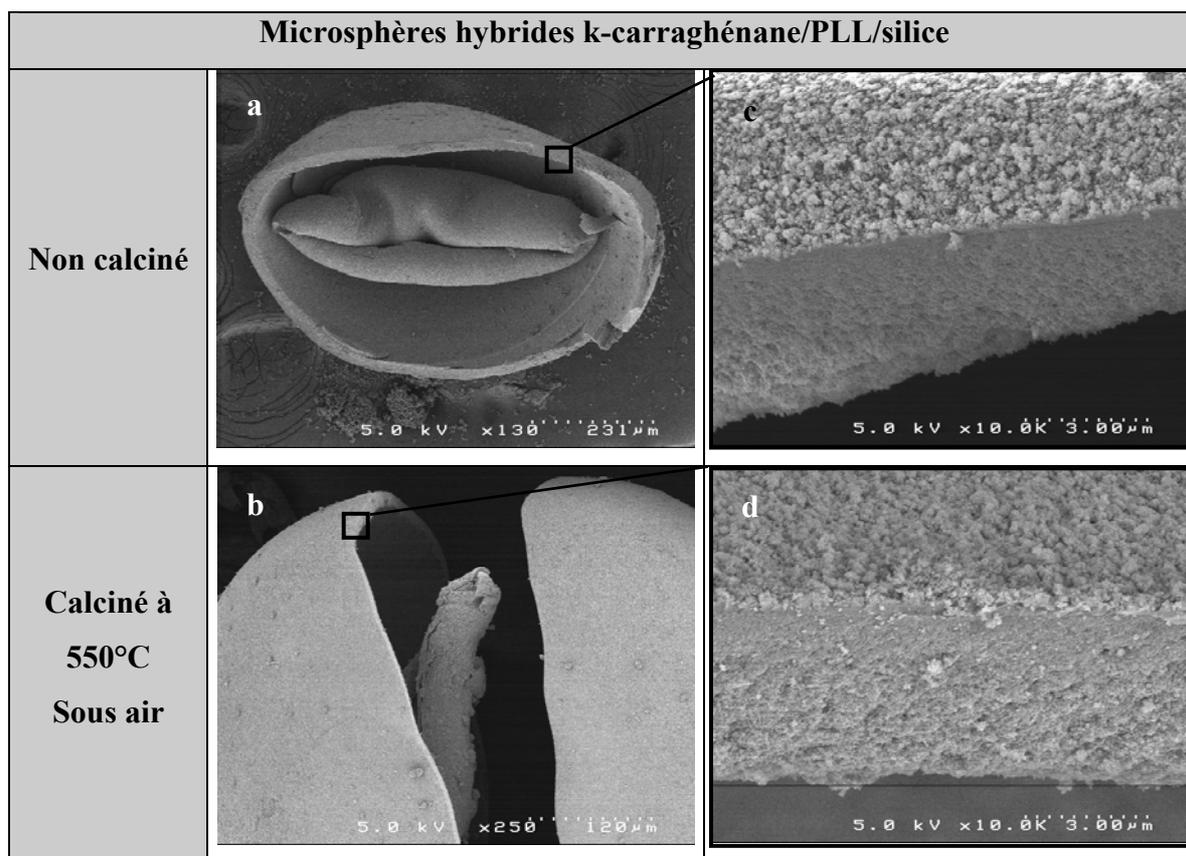
**Tableau 22 : Morphologie générale des microsphères hybrides k-carra/PLL/silice ; a)non calcinées ;b) calcinées à 550°C sous air.**

Sur le cliché **a**, la barre est de 750  $\mu\text{m}$ , les microsphères ont une taille moyenne de 700  $\mu\text{m}$ . Toutes les microparticules ne présentent pas une morphologie sphérique. Cependant elles ont l'aspect des microsphères k-carraghénane d'origines (cf. P 88 figure 48). La barre du cliché **b** est de 600 $\mu\text{m}$  , les microsphères hybrides calcinées ont préservé leur morphologie sphérique identique à celle des microsphère hybrides du cliché **a**. La taille moyenne est aussi de 700  $\mu\text{m}$ .

La photographie de la section d'une microsphère hybride est représentée sur le cliché **a** du tableau 22, la barre fait 231  $\mu\text{m}$ . La taille moyenne de la microsphère est de 700  $\mu\text{m}$ . cette photo illustre la morphologie cœur-couronne qui caractérise les microsphères hybrides synthétisées à partir de microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL. La couronne a une épaisseur voisine de 5  $\mu\text{m}$  (cf. cliché **c**) et n'est pas modifiée par la calcination (cf. cliché **b**). Le cœur rétréci de la microsphère présente une morphologie de type chips. La calcination ne modifie pas cette morphologie (cf. cliché **b**). Ainsi nous pouvons confirmer sa nature hybride.

En comparant les clichés **c** et **d**, nous ne voyons pas de modifications significatives de la morphologie et de l'épaisseur de la coquille. Cette remarque nous amène à conclure que la coquille est de nature fortement silicique.

La surface externe de la coquille avant calcination (cliché **a**, tableau 23) se décrit comme une surface composée d'agrégats de nanoparticules.



**Tableau 23 : Aspects des microsphères hybrides k-carra/PLL/silice sectionnées, non calcinée (a) et calcinée (b). Vues transversales de la couronne, non calcinée (c) et calcinée (d).**

Ces nanoparticules sont certainement de nature hybride, car il semblerait que la rugosité de la surface diminue avec la calcination. En effet les deux cliché **a** et **b** ont la même échelle et les grains présents sur la coquille non calcinée sont plus gros que ceux de la coquille calcinée. Cette observation concorde avec l'hypothèse que **J.Livage et coll** [101] ont établi en étudiant la condensation silicique en présence de chaînes polypeptidiques. Cette étude les a mené à conclure que des nanoparticules de silice seraient assemblées en chapelets sur les chaînes de polymère ce qui correspondrait à l'image avant calcination. La diminution de la rugosité serait liée à la disparition des chaînes polymériques par calcination. En revanche la surface externe de la chips (cf.cliché **c**) présente un aspect de surface différent, plus cotonneuse avec une rugosité plus fine. Cependant la calcination lui donne un aspect de réseau tubulaire interconnecté (cf. cliché **d**).

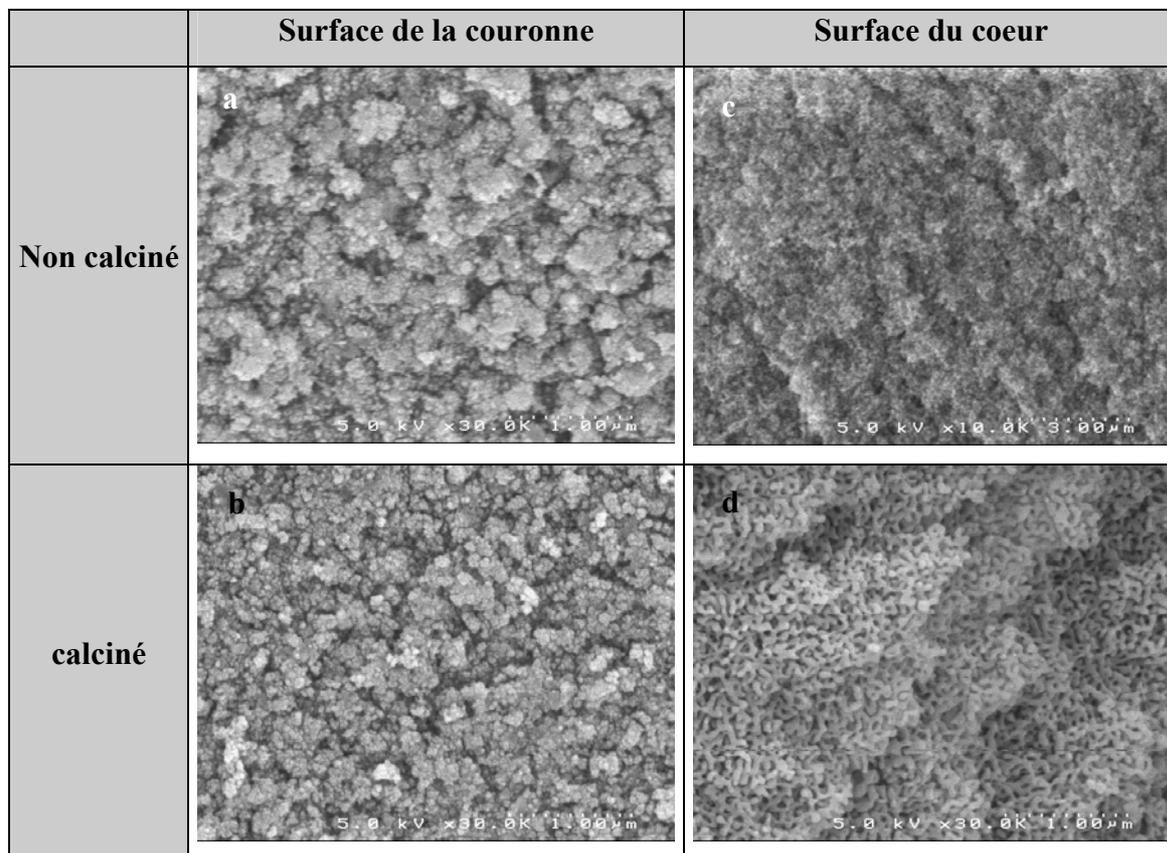


Tableau 24 : Aspect de la surface externe de la couronne, non calcinée (a) et calcinée (b). Aspect de la surface de la chips, non calcinée (c) et calcinée (d).

La nature hybride de la coquille n'est pas encore établie avec certitude. c'est pourquoi nous avons étudié la morphologie des ces microparticules par microscopie optique à fluorescence confocale.

Afin de pouvoir observer une fluorescence sur les microsphères nous avons synthétisé des microsphères hybrides en utilisant des microsphères de k-carraghénane recouvertes de PLL marquée à la fluorescéine. Les images obtenues ont été prises avec un microscope de type BIORAD avec une optique NIKON et comme source lumineuse un laser argon.

La fluorescéine présente un maximum de sa bande d'excitation à 488 nm et nous mesurons l'intensité du maximum d'émission à 512 nm. Les images ont été prises avec un objectif X10 et sont rassemblées sur la figure 70 ci-dessous.

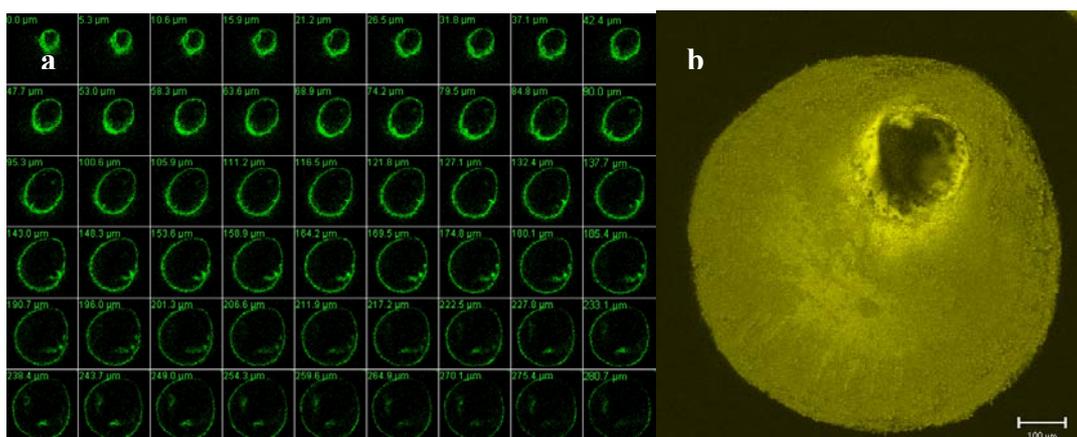


Figure 70 : a) Plans confocaux ; b) Superposition des plans confocaux.

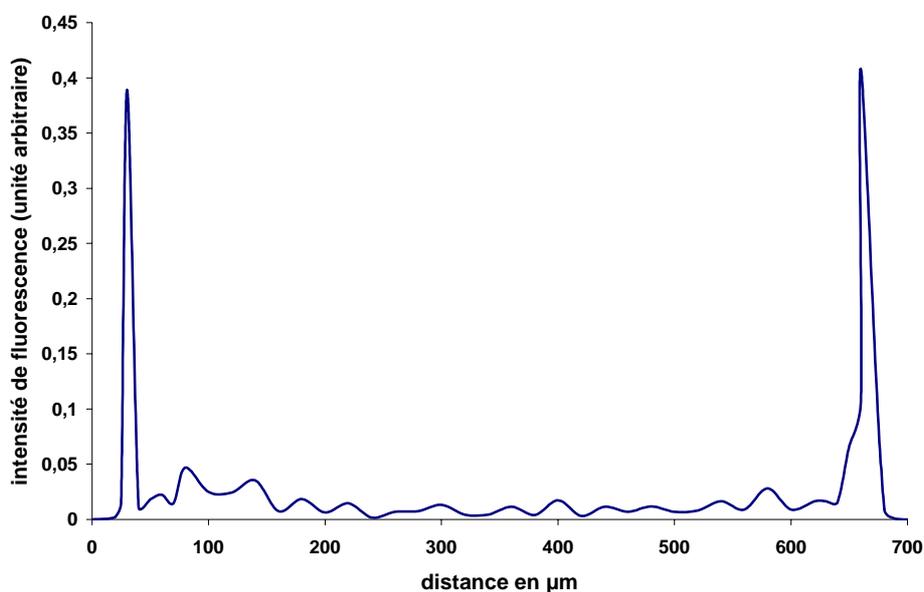


Figure 71 : Profil de l'intensité de fluorescence d'un plan confocal situé au milieu de la microsphère.

Chaque plan confocal est séparé du suivant par  $2,5\mu\text{m}$ . la photo **b** représente la superposition de tous les plans confocaux. A partir du plan situé au milieu de la

microsphère nous pouvons porter l'intensité de fluorescence en fonction de la distance parcourue sur le diamètre du plan (Figure 71). Ainsi nous pouvons estimer l'épaisseur de la couronne fluorescente à 5  $\mu\text{m}$ . Cette épaisseur correspond à l'épaisseur de la coquille observée sur les clichés **c** et **d** du tableau 23 précédant. Ceci nous permet de conclure que la coquille est de nature hybride et qu'elle est le résultat d'une association entre la poly-L-lysine et la silice. La partie noire intérieure au cercle vert, confirme qu'il n'y a pas ou peu de poly-L-lysine partagée entre la coquille et la chips. Cependant nous ne pouvons pas affirmer que la coquille n'est pas le résultat d'une triple association entre le k-carraghénane, la PLL et la silice.

Afin de déterminer la nature chimique de la coquille et celle de la surface de la chips nous avons procédé à des microanalyses par microsonde électronique. Pour cela nous avons exposé des microsphères sectionnées à un faisceau d'électrons et mesuré les rayons X émis par la surface (Figure 72). La détermination du taux de silice a été faite de la même manière que lors des précédentes mesures effectuées sur les microsphères hybrides synthétisées par la voie n°1.

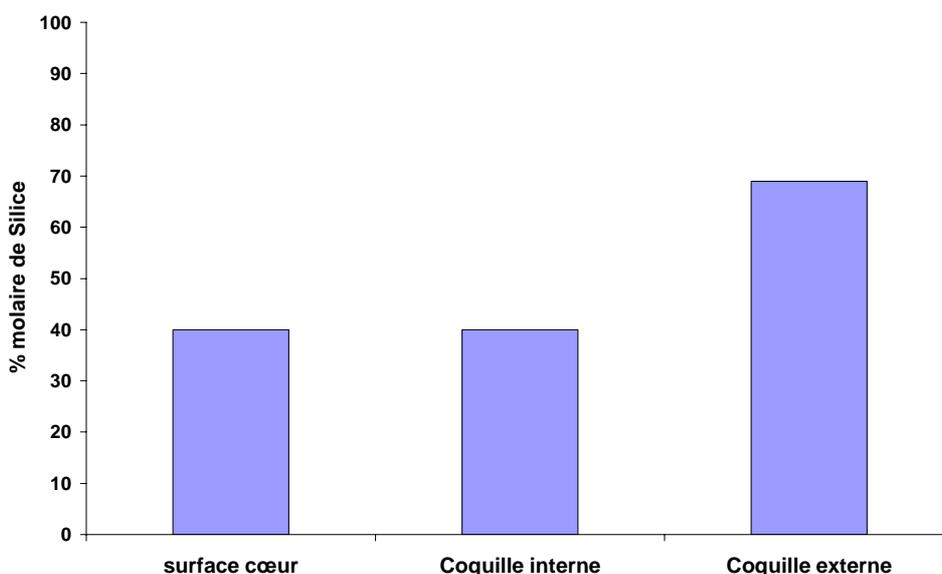


Figure 72 : Pourcentage molaire de silice en fonction de la localisation

A partir de ces résultats nous pouvons confirmer que la coquille contient du k-carraghénane, environ 20% sur la partie externe et pratiquement 60 % sur la zone interne.

La surface externe de la chips présente un taux de silice similaire à celui de la coquille interne.

En mesurant la surface spécifique par adsorption d'azote à 77 K nous avons tracé une isotherme d'adsorption/désorption de type IV. La surface spécifique s'élève à 180  $\text{m}^2/\text{g}$

pour un échantillon non calciné et à 100 m<sup>2</sup>/g pour celui calciné. Nous n'avons observé de microporosité dans aucun des deux cas.

### 3.3.2 Conclusion

Les deux voies de synthèses aboutissent à des microsphères hybrides dont la morphologie est très différente.

A partir de la voie de synthèse n°1 nous sommes capables d'élaborer des microsphères hybrides de taille contrôlée allant de 500 µm à 150 µm qui présentent toutes une mésoporosité et une surface spécifique élevée. Ces caractéristiques en font de bonnes candidates pour des applications diverses. Notamment pour de la microencapsulation de principes actifs, mais aussi pour de la catalyse supportée.

La voie de synthèse n°2 conduit à des microsphères de types cœur-couronne dont la taille est voisine des microsphères de k-carraghénane d'origines. Ces microsphères présentent une mésoporosité et une grande surface spécifique. Nous avons acquis la certitude que cette morphologie est due à l'ajout de poly-L-lysine sur les microsphères de k-carraghénane. Ce type de morphologie présente des intérêts dans certains domaines d'applications comme la microencapsulation mais reste cependant peu intéressante par le fait que les microsphères sont creuses. C'est pourquoi nous avons continué nos investigations afin de trouver une voie de synthèse qui aboutirait à des microsphères du même type de morphologie (cœur-couronne) mais dont le cœur ne serait pas rétréci. La rétraction du cœur est due à plusieurs paramètres :

- Le taux de silice de la coquille est le double que celui du cœur. Or nous savons que les phénomènes de rétractions sont directement proportionnel à la quantité de silice au sein de l'hybride.
- La cohésion entre le cœur et la couronne. Une forte interaction entre le cœur et la couronne pourrait éviter le rétrécissement du cœur.

Le choix d'un précurseur silicique mixte tel que l'aminopropyl-triéthoxysilane offrant un substituant hydrophile pourrait favoriser l'interaction entre la phase organique et inorganique. Ainsi nous pouvons penser que le précurseur mixte pourra interagir avec la totalité de la bille de gel et éviter la rétraction du cœur par rapport à la couronne.

#### 4 Synthèse de microsphères hybrides à partir de mélanges de précurseurs silicique mixte et homodesmique.

Le mélange de précurseurs silicique mixte (aminopropyl-triéthoxysilane) et homodesmique (tetraéthoxysilane) est souvent employé pour générer des gels de silice fonctionnalisés. La fonction amine apportée par le précurseur mixte ne participe pas à la construction du réseau du gel. Donc le rapport des quantités entre les deux précurseurs va influencer la nature de réseau. Les fonctions amines sont susceptibles d'interagir plus fortement avec le carraghénane et ainsi renforcer la cohésion entre la matière organique et la silice.

Ces travaux constituent une perspective d'amélioration des propriétés des microparticules présentant une morphologie de type cœur couronne. Seul les résultats obtenus à partir d'un mélange de 10% d'aminopropyl-triéthoxysilane et 90% de TEOS seront présentés.

La fabrication des matériaux hybrides est similaire à celle de la synthèse des microsphères hybrides élaborées par la voie n°2.

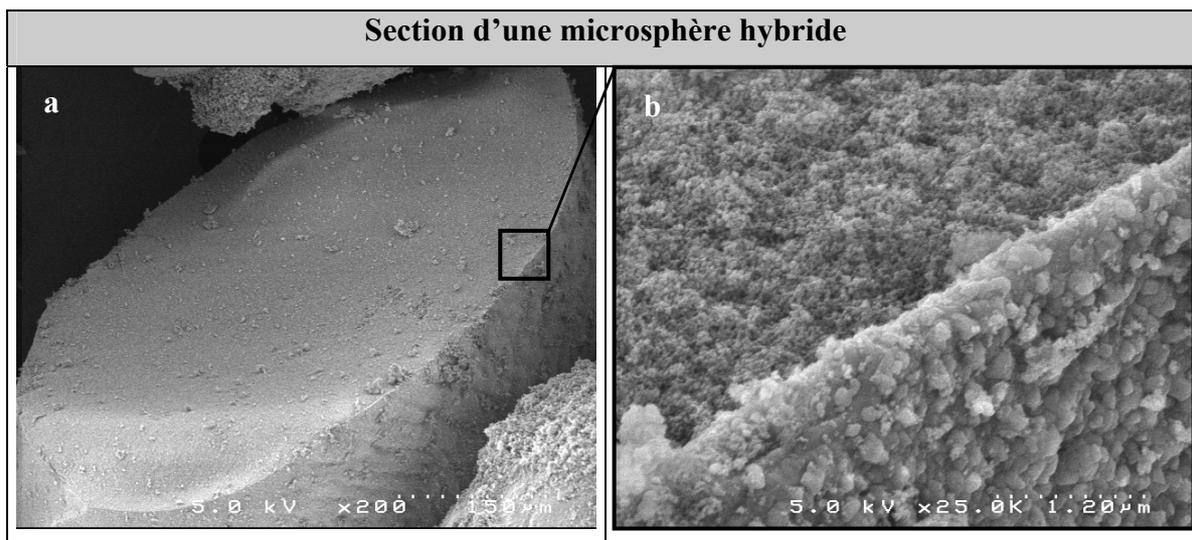
Le mélange réactionnel contient des microsphères de k-carraghénane revêtues de Poly-L-lysine de l'eau et un mélange de précurseurs silicique avec un catalyseur (NaF).

Globalement les proportions de chaque constituant du mélange sont résumées dans le tableau suivant.

Masse de billes de k-carraghénane	Masse de TEOS	Masse de APTEOS	Rapport Précurseurs/Eau	Rapport Précurseurs/k-carr.	Masse de catalyseur NaF
1,760 g	5,405 g	0,606 g	2,4	211	50 mg

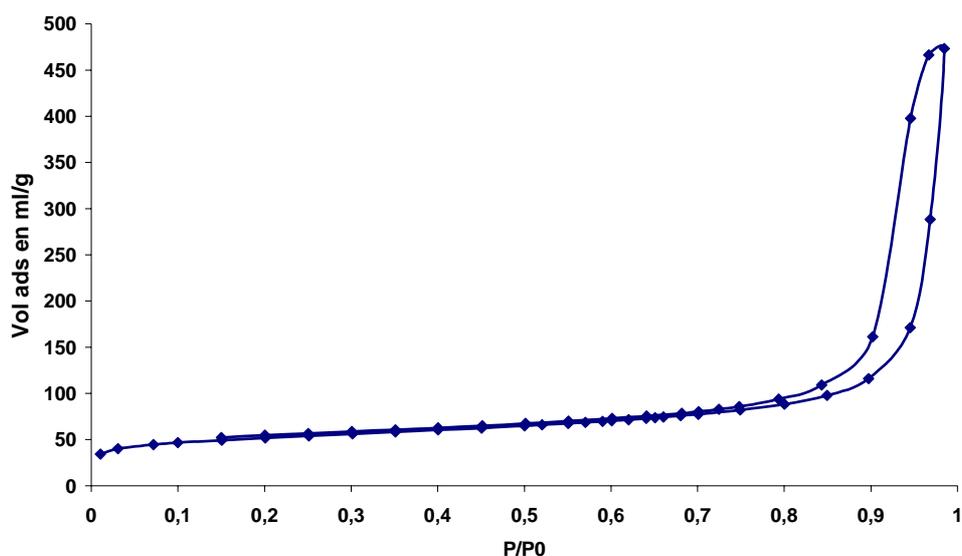
Tableau 25 : Composition du milieu réactionnel.

Les microparticules issues de la synthèse ont été séchées en milieu CO<sub>2</sub> super-critique et présentent une morphologie sphérique. Dans le tableau 26 suivant l'image **a** représente un cliché de microscopie électronique à balayage d'une microsphère sectionnée. Le cliché **b** est un agrandissement de la zone encadrée en noir sur le cliché **a**.



**Tableau 26 : Aspect d'une microsphère hybride k-carr./PLL/silice sectionnées.**

La particule a une taille moyenne d'environ 500  $\mu\text{m}$ , elle présente des stries sur sa surface externe. Ces stries sont caractéristiques des microsphères de k-carraghénane observées sur le cliché de la figure 49 a', page 89. Sur le cliché b, il apparaît que la texture de la surface interne de la microsphère est poreuse tandis que la surface externe est beaucoup plus dense. Ceci pourrait nous amener à conclure que nous sommes en présence d'un objet de type cœur couronne. Le cœur serait poreux ou expansé et la couronne serait dense et compacte. L'analyse volumétrique par adsorption/désorption d'azote à 77K nous a permis de tracer une isotherme d'adsorption représentée sur la figure 73 ci-dessous.



**Figure 73 : Isotherme d'adsorption/désorption d'azote à 77 K des microsphères hybrides k-carr./PLL/silice.**

Cette isotherme est de type IV d'après la classification IUPAC. La forme de l'hystérésis rend compte d'une porosité grande et régulière. De plus, la forme de l'hystérésis nous montre que les cavités poreuses sont relativement uniformes. Cependant, la position de l'hystérésis dans les gammes de pressions élevées et à la fin de l'adsorption, ne nous permettent pas de distinguer la grande mésoporosité de la porosité interparticulaire. Le calcul de la surface spécifique à partir de la théorie BET nous donne une surface de  $200\text{m}^2/\text{g}$ .

Afin de déterminer la composition en matière organique nous avons procédé à une analyse thermogravimétrique. La figure 74 suivante porte le pourcentage massique de perte en fonction de la température (rouge) et la dérivée première de cette perte en fonction du temps (bleu).

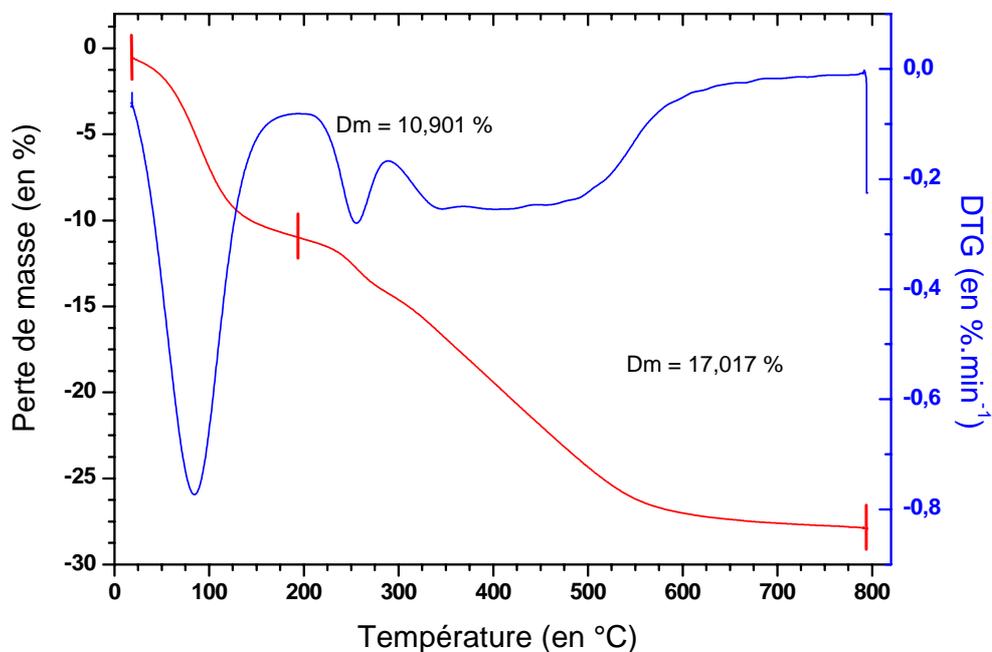


Figure 74 : Thermogramme des microsphères hybrides k-carr./PLL/silice.

Le profil de la perte massique en fonction de la température est similaire à celui observé pour les autres types d'hybrides vus précédemment. Une perte en masse est enregistrée à une température  $<200\text{ °C}$ . Cette chute correspond à l'eau adsorbée par le matériau en présence de l'air ambiant. Au delà de  $200\text{ °C}$  la perte massique correspond à la proportion de matière organique présente au sein du matériau hybride (cf. tableau 27).

Surface BET	ATG	
	TG < 200°C	TG > 200°C
200 m <sup>2</sup> /g	11 %	17 %

Tableau 27 : Résultats ATG et surface spécifique.

L'analyse EDX de la surface interne et externe d'une section nous a permis de tracer la distribution radiale du taux de silice au sein de la particule (Figure 75).

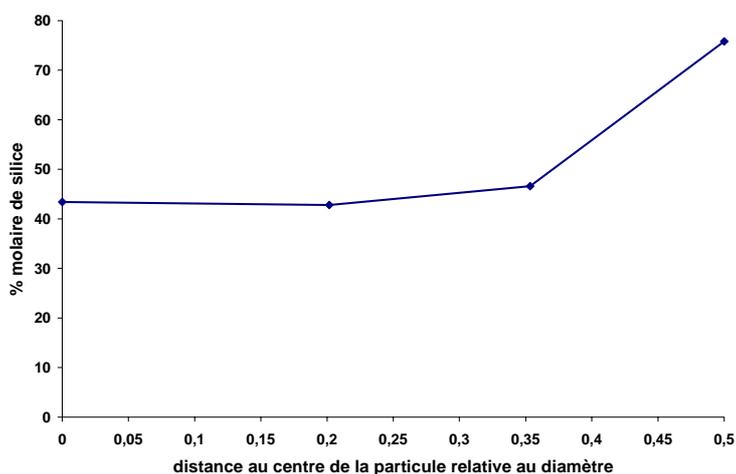


Figure 75 : Analyse EDX d'une section d'une particule

Le profil de la distribution confirme l'hypothèse que nous avons posée lors de l'observation des clichés MEB (cf. Tableau 26), nous sommes effectivement en présence d'un objet de type cœur couronne. Le cœur constitué de 45% de silice et une couronne avec un taux de silice beaucoup plus fort (75%).

## Conclusion

Cet essai préliminaire de synthèse de microsphères hybrides à l'aide d'un mélange de précurseurs silicique montre qu'il est possible d'obtenir des particules de morphologie et de structure souhaitées. Cependant, cette étude demande à être complétée en faisant varier la proportion de chacun des deux précurseurs. De plus une étude en microscopie de fluorescence confocale permettrait de confirmer la présence d'une paroi hybride différente du cœur de la microsphère.

### III. Conclusion générale

---

L'objectif de cette étude était de mettre au point des voies de synthèse sol-gel permettant l'obtention de microparticules hybrides possédant une morphologie sphérique de taille homogène et présentant une mésoporosité.

La première partie de cette étude a consisté à obtenir dans des conditions reproductibles des microsphères de polysaccharides (carraghénanes) revêtues ou non de poly-L-lysine. Les microsphères ainsi préparées par extrusion et gélification ionotropique présentent une morphologie quasi-sphérique et une granulométrie moyenne de 700  $\mu\text{m}$ . Ces microsphères peuvent être revêtues dès leur extrusion par un polymère polycationique poly-L-lysine avec une épaisseur reproductible de 6 à 10  $\mu\text{m}$ . Le mode de séchage de ces microsphères a été mis au point de telle sorte à obtenir des microsphères sèches présentant des caractéristiques internes proches de l'hydrogel de départ. Les mesures de porosité obtenus par adsorption d'azote témoignent de la qualité du maintien de cette structure. Les isothermes montrent qu'il s'agit en effet de mésoporosité. Les clichés obtenus par microscopie électronique à balayage et microscopie de fluorescence confocale démontrent la présence d'un coeur polysaccharidique et d'une couronne de poly-L-lysine dans le cas des microsphères revêtues.

La deuxième partie de cette étude concerne la synthèse de microsphères hybrides à partir des microsphères de polysaccharides ainsi obtenues. Différents paramètres essentiels ont été testés : le mode d'agitation, la nature du précurseur silicique, le rapport eau/précurseur silicique et enfin la nature du catalyseur. Les conditions qui permettent l'obtention de microsphères hybrides carraghénane/silice satisfaisantes sont les suivantes :

- Mode d'agitation rotatif : ce mode d'agitation a été comparé à une agitation par barreau magnétique et ce premier seul permet de garantir le maintien de la forme de la microsphère de départ et ceci particulièrement pour le cas où les microsphères hybrides sont synthétisées avec le TEOS.
- TEOS : en effet seule la synthèse utilisant ce précurseur comparée aux microsphères préparées à partir de TMOS, permet d'obtenir la morphologie des microsphères de départ.

- Le rapport TEOS/eau détermine le taux de silice et par conséquent la taille des microsphères.
- La nature du catalyseur influence la répartition de la silice au sein des microsphères ; cette observation reste difficile quant à son interprétation et nécessiterait des études complémentaires complexes sur les cinétiques mises en jeu.

La troisième partie s'attache à mettre au point la synthèse de microsphères hybrides silice/carraghénanes/poly-L-lysine dans l'objectif de se servir de la paroi de polymère polycationique comme polymère structurant de la paroi hybride des microsphères silice/carraghénanes et ceci en une étape.

Les différentes voies de synthèse conduisent à des microsphères de morphologies très différentes. En effet, il est possible d'obtenir :

- des microsphères présentant une paroi hybride et dont le coeur est effondré au séchage (hybride carraghénane/silice),
- des microsphères présentant une paroi hybride et dont le coeur conserve sa morphologie sphérique solidaire de la paroi. Cependant ce dernier cas n'a été réalisé qu'en présence d'un mélange de précurseur silicique destiné à assurer la cohésion entre matière organique et silice.

La microscopie électronique couplée à l'analyse EDX ainsi que la microscopie de fluorescence confocale ont permis d'identifier correctement la répartition des différents acteurs : poly-L-lysine, carraghénane et silice.

Dans les conditions décrites dans cette étude, il est donc possible de réaliser des matériaux hybrides de morphologie contrôlée (microsphères) en utilisant des polymères d'origine naturelle. Pour compléter les études de caractérisation, ces microsphères hybrides pourraient faire l'objet de test de gonflement en présence d'eau et des tests de résistance mécanique.

Une meilleure connaissance des mécanismes de synthèse mis en jeu et surtout leurs cinétiques devraient permettre une plus grande maîtrise des voies de synthèse de ces matériaux hybrides. Enfin, il serait intéressant de corréliser certains aspects physico-chimiques de l'hydrogel de départ avec les caractéristiques texturales des matériaux hybrides obtenus.

Ces matériaux ainsi synthétisés pourraient trouver des applications dans le domaine de la catalyse et de la Santé.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE**

## IV. Références bibliographiques

---

1. Arshady R., *Microspheres, microcapsules and liposomes, Vol. 1 : preparation and chemical applications*. edition lavoisier, 1999.
2. Arshady R., *Suspension, emulsion and dispersion polymerization: A methodological survey*, *Colloid. Polym. Sci.*, 1992. **270**: p. 1705-17.
3. Arshady R., *Suspension polymerization and its application to the preparation of polymer supports*,. *React, Polym.*, 1993. **1**: p. 159-74.
4. Grulke E A, *Suspension polymerization*,. *Encycl. Polym. Sci. Eng.*, 1989. **16**: p. 443-73.
5. Arshady R, *Preparation and characterization of styrene based polymer supports*,. *Makromol. Chem.*, 1988. **189**: p. 1295-303.
6. Arshady R, *Hydrophilic microspheres based on dimethylacrylamide*,. *Colloid Polym. Sci.*, 1990. **268**: p. 948- 58.
7. Lovell P A (Ed), *Emulsion polymerization and emulsion polymers*,. Wiley, London & New York, 1997.
8. Bacchi P, Gray B. V., Bimbaum S M, *Preparation of model polyvinyltoluene latices and characterization of their surface charge by titration and electrophoresis*, *J. Colloid Interf Sci.*, 1979. **69**: p. 502-28.
9. Barret K E J, *Dispersion Polymerization in Organic Media*. John Wiley, London, 1975.
10. Arshady R, *Suspension, dispersion and interfacial polycondensation: A methodological survey*,. *Polym. Eng. Sci.*, 1993. **33**: p. 865-75.
11. Wilcox D L, B.M., Bemat T, Kellerman D, Kochran J K (Eds), *Hollow and Solid Spheres and Microspheres*,. Materials Research Society, Pittsburg, PA, 1995.
12. Unger K, *Packings and Stationary Phases in Chromatographie Techniques*, Marcel Dekker, New York, 1990.
13. Carturan, Boninsegna S., Dal Toso R, R., Dal Monte, G., *Alginate Microspheres Loaded with Animal Cells and Coated by a Siliceous Layer*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, Jan 2003. **26(1)**: p. 1151-1157.
14. Klein J., Wagner F., *Methods for the immobilization of microbial cells*. *Applied Biochemistry and Bioengineering* . 1983. **4**: p. 11-51.
15. Katzbauer B., Narodoslowsky M., Moser A., *Classification system for immobilisation techniques*. *Bioprocess Engineering*, 1995. **12**: p. 173-179.
16. Klein J., Verlop K.D., *Immobilization techniques-Cells*. *Comprehensive Biotechnology*, 1985. **2(12)**: p. 203-224.
17. Lothar A.M., Oetterer M., *Microbial cell immobilisation applied to alcohol production*. - a review. *Rev. Microbiol.* , Sao Paulo, 1995. **26**: p. 151-159.
18. Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T., *Environmental applications of immobilized microbial cells : a review*. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996. **16**: p. 79-101.
19. Robles R., Sorgeloos P., Van Duffel H., Nelis H., *Progress in biomedication using, live foods*. *J. Appl. Ichthyol.*, 1998. **14**: p. 207-212.

20. Groboillot A., Poncelet D., Neufeld R.J., *immobilization of cells for application in the food industry*. Critical Reviews in Biotechnology, 1994. **14**(2): p. 75-107.
21. Murano E., *Use of natural polysaccharides in the microencapsulation techniques*. J. Appl. Ichthyol., 1998. **14**: p. 245-249.
22. Alsarra, Ibrahim A., S.H. Neau, and M.A. Howard, *Effects of preparative parameters on the properties of chitosan hydrogel beads containing Candida rugosa lipase*. Biomaterials, 2004. **25**(13): p. 2645-2655.
23. Belyaeva, E., Della Valle, and D. Poncelet, *Immobilization of [alpha]-chymotrypsin in [kappa]-carrageenan beads prepared with the static mixer*. Enzyme and Microbial Technology, 2004. **34**(2): p. 108-113.
24. CARTURAN, G., *Alginate Microspheres Loaded with Animal Cells and Coated by a Siliceous Layer*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2003. **26**: p. 1151-1157.
25. Cassidy, M.B., Shaw, K.W.Lee, H.Trevors, *Enhanced mineralization of pentachlorophenol by [kappa]-carrageenan-encapsulated Pseudomonas sp. UG30*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997. **47**(2): p. 108-113.
26. Tosa, T., et al., *Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix*. Biotechnology And Bioengineering, 1979. **21**(10): p. 1697-1709.
27. Sipahigil, O. and B. Dortunc, *Preparation and in vitro evaluation of verapamil HCl and ibuprofen containing carrageenan beads\*1*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **228**(1-2): p. 119-128.
28. Barbotin J.N., Saucedo N., Bazinet C., Kersulec A., Tliomasset B., Thomas D., *Immobilization of whole cells and somatic embryos : coating process and cell matrix. interactions*. Synseeds : applications of synthetic seeds to crop improvement . 1993: p. 65-103.
29. P. Kortesus, et al., *In vitro evaluation of sol-gel processed spray dried silica gel microspheres as carrier in controlled drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **200**: p. 223-229.
30. G.V. Rama Rao, et al., *Monodisperse mesoporous silica microspheres formed by evaporation-induced self assembly of surfactants templates in aerosols*. Advanced materials, 2002. **14**(18): p. 1301-1304.
31. C. Boissiere, et al., *First in-situ SAXS studies of the mesostructuration of spherical silica and titania particles during spray-drying process*. Chemical Communications, 2003. **22**: p. 2798-2799.
32. A. Lind, et al., *Spherical silica agglomerates possessing hierarchical porosity prepared by spray drying of MCM-41 and MCM-48 nanospheres*. Microporous and Mesoporous Materials . 2003. **66**: p. 219-227.
33. Serp, D., et al., *Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization*. Biotechnology And Bioengineering, 2000. **70**(1): p. 41-53.
34. Graham, Phil. Trans. Roy. Soc., 1861: p. 151, 183.
35. Freundlich M., O.J., Zsigmondy E., Kapillarchemie, Akad Verlagsges, Leipzig., 1932.
36. H. G. Bungenberg de Jong., *Crystallisation, coacervation, flocculation in Colloid*. Science 11, 1949: p. 232-258.
37. Herman., P.H., Colloid Science 11, ed, H. R. Kruyt, Elsevier publ. Co. Inc., 1949: p. 483-494.
38. Flory, *Thermodynamics of high polymer solutions*. Journal of Chemical Physics, 1942. **10**: p. 51-61.

39. Dickinson E., *L'état colloïdal les colloïdes alimentaires*. Mason, Paris., 1996: p. 3-26.
40. Ferry J.D., E.J.E., *Studies of the cross-linking process in gelatin gels*. Journal of Physics and Colloid Chemistry, 1949. **53**: p. 184-196.
41. Djabourov M., *les gels de biopolymères, in les réseaux moléculaires organisés*,. Images de la recherche, CNRS, 1994: p. 213-216.
42. Multon J.L., *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries alimentaires*. Lavoisier, Paris, 1992: p. 799.
43. Rees D, A., Adv. Carbohydrat. Chem, 1969. **24**: p. 267-332.
44. Doublier J.L., Thibault J.F., Axelos M.A.V., *Agents épaississants et gélifiants de nature glucidique, Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*,. Multon J.-L., Lavoisier, 1992: p. 373-414.
45. Mueller G.P., Rees.D.A., Trans. Drugs Sea Symposium, University Rhode Island, 1968.
46. Rees D.A., Williamson F.B., *Correlation of optical activity with polysaccharide conformation*,. Nature, 1970. **227**: p. 390-392.
47. Rees D.A., *The carrageenan system of polysaccharides. Part 1. The relation between the kappa and the lambda component*,. Journal of the Chemical Society, 1963: p. 1821-1832.
48. Millane R.P., C.R., Arnott S., Dea I, *The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan*. Carbohydrate research, 1988. **182**: p. 1-17.
49. Anderson N. S., Rees D.A., *X-ray diffraction studies of polysaccharides sulphates -double helix model for kappa and iota carrageenan*,. Journal of Molecular Biology, 1973. **45**: p. 85-99.
50. Landry S., *Relation entre la structure moléculaire et les propriétés mécaniques des gels de carraghénanes*,. thèse, Grenoble, 1987.
51. Rochas C., Landry S., *Relation between the molecular structure and the mechanical properties of carrageenan gels*. Carbohydrate Polymers,, 1989. **10**: p. 117-127.
52. Rochas C., R.M., Landry S., *Calorimetric study of galactans*,. Food Hydrocolloids, 1987. **1**( 3): p. 215-225.
53. Bell C.L., Peppas.N.A., *Swelling/syneresis phenomena in gel-forming interpolymer complexes*,. J. Biomater. Sci. Polymer Edn., (1996),. **7**((8),): p. 671-683.
54. Bayley S.T., *X-ray and infrared studies on carrageenan*. Biochimica Biophysica Acta, 1955. **17**: p. 194-205.
55. Anderson N. S., Harding M.M., Rees D.A., Samuel J.W.B., J. Mol. Biol., 1969. **45**: p. 85-99.
56. Arnott S., S.W.E., Rees D.A., *Iota carrageenan - molecular structure and packing of polysaccharides double helices in oriented libbers of divalent cation salts*,. Journal of Molecular Biology, 1974. **90**: p. 253-267.
57. Rochas C., Rinaudo M., Biopolymers, 1984. **23**: p. 735-745.
58. Abeysekera R.M., Bergstrom.E.T., Goodal D.M, *Ultrastructural evidence for intramolecular double stranding in iota carrageenan*,. Carbohydrate Research,, 1993. **248**: p. 225-231.
59. Morris E.R., Rees.D.A., Robinson C., *Competitive inhibition of interchain interactions in polysaccharides systems*,. J. Mol. Biol., 1980. **138**,; p. 363-374.

60. Smidsrod O., *I.U.P.A.C. 27th International Congress of pure and Applied Chemistry charged polysaccharides*,. Ed. A. Varmanori, Pergamon Press, Oxford, 1980: p. 315-327.
61. Morris E.R., Rees.D.A., Robinson C., *Cation-specific aggregation of carrageenan helices - domain model of polymer gel structure*,. J. Mol. Biol., 1980. **138**: p. 349-362.
62. Rees D.A., *Secondary and tertiary structure of polysaccharides in solutions and gels*,. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1977. **16**: p. 214-224.
63. Dea I.C.M., Rees.D.A., *Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems*,. Journal of Molecular Biology, 1972. **58**,: p. 163-172.
64. Morris V.J., Belton.P.S., *Specific ion effects in iota carrageenane gels*,. Journal of the Chemical Society, 1980: p. 983-984.
65. Te Nijenhuis K., *Investigation into the ageing process in gels of gelatin/water systems by the measurement of their dynamic moduli. II. Mechanism of the ageing process*,. Colloids and Polymer Science,, 1981. **259**: p. 1017-1026.
66. Gekko, K. and M. Fukamizu, *Effect of pressure on the sol-gel transition of gelatin*. International Journal Of Biological Macromolecules, 1991. **13**(5): p. 295-300.
67. Anwari F., Carlozzo.B.J., Chokshi K., *Clear Liquid Separation in Latex Paints containing cellulosic/associative thickener systems*,. Journal of Coatings technology, 1993. **65**(825): p. 123-134.
68. Hsu C.S., Block.H.L., *Electrically induced syneresis phenomena in hydrophilic gels. III. pH effects*,. Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.,Controlled Release Society, Inc, 1996. **23**: p. 769-770.
69. Toncheva G., Panchev I., *Investigation of syneresis of agar jellies with sorbitol*,. Food Chem., (1994). **49**,: p. 29-31.
70. Nagasaka K., Taneya.S., *Syneresis phenomena of foods I. Analysis of syneresis rate of agar gel*,. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, (1996),. **43**(II), p. 1176-1182.
71. Norton, Morris, and Rees, *Lytotropic effects of simple anions on the conformation and interactions of kappa-carrageenan*. Carbohydrate Research, 1984. **134**(1): p. 89-101.
72. Piculell, L., S. Nilsson, and P. Muhrbeck, *Effects of small amounts of kappa-carrageenan on the rheology of aqueous iota-carrageenan*. Carbohydrate Polymers, 1992. **18**(3): p. 199-208.
73. Michon, C., et al., *Viscoelastic properties of [iota]-carrageenan/gelatin mixtures*. Carbohydrate Polymers, 1996. **31**(3): p. 161-169.
74. Rochas, C. and S. Landry, *Molecular organization of kappa carrageenan in aqueous solution*. Carbohydrate Polymers, 1987. **7**(6): p. 435-447.
75. Nilsson, S. and L. Piculell, *Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analysed within the Poisson-Boltzmann cell model. 2. Effects of salt concentration on the thermal transition*. Macromolecules, 1989. **22**(7): p. 3011-3017.
76. Piculell, L., S. Nilsson, and P. Strom, *On the specificity of the binding of cations to carrageenans: Counterion N.M.R. spectroscopy in mixed carrageenan systems\*1*. Carbohydrate Research, 1989. **188**: p. 121-135.
77. Piculell, L., et al., *Phase separation in aqueous mixtures of similarly charged polyelectrolytes*. Polymer Communications (Guildford, England), 1991. **32**(5): p. 158-160.
78. Rinaudo M., Rochas.C., Michels B., Journal de Chimie Physique, 1983. **80**: p. 305-308.

79. Rees D.A., *Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharides gels and networks*,. Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Wolfrom M.L. Eds, Academic Press, New York, 1969: p. 267-332.
80. M. Watase, N.N., *Effect of alkali metal ions on the viscoelasticity of concentrated kappa-carrageenan and agarose gels*,. Rheologica acta, 1982. **21**: p. 318-324.
81. Rochas C., Rinaudo.M., Biopolymers, 1980. **19**: p. 1975-1987.
82. Payens T.A.J., S.T.H.M., *J. Electroanal. Chem.* 1972. **37**: p. 291-296.
83. Morris, E.R., et al., *Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions*. Carbohydrate Polymers, 1981. **1**(1): p. 5-21.
84. Livage, J., *Chimie douce: From shake-and-bake processing to wet chemistry*. New Journal of Chemistry, 2001. **25**(1).
85. Livage, J., M. Henry, and C. Sanchez, *Sol-gel chemistry of transition metal oxides*. Progress in Solid State Chemistry, 1988. **18**(4): p. 259-341.
86. Sanchez, C., et al., *Design of functional nano-structured materials through the use of controlled hybrid organic-inorganic interfaces*. Comptes Rendus Chimie, 2003. **6**(8-10): p. 1131-1151.
87. Brinker, C.J., *Hydrolysis and condensation of silicates : Effects on structure*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1988. **100**: p. 31-50.
88. Brinker, C.J., *Sol-gel processing of silica*, in *The colloid chemistry of silica*, H.E. Berga, Editor. 1994, American Chemical Society: Washington D.C.
89. Swaddle, T.W., J. Salerno, and P.A. Tregloan, *Aqueous aluminates silicates and aluminosilicates*. Chemical Society Reviews, 1995: p. 319-325.
90. Iler, R.K., *The chemistry of silica*, ed. W. Interscience. 1979, New York.
91. H. Eckert and M. Ward, *Nanostructured and Functional Materials (special issue)*. Chem. Mater. and all articles therein . 2001. **13**.
92. B. zu Putlitz, K.L., H. Fischer, M. Antonietti., *The Generation of Armored Latexes and Hollow Inorganic Shells Made of Clay Sheets by Templating Cationic Miniemulsions and Latexes*. advanced materials, 2001. **13**(7): p. 500-503.
93. N. Kawahashi, E.M., *J. Colloid Interface Sci.*, 1991. **143**: p. 103.
94. Hannah Bamnolker ,Sigalit Gura , Shlomo Margel, *New solid and hollow, magnetic and non-magnetic, organic- inorganic monodispersed hybrid microspheres: synthesis and characterization*. J.Mater.Sci.Lett, 1997(16): p. 1412-1415.
95. Caruso, F., M.; Susha, A. Giersig, M. Caruso, R. A., *Magnetic Nanocomposite Particles and Hollow Spheres Constructed by a Sequential Layering Approach*. Chem. Mater. and all articles therein . 2001. **13**: p. 109-116.
96. Caruso, F., R. A. Mohwald, H., *Production of Hollow Microspheres from a no structured Composite Particles*. Chem. Mater. and all articles therein . 1999. **11**: p. 3309-3314.
97. Frank Caruso, R.A.C., and Helmuth Möhwald, *Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating*. Science, 1998. **282**: p. 1111-1114.
98. Iskandar, F. Mikrajuddin, Okuyama K.; *In Situ Production of Spherical Silica Particles Containing Self-Organized Mesopores*. Nano Lett, 2001. **1**: p. 231-234.
99. Z. Niu, Z.Y., Z. Hu, Y. Lu, C.C. Han, *Polyaniline-Silica Composite Conductive Capsules and Hollow Spheres*. Advanced Functional Materials, 2003. **13**(12): p. 949-954.
100. Ren, L., et al., *Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2002. **23**(24): p. 4765-4773.

101. Coradin, T., O. Durupthy, and J. Livage, *Interactions of amino-containing peptides with sodium silicate and colloidal silica: A biomimetic approach of silicification*. Langmuir, 2002. **18**(6): p. 2331-2336.
102. Coradin, T. and J. Livage, *Effect of some amino acids and peptides on silicic acid polymerization*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001. **21**(4): p. 329-336.
103. Coradin, T., A. Coupe, and J. Livage, *Interactions of bovine serum albumin and lysozyme with sodium silicate solutions*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **29**(2-3): p. 189-196.
104. K. J. C. van Bommel, J.H.J., S. Shinkai, *Poly(L-lysine) Aggregates as Templates for the Formation of Hollow Silica Spheres*. advanced materials, 2001. **13**(19): p. 1472 - 1476.
105. Siddharth V. Patwardhan, N.M., Miriam Steinitz-Kannanb and Stephen J. Clarson, *Bioinspired synthesis of new silica structures*. CHEM. COMMUN., 2003: p. 1122–1123.
106. Siddharth V. Patwardhan, N.M., and Stephen J. Clarson, *The Use of Poly-l-Lysine to Form Novel Silica Morphologies and the Role of Polypeptides in Biosilicification*. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers,, 2001. **11**(3): p. 193-198.
107. Siddharth V. Patwardhan, S.J.Clarson., *Silicification and Biosilicification. Part 6. Poly-L-Histidine Mediated Synthesis of Silica at Neutral pH*. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers, 2003. **13**(1): p. 49-53.
108. Siddharth V. Patwardhan and Stephen J. Clarson, *Silicification and Biosilicification Part 7: Poly-L-Arginine Mediated Bioinspired Synthesis of Silica*. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers, 2003. **13**(4): p. 193-203.
109. Clarson, Siddharth.V.Patwardhan., *Silicification and Biosilicification, Part 4. Effect of Template Size on the Formation of Silica*. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers, 2002. **12**: p. 109-116.
110. Clarson, J. Siddharth, V. Patwardhan, Stephen *Silicification and biosilicification Part 3. The role of synthetic polymers and polypeptides at neutral pH*. Silicon Chemistry, 2002. **1**: p. 207-214.
111. Almqvist, N., et al., *Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials I*. Materials Science and Engineering: C, 1999. **7**(1): p. 37-43.
112. kjeld j.c. van bommel, a.f., andseiji shinkai, *organic templates for the generation of inorganic materials*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2003. **42**: p. 980.
113. Carole C. Perry, Tracey Keeling-Tucker., *Biosilicification: the role of the organic matrix in structure control*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2000. **5**: p. 537.
114. jenifer Cha, Salen D. Stucky, Daniel E. Morse, *biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides*. Nature, 2000. **403**: p. 289.
115. nils kroger, manfred sumper, *polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation*. science, 1999. **286**: p. 1129.
116. yurii A. shchipunov, Tat'yana N.Zvyagintseva, *A new precursor for the immobilization of enzymes inside sol-gel-derived hybrid silica nanocomposites containing polysaccharides*. biochemical and biophysical methods, 2004. **58**: p. 25-38.
117. T. Coradin, J.Livage, *synthesis and characterisation of alginate/silica biocomposite*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2003. **26**: p. 1165-1168.

118. Sakai, S., et al., *In vitro and in vivo evaluation of alginate/sol-gel synthesized aminopropyl-silicate/alginate membrane for bioartificial pancreas*. Biomaterials, 2002. **23**(21): p. 4177-4183.
119. Sakai, S., et al., *Permeability of alginate/sol-gel synthesized aminopropyl-silicate/alginate membrane templated by calcium-alginate gel*. Journal of Membrane Science, 2002. **205**(1-2): p. 183-189.
120. Sakai, S., et al., *Aminopropyl-silicate membrane for microcapsule-shaped bioartificial organs: control of molecular permeability*. Journal of Membrane Science, 2002. **202**(1-2): p. 73-80.
121. Sakai, S., et al., *Synthesis and transport characterization of alginate/aminopropyl-silicate/alginate microcapsule: application to bioartificial pancreas*. Biomaterials, 2001. **22**(21): p. 2827-2834.
122. Sakai, S., et al., *MIN6 cells-enclosing aminopropyl-silicate membrane templated by alginate gels differences in guluronic acid content*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **270**(1-2): p. 65-73.
123. Carturan, Boninsegna S., Dal Toso R, R., Dal Monte, G., *Alginate Microspheres Loaded with Animal Cells and Coated by a Siliceous Layer*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2003. **26**: p. 1151-1157.
124. V. Pedroni, P.C.S., M. E. Gschaidner de Ferreira, M. A. Morini., *A chitosan-templated monolithic siliceous mesoporous-macroporous material*. Colloid & Polymer Science, 2000. **278**: p. 964-971.
125. Ogasawara W, .Shenton W.; Davis S. A., Mann S., *Template Mineralization of Ordered Macroporous Chitin-Silica Composites Using a Cuttlebone-Derived Organic Matrix*. Chem. Mater., 2000. **12**(10): p. 2835-2837.
126. Claudio Airoidi, Oyrton A.C., Monteiro j *Chitosan-organosilane hybrids - Syntheses, characterization, copper adsorption, and enzyme immobilization*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **77**(4): p. 797-804.
127. Wang, G., et al., *Amperometric hydrogen peroxide biosensor with sol-gel/chitosan network-like film as immobilization matrix*. Biosensors and Bioelectronics, 2003. **18**(4): p. 335-343.
128. Miao, Y. and S.N. Tan, *Amperometric hydrogen peroxide biosensor with silica sol-gel/chitosan film as immobilization matrix\*1*. Analytica Chimica Acta, 2001. **437**(1): p. 87-93.
129. Ayers, M.R. and A.J. Hunt, *Synthesis and properties of chitosan-silica hybrid aerogels*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2001. **285**(1-3): p. 123-127.
130. Shchipunov, Y.A., *Sol-gel-derived biomaterials of silica and carrageenans*. Journal of Colloid and Interface Science, 2003. **268**(1): p. 68-76.
131. T. Coradin, E.M., L. Linsnard, J. Livage, *Design of silica-coated microcapsules for bioencapsulation*. Chem. Commun., 2001: p. 2496-2497.
132. S. Brunauer, L.S.D., W.E. Deming, and E. Teller, *On a theory of the van der waals adsorption of gases*. Journal of the american chemical society, 1940. **62**: p. 1723-1732.
133. S. Brunauer, P.H.E., and E. Teller, Journal of the American Chemical Society, 1938. **60**: p. 309.
134. L. Jelinek and E.S. Kovats, *True surface areas from nitrogen adsorption experiments*. Langmuir, 1994. **10**: p. 4225-4231.
135. S.J. Gregg and K.S.W. Sing, *Adsorption, surface area, and porosity*. Academic Press, London,, 1982.

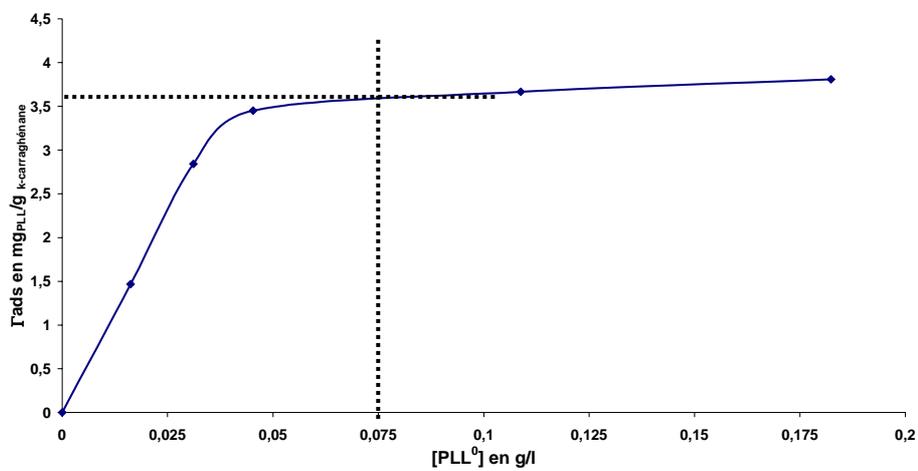
136. Martin, t., *Maîtrise de la morphologie et des propriétés de surface de silice mésoporeuse ordonnée*. thèse Ecole nationale supérieure de chimie de Montpellier, 2002.
137. Tanaka, T., Sun S.T., Hirokawa Y., Katayama S., *Mechanical instability of gels at the phase transition*. nature, 1987. **325**: p. 796-798.
138. Girod, S., Boissière, M. et al., *Polyelectrolyte complex formation between iota-carrageenan and poly(-lysine) in dilute aqueous solutions: a spectroscopic and conformational study*. Carbohydrate Polymers, 2004. **55**(1): p. 37-45.

# **ANNEXES**

## V. ANNEXES

### Annexe A

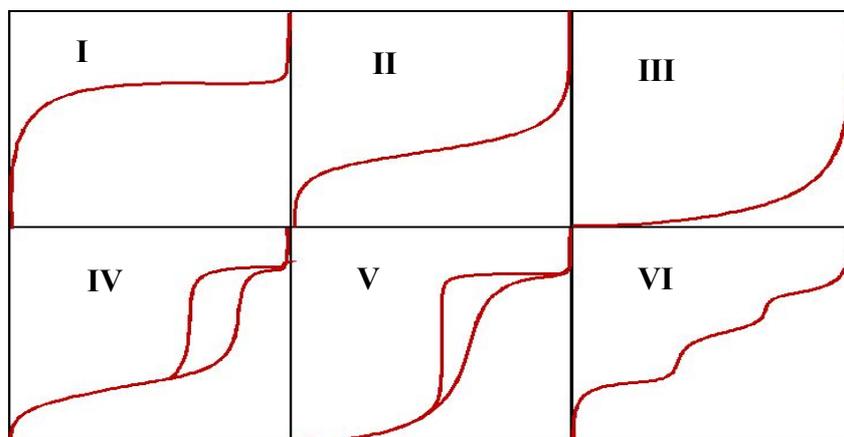
Isotherme d'adsorption à 25°C de poly-L-lysine 15-30 kD sur des billes de k-carraghénane.



Cette isotherme a été établie par déplétion dans des conditions similaires à l'opération de recouvrement des microsphères de k-carraghénane utilisées pour la synthèse des matériaux hybrides.

## Annexe B

### 1 Les différentes isothermes de physisorption :



I : Echantillon microporeux (pores  $< 2$  nm)

II : Adsorbant macroporeux. La déposition de multicouches suit l'adsorption de la monocouche.

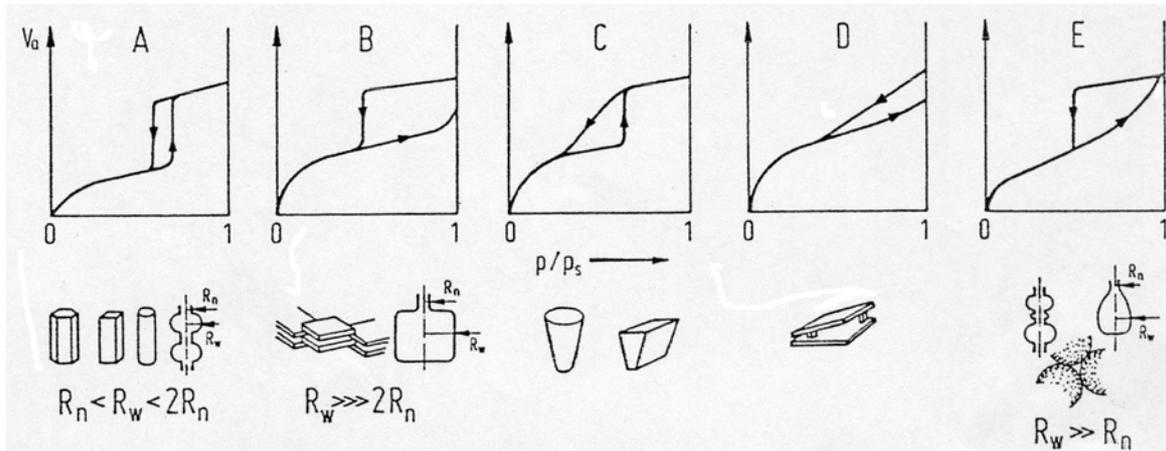
III : Adsorbant macroporeux avec faible interaction avec l'adsorbât ( $C < 20$ ).

IV : Echantillon mésoporeux : monocouche, multicouche et condensation capillaire.

V : Echantillon mésoporeux avec faible interaction avec adsorbât-adsorbant.

VI : Adsorption multicouche par paliers sur surface très uniformes (Ex : Kryton sur graphite).

## 2 Les différents types d'hystérésis dans les isothermes d'adsorption/désorption selon De Boer :



A : Pores cylindriques. Les deux branches de l'isotherme seront plus rapprochées quand le diamètre des pores est plus uniforme ( $R_n \cong R_w$ ).

B : Pores type « boîte à lettre », entre plaques parallèles.

C : Pores coniques

D : Pores entre plaques non parallèles.

E : Pores type « col de bouteille » ou cavité entre sphères empilées.

3 Les différents types d'hystérésis dans les isothermes d'absorption/désorption selon l'IUPAC :

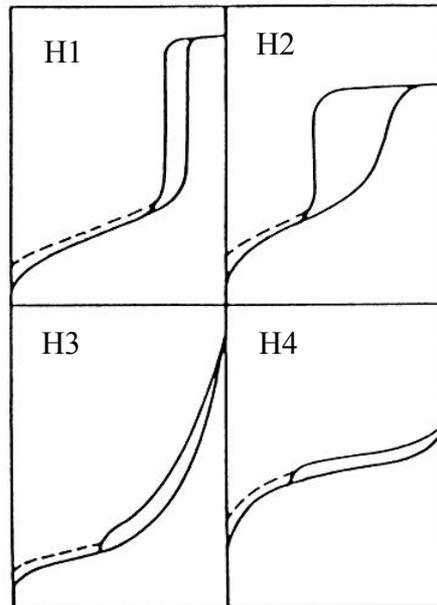


Figure 76 : les 4 types d'hystérésis classés par l'IUPAC en 1985

# **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

Figure 1 : méthode de fabrication des microsphères. [1] .....	4
Figure 2 : différents procédés de fabrication de particules en fonction de leur gamme de taille et de leur cinétique. [1].....	6
Figure 3 : illustration schématique des différents objets présents dans le milieu de polymérisation : M, micelles contenant des monomères ; S, micelles ; N, molécules de polymère ; L, particules en croissance ; •, monomères ; $\bullet$ , macroradicals en croissance. [1].....	8
Figure 4 : exemples de particules obtenues par précipitation polymérisation. A, 30 min de polymérisation ; B, 60 min de polymérisation. [1].....	9
Figure 5 méthodes pour la fabrication de microsphères par polycondensation hétérogène [1] .....	13
Figure 6 : procédés sol-gel pour la préparation de particules siliciques. [1].....	14
Figure 7 : schéma de fabrication de microsphères de Ca-alginate-SiO <sub>2</sub> [13].....	17
Figure 8 : Modèles de gélification par jonctions ponctuelles (a) (gels chimiques) et par zones de jonction(b) (gels physiques). [37].....	23
Figure 9 : Structure chimique des iota (a) et des kappa (b) carraghénanes dont le motif de répétition (AB) <sub>n</sub> est un disaccharide [37] .....	27
Figure 10: Enroulement des chaînes de kappa (a) et de iota (b) carraghénanes sous de doubles hélices droites forme d'hélices droites. [43].....	28
Figure 11: Dépendance en température du pouvoir rotatoire d'oligomères ou de polymère de carraghénanes en présence de 2,5 mol/l de KCl (Les nombres notés près des courbes représentent les degrés de polymérisation des échantillons) [47].....	31
Figure 12: Diagramme de phase des kappa carraghénanes établi à partir de la température de transition conformationnelle et de la concentration totale en potassium libre [52]32	
Figure 13: Variation de la température de gélification avec la concentration en contre-ion potassium libre pour les kappa et les iota carraghénanes [52] .....	33
Figure 14 : Principaux modèles proposés pour la gélification des carraghénanes : (a) modèle d'association de doubles hélices de Rees [41, 50, 56] (b) modèle d'association de simples hélices de Smidrod [55].....	34
Figure 15: formation de ponts intramoléculaires spécifiques de certains cations le long des chaînes de carraghénanes en solution aqueuse à basse température: (a) cas des kappa carraghénanes en présence d'ions potassium ; (b) cas des iota carraghénanes en	

présence d'ions calcium - les pointillés (....) figurent les liaisons de type ionique et les tirets (----) les forces d'attraction électrostatique [60].....	36
Figure 16 : Influence des ions sur la force des gels de carraghénanes [51] .....	40
Figure 18: influence du pH sur les vitesses d'hydrolyse et de condensation d'alkoxydes de silice et de dissolution de silice. La vitesse de condensation est reportée comme l'inverse du temps de formation de gel. [90, 91].....	46
Figure 19: mécanismes de polymérisation de la silice en solution aqueuse selon les conditions expérimentales utilisées [93] .....	49
Figure 20 : schéma de synthèse de nanoparticules hybrides de polystyrène/Si(OMe) <sub>4</sub> par miniémulsion [95]. .....	51
Figure 21 : illustration de la procédure pour la préparation de sphères hybrides ( PDADMAC = poly(diallyldiméthylammonium chloride) ) [100]. .....	51
Figure 22 : formation de particules de silices mésoporeuses et image MEB des particules de silice obtenues [101]. .....	51
Figure 23 : représentation schématique de la préparation de capsules hybrides de polyaniline/silice et de sphères creuses de silice [102]. .....	52
Figure 24 : illustration schématique de modèles de gélification et de floculation (a) gélification pour un mélange de silicate/Poly-L-Lysine , (b) floculation pour un mélange Ludox/Poly-L-Lysine.....	54
Figure 25 : agrégats de particules sphériques et hexagonales issue de biosilification en présence de PLL [109].....	55
Figure 26 : schéma représentatif des interactions électrostatique entre l'alginate et l'aminopropyl-silicate [121]. .....	56
Figure 27 schéma de fabrication des capsules de Ca-alginate + SiO <sub>2</sub> [126]. .....	57
Figure 28 : a) structure spongieuse en feuillets parallèles de l'os de seiche ; b) structure macroporeuse de la réplique silicique. [128].....	58
Figure 29 : représentation schématique du pontage covalent du glutaraldéhyde entre le chitosan et l'orgnosilane [129]. .....	58
Figure 30 : image du réseau de fibres issu de l'aérogel du biocomposite à base de 0,5% de $\kappa$ -carraghénane et de silice [133]. .....	60
Figure 31 : représentation schématique étape par étape de la formation des billes creuses [134]. .....	61
Figure 32 : principe de la microscopie électronique à balayage et microanalyse (EDX) ..	63
Figure 33 : Formule développée de deux monomères de $\kappa$ -carraghénane.....	64

Figure 34 : Processus de fluorescence.....	68
Figure 35 : spectres d'excitation et d'émission de trois marqueurs fluorescents.....	69
Figure 36 : a) formule de la fluorescéine 5-isothiocyanate FITC et b) formule de la Tetraethylrhodamine.....	69
Figure 37 : différence entre la microscopie à fluorescence canonique et la microscopie confocale.....	70
Figure 38 : tache de AIRY	
Figure 39 : Schéma de principe du confocal .....	71
Figure 40 : isotherme d'adsorption/désorption d'azote à 77 K typique de microsphères..	72
Figure 41 : Courbe $t$ de microsphères hybrides calculée avec le modèle FHH modifié. ...	76
Figure 42 : Analyse thermogravimétrique de microsphères hybrides (perte de masse TG en noir et dérivée DTG en bleue).....	79
Figure 43: Schéma du microencapsulator (inotech, SUISSE).....	82
Figure 44: schéma du principe du séchage en milieu CO <sub>2</sub> super-critique.....	84
Figure 45 : photographie de l'autoclave Critical point drier de polaron utilisé pour le séchage en milieu CO <sub>2</sub> super-critique. ....	85
Figure 46 : histogramme représentant la distribution de taille en nombre des différentes particules sèches. ....	90
Figure 47 : isothermes d'adsorption d'azote à 77 K sur les deux types de microsphères..	91
Figure 48 : photos illustrant les cinétiques de gonflement des différentes microsphères. .	92
Figure 49 : courbes illustrant le gonflement des microsphères après séchage en milieu aqueux en fonction du temps.....	92
Figure 50 : clichés de microscopie électronique à balayage. ....	89
Figure 51 : clichés de microscopie électronique à balayage. a) vue générale d'une microsphère de $\kappa$ -carraghénane ayant subi un recouvrement de PLL ; b) agrandissement d'une zone du cliché (a).....	93
Figure 52 : image d'une microsphère de $\kappa$ -carraghénane recouverte de PLL marquée FITC. $\lambda_{ex} = 494 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 519 \text{ nm}$ .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 53 : a) images des plans confocaux de 1 $\mu\text{m}$ d'une microsphère de $\kappa$ -carraghénane avec recouvrement de la surface par de la PLL marquée en FITC ; b) image du cumul de tous les plans confocaux. $\lambda_{ex} = 494 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 519 \text{ nm}$ . ....	95
Figure 54 : courbes illustrant le gonflement des microsphères après séchage en milieu aqueux en fonction du temps.....	96

Figure 55 : isothermes d'adsorption d'azote à 77 k .....	94
Figure 56 Schéma du modèle d'agitation par rotation .....	101
Figure 57 : thermogramme d'hybride élaboré à partir de billes de k-carraghénane et de TEOS.....	110
Figure 58 : illustration schématique des deux voies de synthèses d'hybrides. ....	117
Figure 59 : Effet du rapport TEOS/eau sur la composition des matériaux hybrides.....	119
Figure 60 : pourcentage massique d'eau contenue dans les hybrides en fonction du rapport TEOS/k-carra introduit dans le milieu réactionnel. (catalyseur NaF). <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
Figure 61 : taux de silice au sein de l'hybride en fonction du rapport TEOS/k-carra introduit dans le milieu réactionnel. (catalyseur NaF). .... <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
Figure 62 : pourcentage massique d'eau contenue dans les hybrides en fonction du rapport TEOS/ $\kappa$ -carra introduit dans le milieu réactionnel (catalyseurs - ■ KF ■ NaF).....	121
Figure 63 : taux de silice au sein de l'hybride en fonction du rapport TEOS/k-carra introduit dans le milieu réactionnel (catalyseurs - ■ KF ■ NaF) .....	122
Figure 64 : pourcentage massique d'eau contenue dans les hybrides en fonction du rapport TEOS/k-carra introduit dans le milieu réactionnel. (catalyseurs - ■ KF , ▲ NaF en milieu KCl et ■ NaF seul )......	124
Figure 65 : taux de silice au sein de l'hybride en fonction du rapport TEOS/k-carra introduit dans le milieu réactionnel (catalyseurs - ■ KF , ▲ NaF en milieu KCl et ■ NaF seul ). .....	124
Figure 66 : pourcentage molaire en Silice en fonction de la distance au cœur de la microsphère relative à la taille de celle-ci . (catalyseur NaF). .....	126
Figure 67 : pourcentage molaire en Silice en fonction de la distance au cœur de la microsphère relative à la taille de celle-ci . (catalyseur KF). .....	126
Figure 68 : : pourcentage molaire en Silice en fonction de la distance au cœur de la microsphère relative à la taille de celle-ci . (catalyseur NaF en milieu KCl).....	127
Figure 69 : a) plans confocaux ; b) superposition des plans confocaux.....	136
Figure 70 : pourcentage molaire de silice en fonction de la localisation .....	137

Tableau 1 : Techniques d'étude des hydrogels.....	25
Tableau 3 : récapitulation des principales caractéristiques des microsphères sèches. ....	97
Tableau 4 : illustration des différences morphologiques de microsphères hybrides élaborées par deux types d'agitation à partir de billes de k-carraghénane et de deux précurseurs siliciques.....	103
Tableau 5 : illustration des différences morphologiques de microsphères hybrides calcinées à 550°C, élaborées par deux types d'agitation à partir de billes de k-carraghénane et de deux précurseurs siliciques.....	105
Tableau 6 : illustration des différences morphologiques de microsphères hybrides élaborées par deux types d'agitation à partir de billes de k-carraghénane recouvertes de PLL et de deux précurseurs siliciques. ....	106
Tableau 7 : illustration des différences morphologiques de microsphères hybrides calcinées à 550°C, élaborées par deux types d'agitation à partir de billes de k-carraghénane recouvertes de PLL et de deux précurseurs siliciques. ....	108
Tableau 8 : récapitulatif des principales caractéristiques morphologiques des particules hybrides avant et après calcination en fonction du type d'agitation. ....	109
Tableau 9 : récapitulation du taux de matière organique dans les matériaux hybrides en fonction du type d'agitation.....	111
Tableau 10 : a) isotherme d'adsorption/désorption d'azote à 77 K de microsphères hybrides préparées à partir de TEOS et de microsphères de k-carraghénane ; b) courbe BET ; c) courbe t-plot calculée par FHH modifiée. ....	113
Tableau 11 récapitulation des surfaces spécifiques calculées par la théorie BET et par le t-plot de chaque type d'hybride .....	114
Tableau 12 : proportions de chaque constituant des mélanges réactionnels utilisés pour la synthèse d'hybrides. ....	118
Tableau 13 : résultats d'analyses thermogravimétriques en fonction des proportions de chaque réactif présent dans le milieu réactionnel catalysé par NaF.....	120
Tableau 14 : proportions de réactifs présents dans le milieu.....	118
Tableau 15 : résultats d'analyses thermogravimétriques en fonction des proportions de chaque réactif présent dans le milieu réactionnel catalysé par KF.....	121
Tableau 16 : proportions de réactifs présents dans le milieu.....	123
Tableau 17 : résultats d'analyses thermogravimétriques en fonction des proportions de chaque réactif présent dans le milieu réactionnel catalysé par NaF en milieu KCl. ....	123

Tableau 18 : clichés de microscopie électronique à balayage de microsphères issue de différents rapports TEOS/Eau. (catalyseur NaF).....	128
Tableau 19 : taille moyenne des microsphères hybrides en fonction du rapport SiO <sub>2</sub> /k-carra .....	129
Tableau 20 : surface spécifique des microsphères hybrides en fonction du rapport SiO <sub>2</sub> /k-carra .....	130
Tableau 21: proportion de chaque constituant du milieu réactionnel.....	132
Tableau 22 : clichés de microscopie optique.....	132
Tableau 23 : clichés de microscopie électronique à balayage.....	133

