



HAL
open science

Adhésifs bio-inspirés : synthèse et caractérisation d'hydrogels biocompatibles à base de gélatine et de composés phénoliques

Florence Back

► **To cite this version:**

Florence Back. Adhésifs bio-inspirés : synthèse et caractérisation d'hydrogels biocompatibles à base de gélatine et de composés phénoliques. Chimie théorique et/ou physique. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAE029 . tel-04095019

HAL Id: tel-04095019

<https://theses.hal.science/tel-04095019v1>

Submitted on 11 May 2023

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.

ÉCOLE DOCTORALE ED 182 Physique et Chimie-Physique

UMRS 1121

THÈSE présentée par :

Florence BACK

soutenue le : 15 Novembre 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie-Physique

**Adhésifs bio-inspirés : synthèse et
caractérisation d'hydrogels
biocompatibles à base de gélatine et de
composés phénoliques**

THÈSE dirigée par :

M. BALL Vincent

Professeur, Université de Strasbourg

M. ARNTZ Youri

MCF HDR, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. NARDIN Corinne

Professeure, Université de Pau

Mme. MONTERO Véronique

MCF HDR, Université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. BOUCHER Philippe

Professeur, Université de Strasbourg

Mme. PAEZ Julieta

MCF HDR, Université de Twente

• Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à la faculté dentaire de Strasbourg, au sein de l'unité de recherche INSERM UMRS 1121.

Je tiens à remercier la Professeure Corinne Nardin ainsi que la Maître de conférences Véronique Montéro pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

J'adresse mes respectueux remerciements au Professeur Philippe Boucher ainsi qu'au Maître de conférences Julieta I. Paez pour leur participation au Jury de la présente thèse. Je remercie mes directeurs de thèses, le Maître de conférence Youri Arntz et le Professeur Vincent Ball ainsi que le directeur et sous-directeur du laboratoire, le Professeur Pierre Schaaf et le Docteur Philippe Lavalle.

Je désire tout particulièrement remercier le Professeur Florent Meyer, Christine Affolter-Zbaraszczuk, Lauriane Petit, ainsi que la Docteure Varvara Gribova pour la formation en culture cellulaire ainsi que pour le temps et les réponses qu'ils m'ont apportés. Je remercie la Docteure Morgane Rabineau pour la formation sur le Keyence ainsi que la Docteure Delphine Garnier pour l'accès et la formation aux spectroscopes de la faculté de pharmacie. Je remercie le Docteur Bernard Senger pour toutes les conversations que nous avons pu avoir. Je remercie le Docteur Marc Schmutz et le Docteur Alain Carvalho de l'Institut Charles Sadron pour les fabuleuses images de CryoSEM. Je remercie l'ensemble du personnel de la faculté dentaire et du CRBS. Je remercie le Docteur Guillaume Prunières pour nos instants passés ensemble ainsi que la professeure Nadia Bahlouli.

Merci à ma « dreamteam » pour tous les échanges scientifiques et pour les moments passés, Leyla Kocgozul, Cosette Betscha, Eric Mathieu, Haseeb Iqbal, Zulal Ugur, Sabrina Bahloul, Nour-Ouda Benzaami, Adil Ahmad, Anne-Marie Séné, Pascale Jung et Aurélie Sassenhoff.

Je remercie toute ma famille pour leur soutien et pour leur présence, Titi, Jade, Fred, Bibiche, Soso, Kiki, Roro, Manu, Minou, Mouton, Doudou, Parrain, Rémy et ma maman Christine.

Une pensée toute particulière à tous ceux qui me manquent, Marie-Hélène, Titoune, mon petit papi, ma petite mamie ainsi qu'à mon papa.

Je remercie tout particulièrement une petite partie des maîtres de cette planète, Gizmo, Noumi, Nox, Coussineux, Trigger et Mirza ainsi que les poulets pour le don de leur personne durant les manipulations de traction sur le muscle.

A mon petit poussin...

La contingence n'est que l'ignorance où nous sommes du chemin, chemin que nous suivons nécessairement. De Baruch Spinoza.

Adhésifs bio-inspirés : synthèse et caractérisation d'hydrogels biocompatibles à base de gélatine et de composés phénoliques

Résumé

Actuellement, les colles chirurgicales ne sont pas utilisées pour remplacer les sutures. Elles sont utilisées en compléments des sutures en tant qu'agent hémostatique, antibactérien ou antifongique par exemple. Le grand défi est alors de pouvoir synthétiser une colle non-cytotoxique fortement adhésive et peu chère. En raison des nombreux attributs de la gélatine, les gels qui en contiennent présentent un intérêt quasi constant dans le domaine de la recherche sur les biomatériaux. La gélatine est un matériau biosourcé, biocompatible, biodégradable, peu coûteux, réticulable, facile à produire et à utiliser. Elle est très polyvalente et peut être utilisée dans différentes gammes de pH. En tant qu'hydrogel, la gélatine est capable de former un échafaudage qui peut remplacer la matrice extracellulaire native, permettant ainsi le transport de nutriments, de cellules ou de médicaments. Le caractère facilement biodégradable de la gélatine est corrélatif d'une certaine faiblesse, tant au niveau de l'adhésion que de la rigidité. Dans le cadre de son utilisation en tant qu'adhésif, la réticulation du matériau est nécessaire. La présente thèse concerne l'étude d'hydrogels chimiquement réticulés via le mécanisme régiosélectif et rapide de l'addition de Michael. Les agents de réticulation utilisés sont des molécules de catéchol et de dopamine. Elles font partie de la liste des petites molécules capables de réticuler les hydrogels naturels, dont la caractéristique nécessaire est de posséder au moins deux sites de réticulation fonctionnels [5]. L'objectif principal de cette thèse repose sur la création d'un adhésif chirurgical viable qui soit compétitif en termes de propriétés mécaniques, en termes de propriétés biologiques ainsi qu'en termes de praticité. En termes de propriétés mécaniques il est nécessaire d'obtenir un adhésif capable d'adhérer sur toutes les surfaces (inorganiques, organiques) et dans tous les milieux (aqueux, ioniques, secs). L'adhésion doit être forte sur les tissus. En termes de propriétés biologiques, la non-cytotoxicité est la condition *sine qua non* de son utilisation sur les tissus vivants. La praticité de l'adhésif (la synthèse, durée de gélification, facilité de manipulation par le chirurgien) est un élément nécessaire à des possibles applications médicales. Pour se faire, nous avons dans un premier temps optimisé les concentrations de tous les composants de l'adhésif, à basse concentration en gélatine. Dans ce cadre nous avons notamment comparé les propriétés des agents réticulants comme la dopamine, le catéchol et le Pyrogallol (PARTIE III). Dans un second temps, (PARTIE IV) nous avons procédé à des expériences ayant pour but de rendre viable l'adhésif en termes de propriétés biologiques (cytotoxicité, caractère fongicide, dégradation) et mécaniques (rhéologie sur acier inoxydable et tests de traction sur des muscles de poulets). La première partie concerne les théories et l'état de l'art (PARTIE I), la seconde partie porte sur les matériels et méthodes (PARTIE II). La partie 1 aborde l'état de l'art des adhésifs chirurgicaux et des hydrogels pouvant être utilisés comme adhésifs, les théories de l'adhésion et de l'adhérence. La partie 2 fera état des

réactifs utilisés en chimie et en biologie et abordera la synthèse des adhésifs, des principaux instruments utilisés (rhéomètre, spectrophotomètres et microscopes) ainsi que des méthodes de caractérisation.

Mots clefs : Hydrogels, gélatine, catéchol, dopamine, adhésif, biocompatible, rhéologie

Résumé en anglais

Currently, surgical adhesives are not used to replace sutures. They are used as a complement to sutures as a hemostatic, antibacterial or antifungal agent for example. The great challenge is to be able to synthesize a non-cytotoxic, highly adhesive and inexpensive adhesive. Because of the many attributes of gelatin, gels containing it are of almost constant interest in the field of biomaterials research. Gelatin is a biosourced, biocompatible, biodegradable, inexpensive, cross-linkable, easy to produce and easy to use material. It is very versatile and can be used in different pH ranges. As a hydrogel, gelatin can form a scaffold that can replace the native extracellular matrix, allowing the transport of nutrients, cells or drugs. The readily biodegradable nature of gelatin correlates with a certain weakness in both adhesion and rigidity. In the context of its use as an adhesive, the cross-linking of the material is necessary. The present thesis concerns the study of chemically cross-linked hydrogels via the regioselective and fast Michael addition mechanism. The cross-linking agents used are catechol and dopamine molecules. They belong to the list of small molecules capable of crosslinking natural hydrogels, whose necessary characteristic is to possess at least two functional crosslinking sites [5]. The main objective of this thesis is based on the creation of a viable surgical adhesive that is competitive in terms of mechanical properties, in terms of biological properties as well as in terms of practicality. In terms of mechanical properties, it is necessary to obtain an adhesive capable of adhering to all surfaces (inorganic, organic) and in all media (aqueous, ionic, dry). The adhesion must be strong on tissues. In terms of biological properties, non-cytotoxicity is the sine qua non for its use on living tissue. The practicality of the adhesive (synthesis, gelling time, ease of handling by the surgeon) is a necessary element for possible medical applications. To do this, we first optimized the concentrations of all the components of the adhesive, at low gelatin concentration. In this context, we compared the properties of cross-linking agents such as dopamine, catechol and Pyrogallol (PART III). In a second step (PART IV), we have carried out experiments aiming at making the adhesive viable in terms of biological (cytotoxicity, fungicidal character, degradation) and mechanical (rheology on stainless steel and tensile tests on chicken muscles) properties. The first part deals with theories and state of the art (PART I), the second part deals with materials and methods (PART II). Part 1 deals with the state of the art of surgical adhesives and hydrogels that can be used as adhesives, the theories of adhesion and adherence. Part 2 will report on the reagents used in chemistry and biology and will discuss the synthesis of adhesives, the main instruments used (rheometer, spectrophotometers and microscopes) as well as the characterization methods. **Key words:** Hydrogels, gelatin, catechol, dopamine, adhesive, biocompatible, rheology.

● Introduction

Actuellement, les colles chirurgicales ne viennent qu'en remplacement ponctuel des points de suture.

Les matériaux des fils de sutures peuvent être classés en deux catégories ; les résorbables ou non. La première catégorie regroupe, notamment, les sutures faites en boyaux de bétail, l'acide polyglycique (Dexon ; Syneture), le polyglactine 910 (Vicryl ; Ethicon), le polydioxanone (PDS ; Ethicon), le poly(triméthylène carbonate) (Maxon ; Syneture), le glycomère 631 (Biosyn ; Syneture), le polyglytone 6211 (Caprosyn ; Syneture), le poliglécaprone (Monocryl ; Ethicon).

Les avantages de tels fils sont nombreux (faciles à utiliser, réponse inflammatoire minime, pas d'opération de retrait des sutures, baisse de l'anxiété du patient...).

La seconde catégorie regroupe les matières telles que le coton, la soie, le nylon, le polypropylène... Ils sont résistants à la dégradation et sont les plus communément utilisés en chirurgie percutanée [1]. Un fil peut être tissé en mono ou multi-filaments. Le marché des points de suture mono-filament se chiffre à lui seul à plusieurs millions de dollars par année. Le type mono-filament atténue les réactions tissulaires et glisse facilement à travers les tissus. Cependant les désavantages ne sont pas moindres : potentiel de coupure du tissu, difficulté à tenir, haute rétention de la forme de la suture. Les multi-filaments sont faciles à tenir et permettent un nouage rapide mais, ils laissent des interstices qui sont source d'infection [1].

Bien entendu, il existe d'autres méthodes de fermeture des plaies que les fils comme l'agrafeuse, la fermeture éclair chirurgicale ou le laser. L'agrafeuse est couteuse (\$25/patient) et est inesthétique. La fermeture éclair devient inutile à forte pression, sur toute plaie humide ainsi que sur les patients obèses. Le laser altère la cicatrisation des plaies et nécessite une faible tension initiale [1].

Au vu des désavantages précédemment évoqués, la synthèse de nouvelles colles chirurgicales semble être une voie prometteuse. Les principales colles actuelles contiennent des aldéhydes et des cyanoacrylates qui ont une tenue forte mais leur dégradation enzymatique donne lieu à du relargage de formaldéhydes (mutagènes) [2]. Actuellement, les colles chirurgicales ne sont pas utilisées pour remplacer les sutures. Elles sont utilisées en compléments des sutures en tant qu'agent hémostatique, antibactérien ou antifongique par exemple.

Le grand défi est alors de pouvoir synthétiser une colle non-cytotoxique fortement adhésive et peu chère. En raison des nombreux attributs de la gélatine, les gels qui en contiennent présentent un intérêt quasi constant dans le domaine de la recherche sur les biomatériaux. La gélatine est un matériau biosourcé, biocompatible, biodégradable, peu coûteux, réticulable, facile à produire et à utiliser. Elle est très polyvalente et peut être utilisée dans différentes gammes de pH. En tant qu'hydrogel, la gélatine est capable de former un échafaudage qui peut remplacer la matrice extracellulaire native, permettant ainsi le transport de nutriments, de cellules ou de médicaments [3].

L'inconvénient majeur des hydrogels repose sur leur stockage. En effet ces derniers se dégradent dans le temps en condition humide ou après un regonflement *post*-lyophilisation [4]. Cependant, ils permettent une adhésion en milieu humide et pallient, de ce fait, au principal reproche fait aux colles chirurgicales.

Le caractère facilement biodégradable de la gélatine est corrélatif d'une certaine faiblesse, tant au niveau de l'adhésion que de la rigidité. Dans le cadre de son utilisation en tant qu'adhésif, la réticulation du matériau est nécessaire. La présente thèse concerne l'étude d'hydrogels chimiquement réticulés via le mécanisme régiosélectif et rapide de l'addition de Michael. Les agents de réticulation utilisés sont des molécules de catéchol et de dopamine. Elles font partie de la liste des petites molécules capables de réticuler les hydrogels naturels, dont la caractéristique nécessaire est de posséder au moins deux sites de réticulation fonctionnels [5]. Cette liste comprend des molécules telles que le glutaraldéhyde [6], les dérivés de la tyramine [7] ou la gènipine [8].

La grande majorité des opérations de réticulation est réalisée avant leur utilisation. Elles impliquent un temps de synthèse long (24h, gélatine + dopamine) [9–12]. Il existe très peu d'études sur les gels réticulés extemporanément [13–16]. La synthèse de nos hydrogels ne dure pas plus de 5 minutes et leur utilisation peut être

immédiate si les pourcentages en gélatine sont élevés ($\geq 60\%$ p/v). C'est une synthèse en 1 pot et 3 tirs (au maximum).

Par ailleurs, l'ajout de polyphénols tels que le catéchol ou la dopamine confère aux gels des propriétés antibactériennes et adhésives [17]. Les dérivés du catéchol tels que la dopamine sont capables de donner lieu à une adhésion dans l'eau et les milieux ioniques. Cette particularité a été découverte dans le byssus des moules. La protéine responsable de cette adhésion est composée de 20 à 30 % molaire de dopamine [18]. Le caractère adhésif a été attribué à des liaisons hydrogènes, des liaisons de coordination et des liaisons covalentes [19]. Notre adhésif contient une base de gélatine bovine, des composés phénoliques comme agents réticulants et du periodate de sodium (l'oxydant) qui est utilisé pour enclencher la réticulation de la gélatine via des additions de Michael et éventuellement, des bases de Schiff.

L'objectif principal de cette thèse repose sur la création d'un adhésif chirurgical viable qui soit compétitif en termes de propriétés mécaniques, en termes de propriétés biologiques ainsi qu'en termes de praticité. En termes de propriétés mécaniques il est nécessaire d'obtenir un adhésif capable d'adhérer sur toutes les surfaces (inorganiques, organiques) et dans tous les milieux (aqueux, ioniques, secs). L'adhésion doit être forte sur les tissus. En termes de propriétés biologiques, la non-cytotoxicité est la condition *sine qua non* de son utilisation sur les tissus vivants. La praticité de l'adhésif (la synthèse, durée de gélification, facilité de manipulation par le chirurgien) est un élément nécessaire à des possibles applications médicales.

Pour se faire, nous avons dans un premier temps optimisé les concentrations de tous les composants de l'adhésif, à basse concentration en gélatine. Dans ce cadre nous avons notamment comparé les propriétés des agents réticulants comme la dopamine, le catéchol et le Pyrogallol (PARTIE III). Dans un second temps, (PARTIE IV) nous avons procédé à des expériences ayant pour but de rendre viable l'adhésif en termes de propriétés biologiques (cytotoxicité, caractère fongicide, dégradation) et mécaniques (rhéologie sur acier inoxydable et tests de traction sur des muscles de poulets).

La première partie concerne les théories et l'état de l'art (PARTIE I), la seconde partie porte sur les matériels et méthodes (PARTIE II). La partie 1 aborde l'état de l'art des adhésifs chirurgicaux et des hydrogels pouvant être utilisés comme adhésifs, les théories de l'adhésion et de l'adhérence. La partie 2 fera état des réactifs utilisés en chimie et en biologie et abordera la synthèse des adhésifs, des principaux instruments utilisés (rhéomètre, spectrophotomètres et microscopes) ainsi que des méthodes de caractérisation.

Sauf abréviations des adhésifs/hydrogels, il ne sera pas utilisé d'abréviations récurrentes. Les abréviations ponctuelles seront immédiatement précisées.

Dans un but de simplification, les hydrogels adhésifs seront abrégés en fonction de leur composition. Soit :

- **G_x**, avec **G** pour la gélatine et **x** le pourcentage de gélatine en p/v ;
- **C_y, D_y, P_y**, avec **C**, le catéchol, **D**, la dopamine et **P**, le pyrogallol et **y** la quantité en mM ;
 - **N_y**, avec **N** le periodate de sodium et **y** la quantité en mM ;
- **A_x**, avec **A** la gomme arabique et **x** le pourcentage de gomme arabique en p/v.

- Sommaire

I.	Etat de l'art des adhésifs chirurgicaux, théories de l'adhésion et de l'adhérence	I-11
A.	Etat de l'art des adhésifs chirurgicaux	I-11
B.	Théories de l'adhésion et de l'adhérence.....	I-13
1.	Définitions et théories de l'adhésion	I-13
2.	Théories de l'adhérence	I-14
II.	Matériels et méthodes.....	II-16
A.	Réactifs et produits	II-17
1.	Chimie	II-17
a)	En pratique	II-17
b)	Présentation des hydrogels	II-17
c)	Présentation de la gélatine	II-17
d)	Présentation de la gomme arabique.....	II-21
2.	Biologie	II-21
3.	Préparations des adhésifs et des solutions.....	II-22
B.	Instruments	II-22
1.	Rhéomètre.....	II-22
a)	Les expériences de probe-tack.....	II-23
b)	Les expériences en cisaillement	II-25
2.	Spectrophotomètres.....	II-30
a)	UV-Vis.....	II-30
b)	FTIR-ATR.....	II-30
3.	Microscopes	II-30
a)	Numérique.....	II-30
b)	A Force Atomique	II-30
c)	Electronique à Balayage.....	II-32
C.	Méthodes de caractérisation	II-35
1.	Rhéologie	II-35
2.	Autocicatrisation manuelle.....	II-36
3.	Gonflements	II-36
a)	En pratique	II-36
b)	Théories	II-37
4.	Tests de viabilité.....	II-38
5.	Imagerie	II-39

III. Partie expérimentale 1 : optimisation des composants des adhésifs III-41

A. Optimisation préliminaire des concentrations en gélatine B (250 Bloom) et en periodate de sodium (NaIO_4) : 1 paramètre fixe contre 1 paramètre variable III-42

1. Cinétique de gélification III-42
 - a) Gélatine variable (6% \rightarrow 30% p/v) et **NaIO_4 fixe** (10 mM) III-42
 - b) NaIO_4 variable (10 mM \rightarrow 90 mM) et **gélatine fixe** (10% et 20% p/v) III-43
2. Balayage en température III-45
3. Caractérisations IR et UV-vis III-46
4. Conclusions/discussions III-49

B. Optimisation en concentration des réactifs des hydrogels (oxydants, composés phénoliques) : 2 paramètres fixes contre 1 paramètre variable III-50

1. NaIO_4 variable (10 mM \rightarrow 30 mM) et **gélatine + composés phénoliques** (catéchol/ pyrogallol) **fixes** (gélatine 10% p/v + 10 mM composés phénoliques) III-50
 - a) Mesures des modules de conservation (G') et de perte (G'') : cinétique de gélification III-50
 - b) Mesures de probe-tack : force (N) et énergie de rupture (J/m^2) III-52
 - c) Mesures d'autocicatrisation III-54
 - d) Balayage en température III-58
 - e) Gonflement III-59
 - f) AFM III-65
 - g) Conclusions/discussions III-66
2. Composés phénoliques (catéchol/ dopamine) variables (3,3 mM \rightarrow 100 mM) et **gélatine + NaIO_4 fixes** (gélatine 10% p/v + 10 mM NaIO_4) III-67
 - a) Mesures des modules de conservation (G') : cinétique de gélification III-67
 - b) Mesures de probe-tack : force et énergie de rupture III-69
 - c) Balayage en température III-70
 - d) Balayage en fréquence III-72
 - e) Caractérisation de la taille des pores par microscopie numérique et électronique III-74
 - f) Conclusions/discussions III-85

C. Caractérisations des composants des hydrogels par UV-vis et IR III-85

1. Hydrogels de pyrogallol III-86
2. Hydrogels de catéchol III-87
3. Hydrogels de dopamine III-90
4. Conclusions/discussions III-94

D. Conclusions/discussions : partie expérimentale 1 III-95

IV. Partie expérimentale 2 : synthèse et caractérisation d'une colle chirurgicale IV-97

A. Recherche de la formulation non-cytotoxique IV-97

1.	Détermination des IC ₅₀ du NaIO ₄ et du catéchol.....	IV-98
2.	Criblage MTT des hydrogels	IV-99
3.	Conclusions/discussions	IV-101
B.	Analyse rhéologique.....	IV-101
1.	Criblage probe-tack et adhésion (38°C, 100 µm/s, 15 et 5 minutes).....	IV-101
2.	Cinétique de gélification des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité.....	IV-104
3.	Balayage en température des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité.....	IV-104
4.	Adhésions (probe-tack, 25°C, 3h) à vitesses variables des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité IV-105	
5.	Conclusions.....	IV-117
C.	Imageries CryoSEM des colles biocompatibles	IV-119
D.	Etudes de la dégradation par hydrolyse des colles biocompatibles	122
E.	Recherche d'un candidat fongicide potentiel.....	126
F.	Essais en traction sur le muscle.....	127
G.	Analyse spectrale UV-vis des colles biocompatibles avec la gomme arabique	128
H.	Conclusions de la partie expérimentale 2.....	129
V.	Résumé des résultats.	131
VI.	Conclusions /discussions des parties expérimentales ..	133
A.	Les propriétés mécaniques des adhésifs en tant qu'adhésif chirurgical potentiel	133
B.	Les propriétés biologiques des adhésifs en tant qu'adhésif chirurgical potentiel	133
C.	La praticité de nos adhésifs chirurgicaux potentiels	135
VII.	Références.....	136

I. Etat de l'art des adhésifs chirurgicaux, théories de l'adhésion et de l'adhérence

Cette partie porte sur l'état de l'art des adhésifs pouvant être utilisés sur les tissus organiques (A). Il sera ensuite décrit les théories de l'adhésion et de l'adhérence (B).

A.	Etat de l'art des adhésifs chirurgicaux	I-11
B.	Théories de l'adhésion et de l'adhérence	I-13
1.	Définitions et théories de l'adhésion	I-13
2.	Théories de l'adhérence.....	I-14

A. Etat de l'art des adhésifs chirurgicaux

Actuellement, les adhésifs ne sont pas utilisés pour remplacer les colles chirurgicales. On les utilise en pratique pour fixer les implants et rattacher les tissus en compléments des sutures. Les colles chirurgicales ont des propriétés antibactériennes, antifongiques et hémostatiques qui les rendent indispensables aux opérations chirurgicales. La liste des opérations ou actes de chirurgies utilisant les colles chirurgicales n'a pas de caractère définitif puisque leur utilisation repose sur les besoins du moment des chirurgiens. Pour ce faire une idée, on peut citer pour exemple, la fixation de grilles entre les os de la colonne vertébrale dans les opérations d'hernies, le rattachement des tissus dans le Bypass, dans l'abdominoplastie, la laparotomie, la dissection axillaire, la mastectomie ou la dissection des aortes. Toutes les colles chirurgicales du marché ont des propriétés hémostatiques.

La Haute Autorité de Santé dans son rapport sur les agents hémostatiques de juin 2011 distingue les colles chirurgicales en fonction de l'origine du matériau utilisé. L'origine peut être humaine, synthétiques ou animale [20].

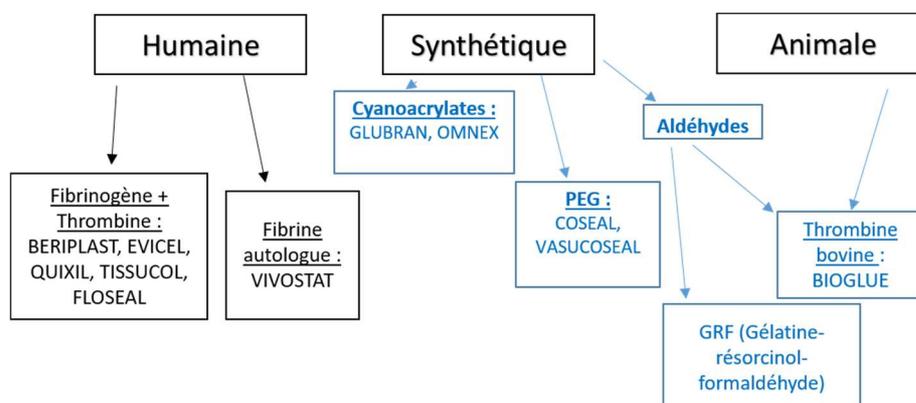


Figure I.1. Représentation schématique des colles recensées par la Haute Autorité de Santé.

Notre adhésif contient une base animale de gélatine b bovine et des agents réticulants de types composés phénoliques. Il rentre alors dans la catégorie des adhésifs mixtes d'origine animale et synthétique. Les adhésifs qui contiennent comme unique base de la gélatine et comme agents réticulants des composés phénoliques supposent

une synthèse longue (+24h) [11,12,21] avec l'ajouts d'autres composés comme des complexes de ruthénium [12] ou des ions ferriques [11,16]. Les complexes de ruthéniums sont chers à produire (225 euros le gramme, Sigma Aldrich) et les ions ferriques donnent lieu à la création de ROS (Reactive Oxygen Species) via la réaction de Fenton. Les ROS sont capables d'endommager l'ADN [22].

Tout comme dans le cadre de la présente thèse, Han *et al.* ont mis en place une synthèse inférieure à 5 minute en 1 pot et 3 tirs [16]. La gélatine étant un matériel trop mou, elle doit être réticulée pour être plus solide. Aussi, les auteurs ont utilisé à cet effet des ions ferriques et de la 2,3,4-trihydroxybenzaldéhyde (THB). Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisés comme agents réticulants des composés phénoliques comme le pyrogallol, le catéchol et la dopamine (chlorhydrate de dopamine). On peut comparer les adhésifs à base de gélatine et réticulés aux composés phénoliques en termes d'adhésion. Le **Tableau I.1** fait état des valeurs des contraintes à la rupture (kPa) des adhésifs à base de gélatine et réticulés avec des composés phénoliques. L'adhésif $G_{20}THB_{0,2}Fe_{16}$ signifie que la formulation contient 20% p/v de gélatine (G), 0.2 mM de THB et 16 mM d'ions ferriques (Fe). L'adhésif $G_{80}C_{13,33}N_{40}A_1$ a une formulation de 80% p/v de gélatine (G), 13,33 mM de catéchol (C), 40 mM de periodate de sodium (N) et 1% de gomme arabique (A).

	Conditions	kPa
Gowda et al.	Peau de porc 10 mm/min. Temps de durcissement (2h)	Lap shear 20 Tensile test 50
Liu et al.	Membrane d'œuf 40 mm/min. Pas d'indication de temps	Tensile test 77±1.5
Fan et al.	Peau de porc 1 mm/min. Temps de durcissement (2h)	Lap shear 24.7±3.3 peau huileuse
Han et al.	Peau de porc 50 mm/min. Temps de durcissement (2h) $G_{20}THB_{0,2}Fe_{16}$	Lap shear 56.5±4.4
Back et al.	Acier inoxydable 38°C 6 mm/min. Temps de durcissement (5 min.) $G_{80}C_{13,33}N_{40}A_1$	Probe-tack test 9.2

Tableau I.1. Valeurs des contraintes à la rupture (kPa) des adhésifs à base de gélatine et réticulés aux composés phénoliques

Le principal problème de ce tableau repose sur les différences des conditions d'évaluation des contraintes à la rupture. Elles ne sont jamais les mêmes. On peut également faire état des adhésifs comprenant d'autres matières telles que de la soie, des protéines, de la chitine, de l'alginate ou des polymères (**Tableau I.2**).

Adhésifs	Substrat	Contraintes à la rupture	Références
Soie + Dopamine	Aluminium	135±15 kPa	[23]
Mixte de protéines de <i>Mytilus edulis</i>	Peau de porc	0,33±0,17 MPa (24h, humidité 40%) 0,93±0,32 MPa (24h ; humidité 80%)	[24]
Copolymères avec partie anionique (groupes phosphates et dopamines) et partie cationique (groupes amines)	Os cortical	120kPa	[25]
Poly Acide ((3,4-dihydroxyphényl)(hydroxy)acétique) _x -co-((acide lactique) _{1-x})	Aluminium (sec) Aluminium (humide) Acie (sec) Teflon (humide)	2,6±0,4 MPa 1±0,3 MPa 1,7±0,5 MPa 0,32±0,05 MPa	[26]
4-arm PEG modifié avec catéchol et collagène + hydroxyapatite	Peau recouverte de sang	40 kPa	[27]

4-arm PEG + laponite + dopamine	Péricarde bovin	3,5±1,2 kPa 7,9±1,8 kPa	[28]
4-arm PEG modifié avec de la dopamine ou de la nitrodopamine	Péricarde bovin humide	Dopamine : pH 6,7 (1,8±0,2 kPa) pH 7,4 (8±1,5 kPa) Nitrodopamine pH 6,7 et 7,4 (4±1 kPa)	[29]
4-arm PEG modifié avec de la dopamine et avec liposomes	Peau de bœuf	35±12,5 kPa	[30]
Chitine modifiée avec du pyrogallol	Peau de bœuf	215 kPa	[31]
Gélatine modifiée avec du 2,3,4-trihydroxybenzaldéhyde	PMMA Fer Verre Peau de porc	136,7±1,4 kPa 147,3±6,3 kPa 92,9±7,4 kPa 56,5±4,4 kPa	[16]
2-uréido-4(3H) –pyrimidinone réticulé avec du poly-méthacrylate + dopamine	Péricarde bovin	122,4±42,4 kPa	[32]
Alginate modifiée avec catéchol	Titane et gencive	30±5 kPa	[33]
4-arm PEG modifié avec de l'acide tannique	Epiderme peau de porc	Avec NH ₂ : 0,17±0,01 MPa Avec OH : 0,13±0,01 MPa	[34]
Poly(N-vinylpyrrolidone) + acide tannique	Verre	3,71 MPa	[14]
Gélatine + catéchol + NaIO ₄	Acier inoxydable	Dopamine : 89±5 kPa Catéchol : 99±14 kPa	[35]
Gélatine + catéchol + NaIO ₄	Acier inoxydable	80±10 kPa	[36]

Tableau I.2. Valeurs des contraintes à la rupture des polymères modifiés avec des polyphénols ou mélangés avec des polyphénols [35].

Les deux dernières références concernent nos hydrogels à 10% p/v de gélatine b (250 Bloom) après 3h de gélification à 25°C. Le même reproche peut être fait pour ce tableau : les conditions d'obtention des valeurs varient en fonction des expériences et des auteurs.

B. Théories de l'adhésion et de l'adhérence

Cette partie comprend les définitions et théories de l'adhésion (1) et de l'adhérence (2).

1. Définitions et théories de l'adhésion

Les mots « colle » (gr. κόλλα) et « adhésif » (lat. *Adhaesivus*) sont employés comme synonymes de manière indifférente. Dans le langage technique, le mot « adhésif » sera plutôt employé pour les solides mous (adhésifs thermofusibles, adhésifs de structure) alors que le mot « colle » renvoie soit à un liquide (colle à solvant) soit à un solide mou (colle de structure). Toutes les colles et adhésifs sont des polymères [37].

J. Cognard distingue le concept « d'adhésion » de celui de « l'adhérence » [37]. Le premier fait état de l'ensemble des interactions qui se produisent au contact du solide et de l'adhésif. Le second est le résultat d'un essai de séparation.

Il existe plusieurs théories de l'adhésion qui plus ou moins se complètent :

La théorie du mouillage (thermodynamique) selon Schonhorn et Sharpe (1964) [38]. Selon cette théorie, il ne peut y avoir d'adhésion sans mouillage. Les interactions alors considérées sont principalement des liaisons faibles. J. Cognard relève que, sauf utilisations de surfactants et de solvants, les colles font un angle de contact fini avec la surface, et qu'à ce titre, le mouillage favorise l'adhésion mais, n'est pas une condition nécessaire.

La théorie des liaisons électrostatiques selon Derjaguin (1934 et 1967) [39,40]. Le contact liquide-solide (couches d'oxydes) donne lieu à une séparation de charges électriques dans l'interphase qui peut être comparé à un condensateur.

La théorie de l'interpénétration par diffusion moléculaire selon Voyutskii (1960) [41]. Elle s'applique aux polymères compatibles qui vont diffuser les uns dans les autres pour former une interface de liaisons faibles.

La théorie de l'ancrage mécanique selon McBain et Hopkins (1925) [42]. C'est l'interpénétration solide-liquide à l'image du plombage du dentiste. La diffusion dépend alors de facteurs tels que la viscosité, la taille des pores, la porosité, l'énergie de surface et la tension superficielle. Selon J. Cognard, la rugosité initiale favorise cette d'interpénétration par effet de pointe mais l'augmentation de la rugosité de la surface ne favorise pas forcément l'adhésion. Ce n'est pas la rugosité elle-même qui favorise l'adhésion mais bien la nature des interactions chimiques aux interfaces.

La théorie chimique selon Buchan et Rae (1946) [43]. L'adhésion serait principalement basée sur les liaisons de type iono-covalentes (liaisons fortes, jusqu'à 1000 kJ/mol, distance d'interaction entre atomes ~0,15 à 0,24 nm).

La théorie des facteurs multiplicatifs (rhéologique) selon Gent et Schultz (1972) [44]. Elle apporte une approche thermodynamique plus poussée en reliant l'énergie de fracture au travail thermodynamique d'adhésion et en prenant en compte les dissipations locales interfaciales et volumiques des matériaux.

L'étude de Bikerman (1968) ou « théorie de l'adhésion des couches de plus faible cohésion » [45]. Elle relève plus de la constatation que de la théorie. Il montre que les ruptures ont lieu systématiquement dans la couche où la force de cohésion est la plus faible et que les forces interfaciales sont toujours plus fortes que les forces de cohésion.

2. Théories de l'adhérence

J. Cognard fait état de théories ayant pour but d'expliquer la relation entre la vitesse de pelage et l'adhérence [37]. Elles reposent principalement sur l'influence du frottement entre les chaînes

Selon la théorie des connecteurs (Raphaël 1992), l'adhérence sur un solide provient de chaînes connectrices attachées à la surface du solide. La séparation des deux éléments suppose un détachement par « succion ». L'énergie libre ΔF_0 nécessaire à l'extraction d'une chaîne connectrice est la somme de deux termes. Son énergie superficielle γ_A et l'entropie de l'allongement de la chaîne [46].

A basse vitesse :

$$G_0 \cong \sigma_0 \cdot h_f \quad (1)$$

Avec σ_0 , la tension seuil de séparation et h_f la longueur de chaîne en pointe de fissure.

Au-delà d'une vitesse critique V_0 , les chaînes frottent sur celles qui les entourent et l'énergie de fracture G dépend de la vitesse.

$$G \cong G_0 \frac{v}{V_0} \quad (2)$$

Selon la théorie du clouage (Wool 1995), les connecteurs sont des clous qui relient l'adhésif au substrat. L'auteur arrive à la même conclusion que la théorie des connecteurs. « La viscosité de séparation est le produit du coefficient de frottement d'une chaîne de polymère par sa longueur et la densité des chaînes attachées » [47].

Les théories n'intègrent pas les variables de l'énergie d'adhérence G_0 en collage dit « fort » (>100 J/m²).

D'après les expériences d'A. Carré et J. Schultz (1984), l'énergie de fracture à vitesse nulle, G_0 , en collage fort est fonction du nombre de liaisons C-C entre deux points de réticulation [48]. Soit :

$$G_0 = W_a \cdot N \quad (3)$$

Avec G_0 , l'énergie de fracture à vitesse nulle en collage fort (J/m^2), W_a , l'énergie d'adhésion et N , le nombre de liaisons C-C entre deux points de réticulation qu'il faut étirer pour provoquer la rupture.

Les vitesses basses sont représentatives de la durabilité de l'adhésif alors que les vitesses hautes sont représentatives d'un choc.

Les auteurs **Gent (1972)** [44], **Aubrey (1980)** [49] et **Barquins (1986)** [50] ont trouvé que pour une gamme de vitesse allant de 10^{-10} à 10^2 $m.s^{-1}$, il existe 5 comportements (ou zones) types (**Figure I.1**).

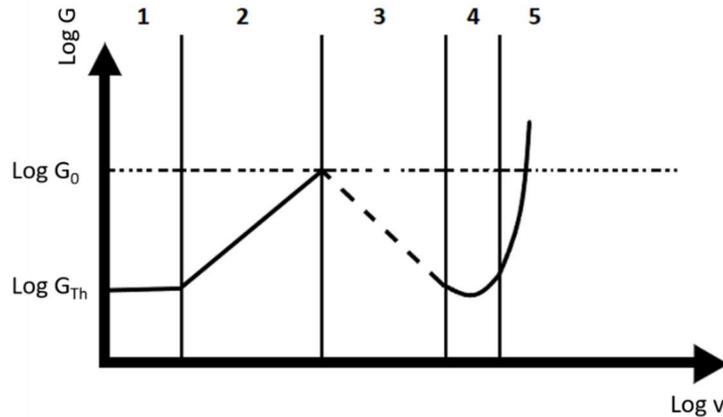


Figure I.2. Relation entre l'énergie de pelage et la vitesse de pelage. Représentation et reproduction des travaux des auteurs J. Cognard [37], Gent [24], Aubrey [29] et Barquins [30].

J. Cognard fait état d'un changement de comportement qui est divisé en 5 zones. Dans la première zone ($v < 10^{-9}$ $m.s^{-1}$), l'énergie de fracture est égale à l'énergie de fracture thermodynamique (énergie d'adhésion) G_{Th} . Dans la seconde zone ($10^{-9} < v < 10^{-2}$ $m.s^{-1}$), l'adhérence est contrôlée par la dissipation visqueuse. G est alors égal à $G_{Th} + K_{sep} \cdot v^n$. La zone 3 concerne une zone de turbulence (stick-slip). Dans la zone 4, le polymère ne dissipe plus d'énergie et devient fragile. Dans la zone 5, la propagation de la fracture devient limitée par la vitesse du son [37].

Le terme $K_{sep} \cdot v^n$, provient du fait que les liquides visqueux obéissent à une loi de puissance de type $F = K \cdot v^n$, avec K_{sep} , la consistance de séparation, v la vitesse et n l'indice de fluidité [37]. La consistance de séparation décrit la dissipation d'énergie par l'écoulement de l'adhésif lors de la fracture. L'indice de fluidité reflète l'étendue des interactions entre les chaînes moléculaires. Il est faible si les interactions sont nombreuses. Aussi, le fluide Newtonien est caractérisé par $n = 1$ et les corps élastiques par $n = 0$. La gélatine est caractérisée par une valeur de n égale à 0,6 ([37,51]).

Le stick-slip peut être imagé comme un patin muni d'un ressort [52]. Pendant la phase de stick, le patin reste immobile et le ressort s'allonge. Pendant la phase de slip, le patin bouge rapidement. Les courbes de pelage sont alors saccadées. En matière de forage rotationnel pétrolier, le stick-slip entraîne des vibrations de torsions destructrices du matériel. Le stick est alors associé à l'arrêt de la rotation et le slip à l'augmentation de la vitesse de rotation [53].

II. Matériels et méthodes

Cette partie, plus technique, concerne les réactifs et produits utilisés (A), les instruments utilisés (B), les méthodes de caractérisation et les méthodes de préparation des hydrogels et des solutions (C).

A. Réactifs et produits	II-17
1. Chimie	II-17
a) En pratique	II-17
b) Présentation des hydrogels	II-17
c) Présentation de la gélatine	II-17
d) Présentation de la gomme arabique	II-21
2. Biologie	II-21
3. Préparations des adhésifs et des solutions	II-22
B. Instruments	II-22
1. Rhéomètre	II-22
a) Les expériences de probe-tack	II-23
b) Les expériences en cisaillement	II-25
2. Spectrophotomètres	II-30
a) UV-Vis	II-30
b) FTIR-ATR	II-30
3. Microscopes	II-30
a) Numérique	II-30
b) A Force Atomique	II-30
c) Electronique à Balayage	II-32
C. Méthodes de caractérisation	II-35
1. Rhéologie	II-35
2. Autocicatrisation manuelle	II-36
3. Gonflements	II-36
a) En pratique	II-36
b) Théories	II-37
4. Tests de viabilité	II-38
5. Imagerie	II-39

A. Réactifs et produits

1. Chimie

a) En pratique

L'ensemble des solutions ont été préparées dans de l'eau ultra pure *Milli-Q*® Direct 8/16 ($\rho=18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, Millipore RO system). Les réactifs tels que le pyrocatechol (réf. C9510), le pyrogallol (réf. P0381) la gélatine B (G6650), le periodate de sodium (NaIO_4) (réf. 311448), la dopamine (sous forme chlorhydrate) (réf. H8502), la gomme arabique (réf. G9752) ont été achetés auprès de *Sigma-Aldrich* et utilisées sans purification ultérieure. La gélatine bovine 250 bloom (réf. CM021, lot Q190114) a été achetée auprès de l'entreprise *l'Univers des Chefs*. L'acétate de sodium (réf. 6268) provient du fournisseur *Merck*.

b) Présentation des hydrogels

Les hydrogels sont essentiellement constitués d'eau mais ne se dissolvent pas en milieu physiologique. Ils possèdent telle quantité d'eau que la diffusion des molécules d'eau est proche de celle en phase liquide [54].

Les hydrogels sont constitués de polymères capables de retenir une très grande quantité de molécules d'eau au sein de leur réseau tridimensionnel. Ils sont classables en fonction de leur origine (naturelle ou synthétique) [30], de leur composition (homopolymère, copolymères, mélanges de polymères) [55], de leur configuration (amorphe, semi-cristalline, cristalline), de leur type de réticulation (covalente ou interactions de Van der Waals, liaisons électrostatiques) [56], de leur type de charges électriques (neutres, ioniques ou zwitterioniques).

Ils représentent une classe unique de matériaux particulièrement utiles pour les applications biomédicales du fait de leur capacité à imiter certaines caractéristiques des tissus vivants [57–59].

Parce que l'eau est l'élément principal du corps humain, les hydrogels sont des matrices non-agressives pour le vivant et présentent un potentiel certain pour la régénération tissulaire. Ils sont également utilisés comme biosenseurs, comme matrice d'attachement réversible des cellules ou d'activité enzymatique, comme délivreur de principes actifs. La liste est non-exhaustive. L'application la plus prometteuse tient évidemment dans le remplacement des tissus humains, voire de l'organe entier via les impressions 3D [4].

c) Présentation de la gélatine

(1) Le collagène

Collagène. (*gr. Kólla, la colle, et γένος « génos », la naissance*) [60]. Le collagène est une glycoprotéine qui représente 25% à 35% des protéines totales du corps (os, cartilage, tissu conjonctif). Composée de trois chaînes peptidiques (tropocollagène, 1000 acides aminés par chaîne), enroulées et liées par des liaisons hydrogènes (via les groupements hydroxyprolines et les molécules d'eau piégées) et par des liaisons covalentes. En polymérisant, le tropocollagène donne une fibrille et plusieurs fibrilles donnent une fibre de collagène. Les liaisons intermoléculaires covalentes sont formées par condensations aldoliques de groupements aldéhydes provenant de la désamination oxydative de la lysine catalysée par la lxyloxydase. On connaît 27 types de collagènes différents. Le type I concerne la peau, les os et les tendons. Le type II concerne le cartilage et le type III concerne la peau (composition différente du type I). Les autres types de collagène sont spécifiques aux organes concernés. La structure primaire du collagène de type I (celle utilisée dans notre étude) contient 1014 acides aminés (100 000 g/mol) qui forment une chaîne α de 334 unités constituées d'une séquence répétitive de trois acides aminés (glycine-X-Y). En N et en C terminal il se trouve des chaînes de 15 à 26 acides aminés qui ne prennent pas la forme d'une chaîne α . En X, il est retrouvé principalement la proline et en Y, l'hydroxyproline. Le **Tableau II.1.** reprend la liste des résidus d'acides aminés contenus dans la gélatine.

Acide aminé	Nombre de résidus	Acide aminé	Nombre de résidus
Alanine	117	Isoleucine	11
Arginine	48	Leucine	24,3
Asparagine	0	Lysine	28
Acide aspartique	46	Méthionine	3,9
Cystéine	0	Phénylalanine	14
Acide glutamique	72	Proline	124
Glutamine	0	Sérine	33
Glycine	335	Thréonine	18
Histidine	4,2	Tryptophane	0
Hydroxyproline	93	Tyrosine	12
Hydroxylysine	4,3	Valine	22

Tableau II.1. Composition moyenne de la gélatine B pour 1000 résidus d'acides aminés, reproduction [60].

Le collagène de type I est composé de trois chaînes α dont deux sont identiques. Ce sont les séquences répétitives G-X-Y qui sont les jonctions à l'origine de la création des hélices via les liaisons hydrogènes. L'hélice est enroulée à pas de gauche et contient trois acides aminés par tour. Lorsque trois hélices sont coordonnées, elles forment la structure tertiaire (300 nm de long, 1,5 nm de diamètre). L'assemblage des trois hélices donne la structure quaternaire. Il est observé un décalage d'un quart de la longueur des structures tertiaires à fin d'obtenir de la meilleure coordination des charges possibles. La structure est également réticulée.

Soit, la représentation schématique des charges globales retrouvées sur structure tertiaire type [60]:

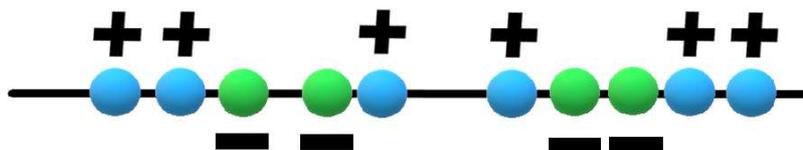


Figure II.1. Représentation des charges globales de la structure tertiaire du collagène, reproduction [60].

Soit, la représentation du décalage des charges globales négatives sur une structure quaternaire [60]:

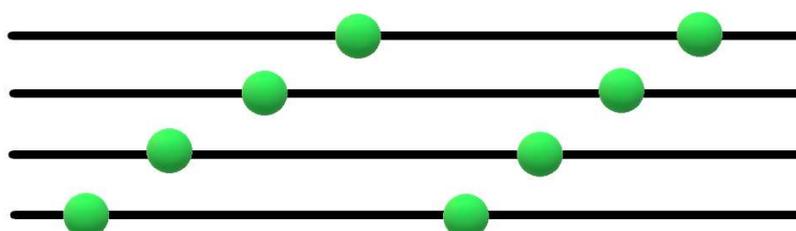


Figure II.2. Représentation du décalage des charges de la structure quaternaire du collagène, reproduction [60].

Le collagène comporte également des carbohydrates liés à l'hydroxylysine via la fonction hydroxyle (galactose, glucosylgalactose). Il perd en solubilité avec l'âge du fait de la réticulation (augmentation des liaisons covalentes). Lors de la synthèse de la gélatine, de telles réticulations sont rompues (hydrolyse acide, basique ou via les collagénases). L'équation bilan de la synthèse de la gélatine à partir du collagène s'écrit [61] :



Collagène + Eau → Gélatine

Le traitement basique (conduisant à la gélatine B), donne lieu à la modification des acides aminés asparagine et glutamine en forme acide. Ceci, est à l'origine de l'abaissement du point isoélectrique (pH= 4,8-5,5) contre (pH=8-9) pour la gélatine de type A (obtenue par un traitement acide). Le traitement par les collagénases donne l'hydrolysate de gélatine (appelé le plus souvent collagène hydrolysé ou gélatine à 0 degré de Bloom).

(2) La gélatine

(a) Présentation

Du temps des hommes des cavernes (il y a ~8 000 ans), et des égyptiens (3 000 ans plus tard), la gélatine entrainait déjà dans la composition des colles. De la révolution industrielle à nos jours, les usages de la gélatine se sont multipliés. En 1833, apparaît le brevet français d'encapsulation des médicaments via la création de la gélule en gélatine dure (Brevet No. 9690). En 1940, la gélatine est utilisée sous forme d'éponge chirurgicale hémostatique. Sans considération des dates spécifiques aux utilisations et découvertes, la gélatine est retrouvée comme composant principal du plasma sanguin de synthèse, comme adhésif dans les implantations des valves cardiaques (gélatine/résorcinol, www.berlinheart.de), comme adhésif non-inflammable (chaussures), dans les sondes de traitement des occlusions intestinales, comme matrice pour l'implantation dans le cerveau des cellules productrices de dopamine pour les patients atteints de la maladie de Parkinson (www.schering.de/scripts/en/30rd/areas/neuro/parkin.php). Elle est également utilisée, en photographie, dans les papiers d'impression (dopée à la bentonite, aux zéolithes, et aux carbonates), en cosmétique (réparation des cheveux cassants, réhydratation de la peau, augmentation de la densité du cuir chevelu), en tant que substitut alimentaire (stimule la synthèse du cartilage), comme complexe de coacervation (gomme d'acacia 59%/gélatine 41%, 3,8 < pH < 5, US Patent No. 72 800 457), comme filtre et comme milieu de culture en microbiologie. La densité de la gélatine est très proche de celle du muscle, de ce fait elle est utilisée dans des matrices de simulation des impacts de balles. Enfin elle est également utilisée comme revêtement anticorrosion, comme fertilisant, comme plastique biosourcé, comme détergent, comme agent de décontamination des métaux lourds ou des tanins, comme gélifiant alimentaire...La liste est, bien entendu, non-exhaustive [60].

Une telle variété dans l'usage de la gélatine démontre que les propriétés de ce matériau sont d'une rare importance. Elle est un bon excipient, non-allergène, dont la production est peu chère, reproductible, purifiable, les paramètres physiques sont contrôlables. C'est une matière biosourcée, abondante, écologique (utilise les rejets de l'industrie), sans sucres, sans graisses, sans purines et sans gluten. Elle stabilise les mousses en emprisonnant l'air en formant un maillage via des liaisons hydrogènes. Elle peut empêcher à ce titre la synérèse (l'expulsion) du lactosérum. Il en existe une très grande variété et ses polymères sont amphotères, fonctionnalisables, hydrophobes, hydrophiles et mobiles. Elle est, un hydrocolloïde protecteur (interfaces air/liquide, solide/liquide...). La surface de la gélatine est particulièrement remarquable. Elle possède des propriétés d'adhésion, et peut former un film protecteur. Les groupements hydrophiles et hydrophobes ont tendance à migrer vers les surfaces en fonction des espèces présentes aux interfaces. Cette propriété est exploitée pour stabiliser les mousses et émulsions, les huiles et les bulles d'air. Cette fonction de stabilisant n'a pas besoin de gélifiant pour être, car sa présence seule augmente la viscosité de la phase aqueuse.

La gélatine contient tous les acides aminés essentiels sauf le tryptophane. Elle possède des lysines et des arginines qui sont utilisées dans la synthèse de l'insuline. L'acide glutamique (pour qui il est observé une perte de 20% 1h après un marathon) joue un rôle clé dans le processus de récupération et dans l'immunité. La gélatine contient de la glycine, qui, tout comme la proline, et nonobstant le fait qu'elle n'est pas un acide aminé essentiel, reste utile dans la fabrication du collagène. Il a été démontré que l'organisme n'en produit pas assez pour répondre à ses besoins (la glycine intervient dans la synthèse de l'ADN et de l'hémoglobine). 10 grammes de gélatine

contiennent l'équivalent en glycine trouvé dans 2,8 L de lait ou 160 grammes de viande rouge. L'hydroxyproline est nécessaire à la synthèse du collagène.

(b) *Caractérisation*

Indice de polymolécularité des chaînes et degré de Bloom

La distribution en masse de la gélatine peut aller de 10 000 à 400 000 g/mol. La plus haute est déjà considérée comme un micro-gel. L'indice de polymolécularité (D) est en moyenne supérieur à 2. Pour rappel :

$$D = M_w/M_n \quad (14)$$

Avec M_w , la masse molaire moyenne en masse et M_n , la masse moléculaire moyenne en nombre.

Les régions qui possèdent plus de 100 000 g/mol (pic majoritaire dans la distribution en masse pour la gélatine de type B) possèdent des chaînes α qui ont une très forte contribution à la gélification. La gélatine de type A, quant à elle, possède une distribution en masse plus large.

Oscar T. Bloom a breveté en 1925 (US Patent No. 1 540 979) une machine et une manipulation pour quantifier la tendance de la gélatine à gélifier. Cette force de gélification est quantifiée par le degré de Bloom. Plus le degré de Bloom est élevé, plus le temps de gélification est court et plus les températures de gélification et de fusions sont hautes.

D'un point de vue pragmatique, le degré de Bloom permet de connaître la quantité de gélatine minimum pour obtenir une gélification dans de l'eau pure :

$$C_2 = C_1 (B_1/B_2)^{1/2} \quad (15)$$

Avec C_2 , la concentration en pourcentage de gélatine pour le degré de bloom le plus haut B_2 , et C_1 , B_1 , les valeurs correspondant à un degré de bloom inférieur.

Le test de Bloom utilise un cylindre de 1,25 cm de diamètre opérant une compression de 4 mm dans de la gélatine à 6,67% dissoute dans de l'eau pure, chauffée pendant 20 min à 60°C dans un batch fermé puis refroidie pendant 17h à 10°C. Le degré de refroidissement ne doit pas dépasser $\pm 0,1^\circ\text{C}$. La force nécessaire à cette opération de compression donnera le degré de Bloom. Ainsi, une force de 1 Newton est l'équivalent de 1 000 degrés de Bloom.

Gonflement des grains et dissolution. Plus les grains sont petits, plus ils gonflent vite avec une dissolution plus rapide. Aussi, il a été trouvé que des grains d'une taille de 0,16-0,3 mm mettent 15 min pour gonfler à 100% de leur capacité dans une eau à 18°C alors que des grains de 0,4-0,6 mm atteignent un maximum de gonflement de 87,5% au bout de 40 min. Pour des grains de 1-1,25 mm, le gonflement sera de 75% au bout de 40 min.

Spectroscopie UV-vis. Tous les acides aminés absorbent dans l'ultraviolet lointain (~ 220 nm). Le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine ont un maximum d'absorption à 278, 275 et 260 nm respectivement. La transparence d'une suspension de gélatine est évaluée au spectromètre UV-Vis à 620 et 450 nm.

Règlementation. Le peroxyde d'hydrogène est utilisé pour détruire les bactéries présentes dans la gélatine. Selon la réglementation de la pharmacopée européenne, la gélatine doit être exempte de salmonelle et d'*E. Coli*, et doit posséder un maximum de 10^3 /g en bactéries aérobies coliforme à 30 °C, 10 mg/kg de chrome, 30 mg/kg de zinc, 50 mg/kg de sulfate et 10 mg/kg de H_2O_2 . La gélatine contient naturellement 8-12% d'eau d'hydratation résiduelle.

(c) *Cinétique de la gélatine*

Les propriétés intrinsèques sont dépendantes de la distribution en masse. L'indice de polymolécularité ($D = 2$) fait que, la formation du gel et sa viscosité n'ont pas de relation linéaire. La formation du gel est dépendante d'une distribution en masse de plus de 100 000 g/mol pour une région considérée. La viscosité représente la mobilité des chaînes (liaisons hydrophobes, électrostatiques) alors que la gélification représente les liaisons

hydrogènes formant une structure primaire. Lors de la gélification, il est nécessaire que les deux phénomènes interviennent car les chaînes doivent se mobiliser dans l'espace afin de s'arranger en structure plus rigide.

Les propriétés viscoélastiques des gels sont déterminées via des mesures d'oscillation au rhéomètre. L'appareil permet de calculer deux paramètres : la viscosité via le module de perte G'' et l'élasticité via le module de conservation G' . Le point de croisement des deux courbes représente le moment de transition sol-gel/gel-sol. Lorsque G'' est au-dessus de G' , le matériau (eau + gélatine) est sous forme liquide. L'inverse signifie que le matériau est sous forme gélifiée. La température de transition gel/sol est fonction croissante du degré de Bloom.

La viscosité dépend du matériel brut, de la concentration, de la température, et du procédé de conditionnement. A degré de Bloom égal, les gélatines de type B ont une viscosité de 30 à 50% plus élevées que les gélatines de type A. Aux concentrations normales, la gélatine a un comportement de type quasi-newtonien (la viscosité n'augmente pas à la suite à une modification de la vitesse de cisaillement).

On observe un degré d'hystérésis entre le croisement sol/gel lors du refroidissement et le croisement gel/sol lors de la chauffe. Pour la gélatine de 5 à 25% dissoute dans de l'eau pure, l'hystérésis est d'environ 5°C (avec sol/gel < gel/sol). L'explication de l'hystérésis élastique peut être décrite de façon imagée. La tension d'un élastique n'est pas la même suivant la vitesse à laquelle il a été tendu et également pas la même lors de la relâche. Une autre image consiste à prendre l'image d'un muscle. Un muscle chaud est un muscle qui va se relâcher plus facilement qu'un muscle froid.

Pour la gélatine, il a été remarqué que les solutions qui sont préparées en dessous de 50°C sont plus performantes en matière de cohésion interne (valeur de G'), indiquant la présence d'une pré-structure dans le milieu. Le pouvoir gélifiant de la gélatine par contre, n'est que très peu modifié suite à une augmentation modérée de la température. Une perte de 2% (valeur de G') après un conditionnement de 2h entre 60 et 70°C. La gélatine peut tenir une chauffe de 90 à 100°C pendant quelques minutes.

d) *Présentation de la gomme arabique*

La gomme arabique est composée de 97% d'hydrates de carbones (sucres) et de 3% de protéines. Les fractions varient en fonction de l'origine, du climat, de l'âge de l'arbre, des conditions d'extraction et de séchage [62,63]. Elle se compose principalement de trois fractions. La première en masse est un polysaccharide hautement ramifié (~90%, masse molaire 3.10^5 g/mol) composé d'un squelette β -(1→3) galactose branché avec des arabinoses et rhamnoses terminés par un acide glucuronique. La seconde fraction en masse (~10%, 1.10^6 g/mol) correspond à un complexe arabinogalactane-protéine dans laquelle les chaînes de l'arabinogalactane sont liées de manière covalente à une chaîne protéique par les groupes sérine et hydroxyproline. La troisième fraction (~1%) est une glycoprotéine qui diffère par sa composition en acides aminés [64]. Son point isoélectrique se trouve à pH = 5,1.

Elle est utilisée en abondance dans l'industrie alimentaire sous la dénomination E414. On l'utilise aussi pour la peinture, les colles, la cosmétique, les sirops, les textiles et les encres [62]. C'est un fixateur d'émulsion au même titre que la gélatine. Elle semble être la seule substance capable d'arrêter la cristallisation des sucres [60]. Elle est connue pour être non-cytotoxique [62].

Le spectre UV-vis des solutions de gomme arabique présente un pic vers 260-275 nm qui est attribué aux acides aminés aromatiques tyrosines, tryptophanes et phénylalanines [65] tandis que l'absorbance < 230 nm est attribuable aux structures protéiques [66].

2. Biologie

Le milieu cellulaire utilisé fut le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) high glucose (MS00VR1003, MS00VR1007, MS00VG1007 lot L0103-500) de *Dutscher* à 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) (S16444, S1644431810, lot S1810-500) et 1% de PS (Penicillin-Streptomycin) (MS00A01008, MS00YH1001, lot L0022-100). De la trypsine (MS00QH, lot L0940-100), du DMSO (Diméthylsulfoxyde) (ref. 317275, lot 3587152), du PBS (Phosphate Buffered-

Saline) de Dutscher et de Biowest (MS00XA1004, lot L0615-500) ainsi que du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) (5mg/ml, 1ml/9ml milieu) (M5655, lot MKCG3023, Sigma-Aldrich) ont également été utilisés. Des cellules NIH 3T3 ont été utilisées pour les tests MTT.

L'ensemble des produits ont été utilisés sans purification préalable.

3. Préparations des adhésifs et des solutions

Préparation de la solution tampon acétate de sodium (50 mM). Dans un flacon de laboratoire Teqler de 1L, il a été ajouté de l'acétate de sodium (4,1 g, 50 mmol) avec 800 ml d'eau Milli-Q®. Le pH de la solution a été ajusté avec de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à pH 5 puis, 200 ml d'eau Milli-Q® ont été rajouté. Tous les autres réactifs, sauf indication contraire, ont été dissous dans la solution tampon.

(A). Préparation des solutions de NaIO₄. Sauf indication contraire, il a été préparé des solutions de periodate de sodium (NaIO₄) (300 mM, 200 mM, 100 mM) en fonction des besoins des manipulations.

(B). Préparation des solutions de pyrogallol/pyrocatechol/dopamine. Les solutions sont préparées au moment même de la manipulation et n'ont pas été conservées pour un usage ultérieur. Sauf indication contraire, il a été préparé des solutions de pyrogallol/catéchol/dopamine (100 mM → 1000 mM) en fonction des besoins des manipulations.

Procédure générale. La solution tampon d'acétate de sodium (50 mM) est introduite dans un flacon Teqler. Le flacon a été refermé et chauffé à 75°C sur une plaque chauffante (environ 45°C à l'intérieur de la solution), et a été maintenu sous agitation magnétique pendant 10 minutes. Il a été saupoudré de la gélatine et la solution **(B)** désirée a été ajoutée, puis la solution **(A)**. Immédiatement, il a été prélevé à l'aide d'une micropipette pour dépôt sur le plan du rhéomètre, 0,6 ml pour les manipulations nécessitant la géométrie plan-plan (adhésion, pelage) et deux fois 0,8 ml pour les manipulations nécessitant la géométrie cône-plan (cinétique, self-healing, température).

Hydrogels à pH 12. La même procédure précédemment décrite a été suivie. Avant l'opération de prélèvement à la micropipette, il a été ajouté du NaOH_(s) (150 mg, 3,75 mmol) pour les hydrogels de pyrogallol et une pastille de NaOH_(s) (200-250 mg, 5-6,25 mmol) pour les hydrogels de catéchol.

B. Instruments

1. Rhéomètre

Les expériences de rhéologie ont toutes été faites avec le rhéomètre Kinexus Ultra (*Malvern*, UK) équipé d'un dynamomètre limité à 50 N. Les différents hydrogels ont été déposés sur la plaque d'acier inoxydable 316 (fer, chrome, carbone, molybdène) du rhéomètre. Celle-ci est régulièrement polie (SiC de granulométrie 6-0). Avant chaque expérience la plaque d'acier est nettoyée au savon puis à l'éthanol. La plaque (appelée plan en rhéologie) est fixée sur un élément Peltier dont la température a été fixée à (25 ± 0,1°C). Les mesures de type adhésion (probe-tack) ont été enregistrées à l'aide de la géométrie plan-plan (2 cm de diamètre). La distance entre le plan et le plateau a été fixée à 1 mm. Les mesures de type cinétique, self-healing (autocicatrisation) et les balayages en température ont été enregistrées à l'aide de la géométrie cône-plan avec un cône supérieur de 4 cm de diamètre possédant un angle au sommet de 174 °. La distance entre le sommet du cône et la plaque d'acier a été fixée à 150 µm.

a) Les expériences de probe-tack

En expérience de probe-tack l'adhésif se trouve entre les deux plans (**Photo I.1**).



Photo II.1. Rhéomètre *Kinexus* en mesure de probe-tack avec la géométrie plan-plan.

Le probe-tack permet de mesurer l'énergie d'adhésion (de fracture) W/A (J/m^2), la force à la rupture $F(N)$ et la distance de la rupture. L'énergie de fracture « W/A » ($J.m^{-2}$) est l'énergie nécessaire pour créer une unité de surface de fracture. La force à la rupture « F » (N) de l'adhésif est fonction de différents paramètres (vitesse de pelage, température, appareil de mesure, géométrie de l'appareillage...). On la traduit souvent en force d'adhésion (Pa), ce qui revient simplement à diviser la Force à la rupture « F » par l'aire du cône ($3,14.10^{-4} m^2$ dans cette étude).

Le cône va d'abord faire une compression du gel (1 N dans les présentes manipulations) puis un étirement à vitesse constante. L'étirement va donner lieu à la création de microcavitations aux interfaces qui peuvent être détectées via les ondes acoustiques [67]. Les microcavitations peuvent implorer horizontalement (ruptures adhésives) ou verticalement (création de fibrilles).

Les allures des courbes de pelage correspondent à deux modes de séparation (**Figure II.3**). Le premier mode (**courbe noire**), homogène, traduit un comportement de type élastique. Le second mode quant à lui, matérialise le processus de fibrillation (**plateau, courbe rouge**) qui s'accompagne d'un rhéodurcissement (la contrainte augmente avec la déformation) du fait du caractère cohésif des fibrilles [68].

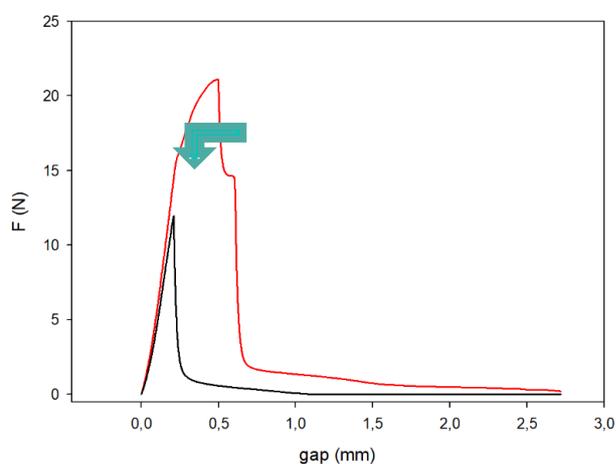


Figure II.3. Les différents modes de séparation dans les courbes de pelage. Déformation homogène (noire), rhéodurcissement (courbe rouge, plateau, flèche bleue).

Il a été démontré que pour acquérir la qualité de bon adhésif, le plateau (Figure II.3, flèche bleue) se devait d'être élevé et long car les fibrilles participent à l'énergie retrouvée dans le probe-tack (jusqu' à 80%) [69].

Grâce à des montages optiques, les auteurs Lakrout et Yamaguchi ont pu observer les phénomènes microphysiques à l'œuvre dans les manipulations de type probe-tack [70,71]. Nous savons maintenant que les différentes parties des courbes correspondent à des phénomènes physiques différents.

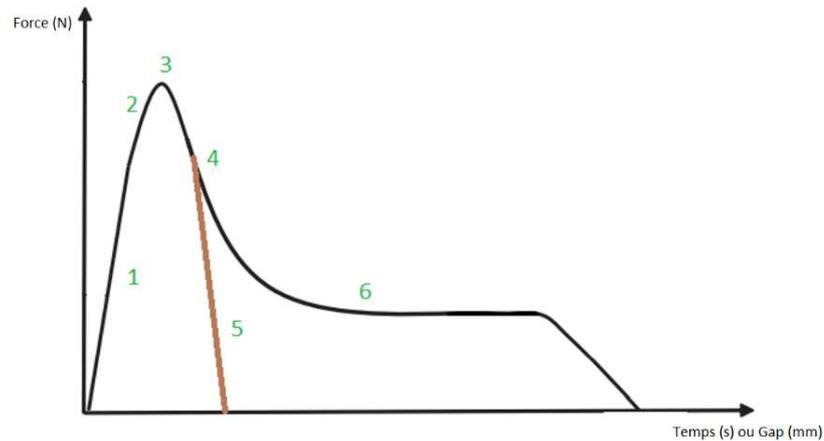


Figure II.4. (1), la force (en ordonnée) augmente linéairement, la déformation est homogène, la traction est de type élastique. (2), l'augmentation de la force est ralentie ; début de la nucléation des microcavités. (3), fin du processus de nucléation. (4), extension latérale des microcavités. (5), coalescence des microcavités. (6), croissance verticale des microcavités et fibrillation [68,70,71].

La littérature fait état de deux types de rupture : la rupture adhésive (l'adhésif se décolle sur une face) et la rupture cohésive (l'adhésif se rompt au cœur de son volume). Pour les adhésifs de type PSA (adhésifs sensibles à la pression), il a été observé qu'une courbe de type 5 (Figures II.4, 5), donne lieu à de la rupture adhésive sur la face supérieure du gel. Lorsque des fibrilles apparaissent, et en l'absence de nucléation au niveau de la partie inférieure du gel, la rupture peut donner lieu à une rupture adhésive sur la face supérieure (6b, avec des fibrilles peu cohésives) ou à une rupture cohésive (6a, avec des fibrilles cohésives). Lorsqu'apparaît de la nucléation au niveau inférieur du gel, il a été observé des ruptures adhésives (6c rupture au niveau inférieur), (6d rupture au niveau inférieur et supérieur, observations faites avec 30% p/v de gélatine b (250 Bloom).

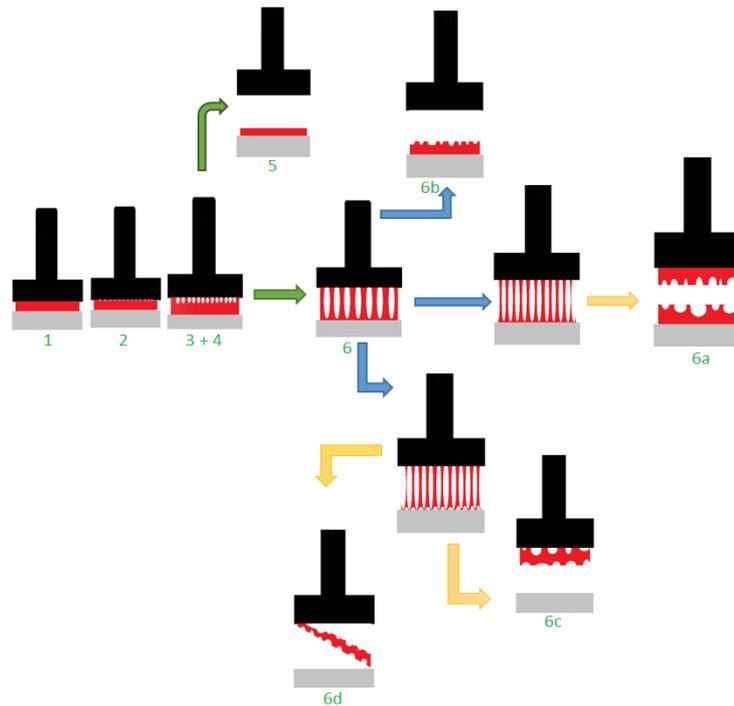


Figure II.5. Reproduction (sauf 6d) des différentes formes de ruptures possibles observées pour le PSA. Reproduction thèse PSA [68].

Les travaux de Good (1988) [72] ont mené à une proposition d'équation permettant de déterminer le lieu de la fracture. Sachant que le lieu de la fracture change avec la vitesse de pelage, la rugosité et la composition du polymère. Selon l'auteur, la rupture adhésive ou cohésive serait le résultat du rapport entre l'énergie de fracture à vitesse nulle et l'énergie de dissipation visqueuse. Soit :

$$\Omega = G_0 / K_{sep} \cdot V^n \quad (4)$$

Lorsque $\Omega < 1$ la rupture est adhésive (interfaciale).

Cependant, ceci n'empêche pas qu'un même adhésif puisse avoir des ruptures cohésives et adhésives. Il y a d'autres paramètres qui doivent rentrer en considération (conditions humides, sèches, condition de la pose de l'adhésif, traitement de la surface, homogénéité de l'adhésif...).

b) Les expériences en cisaillement

Ce paragraphe concerne les expériences rhéologiques faites avec le cône. Il sera abordé l'état de l'art (a), les expériences qui concernent les transitions d'état des matériaux (b) et plus spécifiquement les expériences d'autocicatrisation (c).

(1) Généralités

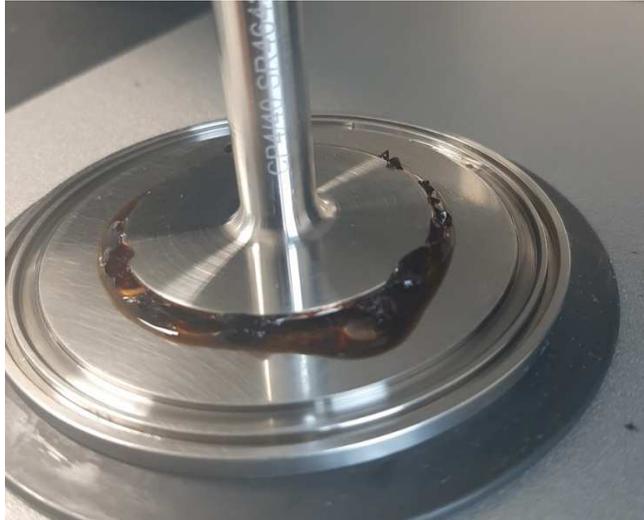


Photo II.2. Rhéomètre *Kinexus* en mesure de cisaillement avec la géométrie cône-plan.

L'élasticité d'un matériau est définie comme la déformation réversible des corps solides déformables en réponse à une contrainte. La mécanique est l'étude de la réponse d'un corps solide à des forces ou des moments appliqués. Les forces (contraintes) ou moments appliqués peuvent donner lieu à des déformations de translations, cisaillements ou des variations de volume.

L'origine microscopique de l'élasticité réside dans le minimum d'énergie potentielle en ce qui concerne les solides cristallins et d'un effet entropique pour les matériaux polymères. Pour un matériau cristallin, la distance interatomique correspond à la configuration de la plus basse en énergie. Ecarter de tels atomes par rapport à leur position d'équilibre revient à augmenter l'énergie potentielle du système et donnera lieu à une force de rappel. Pour les polymères et élastomères, le modèle repose sur le postulat que pour maximiser son entropie de configuration le polymère tend à adopter une forme repliée en pelote. Toute modification de cette forme reviendra à ordonner les segments des chaînes de polymères et diminuera l'entropie. La fin de la contrainte remettra les chaînes en désordre (c'est l'effet entropique)[73].

Les types de déformations (de contraintes) qui sont distinguées de manière récurrentes par la littérature sont : la contrainte dite « normale » (la force appliquée est perpendiculaire à la face qui subit l'effort) et la contrainte dite de « cisaillement ou tangentielle » (la force agit dans le plan de la face considérée). Le premier type supposera des mesures d'extensions (tractions ou compressions) et le second supposera des mesures en cisaillement. Cette pluralité de mesures donne inévitablement lieu à une pluralité de modules d'élasticité. Le module d'élasticité en traction/compression se nomme le module de Young alors que le module d'élasticité en cisaillement est appelé module de cisaillement. Soit E , le module de Young :

$$\sigma = E \epsilon \quad (5)$$

Avec σ , la contrainte en Pascal, E , le module de Young et ϵ , l'allongement relatif ($\frac{l-l_0}{l_0}$).

Soit G , le module de cisaillement :

$$\tau = G \gamma \quad (6)$$

Avec τ , la contrainte en cisaillement, G , le module de cisaillement et γ , la déformation en cisaillement.

Lorsque le matériau est viscoélastique, le module devient complexe.

$$G \rightarrow G^* = G' + iG'' \quad (7)$$

Avec G^* , le module complexe en cisaillement, G' , le module de conservation et G'' le module de perte.

Un solide parfaitement élastique récupère instantanément de la déformation comme un ressort, alors qu'un liquide visqueux Newtonien dissipe toute l'énergie mécanique de cisaillement sous forme de chaleur. Les matériaux viscoélastiques ont un retard dans la déformation et la recouvrance est imparfaite. Ils sont reconnaissables, notamment, via l'effet de Weissenberg (s'accroche au rotor) et de Barrus (gonflement de l'extrudât en sortie de filière).

MATERIEL	DEFORMATION	RECOUVRANCE
HOOKEEN	immédiate	totale
NEWTONIEN	retard	non
VISCOELASTIQUE	retard	partielle

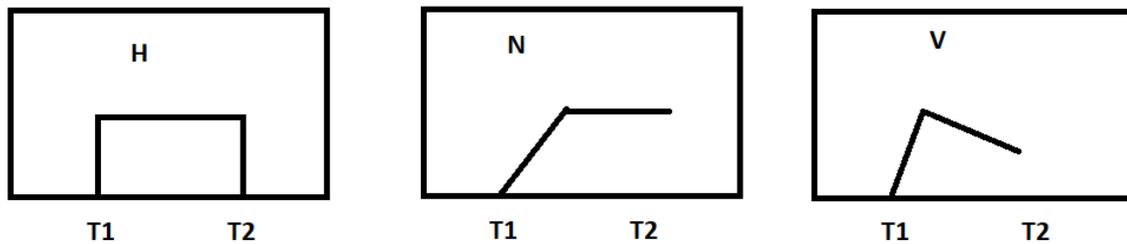


Figure II.6. (Reproduction réf. [74]), les différences entre un matériau purement élastique (Hookéen), purement visqueux (Newtonien) et viscoélastique.

La déformation imposée γ donne lieu à une contrainte τ qui varie de manière sinusoïdale par rapport à la déformation avec un certain déphasage δ qui est fonction du matériau.

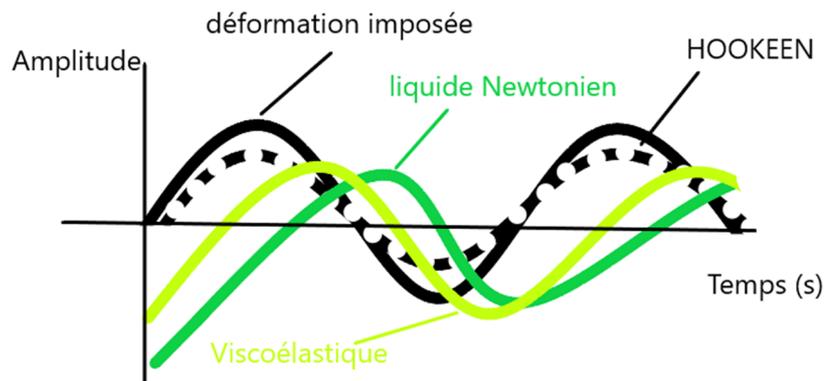


Figure II.7. (Reproduction réf. [74]), représentation de la réponse sinusoïdale d'un matériau suite à une contrainte sinusoïdale.

Avec,

$$\gamma = \gamma_0 \cos(\omega t) \text{ et } \tau = \tau_0 \cos(\omega t + \delta) \quad (8)$$

γ_0 et τ_0 sont les amplitudes de déformation et de contrainte, ω , la pulsation et δ , le déphasage entre les deux.

La contrainte à un temps t va s'exprimer par rapport au déplacement imposé [75]:

$$\tau_t = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos \delta\right) \gamma_0 \cos(\omega t) + \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin \delta\right) \gamma_0 \cos\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) \quad (9)$$

Les modules rhéologiques G' et G'' sont définis dans les parenthèses de couleur. G' , le module de conservation (Pa) est la mesure de l'énergie emmagasinée et relâchée par cycles de déformation et par unité de volume. G'' , le module de perte (Pa) est la mesure de l'énergie perdue sous forme de chaleur par cycle de déformation et par unité de volume.

Dans le cadre un solide élastique parfait, le déphasage est égal à 0 et G'' l'est également. $G' = G_0$ (module de rigidité). Dans le cadre d'un liquide de type Newtonien, le déphasage est égal à 90°, $G' = 0$ et $G'' = \eta'$.

Si le déphasage est supérieur à 45°, $\tan \delta > 0,5$ et le matériel est plus visqueux qu'élastique. La tangente de perte $\tan \delta$ peut être reliée à la viscosité et aux modules de conservation et de perte par la relation :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} = \frac{\eta'}{\eta''} \quad (10)$$

$\tan \delta$ est appelé le facteur de perte ou le facteur d'amortissement. Il représente la fraction d'énergie dissipée pendant un cycle de charge.

Il y a deux méthodes de détermination des paramètres de viscosité et d'élasticité : la méthode transitoire ou la méthode dynamique.

En méthode transitoire on distingue la méthode dite « relaxation des contraintes » de la méthode dite « fluage ». La première méthode consiste dans l'application d'une déformation instantanée et de manière constante en mesurant le déclin de la contrainte en réponse. La seconde consiste dans l'application d'une contrainte instantanée mais constante et dans la mesure de l'augmentation de la déformation. D'après M. Dealy et J. Wang [74], le principal défaut de ce type de mesure repose sur le fait que la réponse du matériau ne peut être reliée à une fonction portant sur une fréquence.

Les tests dynamiques peuvent être soit SAOS « Small Amplitude Oscillatory Shear » (de 1% à 5% en déformation) soit en « tensile mode/compression » (supérieurs à 100% en déformation). La méthode SAOS est non destructrice, sensible et rapide. De 1% à 5%, la contrainte (G' , G'') reste proportionnelle à la déformation (c'est le domaine linéaire de viscoélasticité).

(2) Transitions d'état et de la matière

Ross-Murphy [76] a listé toutes les méthodes de mesures de détection du point de gélification. Les auteurs de la revue [75] relèvent ainsi 4 méthodes de détermination du point de gélification dont deux retiennent l'attention ; quand la valeur de G' devient supérieure à celle de G'' (« la méthode du croisement », dépendante de la fréquence utilisée) ou quand $\tan \delta$ devient indépendant de la fréquence « la méthode de Winter-Chambon ». Ils relèvent que la dernière méthode est celle privilégiée lors des études récentes.

Les gels dits « faibles » montrent une grande dépendance vis-à-vis de la fréquence et possèdent un croisement $G'-G''$. Les gels chimiques (réticulés) ou « forts » montrent une faible dépendance de G' avec la fréquence et ne possèdent pas de croisement $G'-G''$. Les gels dits « physiques » se trouvant entre les deux montrent un G' dépendant de la fréquence mais pas de croisement $G'-G''$. Les auteurs ont alors présenté l'équation suivante :

$$\log G' = n \log f + K \quad (11)$$

Avec K et n des constantes et f la fréquence. Pour des gels réticulés $n = 0$. Pour les gels physiques $n > 0$. Plus on se rapproche de 0 plus le gel est réticulé. A cet effet n peut être utilisé pour savoir quand le gel est proche d'être réticulé.

Les auteurs Gunasekaran et *al.* relèvent que la méthode du croisement « cross-over » n'est pas applicable aux systèmes complexes tels que les féculs [75,77]. Les travaux de M. Winter [78] ont permis de préciser le cadre exact de l'application de la méthode. Le polymère doit répondre à une loi de puissance telle que :

$$G(t) = St^n \quad (12)$$

Avec S (la force), qui dépend de la flexibilité des chaînes et de la densité de réticulation et $G(t)$ le module de relaxation en cisaillement. Lorsque les réseaux de chaînes sont stœchiométriques et lorsqu'ils sont loin de leur température de transition vitreuse, n doit alors être égal à $\frac{1}{2}$ et la méthode du cross-over est applicable. A défaut, pour les réseaux non stœchiométriques qui s'appuient sur un agent réticulant, la relaxation des contraintes suit une loi de puissance dont la valeur est différente de $\frac{1}{2}$. Le point de gélification sera *a priori* du croisement $G'-G''$ lorsque $n > \frac{1}{2}$ (résulte d'un manque en termes de nombre d'agent réticulant). Lorsque $n = \frac{1}{2}$, l'agent réticulant sera présent en excès.

En rhéologie l'équation (12) est représentée par la relation suivante lorsque $n = \frac{1}{2}$:

$$G'(T, \omega) = G''(T, \omega) = \sqrt{\pi/2} S(T) \omega^{1/2} \quad (13)$$

Le facteur de perte est égal à 1 et le point de gélification peut être légitimement établi par la méthode du croisement « cross-over ». Selon l'auteur H. H. Winter, lorsque $n \neq \frac{1}{2}$ il est possible d'utiliser la méthode de Winter-Chambon pour déterminer le point de gélification.

La température de transition vitreuse (T_g) traduit le passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique d'un polymère totalement ou partiellement amorphe [79,80]. En ce qui concerne les matériaux amorphes alimentaires, S. Gunasekaran relève que la T_g porte sur une plage de température plutôt que sur un point fixe [60,75]. Elle apparaît pour une forte chute du module G' . G'' et $\tan \delta$ montrent quant à eux un pic caractéristique [81–83]. La chute observée pour les polymères amorphes synthétiques est de 3 ordre de grandeur (chute d'un facteur 1000) alors que pour les biopolymères, la réduction est souvent d'un ordre de grandeur [84,85].

Les marqueurs les plus souvent utilisés pour la détermination de la T_g sont soit la valeur de G'' soit le pic $\tan \delta$ [86–88]. Il existe plusieurs marqueurs utilisés pour définir les transitions vitreuses. La température du début de chute de G' (T_{onset}), la température moyenne de la région de la transition vitreuse ($T_{midpoint}$), la température où se croise la ligne extrapolée de G' et celle de la pente de la chute ($T_{intersect}$), la température du loss modulus ($T_{G''}$) et la température du facteur de perte ($T_{\tan\delta}$). L'ensemble de ces températures dépend du matériel utilisé, du ratio chauffe/refroidissement ou encore de la fréquence.

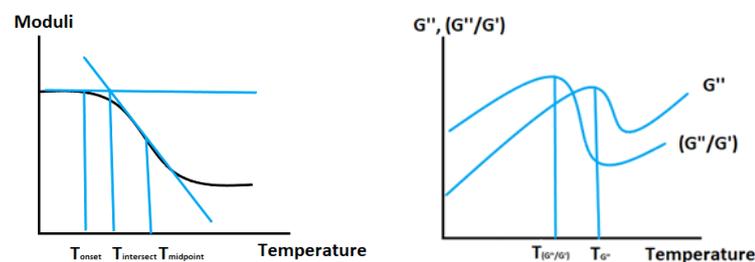


Figure II.8. (Reproduction réf. S. Gunasekaran) [75]. Les différents types de températures utilisés pour la détermination de la transition vitreuse.

La température de transition est fonction de la composition du polymère, de sa masse molaire et de sa structure moléculaire (réticulation, groupement latéraux, rigidité de la chaîne, doubles liaisons, atomes électronégatifs, aromatiques). De manière générale, la valeur de T_g augmente lorsque le volume libre diminue car les atomes/molécules vibrent avec une amplitude plus faible. C'est notamment le cas lors de l'augmentation du nombre de réticulations et/ou de liaisons H et/ou de la masse molaire. *A contrario*, la présence d'eau et l'augmentation de la taille des constituants flexibles feront baisser la valeur de T_g (via l'augmentation du volume libre) [80,89].

(3) Autocicatrisation « self-healing »

L'autocicatrisation des polymères suppose la création préalable d'un dommage (d'une fracture) et la réparation du polymère *post*-dommage. Le taux de réparation peut varier en fonction du temps et en fonction du nombre de dommages effectués. Un bon matériau auto-cicatrisant se doit d'avoir un taux de réparation constant malgré les nombreuses fractures et une réparation quasi-immédiate et autonome (sans chauffage ou rayonnement électromagnétique). Cela suppose une certaine mobilité des atomes [90,91]. Les ionomères sont les polymères les

plus rapides à s'autocicatriser. Les liaisons ioniques (20 à 40 kJ/mol) sont celles qui tiennent sur une plus longue distance (variation du potentiel d'interaction selon une loi en $1/r$).

On peut évaluer *de visu* la capacité d'autocicatrisation d'un polymère en provoquant manuellement la fracture et en maintenant les bouts fracturés ensemble pendant un certain temps. On peut également fracturer la matière avec le rhéomètre en provoquant une déformation (géométrie cône-plan) telle que le module de conservation G' (Pa) soit en dessous du module de perte G'' (Pa). Une fois la fracture faite, il suffira de mesurer les modules de conservation et perte et de les comparer avec les modules de départ.

La gélatine est connue pour être un matériau capable d'autocicatrisation [92].

2. Spectrophotomètres

a) UV-Vis

Les spectres UV-Vis proviennent du spectrophotomètre *Safas* (modèle UVmc², Monaco) (220-240V, 50/60 Hz, 170 VA) en ce qui concerne la partie chimie/physique et du spectrofluorimètre *Safas FLX-XENIUS* (modèle SP2000, Monaco) s'agissant de la partie biologique.

b) FTIR-ATR

Les spectres des échantillons ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR Thermo Fisher Scientific Nicolet 380. Les spectres de tous les échantillons ont été enregistrés dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 4000 et 400 cm^{-1} , avec une résolution égale à 4 cm^{-1} . Trente-deux balayages ont été effectués pour chacun des échantillons. Les résultats ont été traités à l'aide du programme OMNIC (version 9.2.46). Les échantillons proviennent de la mise en poudre d'hydrogels préalablement séchés à l'air libre. Les spectres ont été traités à l'aide du logiciel Origin Pro 2022.

3. Microscopes

a) Numérique

Le microscope VHX-5000 (Keyence) avec un objectif VH-Z500R (objectif de reconnaissance du zoom x500 à 5k) avec une source de lumière LED blanche a été utilisé dans cette étude. Il comprend une caméra CMOS (résolution max : 4800 x 3600) qui permet d'acquérir 50 images à la seconde. Il possède une fonction d'assemblage des images qui permet d'obtenir une résolution de 20k * 20k pixels en quelques secondes. Il gère automatiquement la netteté, les contrastes et les zones saturées. Pilotable par télécommande il permet de faire des analyses 3D. Les observations peuvent être faites par transmission ou peuvent être annulaires complètes ou partielles (dans le but de faire ressortir le relief) ou par contraste interférentiel différentiel (Nomarski). La technique Nomarski permet de discerner d'infimes variations topographiques en utilisant une lumière polarisée divisée en deux qui sera recombinaisonnée et dont les interférences donnent une idée des contrastes les plus détaillés.

b) A Force Atomique

L'AFM permet de visualiser les topographies de surface via le balayage d'une sonde locale. La précision peut aller du micromètre au nanomètre (fonction de la dimension de l'apex de la pointe). Les mesures peuvent être faites dans des milieux secs ou aqueux.

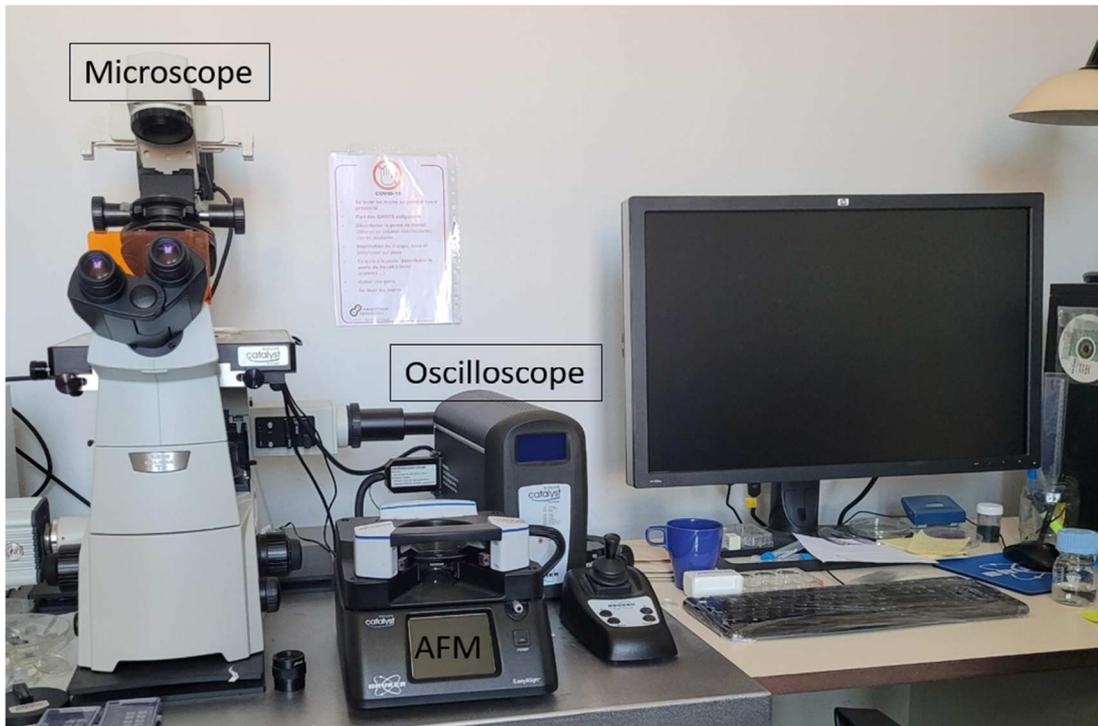


Photo II.3. Photographie de l'AFM utilisé à l'UMR 1121.

La tête de l'AFM possède un levier flexible et réfléchissant. Lorsque le rayon laser dévie du fait de la présence de rugosités de surface, le rayon laser change de position au niveau des photodiodes. Si le point de départ correspond au rayon qui touche les 4 photodiodes, le changement de topographie fera que le laser ne touchera plus que 2 photodiodes (par exemple). Ainsi, il devient possible de déterminer avec précision la topographie des surfaces ainsi que les forces d'interactions entre la pointe et la surface de l'échantillon, connaissant la constante de raideur du bras de levier. Le contact entre la pointe et la surface génère des frictions de la pointe qui s'observeront du côté droite et gauche des photodiodes. Ces mouvements permettent d'avoir une approche qualitative de la nature chimique de la surface.

La pointe peut être composée de silicium ou de nitrure de silicium. Elle peut également être fonctionnalisée.

Le tube piézoélectrique porteur de l'échantillon est capable de s'étirer ou de se contracter suite à une tension électrique. Il contient des électrodes qui lui permettent un mouvement dans les directions x, y et z. Le levier est également pourvu d'un tel tube.

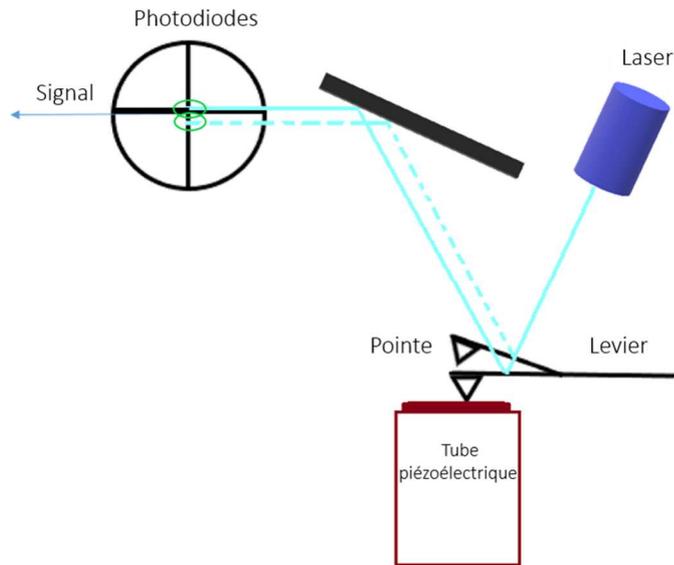


Figure II. 9. Schéma de principe de fonctionnement de l'AFM

Il existe 3 modes de contact de la pointe sur l'échantillon :

- *Le mode contact* utilise les forces répulsives de la surface. La pointe va venir appuyer sur la surface et fera l'objet d'une répulsion. Cette dernière permettra d'évaluer la hauteur de l'échantillon.
- *Le mode non contact* utilise les forces attractives. La pointe ne touche pas l'échantillon et le levier oscille à sa fréquence proche ou égale à sa résonance (50-100kHz). Les déviations du levier seront alors attribuables aux forces attractives de la surface.
- *Le mode contact intermittent* consiste à mettre le levier à fréquence proche ou égale à sa résonance avec une amplitude fixe. Lorsque la pointe touche la surface, l'amplitude change. Cela permet de déterminer la hauteur de l'échantillon.

La morphologie des hydrogels en image topographique a été mesurée en mode de contact intermittent via un Microscope à Force Atomique (AFM) BioScope Catalyst (Bruker Inc, Santa Barbara, USA). Les images ont été acquises en utilisant des cantilevers du type Scanasyst-Air (Bruker Inc, Santa Barbara, USA) avec une résolution de 512x512 et une vitesse de balayage de 1Hz (la taille des images était de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$). A partir des images de topographie obtenues, la rugosité moyenne (S_a) a été calculée via le logiciel « Gwyddion ».

c) Electronique à Balayage

Le microscope électronique à balayage (**Photo II.4**) est un instrument basé sur les interactions électrons-matière. Du fait de leur faible longueur d'onde associée, les électrons permettent d'obtenir des images d'une résolution beaucoup plus grande (1 nm) qu'en microscopie photonique (0,2 μm). Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon, ce qui génère en réponse des électrons secondaires ou rétrodiffusés. Ces derniers sont détectés, amplifiés et le signal obtenu est numérisé.

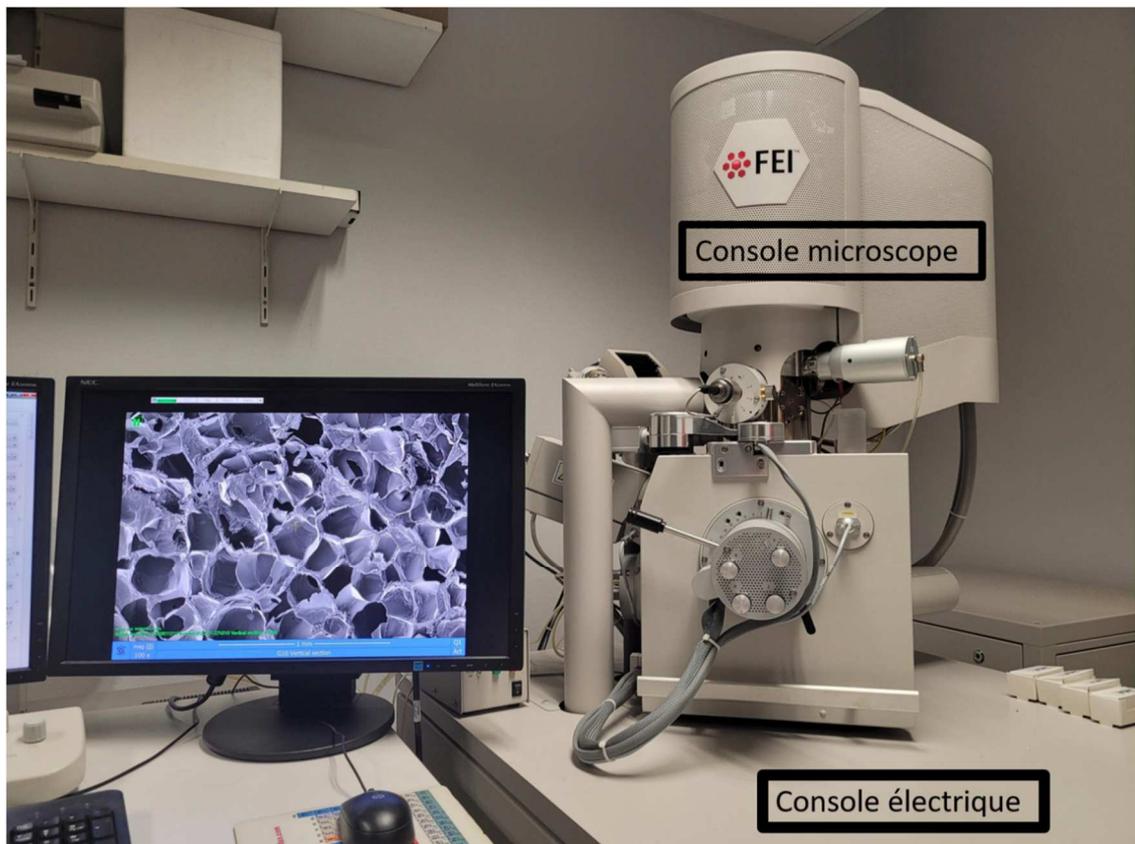


Photo II.4. Photographie du MEB Quanta FEG 250 disponible à l'UMR 1121.

Ce microscope (**Photo II.4**) comprend :

- *une source d'électrons* qui est un canon à émission de champ ou « Field Emission Gun » (FEG). Elle est constituée d'une pointe en tungstène extrêmement fine à laquelle est appliquée une tension. Ceci produit un champ électrique local très intense qui conduit à l'arrachement d'électrons de la pointe par effet tunnel.
- *une colonne* comportant des lentilles électromagnétiques : un condenseur pour réduire le diamètre du faisceau et un objectif assurant la focalisation du faisceau sur l'échantillon ainsi que des bobines défectrices permettant le déplacement du faisceau à sa surface,
- *une chambre objet* comportant une platine recevant les porte-échantillons,
- *des détecteurs* (association d'un scintillateur et un photomultiplicateur) spécifiques des particules réémises.

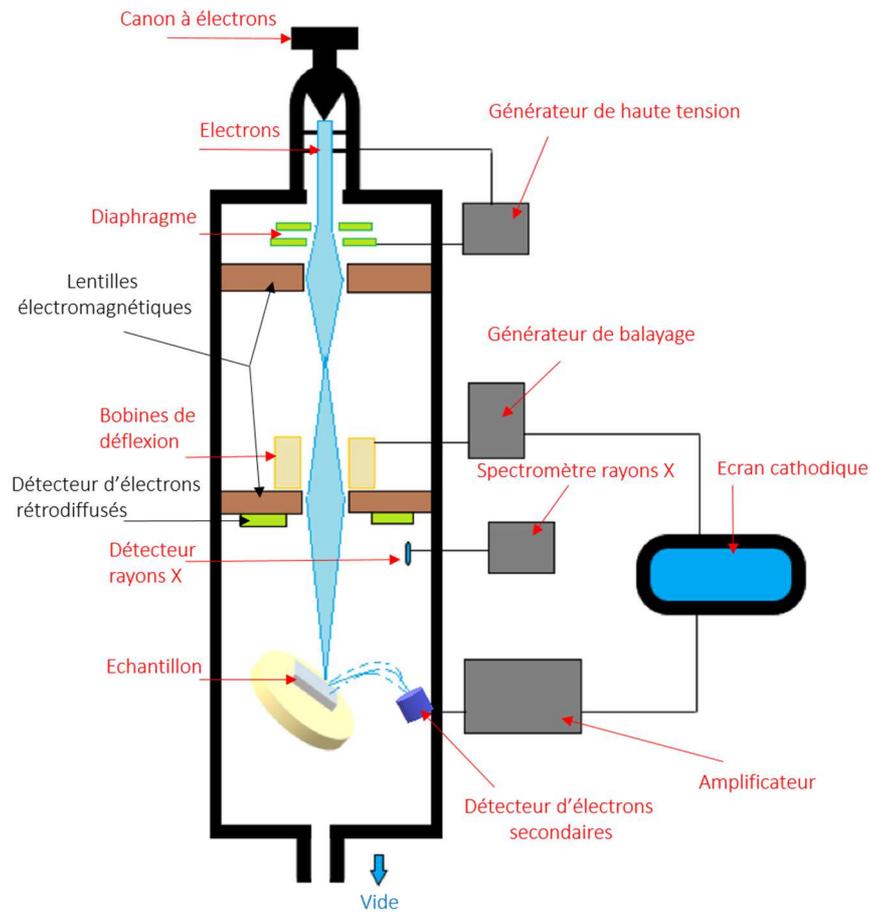


Figure II. 10. Schéma de principe de fonctionnement du Microscope électronique à balayage
Parmi celles-ci, on retrouve principalement :

- Les *électrons secondaires* « secondary electrons » appartiennent aux atomes de l'échantillon. Ils se font éjecter de leur couche électronique suite à l'ionisation de cette dernière par des électrons en provenance du canon. Ils possèdent une faible énergie de l'ordre de 50 eV.

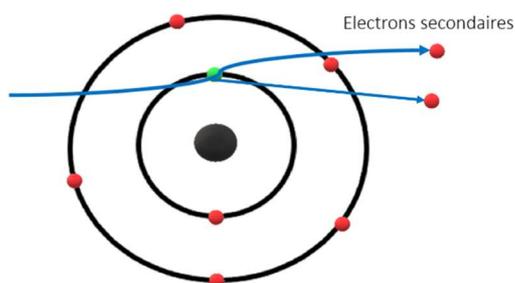


Figure II.11. Représentation de l'obtention des électrons secondaires

De fait, ils ne peuvent provenir que des couches superficielles (profondeur inférieure à 10 nm) de l'échantillon. Leur quantité est fonction des variations de surface. Ils permettent d'obtenir des images en relief ou topographiques. Ils sont aussi facilement collectés par un détecteur Everhart-Thornley (ETD) équipé d'une grille à laquelle on applique une tension positive (+250 V) d'où l'obtention d'un bon rapport signal/bruit. Le détecteur est un scintillateur qui va émettre des photons sous l'impact des électrons. Ce sont ces électrons qui sont utilisés pour obtenir les images de nos gels.

- Les électrons rétrodiffusés (30 keV) « back-scattered electron » sont des électrons primaires qui ont interagi avec les atomes mais qui ont été réémis avec une faible perte en énergie. Leur taux d'émission est fonction croissante du numéro atomique Z autrement dit les zones où sont concentrés des atomes de faible numéro atomique apparaîtront plus sombres. L'image obtenue est donc fonction de la nature des éléments qui constituent l'échantillon.

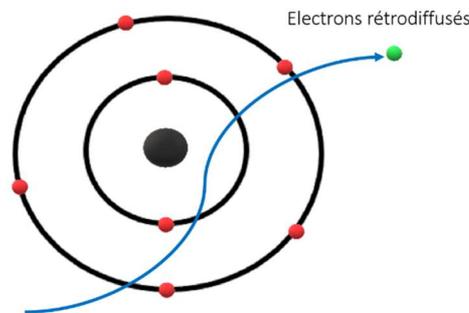


Figure II.12. Représentation de l'obtention des électrons rétrodiffusés

- Les rayons X possèdent une longueur d'onde de l'ordre de 0,03 à 10 nm. Ils sont le résultat de l'ionisation de couches internes d'un atome par les électrons primaires, suivi d'une désexcitation. Lorsque le MEB possède les détecteurs adéquats (WDS, wavelength dispersive spectroscopy, EDS, energy dispersive spectroscopy) il est possible d'analyser ces rayons et de déterminer la nature chimique des atomes présents dans la région imagée et leur proportion (microanalyse).

Certains microscopes électroniques à balayage sont équipés d'une chambre cryogénique permettant l'observation d'échantillons congelés. C'est le cryo-microscope électronique ou CryoSEM.

Les images de microscopie électronique à balayage en mode conventionnel ont été réalisées avec un microscope FEI modèle Quanta FEG 250 (FEI Company, Eindhoven, Pays-Bas) avec une tension d'accélération de 7,5 kV tandis que les images de microscopie en mode congélation « cryo » ont été obtenues à l'aide du CryoSEM (Microscope électronique à balayage à émission de champ ultra haute résolution Hitachi SU 8010, Chiyoda, Tokyo, Japon, équipe du Dr. Marc Schmutz, Institut Charles Sadron, CNRS).

C. Méthodes de caractérisation

1. Rhéologie

- **Cinétiques de gélification.**

Sauf indication expresse contraire, les mesures de cinétique de gélification ont été faites à une fréquence de 1Hz avec déformation constante de 1% à 25 °C pendant 3h. Une mesure a été effectuée toutes les 30 s.

- **Température.**

Sauf indication contraire, les mesures des modules ont été enregistrées à une fréquence de 1 Hz avec déformation de 1% sur une gamme de température allant de 25°C à 50°C avec une rampe de température égale à 1°C/min.

- **Adhésion.**

La quantification de l'adhésion des hydrogels sur des substrats solides d'acier a été effectuée après application d'une force constante de 1 N pendant 1 seconde avant la rétractation du plan supérieur. La durée de gélification préalable à la mesure et la vitesse de retrait du plan varie en fonction des besoins survenus pendant leur étude. Les mesures ont été enregistrées toutes les 10 ms jusqu'à l'apparition d'une force égale à zéro, correspondant à l'absence d'interactions entre le plan supérieur et le plan inférieur et donc à la rupture adhésive ou cohésive du gel. A la fin de chaque test, une photo a été prise afin d'estimer le type de rupture. La force $F(N)$ correspond à la force maximale enregistrée durant l'opération de traction du rhéomètre. L'énergie de fracture « W/A » ($J.m^{-2}$) a été calculée en intégrant l'aire sous la courbe après transformation du temps en distance et normalisée par la surface de la face supérieure (3.14 cm^2) en utilisant la relation suivante :

$$W/A = \frac{v}{S} \int_{t_0}^{t_{max}} F(t) dt \quad (16)$$

Avec W/A l'énergie de fracture ($J.m^{-2}$), v , la vitesse (m/s), et F la force de probe-tack (N) à l'instant t , et S l'aire du plan (m^2)

Soit, la force d'adhésion (FA):

$$FA = F_{max}/A_{collage} \quad (17)$$

Avec FA la force d'adhésion en **kPa**, F_{max} , la force maximale enregistrée (en **Newton**) sur les courbes de probe-tack (**Figure III.7**), $A_{collage}$, l'aire de la surface de collage (surface qui se trouve entre le cône et la plaque) en **m²**.

- **Autocicatrisation sur le long terme (3h).**

L'ensemble des expériences ont été faites à 1Hz à la température de 25°C. Le pourcentage de déformation a été appliqué sur une plage de 10% à 600% en fonction des réponses de l'hydrogel, objet de l'expérience. Chaque hydrogel a été sollicité 3h après le dépôt, puis toutes les heures (huit fois en tout).

- **Balayage en fréquence.**

Des expériences de balayage de fréquence (de 50Hz à 0,005Hz) ont été réalisées à une température constante de 25°C avec une déformation de 1% et 100% pour les gels vieillissants pendant 3h après le dépôt entre la plaque et le cône.

2. Autocicatrisation manuelle

Après 3h de gélification minimum, les hydrogels ont été découpés en deux parties et immédiatement recollés par un maintien d'une minute au niveau de la coupure. Cette opération a été faite trois fois. La première fois l'adhérence des hydrogels a immédiatement été testée de manière qualitative par le secouement du gel maintenu au niveau de l'un des côtés. La seconde fois, les hydrogels ont été secoués après 1h de repos dans une boîte de Petri et la troisième fois au bout de 24h.

3. Gonflements

a) En pratique

Les hydrogels ont été stockés dans de petites boîtes de Petri en polystyrène. Les expériences de gonflement peuvent être scindées en trois parties distinctes de 24h chacune. A la fin de chaque partie, les moyennes des taux (masse, diamètres, épaisseur) en gain, en perte et en recouvrement ont été mesurées avec un minimum de trois hydrogels par espèce représentée. Dans un premier temps, les hydrogels ont été immergés dans un tampon acétate de sodium (50 mM) à pH 5. Dans un second temps, ils ont été séchés à température ambiante sur une plaque en inox (pour éviter le repliement excessif des hydrogels). Enfin, ils ont été à nouveau immergés dans la solution

tampon à température ambiante. Au cours de la dernière étape, la cinétique de gonflement des gels a été suivie avec la prise en compte uniquement de la variation de masse.

b) Théories

Leur capacité de gonflement provient de plusieurs facteurs comme, le rapport entre le nombre de groupements hydrophiles et le nombre de groupements hydrophobes, le degré de réticulation ou le degré d'ionisation et les affinités avec les contre-ions [93].

Achilleos et Al. ont développé une technique pour visualiser en temps réel le gonflement d'un hydrogel basée sur la présence de fluorochromes photo-activables et liés de manière covalente au réseau [94]. Il est apparu que le processus de gonflement n'est pas un processus continu et s'arrête quand les forces d'élasticité et osmotiques atteignent un point d'équilibre. D'autres auteurs ont étudié la synérèse (expulsion d'un liquide à partir d'un gel) d'un gel suite à l'application d'une pression [95]. En matière de gonflement, la classification la plus importante des hydrogels reste celle basée sur la porosité [96]. Ainsi, on distingue les hydrogels non-poreux, des microporeux, des macroporeux et des super-poreux. Les polymères non-poreux ont une distance de chaîne entre deux points de réticulation ξ comprise entre 10 et 100 Å, les microporeux entre 100 et 1000 Å, les macroporeux entre 0.1 et 1 μm et les super-poreux au-delà (environ de 100 μm). Chacun des types de gels possède des comportements types lors de leur gonflement. Les matériaux non-poreux absorbent l'eau via la création de liaisons (tout comme les microporeux et les macroporeux). Les molécules d'eau diffusent dans les volumes libres de manière très lente. De tels matériaux sont utilisés pour mimer les comportements du tissu musculaire. L'imbibition au sein des matériaux microporeux est lente et combine à la fois le phénomène de diffusion moléculaire et un phénomène de convection (transport via une force extérieure) dans les pores remplis d'eau. Ces matériaux sont utilisés dans le domaine biomédical pour une libération contrôlée de principes actifs. La diffusion dans les matériaux macroporeux est rapide et est la résultante de la diffusion de l'eau dans les pores. Les macroporeux font partie de la catégorie des superabsorbants. Enfin, la diffusion (très rapide) dans les matériaux super-poreux repose sur les forces de capillarité.

L'étude du gonflement des hydrogels repose sur une procédure particulière qui passe par une immersion *post-gélification*, un séchage puis une seconde immersion dans un milieu aqueux. L'étude du gonflement d'un hydrogel permet d'avoir une idée sur la résistance et le comportement du matériau en conditions humides. L'absorption d'un solvant peut s'accompagner d'un changement morphologique de l'hydrogel, changement qui, peut avoir comme conséquences néfastes la survenue de fissures [97]. Il existe plusieurs modèles de diffusion (Fickienne, pseudo-Fickienne, non-Fickienne...). Classiquement, la diffusion peut donner trois états [98]. Le premier consiste dans la diffusion des molécules du solvant à travers l'hydrogel. Le second consiste dans la relaxation des chaînes de l'hydrogel suite à l'hydratation du réseau et le troisième consiste dans l'extension du polymère dans le réseau. Ces trois états peuvent être plus ou moins importants en fonction de l'hydrogel considéré.

Les différents types de régimes de diffusion ont été résumés par Y. J. Weitsmann [99].

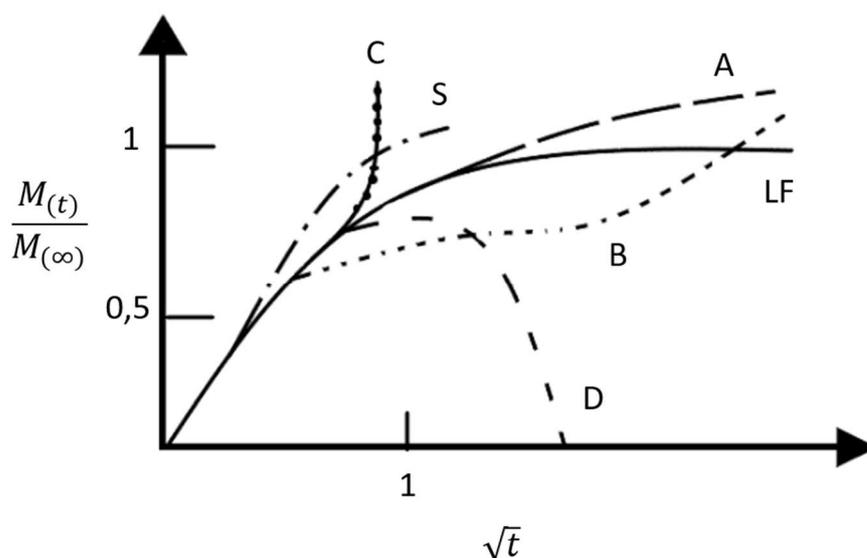


Figure II.13. Résumés des différentes de courbes des taux de gonflement (ordonnée) en fonction de la racine carré du temps, telles que représentées par Y. J. Weitsmann [99]

La courbe A (modèle de Dual-Fick) représente un hydrogel dont le gain en masse n'atteint pas d'état d'équilibre. La courbe B représente le cas où il y a deux phases de diffusion. Pour ces types de courbes, les effets des fluides sont insignifiants et le séchage permet une réversibilité de la diffusion. De telles données sont retrouvées majoritairement pour des matériaux polymères et composites.

La courbe C représente le cas où la diffusion est tellement rapide que cela fissure le polymère, et au final, fini par le fracturer. La courbe D correspond à une perte de masse attribuable à la fracture du polymère. La fracture prend la forme principalement d'une séparation entre les fibres et le polymère du fait d'une lixiviation (dissolution de composés par percolation lente) dans les régions aux interfaces fibres/matrice et par hydrolyse des parties de chaînes du polymère. Elles représentent des situations irréversibles. Elles sont le plus souvent attribuables aux polymères composites.

La courbe LF représente la diffusion Fickienne où, après une diffusion linéaire, le polymère arrive un à point d'équilibre.

La courbe S est associée à un front mobile de diffusion.

4. Tests de viabilité

Tests MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium) sur des extraits. Après leur préparation, les hydrogels ont été stérilisés pendant 45 min sous UV. Les hydrogels à gélification immédiate possédant soit un pourcentage de gélatine supérieur à 60% p/v soit des concentrations élevées en catéchol et/ou une concentration suffisante en NaIO_4 (qui donne lieu à effet de mercerisation) ont pu être utilisés immédiatement après leur préparation. Pour les autres, un minimum de 3h a été attendu.

Ils ont ensuite été immergés pendant 24h dans l'incubateur à 37°C dans le milieu de culture dit « classique » (DMEM High glucose, 10% FBS (Sérum de veau Fœtal), 1% de PS (Pénicilline-Streptomycine)) en utilisant un ratio volumique qui se rapproche au mieux de la norme ISO 10993-5 (1 ml pour 6 cm² de matériau) en ce qui concerne le ratio ml de milieu et matériau seulement. En prenant en compte le gonflement des hydrogels, nous avons choisi un ratio de 1 g d'hydrogel pour 5 ml de milieu. Les extraits ont été utilisés pour l'ensemencement de plaques de 96 puits contenant des cellules NIH 3T3 (fibroblastes murin). Les plaques contiennent une ligne de contrôles négatifs (sans cellules avec des extraits) et une ligne de contrôles positifs (avec cellules et avec le milieu classique). Lesdites plaques ont été incubées pendant 24h. Les milieux ont été retirés et les puits lavés au tampon phosphate salin (PBS). 100 µl de MTT dilué au dixième ont été ajoutés aux différents puits qui ont fait l'objet d'une incubation d'1h30. Le surplus de liquide a été enlevé en prenant soin de laisser les cristaux de Formazan et 100 µl

de DMSO ont été ajoutés pour leur dissolution. Chaque puit a fait l'objet d'une agitation avec la micropipette (par le mouvement de « up and down ») et les embouts ont systématiquement été changés. Les plaques ainsi prêtes ont été analysées à l'aide du spectromètre SAFAS à 570 nm.

Etude de la dégradation des hydrogels. Chaque hydrogel a été laissé à gélifier à l'air libre pendant 3h puis a été réparti en deux lots différents. Ils ont fait l'objet d'une découpe et d'un pesage afin d'obtenir un triplicata par milieux étudiés. Le premier lot comporte l'hydrogel sous sa forme hydratée et le second lot comporte l'hydrogel sous sa forme séchée (37°C à l'étuve pendant 24h). Chaque lot comporte trois milieux d'étude ; un milieu cellulaire DMEM High Glucose (réf. L0103-500, lot MSO12U, 09/23), le même milieu avec en plus 10% de FBS et 1% de PS, et un milieu PBS. Les hydrogels ont été pesés à chaque moment du processus (à 3h après leur synthèse, après leur séchage complet et tous les jours de l'expérience). Ils ont été placés dans des plaques de 24 puits et 1 ml de milieu a été ajouté. L'expérience de dégradation a duré entre 4 et 5 jours (en fonction de la résistance des gels) à compter de l'immersion des hydrogels.

5. Imagerie

Les échantillons ont été imagés sans préparation préalable dans le cadre de l'AFM. Pour les images acquises au MEB et avec le microscope Keyence, une procédure de lyophilisation sans ajout d'additifs et d'agents réticulant a été développée pour l'occasion.

Lyophilisation et traitement des hydrogels. 0,4 ml de gel ont été versés dans des cryotubes Cryo.sTM Greiner bio-one (Grosseron, Coueron, France) pour une congélation à -80°C. Le temps de gélification à température ambiante (récipients fermés) a été ajusté à 24h (sur la base de la vitesse de gélification des gels les plus faibles). Ils ont été mis dans des tubes en polypropylène à fond rond pour permettre une congélation plus régulière. Ces tubes ont été transférés dans des bouteilles de lyophilisation et congelés directement à -80°C pendant 4h. Les échantillons ont été lyophilisés à l'aide du lyophilisateur Alpha 1-4LD plus (Christ, Osterode, Allemagne) sous une pression de 0.024 mbar (-54°C en piège à froid) pendant 16h. Les échantillons d'éponge obtenus ont été sectionnés horizontalement et verticalement (pour voir la présence de mousses) à l'aide d'une lame de rasoir. Ils ont été utilisés en l'état pour les images de microscopie numérique (Keyence).

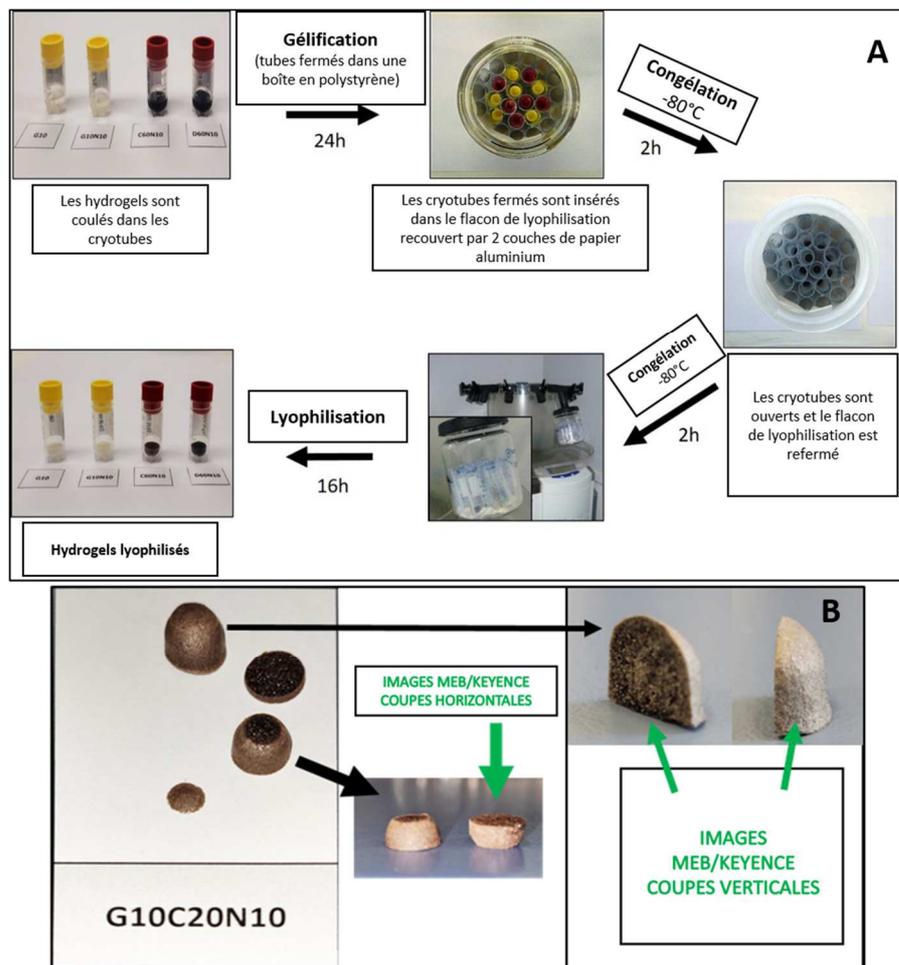


Figure II.14. A). Étapes de la lyophilisation en image [35]. **B).** Exemples d'échantillons coupés. Vue utilisée pour la prise d'images (flèche verte).

Pour la microscopie électronique à balayage, les coupes ont été montées sur des stubs avec de la laque carbonée (Oxford Instruments, Gometz la Ville, France). Elles ont ensuite été recouvertes à l'aide d'un dispositif de pulvérisation HUMMER JR (Technics, Union City, CA, USA) équipé d'une cible en or et palladium.

VHX-5000 Keyence. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Sigma-Plot (version 11.0). La mesure de la taille des pores a été effectuée sur au moins trois échantillons différents, avec un minimum de 400 mesures par type d'hydrogel en haute résolution, avec un zoom x500, en mode annulaire complet.

MEB FEI Quanta FEG 250. La microscopie électronique à balayage a été réalisée avec un microscope FEI Quanta FEG 250 (FEI Company, Eindhoven, Pays-Bas) avec une tension d'accélération de 7,5 kV.

CryoSEM. Les images ont été faites par Alain Carvalho de l'équipe du Dr. Marc Schmutz, à l'Institut Charles Sadron du CNRS. Le gel est plongé rapidement dans l'éthane liquide puis inséré verticalement entre les mâchoires de l'étau du support qui a été préalablement placé à l'intérieur d'un caisson rempli d'azote liquide. Lors de la plongée, l'échantillon est rapidement congelé par contact direct avec l'éthane liquide et reste à basse température même pendant le court transfert vers le porte-échantillon. Le support avec l'échantillon est rapidement transféré sous vide dans la chambre de préparation cryogénique de la machine Quorum PT 3010 fixée au microscope. Là, l'échantillon est fracturé et une légère gravure à -90°C pendant 6 min peut être effectuée pour rendre la structure plus visible. L'échantillon est finalement transféré dans le FEG-cryoSEM et observé à 1kV à -150°C.

III. Partie expérimentale 1 : optimisation des composants des adhésifs

Cette partie concerne les manipulations faites dans le cadre de la thèse. Elles ont donné lieu à 2 articles publiés. Cette partie concerne les manipulations faites dans le but d'optimiser la composition des adhésifs. Dans ce cadres les agents réticulants catéchol, pyrogallol et dopamine ont été comparés. Le premier paragraphe **A)** concerne l'optimisation de la gélatine et du periodate de sodium (NaIO_4). Le second paragraphe **B)** concerne à la fois l'optimisation du periodate de sodium (NaIO_4) en fonction d'une concentration fixe en gélatine et composés phénoliques et l'optimisation des composés phénoliques en fonction d'une concentration fixe en gélatine et periodate de sodium (NaIO_4). Le troisième paragraphe **C)** concerne les caractérisations spectroscopiques des hydrogels. Une conclusion **D)** sur l'ensemble des résultats obtenus viendra clore cette partie.

A. Optimisation préliminaire des concentrations en gélatine B (250 Bloom) et en periodate de sodium (NaIO_4) : 1 paramètre fixe contre 1 paramètre variable.....	III-42
1. Cinétique de gélification	III-42
a) Gélatine variable (6% → 30% p/v) et NaIO_4 fixe (10 mM).....	III-42
b) NaIO_4 variable (10 mM → 90 mM) et gélatine fixe (10% et 20% p/v)	III-43
2. Balayage en température.....	III-46
3. Caractérisations IR et UV-vis	III-47
4. Conclusions/discussions.....	III-49
B. Optimisation en concentration des réactifs des hydrogels (oxydants, composés phénoliques) : 2 paramètres fixes contre 1 paramètre variable.....	III-50
1. NaIO_4 variable (10 mM → 30 mM) et gélatine + composés phénoliques (catéchol/ pyrogallol) fixes (gélatine 10% p/v + 10 mM composés phénoliques)	III-50
a) Mesures des modules de conservation (G') et de perte (G'') : cinétique de gélification.....	III-50
b) Mesures de probe-tack : force (N) et énergie de rupture (J/m^2)	III-52
c) Mesures d'autocicatrisation.....	III-54
d) Balayage en température.....	III-58
e) Gonflement.....	III-59
f) AFM.....	III-65
g) Conclusions/discussions.....	III-66
2. Composés phénoliques (catéchol/ dopamine) variables (3,3 mM → 100 mM) et gélatine + NaIO_4 fixes (gélatine 10% p/v + 10 mM NaIO_4)	III-67
a) Mesures des modules de conservation (G') : cinétique de gélification	III-67
b) Mesures de probe-tack : force et énergie de rupture.....	III-69
c) Balayage en température.....	III-70
d) Balayage en fréquence	III-72
e) Caractérisation de la taille des pores par microscopie numérique et électronique.....	III-74
f) Conclusions/discussions	III-85
C. Caractérisations des composants des hydrogels par UV-vis et IR.....	III-85
1. Hydrogels de pyrogallol.....	III-86
2. Hydrogels de catéchol.....	III-87
3. Hydrogels de dopamine	III-90
4. Conclusions/discussions.....	III-94
D. Conclusions/discussions : partie expérimentale 1	III-95

A. Optimisation préliminaire des concentrations en gélatine B (250 Bloom) et en periodate de sodium (NaIO_4): 1 paramètre fixe contre 1 paramètre variable

Le but de ces expériences est de déterminer la concentration optimale en gélatine B (250 Bloom) et en NaIO_4 afin d'utiliser cette base pour les manipulations futures.

1. Cinétique de gélification

a) Gélatine variable (6% → 30% p/v) et NaIO_4 fixe (10 mM)

Les cinétiques de gélification de la gélatine ont été suivies à l'aide du rhéomètre Kinexus sur une période de 3h à 25°C, avec une fréquence de 1Hz et 1% de déformation. Les données sont acquises toutes les 30 secondes. Les valeurs finales de G' et de G'' prises à la fin des 3h de mesure ont été tracées à l'aide d'une représentation double logarithmique afin d'établir le rapport de proportionnalité (avec une courbe de type $ax + b$) par rapport à la concentration en gélatine (**Figure III.1B**). L'obtention d'un tracé linéaire dans ce mode de représentation signifie que les modules G' et G'' varient comme une loi de puissance de la concentration en gélatine. La valeur de a obtenue lors de la régression linéaire correspond alors à la valeur de l'exposant de la loi de puissance.

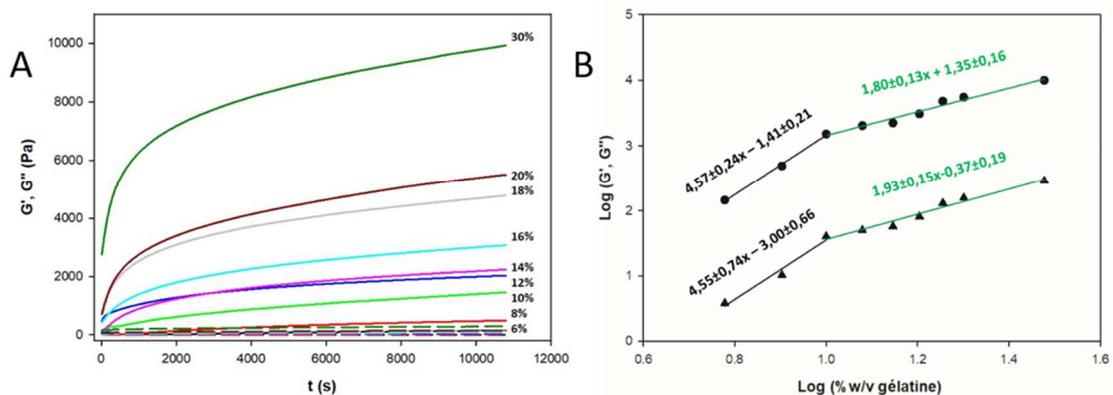


Figure III.1. Suivi rhéologique (3h, 1Hz, 1% de déformation en cisaillement) de la cinétique de gélification de la gélatine + 10 mM NaIO_4 . **A**). Cinétique de gélification de la gélatine de 6% à 30% p/v + NaIO_4 10 mM (du noir au vert foncé, les concentrations massiques sont indiquées à côté de chaque courbe). Les courbes de module de conservation (G') correspondent aux lignes pleines et les courbes de module de perte (G'') correspondent aux lignes pointillées. **B**). Modules de conservation (G' , ●) et de perte (G'' , ▲) à la fin de la cinétique de gélification. Les lignes noires représentent la concentration de gélatine de 6% à 10% p/v et les lignes vertes de 10% à 30% p/v.

Avec un coefficient de corrélation linéaire égal à 0,99, on obtient ($a = 4,57 \pm 0,24$, $b = -1,41 \pm 0,21$, ligne noire) et ($a = 1,80 \pm 0,13$, $b = 1,35 \pm 0,16$, ligne verte) pour G' et de ($a = 4,55 \pm 0,74$, $b = -3,00 \pm 0,66$, ligne noire) et de ($a = 1,93 \pm 0,15$, $b = -0,37 \pm 0,19$, ligne verte) pour G'' . Sur l'ensemble de la gamme considérée (de 6% à 30% p/v), l'évolution de G' suit une loi de puissance de 2,55. Cette valeur est plus proche d'un polymère physique (2,25) que

d'un solide cellulaire (2) selon Oyen [100]. Globalement, la littérature fait état d'une relation de type $G' \propto C^2$ sur différentes gélatines et sur différentes gammes de concentration [101–104].

Nous savons que la trop grande vitesse de refroidissement des gels donne lieu à une perte de résistance possible de 10 à 15% [60] du fait de la perte des possibilités d'alignement et de réticulation des molécules. Dans le cas de l'espèce, l'encombrement stérique dû à une concentration trop élevée entraîne les mêmes pertes. D'après les données de la **Figure III.1B**, il semble légitime de supposer qu'une concentration supérieure à 10% p/v diminue la possibilité d'alignement et de réticulation des molécules. *10% p/v représentera pour la suite des manipulations, la valeur optimale en gélatine.*

La question de savoir si la présence de l'oxydant NaIO_4 n'affecte pas les propriétés de la gélatine doit être posée car cet oxydant fort peut modifier les propriétés chimiques et mécaniques des chaînes de gélatine (**Figure III.2**). Pour cela, des manipulations de la cinétique de gélification (dupliquées ou triplées) à deux concentrations différentes de gélatine (10% p/v et 20% p/v) avec différentes concentrations de NaIO_4 ont été réalisées.

b) NaIO_4 variable (10 mM \rightarrow 90 mM) et gélatine fixe (10% et 20% p/v)

Il ressort de la **Figure III.2B** que l'augmentation de la concentration en NaIO_4 n'affecte pas beaucoup le module de conservation (G') des gels de gélatine à 20% p/v. Avec 90 mM de NaIO_4 , le G' a diminué de seulement 19% alors que la gélatine à 10% p/v a perdu 58%. La concentration constitue une protection contre la dégradation oxydative du periodate de sodium (NaIO_4) ainsi que contre l'augmentation de la force ionique de la solution. L'augmentation de la force ionique des solutions de gélatine est connue pour perturber les interactions électrostatiques des chaînes α , qui peinent à entrer en contact [105] (diminution de 50% de la valeur de G' pour la gélatine de poisson de 12 mM à 250 mM de NaCl). L'interaction électrostatique la plus importante est la liaison hydrogène. Ce sont les liaisons hydrogènes qui lient les chaînes α entre elles pour former des hélices. La liaison hydrogène est une liaison directionnelle qui donne la rigidité aux matériaux.

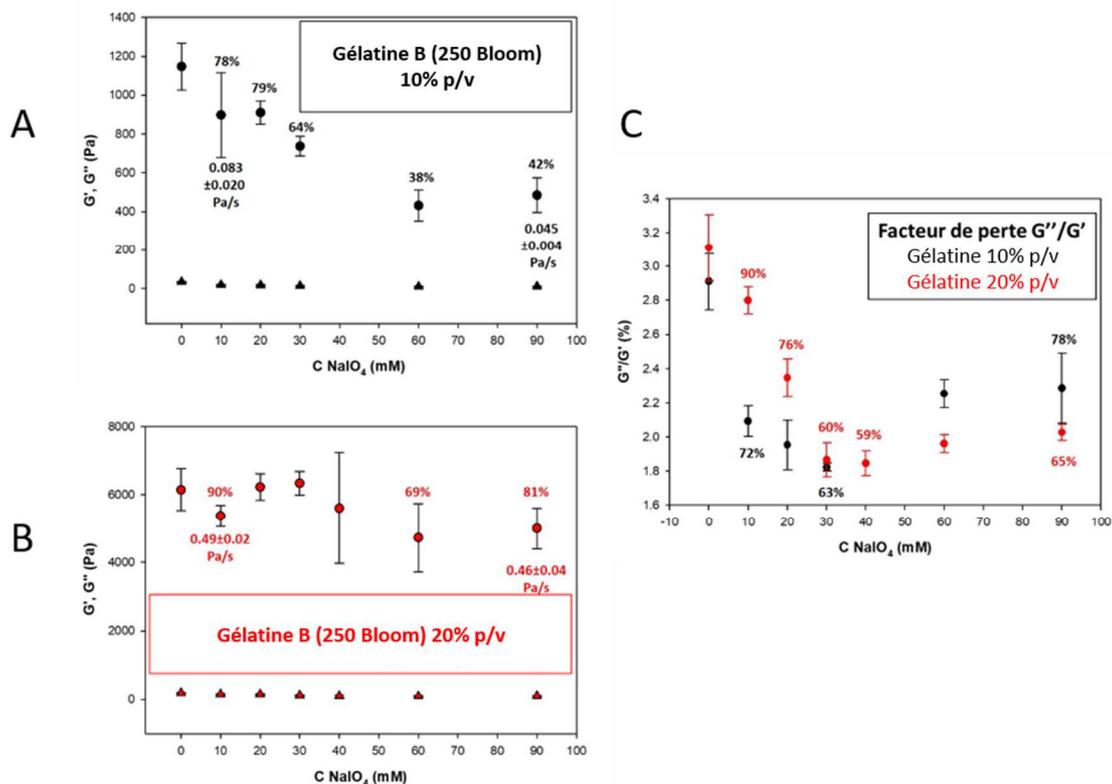


Figure III.2. Suivi rhéologique de la cinétique de gélification de la gélatine 10% et 20% p/v à concentration en periodate de sodium (NaIO_4) variable. (Gauche) Modules de conservation G' (●) et de perte G'' (▲) de la cinétique

de gélification de la gélatine 10% p/v (A) et 20% p/v (B) avec différentes concentrations de NaIO₄ après 3h de gélification (avec une déformation de 1%, 1Hz, à 25°C). Les valeurs en Pa/s représentent la vitesse après 3h de gélification. C). Facteurs de perte (G''/G') des figures de gauche ((•), 10% p/v gélatine et (•), 20% p/v gélatine)).

Les écart types proviennent du fait que la gélatine a une polymolécularité de 2. Cela signifie que la distribution en masse et en taille des chaînes de polymère n'est pas homogène [60].

L'ensemble des données brutes de la Figure III.2 sont reportées dans le Tableau III.1.

Gélatine % (p/v)	NaIO ₄ (mM)	G' (Pa) ±1	G'' (Pa) ±0,1	G''/G' (%) ±0,1	Vitesse 3h (Pa/S)
10%	0	1104	33,3	3	0,11±0,01
		1055	31,6	3	
		1283	34,9	2,7	
	10	693	15	2,2	0,08±0,02
		1128	22,5	2	
	20	874	18,7	2,1	0,08±0,01
		780	15	1,9	
		884	16,1	1,8	
	30	978	20,6	2,1	0,07±0,01
		795	14,4	1,8	
		697	12,6	1,8	
	60	719	13,3	1,9	0,04±0,01
342		7,9	2,3		
459		10,6	2,3		
90	496	10,7	2,2	0,04±0,01	
	391	9,8	2,5		
	568	12	2,1		
20%	0	498	11,2	2,2	0,57±0,04
		6636	207	3,1	
		5453	180	3,3	
	10	6348	184,8	2,9	0,49±0,02
		5596	152	2,7	
		5014	143	2,8	
	20	5507	156,7	2,8	0,57±0,03
		6152	161,5	2,6	
	30	5877	133	2,3	0,58±0,02
		6658	154	2,3	
		6639	131	2	
	40	5968	111,1	1,9	0,05±0,09
		6410	113,6	1,8	
		5701	92,5	1,6	
	60	7193	139,3	1,9	0,43±0,06
		3922	70,7	1,8	
		4836	97,8	2	
	90	3669	71	1,9	0,46±0,04
		5675	109,5	1,9	
		4452	92,7	2,1	

		4920	98,4	2	
		5628	112,8	2	

Tableau III.1. Tableau récapitulatif des données brutes obtenues au cours des expériences dont les résultats sont reportés dans les Figures III.1 et III.2 (cinétique de gélification de la gélatine 10% et 20% p/v à concentration en periodate de sodium (NaIO_4) variable).

À température ambiante, le periodate de sodium (NaIO_4) est connu comme un oxydant spécifique des diols vicinaux ou des aminoalcools (résidus N-terminaux de la sérine et de la thréonine ou de l'hydroxylysine) qui produit du formaldéhyde [106]. Le formaldéhyde, en tant qu'agent de réticulation, peut lier les molécules proches de sa formation [107,108]. Il n'est pas exclu que le processus de chauffage du periodate de sodium (NaIO_4) donne lieu à des radicaux et/ou des réactions oxydatives sur les parties internes de la gélatine. La proximité des peptides dans la gélatine 20% p/v peut empêcher l'insertion du periodate de sodium (NaIO_4) entre les chaînes et/ou favoriser la réticulation des espèces formaldéhydes. En revanche, la gélatine 10% p/v ne semble pas avoir le même effet protecteur, sauf à considérer que le passage de 10 mM à 20 mM de NaIO_4 n'affecte plus la valeur de G' (Figure III.2A). Cette dernière observation suggère que 10 mM de NaIO_4 constitue le maximum pour oxyder totalement la gélatine. En ajoutant 10 mM de NaIO_4 en plus (20 mM au total), seul le module de perte (G'') est affecté (Figure III.2C).

2. Balayage en température

Les expériences de balayage en température permettent de déterminer les températures de transition de phase des hydrogels. Aussi, à mesure que la température monte, le polymère (hydrogel) peut passer la phase gélifiée (Gel) à la phase liquide (Sol) ($T_{gel-sol}$), de la phase gélifiée/solide à un état caoutchoutique (T_g , température de transition vitreuse) ou d'un état solide à l'état liquide (T_f , température de fusion). Elles permettent également de révéler la présence de particules ou de domaines hétérogènes.

Nos expériences de température révèlent la présence de cristaux de NaIO_4 à 30 mM pour la gélatine 10% p/v et 40 mM pour la gélatine 20% p/v (Figure III.3A (photo) et Figure III.3B (symboles avec une croix à l'intérieur)). Par conséquent, la diminution du module de conservation (Figure III.2) est certainement due au cisaillement physique des chaînes de polymère ainsi qu'au ralentissement de la vitesse de gélification dû à l'augmentation de la force ionique de la solution.

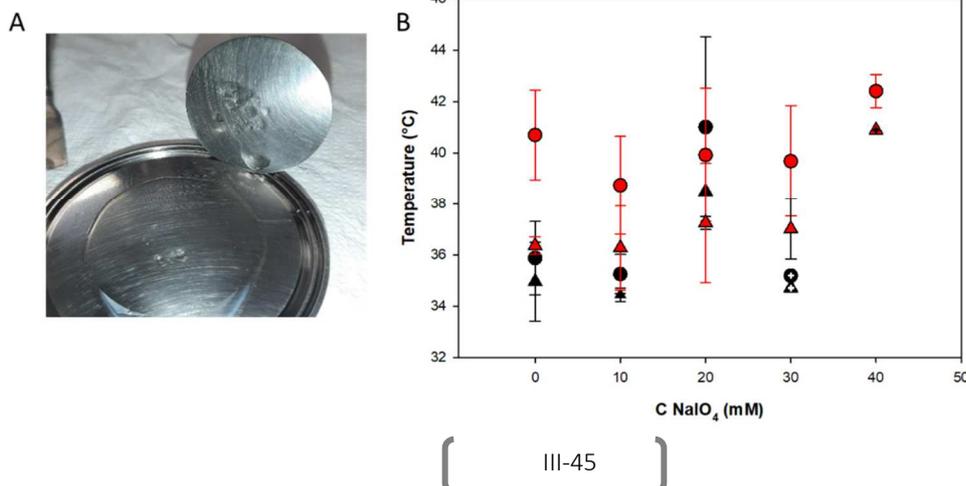


Figure III.3. Expérience de balayage en température des hydrogels à 10% et 20% p/v en gélatine et à concentration en NaIO_4 variable. A) Photo *post* expérience de balayage en température révélant la présence de particules de periodate de sodium (NaIO_4). B) Températures des transitions gel-sol par la méthode du croisement (\blacktriangle) et par le facteur de perte (\bullet). Les expériences de balayage en température ont été réalisées à 1Hz et avec une déformation de 1%, d'une température initiale de 25°C à une température finale de 50°C, à une vitesse de chauffage de 1,0°C.min⁻¹.

Il faut cependant noter que la présence de NaIO_4 jusqu'à 30 mM n'affecte pas la transition gel-sol (**Figure III.3B**). Cette transition peut être déterminée par la méthode du « crossover » (lorsque G'' dépasse G') ou par la méthode du facteur de perte (le point le plus haut de la courbe G''/G'). Selon la revue de S. Gunasekaran [75], la majorité des matériaux alimentaires amorphes ont une gamme de température (voir pour les glucides [109], pour l'amidon natif [110]). La relation inverse ($T_{\text{sol-gel}}$) n'a pas été déterminée dans cette étude. Pour cela, Ross-Murphy [76] préconise d'utiliser la méthode de Winter-Chambon [78] (lorsque $\tan \delta$ devient indépendant de la fréquence) ou de considérer comme les industriels, qu'il est à -5°C par rapport au $T_{\text{gel-sol}}$ [60].

C'est au vu des considérations précédentes (Figures III.1-3) qu'il a été envisagé de comparer les espèces dopamine et catéchol avec 10% p/v de gélatine et 10 mM de NaIO_4 . Cette molarité a été considérée comme l'optimum requis pour oxyder les espèces dopamine ou catéchol sans trop endommager la gélatine elle-même. Par endommager on entend ici une diminution significative des modules de conservation et de perte.

3. Caractérisations IR et UV-vis

Il s'agit de déterminer l'allure des spectres IR et UV-vis de la gélatine et du periodate de sodium (NaIO_4) (idée de la composition chimique) afin de constituer une référence pour la suite des études.

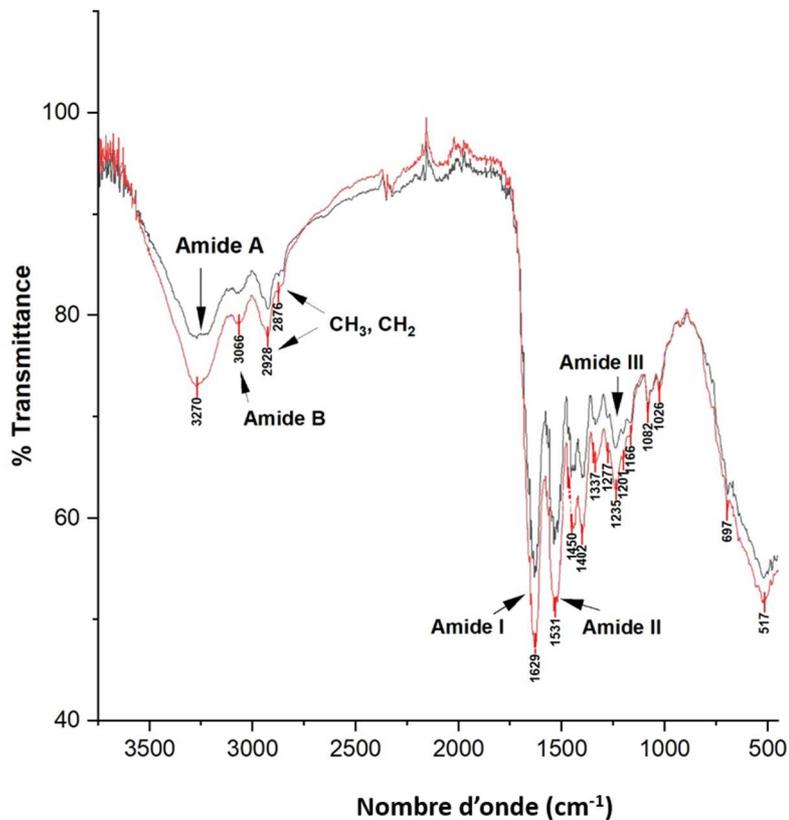


Figure III.4. Comparaison entre le spectre de la gélatine de type B (G_{10} , ligne noire) et de la gélatine avec 10 mM de periodate de sodium (NaIO_4) (G_{10N10} , ligne rouge).

Il existe deux différences notables entre les spectres des espèces G_{10} (gélatine 10% p/v) et G_{10N10} (gélatine 10% p/v + 10 mM NaIO_4). La première est l'intensité plus élevée des pics de G_{10N10} . Soit, l'espèce est plus concentrée, soit, la présence de periodate de sodium (NaIO_4) accentue le moment dipolaire. La deuxième différence concerne le rapport de l'intensité des pics à 1235 cm^{-1} (Amide III) et 1450 cm^{-1} (Proline, Hydroxyproline). Il est habituel d'utiliser le rapport des intensités des pics à 1235 nm (amide III) et 1450 nm (proline, hydroxyproline) pour déterminer le degré de perturbation des chaînes alpha [111]. Dans le cas du collagène, le rapport des pics est égal à 1, lorsque les chaînes sont dans leur conformation native. L'application analogue pour la gélatine bovine de type B donne un rapport ($I_{1450\text{ cm}^{-1}}/I_{1235\text{ cm}^{-1}}$) de 0,9701. L'ajout de periodate de sodium (NaIO_4) seul (10 mM) entraîne un changement de -2,24%. Ce résultat laisse à penser que les chaînes α sont perturbées par la présence de periodate de sodium (NaIO_4), ce qui corrobore la Figure III.2.

La gélatine (Figure III.5) et le periodate de sodium (Figure III.6) ont été caractérisées par spectroscopie UV-Vis dans le but de pouvoir éventuellement utiliser les données pour des études portant sur le relargage des composés des adhésifs.

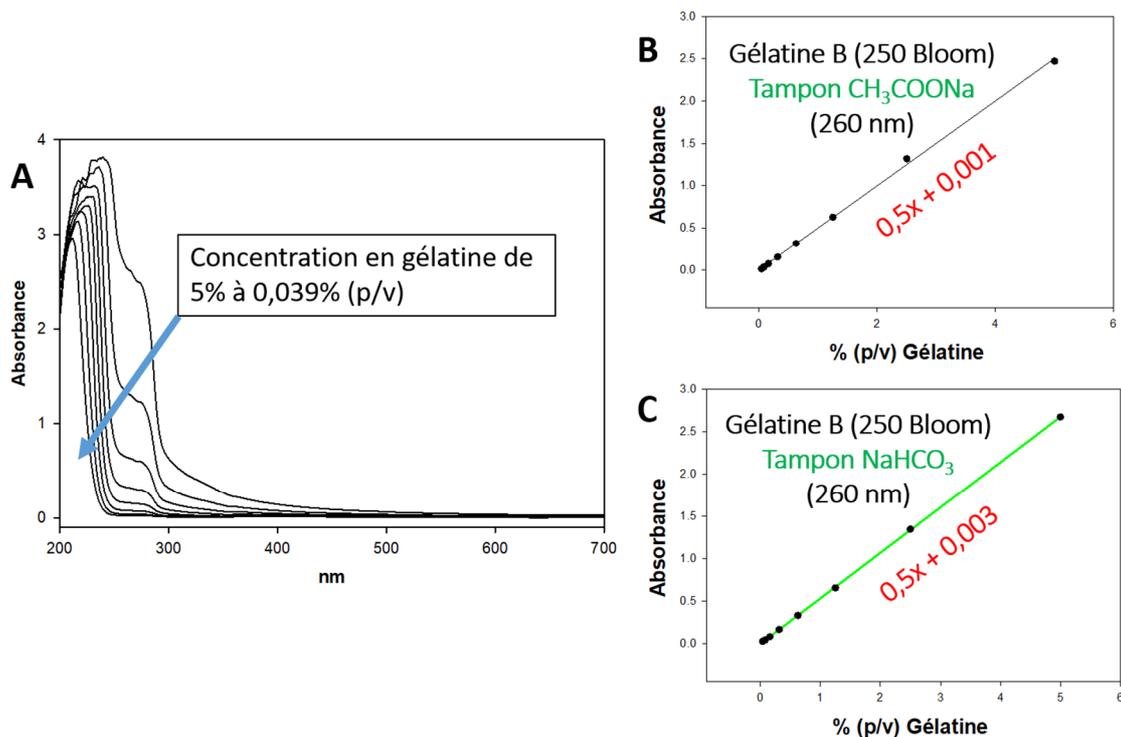


Figure III.5. A). Spectre UV-vis de la gélatine B (250 Bloom) dans le tampon hydrogénocarbonate de sodium (8 spectres d'une concentration de 5% à 0,039% p/v). Droites d'étalonnage correspondantes ($ax + b$) dans le tampon acétate de sodium ($a = 0,5$) (haut **B**) et le tampon hydrogénocarbonate de sodium ($a = 0,5$) (bas **C**).

Tous les acides aminés absorbent dans l'ultraviolet lointain (~ 220 nm). Le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine ont un maximum d'absorption à 278, 275 et 260 nm respectivement. La gélatine ne possède pas de tryptophane. C'est le pic de la phénylalanine qui a été choisi pour déterminer les droites d'étalonnage de la gélatine dans 2 tampons différents (CH_3COONa et NaHCO_3).

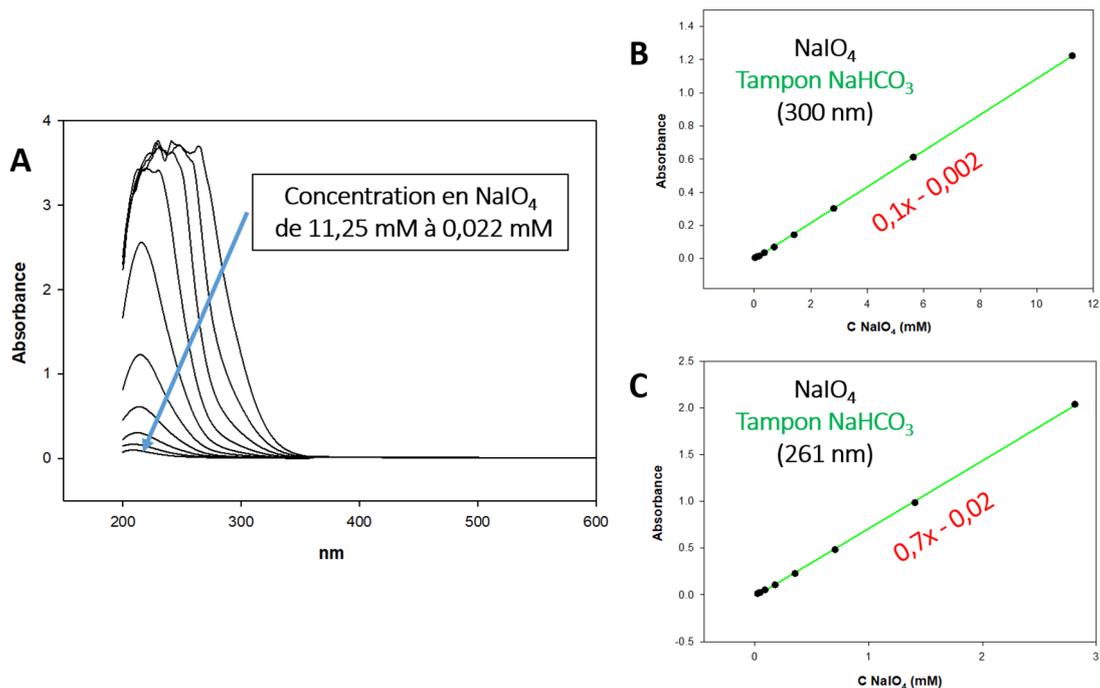


Figure III.6. A). Spectre UV-vis du NaIO_4 dans le tampon hydrogénocarbonate de sodium (10 spectres d'une concentration de 11,25 mM à 0,022 mM). B). Droites d'étalonnage ($ax + b$) correspondantes à 300 nm ($a = 0,1$) (haut) et C) 261 nm ($a = 0,7$) (bas).

Deux droites d'étalonnages semblent possibles à établir pour le periodate de sodium (NaIO_4) (261 et 300 nm). Les deux courbes (gélatine seule et periodate de sodium (NaIO_4) seul) parce qu'elles se superposent, ne permettent pas d'envisager de manière précise des études de libération de ces composants à partir des gels.

4. Conclusions/discussions

Les expériences rhéologiques de la cinétique de gélification de la gélatine (**Figure III.1**) nous ont permis de déterminer que la concentration optimale de la gélatine est de 10% p/v. En deçà de cette valeur, le module de conservation G' n'est pas suffisant pour assurer une base solide aux hydrogels futurs. Cette même figure révèle que les concentrations supérieures à 10% p/v réduisent les chances d'alignement des molécules et donc de réticulation.

Les déterminations rhéologiques de la cinétique et du balayage en température (**Figures III.2,3**) de la gélatine à concentration en NaIO_4 variable nous ont permis de déterminer que la gélatine à 20% p/v est très peu affectée par la présence de periodate de sodium (NaIO_4) même en excès. A 90 mM en periodate de sodium (NaIO_4), le module de conservation n'a perdu que 19% de sa valeur initiale. Les températures de transition Gel-Sol restent les mêmes sur une gamme allant de 35°C à 43°C pour la gélatine 20% p/v et de 33°C à 45°C pour la gélatine 10% p/v malgré l'augmentation de concentration en periodate de sodium (NaIO_4). Le spectre **Figure III.4** corrobore la **Figure III.2** en révélant que la présence de periodate de sodium (NaIO_4) perturbe les chaînes α de la gélatine à 10% p/v.

Les courbes UV-vis (**Figures III.5, 6**) de la gélatine et du NaIO_4 montrent que ces deux composants seront difficilement décelables puisqu'elles se superposent. Cela signifie qu'elles seront difficilement exploitables pour des études futures, notamment en ce qui concerne la libération de substances potentiellement cytotoxiques à partir des hydrogels.

Au vu des résultats de la **Figure III.1**, il apparaît que la concentration optimale pour optimiser les autres composants est de 10% p/v. C'est donc cette concentration qui nous servira de base pour les futures études d'optimisations.

B. Optimisation en concentration des réactifs des hydrogels (oxydants, composés phénoliques) : 2 paramètres fixes contre 1 paramètre variable

Nous avons décidé de fixer la concentration en gélatine à 10% p/v. Donc, dans un premier temps il conviendra de fixer la concentration en composés phénoliques à 10 mM et de changer la concentration en periodate de sodium (1). Dans un second temps, il conviendra de fixer la concentration en periodate de sodium à 10 mM et de changer la concentration en composés phénoliques (2).

1. NaIO_4 variable (10 mM \rightarrow 30 mM) et gélatine + composés phénoliques (catéchol/ pyrogallol) fixes (gélatine 10% p/v + 10 mM composés phénoliques)

L'optimisation des concentrations en composants des adhésifs s'est faite au regard des expériences de cinétique de gélification (a), de probe-tack (b), de mesures de self-healing (c), d'expériences de balayage en température (d) et d'expériences de gonflement (e). Une comparaison des rugosités de surface à été faite via un AFM (f).

a) Mesures des modules de conservation (G') et de perte (G'') : cinétique de gélification

Les modules de conservation (G') sont des données qui permettent notamment, de quantifier la rigidité d'un matériau. Plus les valeurs seront grandes, plus le matériau pourra être considéré comme rigide. Les modules de pertes (G'') sont liés à la viscosité. Pour rappel, la viscosité est la capacité de résistance à l'écoulement d'un fluide sous un gradient de pression.

Les courbes des hydrogels en présence de 10 mM de catéchol montrent des saccades (Figure III.7A et E) à toutes les concentrations en periodate de sodium (NaIO_4) (10 mM, 20 mM et 30 mM) en dépit de l'augmentation du pourcentage de déformation (1%, 50% et 100%). Lors des saccades, il est observable que le cône du rhéomètre se met à vibrer comme si la trop grande force d'adhésion de l'hydrogel l'empêche d'appliquer les déformations souhaitées. L'autre hypothèse repose sur un phénomène dit de l'instabilité « stick-slip » (collé-glissé). Les valeurs G' et G'' des hydrogels de catéchol ne peuvent pas être définies.

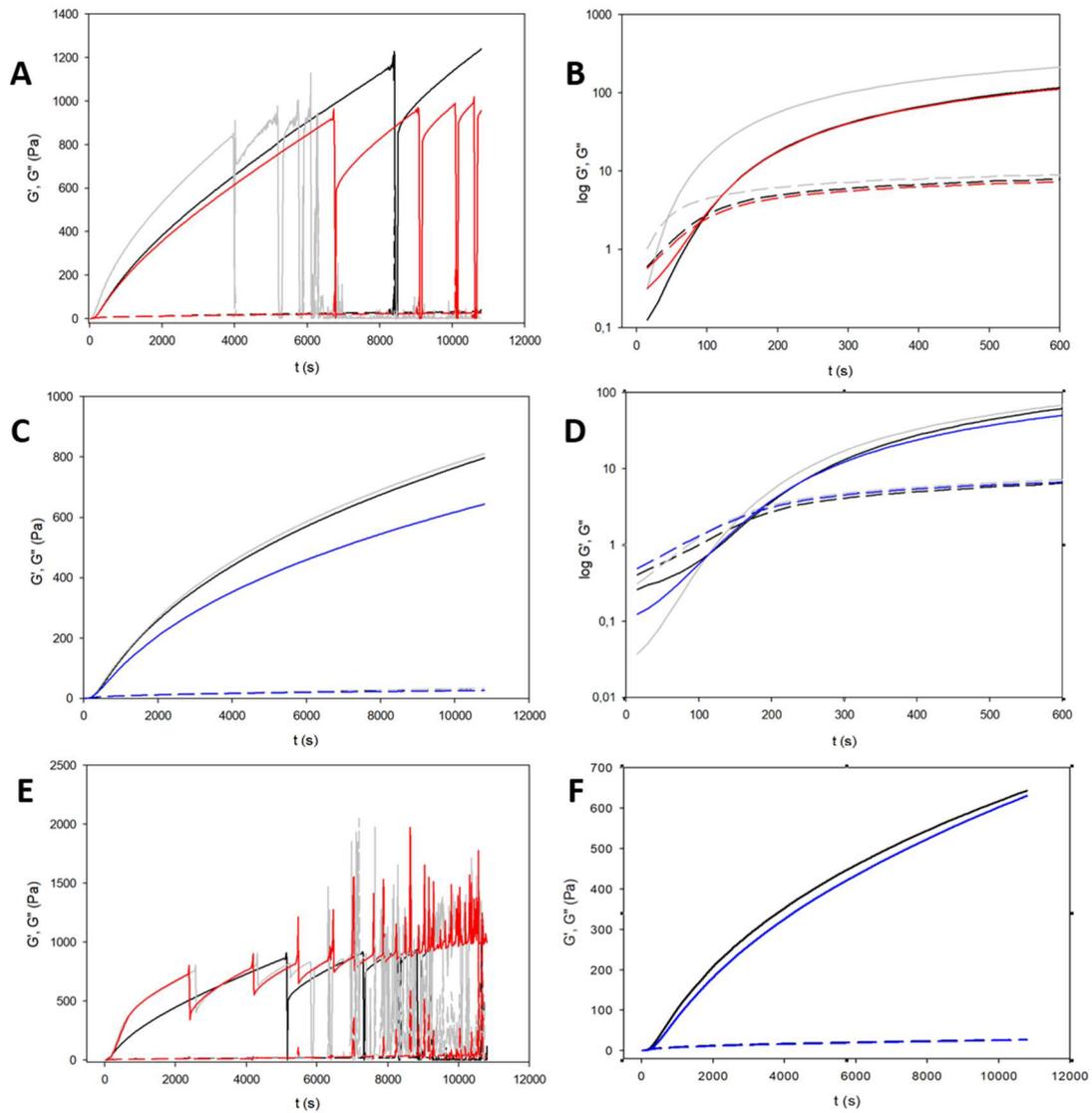


Figure III.7. Cinétique de gélification (25°C, 1Hz, 3h). **A)** 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol + NaIO₄ (10 mM noir, 20 mM gris, 30 mM rouge), **C)** 10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol + NaIO₄ (10 mM noir, 20 mM gris, 30 mM bleu) avec **B), D)** les mêmes données en échelle logarithmique à 1% de déformation. **E)** 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄ avec une déformation imposée de 10% (noir), de 50% (gris) et de 100% (rouge). **F)** 10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO₄ avec une déformation imposée de 1% (noir) et de 50% (bleu).

Les valeurs des G' des hydrogels de 10 mM pyrogallol sont de 798 et 644 Pa et les valeurs de G'' de 34 et 27 Pa pour des concentrations en periodate de sodium (NaIO₄) de 10 mM, 20 mM et 30 mM respectivement. Les courbes des **Figures III.7B** et **D** montrent que le début de gélification est globalement le même pour tous les hydrogels (- de 200 secondes, croisement des courbes G' et G'').

Bien que la vitesse de gélification ne soit pas affectée, les résultats obtenus pour les modules de conservation des hydrogels de 10 mM de pyrogallol ne diffèrent pas de la gélatine pure (**tableau III.1**).

Il a été envisagé d'étudier les mêmes formulations en probe-tack test afin d'obtenir des données reproductibles et comparables.

b) Mesures de probe-tack : force (N) et énergie de rupture (J/m^2)

Dans l'expérience de « probe-tack », on dépose l'hydrogel entre une plaque et un cône. Le rhéomètre va alors tirer le cône à la température et la vitesse désirée ce qui permet d'obtenir des données comme la force à la rupture (N) et l'énergie de fracture (J/m^2). L'ensemble des mesures ont été faites 3h après le dépôt du gel, à 25°C et à une vitesse de retrait du cône fixée à 100 $\mu m/s$.

Les courbes de probe-tack de la **Figure III.8** font apparaître des plateaux de fibrillation de plus en plus longs pour l'hydrogel de catéchol (**rouge**) à mesure que la concentration en $NaIO_4$ augmente. Un long plateau de fibrillation signifie que la structure interne du gel est plus cohésive et probablement plus réticulée. Le contenu du batch lors de la synthèse de l'hydrogel est dense. Ainsi, il apparaît clairement que, pour augmenter les probabilités de rencontre entre les espèces catéchol et $NaIO_4$, l'une des deux espèces doit être en excès.

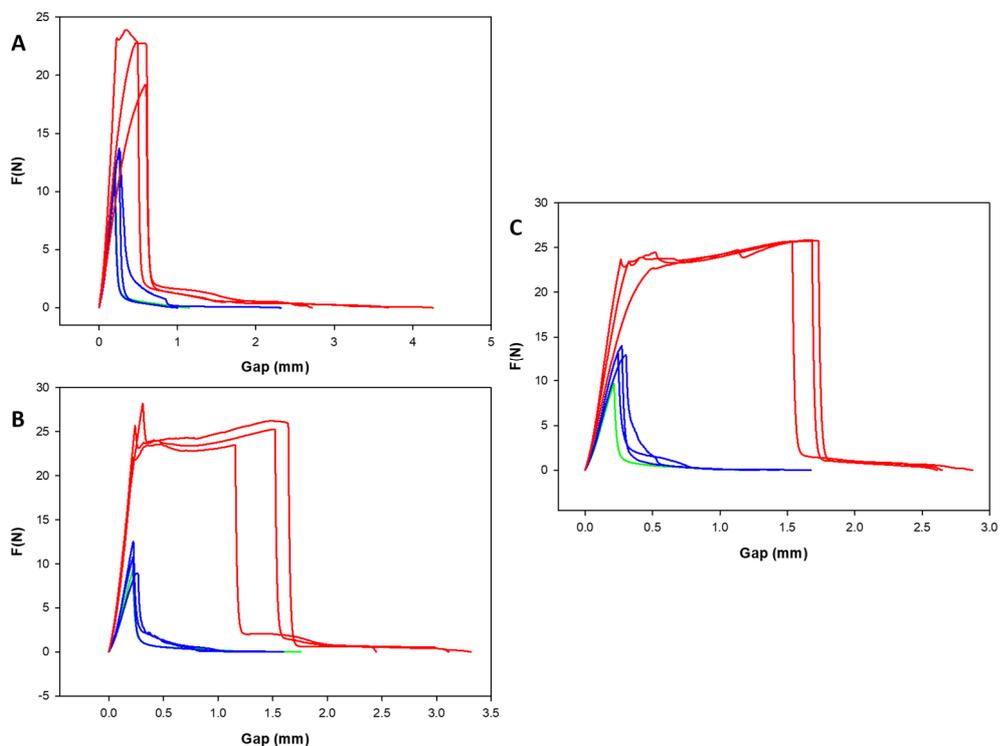


Figure III.8. Courbes de probe-tack (3h, 25°C, 100 $\mu m/s$) des hydrogels 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol avec $NaIO_4$ (**rouge**), 10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol avec $NaIO_4$ (**bleu**) et 10% p/v gélatine avec $NaIO_4$ (**vert**). Avec une concentration en $NaIO_4$ variable ; **A**) 10 mM, **B**) 20 mM et **C**) 30 mM.

Les courbes représentatives des hydrogels de gélatine (**vert**) et de pyrogallol (**bleu**) ne donnent pas lieu à des plateaux de fibrillation. L'ensemble des données finales ont été reprises dans la **Figure III.9** et dans le **Tableau III.2**.

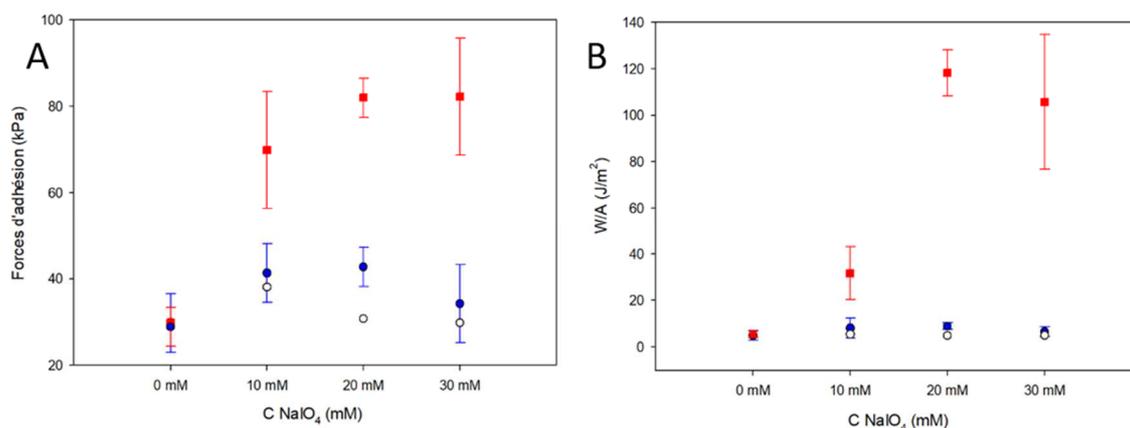


Figure III.9. Données extraites de la **Figure III.8** (3h, 25°C, 100 $\mu\text{m/s}$), en fonction de la concentration en NaIO_4 . **A)** Forces d'adhésion (kPa). **B)** Energie de fracture (J/m^2). Avec 10% p/v gélatine + 10 mM de catéchol (carré rouge), 10% p/v gélatine + 10 mM de pyrogallol (rond bleu) et 10% p/v gélatine (rond blanc).

Les expériences de probe-tack ont toutes été triplées à l'exception de celle de la gélatine seule (rond blanc) dans la **Figure III.9**. Elles permettent de confirmer que les conditions optimales pour l'obtention d'un hydrogel cohésif réticulé sont celles aux concentrations de 20 mM à 30 mM de NaIO_4 . Les valeurs de la gélatine seule ne sont pas celles qui feront l'objet d'une éventuelle application en tant qu'adhésif.

	10 mM NaIO_4			20 mM NaIO_4			30 mM NaIO_4		
	F(N)	kPa	j/m^2	F(N)	kPa	j/m^2	F(N)	kPa	j/m^2
Hydrogel Catéchol	24	76	34	26	82	111	28	90	123
	23	73	38	26	82	123	26	82	112
	19	61	23	26	82	120	24	75	83
	Moyenne	22±3	70±8	32±8	26	82	118±6	26±2	82±8
Hydrogel Pyrogallol	14	43	11	13	41	10	9	28	7
	12	37	5	14	45	8	13	40	8
	14	44	8	13	42	8	11	34	5
	Moyenne	13±1	41±4	8±3	13±1	43±2	9±1	11±2	34±6
Gélatine seule	10 mM NaIO_4			20 mM NaIO_4			30 mM NaIO_4		
	F(N)	kPa	j/m^2	F(N)	kPa	j/m^2	F(N)	kPa	j/m^2
	12	38	6	10	31	5	10	30	5

Tableau III.2. Récapitulatif des données obtenues pendant les expériences de probe-tack (**Figure III.8**).

Globalement, il est remarquable que, les hydrogels contenant du catéchol ou du pyrogallol seul (0 mM NaIO_4) soient équivalents en force d'adhésion (F(N)) et en énergie de fracture (W/A (J/m^2)). Les hydrogels contenant du pyrogallol oxydé sont équivalents à la gélatine, sauf à considérer le faible écart retrouvé dans les hydrogels de 20 mM NaIO_4 . Cette quasi-équivalence provient du fait que l'oxydation du pyrogallol en purpurogalline ne donne pas lieu à un quelconque lien de covalence avec la gélatine. Cet état de fait vient confirmer l'analyse de Henry I. Abrash qui a découvert que l'addition nucléophile sur la purpurogalline ne s'opère qu'à compter de la 120^{ème} minute de chauffe [112].

Le tableau récapitulatif met en exergue le fait que l'ajout de periodate de sodium (NaIO_4) dans la gélatine seule ne donne pas lieu à des changements significatifs dans les valeurs obtenues quant aux énergies de fracture (J/m^2).

Quant à l'hydrogel de catéchol, il est observable que la force d'adhésion (F(N)) reste globalement la même de 10 mM à 30 mM en NaIO_4 . L'énergie de fracture (J/m^2) est multipliée par 3 lorsque la concentration en NaIO_4 est doublée ou triplée. En considérant que, l'oxydation des acides aminés, et l'apparition d'iodate de sodium est égale à celle retrouvée dans l'hydrogel de pyrogallol, l'augmentation de la force d'adhésion (F(N)) (doublée par rapport

au pyrogallol) peut être légitimement liée uniquement à l'oxydation des molécules de catéchol, et aux additions de Michael concomitantes (liaisons covalentes). L'ensemble de ces considérations peut être résumé comme suit : *l'augmentation de la concentration en catéchol oxydé qui donne lieu, notamment, à des liaisons covalentes avec les groupements nucléophiles de la gélatine participe à l'augmentation de la force d'adhésion et de l'énergie de fracture.*

Il ressort de la **Figure II.10**, qu'à compter de 20 mM en NaIO_4 les modes de rupture majoritaires changent de ruptures adhésives pour les hydrogels contenant du pyrogallol en ruptures cohésives pour les hydrogels contenant du catéchol. Pour ces derniers, il est remarquable que la valeur de 20 mM en NaIO_4 marque également l'augmentation par un facteur 3 de la valeur de l'énergie de fracture (**Figure III.9, Tableau III.2**).

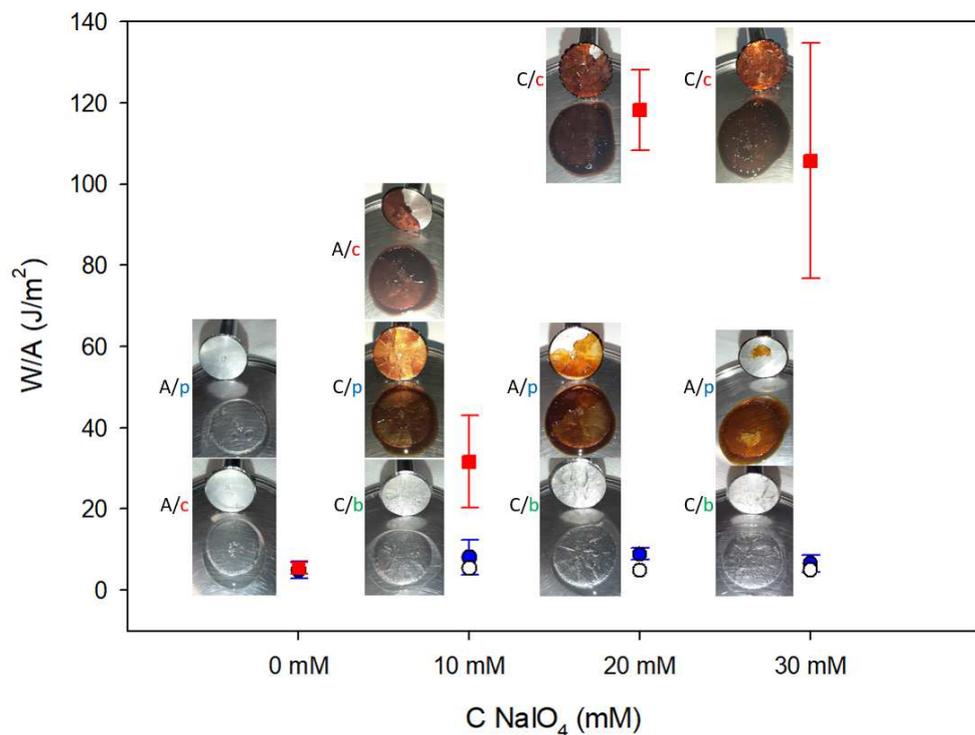


Figure III.10. Photos et modes de ruptures majoritaires des hydrogels durant les expériences représentées sur la **Figure III.9**. Avant le symbole (/), A, la rupture adhésive et C, la rupture cohésive. Après le symbole (/), 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol (c rouge), 10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol (p bleu) et 10% p/v gélatine (b vert). Exemple de lecture ; C/c signifie que la rupture obtenue en majorité est cohésive pour les hydrogels contenant du catéchol.

En résumé, les expériences de probe-tack démontrent que les hydrogels contenant du pyrogallol ne sont pas plus adhésifs sur l'acier que les hydrogels de gélatine non modifiés, cela suggère donc qu'ils ne sont pas réticulés. Passer de 10 mM à 20 mM en NaIO_4 pour les hydrogels contenant du catéchol multiplie environ par ~ 3 ($32 \pm 8 \text{ J/m}^2$ à $118 \pm 7 \text{ J/m}^2$) l'énergie de fracture. Cette augmentation de l'énergie de fracture est accompagnée par un changement du mode de rupture (de la rupture adhésive à la rupture cohésive).

c) Mesures d'autocicatrisation

Le but de ces expériences est de savoir si les hydrogels sont capables de s'autocicatriser et éventuellement de pouvoir quantifier le phénomène. Nous avons évalué *de visu* et dans un premier temps la capacité d'autocicatrisation des hydrogels en les coupants en deux.

Après 3h de gélification minimum, les hydrogels ont été découpés en deux parties et immédiatement recollés par un maintien d'une minute au niveau de la coupure. Cette opération a été faite trois fois. La première

fois l'adhérence des hydrogels a immédiatement été testée par le secouement du gel maintenu au niveau de l'un des côtés. La seconde fois, les hydrogels ont été secoués après 1h de repos dans une boîte de Petri et la troisième fois au bout de 24h.

Il est apparu que les hydrogels contenant des catéchols oxydés (10% p/w gélatine + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄) présentent une capacité d'autocicatrisation au moins pendant 24h.

Dans un second temps nous avons utilisé le rhéomètre sur le long terme afin d'évaluer la capacité des hydrogels à s'autocicatriser.

- Quant aux expériences de long terme (**Figure III.11 et Tableau III.3**). L'ensemble des expériences ont été faites à 1Hz à la température de 25°C. Le pourcentage de déformation a été appliqué sur une plage pouvant aller de 10% à 600% en fonction de l'hydrogel, de manière progressive et croissante jusqu'à ce que $G'' > G'$. Lorsque cette dernière condition est atteinte, les liaisons de l'hydrogel sont considérées comme « rompues » sur au moins un chemin continu traversant l'ensemble du matériau. L'expérience est arrêtée à ce stade pour être refaite 1h après sur le même matériau. Chaque hydrogel a été sollicité 3h après le dépôt, puis toutes les heures (8 fois en tout).

On peut remarquer tout de suite que les valeurs de G' restent les mêmes mais que les pentes de la **Figure III.11** s'amenuisent.

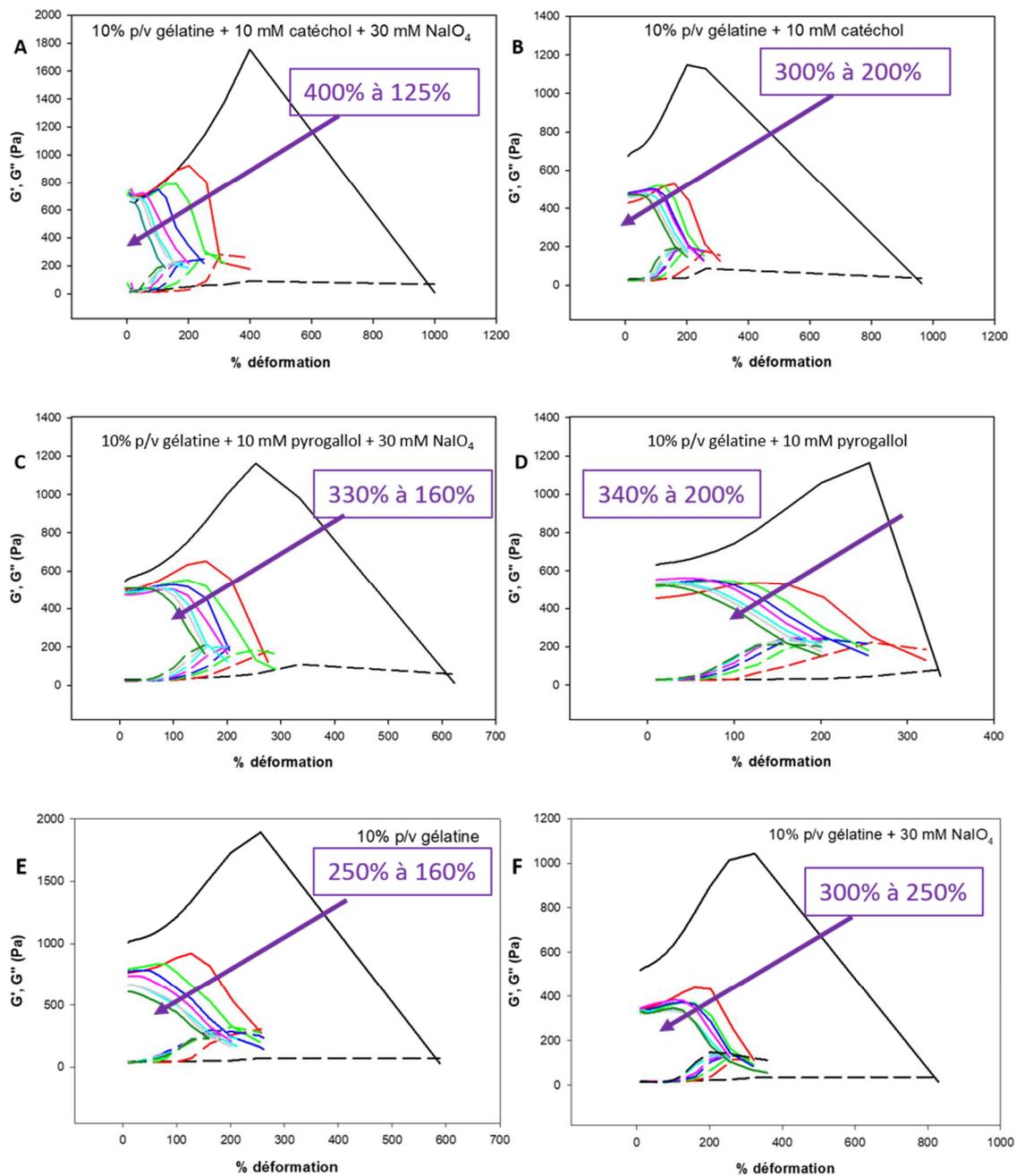


Figure III.11. Expériences d'autocicatrisation des hydrogels sur le long terme après 3h de gélification. Avec l'application de déformations toutes les heures. A 3h (noir), 4h (rouge), 5h (vert clair), 6h (bleu foncé), 7h (rose), 8h (bleu ciel), 9h (gris) et 10h (vert foncé). Les encadrés violets représentent le % de déformation nécessaire pour casser les liaisons des hydrogels à 3h et à 10h.

Toutes les sous-figures (A-F) de la Figure III.11 montrent que les hydrogels s'autocicatrisent après que les liaisons aient été cassées par les fortes déformations appliquées par le cône du rhéomètre. En effet après la première fracture (ligne noire), toutes les autres mesures de G' , prises au début des manipulations avec 10% de déformation montrent une valeur de G' quasi-identique (Tableau III.3).

Hydrogel	G' (Pa) (4h)	G' (Pa) (10h)
10% p/v gélatine + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO ₄	690	660
10% p/v gélatine + 10 mM catéchol	430	470
10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO ₄	500	500
10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol	450	520
10% p/v gélatine	760	600
10% p/v gélatine + 30 mM NaIO ₄	340	330

Tableau III.3. Valeurs de G' (Pa) du début de chaque expérience de long terme à 10% de déformation. Elles permettent d'évaluer la capacité d'autocicatrisation des hydrogels.

Pendant la première étape de mesure pour l'hydrogel 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄ (ligne noire, **Figure III.11A**), il a été entendu un bruit accompagnant la fracture, « un crac », suggérant la présence de liaisons fortes. La ligne noire de cet hydrogel représente la première casse réussie, mais, n'est pas représentative des vagues de déformations antérieurement subies par l'hydrogel avant d'arriver à cette réussite ($G'' > G'$). Aussi, la **Figure III.11A** devrait avoir le même type d'écart que l'on retrouve entre les lignes noires et les autres lignes de couleur des autres sous-figures.

Nous pensons que cet écart représente le *quantum* de liaisons covalentes locales de l'hydrogel qui ont été cassées pendant la première déformation. Pour l'hydrogel de gélatine 10% p/v et de gélatine 10% p/v + 10 mM de catéchol, il a été trouvé un écart de 248 Pa. Pour l'hydrogel de gélatine 10% p/v + 30 mM NaIO₄ et l'hydrogel de gélatine 10% p/v + 10 mM de pyrogallol, il a été trouvé un écart de 180 ± 2 Pa. Enfin, l'hydrogel gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO₄ montre un écart de 48 Pa.

On remarque que l'hydrogel le plus riche en NaIO₄ (30 mM) (**Figure III.11F**) est celui qui possède la plus petite chute de déformation. Les liaisons ioniques sont connues pour être les liaisons qui possèdent le plus grand rayon d'action ($1/r$). Par ailleurs, les ionomères (polymères fortement composés de liaisons ioniques, 20 mol%), sont connus pour être capables de s'autocicatriser [90]. La gélatine en est capable également [92].

On peut considérer que les pentes enregistrées représentent les forces d'adhésion des adhésifs. En effet, plus l'adhésif adhère au cône, plus on aura besoin d'appliquer des déformations importantes. On peut remarquer qu'au fur et à mesure que le temps passe et que l'on applique des déformations, les pentes s'amenuisent et il est de moins en moins nécessaire d'appliquer de fortes déformations. Aussi, dans le but d'évaluer la perte en forces d'adhésion, les courbes de tendance ont été calculées sous forme linéaire ($ax + b$) et les pentes a , ont été retracées dans le **Tableau III.4**.

	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
G₁₀C₁₀N₃₀	2.67	1.26	0.75	0.7	0.27	0.25	0.16	0
G₁₀P₁₀N₃₀	1.06	0.69	0.46	0.37	0.28	0.07	0	0
G₁₀N₃₀	1.85	0.65	0.46	0.37	0.37	0.07	0	0
G₁₀C₁₀	2.3	0.7	0.45	0.3	0.28	0.14	0	0
G₁₀P₁₀	2.05	0.73	0.48	0.34	0.21	0.16	0	0
G₁₀	3.67	1.3	0.7	0.16	0.16	0	0	0

Tableau III.4. Récapitulatif des pentes de la figure III.11.

Pour plus de clarté, les pentes ont été évaluées en pourcentage sur la **Figure III.12**. Cette figure permet d'avoir une idée de la perte en pourcentage des forces d'adhésions.

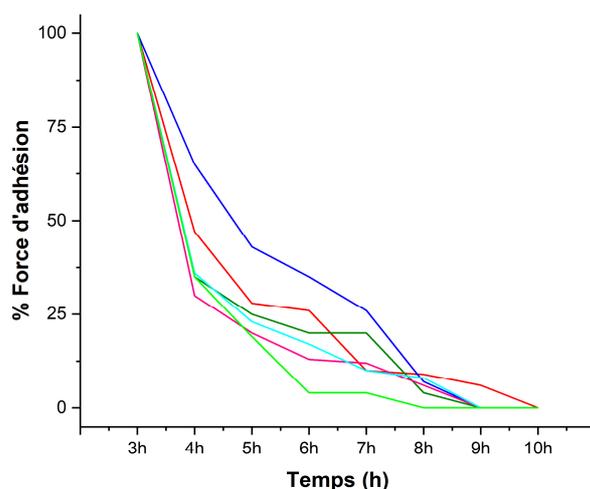


Figure III.12. Perte en pourcentage des forces d'adhésion des adhésifs $G_{10}C_{10}N_{30}$ (rouge), $G_{10}C_{10}$ (rose), $G_{10}P_{10}N_{30}$ (bleu), $G_{10}P_{10}$ (bleu ciel), $G_{10}N_{30}$ (vert) et G_{10} (vert clair).

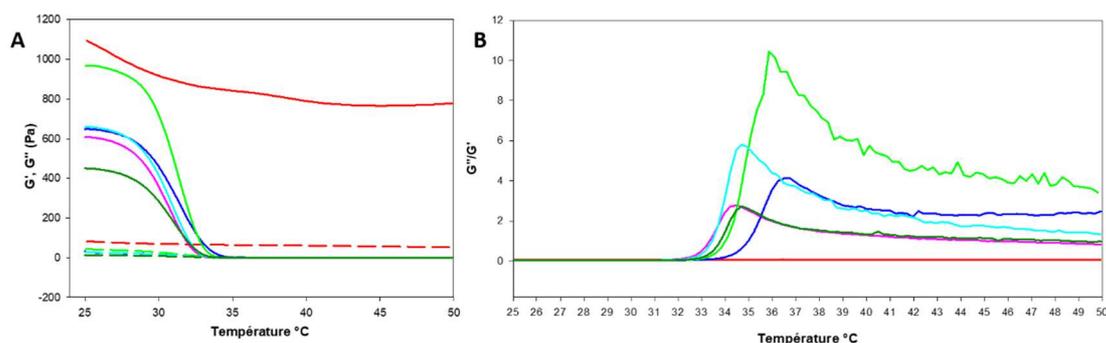
A partir de la première déformation, l'espèce $G_{10}P_{10}N_{30}$ est celle qui perd le moins en force d'adhésion (-35%). Puis vient l'espèce $G_{10}C_{10}N_{30}$ (-50%). Les autres adhésifs présentent une perte comprise entre 60 et 70%. L'espèce $G_{10}C_{10}N_{30}$ possède de l'adhésion jusqu'à 9h (7 cassures). L'espèce G_{10} possède de l'adhésion jusqu'à 7h (5 cassures). Les autres espèces possèdent de l'adhésion jusqu'à 8h (6 cassures). Il conviendrait bien entendu de refaire en triple exemplaire ces manipulations. *A priori*, il ressort que les adhésifs possédant des composés phénoliques oxydés présentent les baisses les plus faibles en forces d'adhésion. Ce lien force d'adhésion-composés phénoliques oxydés a aussi été rapporté dans les expériences suivantes (PARTIE IV, **Tableau IV.17**). Les espèces phénoliques oxydées participeraient aux forces d'adhésion sur l'acier inoxydable parce que celui-ci contient des ions fer. Les ions fer peuvent se coordonner avec les ligands possédant des carbonyles tels que les composés phénoliques et former des complexes de coordination. Il est par ailleurs remarquable que le pyrogallol oxydé possède 2 sites de coordination pour les ions fer alors que le catéchol oxydé n'en possède qu'un seul. Ceci expliquant peut-être pourquoi l'espèce pyrogallol oxydée est celle qui perd le moins en force d'adhésion. Cette explication pourrait être validée dans la mesure où les expériences d'autocicatrisation soient au moins triplées et que cette tendance se retrouve.

En résumé, l'ensemble des adhésifs étudiés sont capables d'autocicatrisation sur le long terme en ce qui concerne les liaisons non-covalentes. Les adhésifs au vu des différentes pentes présentent une perte en forces d'adhésion. A priori, la perte en adhésion est liée en partie à l'absence de complexes de coordination.

d) Balayage en température

Les expériences de balayage en température permettent de déterminer les températures de transition de phase et permettent de savoir si les hydrogels restent cohésifs à la température corporelle, ce qui est un prérequis à toute évaluation biologique.

Les courbes de G' et G'' en fonction de la température se croisent avec $G'' > G'$. Cela signifie que les hydrogels passent de l'état de gel à l'état liquide. Il y a deux manières de déterminer les températures de ces transitions. Soit, on regarde la température où G' croise G'' , soit, on prend en compte le plus haut point trouvé sur la courbe G''/G' (**Figure III.13**). Dans les faits, la transition gel-sol s'opère sur une plage de température.



Figure

III.13. Expériences de balayage en température (1°C/min, 1% déformation sauf ligne rouge à 200%). A) G' et G'' en fonction de la température. G' est représenté par des lignes et G'' par des tirets. B) G''/G' en fonction de la température. Avec 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO_4 (rouge, 200% déformation), 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol (rose), 10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO_4 (bleu foncé), 10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol (bleu), 10% p/v gélatine (vert), 10% p/v gélatine + 30 mM NaIO_4 (vert foncé).

La gélatine, en tant que matériau amorphe, possède $T_{\text{gel-sol}}$ sur une gamme de températures [75]. Aussi, les données du **Tableau III.5** doivent être considérées comme faisant partie d'une gamme plus large.

Hydrogel	$T_{\text{gel-sol}} G'' > G'$ (Gauche) ($\pm 0,1$)	$T_{\text{gel-sol}} G''/G'$ (Droite) ($\pm 0,1$)
$G_{10}C_{10}$	33,5	34,5
$G_{10}C_{10}N_{30}$		
$G_{10}P_{10}$	33,5	34,7
$G_{10}P_{10}N_{30}$	35,2	36,8
G_{10}	34,1	35,9
$G_{10}N_{30}$	34	34,7

Tableau III.5. Données extraites de la figure III. 12 avec les deux méthodes de détermination de la transition Gel-Sol ($T_{\text{gel-sol}}$). Avec $G_{10}C_{10}N_{30}$, 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO_4 , $G_{10}C_{10}$, 10% p/v gélatine + 10 mM catéchol, $G_{10}P_{10}N_{30}$, 10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO_4 , $G_{10}P_{10}$, 10% p/v gélatine + 10 mM pyrogallol, G_{10} , 10% p/v gélatine et $G_{10}N_{30}$, 10% p/v gélatine + 30 mM NaIO_4 .

L'expérience démontre que les hydrogels $G_{10}C_{10}N_{30}$ (10% p/v gélatine + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO_4) sont stables à température corporelle. Aucun croisement n'a pu être observé malgré l'application d'une déformation constante de 200%. Sa résistance à la déformation oblige, lors d'une telle manipulation, à augmenter la déformation d'au moins 200%. A défaut, le cône du rhéomètre se met à trembler et les mesures deviennent impossibles.

Pour résumer, tous les hydrogels considérés possèdent des températures de transition gel-sol à l'exception de l'hydrogel de catéchol oxydé $G_{10}C_{10}N_{30}$. La raison de sa résistance repose sur la présence de réticulations au sein de la gélatine.

e) Gonflement

Ces expériences ont été réalisées dans le but d'avoir une idée concrète de la capacité de gonflement des hydrogels.

Il a été envisagé de procéder en trois étapes de 24h chacune (**Photos III.1, Tableau III.6**), au vu du modèle proposé par J.F Guillet [98]. Les hydrogels ont d'abord été immergés dans un tampon acétate pendant 24h. Cette

étape peut être sans doute être qualifiée de non-déterminante car les hydrogels à $t = 0$ contiennent déjà une grande quantité d'eau. Son unique mérite est de saturer au maximum les hydrogels pour pouvoir évaluer sur un même pied d'égalité la perte d'eau après la seconde période de 24h. L'évaluation de la perte en eau permet de donner une représentation des fluctuations des dimensions des hydrogels, et de par la même, d'avoir une idée des possibles tensions qui pourraient être créées à l'intérieur d'une plaie. La troisième étape (immersion dans le tampon acétate 50 mM) permet de procéder au suivi cinétique du gonflement afin d'évaluer le régime de diffusion.



Photos III.1.(Gauche). Exemples d'hydrogels après le premier trempage à 24h dans le tampon acétate. (Milieu). Exemples d'hydrogels quelconques après séchage de 24h à température ambiante. (Droite). Exemple d'hydrogel après le second trempage de 24h *post*-séchage.

	Gonflement moyen après mise en tampon de 24h			Perte après déshydratation T.A. 24h			Récupération en masse 24h tampon		
	% masse	% épaisseur	% diamètre	% masse	% épaisseur	% diamètre	% masse	% épaisseur	% diamètre
G₁₀C₁₀	61±13	16±8	12±2	89±4	82±3	12±3	80±3	97±7	98±6
G₁₀C₁₀N₃₀	35±3	15±5	5±1	89±1	73±5	14±9	70±4	77±12	102±3
G₁₀C₁₀N₃₀	83±30	86±34	14±3	89±2	73±7	14±3	65±8	64±8	101±3
G₁₀C₁₀N₃₀ pH12	35±6	14±8	9±4	90±1	86±1	23±15	63±1	69±6	97±3
G₁₀P₁₀	43±9	16±11	9±1	91±1	78±7	15±4	85±7	74±8	101±3
G₁₀P₁₀N₃₀	29±4	8±5	8±3	90±2	85±2	12±7	62±7	69±7	100±4
G₁₀P₁₀N₃₀	32±3	10±9	10±3	90±3	89±3	7±4	64±6	59±13	103±3
G₁₀P₁₀N₃₀ pH12	41±1	10±7	12±1	92±1	89±2	1±6	49±3	38±7	103±4
G₁₀	46±6	4±3	11±1	89±1	80±3	10±3	80±5	75±3	101±4
G₁₀N₃₀	43±12	6±8	10±4	91±1	79±4	20±1	69±12	67±12	101±5
G₁₀N₃₀	41±4	15±16	10±6	90±3	87±5	2±5	68±9	53±9	110±4

Tableau III.6. % en masse, épaisseur et volume des hydrogels après un premier gonflement de 24h (opération A), après une déshydratation de 24h par rapport à l'opération A, et après une nouvelle étape de gonflement de 24h par rapport à l'opération A. Toutes les valeurs numériques correspondent à la moyenne de 3 mesures indépendantes arrondies à l'entier près.

On peut considérer que le rétrécissement dimensionnel des hydrogels à température ambiante est un inconvénient majeur en termes de tensions que l'on pourra obtenir dans une plaie. Le **Tableau III.7** met en exergue les valeurs de rétrécissement obtenues après l'opération de dessèchement.

Hydrogel	Diamètre (mm)	Épaisseur (mm)
G₁₀	3,1±0,3	3,5±1,2
G₁₀N₃₀	2,8±0,3	7,5±0,2
G₁₀C₁₀	2,8±0,6	4,4±0,8
G₁₀P₁₀	3,6±1,2	5,8±1,4
G₁₀C₁₀N₃₀	2,4±0,2	6±2
G₁₀P₁₀N₃₀	4±0,2	5,3±1,3
G₁₀C₁₀N₃₀ pH12	2,7±0,8	5,6±4,4
G₁₀P₁₀N₃₀ Ph12	5,3±0,8	0,3±2,9

Tableau III.7. Changement de dimension (mm) mesuré au niveau du diamètre et de l'épaisseur des hydrogels (perte après déshydratation 24h). Avec G_{10} (gélatine 10% p/v), $G_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 30 mM NaIO₄), $G_{10}C_{10}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol), $G_{10}P_{10}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol), $G_{10}C_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄), $G_{10}P_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO₄), $G_{10}C_{10}N_{30}$ à pH 12 (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄), $G_{10}P_{10}N_{30}$ à pH 12 (gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO₄).

Il n'apparaît pas de différences flagrantes en rétrécissement entre les différents hydrogels.

On peut mettre en valeur les données brutes sur une figure en prenant le taux de regonflement moyen en fonction du temps de gonflement.

Le taux de regonflement moyen (T_{gm}) a été calculé via la relation :

$$T_{gm} = \frac{(m_2 - m_1)}{m_1} \quad (18)$$

Avec m_2 , la masse de l'hydrogel à un instant t et m_1 la masse de l'hydrogel sec.

Ce taux de gonflement représente le regonflement en fonction du temps en gramme d'eau par gramme de matière sèche (**Figure III.14**). Il apparaît que l'ensemble des courbes répondent au modèle de Dual-Fick (gonflement rapide suivi d'une diffusion plus lente mais continue).

Tout comme les hydrogels de CTRL-AG & DWNT-AG 1%_m (hydrogels d'agarose, solution de PBS à T.A.) [98]), on observe un gonflement rapide durant les 50 et 60 premières minutes.

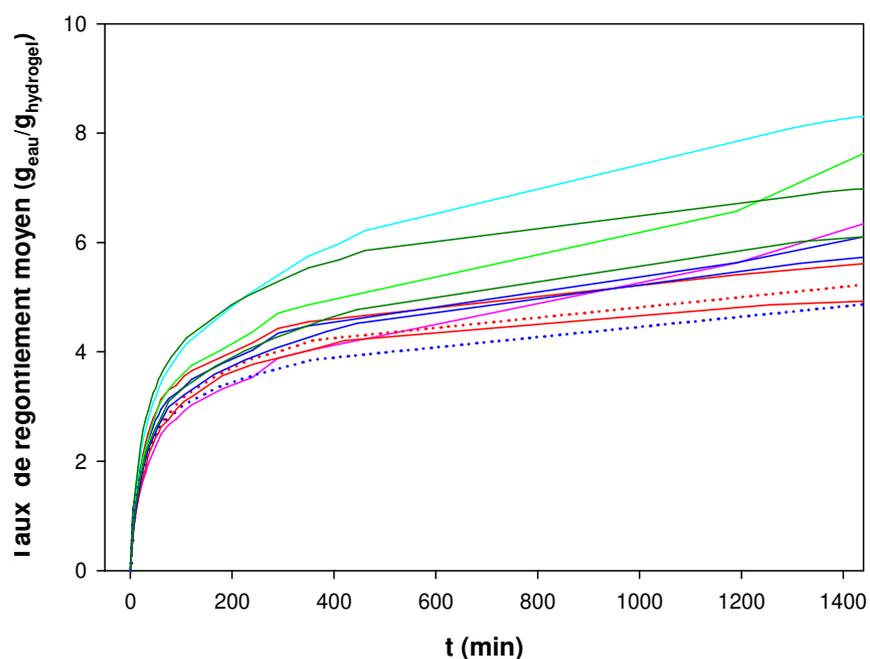


Figure III.14. Récupération en masse après 24h dans le tampon acétate de sodium (50 mM) *a posteriori* de la déshydratation (moyenne sur 3 échantillons). Avec G_{10} gélatine 10% p/v (vert), $G_{10N_{30}}$ gélatine 10% p/v (vert foncé), $G_{10P_{10}}$ gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol (bleu clair), $G_{10P_{10}N_{30}}$ gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO_4 (bleu foncé), $G_{10P_{10}N_{30} \text{ pH } 12}$ gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO_4 + pH 12 (...), $G_{10C_{10}}$ gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol (rose), $G_{10C_{10}N_{30}}$ gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO_4 (rouge), $G_{10C_{10}N_{30} \text{ pH } 12}$ gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO_4 + pH 12 (...).

Les hydrogels les plus réticulés ($G_{10C_{10}N_{30}}$) et ceux préparés à pH 12 possèdent les rapports eau (g) /hydrogels secs (g) (taux de regonfiement final) les plus petits (inférieurs à 6). Si la relation taux de réticulation/gramme d'eau absorbé est évidente, il apparaît que les hydrogels à pH 12 possèdent le même type de comportement quand bien même ils ne seraient pas réticulés ($G_{10P_{10}N_{30} \text{ pH } 12}$). Il est même étonnant, de prime abord, de constater que des hydrogels dopés en espèces ioniques ne donnent pas lieu à un gonflement plus important au vu des lois bien connues de l'osmose (l'eau se dirige toujours du milieu le moins concentré en ions vers le milieu le plus concentré). L'explication tiendrait alors au fait que la procédure de synthèse de tels hydrogels correspond à une mercerisation. L'ajout d'ions hydroxyles provoque un gonflement de l'hydrogel qui a pour effet de faire rétrécir les chaînes de polymères (les fibres) et surtout de les renforcer et de les rendre plus rigides [113].

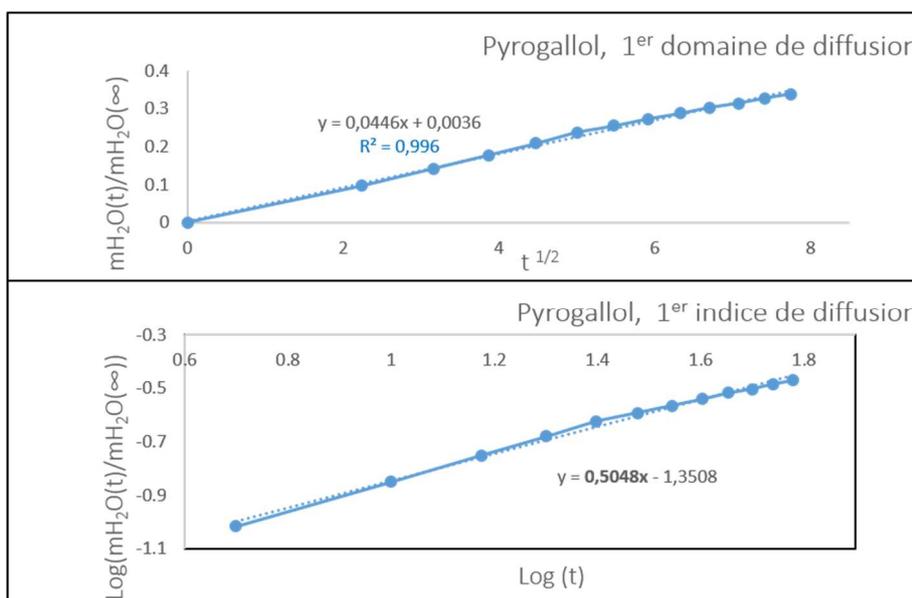
Il est relevable que l'hydrogel le plus réticulé (Tableau III.8) possède le même ratio gramme d'eau/gramme de matière sèche que pour l'échantillon DWNT-AG [98].

Hydrogel	(G _{H2O} /G _{sec}) 24h
G ₁₀	7,6
G ₁₀ N ₃₀	6,6±0,6
G ₁₀ P ₁₀	8,3
G ₁₀ P ₁₀ N ₃₀	5,9±0,3
G ₁₀ P ₁₀ N ₃₀ pH 12	4,9
G ₁₀ C ₁₀	6,3
G ₁₀ C ₁₀ N ₃₀	5,2±0,6
G ₁₀ C ₁₀ N ₃₀ pH 12	5,2

Tableau III.8. Grammes d'eau par gramme d'hydrogel sec (taux de gonflement moyens) au temps final (+24h). Les taux de gonflement pris en compte sont les moyennes des moyennes de la Figure III.14.

Les courbes de gonflement de la **Figure III.14** apparaissent comme bimodales. Il a donc été choisi de rechercher deux domaines de diffusion. La première étape consiste dans la recherche du coefficient de corrélation le plus proche de 1 sur la plage des données qui comprend la racine carrée du temps de diffusion avec le rapport de la masse d'eau moyenne absorbée par trois hydrogels caractéristiques sur la masse d'eau moyenne absorbée par lesdits hydrogels au temps infini. Le gain en eau relatif ($\frac{m_{H_2O}(t)}{m_{H_2O}(\infty)}$) est tracé en fonction de la racine carré du temps pour un obtenir une courbe de la sorptivité (mesure de la capacité d'un milieu à absorber ou désorber un liquide par capillarité). Le modèle repose sur les lois de diffusion Fickienne [114].

La seconde étape porte sur la recherche du coefficient de diffusion sur le domaine précédemment trouvé. La détermination de la valeur de celui-ci est plus précise si les données sont tracées en représentation semi-logarithmique (**Figure III.15**).



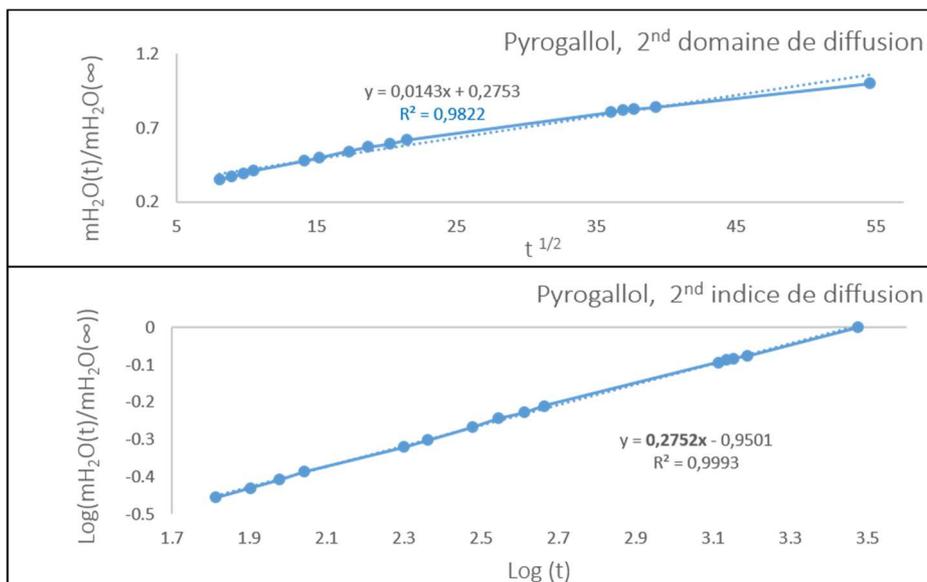


Figure III.15. Exemples de recherches des domaines de diffusion et des indices de diffusion de l'hydrogel G₁₀P₁₀ (gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol).

Les données de la **Figure III.15** pour l'ensemble des hydrogels sont reportées dans le **Tableau III.9**.

	Indice 1 (±0,01)	R ² (±0,001)	t (min)	Indice 2 (±0,01)	R ² (±0,001)	t (min)
G₁₀C₁₀	0,47	0,997	0-60	0,30	0,987	60-∞
G₁₀C₁₀N₃₀	0,50	0,997	0-55	0,19	0,952	55-∞
G₁₀C₁₀N₃₀	0,57	0,996	0-60	0,18	0,927	60-∞
G₁₀C₁₀N₃₀ pH 12	0,52	0,996	0-55	0,21	0,918	55-∞
G₁₀P₁₀	0,50	0,996	0-60	0,28	0,982	60-∞
G₁₀P₁₀N₃₀	0,50	0,999	0-60	0,25	0,981	60-∞
G₁₀P₁₀N₃₀	0,54	0,995	0-60	0,22	0,975	60-∞
G₁₀P₁₀N₃₀ pH 12	0,46	0,994	0-45	0,20	0,937	45-∞
G₁₀	0,50	0,999	0-55	0,29	0,971	55-∞

G₁₀N₃₀	0,49	0,992	0-60	0,20	0,948	60-∞
G₁₀N₃₀	0,53	0,994	0-60	0,23	0,977	60-∞

Tableau III.9. Résumé des valeurs des exposants caractéristiques des régimes de diffusion précédemment recherchés. Avec G_{10} (gélatine 10% p/v), $G_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 30 mM NaIO₄), $G_{10}C_{10}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol), $G_{10}P_{10}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol), $G_{10}C_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄), $G_{10}P_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO₄), $G_{10}C_{10}N_{30}$ à pH 12 (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄), $G_{10}P_{10}N_{30}$ à pH 12 (gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO₄).

Il apparaît que le gonflement des hydrogels peut être décrit par 2 régimes de diffusion. Le premier rapide, serait plutôt représentatif de l'arrivée des molécules d'eau dans le réseau macroporeux et le second serait celui qui représente la relaxation progressive des chaînes de gélatine. C'est d'ailleurs pendant cette dernière phase que la présence des d'ions hydroxyles et/ou iodates semble jouer un rôle en limitant l'expansion des chaînes. En effet des valeurs des exposants caractéristiques des régimes de diffusion les plus élevés se trouvent dans les hydrogels dépourvus de tels ions (**Tableau III.9**).

Lors de la déshydratation l'ensemble des hydrogels ont perdu ~90% de leur masse. Ils regonflent de ~70% de leur masse, après 24h d'immersion en tampon acétate de sodium (50 mM). Le rétrécissement en diamètre lors d'une déshydratation peut aller de 0% à 30% ce qui reste dans la même gamme que l'hydrogels d'agarose utilisés in vivo [98].

Le regonflement des hydrogels donnent des courbes de type Dual-Fick. Le ratio grammes d'eau/gramme d'hydrogel sec est à 6 grammes/1 gramme sec et entre 4,2 et 5,8 lorsque l'hydrogel a été réticulé ou mercerisé. Enfin, il est apparu que les ions hydroxyles et/ou iodates ralentissent le phénomène de relaxation des chaînes.

f) AFM

Comparer la rugosité de surface des hydrogels permet d'exclure la possibilité que les différences de comportement en adhésion soient la résultante d'une différence dans la rugosité de surface entre les différents types d'hydrogels (**Figure III.16**).

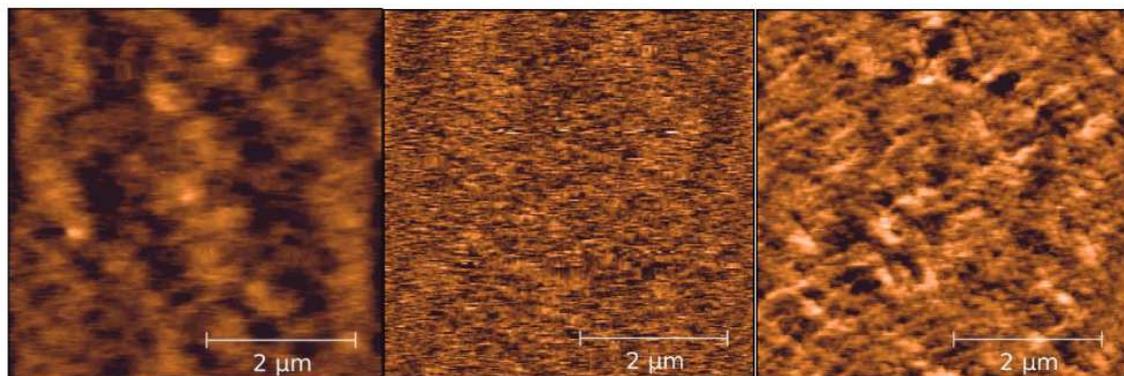


Figure III.16. Topographies AFM des hydrogels dans l'eau enregistrée en mode contact intermittent. De gauche à droite, $G_{10}P_{10}N_{30}$, $G_{10}N_{30}$ et $G_{10}C_{10}N_{30}$. Avec $G_{10}P_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol + 30 mM NaIO₄), $G_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 30 mM NaIO₄), $G_{10}C_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄).

Les valeurs des rugosités de surfaces sont globalement similaires (**Tableau III.10**). L'adhésion très élevée des hydrogels de catéchols oxydés ne serait être imputable à une quelconque modification de la topographie de surface.

Hydrogel	Sa ($\pm 0,1\text{nm}$)
G₁₀	1,4
	1,5
G₁₀P₁₀	0,2
G₁₀C₁₀	5,6
G₁₀N₃₀	0,9
	0,9
G₁₀P₁₀N₃₀	1,9
G₁₀C₁₀N₃₀	6,9
	8,4

Tableau III.10. Valeurs des rugosités obtenues par AFM.

g) Conclusions/discussions

Suivi cinétique de la gélification des hydrogels. Les valeurs des modules de conservation des hydrogels contenant 10 mM de pyrogallol sont de 797, 986 et 644 Pa et les valeurs des modules de perte sont de 33, 59 et 27 Pa pour des concentrations en periodate de sodium (NaIO_4) de 10 mM, 20 mM et 30 mM respectivement. Ces valeurs sont identiques à celles que l'on retrouve pour la gélatine à 10% p/v seule. Pour les hydrogels de catéchol réticulés, l'apparition de saccades rend la mesure des G' et G'' impossible à déterminer.

Mesures de probe-tack. Les expériences de probe-tack démontrent que les hydrogels de pyrogallol ne sont pas réticulés. Passer de 10 mM à 20 mM en NaIO_4 pour les hydrogels de catéchol fait multiplier l'énergie de fracture par 3 (**$32 \pm 8 \text{ J/m}^2$ à $118 \pm 7 \text{ J/m}^2$**). Ce passage est accompagné par un changement du mode de rupture (de la rupture adhésive à la rupture cohésive).

Les hydrogels sont capables d'autocicatrisation en ce qui concerne les liaisons non-covalentes. Les liaisons covalentes ont été détruites pendant l'application de la première déformation (la première casse). Il existe une perte importante en force d'adhésion qui repose a priori sur la présence ou non de composés phénoliques oxydés.

Seuls les hydrogels réticulés ($\text{G}_{10}\text{C}_{10}\text{N}_{30}$) sont capables de résister à la température corporelle. Dans le but d'obtenir un adhésif chirurgical viable, il conviendra d'obtenir une formulation non cytotoxique capable de résister à température corporelle.

La concentration optimale en NaIO_4 est de 20 à 30 mM soit un rapport de 1 molécule de composés phénoliques pour 2 ou 3 molécules de NaIO_4 .

L'ensemble de ces résultats ont été publiés dans un journal avec comité de lecture :

Back, F.; Ball, V.; Arntz, Y. Influence of the NaIO_4 Concentration on the Gelation and the Adhesive Strength of Pyrocatechol/Pyrogallol Containing Gelatin Hydrogels. *Front. Mater.* **2021**, *8*, 671451, doi:10.3389/fmats.2021.671451.

Les adhésifs/hydrogels ont été optimisés en fixant la concentration en gélatine à 10% p/v et à 10 mM de composés phénoliques. Il reste à faire l'inverse : fixer la concentration en gélatine (10% p/v) et en periodate de sodium (10 mM) et faire varier la concentration en composés phénoliques.

2. Composés phénoliques (catéchol/ dopamine) variables (3,3 mM → 100 mM) et gélatine + NaIO₄ fixes (gélatine 10% p/v + 10 mM NaIO₄)

L'optimisation portera sur des expériences de cinétiques de gélification (a), de probe-tack (b), de balayage en température (c) et en fréquence (d). Les hydrogels seront étudiés via la taille de leurs pores (e). L'ensemble des expériences permettront également de comparer le catéchol et la dopamine afin de déterminer quel agent de réticulation présente les caractéristiques les plus optimales pour nos adhésifs.

a) Mesures des modules de conservation (G') : cinétique de gélification

Les expériences de suivi cinétique des gélifications nous permettent de mesurer le module de conservation G' ainsi que le module de perte G''. En variant la concentration en espèces phénoliques, il est possible d'avoir une idée de la concentration optimale au vu de la valeur de G'. Afin d'éviter les phénomènes de saccades (ou de stick-slip) observés durant les cinétiques de gélification des hydrogels à concentration en periodate de sodium (NaIO₄) variable (**Figure III.7**), une déformation de 100% a dû être imposée. Dans toutes les manipulations, aucun phénomène de type stick-slip n'a été observé.

On observe (**Figure III.17**) que pour les hydrogels contenant du catéchol (ronds noirs) oxydés par 10 mM de NaIO₄ la concentration optimale se trouve à 20 mM de catéchol. On observe une chute du G' (Pa) à compter de 30 mM. Pour les hydrogels contenant de la dopamine oxydée par 10 mM de NaIO₄ (ronds rouges), le G' optimal se trouve à 30 mM. On retrouve alors le même type de comportement que celui obtenu dans les expériences à composés phénoliques fixes et NaIO₄ variable (**Figure III.7**).

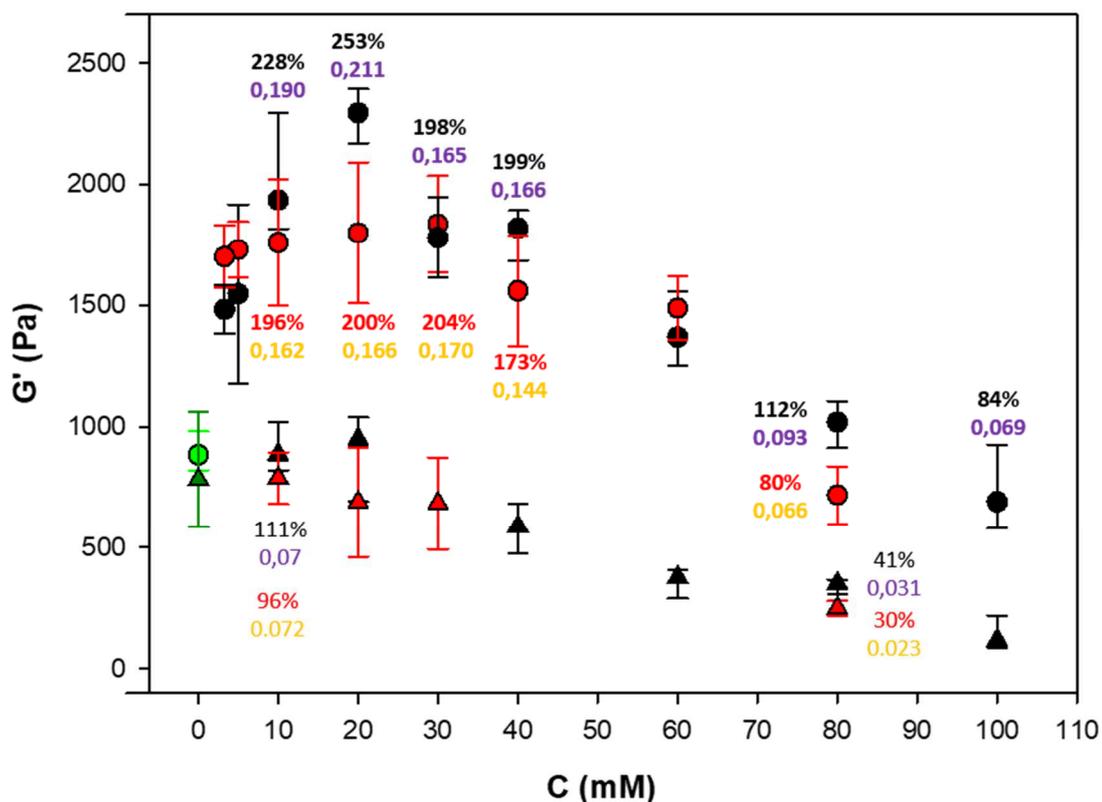


Figure III.17. Modules de conservation G' après 3h de gélification des hydrogels (1Hz, 100% déformation) en fonction de la concentration en catéchol (symboles noirs) et dopamine (symboles rouges), avec (O) et sans (Δ) 10 mM de NaIO_4 . Avec gélatine 10% p/v (250 Bloom) + 10 mM de NaIO_4 (vert clair) et gélatine 10% p/v (250 Bloom) (vert foncé). Les valeurs en % représentent la variation par rapport à la gélatine de référence en % des modules de conservation (G') et les valeurs en dessous des % représentent les vitesses de gélification à 3h en Pa/s (violet hydrogels contenant du catéchol et jaune, hydrogels contenant de la dopamine).

Les conditions qui donnent lieu à des valeurs de G' les plus hautes s'obtiennent lorsque le ratio (mM) composés phénoliques/ (mM) NaIO_4 n'est pas stœchiométrique (1 : 1). La réaction d'oxydation des composés phénoliques avec le NaIO_4 est une réaction à 2 électrons. Cela signifie qu'1 molécule de NaIO_4 est capable d'oxyder totalement 1 molécule de composé phénolique. Dans un milieu fortement encombré en gélatine, les probabilités de rencontre entre les molécules sont amoindries. Avoir un excès de l'un ou de l'autre des réactifs permet de maximiser la probabilité de rencontre.

La raison pour laquelle la concentration optimale en dopamine nécessite d'avoir 10 mM en plus par rapport à l'espèce catéchol repose sur le fait que, pour avoir une réticulation optimale, il faut à la fois maximiser la probabilité de rencontre des espèces NaIO_4 et des composés phénoliques et également, maximiser la probabilité de rencontre entre les sites nucléophiles de la gélatine et les espèces phénoliques préalablement oxydées. Par ailleurs, il faut que la molécule oxydée puisse avoir 2 sites de coordination.

Or, la dopamine oxydée va donner sur du court terme (- de 2 minutes) 2 types de molécules dont une seule (l'aminochrome) est capable de faire des additions de Michael (Figure III.34). Cela signifie que l'on perd en probabilité de rencontre entre les groupements nucléophiles de la gélatine et le composé phénolique capable de faire des additions de Michael. De plus, et *a priori*, l'espèce aminochrome possède moins de sites de réticulations que l'espèce catéchol oxydée (*o*-quinone) du fait de l'encombrement stérique du cycle aromatique nouvellement créé. Cette diminution de la probabilité de rencontre est attestée par les manipulations de balayages en température (Figure III.20) ainsi que par les manipulations de balayage en fréquence (Figure III.22).

Il convient également de souligner que les valeurs des G' à 80 mM de dopamine et celles des G' à 100 mM de catéchol sont similaires (**Figure III.17**). Pour avoir une idée de la raison de ce décalage, les cinétiques de gélification pour ces concentrations en catéchol/dopamine ont été regardées de plus près (**Figure III.18**).

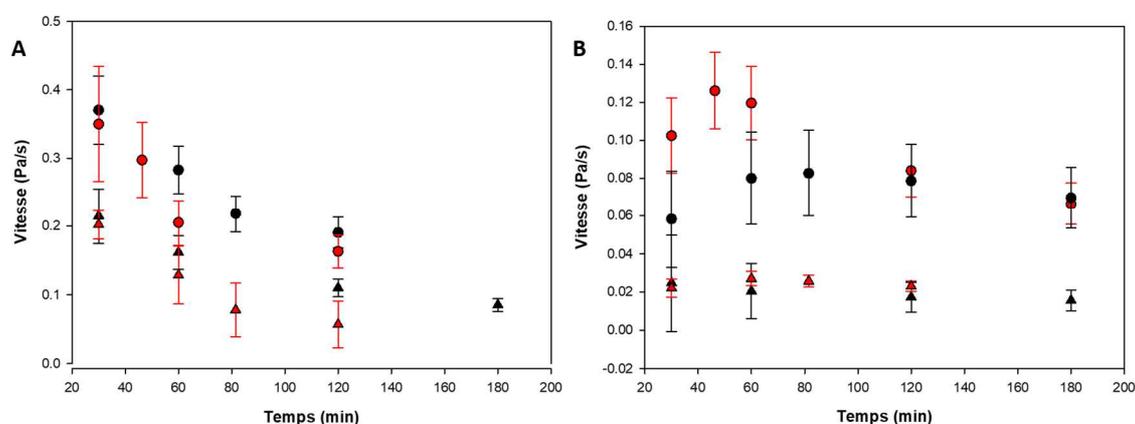


Figure III.18. Vitesses de gélification (Pa/s) à 30, 60, 120 et 180 minutes. **A).** Gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 10 mM de catéchol (noir) ou de dopamine (rouge) avec (•) et sans (▲) 10 mM NaIO₄. **B)** Gélatine 10% p/v + 100 mM de catéchol (noir) ou 80 mM de dopamine (rouge) avec (O) et sans (Δ) 10 mM NaIO₄.

Il est remarquable que la vitesse de gélification des gels contenant 100 mM de catéchol tende à se stabiliser sur le long terme alors que celle mesurée en présence de 80 mM de dopamine subit une décroissance à partir de la 40^{ème} minute environ (**Figure III.18B**). L'explication la plus probable pour ce changement de régime est basée sur l'hypothèse que des conditions oxydantes demeurent dans le gel. Cela donne lieu à l'apparition et à la disparition d'espèces plus ou moins favorables à la gélification. Dans le cas de la dopamine, et au vu des travaux de Bisaglia *et al.*, la disparition des espèces aminochromes (AC) au profit des espèces 5, 6-dihydroxyindoles (DHI) correspond à l'augmentation de la vitesse de gélification tandis que les précipités noirs (particules de dopamine) seraient liés à la diminution [115].

Pour résumer, il a été trouvé que les conditions optimales en module de conservation G' à gélatine et NaIO₄ fixes (Gélatine 10% p/v + 10 mM NaIO₄) ont été obtenues pour les hydrogels de catéchol à 20 mM et pour les hydrogels de dopamine à 30 mM. Les vitesses de gélification à 100 mM en dopamine prouvent que les hydrogels restent en conditions oxydantes et qu'elles ont un impact sur le module de conservation des hydrogels. A concentration optimale fixe ($G_{10C20N10}$ et $G_{10D20N10}$), l'espèce catéchol possède les meilleurs résultats en module de conservation (2282 ± 112 vs 1799 ± 291 pa).

b) Mesures de probe-tack : force et énergie de rupture

Les expériences de probe-tack permettent d'obtenir des données comme la force à la rupture et l'énergie de fracture. L'ensemble des mesures ont été faites à 3h de gélification, à 25°C et à une vitesse de retrait du cône égale à 100 µm/s.

La **Figure III.19B** présente le même type de comportement que la **Figure III.18** : une concentration optimale à 20 mM en catéchol 114 ± 25 J/m² et à 30 mM en dopamine 84 ± 34 J/m². En comparaison avec la gélatine seule 7 ± 2 J/m², l'énergie de rupture est augmentée d'un facteur de 16 et de 12 pour le catéchol et la dopamine respectivement. Les forces d'adhésion sont de 86 ± 6 kPa, 89 ± 5 kPa et de 25 ± 12 kPa pour les hydrogels contenant 20 mM de catéchol, 30 mM de dopamine et de gélatine (250 Bloom) 10% p/v respectivement.

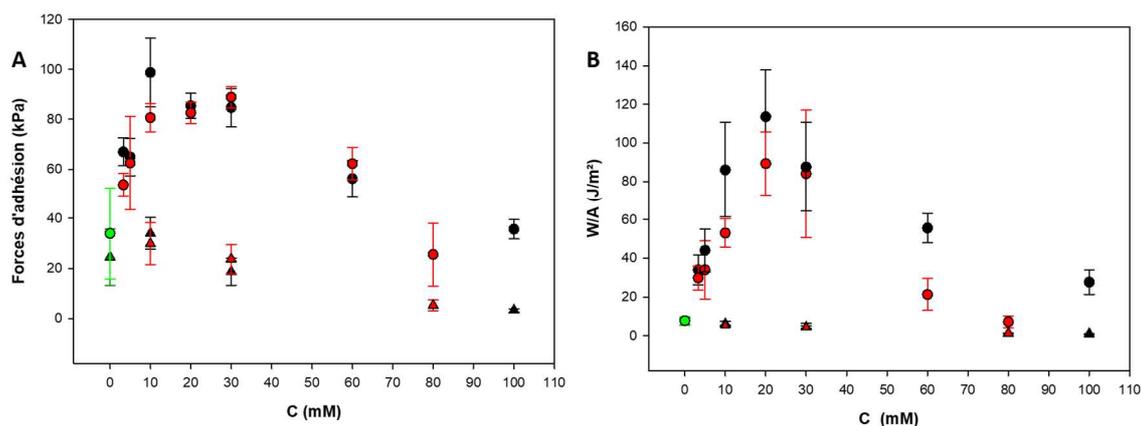


Figure III.19. A) Forces d'adhésion et B) énergie de rupture des hydrogels de gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 10 mM NaIO₄ en fonction de la concentration en catéchol (noir) et dopamine (rouge). Avec gélatine 10% p/v (250 Bloom) + 10 mM de NaIO₄ (vert clair) et gélatine 10% p/v (250 Bloom) (vert foncé).

Toutes les ruptures à 3h de gélification ont été de type cohésif (Photo III.2).



Photo III.2. Rupture des hydrogels à 3h à 25°C. Avec de gauche à droite $G_{10}N_{10}$ (gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 10 mM NaIO₄), $G_{10}C_{20}N_{10}$ (gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM NaIO₄), et $G_{10}C_{60}N_{10}$ (gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 60 mM catéchol + 10 mM NaIO₄).

Pour comparer, les meilleures valeurs des hydrogels de catéchol $G_{10}C_{10}N_{30}$ (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄) qui ont été obtenues sont du même niveau (106±21 J/m², 83±8 kPa).

Pour résumer, les hydrogels $G_{10}C_{10}N_{30}$, $G_{10}C_{10}N_{20}$, $G_{10}C_{20}N_{10}$ et $G_{10}D_{30}N_{10}$ sont les hydrogels qui présentent des énergies d'adhésions supérieures, égales ou proches de 100 J/m² (après 3h de gélification à 25°C et 100 μm/s). Leur collage est qualifiable à ce titre de collage fort [37]. Toutes les ruptures observées furent cohésives. A concentration optimale fixe ($G_{10}C_{20}N_{10}$ et $G_{10}D_{20}N_{10}$), l'espèce catéchol possède les meilleurs résultats en énergie de fracture (99±14 vs 89±5 J/m²).

c) Balayage en température

Les expériences de balayage en température (Figure III.20) permettent de déterminer les températures de transition de phase et permettent de savoir si les hydrogels sont stables à la température corporelle.

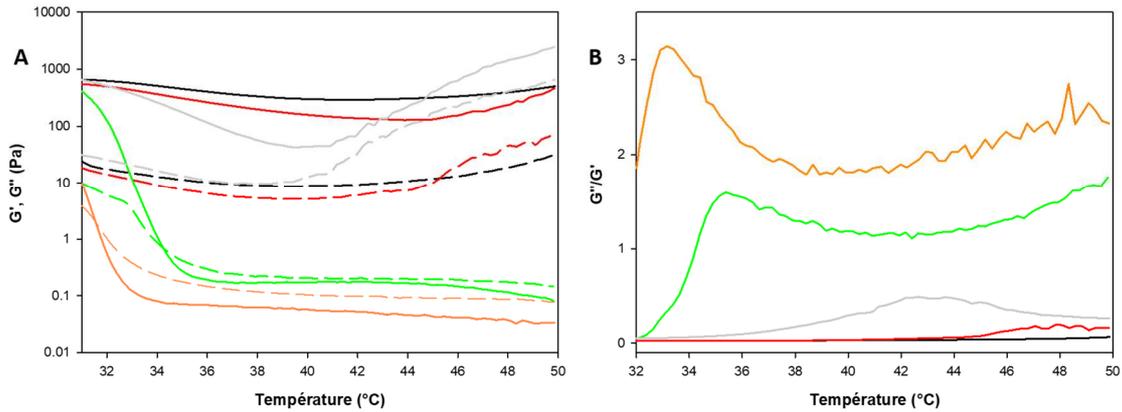


Figure III.20. A) Evolution des modules de conservation et de perte (G' , lignes, G'' , tirets) en échelle log et B) évolution du rapport G''/G' en fonction de la température (1Hz, 1% déformation, de 25°C à 50°C avec 1°C/min). Avec gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}N_{10}$, vert), gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}C_{20}N_{10}$, noir), gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 20 mM dopamine + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}D_{20}N_{10}$, rouge), gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 80 mM catéchol + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}C_{80}N_{10}$, gris) et gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 80 mM dopamine + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}D_{80}N_{10}$, orange).

Au vu de la Figure III.20 et du Tableau III.11, il est remarquable que seul l'hydrogel $G_{10}C_{20}N_{10}$ de gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 20 mM de catéchol + 10 mM NaIO₄ ne présente ni de transition Gel-Sol (pas de croisement observé en A) ni de température de transition vitreuse (pas de pic en B). L'hydrogel $G_{10}D_{20}N_{10}$ présente une température de transition vitreuse (47,8°C) caractéristique d'un défaut de réticulation comparé à l'hydrogel de catéchol $G_{10}C_{20}N_{10}$. Un tel défaut de réticulation peut être imputable à plusieurs causes (répulsion des charges globales de la gélatine du fait de la présence des protons de la dopamine, présence de gros atomes électronégatifs de chlore augmentant l'espace libre entre les chaînes, baisse de la probabilité de réticulation par la diminution du nombre de sites électrophiles sur les composés phénoliques).

Hydrogel	$T_{\text{gel-sol}} G'' > G'$ (Gauche) ($\pm 0,1$)	$T_{\text{gel-sol}}$ OU T_g G''/G' (Droite) ($\pm 0,1$)
$G_{10}N_{10}$	34,2	35,4
$G_{10}C_{20}N_{10}$		
$G_{10}D_{20}N_{10}$		47,8
$G_{10}C_{80}N_{10}$		42,7
$G_{10}D_{80}N_{10}$	31,5	33,2

Tableau III.11. Données de la Figure III.19.

En résumé, les hydrogels $G_{10}C_{20}N_{10}$, $G_{10}D_{20}N_{10}$ et $G_{10}C_{80}N_{10}$ sont stables à température corporelle. Au vu du fait que l'hydrogel $G_{10}D_{80}N_{10}$ possède un croisement G' , G'' , il est possible de conclure que celui-ci ne possède pas ou très peu de points de réticulations. A concentration optimale fixe ($G_{10}C_{20}N_{10}$ et $G_{10}D_{20}N_{10}$), l'espèce catéchol ne possède pas de transition vitreuse sur la gamme de température considérée contrairement à l'espèce réticulée à

la dopamine (T_g 47,8°C). Cela signifie que l'hydrogel/l'adhésif réticulé au catéchol possède un taux de réticulation supérieur à l'hydrogel/adhésif réticulé à la dopamine.

d) Balayage en fréquence

Les expériences de balayage en fréquence (Figure III.21) ont été faites dans le but d'obtenir un faisceau d'indices permettant de prouver la présence de points de réticulations et d'éventuellement le quantifier. On utilise pour cela l'équation d'Egelandsdal [116] :

$$\text{Log } G' = n \text{ Log } f + K \quad (19)$$

Où n représente le degré de dépendance en fréquence, K une constante, f la fréquence et G' le module de conservation.

Un gel dit « chimique » fortement réticulé sera caractérisé par $n = 0$ (pas de croisement $G'-G''$, pas de dépendance à la fréquence) alors qu'un gel physique (n'a pas de croisement $G'-G''$, faible dépendance à la fréquence) sera caractérisé par $n > 0$.

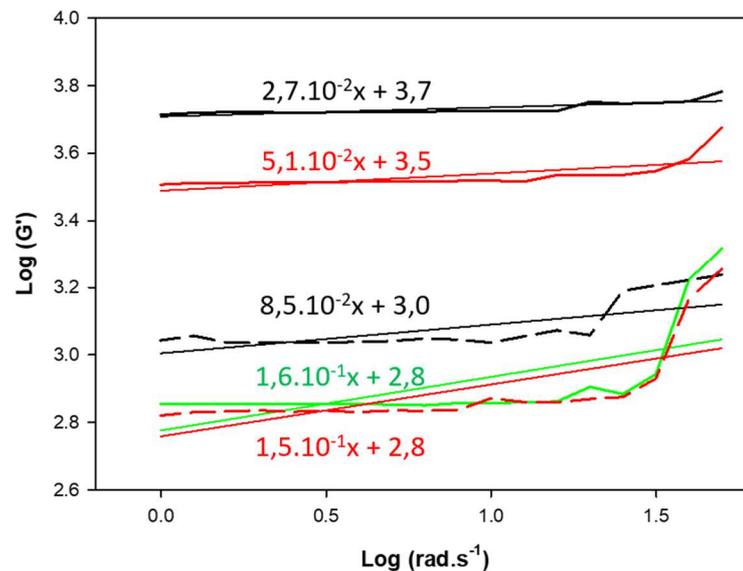


Figure III.21. Expériences de balayage en fréquence selon la méthode d'Egelandsdal (de 50Hz à 1Hz, 25°C, 100% déformation). Avec gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}N_{10}$, vert), gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}C_{20}N_{10}$, noir), gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 20 mM dopamine + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}D_{20}N_{10}$, rouge), gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 80 mM catéchol + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}C_{80}N_{10}$, tirets noirs) et gélatine (250 Bloom) 10% p/v + 80 mM dopamine + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}D_{80}N_{10}$, tirets rouges).

La pente n des courbes de tendances (Figure III.21) a été reportée à la Figure III.22A. Elle est représentée par des cercles. Le facteur de perte (G''/G') a été obtenu à $5 \cdot 10^{-3}$ Hz. Il est représenté par des triangles. Toutes les expériences ont été triplées.

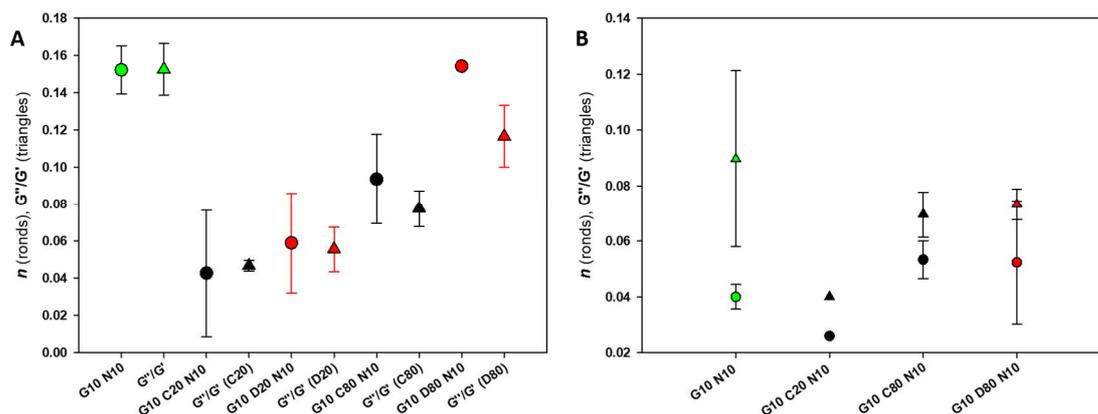


Figure III.22. La pente n (•) et $\tan \delta$ (▲) fonction des hydrogels de catéchol/dopamine (C/D, 20 mM, 60 mM or 80 mM). Tous les gels contiennent 10 mM de NaIO_4 (N_{10}) et 10% p/v de gélatine (G_{10}). Avec **A**), expériences à 100% de déformation et **B**), expériences à 1% de déformation.

Il est apparu que les expériences de balayage en fréquence à 1% de déformation (**Figure III.22B**) n'ont pu donner lieu qu'à une seule expérience (qui a été jugée viable au vu de l'allure non saccadée de la courbe) avec les hydrogels de catéchol fortement réticulés ($G_{10}C_{20}N_{10}$). C'est d'ailleurs l'observation de saccades (ou de stick-slip) qui nous a amené à ajouter une déformation de 100% dans les expériences de suivi cinétique de gélification (**Figure III.17**).

Les hydrogels les plus réticulés (**Figure III.22A**) avec 20 mM de catéchol/dopamine n'ont pas présenté de croisement $G'-G''$ en expérience de balayage en température (**Figure III.20A**) et en fréquence. Leurs pentes ($G_{10}C_{20}N_{10}$, $n = 0,04 \pm 0,03$) ($G_{10}D_{20}N_{10}$, $n = 0,06 \pm 0,03$) sont proches des valeurs des gels de β -lactoglobuline ($0,03 < n < 0,06$, 20°C) qui possèdent un G' de 20 kPa à $\text{pH} = 5,5$ [77]. Leurs facteurs de perte sont en deçà de la gélatine ($G_{10}C_{20}N_{10}$, $0,05 \pm 0,01$) ($G_{10}D_{20}N_{10}$, $0,06 \pm 0,02$). Plus les facteurs de perte sont bas, plus les gels ont un comportement assimilable à celui d'un solide. Avec leurs pentes et leurs facteurs de perte inférieurs à la gélatine (**Tableau III.12**), les hydrogels $G_{10}C_{20}N_{10}$, $G_{10}D_{20}N_{10}$ et $G_{10}C_{80}N_{10}$ peuvent être qualifiés de réticulés et de gels « physiques ».

Hydrogel	Déformation	100%
	n (•)	G''/G' (▲)
G ₁₀ N ₁₀	0,15±0,02	0,15±0,02
G ₁₀ C ₂₀ N ₁₀	0,04±0,03	0,05±0,01
G ₁₀ D ₂₀ N ₁₀	0,06±0,03	0,06±0,02
G ₁₀ C ₈₀ N ₁₀	0,09±0,02	0,07±0,01
G ₁₀ D ₈₀ N ₁₀	0,15±0,01	0,11±0,02
Hydrogel	Déformation	1%
	n (•)	G''/G' (▲)
G ₁₀ N ₁₀	0,04±0,01	0,09±0,04
G ₁₀ C ₂₀ N ₁₀	0,026	0,04
G ₁₀ C ₈₀ N ₁₀	0,05±0,01	0,07±0,01
G ₁₀ D ₈₀ N ₁₀	0,05±0,02	0,07±0,01

Tableau III.12. Données de la Figure III.22

La pente n avait déjà été évaluée pour la gélatine par différents auteurs dans différentes conditions (5°C ; gélatine porcine 0,031, 0°C-10°C ; Rohu 0,134, peau d'Hammour ; de 0,07 à 0,02) [117].

En résumé, les hydrogels G₁₀C₂₀N₁₀, G₁₀D₂₀N₁₀ et G₁₀C₈₀N₁₀ possèdent des pentes (0,04±0,03, 0,06±0,03, 0,09±0,02) et des facteurs de perte (0,05±0,01, 0,06±0,02, 0,07±0,01) inférieurs à la gélatine dans les expériences à 100% de déformation et peuvent être considérés comme des gels physiques et réticulés. Les autres hydrogels G₁₀D₈₀N₁₀ et G₁₀N₁₀ seront considérés comme des gels « faibles ». Du fait de la présence de saccades sur les courbes des hydrogels G₁₀C₂₀N₁₀ et G₁₀D₂₀N₁₀, les valeurs des expériences à 1% de déformation n'ont pas été prises en compte. A concentration optimale fixe (G₁₀C₂₀N₁₀ et G₁₀D₂₀N₁₀), l'espèce catéchol possède une dépendance à la fréquence inférieure à l'espèce dopamine (0,04±0,03 vs 0,06±0,03). Ce qui signifie que l'espèce catéchol possède un taux de réticulation supérieure à l'espèce dopamine.

e) Caractérisation de la taille des pores par microscopie numérique et électronique

Une procédure sur-mesure (Figure II.14) a été mise en place afin d'obtenir des échantillons « éponges » lyophilisés sans ajouts d'agents réticulants et sans adduit ni solvant. Les images obtenues avec le microscope Keyence et au MEB sont des photos de nos hydrogels « purs ». Elles ont été faites dans le but d'avoir une idée de la taille des pores et de leur distribution. Avec les coupes horizontales, nous avons mesuré la taille des pores à l'aide du logiciel du Keyence. Les coupes verticales nous ont permis d'apprécier la présence de parties blanches démontrant une absence d'homogénéité.

Dans le cadre du MEB la résolution obtenue est plus fine (de l'ordre du nanomètre) mais le vide nécessaire à la métallisation casse les films des pores à la surface des hydrogels. Pour le microscope Keyence, la résolution est de l'ordre du micromètre, la prise des photos est non-invasive et outre la lyophilisation, l'opération ne nécessite pas de préparations particulières.

Le but de cette expérience est de pouvoir comparer la taille des pores en fonction de la concentration en composés phénoliques (optimisation). Il sera également comparé, la tailles des pores des espèces catéchol et dopamine entre elles. Les photos des coupes horizontales sont représentées par la grosse flèche verte sur la photo de gauche (**Figure III.23**). Les photos des coupes verticales ont été prises majoritairement au niveau du haut du dôme

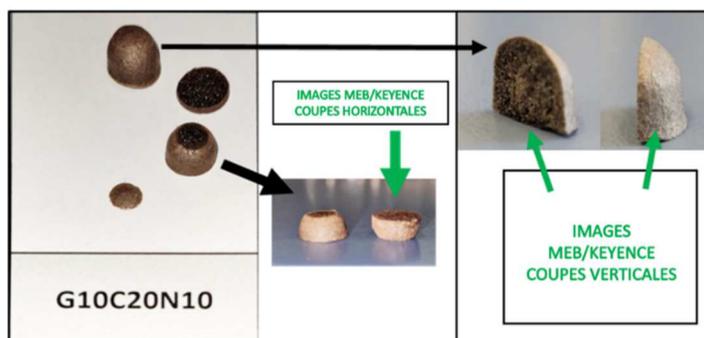
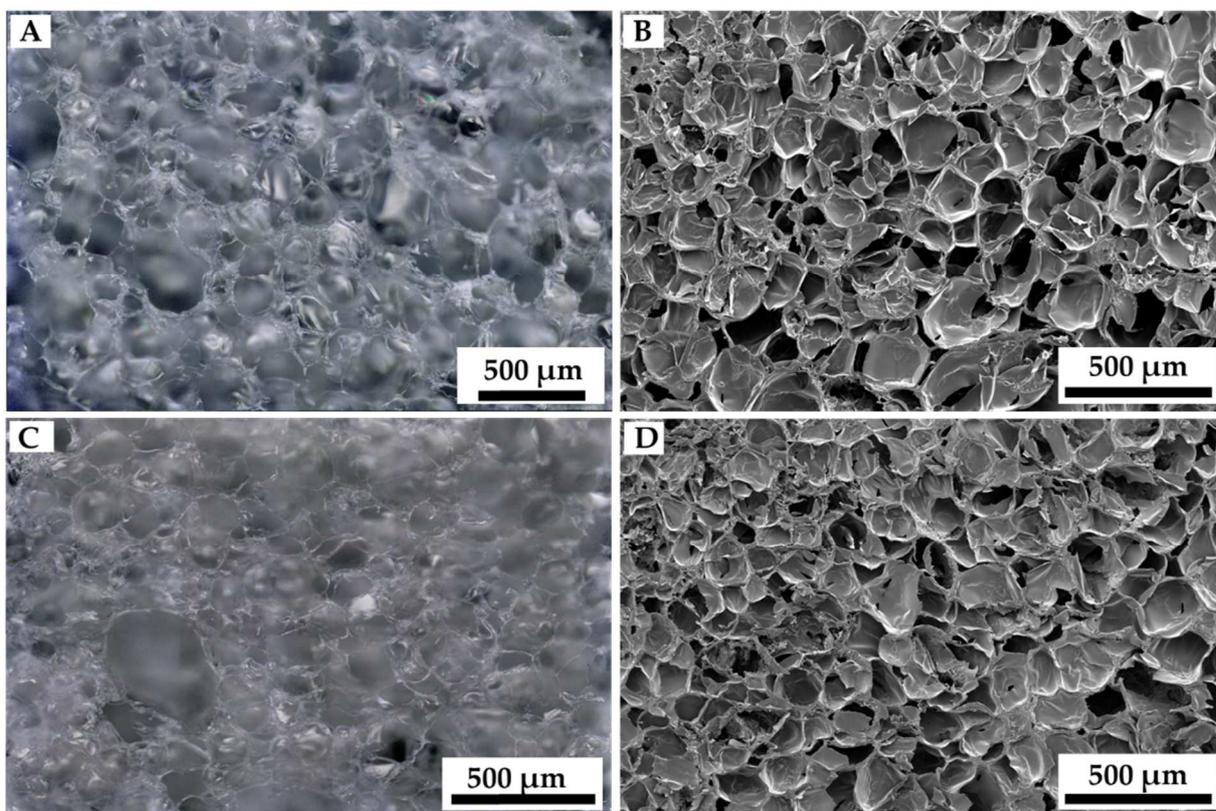
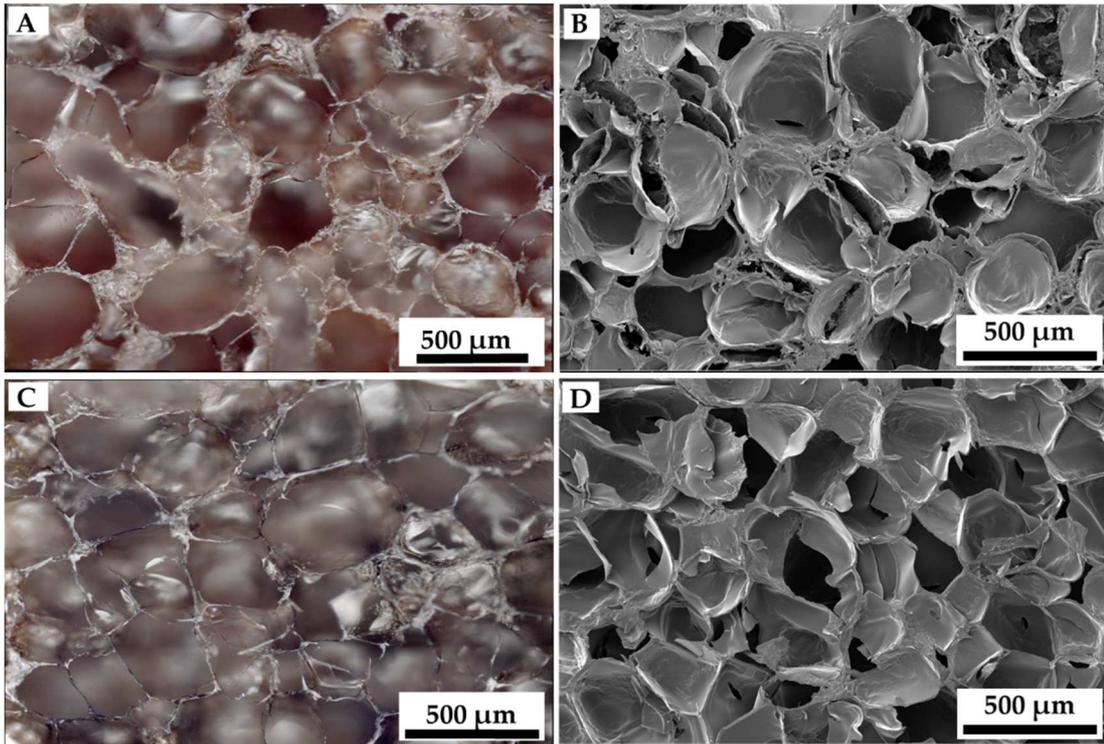


Figure III.23. Photos des deux types de coupes : horizontales (gauche) et verticales (droite).

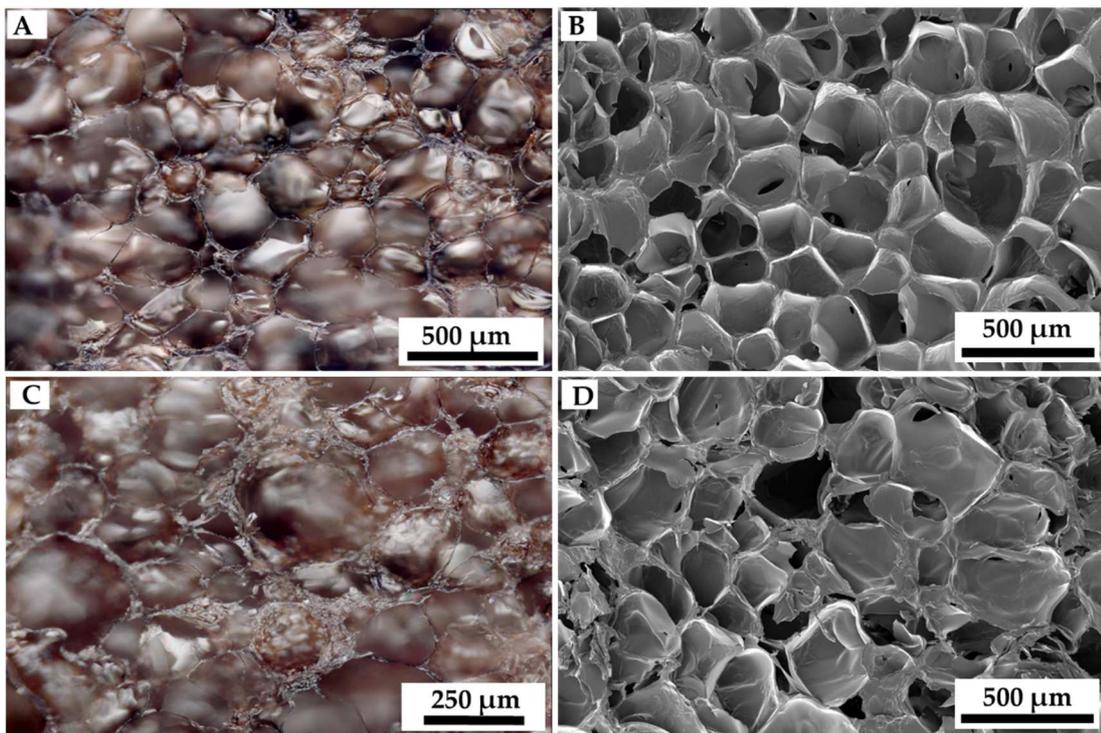
Les **Images III.1-5** représentent les coupes horizontales des espèces G_{10} , $G_{10}N_{10}$, $G_{10}C_{3,3}N_{10}$, $G_{10}C_5N_{10}$, $G_{10}C_{20}N_{10}$, $G_{10}C_{60}N_{10}$ ainsi que les espèces $G_{10}D_{3,3}N_{10}$, $G_{10}D_5N_{10}$, $G_{10}D_{20}N_{10}$, $G_{10}D_{60}N_{10}$. Ce sont ces images qui ont été prises pour calculer la taille des pores. Comparer visuellement les **Images 2-3** et **4-5** permet de remarquer *de visu* qu'on observe une meilleure homogénéité sur les éponges présentant les concentrations optimales en composés phénoliques ($G_{10}C_{20}N_{10}$ et $G_{10}D_{20}N_{10}$).



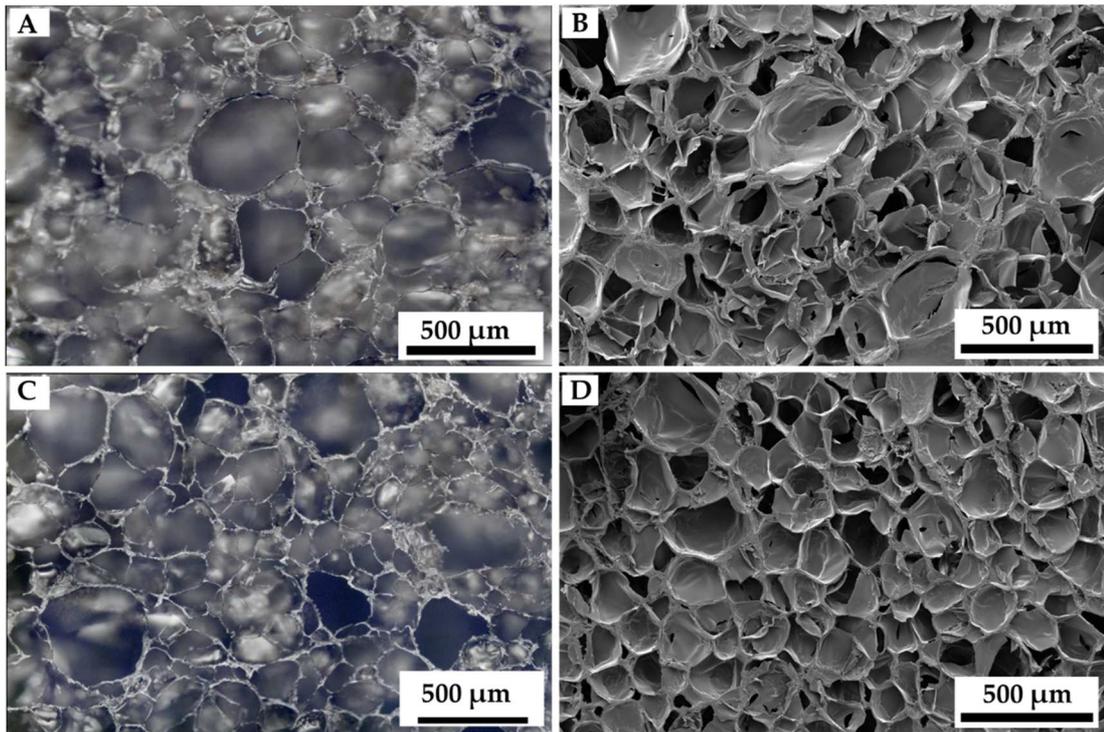
Images III.1. Coupes horizontales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, G_{10} (gélatine 250 Bloom 10% p/v) et C-D, $G_{10}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 10 mM NaIO₄).



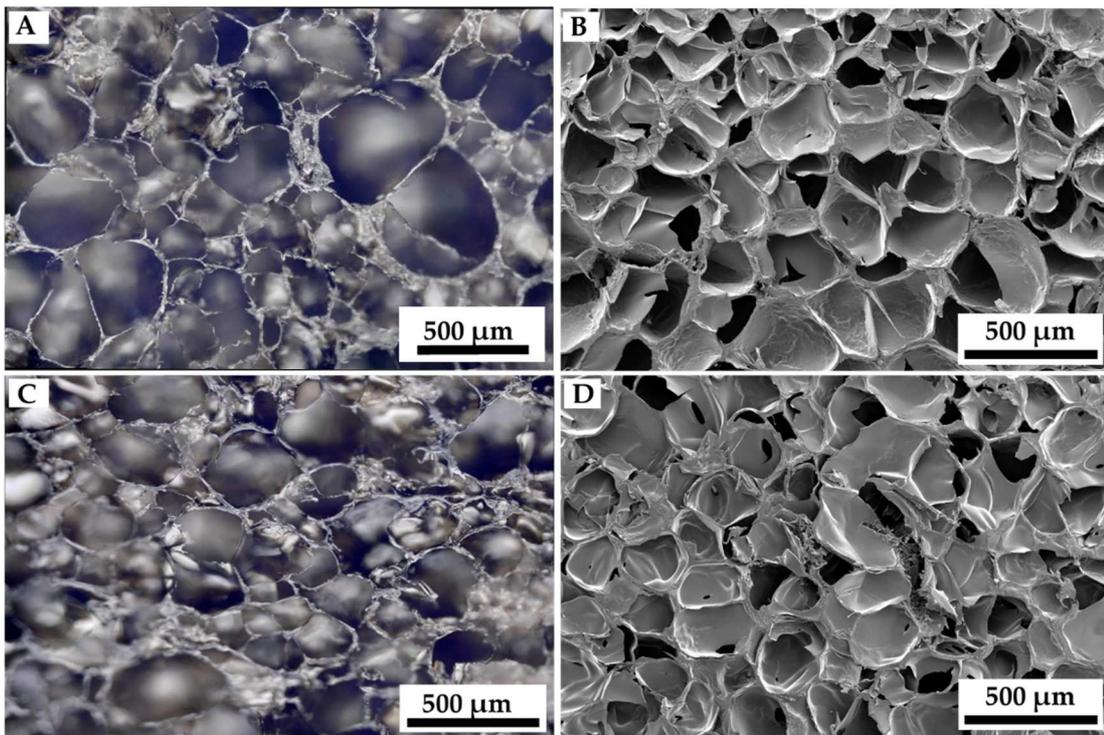
Images III.2. Coupes horizontales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM $NaIO_4$) et C-D, $G_{10}C_5N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM catéchol + 10 mM $NaIO_4$).



Images III.3. Coupes horizontales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, $G_{10}C_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM $NaIO_4$) et C-D, $G_{10}C_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM catéchol + 10 mM $NaIO_4$).

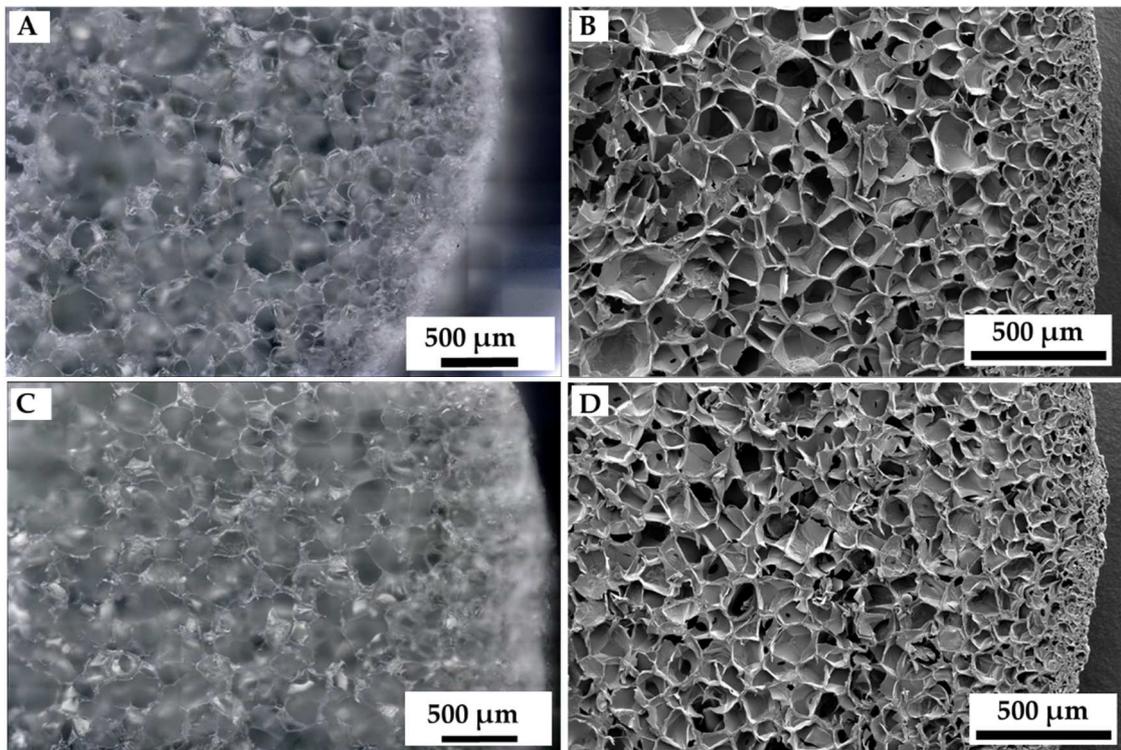


Images III.4. Coupes horizontales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, $G_{10}D_{3,3}N_{10}$ (g elatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) et C-D, $G_{10}D_5N_{10}$ (g elatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM dopamine + 10 mM NaIO₄).

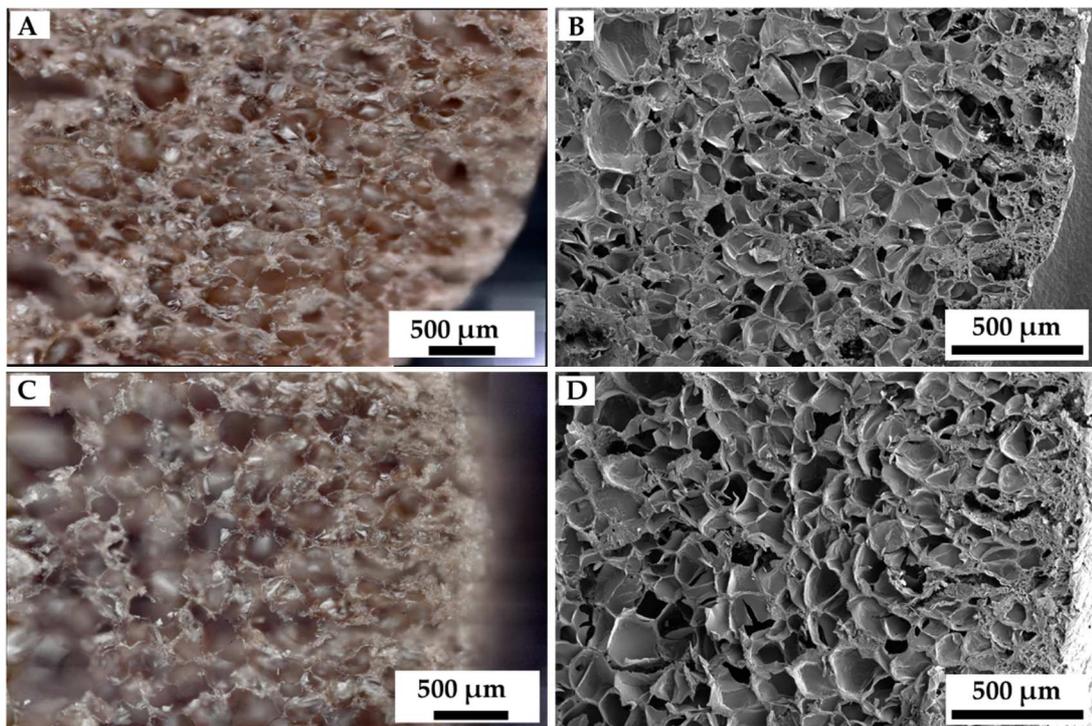


Images III.5. Coupes horizontales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, $G_{10}D_{20}N_{10}$ (g elatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) et C-D, $G_{10}D_{60}N_{10}$ (g elatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM dopamine + 10 mM NaIO₄).

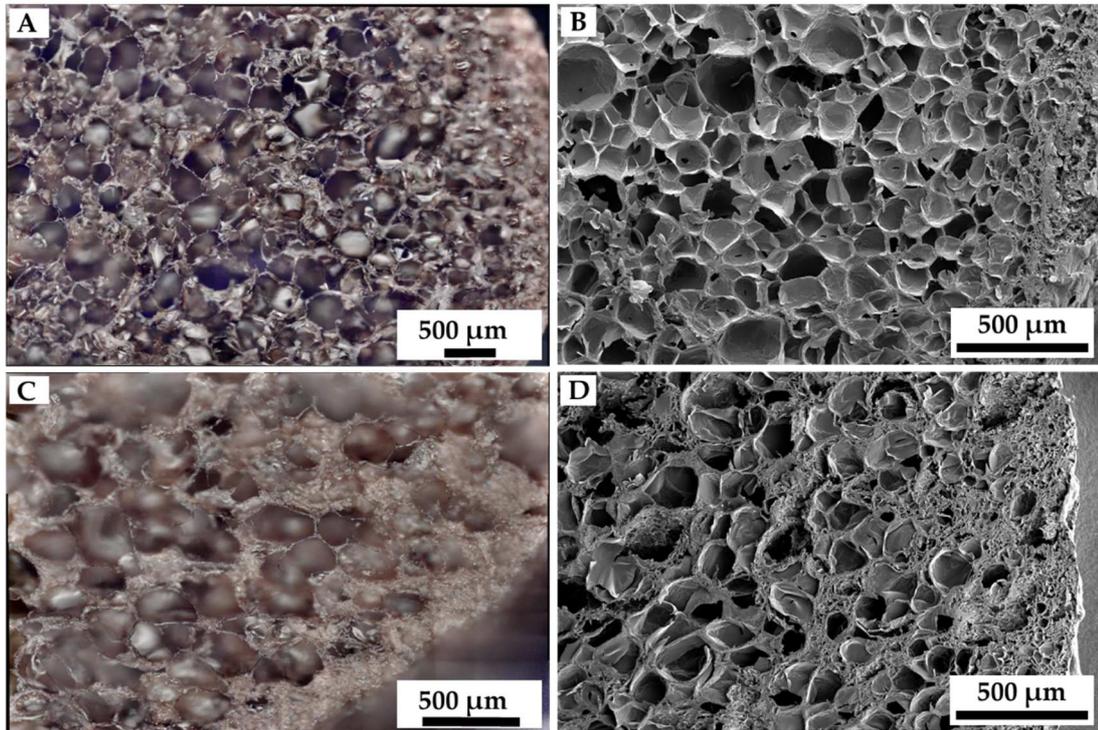
Les **Images III.6-10** représentent les coupes verticales. Elles permettent d'apprécier les éponges dans leur ensemble (sur toute la longueur de leur coupe). Les **Images III-8, 10** permettent de mettre en exergue la présence de zone hétérogènes blanches. Elles sont particulièrement visibles aux concentrations les plus élevées en composés phénoliques ($G_{10}C_{60}N_{10}$ et $G_{10}D_{60}N_{10}$).



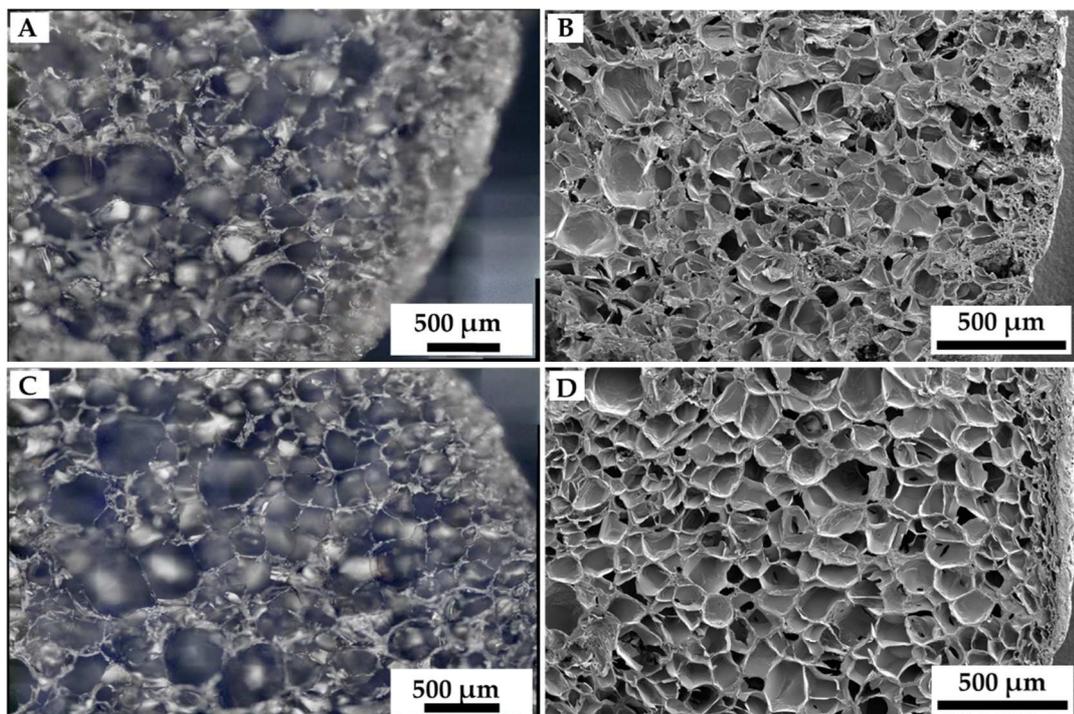
Images III.6. Coupes verticales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, G_{10} (gélatine 250 Bloom 10% p/v) et C-D, $G_{10}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 10 mM $NaIO_4$).



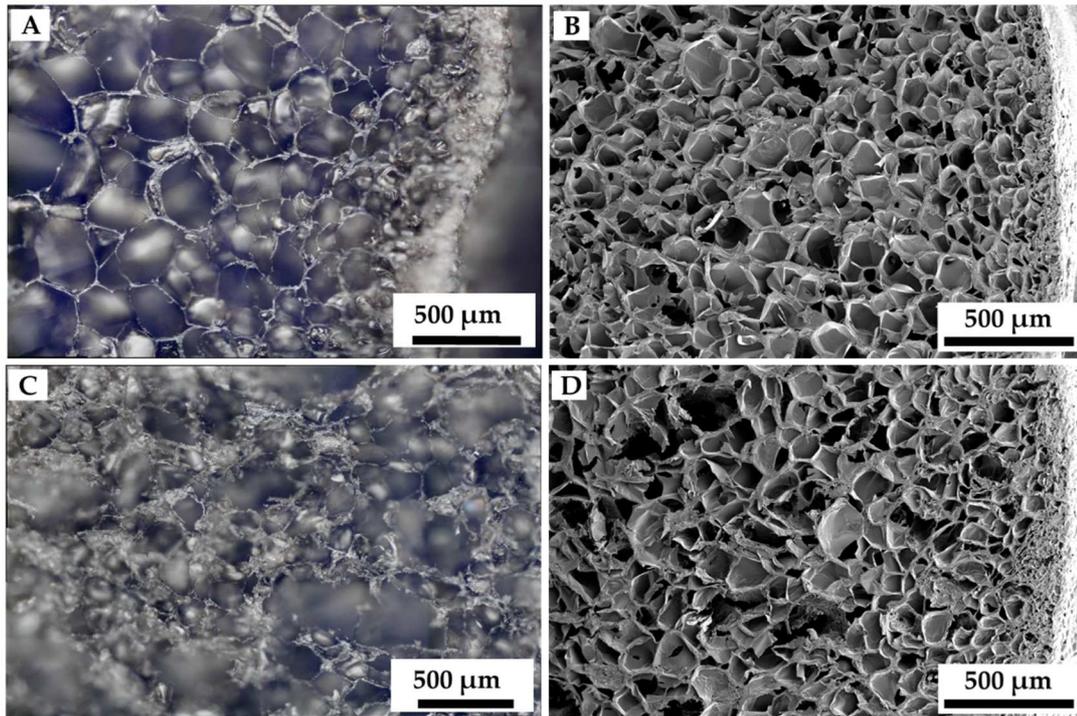
Images III.7. Coupes verticales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) et C-D, $G_{10}C_5N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM catéchol + 10 mM NaIO₄).



Images III.8. Coupes verticales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, $G_{10}C_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) et C-D, $G_{10}C_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM catéchol + 10 mM NaIO₄).



Images III.9. Coupes verticales. Colonne de gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, $G_{10}D_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) et C-D, $G_{10}D_5N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM dopamine + 10 mM NaIO₄).



Images III.10. Coupes verticales. Colonne de Gauche (Keyence). Colonne de droite (MEB). Avec A-B, $G_{10}D_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM dopamine + 10 mM $NaIO_4$) et C-D, $G_{10}D_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM dopamine + 10 mM $NaIO_4$).

Les images acquises avec le MEB et le microscope Keyence (**Images III.5 et 3**) montrent une certaine homogénéité et une plus forte régularité des pores des hydrogels les plus réticulés $G_{10}C_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM $NaIO_4$) et $G_{10}D_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM dopamine + 10 mM $NaIO_4$). Ces derniers possèdent une très petite quantité de zones blanches (**Images III.8 et 10**). Les zones blanches sont présentes dans tous les autres hydrogels et leur présence pourrait être due à la persistance d'un milieu oxydant soit, du fait des restes en $NaIO_4$ non consommé (3,3 mM et 5 mM de catéchol/dopamine) soit, des restes en composés phénoliques capables de former des espèces radicalaires ou de s'auto-oxyder (60 mM de catéchol/dopamine).

A la résolution du MEB et du microscope Keyence, aucune particule solide n'a pu être observée.

L'ensemble des données des mesures sur les coupes horizontales au Keyence ont été reprises dans la **Tableau III.13**. Les pores ont été modélisés comme des ellipses. L'aire d'une ellipse est donnée par la relation :

$$Majeur * Mineur * \pi \quad (20)$$

	Majeur (μm)	Mineur (μm)	Majeur- Mineur (μm)	Aire de l'ellipse (mm^2)	Nombre d'échantillons	Nombre total de mesures
G₁₀	215±20	157±14	59±7	0,117±0,019	4	696
G₁₀N₁₀	183±15	133±8	50±10	0,086±0,008	3	476
G₁₀C_{3,3}N₁₀	311±19	219±6	91±15	0,235±0,025	3	514
G₁₀D_{3,3}N₁₀	250±22	186±16	63±8	0,168±0,025	3	566
G₁₀C₅N₁₀	335±22	245±21	90±2	0,275±0,048	3	568
G₁₀D₅N₁₀	217±28	152±21	64±8	0,118±0,025	3	574
G₁₀C₂₀N₁₀	270±18	200±17	71±7	0,177±0,026	3	582
G₁₀D₂₀N₁₀	263±25	189±15	75±11	0,177±0,035	3	618
G₁₀C₆₀N₁₀	317±25	236±16	81±10	0,255±0,040	3	418
G₁₀D₆₀N₁₀	262±16	183±4	79±14	0,163±0,016	3	594

Tableau III.13. Mesures des longueurs (Majeur) et des largeurs (Mineur) des pores au vu des photos prises au Keyence pour des coupes horizontales effectuées au travers des gels (Figure III.21).

Les longueurs des axes majeurs, des axes mineurs et les aires des ellipses ont été représentés selon leur % de distribution en nombre (Figure III.24, 25).

Il ressort de la Figure III.24 que les hydrogels contenant du catéchol tendent à avoir une taille des pores différente que celle de la gélatine G₁₀ (gélatine 250 Bloom 10% p/v) et de la gélatine G₁₀N₁₀ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 10 mM NaIO₄). Sans surprise, le même % de distribution en nombre est retrouvé dans la Figure III.25 portant sur l'aire des ellipses.

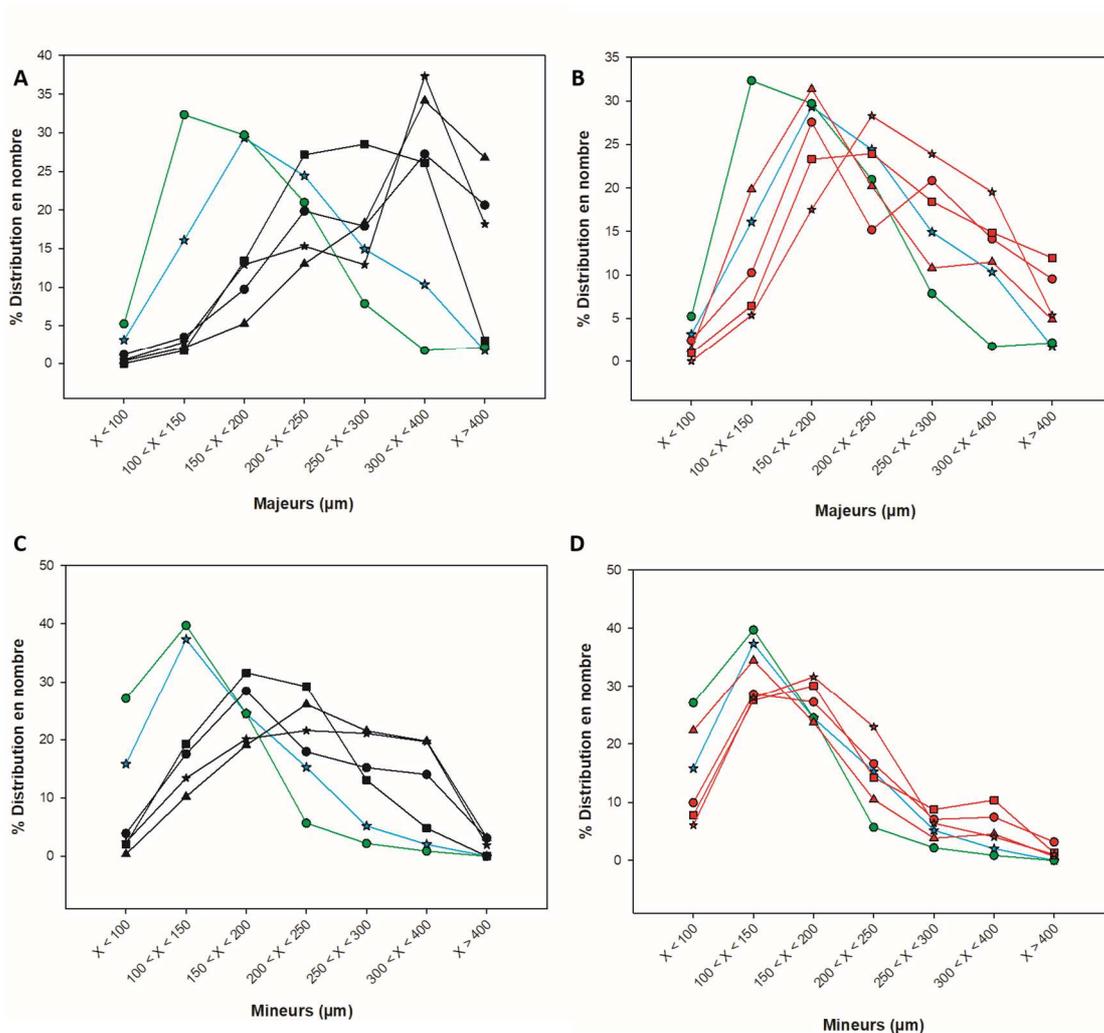


Figure III.24. % distribution en nombre de la longueur des majeurs et des mineurs. Avec G_{10} (gélatine 250 Bloom 10% p/v) (★), $G_{10}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 10 mM NaIO₄) (●) et **A** $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) (●), $G_{10}C_5N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) (▲), $G_{10}C_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) (noir, ■), $G_{10}C_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) (★). **B** $G_{10}D_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) (●), $G_{10}D_5N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) (▲), $G_{10}D_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) (■) et $G_{10}D_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) (★).

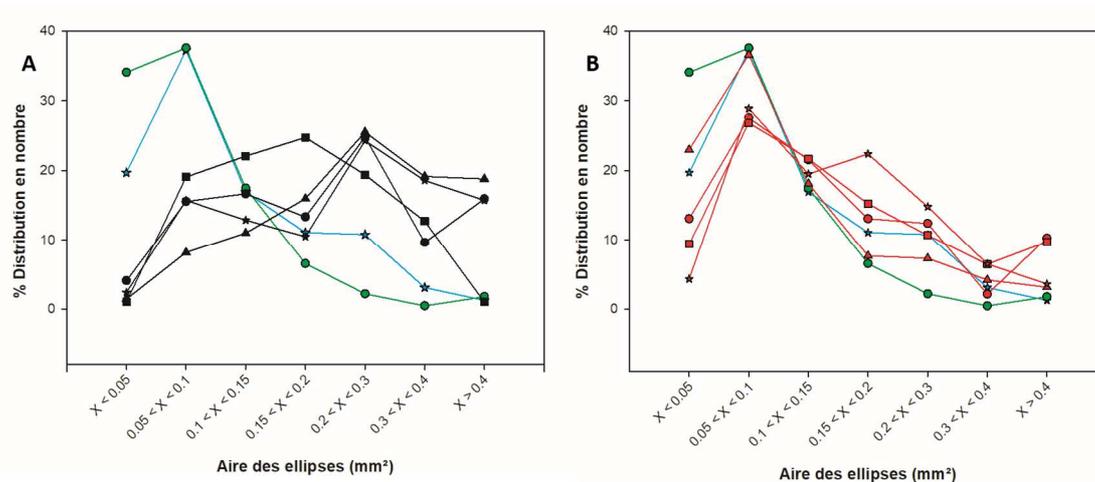


Figure III.25. % distribution en nombre de l'aire des ellipses. Avec G_{10} (gélatine 250 Bloom 10% p/v) (★), $G_{10}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 10 mM NaIO₄) (●) et **A** $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) (●), $G_{10}C_{5}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) (▲), $G_{10}C_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) (noir, ■), $G_{10}C_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM catéchol + 10 mM NaIO₄) (★). **B** $G_{10}D_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) (●), $G_{10}D_{5}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) (▲), $G_{10}D_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) (■) et $G_{10}D_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM dopamine + 10 mM NaIO₄) (★).

Discussion

Outre la température, le temps de chauffe et la vitesse d'agitation (plaque à 45°C, 15 minutes, préchauffage du tampon pendant 5 minutes, 200 rpm) et outre la procédure de lyophilisation (identique pour tous les hydrogels), les facteurs influençant la taille des pores sont la taille des agents réticulants et la distribution en charge de la gélatine (la viscosité) et le taux de réticulation [60].

Quant à la taille des agents réticulants catéchol et dopamine, et étant donné que le groupement éthylamine de la dopamine n'intervient pas dans la réticulation (les réactions intramoléculaires sont prioritaires par rapport aux réactions intermoléculaires), on peut dire que la taille des agents est la même et qu'elle ne serait de par là même intervenir dans le changement de la taille des pores.

La distribution des charges peut être affectée par 2 manières : par le changement de la concentration ionique et par le changement de pH [105].

Quant à l'affectation de la distribution des charges par changement de pH, il est largement connu que dans le cadre de la fixation des émulsions par la gélatine, l'éloignement du point isoélectrique et donc, la perturbation des charges globales va diminuer la viscosité de la gélatine. Les films de gélatine, au lieu d'être épais et de permettre la création de grandes bulles d'émulsion (et donc de pores), vont devenir très fin du fait de la répulsion des charges. En cas de tension, les films vont se casser et on observe la création de petites bulles [60]. L'auteur Haug I.J. précise sur ce point que les chaînes alpha de la gélatine possèdent des points de jonctions composés des 3 acides aminés Glycine-Proline-Hydroxyproline et que ces 3 acides aminés sont le lieu de la jonction des chaînes alpha à l'origine de la création des hélices de collagène. Cette jonction a par ailleurs, souvent été considérée comme des points de réticulation (elle contiendrait 20 à 30 acides aminés). L'auteur relève que cette jonction est stabilisée par des liaisons hydrogènes (considérées comme des liaisons électrostatiques). Après des expériences faites sur l'effet de la diminution du pH, il relève que la distribution des charges des chaînes alpha change, ce qui inhibe la formation des jonctions à l'origine de la création des hélices. La dénaturation de la gélatine en fonction du pH et des concentrations ioniques peut être suivie par DSC (Calorimétrie Différentielle à Balayage), par rayons X ou par polarimétrie. Les auteurs Giofrè et al. (2012) ont étudié la relation pH et stabilité des films de gélatine via le module de Young, la diffraction des rayons x et la DSC [118].

Quant à l'affection de la distribution des charges par augmentation de la concentration ionique Haug I.J relève que l'ajout de sels entraîne la diminution des chaînes à entrer en contact via des interactions électrostatiques de courte portée.

Dans notre cas, on remarque déjà que la diminution de la viscosité de la gélatine 250 Bloom 10% p/v (33 ± 2 Pa) (★) par l'ajout de 10 mM de NaIO_4 (19 ± 4 Pa) (●) provoque une baisse du % de distribution de l'aire des ellipses (Figure III.25). L'espèce NaIO_4 peut être considérée comme un sel et, à ce titre, perturbe la distribution des charges. Cette espèce peut également intervenir en tant qu'agent oxydant. Nous savons cependant qu'elle n'oxyde que les diols vicinaux et aminoalcools terminaux [106]. Il semble que cette perturbation se traduit dans la Figure III.25 via l'augmentation de la distribution en nombre de % des ellipses possédant une taille inférieure à $0,05 \text{ mm}^2$ de l'hydrogel $G_{10}N_{10}$ (●) par rapport à l'hydrogel G_{10} (★).

Il n'est *a priori* pas possible de comparer les hydrogels G_{10} , $G_{10}N_{10}$ avec les hydrogels réticulés à la dopamine et au catéchol. En Effet, nous savons depuis les expériences de balayage en température et en fréquence que les hydrogels G_{10} et $G_{10}N_{10}$ possèdent un croisement G' , G'' et sont dépendants de la fréquence. A ce titre, donc, ils qualifiés de gels dits « faibles ». Les hydrogels qui ne possèdent pas de croisement G' , G'' mais qui sont dépendant de la fréquence sont qualifiables de gels « physiques » [75,116].

En comparant l'hydrogel $G_{10}C_{20}N_{10}$ ($G'' = 95 \pm 22$ Pa) et $G_{10}D_{20}N_{10}$ ($G'' = 64 \pm 13$ Pa) on se rend compte que le maximum en distribution en nombre pour l'espèce catéchol ($0,15 < X < 0,2$) est supérieur à celui de l'espèce dopamine ($0,05 < X < 1$). L'hydrogel de dopamine contient 30 mM d'espèces ioniques (10 mM de NaIO_4 et 20 mM de chlorhydrate de dopamine). Le chlorhydrate de dopamine peut être vu comme une espèce ionique ou comme un libérateur de protons. La réaction de cyclisation (Figure III.30) de la dopamine *post*-oxydation va libérer dans le milieu un proton. Cette libération de protons pourrait aussi perturber les charges globales de la gélatine (et donc la viscosité). Afin d'identifier si c'est en tant qu'espèce ionique ou en tant qu'espèce donneuse de protons (ou les 2), la méthode de cristallographie par diffraction des rayons X pourrait être la plus envisageable.

Quant au taux de réticulation, il est observable que les hydrogels de catéchol réticulés de manière non optimale (3,3 mM, 5 mM et 60 mM de catéchol) possèdent des maxima de % de distribution en nombre plus élevés que la gélatine (entre $0,2$ et $0,3 \text{ mm}^2$). La distribution en charge de la gélatine n'est pas perturbée par le catéchol. Les hydrogels de catéchol ne possèdent qu'alors que 10 mM de NaIO_4 en espèces ioniques. Lorsque le taux de réticulation est optimal, le maximum de % de distribution en nombre baisse ($0,15$ et $0,2 \text{ mm}^2$). L'explication est relativement simple : plus le taux de réticulation est élevé, plus les sites de réticulations sont occupés et plus le maillage sera serré (Figure III.26B). Le taux ou degré de réticulation peut être évalué facilement en spectroscopie UV-Vis à l'aide de la méthode de la détermination des amines libres mise en place par Sataké [118–120].



Figure III.26. Représentation schématique de deux chaînes de polymères de gélatine (noir) et des agents réticulants (vert). Avec A, l'hypothèse d'un hydrogel avec un taux de réticulation bas et B, hypothèse d'un hydrogel avec un taux de réticulation élevé.

En résumé, nous avons observé à l'aide du microscope Keyence et au MEB que les hydrogels $G_{10}C_{20}N_{10}$ et $G_{10}D_{20}N_{10}$ possèdent les pores les plus réguliers et le moins de zones blanches. La présence de zones blanches pourrait être due à la persistance d'un milieu oxydant soit, du fait des restes en NaIO_4 non consommé (3,3 mM et 5 mM de catéchol/dopamine) soit, des restes en composés phénoliques capables de former des espèces radicalaires ou de s'auto-oxyder (60 mM de catéchol/dopamine). L'optimisation de la réticulation pour les hydrogels de catéchol donne lieu à une baisse de l'aire des pores considérés dans le cas présent comme des ellipses (maximum en % de distribution

en nombre : 0,15 et 0,2 mm²). L'hydrogel de dopamine contient 30 mM d'espèces ioniques (10 mM de NaIO₄ et 20 mM de chlorhydrate de dopamine). Le chlorhydrate de dopamine peut être vu comme une espèce ionique ou comme un libérateur de protons. A concentration optimale fixe (G₁₀C₂₀N₁₀ et G₁₀D₂₀N₁₀), l'espèce catéchol possède une taille des pores en ellipse supérieure à l'espèce dopamine (entre 0,15 et 0,2 mm² vs entre 0,05 et 0,1 mm²).

f) Conclusions/discussions

Pour résumer, il a été trouvé que les conditions optimales en module de conservation G' à gélatine et NaIO₄ fixes (gélatine 10% p/v + 10 mM NaIO₄) ont été obtenues pour les hydrogels contenant du catéchol à 20 mM et pour les hydrogels contenant de la dopamine de 20 à 30 mM (**Figure III.17**). Les vitesses de gélification à 100 mM en dopamine prouvent que les hydrogels restent en conditions oxydantes et qu'elles ont un impact sur le module de conservation des hydrogels (**Figure III.18**).

En matière d'adhésion, ces mêmes hydrogels G₁₀C₂₀N₁₀ et G₁₀D₃₀N₁₀ présentent des énergies d'adhésion supérieures à 100 J/m² (après 3h de gélification, à 25°C et 100 μm/s) et des forces d'adhésion de l'ordre de 80 kPa (**Figure III.19**). Toutes les ruptures observées furent cohésives.

Les hydrogels G₁₀C₂₀N₁₀, G₁₀D₂₀N₁₀ et G₁₀C₈₀N₁₀ sont stables à température corporelle et sont réticulés (**Figure III.20**). Ils possèdent des pentes (0,04±0,03, 0,06±0,03, 0,09±0,02) et des facteurs de perte (0,05±0,01, 0,06±0,02, 0,07±0,01) inférieurs à la gélatine dans les expériences à 100% de déformation (**Figure III.22**). Ils peuvent donc être qualifiés de gels dit « physiques ».

Nous avons observé à l'aide du microscope Keyence et au MEB que les hydrogels G₁₀C₂₀N₁₀ et G₁₀D₂₀N₁₀ possèdent les pores les plus réguliers et le moins de zones blanches. La présence de zones blanches pourrait être due à la persistance d'un milieu oxydant soit, du fait des restes en NaIO₄ non consommé (3,3 mM et 5 mM de catéchol/dopamine) soit, des restes en composés phénoliques capables de former des espèces radicalaires ou de s'auto-oxyder (60 mM de catéchol/dopamine). L'optimisation de la réticulation pour les hydrogels de catéchol donne lieu à une baisse de l'aire des pores considérés dans le cas présent comme des ellipses (maximum en % de distribution en nombre : 0,15 et 0,2 mm²). L'hydrogel de dopamine contient 30 mM d'espèces ioniques (10 mM de NaIO₄ et 20 mM de chlorhydrate de dopamine). Le chlorhydrate de dopamine peut être vu comme une espèce ionique ou comme un libérateur de protons. Afin d'identifier si c'est en tant qu'espèce ionique ou en tant qu'espèce donneuse de protons (ou les 2), la méthode de cristallographie par diffraction des rayons X pourrait être la plus envisageable.

A concentration optimale fixe (G₁₀C₂₀N₁₀ et G₁₀D₂₀N₁₀), l'espèce catéchol possède les meilleurs résultats en module de conservation (2282±112 vs 1799±291 pa), en énergie de fracture (99±14 vs 89±5 J/m²), en dépendance à la fréquence (0,04±0,03 vs 0,06±0,03), et en tailles des pores (entre 0,15 et 0,2 mm² vs entre 0,05 et 0,1 mm²). De plus, l'espèce catéchol ne possède pas de transition vitreuse sur la gamme de température considérée contrairement à l'espèce réticulée à la dopamine (Tg 47,8°C).

La concentration optimale en composés phénoliques est de 20 à 30 mM soit un rapport de 1 molécule de NaIO₄ pour 2 ou 3 molécules de composés phénoliques.

Le pourquoi des différences entre les composés phénoliques pyrogallol, catéchol et dopamine peut également s'expliquer d'un point de vue mécanistique. Aussi, la spectroscopie UV-vis et IR peuvent venir étayer la compréhension des différences entre ces espèces.

C. Caractérisations des composants des hydrogels par UV-vis et IR

Cette section porte sur la caractérisation UV-vis et IR des hydrogels de pyrogallol (1), de catéchol (2) et de dopamine (3). Des représentations des molécules seront apportées afin de comprendre l'origine des caractères

adhésifs ou non des hydrogels. Une conclusion permettra de comparer les différents agents de réticulations que sont le pyrogallol, le catéchol et la dopamine (4).

1. Hydrogels de pyrogallol

Afin de connaître la composition de l'hydrogel de pyrogallol et de savoir si le pyrogallol est capable de faire des réticulations, un spectre UV-Vis de l'hydrogel a été fait dès l'oxydation de l'agent de réticulation par le NaIO_4 (Figure III.27).

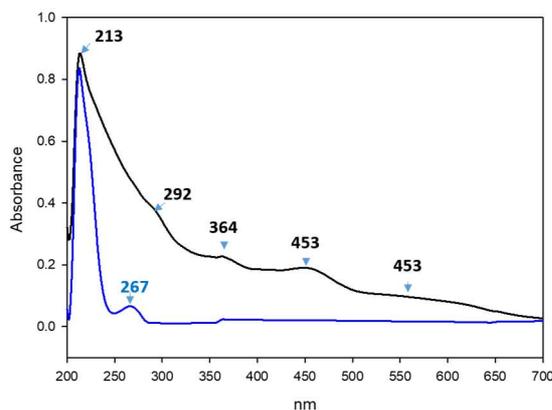


Figure III.27. Recherche qualitative des molécules présentes dans les hydrogels de pyrogallol (après 5 minutes de chauffe, 45°C). Pyrogallol dans un tampon acétate (ligne bleue), pyrogallol + NaIO_4 dans un tampon acétate (ligne noire).

Le changement de l'allure du spectre provient de l'oxydation du pyrogallol. Le pyrogallol oxydé (Figure III.28) va former une espèce mésomère et va réagir préférentiellement avec un autre pyrogallol oxydé pour donner l'espèce purpurogalline [112,121]. D'après la littérature, l'addition nucléophile d'un groupement de la gélatine sur la purpurogalline ne pourra se faire qu'à partir de la 120^{ème} minute [112].

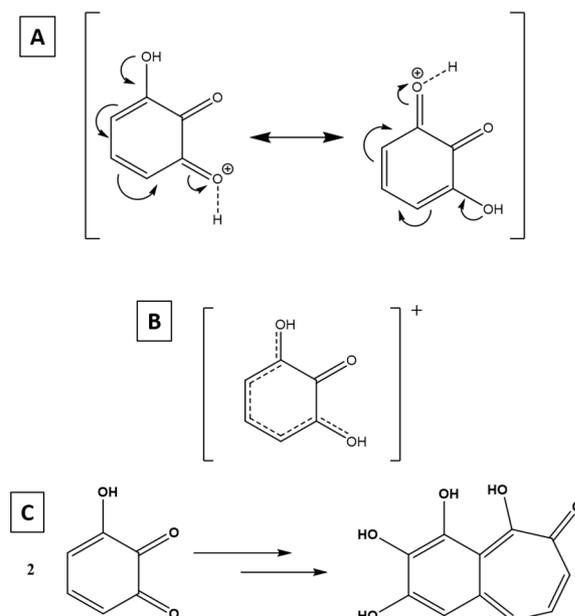


Figure III.28. A) Formes mésomères du pyrogallol (oxydé par le periodate de sodium (NaIO_4)). B) Hybride de résonance du pyrogallol oxydé. C) Résultat de l'oxydation du pyrogallol par le periodate de sodium (NaIO_4) formant la purpurogalline.

Les résultats des tests de probe-tack sur les hydrogels de pyrogallol ne montrent pas de différence entre ces derniers et ceux de la gélatine pure. Seule la purpurogalline est capable de faire des réticulations. Les résultats de probe-tack et le spectre UV-vis démontrent qu'il n'y a pas eu de réticulations.

La durée d'attente de 120 minutes pour une réticulation ne correspond pas à nos exigences à savoir, réticuler la gélatine afin d'obtenir une colle en moins de 5 minutes pour pouvoir l'utiliser immédiatement sur les tissus.

2. Hydrogels de catéchol

Afin de connaître la composition de l'hydrogel de catéchol et de savoir s'il le catéchol est capable de faire des réticulations, un spectre UV-Vis de l'hydrogel a été fait dès l'oxydation de l'agent de réticulation par le NaIO_4 (Figure III.29). Il a également été fait des spectres IR sur les hydrogels lyophilisés selon la procédure de lyophilisation retrouvable en PARTIE II.C.5.

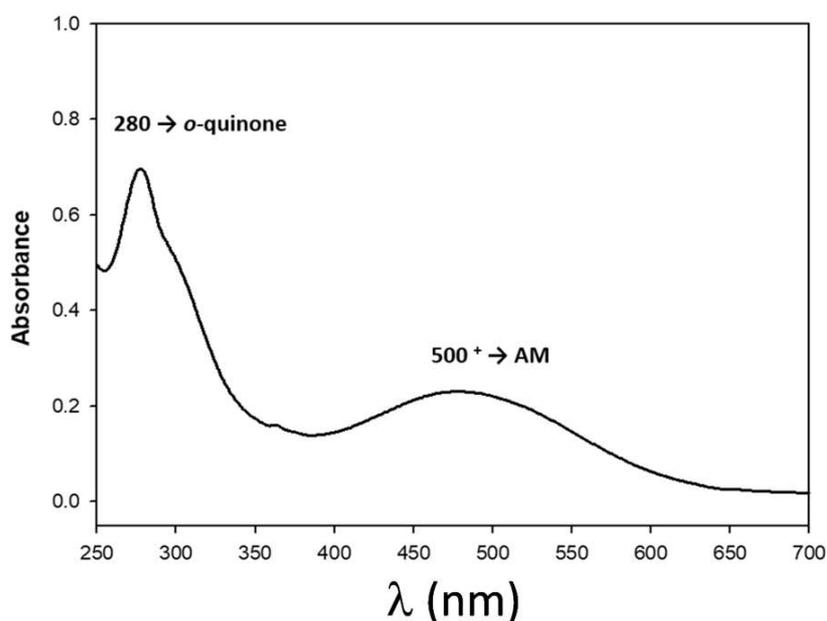


Figure III.29. Recherche qualitative des molécules présentes dans les hydrogels de catéchol. Le spectre est le résultat d'un prélèvement dans le batch (10% p/v gélatine + 10 mM catéchol + 10 mM NaIO_4) au moment de la chauffe (5 minutes, 45°C). AM : pic correspondant à l'absorption de l'espèce obtenue après addition de Michael.

Les pics caractéristiques d'une espèce résultant d'une addition de Michael se trouvent à des longueurs d'onde de 358 nm et 488 nm [122]. Leur présence dans le spectre de la Figure III.29 démontre bien la formation d'une liaison covalente entre un groupement nucléophile de la gélatine et le catéchol oxydé (*o*-quinone).

L'oxydation par le periodate de sodium (NaIO_4) peut donner du catéchol oxydé (Figure III.30) sous la forme semiquinone (perte de 1 électron) et/ou sous forme *ortho*-quinone (perte de 2 électrons) [123]. La première forme peut donner lieu à de la polymérisation et la seconde à des additions de Michael et des bases de Schiff [15]. A température ambiante le periodate de sodium (NaIO_4) est connu pour oxyder les diols vicinaux et les aminoalcools dans une réaction à 2 électrons [106]. Il n'est cependant pas exclu que le periodate de sodium (NaIO_4) donne lieu à des réactions radicalaires, dans un milieu à température élevée.

La présence de bases de Schiff est difficilement perceptible puisque les longueurs d'onde de ses dernières sont au niveau de la gélatine. **Schiff base** : 220 nm $\pi - \pi^*$, 260 et 310-350 nm Ar=N*. **Gélatine** : -220 nm (acides aminés), 275 et 260 nm tyrosine et la phénylalanine, 300-400 nm chaînes alpha.

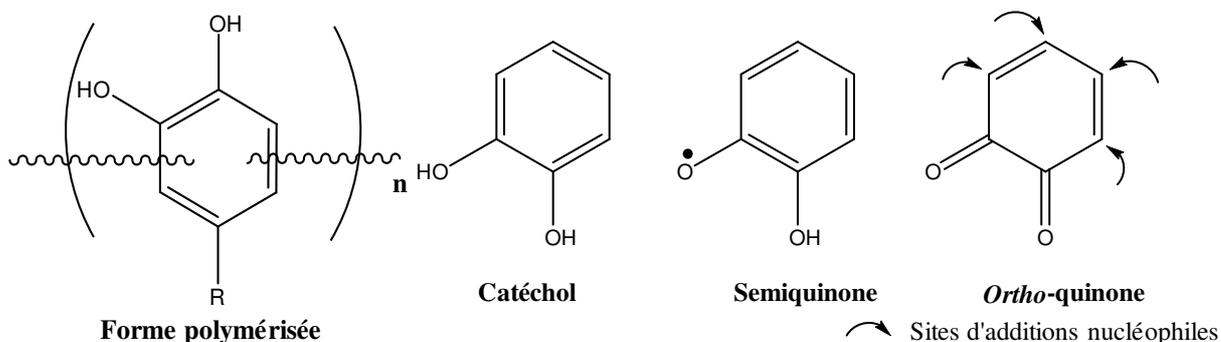


Figure III.30. Représentation du catéchol et de ses produits d'oxydation.

Pour que la réticulation soit optimale, il faut au minimum avoir 2 sites de liaison (Figure III.31). Le catéchol possède 4 sites d'addition de Michael (liaisons covalentes irréversibles) et 2 sites de liaisons pour les bases de Schiff (2 carbonyles, liaisons covalentes réversibles). Il est à relever que l'espèce sous forme polymérisée n'est pas exclusive d'une oxydation pouvant donner à leur tour des liaisons covalentes réversibles et irréversibles (bases de Schiff et addition de Michael).

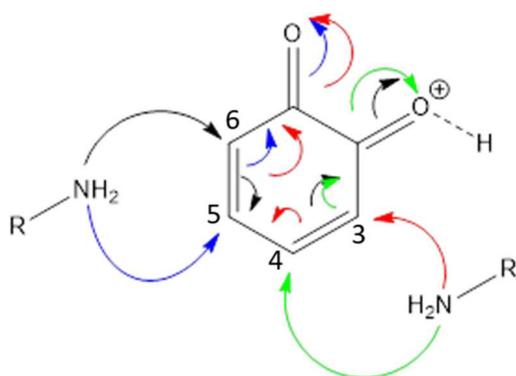


Figure III.31. Représentation du mécanisme de l'addition de Michael avec les 4 sites de liaisons possibles. Les sites de liaison préférentiels sont en position 4 et 5.

Le milieu réactionnel étant très dense (10% p/v gélatine), toute espèce qui possède un groupement nucléophile peut *a priori* se lier au catéchol (lysine, histidine, hydroxyle...).

Au vu de l'analyse spectrale, il apparaît que l'espèce catéchol donne lieu à de la réticulation de la gélatine à des temps courts (-5 minutes) via des additions de Michael.

Il a été choisi de faire de la spectroscopie IR afin de pouvoir quantifier ou même qualifier la présence des réticulations. Pour ce faire, les hydrogels à possédant une quantité fixe de gélatine (10% p/v) et de NaIO₄ (10 mM) avec des quantités variables en catéchol (de 3,3 mM à 80 mM) ont été faits (Figure 32-33).

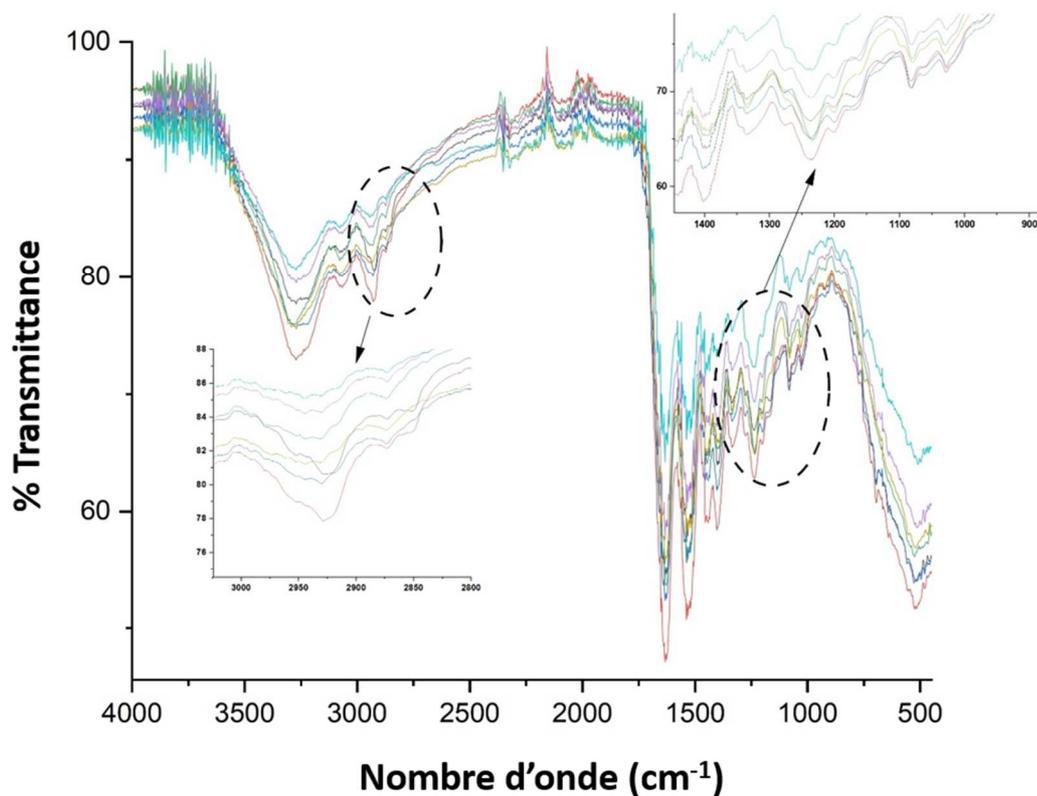


Figure III.32. Comparaison des spectres des hydrogels G_{10} (noir), $G_{10}N_{10}$ (rouge), $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (bleu), $G_{10}C_5N_{10}$ (vert), $G_{10}C_{20}N_{10}$ (violet), $G_{10}C_{60}N_{10}$ (jaune) et $G_{10}C_{80}N_{10}$ (bleu ciel). Avec G_{10} (gélatine 250 Bloom 10% p/v), $G_{10}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 10 mM NaIO₄), $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO₄), $G_{10}C_5N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM catéchol + 10 mM NaIO₄), $G_{10}C_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM NaIO₄), $G_{10}C_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM catéchol + 10 mM NaIO₄), $G_{10}C_{80}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 80 mM catéchol + 10 mM NaIO₄).

Il a été trouvé des différences au niveau des pics 1235 cm⁻¹/1450 cm⁻¹ (**Tableau III.14**). Ces pics représentent l'amide III (1235 cm⁻¹) et la proline à (1450 cm⁻¹). L'amide III correspond à l'élongation C-N ainsi qu'à la liaisons N-H de la courbure de l'hélice [124]. Il est usuel d'utiliser les rapports d'intensité de ces pics pour évaluer la perturbation des chaînes alpha. Nous l'avons fait dans le **Tableau III.14**.

Entre la gélatine seule (ligne noire) et l'hydrogel $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (ligne rouge) il se trouve une différence entre 2928-2961 cm⁻¹ (ligne rouge, **Figure III.33**, CH vibrations). L'espèce catéchol n'est pas à l'origine de cette différence (ligne bleue). Cette différence avait déjà été observée lors de l'addition de dialdéhyde d'amidon comme agent de réticulation [125]. Cependant, elle ne constitue pas la preuve d'une réticulation parce qu'on la retrouve sur les spectres des hydrogels $G_{10}D_{80}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 80 mM dopamine) (**Figure III.37**), spectres qui ne sont pas réticulés.

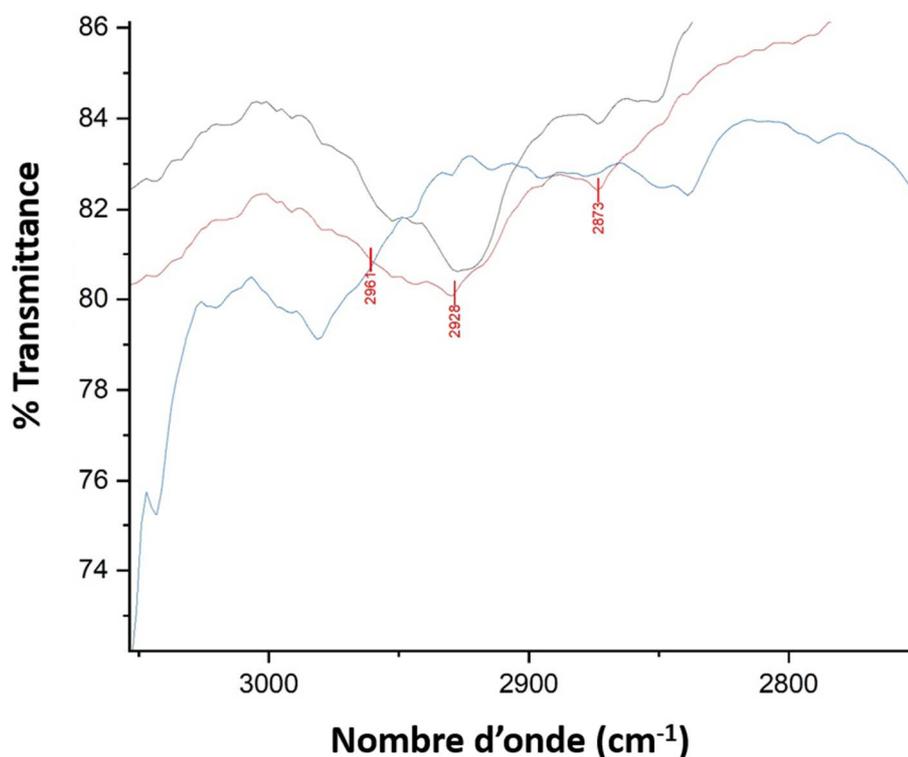


Figure III.33. Comparaison entre l'hydrogel G₁₀ (noir), G₁₀C_{3,3}N₁₀ (rouge) et l'espèce catéchol seule (bleu). Avec G₁₀ (gélatine 250 Bloom 10% p/v) et G₁₀C_{3,3}N₁₀ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO₄).

Il n'a pas été possible de mettre en exergue la présence de points de réticulations entre l'espèce catéchol et la gélatine. La différence entre les hydrogels de gélatine et les hydrogels de catéchol qui se trouve à 2928-2961 cm⁻¹ qui représente des CH vibrations n'a pas été élucidée.

3. Hydrogels de dopamine

Afin de connaître la composition de l'hydrogel de dopamine et de savoir s'il la dopamine est capable de faire des réticulations, un spectre UV-Vis de l'hydrogel a été fait dès l'oxydation de l'agent de réticulation par le NaIO₄ (Figure III.34). Il a également été fait des spectres IR sur les hydrogels lyophilisés selon la procédure de lyophilisation retrouvable en PARTIE II.C.5.

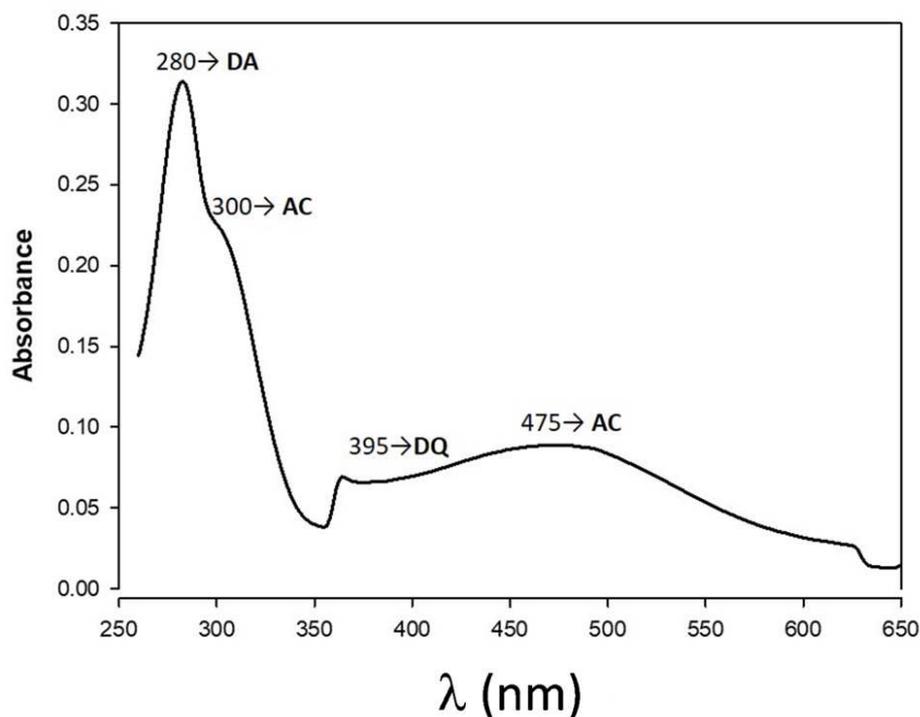


Figure III.34. Recherche qualitative des molécules présentes dans les hydrogels de chlorhydrate de dopamine (gélatine 10% p/v + 20 mM chlorhydrate de dopamine + 10 mM de NaIO_4). Echantillon prélevé dans le batch à chaud (après 5 minutes de chauffage à 45°C).

Le pic à 280 nm représente l'espèce dopamine, ceux à 300 nm et 475 nm l'espèce aminochrome. Le pic centré à 395 nm correspond à la dopamine-*o*-quinone. Les pics de la **Figure III.34** sont similaires à ceux obtenus par Bisaglia [115]. Ce dernier n'exclut pas un réarrangement de ces espèces (**Figure III.35**) en 5, 6-dihydroxyindole (DHI) et en indole-5, 6-quinone (IQ).

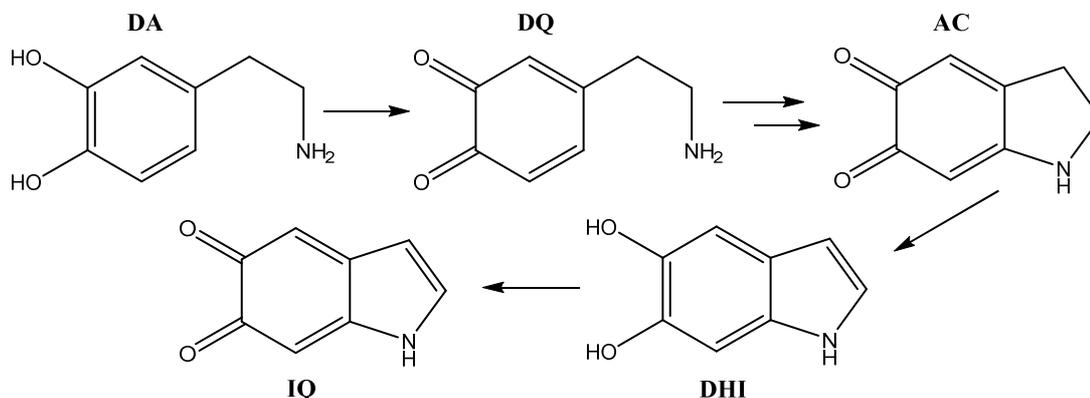


Figure III.35. Schéma représentatif des dérivés de dopamine présents aux faibles temps de réaction d'oxydation de la dopamine (DA) par le periodate de sodium (NaIO_4). Avec la dopamine-*o*-quinone (DQ), l'aminochrome (AC), la 5, 6-dihydroxyindole (DHI) et l'indole-5, 6-quinone (IQ).

Les réactions intramoléculaires sont prioritaires par rapport aux autres réactions. L'amine de la dopamine va donner lieu à une cyclisation ($\text{DQ} \rightarrow \text{AC}$) et ne sera pas disponible. La molécule DQ ne pourra alors faire l'objet d'une quelconque addition de Michael. L'espèce AC possède 4 sites de liaisons covalentes irréversibles (addition de Michael) avec une certaine gêne stérique du cycle pyrrolidine et 2 sites de liaisons covalentes réversibles (2 carbonyles). L'espèce IQ possède 1 site de liaison covalente de plus. Il convient de prendre en compte le paramètre temporel : la dopamine change de statut au cours du temps et devient tantôt nucléophile (DA, DHI), tantôt

électrophile (DQ, AC, IQ). Seules les espèces électrophiles peuvent réagir avec les amines et conduire à une réticulation.

A moins de 5 minutes de la réaction, il n'est retrouvé que les espèces DA, DQ et AC. Seule l'espèce AC peut donner lieu à des additions de Michael et des bases de Schiff. Cependant, cette espèce va évoluer dans le temps vers l'espèce DHI qui ne pourra donner lieu à telles additions. Aussi, l'espèce AC semble avoir moins de sites de liaisons covalentes du fait de l'encombrement du cycle. Il y a dès lors, de véritables pertes en probabilité de rencontre. Toute perte en probabilité de rencontre réduira *ipso facto* la quantité de points de réticulations [126].

Au stade de la simple étude spectrale, il n'est pas possible d'établir une preuve d'une quelconque réticulation de la gélatine avec les espèces résultant de l'oxydation de la dopamine. Les approches rhéologiques a posteriori nous ont démontré que la réticulation était bien effective (- 5 min.).

Il a été choisi de faire de la spectroscopie IR afin de pouvoir quantifier ou même qualifier la présence des réticulations. Pour ce faire, les hydrogels à possédant une quantité fixe de gélatine (10% p/v) et de NaIO₄ (10 mM) avec des quantités variables en dopamine (de 3,3 mM à 80 mM) ont été faits (Figure 36-37).

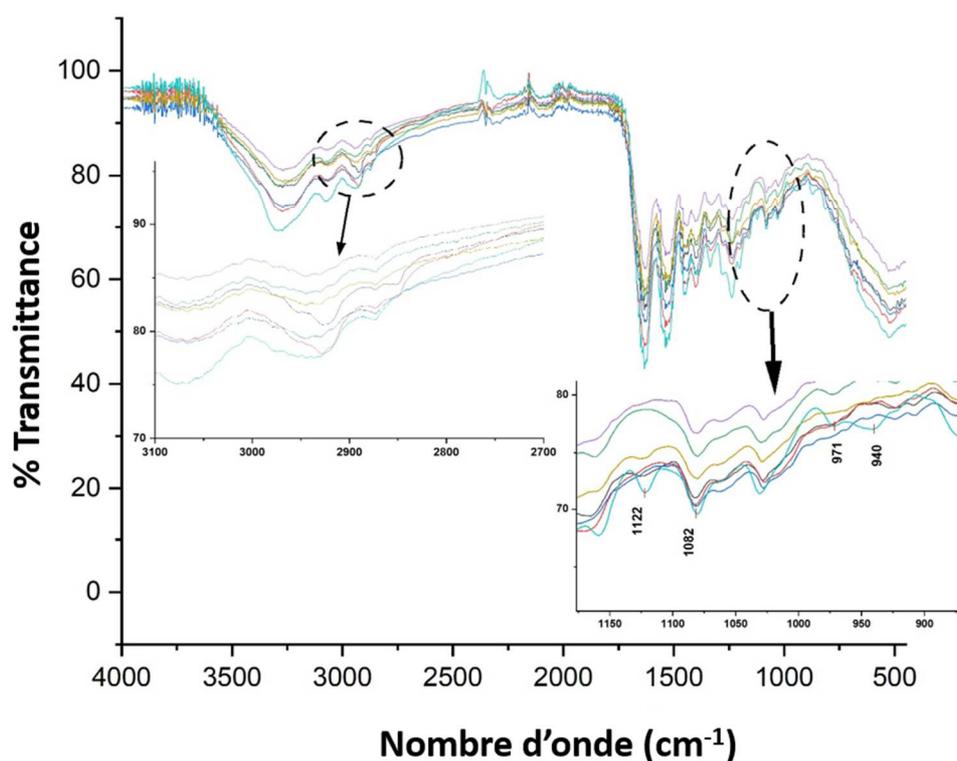


Figure III.36. Comparaison des spectres des hydrogels G_{10} (noir), $G_{10}N_{10}$ (rouge), $G_{10}D_{3,3}N_{10}$ (bleu), $G_{10}D_5N_{10}$ (vert), $G_{10}D_{20}N_{10}$ (violet), $G_{10}D_{60}N_{10}$ (jaune) et $G_{10}D_{80}N_{10}$ (bleu ciel). Avec G_{10} (gélatine 250 Bloom 10% p/v), $G_{10}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 10 mM NaIO₄), $G_{10}D_{3,3}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 3,3 mM dopamine + 10 mM NaIO₄), $G_{10}D_5N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 5 mM dopamine + 10 mM NaIO₄), $G_{10}D_{20}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 20 mM dopamine + 10 mM NaIO₄), $G_{10}D_{60}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 60 mM dopamine + 10 mM NaIO₄), $G_{10}D_{80}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 80 mM dopamine + 10 mM NaIO₄).

Les pics de l'hydrogel $G_{10}D_{80}N_{10}$ à 1122, 1082, 971 et 940 cm^{-1} (Figure III.37) sont attribuables au chlorhydrate de dopamine [127]. Le trop petit nombre de sites de liaisons covalentes rend impossible son observation en spectroscopie IR [128].

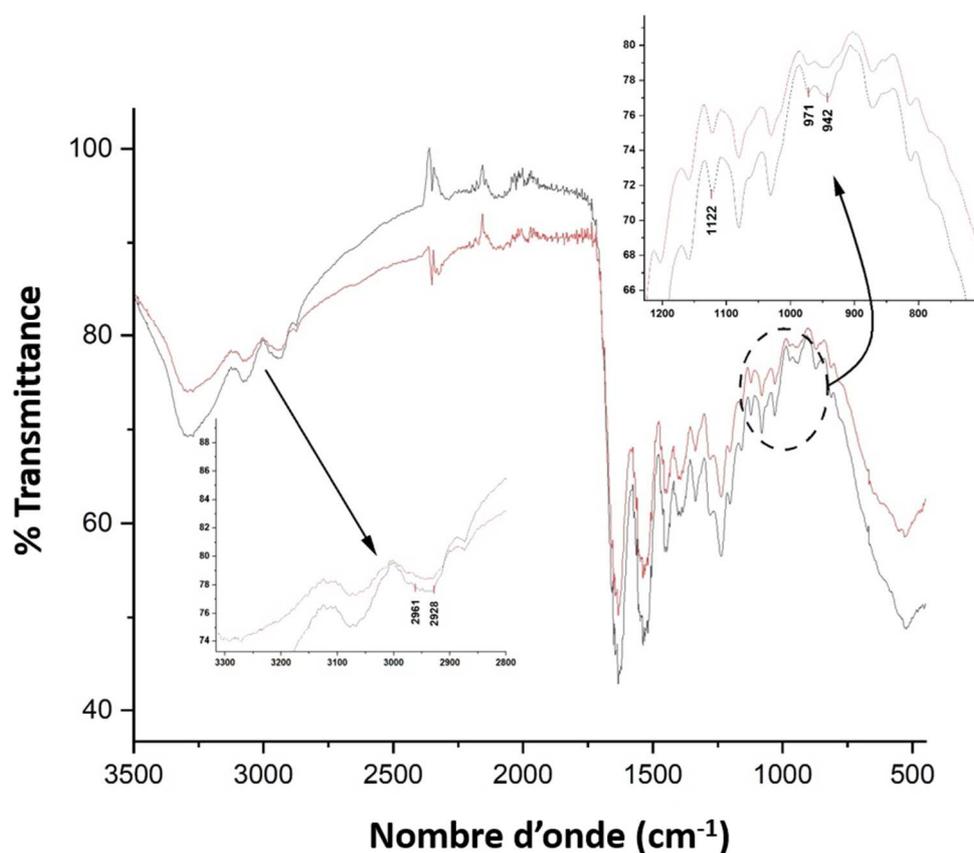


Figure III.37. Comparaison entre les spectres des hydrogels $G_{10}D_{80}N_{10}$ (noir) and $G_{10}D_{80}$ (rouge). Avec, $G_{10}D_{80}N_{10}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 80 mM dopamine + 10 mM NaIO_4) et $G_{10}D_{80}$ (gélatine 250 Bloom 10% p/v + 80 mM dopamine).

Il est d'usage d'utiliser le ratio des pics en intensité à 1235 cm^{-1} (amide III) et 1450 cm^{-1} (proline, hydroxyproline) dans le but de déterminer le degré de perturbation des chaînes α [111]. Dans le cadre de l'étude du collagène pur, le ratio est égal à 1. Nous avons fait un calcul analogue avec la gélatine B 250 Bloom 10% p/v et nous avons obtenu un ratio ($I_{1450\text{cm}^{-1}}/I_{1235\text{cm}^{-1}}$) de 0,9701 (Tableau III.14). Ce dernier nous a servi de base pour évaluer le pourcentage de perturbation des autres hydrogels. Les ratios des hydrogels de catéchol et de dopamine (3,3 mM) n'ont pas présenté de différence particulière avec la gélatine pure (0,02% et 0,35% pour le catéchol et la dopamine respectivement). L'addition de NaIO_4 (10 mM) donne une différence de 2,24%, ce qui pourrait expliquer la diminution de G' observée lors du suivi de la gélification de l'hydrogel $G_{10}N_{10}$ (Figure III.4). Nos déductions vont dans le même sens que celles faites par Haug [105] (diminution de 50% de la valeur de G' pour la gélatine de poisson de 12 mM à 250 mM de NaCl). Les autres concentrations de composés phénoliques avec 10 mM de NaIO_4 font varier le ratio de 1,17% à 2,83% pour tous les hydrogels à l'exception de l'hydrogel $G_{10}D_{80}N_{10}$ qui montre une variation plus importante de 4,62%. Au vu des précédents de la littérature on peut conclure que les espèces phénoliques perturbent les chaînes α de la gélatine.

Ratio Intensité des Pics ($1450\text{ cm}^{-1}/1234\text{ cm}^{-1}$)					
		Différence (%)			
0,9484	$G_{10}N_{10}$	-2,24	0	G_{10} (réf.)	0,9701
0,9699	$G_{10}C_{3,3}N_{10}$	-0,02	0,35	$G_{10}D_{3,3}N_{10}$	0,9736
0,9932	$G_{10}C_5N_{10}$	2,38	2,55	$G_{10}D_5N_{10}$	0,9949
0,9815	$G_{10}C_{20}N_{10}$	1,17	2,09	$G_{10}D_{20}N_{10}$	0,9905
0,9972	$G_{10}C_{60}N_{10}$	2,78	2,83	$G_{10}D_{60}N_{10}$	0,9976
0,9821	$G_{10}C_{80}N_{10}$	1,23	4,62	$G_{10}D_{80}N_{10}$	1,015

Tableau III.14. Ratios d'intensité des pics (colonnes gauche et droite) en fonction des hydrogels. Les colonnes du centre du tableau indiquent la différence en % des ratios obtenus par rapport à l'hydrogel de gélatine B 250 Bloom pure (G_{10}).

Pour autant une question demeure. On remarque que dans le cadre de la présence seule de periodate de sodium ($G_{10}N_{10}$) le ratio d'intensité des pics donne lieu à une différence négative de -2.24% par rapport à la valeur de référence G_{10} . Concrètement la différence en intensité entre les 2 pics est plus importante avec $G_{10}N_{10}$ qu'avec tous les autres hydrogels. Il conviendrait de refaire les expériences plusieurs fois afin d'obtenir des moyennes avec écarts-types avant d'apporter une quelconque conclusion sur le sujet. Si cette tendance se maintient, il serait légitime de penser que la présence des agents de réticulations affecte les chaînes alpha de la gélatine d'une autre façon que celle du periodate de sodium. On pourrait envisager par exemple, la perturbation des chaînes alpha du fait de la présence de nanoparticules.

4. Conclusions/discussions

Quant au pyrogallol, bien que la littérature fasse état d'une durée d'attente de 120 minutes pour une réticulation via une addition de Michael, nous aurions pu espérer une possible réticulation du fait que le milieu est concentré et qu'à ce titre, il peut se comporter comme une enzyme synthétique et accélérer les réactions (effet dendrimère [129]). Cet effet n'a pas eu lieu et le temps d'attente ne correspond pas à nos exigences (obtenir une colle en moins de 5 minutes pour pouvoir l'utiliser immédiatement sur les tissus).

Au vu de l'analyse des spectres UV-vis, il apparaît que l'espèce catéchol donne lieu à de la réticulation de la gélatine à des temps très courts (-5 minutes). De visu (virage de la couleur rapide à l'ajout de l'oxydant $NaIO_4$), et au vu des résultats rhéologiques, la dopamine oxydée réticule la gélatine dans le même ordre de temps. L'analyse UV-vis de l'hydrogel de dopamine nous a permis de comprendre pourquoi la dopamine possède des valeurs rhéologiques inférieures au catéchol.

*Les spectres IR ne nous ont pas permis d'établir la preuve de liaisons covalentes. Cependant, ils permettent de mettre en exergue le fait que l'ajout de $NaIO_4$ et de composés phénoliques a pour effet de perturber les chaînes α de la gélatine. Ces dernières sont responsables de la cohésion de l'hydrogel et sont nécessaires à la gélification. Les espèces $NaIO_4$ et le chlorhydrate de dopamine sont ioniques et à ce titre peuvent venir perturber les chaînes alpha en diminuant les possibilités des chaînes à entrer en contact via des interactions électrostatiques de courte portée. Le chlorhydrate de dopamine, en tant que composé acide peut également empêcher les jonctions des chaînes alpha par la perturbation des charges globales. Enfin si la tendance trouvée lors des études des pics d'intensité du **Tableau III.14** se confirme, la formation des hélices, et donc les jonctions des chaînes alpha pourrait être perturbée par la présence de nanoparticules de catéchol et de dopamine.*

D. Conclusions/discussions : partie expérimentale

1

(i) **Concentration optimale en gélatine B (250 Bloom).** Les expériences rhéologiques de la cinétique de gélification de la gélatine (**Figure III.1**) nous ont permis de déterminer que la concentration optimale en gélatine est de 10% p/v. En deçà de cette valeur, le module de conservation G' n'est pas suffisant pour assurer une base solide aux hydrogels futurs. Cette même figure révèle que les concentrations supérieures à 10% p/v réduisent les chances d'alignement des molécules et donc de réticulation.

(ii) **Concentration optimale en oxydant (NaIO_4) vis-à-vis de la gélatine B (250 Bloom).** Les déterminations rhéologiques de la cinétique et du balayage en température (**Figures III.2,3**) de la gélatine à concentration en NaIO_4 variable nous ont permis de déterminer que la gélatine à 20% p/v est très peu affectée par la présence de NaIO_4 même en excès. A 90 mM de NaIO_4 , le module de conservation n'a perdu que 19% de sa valeur initiale. Les températures de transition gel-sol restent les mêmes sur une gamme allant de 35°C à 43°C pour la gélatine 20% p/v et de 33°C à 45°C pour la gélatine 10% p/v malgré l'augmentation de concentration en NaIO_4 . Le spectre **Figure III.4** montre que la présence de 10 mM de NaIO_4 perturbe les chaînes α de la gélatine à 10% p/v de 2,24%. La **Figure III.2** (cinétique de gélification, suivi rhéologique) fait état d'une perte de 22% en module de conservation G' lorsqu'il est ajouté 10 mM de NaIO_4 à 10% p/v de gélatine 250 Bloom.

(iii) **Concentration optimale en composés phénoliques vis-à-vis de la gélatine B (250 Bloom).** Au vu des résultats obtenus à la **Figure III.17**, l'étude de la concentration optimale en composés phénoliques (catéchol, dopamine) ne montre pas de différence en module de conservation G' jusqu'à 30-40 mM par rapport à la gélatine 250 Bloom 10% p/v seule. Nous restons dans le même ordre de grandeur (entre 560 et 1070 Pa). Au-dessus de 30-40 mM, les valeurs de G' (Pa) diminuent jusqu'à être à 41% et 30% de la valeur du G' (Pa) de la gélatine à 80 mM de catéchol et de dopamine respectivement.

(iv) **Concentration optimale en oxydant (NaIO_4) vis-à-vis de la gélatine 10% p/v + 10 mM de composés phénoliques (catéchol, pyrogallol).** Le pyrogallol n'a pas montré de différence significative en rhéologie vis-à-vis de la gélatine seule. Les hydrogels en contenant n'ont pas été l'objet de réticulations. Il a été démontré en spectroscopie UV-vis que l'hydrogel contenant du catéchol est réticulé via des additions de Michael (**Figure III.29**). Passer de 10 mM à 20 mM en NaIO_4 pour les hydrogels de catéchol fait multiplier l'énergie de fracture (à 3h, 25°C et 100 $\mu\text{m/s}$) par 3 (**32±8 J/m² à 118±7 J/m²**). Ce passage est accompagné par un changement de mode de rupture (de la rupture adhésive à la rupture cohésive, **Figure III.10**). Il n'y a pas de différence significative entre les forces d'adhésion et les énergies de fracture obtenues à 20 mM (82 kPa, 118±7 J/m²) et à 30 mM (82±8 kPa et 106±21 J/m²) (**Tableau III.2**). Pour résumer, le ratio optimal NaIO_4 /Composés Phénolique est de 2-3 NaIO_4 pour 1 Composé Phénolique.

(v) **Concentration optimale en composés phénoliques (catéchol, dopamine) vis-à-vis de la gélatine B (250 Bloom) 10% p/v + 10 mM NaIO_4 .** Il a été trouvé que les conditions optimales en module de conservation G' à gélatine et NaIO_4 fixes (gélatine 10% p/v + 10 mM NaIO_4) ont été obtenues pour les hydrogels contenant du catéchol à 20 mM et pour les hydrogels contenant de la dopamine de 20 à 30 mM **Figure III.17**. En matière d'adhésion, ces mêmes hydrogels $G_{10}C_{20}N_{10}$ et $G_{10}D_{30}N_{10}$ présentent des énergies d'adhésions supérieures à 100 J/m² (à 3h, 25°C et 100 $\mu\text{m/s}$) et des forces d'adhésion de l'ordre de 80 kPa **Figure III.19**. Toutes les ruptures observées furent cohésives **Photo III.2**. Pour résumer, le ratio optimal NaIO_4 /Composés Phénolique est de 1 NaIO_4 pour 2-3 Composés Phénoliques.

En résumé, les valeurs en module de conservation G' , en contrainte maximale d'adhésion, et en énergie d'adhésion (J/m²) les plus élevées ont été obtenues avec les hydrogels $G_{10}C_{10}N_{20}$, $G_{10}C_{10}N_{30}$, $G_{10}C_{20}N_{10}$ et $G_{10}D_{30}N_{10}$. Soit $G_{10}C_{10}N_{20}$, (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 20 mM NaIO_4), $G_{10}C_{10}N_{30}$, (gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO_4), $G_{10}C_{20}N_{10}$, (gélatine 10% p/v + 20 mM catéchol + 10 mM NaIO_4) et $G_{10}C_{10}N_{30}$, (gélatine 10% p/v + 30 mM dopamine + 10 mM NaIO_4). Il apparaît clairement que les conditions optimales sont réunies lorsque l'une des deux espèces se trouve en excès (avec un rapport de 1/2 et 1/3). Il résulte que, la réticulation optimale dépend de la probabilité de rencontre des deux espèces dans un milieu concentré en gélatine. A cette première probabilité, il vient

s'ajouter une seconde ; celle de la rencontre entre l'espèce phénolique oxydée avec au moins 2 groupements nucléophiles de la gélatine, que ce soit par une addition de Michael et/ou par une base de Schiff.

Les hydrogels réticulés $G_{10}C_{10}N_{30}$, $G_{10}C_{20}N_{10}$, $G_{10}D_{20}N_{10}$ et $G_{10}C_{80}N_{10}$ sont stables à température corporelle (Figures III.13 et III.20). Cela signifie qu'ils sont des candidats potentiels pour être utilisés comme biomatériaux à usage médical. En tant que colle biologique, ils présentent de nombreux avantages : biosourcés, biodégradables, peu chers (< 1 euro/10 ml d'hydrogel), adhésifs, rapides et faciles à synthétiser (- 5 minutes).

A concentration optimale fixe ($G_{10}C_{20}N_{10}$ et $G_{10}D_{20}N_{10}$), l'espèce catéchol possède les meilleurs résultats en module de conservation (2282 ± 112 vs 1799 ± 291 pa), en énergie de fracture (99 ± 14 vs 89 ± 5 J/m²), en dépendance à la fréquence ($0,04\pm 0,03$ vs $0,06\pm 0,03$), et en tailles des pores (entre 0,15 et 0,2 mm² vs entre 0,05 et 0,1 mm²). De plus, l'espèce catéchol ne possède pas de transition vitreuse sur la gamme de température considérée contrairement à l'espèce réticulée à la dopamine (Tg 47,8°C). L'étude spectroscopique démontre bien que les additions de Michael et bases de Schiff sont plus faciles à mettre en œuvre que dans le cadre de la dopamine oxydée qui donne lieu à 3 espèces différentes dont une seule est capable de faire des liaisons covalentes (Figures III.34-35).

L'ensemble des manipulations de la présente PARTIE III, porte sur des hydrogels/adhésifs gélifiés avec 3h de temps de durcissement. Si l'on souhaite comparer avec la littérature en termes de contraintes à la rupture, il convient de se reporter à la PARTIE I, **Etat de l'art (Tableau I.2)**.

En ce qui concerne les manipulations d'autocicatrisation, nos compétiteurs directs ($G_{20}THB_{0.2}Fe_{16}$) ont obtenu de meilleurs résultats que nous avec un G' (Pa) de plus de 1000 concernant les interactions non-covalentes. Leur expérience avait été faite à 37°C et les déformations ont été appliquées toutes les 300 secondes. Ils n'ont pas fait état de la perte en forces d'adhésion. Nous avons obtenu 600 Pa à 25°C avec des déformations toutes les heures [16]. Il conviendrait de refaire cette manipulation dans les mêmes conditions d'autant plus qu'il est important de savoir si les forces d'adhésion seront maintenues à température corporelle (c'est-à-dire dans le corps du patient).

Il reste cependant 2 points à optimiser : le temps de gélification et la cytotoxicité de la colle. La gélification des hydrogels n'est effective qu'à compter de 3h. Afin de réduire le temps de gélification, il a été envisagé d'étudier des hydrogels qui possèdent des concentrations en gélatine plus élevées dans le but d'obtenir une colle opérationnelle dès les premières minutes.

Les résultats de la **Partie expérimentale 1, III.B.1 et C.1-2** ont été publiés :

Back, F.; Ball, V.; Arntz, Y. Influence of the NaIO₄ Concentration on the Gelation and the Adhesive Strength of Pyrocatechol/Pyrogallol Containing Gelatin Hydrogels. *Front. Mater.* **2021**, *8*, 671451. Doi :10.3389/fmats.2021.671451.

Les résultats de la **Partie expérimentale 1, III.A, B.2 et C.2-3** ont été publiés:

Back, F.; Mathieu, E.; Betscha, C.; El Yakhli, S.; Arntz, Y.; Ball, V. Optimization of the Elasticity and Adhesion of Catechol- or Dopamine-Loaded Gelatin Gels under Oxidative Conditions. *Gels* **2022**, *8*(4), 210.

Doi: org/10.3390/gels8040210.

IV. Partie expérimentale 2 : synthèse et caractérisation d'une colle chirurgicale

Afin d'obtenir l'adhésif chirurgical idéal, nous avons commencé par faire un criblage des différentes formulations en tests de cytotoxicité (A). Une fois la formulation obtenue, l'adhésif fut analysé d'un point de vue rhéologique tant sur sa cinétique de gélification, sur ses températures de transition que sur son adhésion (B). Ils ont été imagés (CryoSEM) (C) et ont fait l'objet d'une étude de leur dégradation dans différents milieux (D). La possibilité d'être un candidat fongicide potentiel a été recherchée (E) et des essais en traction ont été faits sur des muscles de poulets (F). Les adhésifs ont été caractérisés par spectroscopie UV-visible (G).

A.	Recherche de la formulation non-cytotoxique.....	IV-97
1.	Détermination des IC_{50} du $NaIO_4$ et du catéchol.....	IV-97
2.	Criblage MTT des hydrogels.....	IV-98
3.	Conclusions/discussions.....	IV-100
B.	Analyse rhéologique.....	IV-101
1.	Criblage probe-tack et adhésion (38°C, 100 μ m/s, 15 et 5 minutes).....	IV-101
2.	Cinétique de gélification des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité	IV-104
3.	Balayage en température des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité.....	IV-104
4.	Adhésions (probe-tack, 25°C, 3h) à vitesses variables des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité IV-105	
5.	Conclusions.....	IV-117
C.	Imageries CryoSEM des colles biocompatibles	IV-119
D.	Etudes de la dégradation par hydrolyse des colles biocompatibles	122
E.	Recherche d'un candidat fongicide potentiel.....	126
F.	Essais en traction sur le muscle	127
G.	Analyse spectrale UV-vis des colles biocompatibles avec la gomme arabique	128
H.	Conclusions de la partie expérimentale 2	129

A. Recherche de la formulation non-cytotoxique

Pour ce faire, nous avons criblé en test MTT (2), différentes concentrations en catéchol, différentes concentrations en gélatine et différentes concentrations en $NaIO_4$ jusqu'à l'obtention d'une zone de non-cytotoxicité. Les cellules utilisées sont les cellules classiques connues pour être les plus résistantes (NIH 3T3). Nous avons également étudié la toxicité du catéchol et du $NaIO_4$ afin de déterminer leur IC_{50} (1).

1. Détermination des IC_{50} du $NaIO_4$ et du catéchol

L' IC_{50} ou la concentration inhibitrice médiane est la quantité de molécules nécessaire pour inhiber de 50% un processus biologique. En l'occurrence ici, la viabilité cellulaire des NIH 3T3 (fibroblastes embryonnaires de souris). Plus concrètement, l' IC_{50} permet de savoir quelle molécule est à l'origine de la toxicité de l'hydrogel.

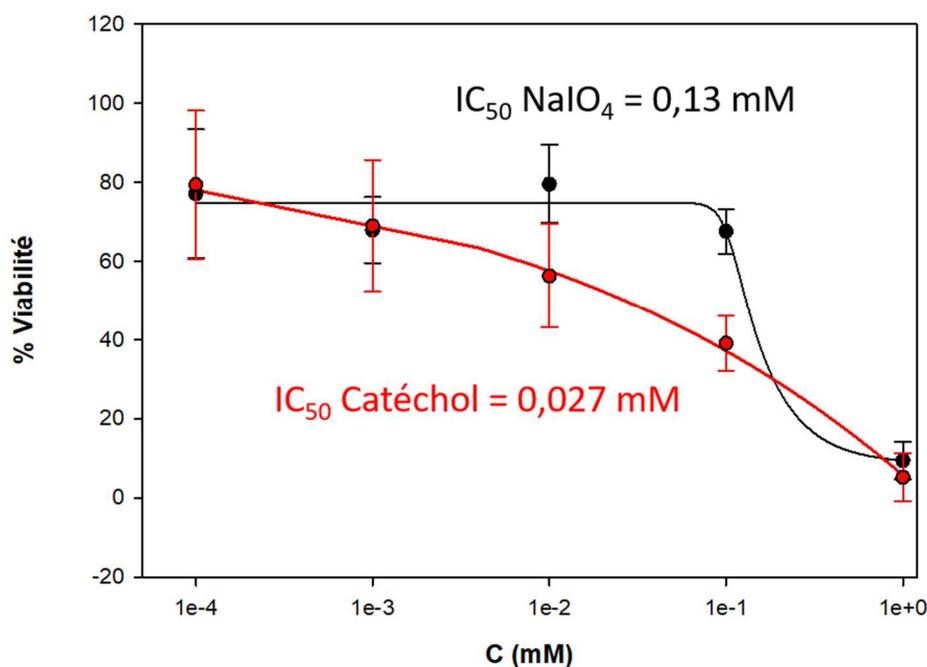


Figure IV. 1. Détermination de l' IC_{50} du $NaIO_4$ et du catéchol en test MTT classique avec des cellules NIH 3T3.

Il convient de relever que l'espèce $NaIO_4$ ($IC_{50} = 0,13$ mM) semble moins toxique que l'espèce catéchol seule ($IC_{50} = 0,027$ mM). Les auteurs Hans et al. (2010) ont remarqué que certains polyphénols réduisaient directement le MTT via leur groupement hydroxyles [130]. Ils soulèvent que cet effet est plus important lorsque l'espèce polyphénol contient 3 groupements hydroxyles. Notre courbe du catéchol ne saurait donc être valide. Le MTT est normalement réduit au niveau du complexe II de la chaîne respiratoire au sein de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

Les espèces catéchols et leurs dérivés sont connus pour se lier à l'ATP synthase. Aussi, les tests basés sur la libération d'ATP comme le CellTiter-Glo® sont à exclure [131]. Il serait éventuellement envisageable d'utiliser le CellTiter-Fluor™ dont le principe de fonctionnement repose sur un peptide fluorochrome qui devient fluorescent qu'après son clivage au sein des protéases des cellules vivantes. On pourrait également utiliser le test LIVE/DEAD®. Ces derniers utilisent comme fluorochrome la calcéine qui devient verte suite à l'action des estérases intracellulaires couplé avec l'homodimère-1- d'éthidium rouge qui lui indique la présence de cellules mortes en se liant à l'ADN. Fort heureusement, les puits de nos plaques ont été soigneusement lavés au PBS avant l'insertion du milieu contenant le MTT. Les résultats des tests MTT ont toujours été corroborés avec les observations préalables faites au microscope. Plus précisément, les puits étaient observés avant et après la mise en place du milieu content le MTT. Il n'y a pas eu de bonnes surprises. C'est-à-dire qu'il n'a pas été obtenu de réduction de MTT dans des puits ne contenant pas cellules, comme ont pu le remarquer les Han *et al.*[130]. En plus de ses considérations, les contrôles négatifs (les puits qui ne contiennent pas de cellules) contenaient tout comme les autres puits le milieu contenant l'extrait. Ils ont également été lavés puis, le milieu contenant le MTT a été rajouté. La moyenne des contrôles négatifs a systématiquement été soustraite aux résultats obtenus dans les puits.

Au vu des IC_{50} obtenus et présumés, il apparaît que pour maximiser les chances de réticulations avec un rapport de 1/2 ou 1/3 en catéchol et en $NaIO_4$, il vaut mieux que l'espèce en excès soit celle qui soit le moins cytotoxique. L' IC_{50} du $NaIO_4$ démontre que l'espèce est raisonnablement peu cytotoxique.

2. Criblage MTT des hydrogels

L'opération de criblage consiste à faire passer des tests MTT à un maximum d'hydrogels auxquels on aura fait varier les concentrations des composants en espérant que l'on trouve un hydrogel qui n'est pas cytotoxique. Lorsque le criblage est suffisant, on observe alors une zone de non-cytotoxicité.

Nous avons trouvé une zone de non-cytotoxicité (Figure IV.2, 3) qui se trouve entre 0,33 et 0,165 pour le rapport Catéchol (mM) / % p/v Gélatine, entre 0,5 et 1 pour le rapport NaIO_4 (mM) / % p/v Gélatine et à 3 pour le rapport NaIO_4 (mM) / Catéchol (mM) (Tableau IV.1).

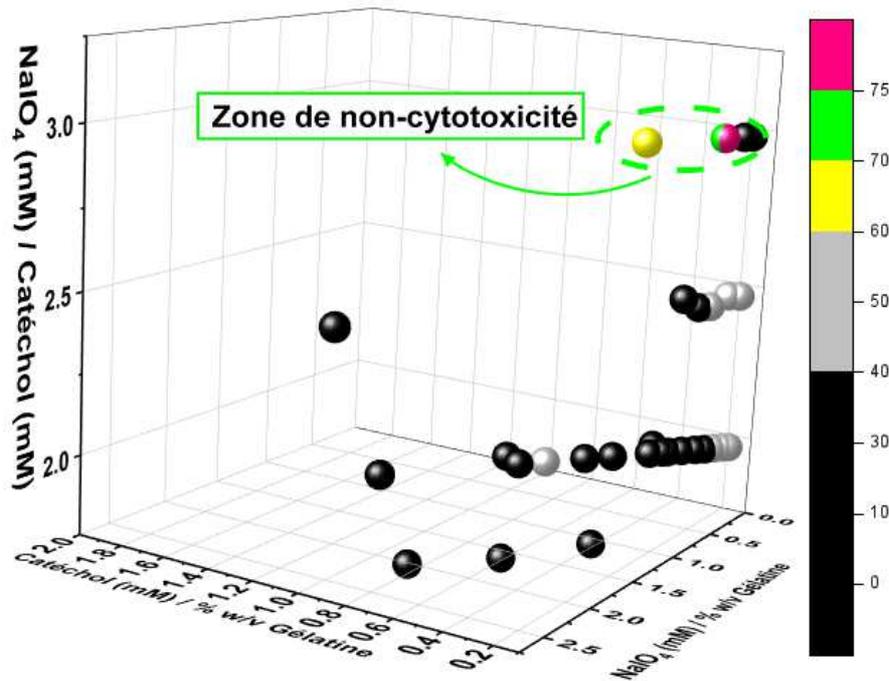


Figure IV.2. Résultats du criblage MTT (NIH 3T3) des hydrogels en fonction des rapports NaIO_4 (mM) / Catéchol (mM) (Z), Catéchol (mM)/% p/v Gélatine (X) et NaIO_4 (mM)/% p/v Gélatine (Y).

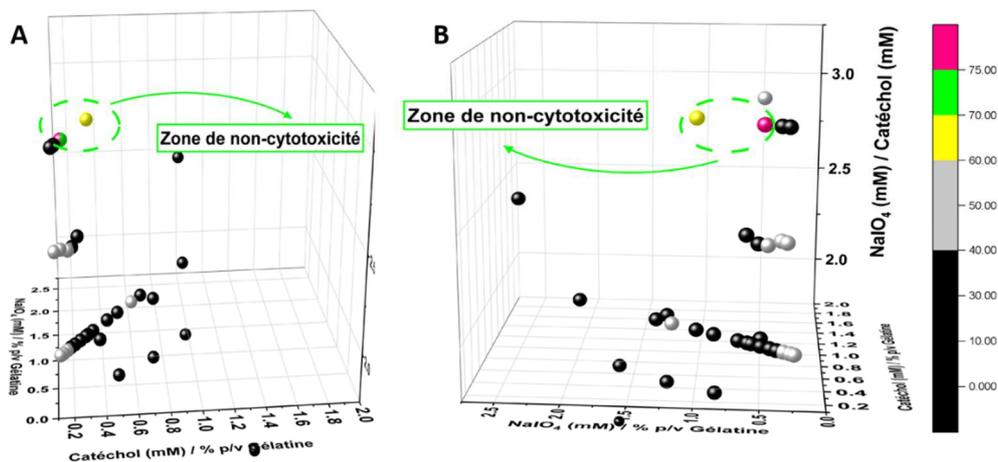


Figure IV.3. Résultats du criblage MTT (NIH 3T3) des hydrogels en fonction des rapports NaIO_4 (mM) / Catéchol (mM) (Z), Catéchol (mM)/% p/v Gélatine (X) et NaIO_4 (mM)/% p/v Gélatine (Y). Avec A, point de vue de l'axe X et B, point de vue de l'axe Y.

Il faut noter que le rapport de 3 NaIO₄ (mM) / Catéchol (mM) est celui qui présente le plus de viabilité cellulaire. Ceci donne lieu à 2 possibilités/explications qui peuvent être cumulatives. Soit, le catéchol seul est fortement cytotoxique et il convient de l'oxyder. Soit, le fait d'avoir un rapport de 1/3 (1 catéchol, 3 NaIO₄) permet de maximiser les probabilités de rencontre entre les deux espèces pour l'oxydation du catéchol, et donc, de maximiser le taux de réticulations. Lorsque l'hydrogel est réticulé à son maximum, le maillage est plus serré, et les espèces emprisonnées à l'intérieur se libèrent moins vite dans le milieu cellulaire.

Date	Hydrogels	Rapport % p/v gélatine et en mM pour le NaIO ₄ et le catéchol			Nbre de puits	% Viabilité
		Catéchol/Gélatine	NaIO ₄ /Gélatine	NaIO ₄ /Catéchol		
09.09.21 15.09.21 22.09.21	Gélatine 20% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO ₄	0,165	0,5	3	7 7 7	76±12
08.11.21	Gélatine 60% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO ₄	0,166	0,5	3	9	70±6
19.10.21	Gélatine 80% p/v + 15 mM catéchol + 37 mM NaIO ₄	0,187	0,46	2,47	21	51±1
08.11.21	Gélatine 80% w/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO ₄	0,125	0,37	3	5	31±4
08.11.21	Gélatine 70% p/v + 10% p/v gum arabique + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO ₄	0,143	0,43	3	1	69
09.09.21 22.09.21 22.09.21 22.09.21	Gélatine 10% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO ₄	0,33	1	3	7 7 7 7	60±4
25.08.21 09.09.21 22.09.21	Gélatine 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO ₄	1	3	3	7 7 7	51±8

Tableau IV.1. Résumé des valeurs les plus importantes du criblage MTT.

Il convient dans un premier temps de séparer les observations faites à 10% p/v de gélatine B (250 Bloom) et celles qui possèdent un pourcentage plus élevé. Au vu de nos observations *post*-optimisation du % p/v de gélatine (Figure III.1), nous savons qu'après 10% p/v de gélatine, les chances de réticulations et d'alignements des chaînes α sont amoindries.

Pour la gélatine à 10% p/v :

Considérant que, diminuer la quantité de catéchol en dessous de 3,3 mM donnera un hydrogel tellement peu réticulé, mou et sans réel intérêt et que, considérant que, l'espèce G₁₀C₁₀N₃₀ présente un fort taux de réticulation mais, a priori, une viabilité cellulaire insuffisante, il est fort à parier que l'on trouvera une espèce viable entre 3,3 mM et 10 mM en catéchol.

Pour les gélatines à + de 10% p/v :

Dans un premier temps, il convient de relever que, sur la plage de 20% à 60% p/v de gélatine, et à partir du moment où l'on respecte ce que l'on va appeler les rapports optimums (0,165/0,5/3), les hydrogels seront non-cytotoxiques. Ces résultats sont particulièrement importants. Ils signifient que d'une part, on peut faire varier la quantité de gélatine que l'on souhaite pour obtenir différentes matières (matrices, colles) tout en étant sûrs que nos matériaux seront non-cytotoxiques. D'autre part, cela signifie que c'est bien le taux de réticulations qui est la condition *sine qua non* de la non-cytotoxicité des hydrogels.

Il est par ailleurs tellement important de maximiser le taux de réticulation par rapport à la quantité de catéchol que, dans le cas où l'on diminue la quantité de catéchol (l'espèce cytotoxique) (0,125/0,37/3, Tableau IV.1) le % de viabilité passe à 31±4%.

3. Conclusions/discussions

Pour un hydrogel composé à 10% p/v en gélatine b (250 Bloom), il est fort à parier que l'on trouvera une espèce viable entre 3,3 mM et 10 mM en catéchol.

Pour un hydrogel composé de plus de 20% p/v en gélatine b (250 Bloom) et plus, nous avons trouvé les rapports « optimums » qui permettent d'obtenir dans tous les cas un matériau non-cytotoxique (0,165/0,5/3). La maximisation du taux de réticulation semble être une condition primordiale à la non-cytotoxicité.

B. Analyse rhéologique

Nous avons étudié le rapport concentration en catéchol/NaIO₄/gélatine vis-à-vis des forces et énergies d'adhésion à 38°C (~température corporelle), sans considération de leur toxicité dans le but de comprendre quelle partie de l'hydrogel était la plus déterminante dans l'adhérence (1).

Avec les hydrogels de la zone de non-cytotoxicité trouvés dans les paragraphes précédents, nous avons étudiés leur cinétique de gélification (2), leurs comportements vis-à-vis d'un balayage en température (3), leurs adhésions via des manipulations de probe-tack à vitesse variable (25°C) (4), et leurs adhésions à 25°C et à 38°C (5).

1. Criblage probe-tack et adhésion (38°C, 100 μm/s, 15 et 5 minutes)

Le but était de pouvoir déterminer à température corporelle (~38°C) quelle partie de l'hydrogel participe de manière déterminante à l'adhésion. Aussi, il convenait de trouver quelle était la meilleure formulation qui permettrait d'avoir un adhésif répondant aux exigences de la chirurgie (temps de gélification, temps de pose, grandes énergies et forces d'adhésions). L'adhésif devant être opérationnel sur des temps très courts, des manipulations de probe-tack ont été faites à 15 et 5 minutes (Tableau IV.2-4). Il est appelé Rupture 1, la distance en mm obtenue suite à la chute du plateau de fibrillation et Rupture 2, la rupture finale de l'hydrogel.

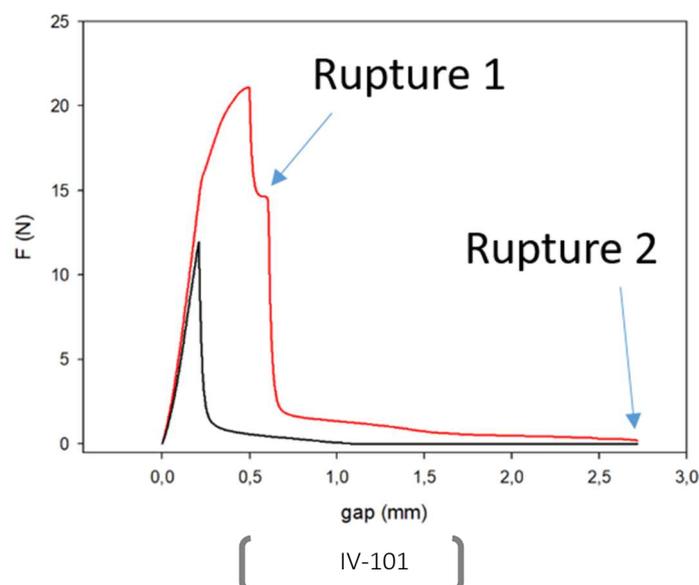


Figure IV.4. Schéma des différentes ruptures.

Hydrogel 38°C 100 µm/s 15 minutes						F(N) ±0,01	kPa (±1)	J/m ²	Rupture 1 au plateau (mm) ±0,1	Rupture 2 (mm) ±1
% p/v gélatine	(mM) catéchol	(mM) NaIO ₄	catéchol (mM)/g élatine % p/v	NaIO ₄ (mM)/g élatine % p/v	NaIO ₄ (mM)/catéchol (mM)					
30	100	60	3,33	2	0,6	10,03	32	82	4,6	17
30	60	60	2	2	1	13,86	44	107	3,5	10
30	30	60	1	2	2	6,69	21	90	0,2	14
30	30	50	1	1,66	1,66	2,25	7	49	5,3	26
30	30	50	1	1,66	1,66	0,38	1	19	21	31
30	30	30	1	1	1	0,82	3	17	16,3	23
30	20	40	0,66	1,33	2	2,3	7	19	7	12
40	100	60	2,5	1,5	0,6	14,75	47	101	5	9
40	60	60	1,5	1,5	1	3,06	10	56	6,2	43
40	30	60	0,75	1,5	2	7,64	24	50	3,3	16
40	30	50	0,75	1,25	1,66	4,45	14	42	6,5	24
40	30	30	0,75	0,75	1	9	29	88	3,7	20
40	20	40	0,5	1	2	2,12	7	42	8,3	35
40	20	34	0,5	0,85	1,7	2,64	8	29	10,6	15
50	8,33	25	0,166	0,5	3	0,97	3	31,61	30	32
60	10	30	0,16	0,5	3	1,90±0,5	6±1,7	130±25	40±7	49
60	0	30	0	0,5	0	0,63±0,26	3±6	40±17	49±1	50
80	13,33	40	0,16	0,5	3	8,7±5	28±17	236±112	22±4	29±0,6
80	0	40	0	0,5	0	4,37	14	309	50	50

Tableau IV. 2. Criblages d'hydrogels via des expériences de probe-tack à 38°C, 100 µm/s, à 15 minutes.

Augmenter la concentration en gélatine, fait augmenter les forces à la rupture (F(N)) et les énergies d'adhésions (J/m²). Il est remarquable que le passage de 60% p/v à 80% p/v en gélatine B (250 Bloom) pour les hydrogels non cytotoxiques donne lieu à une augmentation d'un facteur ~1,8 des énergies d'adhésion (de 130 à 236 J/m²) et d'un facteur de ~4,6 en ce qui concerne les forces d'adhésion (de 6 à 28 kPa). Par ailleurs, les ruptures des hydrogels s'opèrent à des distances plus longues à mesure que la concentration en gélatine augmente.

Pour une même valeur d'énergie d'adhésion (~100 J/m²), l'hydrogel G₆₀C₁₀N₃₀ est équivalent aux hydrogels (G₄₀C₁₀₀N₆₀ et G₃₀C₆₀N₆₀) en termes d'énergie d'adhésion. Il convient de relever que les forces à la rupture F(N) et les forces d'adhésion (kPa) sont multipliées par 9,4 avec 100 mM de catéchol et par 8,8 avec 60 mM de catéchol par rapport à G₆₀C₁₀N₃₀. En résumé, la quantité de catéchol oxydé possède un impact sur les forces à la rupture et les énergies d'adhésions. En d'autres termes, augmenter la concentration en catéchol oxydé permet de diminuer la concentration en gélatine.

Hydrogel 38°C 100 µm/s 15 minutes						F(N) ±0,01	kPa (±1)	J/m ²
% p/v gélatine	(mM) catéch ol	(mM) NaIO ₄	catéchol (mM)/gél atine % p/v	NaIO ₄ (mM)/gél atine % p/v	NaIO ₄ (mM)/cat échol (mM)			
30	60	60	2	2	1	13,86	44	107
30	30	60	1	2	2	6,69	21	90
30	30	50	1	1,66	1,66	0,38	1	19
30	20	40	0,66	1,33	2	2,3	7	19
40	60	60	1,5	1,5	1	3,06	10	56
40	30	60	0,75	1,5	2	7,64	24	50

Tableau IV. 3. Criblages d'hydrogels via des expériences de probe-tack à 38°C, 100 µm/s, à 15 minutes (résumé).

Nous savons depuis les manipulations portant sur la recherche des concentrations optimales en composés phénoliques et en NaIO₄ qu'il est nécessaire d'avoir un rapport en concentration d'au minimum 1/2 pour optimiser l'adhésion et les modules de conservations (**Figure III.8 et 15**). Le **Tableau IV.3** illustre également ce phénomène.

On peut donc *a priori* en conclure que les espèces catéchol non oxydées n'interviennent pas dans les forces et les énergies d'adhésions.

Hydrogel 38°C 100 µm/s 5 minutes						F(N) ±0,01	kPa (±1)	J/m ²
% p/v gélatin e	(mM) catéch ol	(mM) NaIO ₄	catéchol (mM)/g élatine % p/v	NaIO ₄ (mM)/g élatine % p/v	NaIO ₄ (mM)/cat échol (mM)			
10	3,3	10	0,33	1	3	0,80	2,5	6,31
10	10	30	1	0,5	3	0,05	0,1	4,67
20	3,3	10	0,165	0,5	3	0,3±0,1	1,3±0,6	8±7
30	100	60	3,33	2	0,6	1,17	4	68
30	30	60	1	2	2	3,64	12	41
30	30	50	1	1,66	1,66	1,23	4	30
40	100	60	2,5	1,5	0,6	1,45	5	84
40	60	60	1,5	1,5	1	0,41	1	20
40	30	60	0,75	1,5	2	2,14	7	100
40	30	50	0,75	1,25	1,66	2,05	7	24
40	30	30	0,75	0,75	1	0,56	2	33
40	20	40	0,5	1	2	0,51	2	28
60	10	30	0,16	0,5	3	1,6±0,4	5±1,3	103±14
60	10	20	0,16	0,33	2	0,34	1	9
60	0	30	0	0,5	0	1±0,4	3,3±1,3	36±51
80	10	30	0,125	0,375	3	2,8	9	204
80	10	20	0,125	0,25	2	0,9	3	38
80	0	40	0	0,5	0	1,37	4	92

Tableau IV. 4. Criblages d'hydrogels via des expériences de probe-tack à 38°C, 100 µm/s, à 5 minutes.

A 5 minutes, on retrouve une équivalence entre les hydrogels G₄₀C₃₀N₆₀, G₄₀C₁₀₀N₆₀ et G₆₀C₁₀N₃₀.

Pour résumer, que ce soit à 15 et 5 minutes, la concentration en catéchol oxydé, en gélatine, et le ratio $\text{NaIO}_4/\text{catéchol}$ (**Tableau IV.2**) possèdent un impact sur les énergies et forces d'adhésions. Par contre il relève de ce même tableau que les espèces catéchol non oxydées ne participent pas à l'amélioration de l'adhésion.

Le passage de 60% à 80% p/v en gélatine B (250 Bloom) avec le ratio 3/1, $\text{NaIO}_4/\text{catéchol}$, multiplie par $\sim 1,8$ (de 130 à 236 J/m^2 , 15 minutes) et par ~ 2 (de 103 à 204 J/m^2 , 5 minutes) les énergies d'adhésion et par $\sim 4,6$ (de 6 à 28 kPa, 15 minutes) et $\sim 1,8$ (de 1,6 à 2,8 kPa, 5 minutes) les forces d'adhésion.

A 38°C, les ruptures étaient majoritairement cohésives. Il semblerait que la viscosité joue un rôle prépondérant dans l'ancrage des molécules sur le substrat en acier inoxydable (cf. théorie de l'ancrage mécanique McBain et Hopkins 1925).

2. Cinétique de gélification des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité

Au vu de la quantité trop importante de matière que représente les hydrogels au-dessus de 30%, il a seulement été envisagé d'étudier la cinétique de gélification des hydrogels $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ et $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ à 25°C pendant 3h.

En **Figure IV.5.A** on retrouve le phénomène de « stick-slip » qui tend à disparaître à 400% de déformation (**ligne rouge**). En **B**, il a été obtenu pour l'hydrogel $G_{10}C_{3,3}N_{10}$, un G' de 2593 Pa et un G'' de 54 Pa et pour l'hydrogel $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ un G' de 7025 Pa et un G'' de 153 Pa.

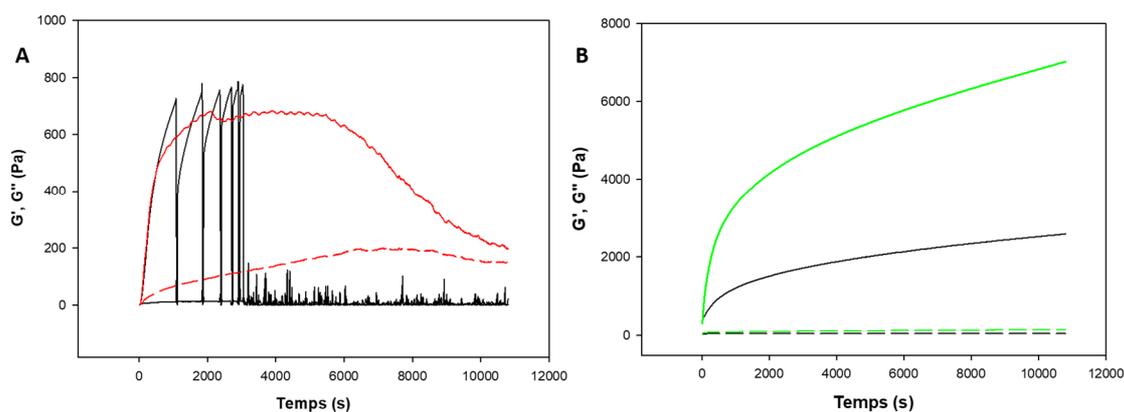


Figure IV.5. Cinétique de gélification des hydrogels. Avec **A**) $G_{10}C_{10}N_{30}$ (noir 1% déformation, rouge 400% de déformation $\sim 45^\circ$ rotation du cône à vide), **B**) $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (noir, 1% déformation) et $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ (vert, 1% déformation). Les lignes pleines représentent le module de conservation G' et les tirets le module de perte G'' .

En comparant les valeurs obtenues au **Tableau III.1** des gélatines B (250 Bloom) à 10% et 20% p/v (1147 ± 120 et 6140 ± 630 Pa) il apparaît que seul l'hydrogel réticulé à 10% p/v de gélatine B (250 Bloom) possède un module de conservation qui a augmenté. Cette considération appuie les résultats de la **Figure III.1** et le postulat selon lequel au-dessus de 10% p/v de gélatine la concentration en solution est telle que les probabilités d'alignements et de réticulations sont réduites.

3. Balayage en température des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité

Les expériences de balayage en température permettent de déterminer si l'hydrogel possède des transitions de type $T_{\text{Gel-Sol}}$ ou T_g . Elles permettent également d'avoir une idée du comportement de l'hydrogel lors d'une montée en température et de savoir si l'hydrogel sera viable à température corporelle.

Sans surprise, les hydrogels dénués de réticulations (**lignes noires**) possèdent une transition Gel-Sol. Cela signifie qu'ils deviennent liquides et ce, avant (G_{10}) ou à température corporelle (G_{20}).

Lorsque les hydrogels sont réticulés avec 3,3 mM catéchol et 10 mM de NaIO_4 (**lignes rouges**), ils ne possèdent plus de transitions Gel-Sol mais une Transition vitreuse (T_g). Cela signifie que les hydrogels ne sont pas liquides mais, qu'ils passent d'un état vitreux à un état caoutchoutique (les chaînes de biopolymères glissent entre elles). Les hydrogels deviennent de plus en plus mous mais ne fondent pas. Au vu de la remontée des **lignes rouges** *post* T_g , on peut en déduire que les hydrogels se durcissent par la suite. Cela est sûrement dû au fait qu'ils perdent le surplus d'eau (les molécules d'eau étant plus mobiles que les chaînes de biopolymères entre elles). A $37,5^\circ\text{C}$, l'hydrogel $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ possède un module de conservation G' de 54 ± 38 Pa alors que le G' de l'hydrogel $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ est de 51 ± 24 Pa (expérience triplée) (**Figure IV-6**).

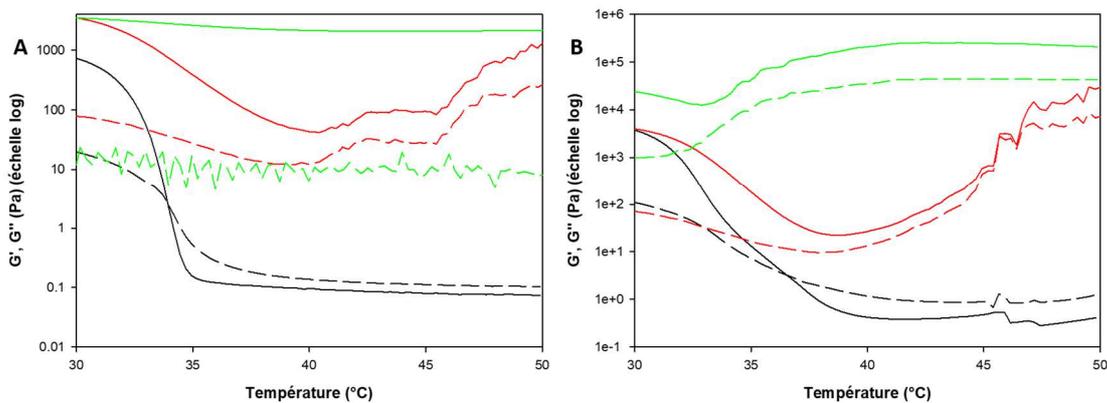


Figure IV.6. Balayage en température ($1^\circ\text{C}/\text{min.}$) des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité à 1% de déformation après 3h de gélification. Avec **A**), G_{10} (noir), $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (rouge), $G_{10}C_{10}N_{30}$ (vert) et **B**), G_{20} (noir), $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ (rouge) et $G_{50}C_{8,33}N_{25}$ (vert, après 1h de gélification). Les lignes pleines correspondent aux modules de conservation G' et les tirets aux modules de perte G'' .

Les hydrogels $G_{10}C_{10}N_{30}$ et $G_{50}C_{8,33}N_{25}$ (**lignes vertes**) ne possèdent pas, *a priori*, et sur cette gamme de température de transitions vitreuses (T_g). Il semble qu'ils aient le comportement de thermodurcissables. Les lignes de l'hydrogel $G_{10}C_{10}N_{30}$ ne semblent pas réagir à la montée en température et celles de l'hydrogel $G_{50}C_{8,33}N_{25}$ montent sans descendre (le biopolymère perd de l'eau et se durcit). Le G' à $37,5^\circ\text{C}$ est de 2,3 kPa pour l'hydrogel $G_{10}C_{10}N_{30}$ et de 93 kPa pour l'hydrogel $G_{50}C_{8,33}N_{25}$.

En résumé, seuls les hydrogels $G_{10}C_{10}N_{30}$ et $G_{50}C_{8,33}N_{25}$ présentent une stabilité à température corporelle. On peut largement en conclure que les hydrogels ayant les rapports de non-cytotoxicité supérieurs ou égaux à 50% p/v en gélatine sont également stables à température corporelle.

4. Adhésions (probe-tack, 25°C , 3h) à vitesses variables des hydrogels de la zone de non-cytotoxicité

La traction que peut subir une colle chirurgicale dans un organe ou une plaie peut être de différentes vitesses. Les expériences de probe-tack à vitesses variables nous permettent d'avoir une idée du comportement des hydrogels lorsque la traction s'opère à différentes vitesses, tant sur les énergies d'adhésion (J/m^2) et forces de ruptures ($F(\text{N})$) que sur la distance de la rupture (mm).

Pour rappel, les ruptures peuvent être de différents types **A** et sont représentées par un type de courbe précis **B** (**Figure IV-7**).

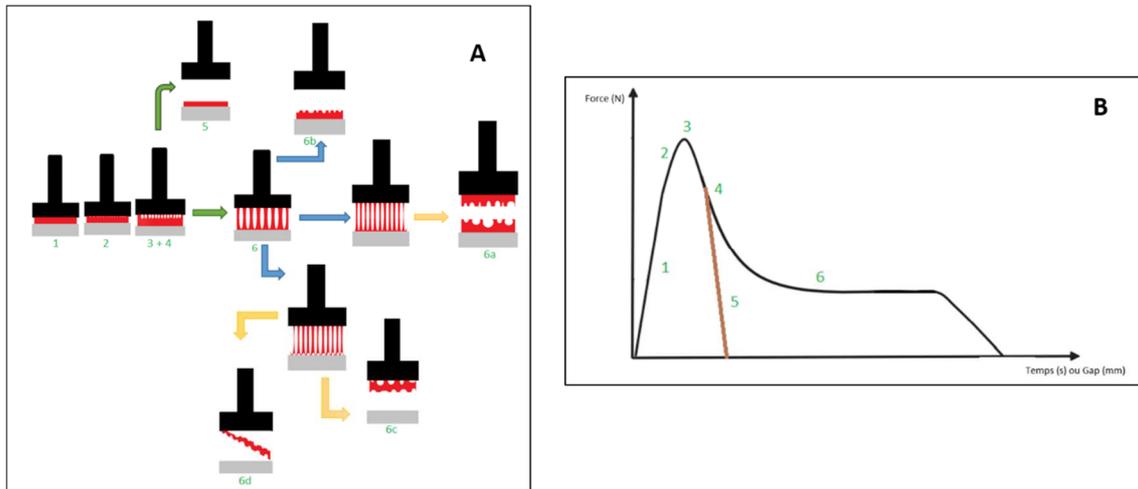


Figure IV.7. A) Reproduction (sauf 6d) des différentes formes de ruptures possibles observées pour le PSA. Reproduction thèse PSA [68], B) (1), la force (en ordonnée) augmente linéairement, la déformation est homogène, la traction est de type élastique. (2), l'augmentation de la force est ralentie ; début de la nucléation des microcavités. (3), fin du processus de nucléation. (4), extension latérale des microcavités. (5), coalescence des microcavités. (6), croissance verticale des microcavités et fibrillation.



Photo IV.1. Test de probe-tack avec un hydrogel à 80% p/v de gélatine + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄ montrant la présence des fibrines.

Des expériences de probe-tack à vitesse variable ont été faites avec des concentrations variables en gélatine (Figure IV.8), avec l'espèce $G_{10}C_{3,3}N_{30}$ (Figure IV.9), avec l'espèce $G_{10}C_{10}N_{30}$ (Figure IV.10) ainsi qu'avec l'espèce $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ (Figure IV.11). Concrètement, cela nous permettra d'évaluer le comportements des hydrogels/adhésifs vis-à-vis de la vitesse et de savoir quel composant (gélatine, catéchol oxydé) intervient dans les forces de cohésion et/ou d'adhésion.

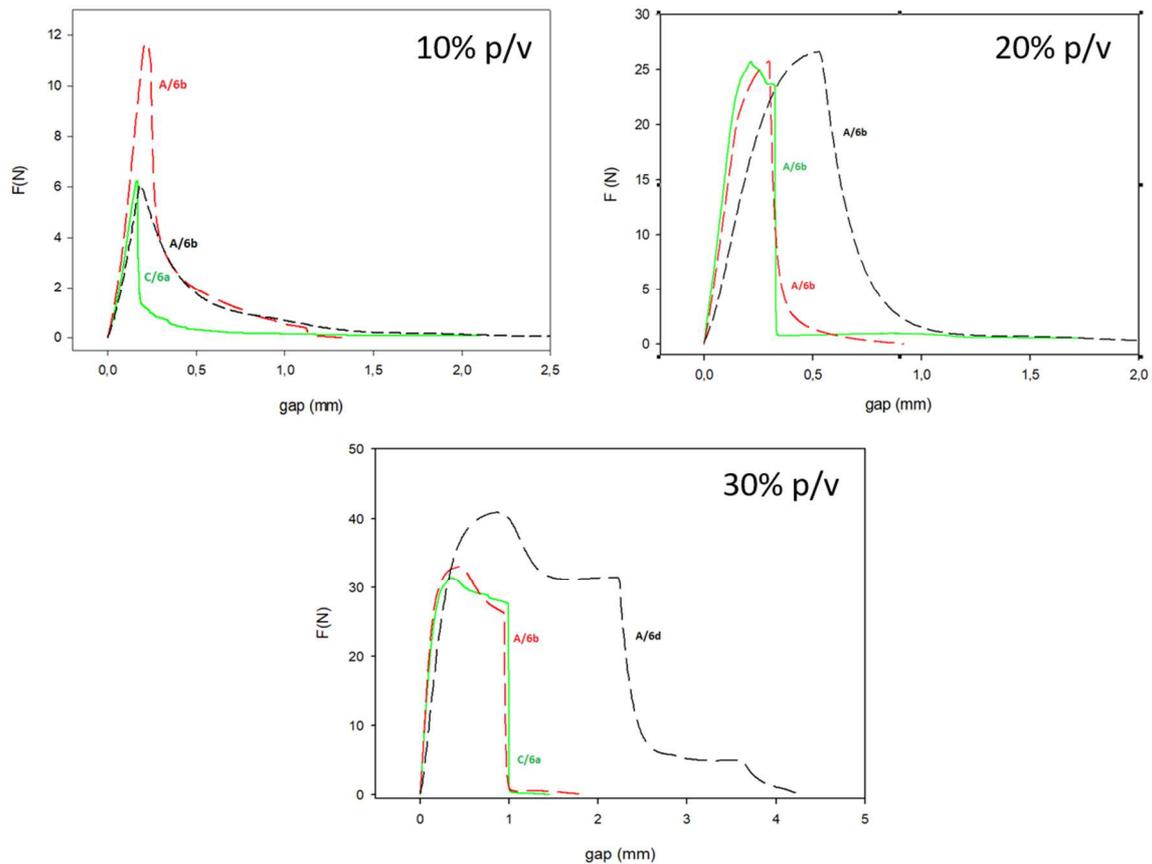


Figure IV.8. Expériences de probe-tack de la gélatine B (250 Bloom) à différentes concentrations (10%, 20%, 30%) et vitesses variables (10 $\mu\text{m/s}$ (ligne verte), 100 $\mu\text{m/s}$ (tirets rouges), 1000 $\mu\text{m/s}$ (tirets noirs)). Avec C, rupture cohésive et A, rupture adhésive.

L'ensemble des données a été repris dans le **Tableau IV. 5**. A 25°C, la gélatine ne semble pas s'ancrer au substrat (acier inoxydable). Les ruptures sont essentiellement adhésives. On peut dire que les groupements de la gélatine participent dans ce cadre aux forces de cohésions interne du gel. On entend par forces de cohésion interne au gel les forces attractives qui lient les molécules du matériau lui-même.

Gélatine B (250 Bloom) 10% p/v						
Vitesses ($\mu\text{m/s}$)	Energie d'adhésion (J/m^2)	F(N) max	Type de rupture	Rupture 1 (mm)	Rupture 2 (mm)	Plateau de fibrillation ~(N)
10	3	6	C/6a	0,16	2,10	2
100	10	12	A/6b	0,21	1,34	4
1000	8	6	A/6b	0,19	2,97	4

Gélatine B (250 Bloom) 20% p/v						
Vitesses ($\mu\text{m/s}$)	Energie d'adhésion (J/m^2)	F(N) max	Type de rupture	Rupture 1 (mm)	Rupture 2 (mm)	Plateau de fibrillation ~(N)
10	22	26	A/6b	0,32	1,73	24
100	20	26	A/6b	0,30	0,91	5
1000	45	27	A/6b	0,54	2,97	17

Gélatine B (250 Bloom) 30% p/v						
Vitesses ($\mu\text{m/s}$)	Energie d'adhésion (J/m^2)	F(N) max	Type de rupture	Rupture 1 (mm)	Rupture 2 (mm)	Plateau de fibrillation ~(N)
10	85	31	C/6a	0,99	1,45	30
100	85	33	A/6b	0,94	1,83	30
1000	267	41	A/6d	2,23	4,28	32

Tableau IV. 5. Récapitulatifs des données obtenues de la Figure IV.8. Il est appelé Rupture 1, la distance en mm obtenue suite à la chute du plateau de fibrillation et Rupture 2, la rupture finale de l'hydrogel (**Figure IV.4**). Les valeurs des énergies d'adhésion (J/m^2) et de la force à la rupture F(N) ont été arrondies à l'entier supérieur.

*Les données correspondent à un seul « tir » et ont été faites à titre de référence/témoin. Il est observable que les ruptures sont essentiellement adhésives. A 10% p/v de gélatine B (250 Bloom) l'évolution des valeurs de l'adhésion n'est pas perceptible. A 20% p/v de gélatine B (250 Bloom) passer de 10 à 1000 $\mu\text{m/s}$ permet de multiplier par ~ 2 l'énergie d'adhésion (J/m^2) et par $\sim 1,8$ le gap à la rupture 1. A 30% p/v de gélatine B (250 Bloom) passer de 10 à 1000 $\mu\text{m/s}$ permet de multiplier par $\sim 3,1$ l'énergie d'adhésion (J/m^2), par $\sim 2,4$ le gap à la rupture 1 et par $\sim 1,2$ la force à la rupture maximale (**Tableau IV.12**).*

Des expériences de probe-tack à vitesse variable ont été faites avec l'espèce $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ (**Figure IV.9**).

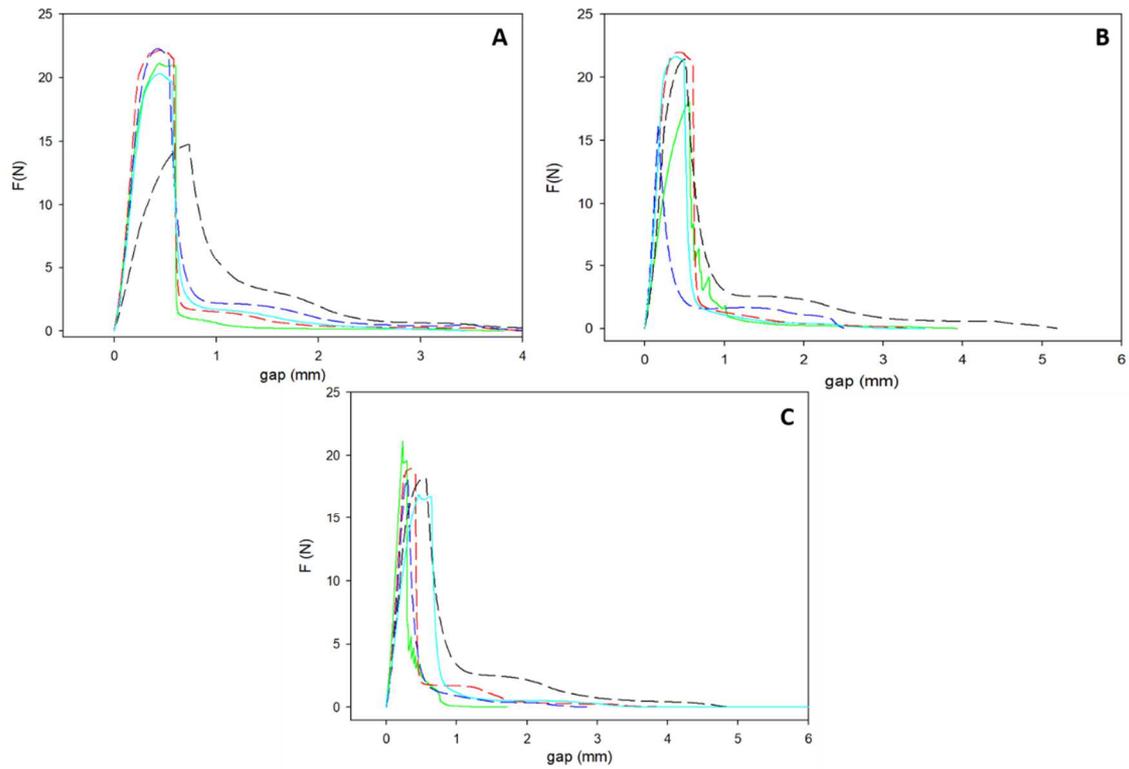


Figure IV.9. Expériences de probe-tack de la gélatine B (250 Bloom) à 10% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}C_{3,3}N_{10}$) avec des vitesses variables (10 $\mu\text{m/s}$ (ligne verte), 100 $\mu\text{m/s}$ (tirets rouges), 250 $\mu\text{m/s}$ (ligne bleu ciel), 500 $\mu\text{m/s}$ (tirets bleus), 1000 $\mu\text{m/s}$ (tirets noirs). Les tests ont tous été triplés. Avec A, les résultats des valeurs les plus hautes, B, les résultats des valeurs moyennes et C, les résultats des valeurs les plus basses.

L'ensemble des données a été repris dans des Tableaux IV.6, 7.

$G_{10}C_{3,3}N_{10}$	A					B					C				
Vitesse	10	100	250	500	1000	10	100	250	500	1000	10	100	250	500	1000
Force (N) max.	21	22	20	22	15	18	22	22	16	21	22	19	17	18	18
Force (N) du plateau	21	23	20	23	4	1	1	21	2	4	19	1	17	1	4
Energie de fracture (J/m^2)	32	39	35	43	68	28	38	32	19	51	15	25	32	18	47
Rupture 1 (mm) ($\pm 0,1$)	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6	0,5	0,2	0,5	0,3	0,4	0,6	0,4	0,6
Rupture 2 (mm) ($\pm 0,1$)	3,8	4	2,4	4,1	5,2	3,9	3,3	0,5	2,5	5,2	1,7	4,1	0,6	2,9	4,9
Type de rupture	C/6a	C/6a	C/6a	C/6a	A/6b	C/6a	A/6b	C/6a	C/6a	C/6a	C/6a	C/6a	C/6a	A/6b	C/6a

Tableau IV. 6. Récapitulatifs des données obtenues de la Figure IV.9. Les valeurs des énergies d'adhésion (J/m^2) et de la force à la rupture $F(\text{N})$ ont été arrondies à l'entier supérieur.

G ₁₀ C _{3,3} N ₁₀					
Vitesses (μm/s)	Energie d'adhésion (J/m ²)	F(N) max	Type de rupture	Rupture 1 (mm)	Rupture 2 (mm)
10	25±9	20±2	C/6a	0,5±0,2	3±1
100	34±7	21±2	C/6a	0,5±0,1	4±1
250	33±3	20±3	C/6a	0,6±0,1	2±1
500	27±14	19±3	C/6a	0,4±0,2	3±1
1000	56±11	18±3	C/6a	0,6±0,2	5±1

Tableau IV. 7. Moyennes du Tableau IV.6.

On peut observer une augmentation des énergies d'adhésion d'un facteur de ~2,2 lorsque l'on passe de 10 à 1000 μm/s. A priori, on ne retrouve pas d'augmentation des forces à la rupture (F(N)). On ne trouve pas de relation particulière entre la vitesse et la distance de la rupture. Les ruptures sont majoritairement cohésives. Ce qui signifie que le catéchol oxydé apporte une force d'adhésion à l'hydrogel/adhésif. On entend par forces d'adhésion les forces attractives entre l'adhésif et un autre matériau.

Des expériences de probe-tack à vitesse variable ont été faites avec l'espèce G₁₀C₁₀N₃₀ (Figure IV.10).

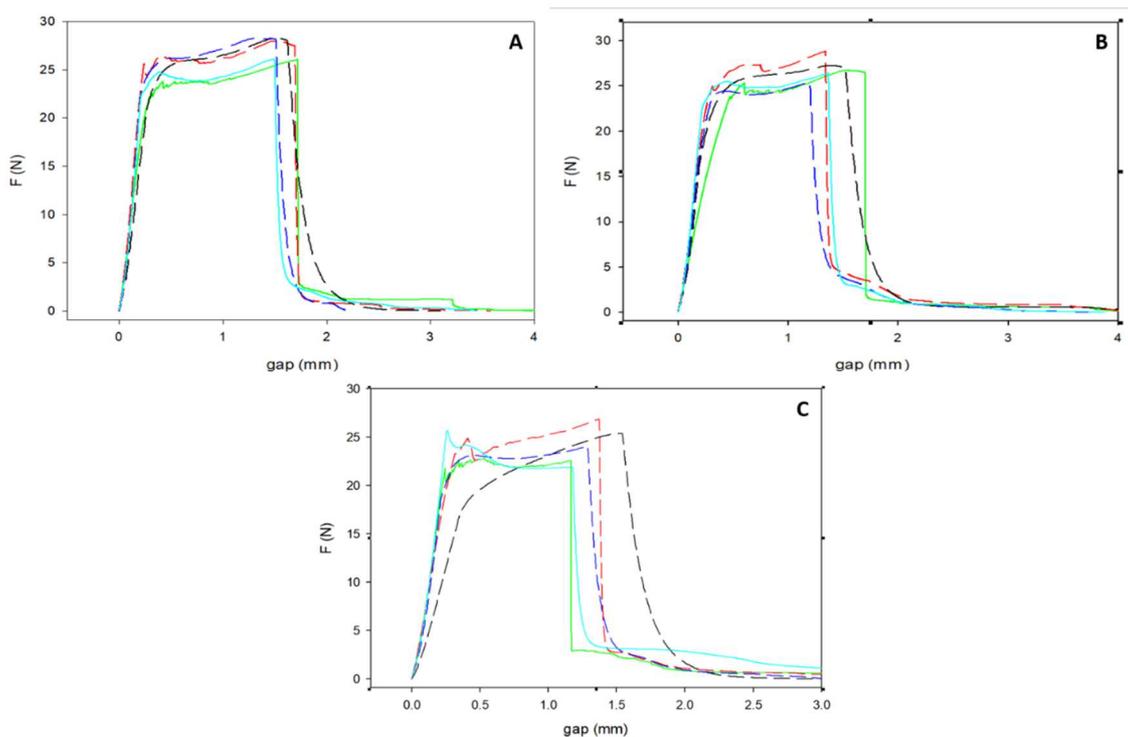


Figure IV.10. Expériences de probe-tack de la gélatine B (250 Bloom) à 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO₄ (G₁₀C₁₀N₃₀) avec des vitesses variables (10 μm/s (ligne verte), 100 μm/s (tires rouges), 250 μm/s (ligne bleu ciel), 500 μm/s (tires bleus), 1000 μm/s (tires noirs)). Les tests ont tous été triplés. Avec A, les résultats des valeurs les plus hautes, B, les résultats des valeurs moyennes et C, les résultats des valeurs les plus basses.

L'ensemble des données a été repris dans les **Tableaux IV.8, 9**. L'ajout de catéchol oxydé donne lieu à des ruptures de types cohésives. On peut dire que le catéchol oxydé est lié aux forces d'adhésion du gel.

G ₁₀ C ₁₀ N ₃₀	A					B					C				
	10	100	250	500	1000	10	100	250	500	1000	10	100	250	500	1000
Vitesse (µm/s)															
Force (N) max.	26	28	26	28	28	26	29	26	25	28	23	25	26	24	27
Force (N) du plateau	24	25	23	25	25	24	26	25	24	25	22	22	22	22	20
Energie de fracture (J/m ²)	129	136	115	125	136	125	115	109	96	130	82	108	95	94	104
Rupture 1 (mm) (±0,1)	1,7	1,7	1,5	1,5	1,6	1,7	1,3	1,4	1,2	1,5	1,2	1,4	1,1	1,3	1,5
Rupture 2 (mm) (±0,1)	4,1	3,6	3,2	2,2	3,1	4,1	5,3	2,9	3,8	4,7	4,8	4,1	4,6	3,1	2,9
Type de rupture	C/6a	C/6a	C/6a	C/6a	C/6a	A/6b	C/6a								

Tableau IV. 8. Récapitulatifs des données obtenues de la Figure IV.10. Les valeurs des énergies d'adhésion (J/m²) et de la force à la rupture F(N) ont été arrondies à l'entier supérieur.

G ₁₀ C ₁₀ N ₃₀					
Vitesses (µm/s)	Energie d'adhésion (J/m ²)	F(N) max	Type de rupture	Rupture 1 (mm)	Rupture 2 (mm)
10	112±26	25±2	C/6a	1,5±0,4	4±0,5
100	120±15	27±2	C/6a	1,5±0,2	4±0,9
250	107±11	26±1	C/6a	1,4±0,2	3,6±1
500	105±18	26±2	C/6a	1,4±0,2	3±1
1000	123±17	28±1	C/6a	1,4±0,2	3,6±1

Tableau IV. 9. Moyennes du Tableau IV.8.

A priori, on ne retrouve pas d'augmentation des forces à la rupture (F(N)) et des énergies d'adhésion. Les ruptures sont majoritairement cohésives. On ne trouve pas de relation particulière entre la vitesse et la distance de la rupture.

Des expériences de probe-tack à vitesse variable ont été faites avec l'espèce G₂₀C_{3,3}N₁₀ (**Figure IV.11**).

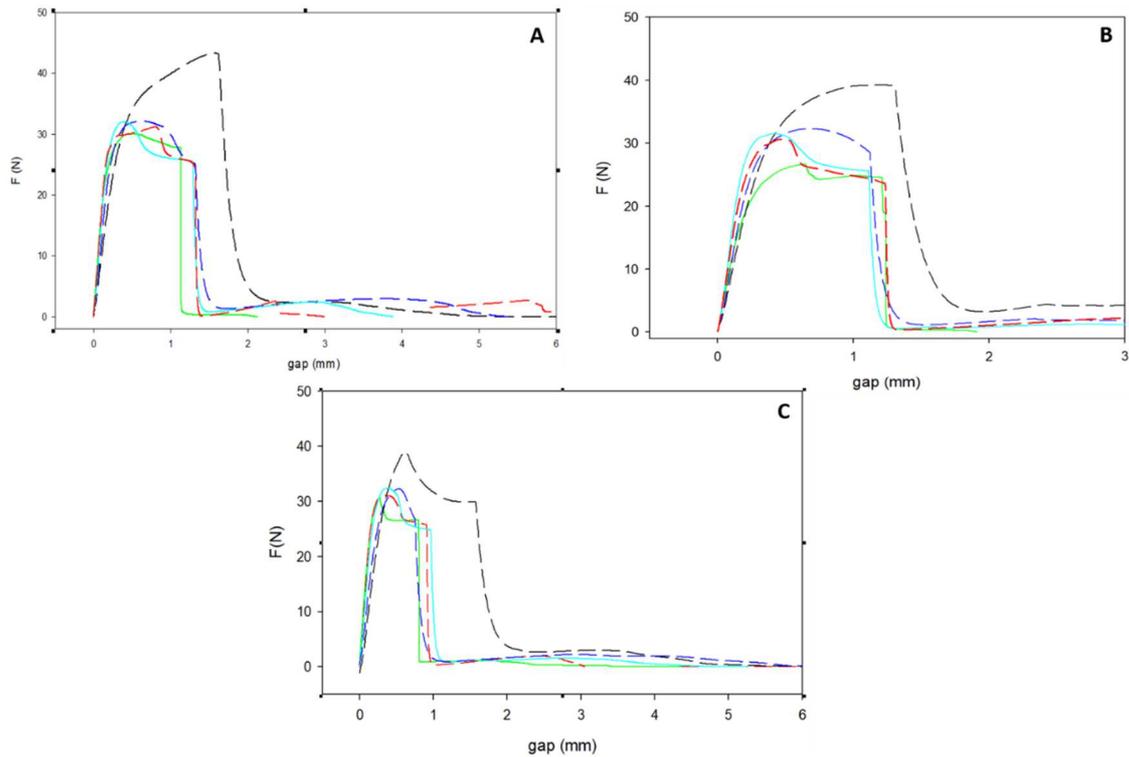


Figure IV.11. Expériences de probe-tack de la gélatine B (250 Bloom) à 20% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO₄ ($G_{10}C_{10}N_{30}$) avec des vitesses variables (10 $\mu\text{m/s}$ (ligne verte), 100 $\mu\text{m/s}$ (tirets rouges), 250 $\mu\text{m/s}$ (ligne bleu ciel), 500 $\mu\text{m/s}$ (tirets bleus), 1000 $\mu\text{m/s}$ (tirets noirs)). Les tests ont tous été triplés. Avec **A**, les résultats des valeurs les plus hautes, **B**, les résultats des valeurs moyennes et **C**, les résultats des valeurs les plus basses.

L'ensemble des données a été repris dans les **Tableaux IV.10, 11**. On remarque que l'ajout de 10% p/v en gélatine en présence de catéchol oxydé fait perdre le caractère adhésif du gel (ruptures deviennent adhésives).

$G_{20}C_{3,3}N_{10}$	A							
Vitesse ($\mu\text{m/s}$)	10	50	75	100	250	500	750	1000
Force (N) max.	30	31	34	31	32	32	30	43
Force (N) du plateau	29	26	29	26	27	2	27	2
Energie de fracture (J/m^2)	96	107	133	117	121	144	162	236
Rupture 1 (mm) ($\pm 0,1$)	1,1	1,1	1,4	1,3	1,3	1,1	1,8	1,6
Rupture 2 (mm) ($\pm 0,1$)	2,1	4,1	3,6	3	3,9	4,2	4,4	5,4
Type de rupture	C/6a	A/6b						

G₂₀C_{3,3}N₁₀	B							
Vitesse (µm/s)	10	50	75	100	250	500	750	1000
Force (N) max.	27	31	31	31	32	32	31	39
Force (N) du plateau	25	26	26	27	27	1,1	26	2
Energie de fracture (J/m²)	89	92	114	108	101	116	137	185
Rupture 1 (mm) (±0,1)	1,2	1,1	1,3	1,2	1,1	1,3	1,4	1,3
Rupture 2 (mm) (±0,1)	1,9	1,9	4,1	3,7	3,5	5,4	4,4	4,8
Type de rupture	C/6a	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b

G₂₀C_{3,3}N₁₀	C							
Vitesse (µm/s)	10	50	75	100	250	500	750	1000
Force (N) max.	31	32	41	31	32	32	29	39
Force (N) du plateau	27	27	30	28	26	1	26	30
Energie de fracture (J/m²)	69	76	75	83	93	88,4	132	181
Rupture 1 (mm) (±0,1)	0,8	0,8	0,8	0,9	1	0,8	1,4	1,6
Rupture 2 (mm) (±0,1)	4,5	3,6	2,2	3,1	5,2	7	4,2	7,1
Type de rupture	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b	A/6b

Tableau IV. 10. Récapitulatifs des données obtenues de la Figure IV.11. Les valeurs des énergies d'adhésion (J/m²) et de la force à la rupture F(N) ont été arrondies à l'entier supérieur.

G ₂₀ C _{3,3} N ₃₀					
Vitesses (µm/s)	Energie d'adhésion (J/m ²)	F(N) max	Type de rupture	Rupture 1 (mm)	Rupture 2 (mm)
10	85±15	29±3	C/6A	1,1±0,3	2,9±1,5
50	92±16	32±7	A/6B	1±0,2	3,2±1,2
75	107±30	36±6	A/6B	1,2±0,3	3,2±1
100	103±18	31±1	A/6B	1,2±0,3	3,2±0,5
250	105±15	32±1	A/6B	1,2±0,2	4,2±1
500	116±28	32±1	A/6B	1,1±0,3	5,5±1,5
750	144±17	30±1	A/6B	1,6±0,3	4,4±1
1000	200±31	40±3	A/6B	1,5±0,2	5,7±1,5

Tableau IV. 11. Moyennes du Tableau IV.10.

On peut observer une augmentation des énergies d'adhésion d'un facteur de ~2,3 lorsque l'on passe de 10 à 1000 µm/s. A priori, on retrouve une augmentation des forces à la rupture (F(N)) d'un facteur de ~1,4 lorsque l'on passe de 10 à 1000 µm/s. Les ruptures sont majoritairement adhésives. On ne trouve pas de relation particulière entre la vitesse et la distance de la rupture.

En ce qui concerne la relation énergies d'adhésion/vitesse de probe-tack (**Figure IV.12**), on remarque bien que, d'une part, nous sommes en présence d'une fonction croissante et que d'autre part, l'hydrogel G₂₀C_{3,3}N₁₀ est celui pour lequel la pente est la plus remarquable.

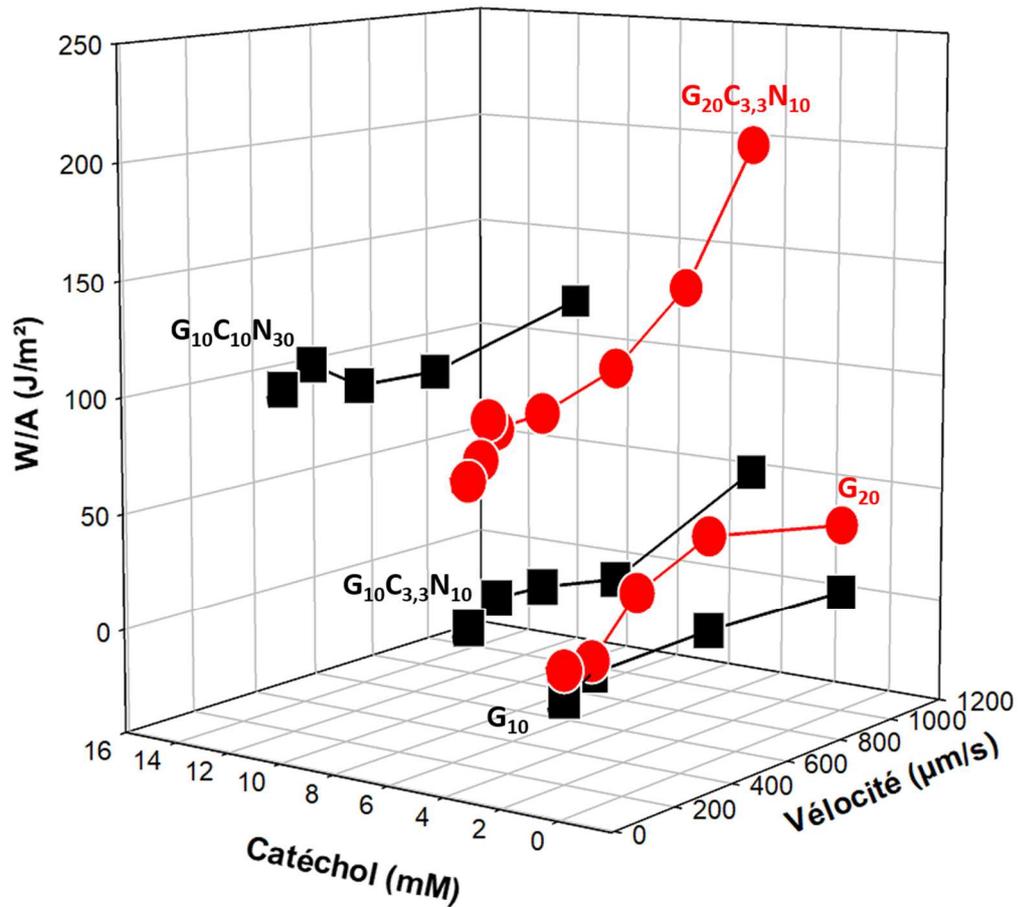


Figure IV.12. Schéma 3D des moyennes des énergies d'adhésion en fonction de la concentration en catéchol et de la vitesse des expériences de probe-tack (3h, 25°C). Avec en noir de gauche à droite, $G_{10}C_{10}N_{30}$, $G_{10}C_{3,3}N_{10}$ et G_{10} et en rouge de gauche à droite, $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ et G_{20} .

En ce qui concerne la relation forces de ruptures et les vitesses de probe-tack, les données ont été logées à fin d'en établir leur pente (Figure IV-13).

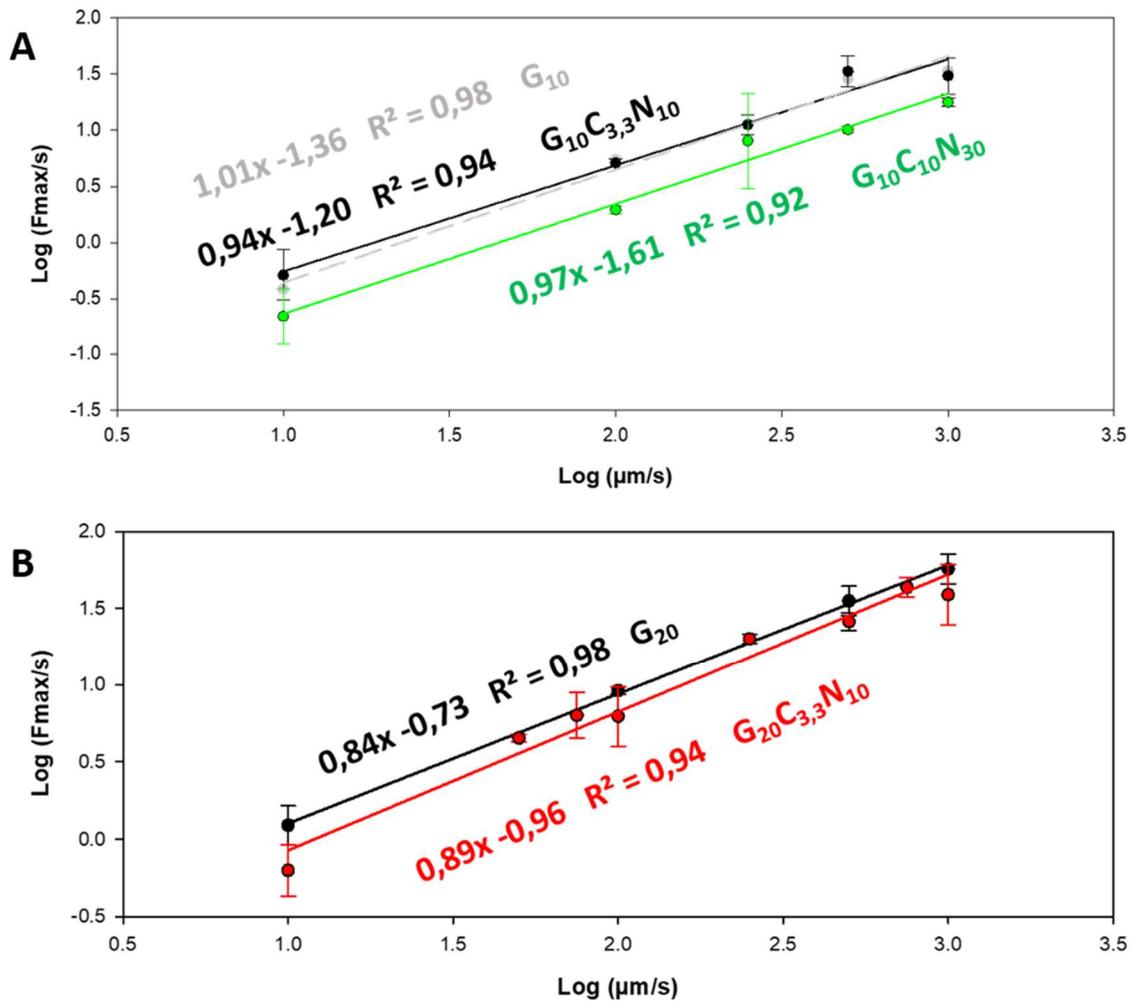


Figure IV.13. Les courbes de tendances de type linéaires ($ax + b$) du logarithme de la force maximale sur le temps en fonction du logarithme de la vitesse du probe-tack. Toutes les valeurs sont précises à $\pm 0,01$ près. Avec **A**), les hydrogels avec 10% p/v de gélatine B (250 Bloom) et **B**), les hydrogels à 20% p/v de gélatine B (250 Bloom).

Les courbes de tendance présentent un comportement similaire et semblent fonction de la concentration en gélatine. Avec 10% p/v, la pente se trouve entre 0,94 et 1,01 alors qu'avec 20% p/v elle se trouve entre 0,84 et 0,89.

5. Conclusions

Expériences d'adhésion à 25°C, 3h à vitesse variable :

S'agissant de la relation augmentation de la vitesse de traction et énergie d'adhésion et force à la rupture, le **Tableau IV.12** récapitule les augmentations significatives.

Hydrogel	Type de Rupture Majoritaire	Passage de 10 $\mu\text{m/s}$ à 1000 $\mu\text{m/s}$ (facteurs d'augmentations)		
		J/m ²	F(N) max	Rupture 1
G ₁₀	A/6b	2	1,2	1,8
G ₂₀				
G ₃₀				
G ₁₀ C _{3,3} N ₁₀	C/6a	2,2		
G ₁₀ C ₁₀ N ₃₀				
G ₂₀ C _{3,3} N ₁₀	A/6b	2,3	1,4	

Tableau IV.12. Facteurs d'augmentations des valeurs-types des expériences de probe-tack à vitesses variables.

Il n'a pas été trouvé de relation entre l'augmentation de la vitesse de traction et les forces à la rupture et énergies d'adhésion des hydrogels G₁₀ et G₁₀C₁₀N₃₀. Seul l'hydrogel G₃₀ semble réagir à l'augmentation de la vitesse sur tous les paramètres envisagés. Ceci laissant à penser que la densité des chaînes (cf. théorie du clouage) semble jouer un rôle dans les phénomènes à l'œuvre.

On retrouve d'ailleurs la même relation avec la densité des chaînes s'agissant de la relation augmentation de la vitesse de traction (log) et force maximale à la rupture/temps en seconde (log) (**Figure IV.13**).

Les courbes de tendance présentent un comportement similaire et semblent fonction de la concentration en gélatine. Avec 10% p/v, la pente se trouve entre 0,94 et 1,01 alors qu'avec 20% p/v elle se trouve entre 0,84 et 0,89.

Il ressort du **Tableau IV.13** que les facteurs les plus importants qui augmentent l'adhésion/l'adhérence, le plateau de fibrillation et la distance de la rupture sont l'augmentation de la concentration en gélatine de 10% à 30% p/v ainsi que l'augmentation de la concentration en catéchol oxydé (**vert foncé**). Aussi, l'ajout de 10 mM de catéchol + 30 mM de NaIO₄ est équivalent à une augmentation de 20% p/v en concentration en gélatine b (250 Bloom).

Facteurs d'augmentations									
Passage de G ₁₀ à G ₁₀ C _{3,3} N ₁₀					Passage de G ₂₀ à G ₂₀ C _{3,3} N ₁₀				
Vitesse de tack (µm/s)	10	100	1000	Moyennes	Vitesse de tack (µm/s)	10	100	1000	Moyennes
Energie d'adhésion (J/m ²)	8	3	7	6	Energie d'adhésion (J/m ²)	4	5	4	4
Force max (N)	3	2	3	3	Force max (N)	1	1	1	1
Rupture 1	3	2	3	3	Rupture 1	3	4	3	3
Plateau de fibrillation (N)	7	2	1	3	Plateau de fibrillation (N)	1	5	1	2
Passage de G ₁₀ à G ₁₀ C ₁₀ N ₃₀					Passage de G ₁₀ C _{3,3} N ₁₀ à G ₂₀ C _{3,3} N ₁₀				
Vitesse de tack (µm/s)	10	100	1000	Moyennes	Vitesse de tack (µm/s)	10	100	1000	Moyennes
Energie d'adhésion (J/m ²)	37	12	15	21	Energie d'adhésion (J/m ²)	3	3	4	3
Force max (N)	4	2	5	4	Force max (N)	1	1	2	1
Rupture 1	9	7	7	8	Rupture 1	2	2	3	2
Plateau de fibrillation (N)	11	6	6	8	Plateau de fibrillation (N)	2	3	3	3
Passage de G ₁₀ à G ₂₀					Passage de G ₁₀ à G ₃₀				
Vitesse de tack (µm/s)	10	100	1000	Moyennes	Vitesse de tack (µm/s)	10	100	1000	Moyennes
Energie d'adhésion (J/m ²)	7	2	6	5	Energie d'adhésion (J/m ²)	28	9	33	23
Force max (N)	4	2	5	4	Force max (N)	5	3	7	5
Rupture 1	2	1	3	2	Rupture 1	6	4	12	7
Plateau de fibrillation (N)	12	1	4	6	Plateau de fibrillation (N)	15	8	8	10

Tableau IV.13. Facteurs d'augmentations des valeurs-types des expériences de probe-tack à concentrations variables. L'ensemble des valeurs ont été arrondies à l'entier près.

A 25°C, la gélatine ne semble pas s'ancre au substrat (acier inoxydable). Les ruptures sont essentiellement adhésives. On peut dire que les groupements de la gélatine participent dans ce cadre aux forces de cohésions interne du gel. L'ajout de catéchol oxydé (G₁₀C_{3,3}N₁₀) donne lieu à des ruptures de types cohésives. On peut dire que le catéchol oxydé est lié aux forces d'adhésion du gel. On remarque que l'ajout de 10% p/v en gélatine (G₂₀C_{3,3}N₁₀) en présence de catéchol oxydé fait perdre le caractère adhésif du gel (ruptures deviennent adhésives).

Expériences de probe-tack à 38°C, 100 µm/s à 15 et 5 minutes :

Le passage de 60% à 80% p/v en gélatine B (250 Bloom) avec le ratio 3/1, NaIO₄/catéchol, multiplie par ~1,8 (de 130 à 236 J/m², 15 minutes) et par ~2 (de 103 à 204 J/m², 5 minutes) les énergies d'adhésion et par ~4,6 (de 6 à 28 kPa, 15 minutes) et ~1,8 (de 1,6 à 2,8 kPa, 5 minutes) les forces d'adhésion.

Le pourcentage de gélatine joue un rôle prépondérant dans l'adhérence.

La quantité de catéchol oxydé possède un impact sur les forces à la rupture et les énergies d'adhésions. En d'autres termes, augmenter la concentration en catéchol oxydé permet de diminuer la concentration en gélatine. Pour exemple, à 15 minutes l'hydrogel G₆₀C₁₀N₃₀ est équivalent aux hydrogels (G₄₀C₁₀₀N₆₀ et G₃₀C₆₀N₆₀) en termes d'énergie d'adhésion.

Par contre, nos résultats semblent conclure que les espèces catéchol non oxydées n'interviennent pas dans les forces et les énergies d'adhésions.

A 38°C, les ruptures étaient majoritairement cohésives. Il semblerait que la viscosité joue un rôle prépondérant dans l'ancrage des molécules sur le substrat en acier inoxydable

Expériences de balayage en température :

Il a été trouvé que les hydrogels non-cytotoxiques de 50% et plus p/v en gélatine respectant les ratios optimums de cytotoxicité sont stables à la température corporelle.

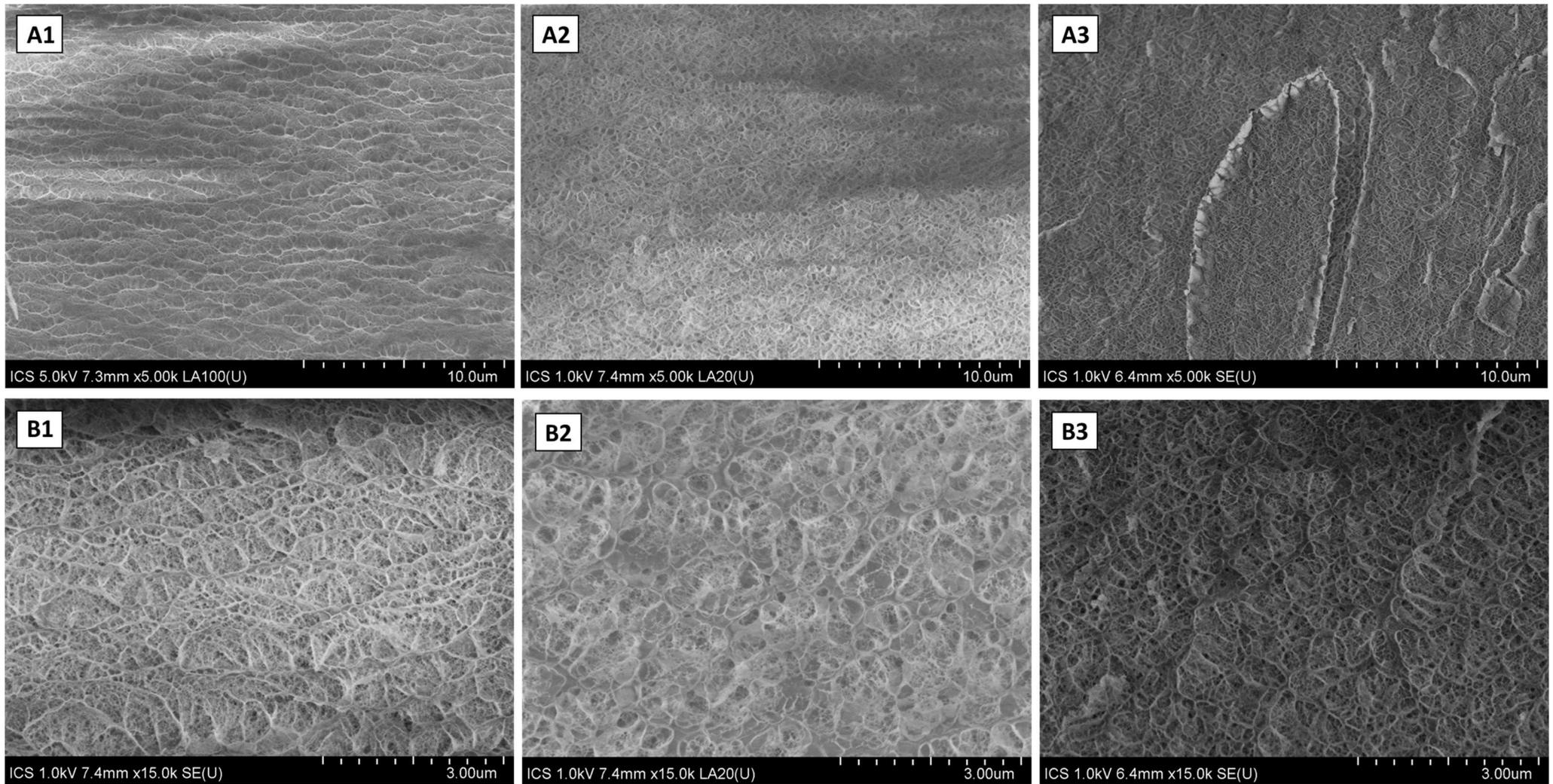
Expériences de suivi cinétique de gélification :

Il a été trouvé que l'hydrogel très fortement réticulé G₁₀C₁₀N₃₀ présente un « stick-slip » moins prononcé lorsqu'il est appliqué une déformation de 400%.

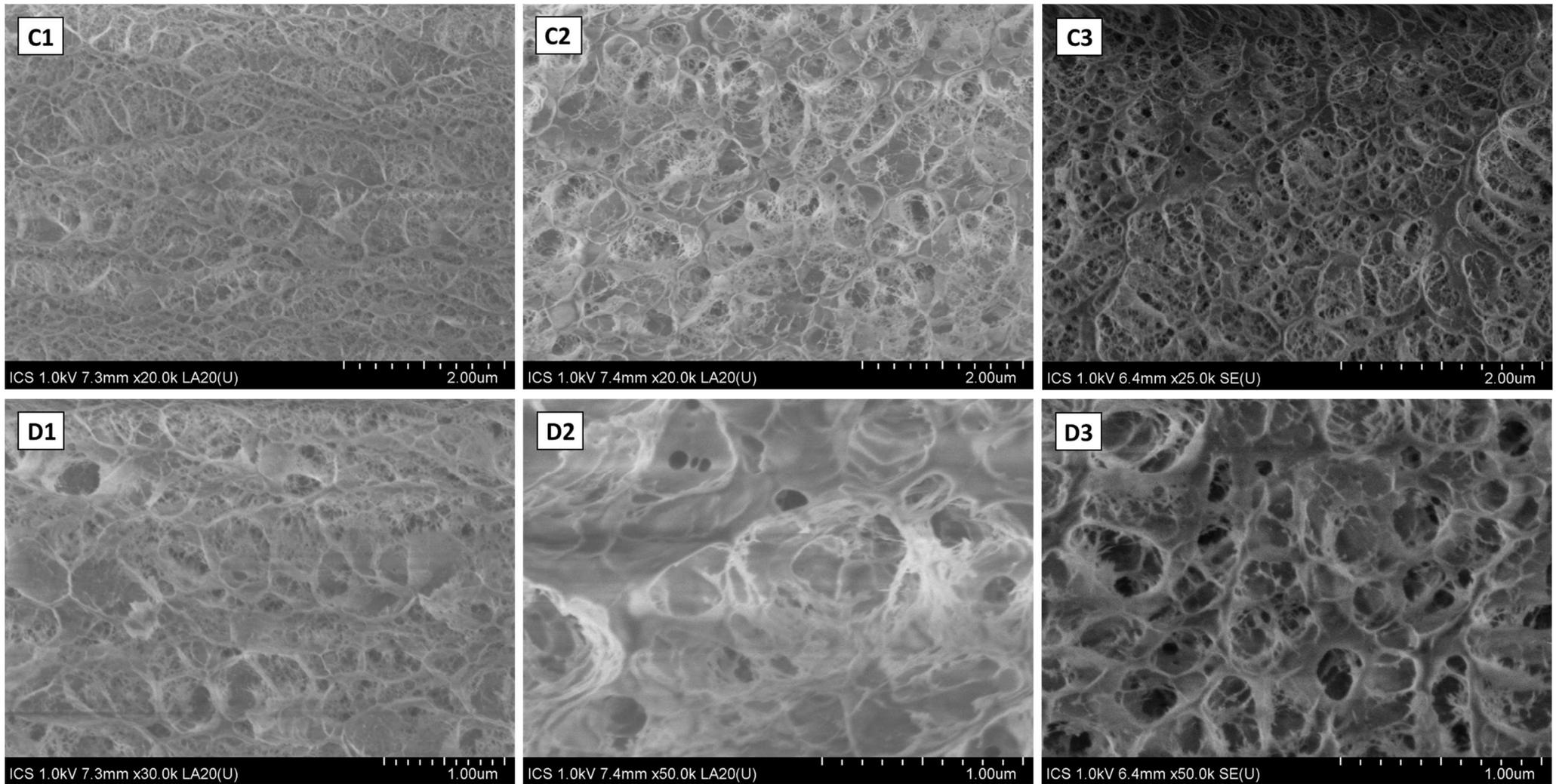
Entre l'hydrogel G₂₀ et le G₂₀C_{3,3}N₁₀, le suivi cinétique de la gélification n'a pas été changé. Les modules de conservation des hydrogels sont globalement les mêmes (6140±630 Pa et 7025 Pa, respectivement). Par contre, avec 10% p/v en gélatine (G₁₀ et G₁₀C_{3,3}N₁₀), et parce que le milieu faiblement condensé permet une plus forte réticulation, les modules de conservation ont augmentés (1147 Pa et 2593 Pa, respectivement).

C. Imageries CryoSEM des colles biocompatibles

Les images de CryoSEM sont connues pour être les plus fidèles à la réalité. Aussi il est apparu comme important de pouvoir déterminer la taille réelle des pores ainsi que d'éventuellement repérer la présence de particules de composés phénoliques ou de cristaux de NaIO₄.



Images CryoSEM IV.1. Images CryoSEM des hydrogels avec deux grossissements (série A (5kX) et série B (15kX)). Avec **1**, $G_{10}N_{30}$ (gélatine b (250 Bloom) 10% p/v + 30 mM NaIO_4) **2**, $G_{10}C_{10}N_{30}$ (gélatine b (250 Bloom) 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO_4) et **3**, $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ (gélatine b (250 Bloom) 20% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO_4).



Images CryoSEM IV.2. Images CryoSEM des hydrogels avec grossissements (série C (20kX) et série D (30kX et 50kX)). Avec 1, $G_{10}N_{30}$ (gélatine b (250 Bloom) 10% p/v + 30 mM NaIO_4) 2, $G_{10}C_{10}N_{30}$ (gélatine b (250 Bloom) 10% p/v + 10 mM catéchol + 30 mM NaIO_4) et 3, $G_{20}C_{3,3}N_{10}$ (gélatine b (250 Bloom) 20% p/v + 3,3 mM catéchol + 10 mM NaIO_4).

On estime que la taille des pores est d'environ de 10 μm . La bonne nouvelle est qu'il n'a pas été trouvé de particules/cristaux au sein des hydrogels. On peut alors en conclure qu'ils sont homogènes. Il est impossible d'observer une différence entre les hydrogels $G_{10}N_{30}$ et $G_{10}C_{10}N_{30}$. Avec l'hydrogel à 20% p/v de gélatine, on observe l'apparition de fibres. On peut supposer qu'elles jouent un rôle considérable dans la rigidité (module de conservation G'), la viscosité (module de perte G'') et l'adhésion des hydrogels (force et énergie de rupture).

D. Etudes de la dégradation par hydrolyse des colles biocompatibles

L'étude du gonflement et de la dégradation permet d'avoir une idée de la résistance du matériau.

Allure générale des courbes. Au vu de la **Figure I.9** portant sur la théorie du gonflement, et à l'exception des courbes des hydrogels séchés de la **Figure IV.14B**, les courbes observées sont de type D. Les courbes de type D correspondent à une perte de masse attribuable à la fracture du polymère. La fracture prend la forme d'une séparation entre les fibres du fait lixiviation (dissolution par percolation lente) et par hydrolyse des chaînes de polymère.

Les courbes des hydrogels séchés de la **Figure IV.14B**, correspondent à une courbe de type A. L'hydrogel n'a pas atteint son point d'équilibre.

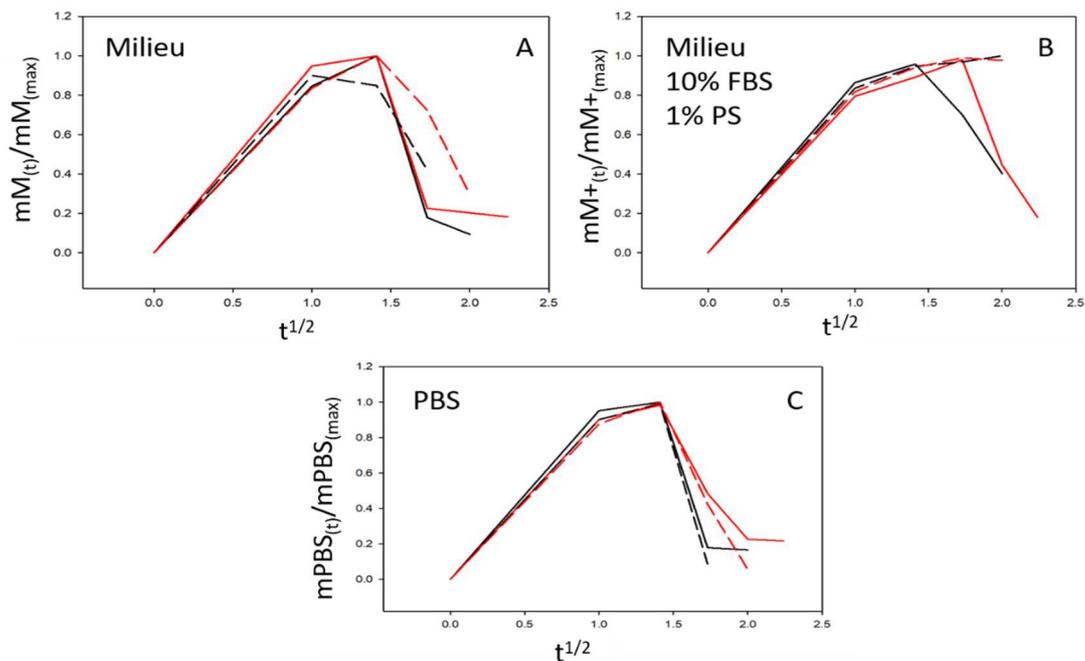


Figure IV.14. Courbes des moyennes (triplicata) du suivi de la dégradation des hydrogels non-cytotoxiques à 40 et 80% p/v en gélatine comprenant les rapports « optimums ». Avec **A**, dégradation dans le milieu DMEM High Glucose, **B**, dégradation dans le milieu DMEM High glucose + 10% FBS + 1% PS et **C**, dégradation dans le tampon PBS. Le noir correspond à l'hydrogel 40% p/v gélatine et le rouge l'hydrogel à 80% p/v gélatine. Les traits pleins sont les valeurs des hydrogels étudiés mouillés et les tirets des hydrogels préalablement séchés. Les valeurs en ordonnée représentent le ratio masse de l'hydrogel à un temps t sur la masse de l'hydrogel le plus lourd (le plus gonflé). L'abscisse représente la racine carrée du temps en jours.

Expériences de gonflement. La pente du départ correspond à la diffusion du solvant à l'intérieur des pores. Plus les pores sont grands plus la pente de la courbe sera forte. La capacité de gonflement provient aussi de plusieurs facteurs comme, le ratio nombre de groupements

hydrophiles/hydrophobes, le degré de réticulation ou le degré d'ionisation et les affinités avec les contre-ions ainsi que le solvant (pH, osmolarité) [93].

Les pentes de gonflement entre les hydrogels à 40% et 80% p/v gélatine en milieu PBS et DMEM High Glucose sont sensiblement les mêmes (**Tableau IV.14**). Si pour un même solvant, les valeurs des pentes sont les mêmes pour les hydrogels à 40% et 80% p/v gélatine, on peut conclure que la taille des pores et/ou la réticulation reste la même, comme il semble en être le cas. Si pour deux solvants différents, les valeurs des pentes sont les mêmes, on peut conclure que l'osmolarité des solvants est très proche, comme il semble en être le cas. Pour les solvants PBS et DMEM High Glucose, le maximum de gonflement est atteint pour les hydrogels à 40% p/v gélatine en moyenne 0,33 jours avant l'hydrogel à 80% p/v gélatine (**Tableaux IV. 14,15**). *Han et al.* ($G_{20}THB_{0,2}Fe_{16}$) ont obtenu un gonflement total au bout de 2-3 jours à 37°C dans le PBS par gravimétrie [16]. Nous avons obtenu dans ce milieu un gonflement maximum à 2,25 jours. *Liu et al.* (Gélatine + catéchol + complexes de ruthénium) ont obtenu un maximum à 3 jours dans le TBS (Tris-HCl saline buffer) à 37°C.

Les valeurs des pentes avec le milieu DMEM High Glucose + 10% FBS +1% PS sont un peu plus faibles. *A priori*, l'ajout de sérum foetal bovin (protéines, ions, hormones) augmente l'osmolarité du solvant. Pour ce milieu, il faut en moyenne 3 jours pour les hydrogels hydratés et plus de 4 jours pour les hydrogels séchés pour arriver au maximum de gonflement (**Tableaux IV. 14,15**).

Gonflement $\pm 0,01$				Dégradation $\pm 0,01$			
40% Hydraté	80% Hydraté	40% Sec	80% Sec	40% Hydraté	80% Hydraté	40% Sec	80% Sec
PBS				PBS			
0,95	0,90	0,90	0,88	-0,82	-0,50	-0,91	-0,58
DMEM HG				DMEM HG			
0,85	0,95	0,90	0,83	-0,82	-0,77	-0,43	-0,43
DMEM HG + 10% FBS +1% PS				DMEM HG + 10% FBS +1% PS			
0,86	0,79	0,84	0,82	-0,30	-0,53	ND	ND

Tableau IV.14. Récapitulatif des pentes des courbes moyennes de la Figure IV.14. Les valeurs des pentes représentent les pentes les plus fortes en gonflement et en dégradation (exemple **Figure IV.14.C**, de 0 à 1 t^{1/2}).

Expériences de dégradation des hydrogels (Tableau IV.14). En milieu PBS, les hydrogels à 80% p/v gélatine se dégradent moins vite que ceux à 40% p/v gélatine. En milieu DMEM High Glucose les hydrogels à 40% et 80% p/v ont les mêmes valeurs de dégradation. *Le fait d'avoir séché préalablement les hydrogels a donné lieu à un effet protecteur contre l'hydrolyse et/ou la lixiviation.* La seule différence entre l'hydrogel à 80% et 40% porte sur le jour de la dégradation qui commence au jour où le gonflement maximum est atteint.

En milieu DMEM High Glucose + 10% FBS +1% PS, l'hydrogel hydraté à 80% p/v gélatine met 0,33 jours en moyenne de plus à commencer son processus de dégradation qui s'avère être plus important (-0,53) que l'hydrogel à 40% p/v gélatine (-0,30). Il n'a pas été observé de dégradations pour les échantillons préalablement séchés. On retrouve l'effet protecteur du séchage.

Han et al. ($G_{20}THB_{0,2}Fe_{16}$) ont obtenu une dégradation totale au bout de 7 jours à 37°C dans le PBS par gravimétrie [16]. Nous avons arrêté les manipulations dans le PBS à 37°C au bout de 3-4 jours alors qu'il restait moins de 10% du matériau.

DMEM HIGH GLUCOSE (DHG)			
Hydrogels Mouillés	Gonflement maximum avant dégradation (Jour moyen)	Gonflement maximum moyen (comparé au mouillé du départ) %	Jour d'arrêt
40%	2	532±98	4
80%	2	405±24	5
DHG + 10% FBS + 1% PS			
Hydrogels Mouillés	Gonflement maximum avant dégradation (Jour moyen)	Gonflement maximum moyen (comparé au mouillé du départ) %	Jour d'arrêt
40%	3	590±49	4
80%	3.33	495±98	5
PBS			
Hydrogels Mouillés	Gonflement maximum avant dégradation (Jour moyen)	Gonflement maximum moyen (comparé au mouillé du départ) %	Jour d'arrêt
40%	2	553±21	4
80%	2.33	426±33	5

Tableau IV. 15. Récapitulatif des données des hydrogels non séchés.

Hydrogels séchés	DMEM HIGH GLUCOSE (DHG)				
	Gonflement maximum avant dégradation (Jour moyen)	Gonflement maximum moyen (comparé au sec du départ) %	Gonflement maximum moyen (comparé au mouillé du départ) %	% Restant (masse sèche)	Jour d'arrêt
40%	1,67	1333±138	428±40	23±13	3
80%	2	984±23	29±4	29±4	4
Hydrogels séchés	DHG + 10% FBS + 1% PS				
	Gonflement maximum avant dégradation (Jour moyen)	Gonflement maximum moyen (comparé au sec du départ) %	Gonflement maximum moyen (comparé au mouillé du départ) %	% Restant (masse sèche)	Jour d'arrêt
40%	4+	1450±14	465±9	91±7	4
80%	4+	1095±41	517±28	99±1	4
Hydrogels séchés	PBS				
	Gonflement maximum avant dégradation (Jour moyen)	Gonflement maximum moyen (comparé au sec du départ) %	Gonflement maximum moyen (comparé au mouillé du départ) %	% Restant (masse sèche)	Jour d'arrêt
40%	1,67	1139±148	371±45	11±10	3
80%	2	950±56	455±28	5±9	4

Tableau IV. 16. Récapitulatif des données des hydrogels séchés.

Il reste tout de même difficile de prétendre que l'on puisse extrapoler ce type de manipulations avec une dégradation *in vivo* dans la mesure où le processus de dégradation de la gélatine repose une protéolyse et non une hydrolyse. En général, le temps de dégradation est fonction du taux de réticulation et non de la méthode employée. Le temps de demi-vie a été évalué entre 0 et 13 jours pour des hydrogels de gélatine réticulés au glutaraldéhyde (implantation dans le dos d'une souris) [132]. Les auteurs *Fan et al.* ont obtenu une dégradation de leur gélatine réticulée à la dopamine et à la gènipine + fer de leur adhésif dans la trypsine au bout de 50 minutes à 37°C. *Liu et al.* ont une dégradation totale à 37°C par la trypsine dans le TBS entre 4h et 12,5h [12]. *Godwa et al.* (gélatine + dopamine) ont obtenu une dégradation au bout de 10h par la collagénase à 37°C dans le PBS [21].

Pour résumer, la similarité des pentes de gonflement des hydrogels à 40% et 80% p/v gélatine en milieu PBS et DMEM High Glucose (**Tableau IV.14**) laisse à penser que la taille des pores et/ou la réticulation est la même et que l'osmolarité des solvants PBS et DMEM High Glucose semble très proche. Ces adhésifs ont été réticulés avec les ratios optimums de non-cytotoxicité. Ils possèdent donc a priori le même taux de réticulation. Le milieu DMEM High Glucose + 10% FBS +1% PS possède une osmolarité un peu plus forte, les pentes de gonflement étant moins raides et le nombre de jours moyens pour arriver au gonflement maximal

est de 3 pour les hydrogels hydratés et de plus de 4 pour les hydrogels séchés (contre ~2 pour les autres solvants).

Quant à la dégradation (**Tableau IV.14**). En milieu PBS, la densité des polymères semble ralentir le processus de dégradation sans considération du séchage préalable. En milieu DMEM High Glucose, c'est le séchage qui semble être le facteur responsable de la baisse de la dégradation tout comme dans le milieu DMEM High Glucose + 10% FBS +1% PS.

E. Recherche d'un candidat fongicide potentiel

Les hydrogels de gélatine 10% p/v pure (**G**), de gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol (**P**) et de gélatine 10% p/v + 10 mM de catéchol (**C**) ont été coulés et laissés dans les boîtes de polystyrène capuchon fermé (pour conserver l'humidité) pour observer l'apparition éventuelle de champignons (**Photo IV.2**).

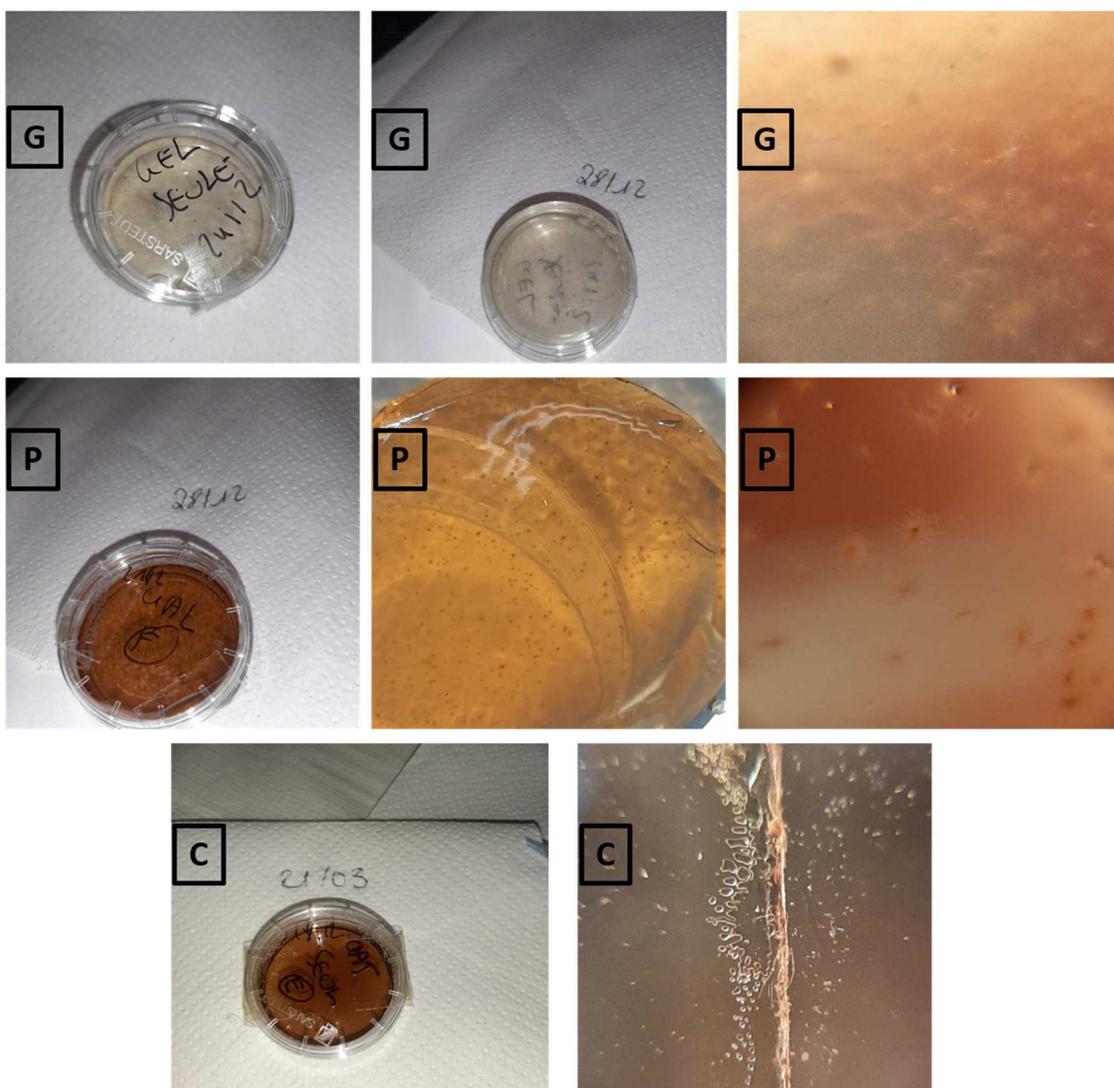


Photo IV.2. Observations des hydrogels de gélatine 10% p/v pure (**G**), de gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol (**P**) et de gélatine 10% p/v + 10 mM de catéchol (**C**) dans le temps.

Les champignons ont été observés pour les hydrogels de gélatine (**G**) pure 10% p/v au bout de 4 jours, pour les hydrogels de gélatine 10% p/v + 10 mM pyrogallol (**P**) au bout de 7 jours. Pour les hydrogels contenant de la gélatine 10% p/v + 10 mM de catéchol il n'a pas été observé d'apparition de champignons au bout de 3 mois.

Nous n'avons pas fait les observations avec des hydrogels contenant des catéchols ou des dopamines oxydés par ce qu'ils présentent une couleur trop sombre pour que de quelconques champignons puissent être observés.

Il ressort des observations que les hydrogels contenant du catéchol sont de bons candidats pour des expériences supplémentaires visant à prouver leur caractère fongicide.

F. Essais en traction sur le muscle

Les essais en traction sur le muscle permettent d'avoir une idée de la force du collage sur le matériel organique. La colle a été synthétisée sur place et directement appliquée. L'essai en traction a été fait au bout de 15 minutes à température ambiante à une vitesse de 100 $\mu\text{m/s}$ (Figure IV.15).

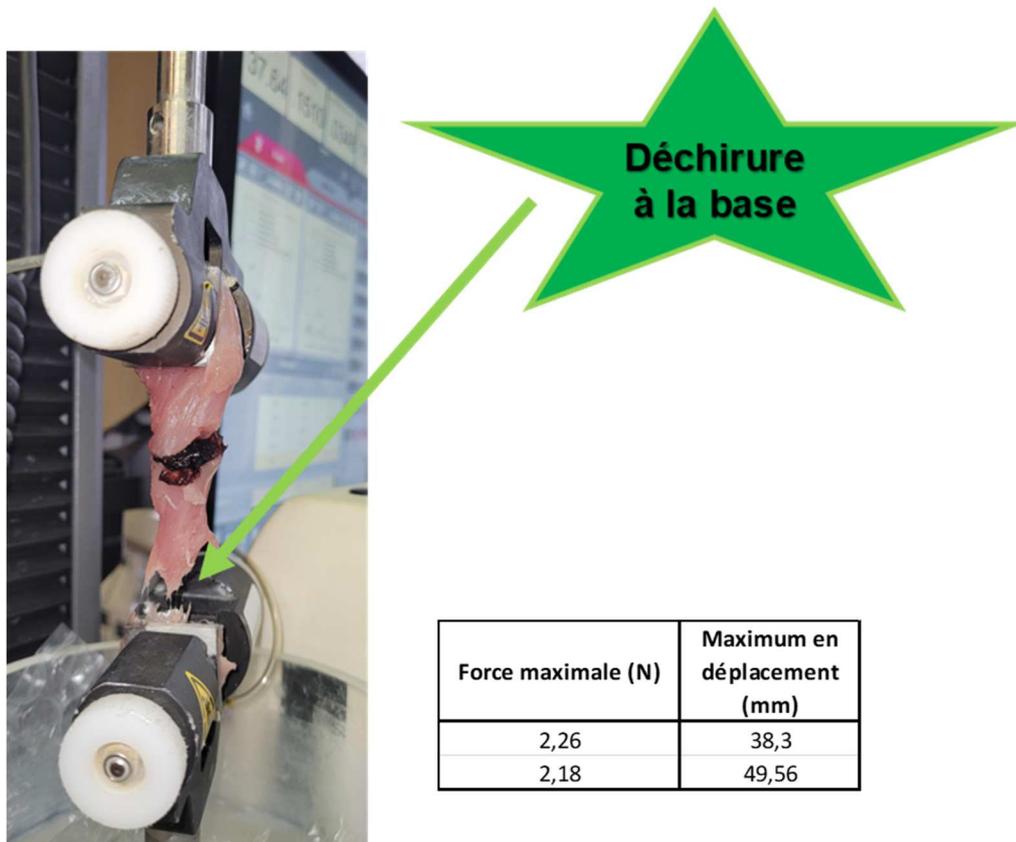


Figure IV.15. Image des essais en traction du muscle de la cuisse de poulet et valeurs de la force maximale et du déplacement correspondants.

Le muscle se déchire à la base. Cela signifie que le collage est fort. Seule la formulation $G_{80}C_{13,33}N_{40}A_1$ (gélatine b (250 Bloom) 80% p/v + 13,33 mM catéchol + 40 mM de NaIO_4 + 100 mg de gomme arabique) a donné lieu à des résultats probants. L'ajout de gomme arabique (et donc de liaisons hydrogènes) augmente le collage sur la matière organique. Pour avoir un ordre de grandeur, le même hydrogel à 5 min, 38°C et avec une traction de 100 $\mu\text{m/s}$ possède une force à la rupture de $2,9 \pm 0,1$ N et une énergie d'adhésion de 202 ± 68 J/m² (expérience doublée) sur l'acier inoxydable en probe-tack.

La rupture sur ce substrat n'est ni cohésive, ni adhésive. Il semble que l'adhésif à interpénétrer le muscle (cf. théorie de Voyutskii 1960).

Pour comparer avec des sutures faites avec des fils « 3-0 polyglactine 910 » (Vicryl; Ethicon, a Johnson & Johnson Company, Somerville, New Jersey, copolymère d'acide glycolique et d'acide lactique), résorbables à 70 jours, les auteurs Castillo *et al.* ont obtenu une force maximale à la rupture de $54,18 \pm 21,47$ (Figure-eight méthode), $45,39 \pm 13,86$ (Mason-Allen méthode), $64,29 \pm 19,30$ (sutures en périphérie) sur des muscles de pattes arrières de porcs de $3,62 \pm 0,14$ cm diamètre et de $7,62 \pm 0,92$ cm de circonférence, sur le même type de test en traction à la vitesse de 420 $\mu\text{m/s}$ [133].

G. Analyse spectrale UV-vis des colles biocompatibles avec la gomme arabique

L'analyse spectrale nous permet de confirmer la présence de liaisons covalentes entre la gélatine, le catéchol, et la gomme arabique. Il a été utilisé pour se faire un spectromètre UV-vis. Les analyses spectrales sont purement qualitatives.

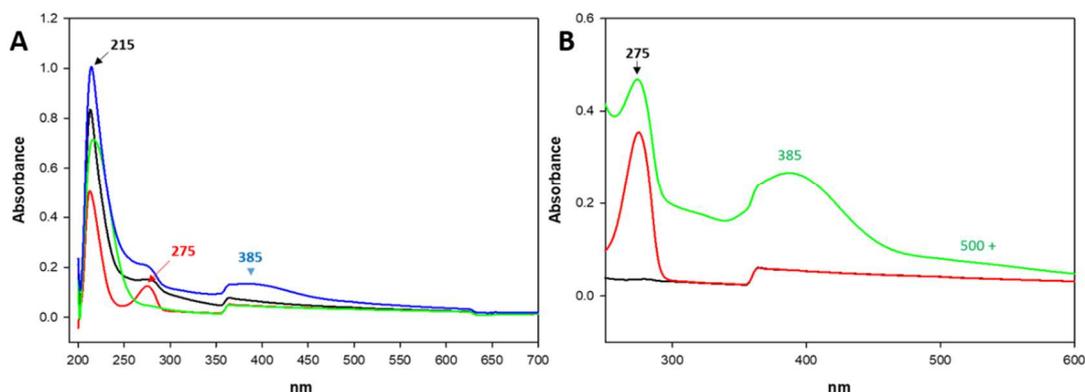


Figure IV.16. Recherche qualitative des molécules présentes dans les hydrogels de gomme arabique Sigma-Aldrich à moins de 5 min de chauffe (45°C) dans le tampon acétate de sodium (50 mmol). **A)** Gomme arabique (**noir**), gomme arabique + catéchol (**rouge**), gomme arabique + NaIO₄ (**vert**), gomme arabique + catéchol + NaIO₄ (**bleu**). **B)** Gomme arabique + gélatine B (250 Bloom) (**noir**), gomme arabique + gélatine B (250 Bloom) + catéchol (**rouge**), gomme arabique + gélatine B (250 Bloom) + catéchol + NaIO₄ (**vert**).

Concernant le spectre de la gomme arabique **A)**, l'absorbance à vers 260-275 nm est attribuable aux acides aminés aromatiques tyrosines, tryptophanes et phénylalanines [65] tandis que l'absorbance à <230 nm est attribuable aux structures protéiniques [66]. Les pics à 385 nm + 500 nm sont attribuables aux liaisons covalentes dues aux additions de Michael entre la gomme arabique et le catéchol (**Figure IV.16A**, **ligne bleue**) et entre la gomme arabique/gélatine et le catéchol (**Figure IV.16B**, **ligne verte**) [122].

Il est intéressant de souligner que la gomme arabique participe au réseau réticulé de l'hydrogel. On peut alors envisager que le catéchol lie la gomme arabique et la gélatine de manière covalente.

H. Conclusions de la partie expérimentale 2

Recherche de la formulation non-cytotoxique. Au vu des IC_{50} obtenus (0,13 mM $NaIO_4$) et présumés (0,027 mM catéchol), il apparaît que pour maximiser les chances de réticulations avec un rapport de 1/2 ou 1/3 en catéchol et en $NaIO_4$, il vaut mieux que l'espèce en excès soit celle qui soit le moins cytotoxique ($NaIO_4$).

Pour un hydrogel composé à 10% p/v en gélatine b (250 Bloom), il est fort à parier que l'on trouvera une espèce viable entre 3,3 mM et 10 mM en catéchol.

Pour un hydrogel composé de plus de 20% p/v en gélatine b (250 Bloom) et plus, nous avons trouvé les rapports « optimums » qui permettent d'obtenir dans tous les cas un matériau non-cytotoxique (0,165//0,5//3) (Catéchol (mM)/% p/v Gélatine// $NaIO_4$ (mM)/% p/v Gélatine// $NaIO_4$ (mM) / Catéchol (mM)). La maximisation du taux de réticulations semble être une condition primordiale à la non-cytotoxicité.

Expériences de rhéologie.

- Expériences d'adhésion à 25°C, 3h à vitesse variable :

Il n'a pas été trouvé de relation entre l'augmentation de la vitesse de traction et les forces à la rupture et énergies d'adhésion des hydrogels G_{10} et $G_{10}C_{10}N_{30}$. Seul l'hydrogel G_{30} semble réagir à l'augmentation de la vitesse sur tous les paramètres envisagés. Ceci laissant à penser que la densité des chaînes (cf. théorie du clouage) semble jouer un rôle dans les phénomènes à l'œuvre.

On retrouve d'ailleurs la même relation avec la densité des chaînes s'agissant de la relation augmentation de la vitesse de traction (log) et force maximale à la rupture/temps en seconde (log).

Les courbes de tendance présentent un comportement similaire et semblent fonction de la concentration en gélatine. Avec 10% p/v, la pente se trouve entre 0,94 et 1,01 alors qu'avec 20% p/v elle se trouve entre 0,84 et 0,89.

- **Expériences de balayage en température.** Il a été trouvé que les hydrogels non-cytotoxiques gélatine sont stables à la température corporelle ($G_{50}C_{8,33}N_{25}$ et éventuellement $G_{10}C_{10}N_{30}$).
- **Expériences de suivi cinétique de gélification.** Il a été trouvé que l'hydrogel très fortement réticulé $G_{10}C_{10}N_{30}$ présente un « stick-slip » moins prononcé lorsqu'il est appliqué une déformation de 400%.

Entre l'hydrogel G_{20} et le $G_{20}C_{3,3}N_{10}$, le suivi cinétique de la gélification n'a pas été changé. Les modules de conservation des hydrogels sont globalement les mêmes (6140±630 Pa et 7025 Pa, respectivement). Par contre, avec 10% p/v en gélatine (G_{10} et $G_{10}C_{3,3}N_{10}$), et parce que le milieu faiblement condensé permet une plus forte réticulation, les modules de conservation ont augmentés (1147 Pa et 2593 Pa, respectivement).

- **Expériences de probe-tack à 38°C, 100 μ m/s à 15 et 5 minutes.** Le passage de 60% à 80% p/v en gélatine B (250 Bloom) avec le ratio 3/1, $NaIO_4$ /catéchol, multiplie par ~1,8 (de 130 à 236 J/m², 15 minutes) et par ~2 (de 103 à 204 J/m², 5 minutes) les énergies d'adhésion et par ~4,6 (de 6 à 28 kPa, 15 minutes) et ~1,8 (de 1,6 à 2,8 kPa, 5 minutes) les forces d'adhésion. Par ailleurs, les ruptures des hydrogels s'opèrent à des distances plus longues à mesure que la concentration en gélatine augmente.

Le pourcentage de gélatine joue un rôle prépondérant dans l'adhérence.

La quantité de catéchol oxydé possède un impact sur les forces à la rupture et les énergies d'adhésions. En d'autres termes, augmenter la concentration en catéchol oxydé permet de diminuer la concentration en gélatine. Pour exemple, l'hydrogel $G_{60}C_{10}N_{30}$ est équivalent aux hydrogels ($G_{40}C_{100}N_{60}$ et $G_{30}C_{60}N_{60}$) en termes d'énergie d'adhésion.

Par contre, nos résultats semblent conclure que les espèces catéchol non oxydées n'interviennent pas dans les forces et les énergies d'adhésions.

Images de CryoSEM. On estime que la taille des pores est d'environ de 10 μm . Il n'a pas été trouvé de particules au sein des hydrogels. Il est impossible d'observer une différence entre les hydrogels $G_{10}N_{30}$ et $G_{10}C_{10}N_{30}$. Avec l'hydrogel à 20% p/v de gélatine, on observe l'apparition de fibres. On peut supposer qu'elles jouent un rôle considérable dans la rigidité (module de conservation G'), la viscosité (module de perte G'') et l'adhésion des hydrogels (force et énergie de rupture).

Expériences de gonflement et de dégradation. La similarité des pentes de gonflement des hydrogels à 40% et 80% p/v gélatine en milieu PBS et DMEM High Glucose (**Tableau IV.14**) laissent à penser que la taille des pores et/ou la réticulation est la même et que l'osmolarité des solvants PBS et DMEM High Glucose semble très proche. Le milieu DMEM High Glucose + 10% FBS +1% PS possède une osmolarité un peu plus forte, les pentes de gonflement étant moins raides et le nombre de jours moyens pour arriver au gonflement maximal est de 3 pour les hydrogels hydratés et de plus de 4 pour les hydrogels séchés (contre ~2 pour les autres solvants).

Quant à la dégradation (**Tableau IV.14**). En milieu PBS, la densité de polymère semble ralentir le processus de dégradation sans considération du séchage préalable. En milieu DMEM High Glucose, c'est le séchage qui semble être le facteur responsable de la baisse de la dégradation tout comme dans le milieu DMEM High Glucose + 10% FBS +1% PS.

Recherche d'un hydrogel potentiellement fongicide. Il ressort des observations que les hydrogels contenant du catéchol sont de bons candidats pour des expériences supplémentaires visant à prouver leur caractère fongicide.

Hydrogels avec ajout de gomme arabique.

- **Essais en traction sur le muscle de poulet.** Le muscle se déchire à la base. Cela signifie que le collage est fort. Seule la formulation $G_{80}C_{13,33}N_{40}A_1$ (gélatine b (250 Bloom) 80% p/v + 13,33 mM catéchol + 40 mM de NaIO_4 + 100 mg de gomme arabique) a donné lieu à des résultats probants. Il a été obtenu une force maximale à la rupture de $2,22 \pm 0,06$ N.
- **Analyse spectrale UV-vis.** Il a été observé que le catéchol lie la gomme arabique et la gélatine de manière covalente.

En ce qui concerne le rôle des composants dans l'adhésion/adhérence :

HYDROGEL	SUBSTRAT	TEMPERATURE °C	RUPTURES	FORCES
Gélatine pure	Acier inoxydable	25	ADHESIVES	COHESION
$G_{10}C_{3,3}N_{10}$	Acier inoxydable	25	COHESIVES	ADHESION
$G_{20}C_{3,3}N_{10}$	Acier inoxydable	25	ADHESIVES	COHESION
TOUT HYDROGEL	Acier inoxydable	38	COHESIVES	ADHESION
$G_{80}C_{13,33}N_{40}A_1$	Muscle	25		?

Tableau IV. 17. Récapitulatif des ruptures en fonction des composants

A 25°C, il apparaît que la gélatine participe aux forces de cohésion des hydrogels (ligne 1 et 3). Le catéchol oxydé participe aux forces d'adhésion (ligne 2) sur l'acier inoxydable. L'élévation de température donne a priori lieu à une baisse de la viscosité qui permet un meilleur ancrage (ligne 4).

A 25°C l'hydrogel semble s'être interpénétré dans le muscle.

V. Résumé des résultats.

L'adhésion de nos hydrogels a été principalement étudiée à l'aide d'un rhéomètre. On peut diviser les études en deux grandes catégories ; celles faites avec une concentration basse en gélatine (pouvant être utilisées comme matrices) et celles faites dans le but d'obtenir une colle chirurgicale viable.

En ce qui concerne les résultats obtenus avec les concentrations basses en gélatine. Les principales expériences rhéologiques menées dans le but de connaître les conditions optimales des concentrations en réactifs ont été résumées dans le **Tableau V.1**.

Expériences/Optimisations des concentrations	Résultats/Observations	Figures
Gélatine variable + NaIO ₄ fixe (10 mM)	Concentration optimale en gélatine est de 10% p/v	III.1
NaIO ₄ variable + Gélatine fixe (10 et 20% p/v)	10% p/v gélatine : perturbation des chaînes alpha de la gélatine et perte de 22% du module de conservation G' à partir de 10 mM NaIO₄ 20% p/v gélatine : perte significative du module de conservation G' (31%) qu'à partir de 60 mM NaIO ₄	III.2, 4
NaIO ₄ variable + Gélatine et Composés Phénoliques fixes (10% p/v, 10 mM)	Passer de 10 mM à 20 mM en NaIO₄ pour les hydrogels de catéchol fait multiplier l'énergie de fracture par 3 (32±8 J/m ² à 118±7 J/m ²). Ce passage donne un changement de mode de rupture (de la rupture adhésive à la rupture cohésive). Pas de différences significatives entre les forces d'adhésion et les énergies de fracture obtenues à 20 mM (82 kPa, 118±7 J/m ²) et à 30 mM (82±8 kPa et 106±21 J/m ²) de NaIO ₄	III.10,28
Composés Phénoliques variables + Gélatine fixe (10% p/v)	La perte en module de conservation G' commence vers 30-40 mM en composés phénoliques	III.16
Composés Phénoliques variables + Gélatine et NaIO ₄ fixes (10% p/v, 10 mM)	G ₁₀ C ₂₀ N ₁₀ et G ₁₀ D ₃₀ N ₁₀ sont les plus optimaux. Avec G' = 2282±112 Pa et 1836±199 Pa (3h, 100% déformation), des énergies d'adhésions supérieures à 100 J/m² et des forces d'adhésion de l'ordre de 80 kPa (3h, 100 µm/s, T.A.). Leurs ruptures sont majoritairement cohésives.	III.16,18
Balayage en température	Les hydrogels les plus réticulés G ₁₀ C ₂₀ N ₁₀ , G ₁₀ D ₂₀ N ₁₀ , G ₁₀ C ₁₀ N ₃₀ sont stables à température corporelle	III.12,19
OBSERVATIONS GENERALES		
Il apparaît clairement que les conditions optimales sont réunies lorsque l'une des deux espèces (composé phénolique, NaIO₄) se trouve en excès (avec un rapport de 1/2 et 1/3).		

Tableau V.1. Résumés des expériences et des résultats principaux

En ce qui concerne la recherche d'une colle chirurgicale viable.

Afin d'obtenir une colle chirurgicale viable, des tests de cytotoxicité MTT ont été entrepris. Nous avons obtenu une zone de non-cytotoxicité. Les hydrogels contenant les rapports non-cytotoxiques ont fait l'objet d'expériences de rhéologie (probe-tack à vitesse variable, adhésion, balayage en température) et d'expériences de dégradation. Ils ont également été imagés en CryoSEM. Les principaux résultats sont résumés dans le **Tableau V.2**.

Expériences	Résultats/Observations	Figures
MTT sur Extraits 24h, 5000 cellules/puits	<i>Pour un hydrogel composé de plus de 20% p/v en gélatine b (250 Bloom) et plus, nous avons trouvé les rapports « optimums » qui permettent d'obtenir dans tous les cas un matériau non-cytotoxique (0,165//0,5//3) (Catéchol (mM)/% p/v Gélatine// NaIO₄ (mM)/% p/v Gélatine// NaIO₄ (mM) / Catéchol (mM)). La maximisation du taux de réticulation semble être une condition primordiale à la non-cytotoxicité</i>	IV.2
Rhéologie cinétique de gélification 25°C, 3h	<i>Entre l'hydrogel G₂₀ et le G₂₀C_{3,3}N₁₀, le suivi cinétique de la gélification n'a pas été changé. Les modules de conservation des hydrogels sont globalement les mêmes (6140±630 Pa et 7025 Pa, respectivement). Par contre, avec 10% p/v en gélatine (G₁₀ et G₁₀C_{3,3}N₁₀), et parce que le milieu faiblement condensé permet une plus forte réticulation, les modules de conservation ont augmentés (1147 Pa et 2593 Pa, respectivement).</i>	IV.5
Rhéologie -adhésion à 38°C, 15 et 5 minutes, 100 µm/s	<p><i>Le passage de 60% à 80% p/v en gélatine B (250 Bloom) avec le ratio 3/1, NaIO₄/catéchol, multiplie par ~1,8 (de 130 à 236 J/m², 15 minutes) et par ~2 (de 103 à 204 J/m², 5 minutes) les énergies d'adhésion et par ~4,6 (de 6 à 28 kPa, 15 minutes) et ~1,8 (de 1,6 à 2,8 kPa, 5 minutes) les forces d'adhésion.</i></p> <p><i>Les ruptures des hydrogels s'opèrent à des distances plus longues à mesure que la concentration en gélatine augmente.</i></p> <p><i>Le pourcentage de gélatine joue un rôle prépondérant dans l'adhérence.</i></p> <p><i>La quantité de catéchol oxydé possède un impact sur les forces à la rupture et les énergies d'adhésions.</i></p> <p><i>Nos résultats semblent conclure que les espèces catéchol non oxydées n'interviennent pas dans les forces et les énergies d'adhésions.</i></p>	Tableaux IV.2,4
CryoSEM	<i>On estime que la taille des pores est d'environ de 10 µm. Il n'a pas été trouvé de particules au sein des hydrogels. Il est impossible d'observer une différence entre les hydrogels G₁₀N₃₀ et G₁₀C₁₀N₃₀. Avec l'hydrogel à 20% p/v de gélatine, on observe l'apparition de fibres. On peut supposer qu'elles jouent un rôle considérable dans la rigidité (module de conservation G'), la viscosité (module de perte G'') et l'adhésion des hydrogels (force et énergie de rupture).</i>	Images CryoSEM
Recherche d'un fongicide potentiel	<i>Il ressort des observations que les hydrogels contenant du catéchol sont de bons candidats pour des expériences supplémentaires visant à prouver leur caractère fongicide.</i>	Photo IV.2
Essais en traction sur muscle du poulet	<i>Le muscle se déchire à la base. Cela signifie que le collage est fort. Seule la formulation G₈₀C_{13,33}N₄₀A₁ (gélatine b (250 Bloom) 80% p/v + 13,33 mM catéchol + 40 mM de NaIO₄ + 100 mg de gomme arabique) a donné lieu à des résultats probants. Il a été obtenu une force maximale à la rupture de 2,22±0,06 N.</i>	IV.15

Tableau V.2. Résumés des expériences et des résultats principaux

VI. Conclusions /discussions des parties expérimentales

L'objectif de la présente thèse portait sur la création d'un adhésif compétitif en termes de propriétés mécaniques (A), biologiques (B) et pratiques (C).

A. Les propriétés mécaniques des adhésifs en tant qu'adhésif chirurgical potentiel

L'adhésif G₈₀C_{13,33}N₄₀A₁ possède les plus grandes qualités pour être une colle chirurgicale en devenir. Cet adhésif colle sur le muscle. La jonction muscle-adhésif-muscle est plus forte que le muscle lui-même. Les colles chirurgicales sont utilisées pour leur propriétés hémostatiques. La forte densité du réseau de polymères de gélatine à 80% p/v permettra de constituer une barrière plus efficace aux infiltrations de cellules éosinophiles, lymphocytes et plasmocytes [134]. En termes de propriétés mécaniques cet adhésif est résistant à la température corporelle. Comme nous l'avons dans la partie état de l'art, il est très difficile de pouvoir comparer les adhésifs entre eux puisque les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes. Cependant, avec le même appareil, la même vitesse (100 µm/s), le même type de muscle de poulet (cuisse de supermarché), et selon une expérience de « lap shear », l'adhésif commercial Ifabond® contenant du cyanoacrylate a obtenu une force d'adhésion maximale de 5,2±3,3 N. Nous avons obtenu sur 2 tirs 2,2±0,1N. Ifabond® est sans surprise plus forte que de notre adhésif mais elle contient des cyanoacrylates qui se dégradent en formaldéhydes. Les formaldéhydes sont connus pour être très réactifs et de par ce fait, toxiques. Il conviendrait dans le cadre de cette partie de refaire plus d'essais en traction sur le muscle du poulet et notamment en « lap shear » afin de pouvoir la comparer plus justement avec Ifabond®.

Les propriétés d'autocicatrisation doivent également être reprises dans les mêmes conditions que de compétiteurs directs (37°C, 300 secondes, 300% déformations) [16]. En effet nos expériences démontrent que nous avons une perte en force d'adhésion à 25°C. Il s'agirait de savoir si à 37°C nous conserverons cette perte. Cette question est importante dans la mesure où elle représente la capacité de s'autoréparer de notre adhésif dans le corps du futur patient, qui sera en mouvement et donc, sera susceptible de créer des fissures au sein de l'adhésif. Nous pensons que la capacité d'autocicatrisation ne perdurera pas sur le long terme du fait de la dégradation de l'adhésif par les collagénases du corps (les chaînes de polymères seront hydrolysées et donc coupées).

B. Les propriétés biologiques des adhésifs en tant qu'adhésif chirurgical potentiel

Nous avons obtenu les rapports optimums qui permettent d'avoir dans tous les cas (≥20% p/v gélatine) des matériaux non-cytotoxiques. Par rapport aux auteurs ayant travaillé sur le même type de matériaux (gélatine + composés phénoliques) nous avons obtenu nos résultats dans de pires conditions. Ce qui signifie que nos adhésifs sont autant voire meilleurs que les adhésifs de nos concurrents (Tableau VI.1). Le problème de cette disparité de conditions réactionnelles porte sur la norme ISO 10993-5. En effet, il n'existe pas de norme de test de cytotoxicité sur les matériaux hydrogels/adhésifs. De ce fait, la littérature s'appuie sur cette norme pour justifier de la quantité de matériau utilisé pendant le test alors même qu'il est difficile voire impossible de faire le lien entre un matériau en 3 dimensions avec la norme ISO qui parle d'un matériau en 2 dimensions (1 ml pour 6 cm²).

	Cellules/ Immersion	Tests sur extraits	Viabilité
Gowda et al.	Fibroblastes de Dermis humain 5mg/1ml 12h 37°C	Alamarblue	+80%
Liu et al.	Fibroblastes Souris L929 0.2mL/1ml 48h 37°C	MTS	+80%
Fan et al.	Fibroblastes de Dermis humain 5ml/1ml 4°C 7 jours	MTT	= au milieu cellulaire
Han et al.	Fibroblastes Souris L929 10mg/1ml 12h 37°C	MTT	96%
Back et al.	Fibroblastes Souris NIH 3T3 200mg/ml 24h 37°C	MTT	+70%

Tableau VI.1. Comparaison des tests de cytotoxicité des adhésifs de gélatine + composés phénoliques

En termes de cytotoxicité, il conviendrait de refaire plus de tests afin de pouvoir faire une analyse statistique de nos résultats. Il serait éventuellement intéressant de faire des tests dans les mêmes conditions que notre compétiteur direct Han *et al.* Il convient également de faire le rapprochement entre les deux régimes trouvés durant les expériences de suivi de gélification de la gélatine + 10 mM de NaIO₄ (**Figure VI.1**). Les rapports optimums représentent la capacité de réticuler les matériaux. Or cette capacité est liée à la viscosité du matériau. Les rapports optimums seront donc *a priori* valables au-delà de 10% p/v de gélatine. En dessous de cette valeur, il existe alors d'autres rapports qu'il convient de découvrir.

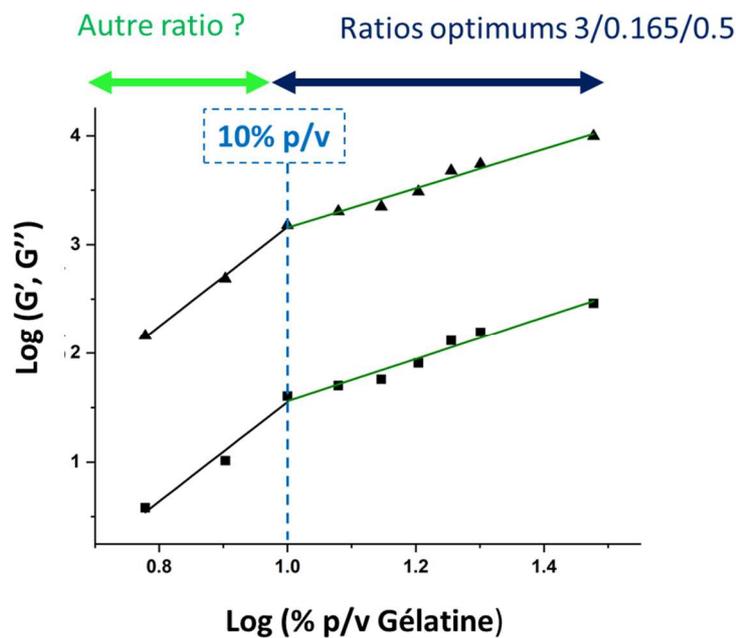


Figure VI. 1. Reprise de la Figure III.1. Cinétique de gélification de la gélatine + 10 mM NaIO₄

La partie biologique devrait comporter des manipulations de bactériologies et d'expériences sur les champignons. En termes de bactériologie, nos compétiteurs directs Han *et al.* ont obtenu une activité de leur adhésif sur *E. Coli* et *S. Aureus* [16]. Nous savons que le catéchol possède des propriétés fongicides sur les souches *Colletotrichum circinans*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium italicum*. Ces champignons concernent des maladies des plantes et il apparaîtrait donc comme judicieux d'étudier nos adhésifs sur la souche *candida albicans*.

Enfin, la partie biologie devrait comporter des manipulations *in vivo*. On citera pour exemple nos concurrents directs Han *et al.* Ces derniers ont testé leur adhésif sur des rats diabétiques à qui on avait injecté des souches de *S. Aureus*. Au bout de 21 jours, les plaies s'étaient refermées sans que soit observé d'inflammations particulières [16].

C. La praticité de nos adhésifs chirurgicaux potentiels

D'un point de vue de la praticité, nos adhésifs sont rapidement synthétisables (- 5min.), facilement synthétisables (1 pot, 3 tirs), et peu chers (- 1euro /8 grammes). Ils sont polyvalents. C'est-à-dire que l'on peut changer la concentration en gélatine pour avoir différents matériaux. Nos adhésifs doivent tout de même être créés sur place et ne peuvent pas être stockés dans des tubes. Il a été évalué *de visu* que les adhésifs contenant 60% p/v et plus de gélatine sont utilisables immédiatement. Il est difficile d'évaluer la gélification des autres pourcentages en gélatine avec le rhéomètre au-delà de 30% p/v (le polymère gonfle trop vite). Pour les concentrations allant de 6% à 30% la gélification n'est pas terminée au bout de 3h. Lors de la pose des adhésifs G₈₀C_{13,33}N₄₀A₁ sur le muscle du poulet il est apparu que la vitesse de gélification trop rapide peut être diminuée par l'utilisation de grains plus fins de gélatine. Dès lors le chirurgien aura plus le temps de mettre en place l'adhésif sur le patient et les propriétés mécaniques ne seront pas modifiées. Il convient également de faire attention à la température de la pose de l'adhésif. Il est apparu que lorsque l'adhésif était mis sur les substrats froids inférieurs à 25°C, la viscosité des adhésifs augmentait très vite ce qui a pour effet de faire précipiter l'adhésif et renforcer les forces de cohésion en dépit des forces d'adhésion. En termes de praticité, il convient de préparer les récipients qui contiennent la concentration voulue en gélatine et en catéchol, puis de rajouter le tampon, de chauffer et d'ajouter le NaIO₄ qu'au moment où l'on désire utiliser l'adhésif.

VII. Références

1. Al-Mubarak, L.; Al-Haddab, M. Cutaneous Wound Closure Materials: An Overview and Update. *J. Cutan. Aesthet. Surg.* **2013**, *6*, 178, doi:10.4103/0974-2077.123395.
2. *Handbook of Adhesion Technology*; Silva, L.F.M. da, Öchsner, A., Adams, R.D., Eds.; Springer reference; Springer: Heidelberg, 2011; ISBN 978-3-642-01168-9.
3. Rodríguez-Rodríguez, R.; Espinosa-Andrews, H.; Velasquillo-Martínez, C.; García-Carvajal, Z.Y. Composite Hydrogels Based on Gelatin, Chitosan and Polyvinyl Alcohol to Biomedical Applications: A Review. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2020**, *69*, 1–20, doi:10.1080/00914037.2019.1581780.
4. Barbucci, R. *Hydrogels: Biological Properties and Applications*; 2009th ed.; Springer, 2014;
5. Parhi, R. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 515–530, doi:10.15171/apb.2017.064.
6. Liang, H.-F.; Hong, M.-H.; Ho, R.-M.; Chung, C.-K.; Lin, Y.-H.; Chen, C.-H.; Sung, H.-W. Novel Method Using a Temperature-Sensitive Polymer (Methylcellulose) to Thermally Gel Aqueous Alginate as a PH-Sensitive Hydrogel. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1917–1925, doi:10.1021/bm049813w.
7. Kurisawa, M.; Chung, J.E.; Yang, Y.Y.; Gao, S.J.; Uyama, H. Injectable Biodegradable Hydrogels Composed of Hyaluronic Acid–Tyramine Conjugates for Drug Delivery and Tissue Engineering. *Chem. Commun.* **2005**, 4312, doi:10.1039/b506989k.
8. Jin, J.; Song, M.; Hourston, D.J. Novel Chitosan-Based Films Cross-Linked by Genipin with Improved Physical Properties. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 162–168, doi:10.1021/bm034286m.
9. Gowda, A.H.J.; Bu, Y.; Kudina, O.; Krishna, K.V.; Bohara, R.A.; Eglin, D.; Pandit, A. Design of Tunable Gelatin-Dopamine Based Bioadhesives. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 1384–1391, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.195.
10. Thi, P.L.; Lee, Y.; Thi, T.T.H.; Park, K.M.; Park, K.D. Catechol-Rich Gelatin Hydrogels in Situ Hybridizations with Silver Nanoparticle for Enhanced Antibacterial Activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *36*, doi:10.1016/j.msec.2018.06.037.
11. Fan, C.; Fu, J.; Zhu, W.; Wang, D.-A. A Mussel-Inspired Double-Crosslinked Tissue Adhesive Intended for Internal Medical Use. *Acta Biomaterialia* **2016**, *33*, 51–63, doi:10.1016/j.actbio.2016.02.003.
12. Liu, Y.; Cheong NG, S.; Yu, J.; Tsai, W.-B. Modification and Crosslinking of Gelatin-Based Biomaterials as Tissue Adhesives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *174*, 316–323, doi:10.1016/j.colsurfb.2018.10.077.
13. Chen, Y.-N.; Peng, L.; Liu, T.; Wang, Y.; Shi, S.; Wang, H. Poly(Vinyl Alcohol)–Tannic Acid Hydrogels with Excellent Mechanical Properties and Shape Memory Behaviors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 27199–27206, doi:10.1021/acsami.6b08374.
14. Nam, H.G.; Nam, M.G.; Yoo, P.J.; Kim, J.-H. Hydrogen Bonding-Based Strongly Adhesive Coacervate Hydrogels Synthesized Using Poly(N -Vinylpyrrolidone) and Tannic Acid. *Soft Matter* **2019**, *15*, 785–791, doi:10.1039/C8SM02144A.
15. Yang, J.; Cohen Stuart, M.A.; Kamperman, M. Jack of All Trades: Versatile Catechol Crosslinking Mechanisms. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 8271–8298, doi:10.1039/C4CS00185K.
16. Han, N.; Xu, Z.; Cui, C.; Li, Y.; Zhang, D.; Xiao, M.; Fan, C.; Wu, T.; Yang, J.; Liu, W. Fe³⁺-Chealingrosslinked Pyrogallol-Tethered Gelatin Adhesive Hydrogel with Antibacterial Activity for Wound. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 3164–3172, doi:10.1039/D0BM00188K.
17. Yang, Y.; Shi, K.; Yu, K.; Xing, F.; Lai, H.; Zhou, Y.; Xiao, P. Degradable Hydrogel Adhesives with Enhanced Tissue Adhesion, Superior Self-Healing, Cytocompatibility, and Antibacterial Property. *Adv. Healthc. Mater.* **2022**, *11*, 2101504, doi:10.1002/adhm.202101504.
18. Lee, B.P.; Messersmith, P.B.; Israelachvili, J.N.; Waite, J.H. Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41*, 99–132, doi:10.1146/annurev-matsci-062910-100429.
19. Nicklisch, S.C.T.; Waite, J.H. Mini-Review: The Role of Redox in Dopa-Mediated Marine Adhesion. *Biofouling* **2012**, *28*, 865–877, doi:10.1080/08927014.2012.719023.
20. Haute Autorité de Santé Rapport_hemostatiques_27052011_vd (1).Pdf.
21. Gowda, A.H.J.; Bu, Y.; Kudina, O.; Krishna, K.V.; Bohara, R.A.; Eglin, D.; Pandit, A. Design of Tunable Gelatin-Dopamine Based Bioadhesives. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *164*, 1384–1391, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.195.
22. Boufraquech, M. Implication des espèces réactives de l’oxygène (ROS) dans la radiocarcinogène thyroïdienne. 191.

23. Burke, K.A.; Roberts, D.C.; Kaplan, D.L. Silk Fibroin Aqueous-Based Adhesives Inspired by Mussel Adhesive Proteins. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 237–245, doi:10.1021/acs.biomac.5b01330.
24. Ninan, L. Adhesive Strength of Marine Mussel Extracts on Porcine Skin. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4091–4099, doi:10.1016/S0142-9612(03)00257-6.
25. Shao, H.; Bachus, K.N.; Stewart, R.J. A Water-Borne Adhesive Modeled after the Sandcastle Glue of *P. Californica*. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 464–471, doi:10.1002/mabi.200800252.
26. Jenkins, C.L.; Siebert, H.M.; Wilker, J.J. Integrating Mussel Chemistry into a Bio-Based Polymer to Create Degradable Adhesives. *Macromolecules* **2017**, *50*, 561–568, doi:10.1021/acs.macromol.6b02213.
27. Feng, J.; Ton, X.-A.; Zhao, S.; Paez, J.; del Campo, A. Mechanically Reinforced Catechol-Containing Hydrogels with Improved Tissue Gluing Performance. *Biomimetics* **2017**, *2*, 23, doi:10.3390/biomimetics2040023.
28. Liu, Y.; Meng, H.; Konst, S.; Sarmiento, R.; Rajachar, R.; Lee, B.P. Injectable Dopamine-Modified Poly(Ethylene Glycol) Nanocomposite Hydrogel with Enhanced Adhesive Property and Bioactivity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 16982–16992, doi:10.1021/am504566v.
29. Cencer, M.; Murley, M.; Liu, Y.; Lee, B.P. Effect of Nitro-Functionalization on the Cross-Linking and Bioadhesion of Biomimetic Adhesive Moiety. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 404–410, doi:10.1021/bm5016333.
30. Burkert, S.; Schmidt, T.; Gohs, U.; Dorschner, H.; Arndt, K.-F. Cross-Linking of Poly(N-Vinyl Pyrrolidone) Films by Electron Beam Irradiation. *Rad. Phys. Chem.* **2007**, *76*, 1324–1328, doi:10.1016/j.radphyschem.2007.02.024.
31. Oh, D.X. Tunicate-Mimetic Nanofibrous Hydrogel Adhesive with Improved Wet Adhesion. *Acta Biomater.* **2015**, *20*, 104–112, doi:10.1016/j.actbio.2015.03.031.
32. Balkenende, D.W.R.; Winkler, S.M.; Li, Y.; Messersmith, P.B. Supramolecular Cross-Links in Mussel-Inspired Tissue Adhesives. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 1439–1445, doi:10.1021/acsmacrolett.0c00520.
33. Mateescu, M.; Baixe, S.; Garnier, T.; Jierry, L.; Ball, V.; Haikel, Y.; Metz-Boutigue, M.H.; Nardin, M.; Schaaf, P.; Etienne, O.; et al. Antibacterial Peptide-Based Gel for Prevention of Medical Implanted-Device Infection. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0145143, doi:10.1371/journal.pone.0145143.
34. Kim, K.; Shin, M.; Koh, M.-Y.; Ryu, J.H.; Lee, M.S.; Hong, S.; Lee, H. TAPE: A Medical Adhesive Inspired by a Ubiquitous Compound in Plants. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 2402–2410, doi:10.1002/adfm.201500034.
35. Back, F.; Mathieu, E.; Betscha, C.; El Yakhlifi, S.; Arntz, Y.; Ball, V. Optimization of the Elasticity and Adhesion of Catechol- or Dopamine-Loaded Gelatin Gels under Oxidative Conditions. *Gels* **2022**, *8*, 210, doi:10.3390/gels8040210.
36. Back, F.; Ball, V.; Arntz, Y. Influence of the NaIO₄ Concentration on the Gelation and the Adhesive Strength of Pyrocatechol/Pyrogallol Containing Gelatin Hydrogels. *Front. Mater.* **2021**, *8*, 671451, doi:10.3389/fmats.2021.671451.
37. Cognard, J. *Science et Technologie Du Collage -*; Presses polytechniques et universitaires romandes.; 2003; ISBN 978-2-88074-410-6.
38. *Contact Angle, Wettability, and Adhesion*; Fowkes, F.M., Ed.; Advances in Chemistry; AMERICAN CHEMICAL SOCIETY: WASHINGTON, D.C., 1964; Vol. 43; ISBN 978-0-8412-0044-9.
39. Derjaguin, V.B. Theorie des Anhaftens kleiner Teilchen. *Prog. Surf. Sci.* **1934**, *40*, 6–15, doi:10.1016/0079-6816(92)90027-F.
40. Derjaguin, B.V.; Smilga, V.P. Electronic Theory of Adhesion. *J. Appl. Phys.* **1967**, *9*, doi:10.1063/1.1709192.
41. Voyutskii, S.S. The Diffusion Theory of Adhesion. *Am. Chem. Soc.* **1960**, *33*, 748–756, doi:10.5254/1.3542193.
42. McBain, J.W.; Hopkins, D.G. On Adhesives and Adhesive Action. *J. Phys. Chem.* **1925**, *29*, 188–204, doi:10.1021/j150248a008.
43. Buchan, S.; Rae, W.D. Chemical Nature of the Rubber-To-Brass Bond. *Rubber Chem. Technol.* **1946**, *19*, 968–986, doi:10.5254/1.3543264.
44. Gent, A.N.; Schultz, J. Effect of Wetting Liquids on the Strength of Adhesion of Viscoelastic Material. *J. Adhes.* **1972**, *3*, 281–294, doi:10.1080/00218467208072199.
45. Bikerman, J.J. *The Science of Adhesives Joints*; Academic Press; 2e éd.; 1968; ISBN 978-1-4832-6773-9.
46. Raphael, E.; de Gennes, P.G. Rubber-Rubber Adhesion with Connector Molecules. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 6, doi:10.1021/j100189a018.
47. Wool, R.P.: *Polymer Interfaces: Structure and Strength*.; Hanser Pub Inc.; 1995; ISBN 978-1-56990-133-5.

48. Carre, A.; Schultz, J. Polymer-Aluminium Adhesion II. Role of the Adhesive and Cohesive Properties of the Polymer. *J. Adhes.* **1984**, *17*, 135–155, doi:10.1080/00218468408079671.
49. Aubrey, D.W.; Sherriff, M. Peel Adhesion and Viscoelasticity of Rubber–Resin Blends. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1980**, *18*, 2597–2608, doi:10.1002/pol.1980.170180818.
50. Maugis, D.; Barquins, M. Adhésion, Collage et mécanique de la Rupture. In *Adhesion between polymers and concrete / Adhésion entre polymères et béton*; Sasse, H.R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1986; pp. 41–54 ISBN 978-0-412-29050-3.
51. Kendall, K. Shrinkage and Peel Strength of Adhesive Joints. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1973**, *6*, 1782–1787, doi:10.1088/0022-3727/6/15/304.
52. Dalbe, M.-J. Instabilité de Stick-Slip Lors Du Pelage d’un Adhésif, Claude Bernard Lyon 1, 2016.
53. Toumi, S. Contribution à la suppression du phénomène stick slip et à la construction d’un observateur de dimension infinie en forage pétrolier, Paris-Saclay, 2018.
54. Esmail Jabbari (Ed.) *Hydrogels in Tissue Engineering.*; 2018; ISBN 978-3-03897-121-4.
55. Zhao, W.; Jin, X.; Cong, Y.; Liu, Y.; Fu, J. Degradable Natural Polymer Hydrogels for Articular Cartilage Tissue Engineering: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2013**, *88*, 327–339, doi:10.1002/jctb.3970.
56. Hacker, M.C.; Mikos, A.G. Synthetic Polymers. In *Principles of Regenerative Medicine*; Elsevier, 2011; pp. 587–622 ISBN 978-0-12-381422-7.
57. Ganji, F.; Vasheghani-Farahani, S.; Vasheghani-Farahani, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran. Polym. J.* **2010**, *19*, 375–388.
58. Gao, D.; Xu, H.; Philbert, M.A.; Kopelman, R. Ultrafine Hydrogel Nanoparticles: Synthetic Approach and Therapeutic Application in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2224–2227, doi:10.1002/anie.200603927.
59. Vasheghani-Farahani, E.; Cooper, D.G.; Vera, J.H.; Weber, M.E. Concentration of Large Biomolecules with Hydrogels. *Chem. Eng. Sci.* **1992**, *47*, 31–40, doi:10.1016/0009-2509(92)80197-K.
60. Schrieber, R.; Gareis, H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*; Wiley-VCH: Weinheim, 2007; ISBN 978-3-527-31548-2.
61. Marouf, A.; Tremblin, G. *Abrégé de biochimie appliquée: Nouvelle édition*; EDP Sciences, 2020; ISBN 978-2-7598-1908-9.
62. Elbadawi, A.A.; Alsabah, Y.A.; Abuelhassan, H.H. Physical and Electrical Properties of Gum Arabic. In *Gum Arabic*; Elsevier, 2018; pp. 75–91 ISBN 978-0-12-812002-6.
63. Kögel-Knabner, I. The Macromolecular Organic Composition of Plant and Microbial Residues as Inputs to Soil Organic Matter. *Soil Biol. Biochem.* **2002**, *34*, 139–162, doi:10.1016/S0038-0717(01)00158-4.
64. Dror, Y.; Cohen, Y.; Yerushalmi-Rozen, R. Structure of Gum Arabic in Aqueous Solution. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **2006**, *44*, 3265–3271, doi:10.1002/polb.20970.
65. Dhenadhayalan, N.; Mythily, R.; Kumaran, R. Fluorescence Spectral Studies of Gum Arabic: Multi-Emission of Gum Arabic in Aqueous Solution. *J. Lumin.* **2014**, *155*, 322–329, doi:10.1016/j.jlumin.2014.06.022.
66. Prasad, S.; Mandal, I.; Singh, S.; Paul, A.; Mandal, B.; Venkatramani, R.; Swaminathan, R. Near UV-Visible Electronic Absorption Originating from Charged Amino Acids in a Monomeric Protein. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5416–5433, doi:10.1039/C5SC03694A.
67. McDonald, W.F.; Urban, M.W. A New Method to Monitor Adhesion and Interfacial Failure between Polymers: Rheo-Photoacoustic FT-IR Spectroscopy. *J. Adhes. Sci. Technol.* **1990**, *4*, 751–764, doi:10.1163/156856190X00649.
68. Aymonier-Marçais, A. Theses.Fr – Agnès Aymonier-Marçais , Modélisation d’adhésifs Sensibles à La Pression Corrélations Structure-Propriétés de Tack de Copolymères Acryliques Synthétisés Par Voie Radicalaire En Émulsion, Bordeaux 1, 2001.
69. Roncin, A. Etude de La Modification Des Propriétés Rhéologiques Linéaires et Non Linéaires Par Ingénierie Moléculaire : Vers Le Contrôle Des Propriétés Adhésives de Matériaux Autocollants, Pau, 2012.
70. Lakrout, H.; Sergot, P.; Creton, C. Direct Observation of Cavitation and Fibrillation in a Probe Tack Experiment on Model Acrylic Pressure-Sensitive-Adhesives. *J. Adhes.* **1999**, *69*, 307–359, doi:10.1080/00218469908017233.
71. Yamaguchi, T.; Koike, K.; Doi, M. In Situ Observation of Stereoscopic Shapes of Cavities in Soft Adhesives. *Europhys. Lett.* **2007**, *77*, 64002, doi:10.1209/0295-5075/77/64002.
72. Good, R.J.; Gupta, R.K. Rheological, Interfacial and Thermal Control of Polymer Adhesion. I. Isothermal Theory. *J. Adhes.* **1988**, *26*, 13–36, doi:10.1080/00218468808071272.
73. Serge, E.; David, L. *Introduction à La Physique Des Polymères : Cours et Exercices Ed. 2*; Dunod; 2ème Ed.; 2012; ISBN 978-2-10-058577-9.
74. Dealy, J.M.; Wang, J. *Melt Rheology and Its Applications in the Plastics Industry*; Engineering Materials and Processes; Springer Netherlands: Dordrecht, 2013; ISBN 978-94-007-6394-4.

75. Gunasekaran, S.; Ak, M.M. Dynamic Oscillatory Shear Testing of Foods – Selected Applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, *11*, 115–127, doi:10.1016/S0924-2244(00)00058-3.
76. Ross-Murphy, S.B. RHEOLOGICAL CHARACTERISATION OF GELS. *J. Texture Stud.* **1995**, *26*, 391–400, doi:10.1111/j.1745-4603.1995.tb00979.x.
77. Stading, M.; Hermansson, A.-M. Viscoelastic Behaviour of β -Lactoglobulin Gel Structures. *Food Hydrocoll.* **1990**, *4*, 121–135, doi:10.1016/S0268-005X(09)80013-1.
78. Winter, H.H. *Can the Gel Point of a Cross-Linking Polymer Be Detected by The G' - G'' Crossover?*; 1987; ISBN 09284931.
79. Weipert, D. Determining Rheological Properties of Cereal Products Using Dynamic Mechanical Analysis in Compression Mode. *Cereal foods world (USA)* **1997**.
80. Frajman, P.; Urbain, J.-M. *Chimie Organique et Polymeres (Édition Française)*; Nathan.; 2007; ISBN 978-2-09-160326-1.
81. Clark, A.H.; Ross-Murphy, S.B. *Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels*; Advance in Polymer Science; Springer-Verlag.; 1987; Vol. 83;.
82. Nikolaidis, A.; Labuza, T.P. Glass Transition State Diagram of a Baked Cracker and Its Relationship to Gluten. *J Food Sci.* **1996**, *61*, 803–806, doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb12206.x.
83. Peleg, M.; Chinachoti, P. On Modeling Changes in Food and Biosolids at and around Their Glass Transition Temperature Range. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **1996**, *36*, 49–67, doi:10.1080/10408399609527718.
84. Perez, J. Theories of Liquid-Class Transition. *J. Food Eng.* **2022**, *22*, 89–114, doi:10.1016/0260-8774(94)90027-2.
85. Mizuno, A.; Mitsui, M.; Motoki, M. Glass Transition Temperature of Casein as Affected by Transglutaminase. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 796–799, doi:10.1111/j.1365-2621.1999.tb15914.x.
86. Madeka, H.; Kokini, J.L. Effect of Glass Transition and Cross-Linking on Rheological Properties of Zein: Development of a Preliminary State Diagram. *Cereal Chem.* **1996**, *73*, 433–438.
87. Kalichevsky, M.T.; Jaroszkiewicz, E.M.; Ablett, S.; Blanshard, J.M.V.; Lillford, P.J. The Glass Transition of Amylopectin Measured by DSC, DMTA and NMR. *Carbohydr. Polym.* **1992**, *18*, 77–88, doi:10.1016/0144-8617(92)90129-E.
88. Forsell, P.M.; Mikkilä, J.M.; Moates, G.K.; Parker, R. Phase and Glass Transition Behaviour of Concentrated Barley Starch-Glycerol-Water Mixtures, a Model for Thermoplastic Starch. *Carbohydr. Polym.* **1997**, *34*, 275–282, doi:10.1016/S0144-8617(97)00133-1.
89. Slade, L.; Levine, H. Water and the Glass Transition - Dependence of the Glass Transition on Composition and Chemical Structure: Special Implications for Flour Functionality in Cookie Baking. *J. Food Eng.* **1994**, *22*, 143–188.
90. Varley, R. Ionomers as Self Healing Polymers. In *Self Healing Materials*; van der Zwaag, S., Ed.; Springer Series in Materials Science; Springer Netherlands: Dordrecht, 2007; Vol. 100, pp. 95–114 ISBN 978-1-4020-6249-0.
91. *Self Healing Materials: An Alternative Approach to 20 Centuries of Materials Science*; Zwaag, S. van der, Ed.; Springer series in materials science; Springer: Dordrecht, 2007; ISBN 978-1-4020-6249-0.
92. Sharma, A.; Rawat, K.; Solanki, P.R.; Bohidar, H.B. Self-Healing Gelatin Ionogels. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *95*, 603–607, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.11.103.
93. Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review. *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 105–121, doi:10.1016/j.jare.2013.07.006.
94. Voyutskii, S.S. *Visualisation de La Déformation Dynamique Dans Le Gonflement Des Gels Polymères*; Chemical Engineering Science; Elsevier Science Ltd, 1960; Vol. 33;.
95. Vervoort, S.; Patlazhan, S.; Weyts, J.; Budtova, T. Solvent Release from Highly Swollen Gels under Compression. *Polymer* **2005**, *46*, 121–127, doi:10.1016/j.polymer.2004.10.046.
96. Lowman, A. [PDF] SMART PHARMACEUTICALS | Semantic Scholar Available online: <https://www.semanticscholar.org/paper/SMART-PHARMACEUTICALS-Lowman/5afb4c465c0c2b551dbcccd21e832dcba5c90ead#citing-papers> (accessed on 1 February 2022).
97. Daoud, M.; Bouchaud, E.; Jannink, G. Swelling of Polymer Gels. *Macromolecules* **1986**, *19*, 1955–1960, doi:10.1021/ma00161a030.
98. Guillet, J.-F. Nanotubes de Carbone Pour La Délivrance Transdermique Électro-Stimulée de Substances Biologiquement Actives, Toulouse, 2017.
99. Weitsman, Y.J. *Effets Fluides Dans Les Polymères et Les Composites Polymères* | SpringerLink; Springer, 2012; ISBN 978-1-4899-7331-3.
100. Oyen, M.L. Mechanical Characterisation of Hydrogel Materials. *International Materials Reviews* **2014**, *59*, 44–59, doi:10.1179/1743280413Y.0000000022.
101. Gilson, P. Rheological Characterisation of Gelatins from Mammalian and Marine Sources. *Food Hydrocolloids* **2000**, *14*, 191–195, doi:10.1016/S0268-005X(99)00050-8.

102. Gilsean, P.M.; Ross-Murphy, S.B. Shear Creep of Gelatin Gels from Mammalian and Piscine Collagens. *Int. J. Biol. Macromol.* **2001**, *29*, 53–61, doi:10.1016/S0141-8130(01)00149-0.
103. Nijenhuis, K.T. Investigation into the Ageing Process in Gels of Gelatin/Water Systems by the Measurement of Their Dynamic Moduli. *Colloid Polym. Sci.* **259**, 522–535, doi:10.1007/BF01397890.
104. Clark, A.H.; Ross-Murphy, S.B. The Concentration Dependence of Biopolymer Gel Modulus. *Brit. Poly. J.* **1985**, *17*, 164–168, doi:10.1002/pi.4980170214.
105. Haug, I.J.; Draget, K.I.; Smidsrød, O. Physical and Rheological Properties of Fish Gelatin Compared to Mammalian Gelatin. *Food Hydrocoll.* **2004**, *18*, 203–213, doi:10.1016/S0268-005X(03)00065-1.
106. Hermanson, G.T. Functional Targets for Bioconjugation. In *Bioconjugate Techniques*; Elsevier, 2013; pp. 127–228 ISBN 978-0-12-382239-0.
107. Prossnitz, E.; Nikaido, K.; Ulbrich, S.J.; Ames, G.F. Formaldehyde and Photoactivatable Cross-Linking of the Periplasmic Binding Protein to a Membrane Component of the Histidine Transport System of Salmonella Typhimurium. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17917–17920, doi:10.1016/S0021-9258(19)81303-0.
108. Vasilescu, J.; Guo, X.; Kast, J. Identification of Protein-Protein Interactions Using in Vivo Cross-Linking and Mass Spectrometry. *Proteomics* **2004**, *4*, 3845–3854, doi:10.1002/pmic.200400856.
109. Gallegos-Infante, J.A.; Ochoa-Martínez, L.A.; Ortiz-Corral, C. Glass Transition Temperature Behavior of a Model Blend of Carbohydrates Comportamiento de La Temperatura de Transición Vítrea de Una Mezcla Modelo de Carbohidratos Comportamento Da Temperatura de Transición Vítrea Dunha Mezcla Modelo de Carbohidratos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2005**, *5*, 6–10, doi:10.1080/11358120509487664.
110. Thiewes, H.J.; Steeneken, P.A.M. The Glass Transition and the Sub-T, Endotherm of Amorphous and Native Potato Starch at Low Moisture Content. *Carbohydr. Polym.* **1997**, *32*, 123–130.
111. Júnior, Z.S.S.; Botta, S.B.; Ana, P.A.; França, C.M.; Fernandes, K.P.S.; Mesquita-Ferrari, R.A.; Deana, A.; Bussadori, S.K. Effect of Papain-Based Gel on Type I Collagen - Spectroscopy Applied for Microstructural Analysis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11448, doi:10.1038/srep11448.
112. Abrash, H.I. The Interaction of Oxidation Products of Pyrogallol with Poly-L-Lysine. A Model Oxidative Beer Haze. *Carlsberg Res. Commun.* **1977**, *42*, 27–33, doi:10.1007/BF02906707.
113. Tortora, P.G.; Johnson, I. *Le Dictionnaire Des Textiles*; Fairchild Books; Bloomsbury.; 2013; Vol. 8; ISBN 978-1-60901-535-0.
114. De Wilde, W.P.; Frolkovic, P. The Modelling of Moisture Absorption in Epoxies: Effects at the Boundaries. *Composites* **1994**, *25*, 119–127, doi:10.1016/0010-4361(94)90005-1.
115. Bisaglia, M.; Mammi, S.; Bubacco, L. Kinetic and Structural Analysis of the Early Oxidation Products of Dopamine. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 15597–15605, doi:10.1074/jbc.M610893200.
116. Egelandsdal, B.; Fretheim, K.; Harbitz, O. Dynamic Rheological Measurements on Heat-Induced Myosin Gels: An Evaluation of the Method's Suitability for the Filamentous Gels. *J. Sci. Food Agric.* **1986**, *37*, 944–954, doi:10.1002/jsfa.2740370916.
117. Ahmed, J.; Ptaszek, P.; Basu, S. *Rheological Properties of Gelatin and Advances in Measurement*; Woodhead; Elsevier Ltd, 2016; ISBN 978-0-08-100431-9.
118. Gioffrè, M.; Torricelli, P.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; Bigi, A. Role of PH on Stability and Mechanical Properties of Gelatin Films. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2012**, *27*, 67–77, doi:10.1177/08839115111431484.
119. Kale, R.N.; Bajaj, A.N. Ultraviolet Spectrophotometric Method for Determination of Gelatin Crosslinking in the Presence of Amino Groups. *Journal of Young Pharmacists* **2010**, *2*, 90–94, doi:10.4103/0975-1483.62223.
120. Satake, K.; Okuyama, T.; Ohashi, M.; Shinoda, T. THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF AMINE, AMINO ACID AND PEPTIDE WITH 2,4,6-TRINITROBENZENE 1-SULFONIC ACID. 7.
121. Baisch, G.; Wagner, B.; Öhrlein, R. An Efficient Chemo-Enzymatic Approach towards Variably Functionalized Benzotropolones. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3742–3748, doi:10.1016/j.tet.2010.03.068.
122. Yang, J.; Saggiomo, V.; Velders, A.H.; Cohen Stuart, M.A.; Kamperman, M. Reaction Pathways in Catechol/Primary Amine Mixtures: A Window on Crosslinking Chemistry. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166490, doi:10.1371/journal.pone.0166490.
123. McDowell, L.M.; Burzio, L.A.; Waite, J.H.; Schaefer, J. Rotational Echo Double Resonance Detection of Cross-Links Formed in Mussel Byssus under High-Flow Stress. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20293–20295, doi:10.1074/jbc.274.29.20293.
124. Muyonga, J.H.; Cole, C.G.B.; Duodu, K.G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Acid Soluble Collagen and Gelatin from Skins and Bones of Young and Adult Nile Perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* **2004**, *86*, 325–332, doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.038.

125. Skopinska-Wisniewska, J.; Tuszyńska, M.; Olewnik-Kruszkowska, E. Comparative Study of Gelatin Hydrogels Modified by Various Cross-Linking Agents. *Materials* **2021**, *14*, 396, doi:10.3390/ma14020396.
126. Khalafi, L.; Rafiee, M.; Shahbak, M.; Shirmohammadi, H. Kinetic Study of the Oxidation of Catechols in the Presence of N-Methylaniline. *Journal of Chemistry* **2013**, *2013*, 1–5, doi:10.1155/2013/497515.
127. Yadav, T.; Mukherjee, V. Interpretation of IR and Raman Spectra of Dopamine Neurotransmitter and Effect of Hydrogen Bond in HCl. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1160*, 256–270, doi:10.1016/j.molstruc.2018.01.066.
128. Lee, D.H.; Arisaka, Y.; Tonegawa, A.; Kang, T.W.; Tamura, A.; Yui, N. Cellular Orientation on Repeatedly Stretching Gelatin Hydrogels with Supramolecular Cross-Linkers. *Polymers* **2019**, *11*, 2095, doi:10.3390/polym11122095.
129. Helms, B.; Fréchet, J.M.J. The Dendrimer Effect in Homogeneous Catalysis. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1125–1148, doi:10.1002/adsc.200606095.
130. Han, M. Limitations of the Use of MTT Assay for Screening in Drug Discovery. *J. Chin. Pharm. Sci.* **2010**, *19*, doi:10.5246/jcps.2010.03.027.
131. Ahmad, Z.; Laughlin, T.F.; Kady, I.O. Thymoquinone Inhibits Escherichia Coli ATP Synthase and Cell Growth. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127802, doi:10.1371/journal.pone.0127802.
132. Ozeki, M.; Tabata, Y. In Vivo Degradability of Hydrogels Prepared from Different Gelatins by Various Cross-Linking Methods. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2005**, *16*, 549–561, doi:10.1163/1568562053783731.
133. Castillo, A.C.; Kaltwasser, K.; Morris, R.; Sanchez, E.R.; Rai, S.; Lombana, N.; Tran, D.; Branski, L.; Zhang, A.Y. Comparing 3 Suture Techniques After Muscle Laceration Repair. *Hand (New York, N.Y.)* **2021**, *16*, 67–72, doi:10.1177/1558944719837021.
134. Slezak, P.; Klang, A.; Ferguson, J.; Monforte, X.; Schmidt, P.; Bauder, B.; Url, A.; Osuchowski, M.; Redl, H.; Spazierer, D.; et al. Tissue Reactions to Polyethylene Glycol and Glutaraldehyde-Based Surgical Sealants in a Rabbit Aorta Model. *J Biomater Appl* **2020**, *34*, 1330–1340, doi:10.1177/0885328219900078.