



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES

THESE

(TV) 2005 AMARGIER-HUIN, C.

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR

DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des procédés

par

Service Commun de la Documentatio
INPL
Nancy-Brabois

Cécile AMARGIER-HUIN

**Contribution à la mise au point d'un biomatériau de comblement à
base de hyaluronate pour la réparation du cartilage**

Soutenue publiquement le 12 janvier 2005 devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs :	G. Muller
	D. Labarre
Examineurs :	L. Choplin
	E. Dellacherie
	P. Hubert
	E. Payan

A mon mari,

A ma famille,

A mes amis,

A ceux qui m'ont toujours soutenue...

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au sein du groupe « Matériaux et Polymères de Spécialité » du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (UMR CNRS-INPL 7568, Groupe ENSIC, Nancy). Je remercie Madame Edith Dellacherie, Directeur de ce laboratoire et Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC), de m'y avoir accueillie. Je lui suis reconnaissante pour tous les précieux conseils scientifiques qu'elle m'a donnés.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Physiopathologie et de Pharmacologie Articulaires (UMR CNRS-UHP Nancy I 7561, Faculté de Médecine, Nancy). Je remercie Monsieur Patrick Netter, Doyen de la Faculté de Médecine, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Madame Elisabeth Payan et Monsieur Patrick Hubert, Chargés de Recherche au CNRS, ont encadré ce travail, respectivement pour la partie Biologie et la partie Physico-chimie. Je tiens à leur témoigner toute ma reconnaissance pour leur disponibilité, leurs conseils et leur soutien constant durant ces trois années.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur Guy Muller, Directeur de recherche au CNRS et Directeur du Laboratoire Polymères, Biopolymères, Membranes (UMR CNRS-Université de Rouen 6522, Rouen), et Monsieur Denis Labarre, Professeur à l'unité de PhysicoChimie, PharmacoTechnie et BioPharmacie (UMR CNRS-Université de Paris-Sud XI 8612, Châtenay-Malabry), de juger ce travail.

Je remercie Monsieur Lionel Choplin, Professeur à l'ENSIC et Directeur du Centre de Génie Chimique des Milieux Rhéologiquement Complexes (GEMICO, Nancy), pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour sa participation à ce jury de thèse. Je tiens également à adresser mes remerciements à Philippe Marchal, docteur assistant ingénieur, pour sa bonne humeur permanente et son aide précieuse, tant sur le plan technique que théorique. Merci à toutes les personnes du GEMICO pour leur accueil chaleureux.

Je tiens à remercier tout spécialement Cathy Gérard, Doctorante, pour son aide durant les études *in vitro* et pour l'amitié qui nous lie. J'associe à ces remerciements Christelle Catuogno, Post-doctorante, pour les rayons de soleil qu'elle a propagés dans nos têtes, ainsi que toute l'équipe du Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires.

Mes remerciements s'adressent également à Emmanuelle Marie, Chargée de Recherche au CNRS, pour son soutien de tous les instants, à Jean-Luc Six, Maître de Conférences à l'Ecole Européenne d'Ingénieurs en Génie des Matériaux, qui a toujours soutenu ses monitrices. Je remercie Alain Durand, Maître de Conférences à l'ENSIC, pour sa disponibilité et sa gentillesse légendaires, et Michèle Léonard, Chargée de Recherche au CNRS, pour ses compétences scientifiques et le courage dont elle fait preuve. Merci à Cécile Nouvel, Maître de Conférences à l'ENSIC : les liens que nous avons tissés lors de nos thèses seront toujours présents.

Je ne saurais oublier de remercier Marie-Christine Grassiot et Jean-Marie Grosse, pour leur appui technique, Olivier Fabre pour les quelques spectres RMN qu'il a dû faire pour moi, ainsi que Jeanine Fourier et Dominique Storck, pour leur aide administrative. Vos sourires et nos discussions vont me manquer.

Mes remerciements s'adressent également à Amy White, Ruben Madrid Reina et Aline Laguerre pour leur contribution à ce travail en ce qui concerne la photopolymérisation.

Je tiens finalement à remercier mes collègues du laboratoire qui n'ont jamais cessé de me soutenir pendant ces trois années de thèse : ma Louloute Elise (il y aurait trop de choses à dire...), le coq Davidou qui n'est jamais tout à fait parti du bureau, Stéphane pour m'avoir redonné confiance quand il le fallait, Ahmed pour sa tchatche et ses exploits sportifs, Fred pour ses conseils en sport et ses phrases qui ne veulent rien dire, Delphine, ma première microthésarde qui a bien grandi, Hanna, Elise, Michel, Charbel, Dorra, Marie, Maud et les autres... Un merci spécial à Marie et à Manue pour toutes les réunions au sommet que nous avons partagées.

Liste des abréviations et des symboles

Liste des abréviations et des symboles

Bibliographie

EDC : N,N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthyl carbodiimide

HASE : hydrophobically modified alkali soluble emulsions

HEUR : hydrophobically ethoxylated urethanes

HPMC : hydroxypropylméthylcellulose

PGA : poly(acide glycolique)

pHEMA : poly(2-hydroxyéthylméthacrylate)

PLA : poly(acide lactique)

PNIPAAm : poly(N-isopropylacrylamide)

POE : poly(oxyde d'éthylène) ou PEG : poly(éthylène glycol)

PVA : poly(alcool vinylique)

Polymères

HA : hyaluronate de sodium

HA-TBA : hyaluronate de tétrabutylammonium

HA-TEG-x% : dérivé de hyaluronate de sodium comportant x moles de TEG pour 100 moles de motifs monosaccharidiques

HA-TEG-x%-C₁₂-y% : dérivé de hyaluronate de sodium comportant x moles de TEG et y moles de C₁₂ pour 100 moles de motifs monosaccharidiques

AA : alginate de sodium

AA-TBA : alginate de tétrabutylammonium

AA-C₁₂-x% : dérivé d'alginate de sodium comportant x moles de C₁₂ pour 100 moles de motifs monosaccharidiques

AA-C₁₂-x%-MA-y% : dérivé d'alginate de sodium comportant x moles de C₁₂ et y moles de méthacrylate pour 100 moles de motifs monosaccharidiques

Synthèses

DMSO : diméthylsulfoxyde

TEG ditosylate : tétraéthylène glycol ditosylate

PEG : poly(éthylène glycol)

EtOH : éthanol

TBAOH : hydroxyde de tétrabutylammonium

VP : 1-vinylpyrrolidone

Liste des abréviations et des symboles

Caractérisation

M : résidu mannuronate de l'alginate de sodium

G : résidu guluronate de l'alginate de sodium

SEC-MALLS : chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière laser multi-angles

\bar{M}_n : masse molaire moyenne en nombre ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

\bar{M}_w : masse molaire moyenne en masse ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

\bar{M}_v : masse molaire moyenne viscosimétrique ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

I : indice de polymolécularité

RMN : résonance magnétique nucléaire

CPG : chromatographie en phase gazeuse

Propriétés rhéologiques

τ : contrainte de cisaillement (Pa)

γ : déformation de cisaillement

$\dot{\gamma}$: vitesse de cisaillement (s^{-1})

η : viscosité (Pa.s)

η_0 : viscosité au premier plateau newtonien (Pa.s)

τ_c : contrainte critique (Pa)

ω : fréquence ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$)

G' : module élastique (Pa)

G'' : module visqueux (Pa)

$\tan \delta$: tangente de l'angle de déphasage δ ($=G''/G'$)

λ_e : temps de relaxation défini comme le rapport de la viscosité au premier plateau newtonien à la contrainte critique (s)

λ_0 : temps de relaxation déterminé d'après les spectres mécaniques $G', G'' = f(\omega)$ (s)

Études biologiques

ADN : acide désoxyribonucléique

BPBA : acide (benzoyl,1-4,phényl)-2-butyrique (étalon en IA-ECZ)

CS : chondroïtines sulfates

Liste des abréviations et des symboles

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) : milieu de culture cellulaire

dpm : nombre de désintégrations par minute (radioactivité)

Δ diHA : disaccharide de hyaluronate

Δ diC0S : disaccharide de chondroïtine sulfate 0S

Δ diC4S : disaccharide de chondroïtine sulfate 4S

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

HES : Hématoxyline Eosine Safran (colorant d'histologie)

IA-ECZ : électrophorèse capillaire de zone par association ionique

MIA : acide monoiodoacétique

MixB : mélange d'acide 4-hydroxy-benzoïque et d'acide (4-hydroxyphényl)-acétique (étalon en IA-ECZ)

PicA : phosphate de tétrabutylammonium

SVF : sérum de veau fœtal

Tris : tris(hydroxyméthyl)amino-méthane

Sommaire

Introduction	1
---------------------	----------

Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire et la réparation du cartilage	5
--	----------

1. INTRODUCTION.....	5
2. LES HYDROGELS A BASE DE POLYSACCHARIDES.....	6
2.1. LES GELS PHYSIQUES	6
2.1.1. <i>Réticulation par interactions ioniques</i>	6
2.1.1.1. Alginate	7
2.1.1.2. Pectine	8
2.1.1.3. Carraghénane.....	8
2.1.1.4. Chitosane.....	9
2.1.2. <i>Réticulation par liaisons hydrogène</i>	10
2.1.2.1. Les gels pH-réversibles	10
2.1.2.2. Les gels thermoréversibles	10
2.1.3. <i>Réticulation par stéréocomplexation</i>	13
2.1.4. <i>Réticulation par introduction de motifs hydrophobes</i>	13
2.1.4.1. Pullulane.....	14
2.1.4.2. Carboxyméthylcurdlane	15
2.1.4.3. Chitosane	15
2.1.4.4. Hyaluronate	16
2.1.4.5. Autres polysaccharides.....	17
2.2. LES GELS CHIMIQUES	17
2.2.1. <i>Réticulation par photopolymérisation</i>	17
2.2.1.1. Dextrane	18
2.2.1.2. Hyaluronate	19
2.2.2. <i>Réticulation par réaction entre groupements fonctionnels</i>	20
2.2.2.1. Réticulation par les aldéhydes.....	20
2.2.2.2. Réticulation par réactions d'addition	21
2.2.2.3. Réticulation par réactions de condensation.....	23
3. LES HYDROGELS DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE ET LA REPARATION DU CARTILAGE.....	24

Sommaire

3.1. LE CARTILAGE ARTICULAIRE, LE LIQUIDE SYNOVIAL ET LE ROLE DU HYALURONATE	24
3.1.1. <i>Le cartilage articulaire</i>	24
3.1.1.1. Les chondrocytes.....	24
3.1.1.2. Le réseau de collagène et de protéoglycanes	25
3.1.1.3. Le rôle du cartilage.....	26
3.1.2. <i>Le liquide synovial</i>	26
3.2. L'ARTHROSE ET LES LESIONS ARTICULAIRES	27
3.2.1. <i>Manifestations de l'arthrose</i>	27
3.2.2. <i>Approche physico-chimique et moléculaire de l'arthrose</i>	28
3.3. L'INTERET DES HYDROGELS DANS LA REPARATION DU CARTILAGE ET L'INGENIERIE TISSULAIRE.....	29
3.3.1. <i>La viscosupplémentation</i>	29
3.3.2. <i>Les biomatériaux de comblement</i>	30
3.3.2.1. Cahier des charges d'un biomatériau de comblement.....	31
3.3.2.2. Les différents types de biomatériaux de comblement.....	31
4. CONCLUSION.....	38
5. BIBLIOGRAPHIE	39

Chapitre II : Synthèse et caractérisation physico-chimique des dérivés de hyaluronate	48
--	-----------

1. INTRODUCTION.....	48
2. GENERALITES SUR LE HYALURONATE DE SODIUM.....	49
2.1. ORIGINE	49
2.2. STRUCTURE	50
2.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU HYALURONATE EN SOLUTION AQUEUSE	50
2.4. APPLICATIONS	52
3. MODIFICATION CHIMIQUE DU HYALURONATE.....	53
3.1. LES HYALURONATES PARENTS.....	53
3.2. PROTOCOLE GENERAL DE PREPARATION DES HYALURONATES MODIFIES	53
3.3. MISE AU POINT DE LA SYNTHESE	54
3.4. NOMENCLATURE	55

Sommaire

4. CARACTERISATION DES DERIVES OBTENUS.....	56
4.1. ETUDE DE L'EVOLUTION DES MASSES MOLAIRES DU HYALURONATE AU COURS DE LA SYNTHÈSE.....	56
4.1.1. Généralités.....	56
4.1.2. Equipements.....	57
4.1.3. Conditions expérimentales.....	57
4.1.4. Evolution des masses molaires moyennes.....	57
4.2. DETERMINATION DES TAUX DE SUBSTITUTION.....	59
4.3. ETUDE, PAR RMN ¹ H, DE LA PURETE DES POLYMERES PREPARES.....	61
5. RESULTATS ET COMPARAISON DES DIFFERENTES SYNTHÈSES.....	62
5.1. CAS DES DERIVES HA-C ₁₂ -TEG.....	62
5.2. CAS DES DERIVES HA-TEG-C ₁₂	63
5.2.1. Influence de la quantité de HA-TBA utilisée pour la synthèse et de la masse molaire du HA sur la réactivité des chaînes alkyle.....	63
5.2.2. Influence du temps de réaction, du mode d'agitation et de la précipitation pendant la synthèse.....	64
5.3. OPTIMISATION DU TAUX EN CHAINES ALKYLE ET EN RETICULANT CHIMIQUE.....	64
6. CONCLUSION.....	65
7. BIBLIOGRAPHIE.....	66

Chapitre III : Etude en régime semi-dilué des dérivés de hyaluronate	68
---	-----------

1. INTRODUCTION.....	68
2. GENERALITES SUR LA RHEOLOGIE.....	69
2.1. INTRODUCTION A LA RHEOLOGIE.....	69
2.2. ETUDE EN REGIME PERMANENT.....	71
2.3. ETUDE EN REGIME OSCILLATOIRE.....	72
3. ETUDE DES PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES DERIVES DE HYALURONATE	74
3.1. MATERIEL ET CONDITIONS OPERATOIRES.....	74
3.1.1. Préparation des solutions de polymères.....	74

Sommaire

3.1.2. Matériel et conditions opératoires	74
3.1.3. Mise en place de l'échantillon	75
3.1.4. Précisaillement de l'échantillon et reprise en viscosité	75
3.2. MISE EN EVIDENCE DE LA RETICULATION CHIMIQUE	76
3.3. COMPORTEMENT EN REGIMES PERMANENT ET OSCILLATOIRE	78
3.3.1. Comportement en régime permanent	79
3.3.2. Comportement en régime oscillatoire	81
3.3.2.1. G', G'' en fonction de la contrainte	81
3.3.2.2. G', G'' en fonction de la fréquence	82
3.3.3. Conclusion	83
3.4. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN POLYMERE	84
3.5. DISCUSSION SUR LES EFFETS DE DIFFERENTS PARAMETRES DE SYNTHESE	85
3.5.1. Influence de la masse de HA-TBA utilisée lors de la synthèse	85
3.5.2. Influence du type d'agitation	85
3.5.3. Influence de la précipitation pendant la synthèse	86
3.5.4. Influence des taux en C ₁₂ et TEG et de la masse molaire du polymère	86
3.5.4.1. Effet du taux en chaînes alkyle et de la \bar{M}_w	86
3.5.4.2. Effet du taux en TEG et de la \bar{M}_w	87
3.5.4.3. Effet des taux en C ₁₂ et TEG	88
4. EFFETS DE LA STERILISATION	88
4.1. LES METHODES CONVENTIONNELLES DE STERILISATION	88
4.1.1. Stérilisation chimique à l'oxyde d'éthylène	88
4.1.2. Rayonnements ionisants	89
4.1.3. Stérilisation par chaleur humide ou autoclavage	90
4.1.4. Stérilisation par irradiation UV	90
4.2. EFFETS DE LA STERILISATION PAR CHALEUR HUMIDE SUR LES PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES HYDROGELS	91
5. STABILITE EN MILIEU PHYSIOLOGIQUE	92
6. CONCLUSION	94
7. BIBLIOGRAPHIE	96

Chapitre IV : Etude biologique *in vitro* en culture tridimensionnelle des dérivés de hyaluronate

98

1. OBJECTIFS.....	98
2. MATERIEL ET METHODES.....	100
2.1. SYNTHÈSE DES MATERIAUX POLYSACCHARIDIQUES	100
2.1.1. <i>Synthèse des alginates modifiés</i>	100
2.1.2. <i>Synthèse des hyaluronates modifiés</i>	101
2.2. CARACTERISATION RHEOLOGIQUE DES SOLUTIONS DE POLYMERES, SEULS OU EN MELANGE	101
2.2.1. <i>Préparation des solutions de polymères</i>	101
2.2.2. <i>Appareillage</i>	101
2.2.3. <i>Etudes réalisées</i>	102
2.3. FORMULATION DES POLYMERES SOUS FORME DE BILLES	102
2.4. CULTURE DES CHONDROCYTES EN BILLES	103
2.4.1. <i>Prélèvement et culture en monocouche des chondrocytes de rat issus de languettes sternales</i>	103
2.4.2. <i>Culture en billes</i>	104
2.5. PROTOCOLE DE LA STIMULATION MECANIQUE.....	104
2.6. MICROSCOPIE OPTIQUE : ETUDES HISTOLOGIQUES.....	105
2.6.1. <i>Préparation des réactifs de fixation et de déshydratation</i>	105
2.6.2. <i>Traitement des échantillons</i>	105
2.6.3. <i>Coloration des échantillons</i>	106
2.6.3.1. <i>La coloration HES</i>	106
2.6.3.2. <i>La coloration au bleu alcian</i>	107
2.6.3.3. <i>La coloration au bleu de toluidine</i>	107
2.6.3.4. <i>La coloration au rouge sirius</i>	107
2.6.4. <i>Analyse des échantillons</i>	108
2.7. INCORPORATION DES PRECURSEURS RADIOMARQUES.....	108
2.7.1. <i>Principe</i>	108
2.7.2. <i>Produits</i>	108
2.7.3. <i>Protocole</i>	109
2.7.4. <i>Expression des résultats</i>	110
2.8. DOSAGE DU HYALURONATE EN IA-ECZ.....	110

Sommaire

2.8.1. Principe	110
2.8.2. Produits	110
2.8.3. Protocole	111
2.8.4. Analyse des échantillons	112
2.9. DOSAGE DES CHONDROÏTINES SULFATES EN IA-ECZ	112
2.9.1. Principe	112
2.9.2. Produits	113
2.9.3. Protocole	113
2.9.4. Analyse des échantillons	114
2.10. PROTOCOLE DE LA CINÉTIQUE DE LIBÉRATION DU HYALURONATE D'UNE MATRICE TRIDIMENSIONNELLE D'ALGINATE DE CALCIUM	114
2.11. PROTOCOLE DE L'ÉTUDE DE LA CYTOTOXICITÉ	115
3. CINÉTIQUE DE LIBÉRATION DU HYALURONATE D'UNE MATRICE TRIDIMENSIONNELLE D'ALGINATE DE CALCIUM	116
3.1. MÉLANGES ÉTUDIÉS ET CONDITIONS POUR PRÉPARER LES BILLES	116
3.2. CARACTÉRISATION RHEOLOGIQUE DES PRODUITS UTILISÉS, SEULS OU EN MÉLANGE	117
3.3. RÉSULTATS DE LA CINÉTIQUE DE LIBÉRATION DU HA DES BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM ET DISCUSSION	117
3.3.1. Influence du milieu de libération	117
3.3.2. Influence de l'autoclavage	118
3.3.3. Influence de la concentration totale en polysaccharides	119
3.3.4. Influence de la stimulation mécanique et de la présence des cellules	120
3.3.5. Influence du type de hyaluronate utilisé	121
3.3.6. Influence du type d'alginate utilisé	122
3.3.6.1. Hypothèse basée sur la rhéologie	123
3.3.6.2. Hypothèse basée sur la structure des hydrogels	124
3.4. CONCLUSION	125
4. ÉTUDE DE LA CYTOTOXICITÉ	126
4.1. ÉVALUATION DU NOMBRE DE CELLULES PRÉSENTES DANS LES BILLES	126
4.2. INFLUENCE DE LA PRÉSENCE DE HA SUR LES SYNTHÈSES D'ADN ET DE PROTEOGLYCANES	127
4.2.1. Influence de la présence de HA sur la prolifération cellulaire	127
4.2.2. Influence de la présence de HA sur la synthèse des protéoglycanes	128

Sommaire

4.3. INFLUENCE DE LA STIMULATION MECANIQUE SUR LES SYNTHESSES D'ADN ET DE PROTEOGLYCANES.....	129
4.3.1. <i>Influence de la stimulation mécanique sur la prolifération cellulaire</i>	129
4.3.2. <i>Influence de la stimulation mécanique sur la synthèse de protéoglycanes</i>	130
4.4. <i>Conclusion</i>	131
5. CONCLUSION.....	132
6. BIBLIOGRAPHIE.....	133

Chapitre V : Perspectives d'une nouvelle voie d'élaboration de biomatériaux : les dérivés photopolymérisables	136
--	------------

1. INTRODUCTION.....	136
2. PRINCIPE DE LA PHOTOPOLYMERISATION.....	137
2.1. AVANTAGES DE CETTE TECHNIQUE.....	137
2.2. LES PHOTOAMORCEURS.....	138
2.2.1. <i>Photopolymérisation radicalaire par photoclivage</i> ³³	139
2.2.2. <i>Photopolymérisation radicalaire par arrachement d'hydrogène</i> ³³	139
2.2.3. <i>Le système photoamorceur utilisé</i>	139
2.3. LA PHOTOPOLYMERISATION <i>IN SITU</i>	140
2.4. LES MATERIAUX PHOTOPOLYMERISABLES.....	141
3. MISE AU POINT DE LA SYNTHESE DE CES DERIVES DOUBLEMENT MODIFIES.....	142
3.1. VOIE DE SYNTHESE METTANT EN JEU LE 2-CHLOROETHYLMETHACRYLATE.....	142
3.1.1. <i>Fixation des groupements méthacrylate</i>	142
3.1.1.1. Protocole de fixation.....	142
3.1.1.2. Détermination du taux de fixation en méthacrylate.....	143
3.1.1.3. Résultats.....	144
3.1.2. <i>Fixation des groupements méthacrylate et des chaînes alkyle</i>	144
3.1.2.1. Protocole de la double fixation.....	144
3.1.2.2. Détermination des taux de fixation en méthacrylate et en chaînes C ₁₂	145
3.1.2.3. Tableau récapitulatif des produits synthétisés.....	145
3.1.2.4. Conclusions.....	145

Sommaire

3.2. VOIE DE SYNTHÈSE METTANT EN JEU L'ANHYDRIDE METHACRYLIQUE.....	146
3.2.1. Fixation des groupements méthacrylate	146
3.2.1.1. Protocole de fixation	146
3.2.1.2. Détermination du taux de fixation en méthacrylate	147
3.2.1.3. Résultats	147
3.2.2. Fixation des groupements méthacrylate et des chaînes alkyle	147
3.2.2.1. Première voie de synthèse envisagée et problèmes rencontrés	147
3.2.2.2. Autres voies pour synthétiser les alginates doublement modifiés.....	148
3.2.2.3. Conclusions	149
3.3. CONCLUSION	150
4. ESSAIS DE PHOTOPOLYMERISATION.....	150
4.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS ET ETUDES ENVISAGEES	150
4.2. ASPECT QUALITATIF	151
4.2.1. Matériel et méthodes.....	151
4.2.2. Résultats et discussion.....	151
4.3. ASPECT QUANTITATIF	153
4.3.1. Matériel et méthodes	153
4.3.2. Résultats et discussion.....	154
4.3.2.1. Etudes rhéologiques sur les dérivés obtenus avec le 2-chloroéthylméthacrylate..	154
4.3.2.2. Etudes rhéologiques sur les dérivés obtenus avec l'anhydride méthacrylique	155
5. CONCLUSION.....	156
6. BIBLIOGRAPHIE	159

Introduction

Introduction

Les polymères associatifs hydrosolubles sont le plus souvent des macromolécules amphiphiles, neutres ou chargées, constituées d'une majorité de segments hydrophiles et d'une faible proportion de segments hydrophobes. En milieu aqueux, de telles macromolécules sont capables de s'organiser, grâce à l'établissement d'interactions hydrophobes intra et/ou intermoléculaires entre les segments apolaires. Plus particulièrement, en régimes semi-dilué et concentré, cette organisation se traduit par la formation d'un réseau polymère tridimensionnel, réticulé physiquement, et conduit à l'obtention de solutions de viscosité élevée, voire d'hydrogels réversibles plus ou moins rigides.

De nombreux travaux de recherche sur des polymères amphiphiles associatifs à base de polysaccharides ont été menés au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (UMR CNRS-INPL 7568, Nancy). Des dérivés d'alginate de sodium, de hyaluronate de sodium et de pectine ont permis de développer nos connaissances aussi bien sur les techniques de préparation de ces dérivés amphiphiles que sur leurs propriétés spécifiques en milieu aqueux.

Depuis quelques années, les activités du Laboratoire se sont orientées vers l'utilisation des propriétés spécifiques des polysaccharides amphiphiles dans diverses applications biomédicales (pansements, vectorisation, biomatériaux...). Le travail présenté dans ce mémoire concerne l'application de tels polymères pour le traitement des pathologies ostéoarticulaires et a été effectué en collaboration avec le Laboratoire de Physiopathologie et de Pharmacologie Articulaires (UMR CNRS-UHP 7561, Faculté de Médecine, Nancy, Directeur Pr. P. Netter).

Les pathologies ostéoarticulaires, dont l'arthrose est la forme la plus répandue, se caractérisent par une dégradation progressive du cartilage au niveau des articulations, et aboutissent, à plus ou moins long terme, à la formation de lésions ostéochondrales irréversibles. En effet, le cartilage, une fois lésé, ne se répare pas spontanément, mais évolue vers un tissu de nature fibreuse, ne possédant plus les propriétés mécaniques et biologiques propres au cartilage sain. Chez le sujet atteint d'arthrose, l'apparition de ces lésions engendre une douleur intense et conduit progressivement à un enraidissement des articulations atteintes. Cette maladie touchant principalement les articulations de l'appareil locomoteur, elle constitue donc un véritable handicap physique.

La douleur et l'inflammation apparaissant lors d'une arthrose plus ou moins sévère peuvent être traitées par des antalgiques et des anti-inflammatoires. Par ailleurs, pour redonner une certaine

Introduction

mobilité à l'articulation atteinte, il est également possible de pratiquer une viscosupplémentation. Cette technique consiste à injecter une solution visqueuse dans la cavité articulaire, permettant de restaurer les propriétés rhéologiques du liquide synovial, altérées par l'inflammation. Malheureusement, de tels traitements ne permettent qu'un ralentissement du processus dégénératif de la maladie et ne constituent pas de réels remèdes pour la réparation des lésions cartilagineuses profondes.

C'est pourquoi de nombreuses recherches sont entreprises afin de concevoir un matériau implantable et biorésorbable, appelé plus généralement « biomatériau de comblement », capable d'interagir avec le cartilage lésé, de servir de tuteur aux chondrocytes, cellules responsables de la synthèse du cartilage, et de favoriser ainsi la production d'une nouvelle matrice cartilagineuse. Un tel biomatériau doit pouvoir non seulement assumer les exigences mécaniques liées au rôle de l'articulation dans l'appareil locomoteur mais également favoriser la régénération tissulaire. Il doit donc présenter des propriétés très spécifiques :

- Sur le plan biologique, un matériau de comblement doit être biocompatible, biodégradable, non toxique et non immunogène. En outre, il doit être suffisamment hydrophile et poreux pour permettre la recolonisation cellulaire.
- Sur le plan mécanique, il doit présenter les propriétés de dureté et de résistance se rapprochant autant que possible de celles du cartilage sain, afin de remplir les fonctions de ce dernier, tant que le tissu de réparation n'est pas totalement élaboré.
- Sur un plan purement pratique, un biomatériau de comblement doit être de texture maniable pour pouvoir être facilement implantable. Par ailleurs, il ne doit pas subir d'altération notable à la stérilisation.

Pour répondre aux exigences biologiques, notre choix pour l'élaboration d'un tel biomatériau s'est porté sur le hyaluronate de sodium. C'est un polysaccharide polyanionique omniprésent dans la cavité articulaire : c'est l'un des principaux constituants du cartilage et du liquide synovial. D'une part, il joue un rôle mécanique, puisqu'il assure l'intégrité de la matrice cartilagineuse et est responsable des propriétés viscoélastiques du liquide synovial. D'autre part, au sein de la matrice cartilagineuse, il influence la prolifération et l'activité de synthèse des cellules. En outre, il a déjà été utilisé dans le traitement de l'arthrose, sous forme de solutions aqueuses, pour la lubrification des articulations.

Introduction

Par conséquent, un biomatériau à base de hyaluronate devrait être totalement biocompatible et biorésorbable et pourrait présenter des propriétés biologiques facilitant la recolonisation par les chondrocytes et la synthèse du tissu cartilagineux.

Au niveau mécanique, ce matériau doit posséder des propriétés de fluide, afin d'être facilement implantable et d'épouser les contours de la lésion. Mais il doit également présenter des propriétés de solide, avec une certaine résistance mécanique, pour pouvoir jouer son rôle de tuteur dans la régénération de la nouvelle matrice cartilagineuse.

Le comportement en solution de dérivés amphiphiles de hyaluronate a été étudié lors d'un travail de thèse précédent : les propriétés trouvées à cette occasion se sont révélées appropriées à ces exigences. En effet, d'un point de vue mécanique, les hydrogels préparés sont suffisamment visqueux pour pouvoir être maintenus dans une lésion et leur caractère rhéofluidifiant les rend particulièrement malléables pour leur implantation. En outre, du point de vue biologique, l'étude *in vitro* a permis de mettre en évidence le caractère biocompatible et non cytotoxique de ces dérivés, et l'existence d'une certaine affinité des chondrocytes pour ces hyaluronates amphiphiles. Après implantation *in vivo* dans les lésions ostéochondrales de rat, les hydrogels jouent effectivement leur rôle de tuteur pour la recolonisation cellulaire et la synthèse d'un néotissu.

Cependant, ces hydrogels sont réversibles et se déstructurent lentement lorsqu'ils sont mis au contact avec les milieux aqueux. Lors de leur implantation dans le genou des rats, cette caractéristique ne s'est pas révélée gênante, dans la mesure où la lésion qui avait été traitée n'était pas soumise à un flux important de fluides biologiques. Les hydrogels ont ainsi conservé leurs propriétés mécaniques suffisamment longtemps pour assurer leur rôle de tuteur. Pour d'autres applications, et en particulier pour une utilisation dans certaines articulations chez l'homme, le contact avec les fluides biologiques risque d'être plus marqué et la stabilité structurale de l'hydrogel insuffisante pour qu'il puisse être maintenu dans la lésion.

Pour pouvoir améliorer la persistance de l'hydrogel après son implantation, et donc renforcer sa stabilité structurale, nous avons envisagé - et c'était l'objectif de cette thèse - d'associer, au sein du réseau polysaccharidique aqueux, des liaisons de réticulation chimique irréversibles aux interactions physiques hydrophobes. Pour pouvoir conserver les propriétés rhéofluidifiantes particulières des hydrogels associatifs, intéressantes pour l'implantation *in vivo*, nous avons délibérément choisi de limiter le taux de réticulant chimique.

Introduction

Dans le chapitre I, nous ferons un descriptif des différents types d'hydrogels obtenus à partir de polysaccharides, hydrogels physiques ou chimiques. Nous présenterons également l'intérêt de ces hydrogels dans l'ingénierie tissulaire et la réparation du cartilage, en donnant quelques exemples de biomatériaux de comblement existants.

La synthèse et la caractérisation des dérivés doublement modifiés à base de hyaluronate seront décrites dans le chapitre II. Le chapitre III sera consacré à l'étude du comportement des dérivés préparés, en régime semi-dilué, grâce à des méthodes rhéologiques. Compte-tenu de l'application biomédicale visée, nous évoquerons des questions relatives au maintien des propriétés rhéologiques des hydrogels lors de la stérilisation, ainsi que dans les conditions d'usage (milieu physiologique, 37°C).

Le chapitre IV traite des aspects biologiques de ce travail. Pour pouvoir évaluer l'influence de n'importe quel dérivé sur les chondrocytes, ces cellules sont cultivées en milieu tridimensionnel, dans des billes d'alginate de calcium, en présence du dérivé en question. Nous avons entrepris ce type d'étude afin d'évaluer les réponses biologiques données par les chondrocytes, en terme de viabilité, de prolifération cellulaire et de synthèse de composants matriciels, en présence des dérivés du hyaluronate.

L'ensemble des études effectuées, tant sur le plan physico-chimique que biologique, nous a permis de mieux appréhender les exigences liées à la conception de biomatériaux de comblement. Avant de conclure, nous discuterons d'une nouvelle voie d'élaboration de ces biomatériaux que nous avons commencé à explorer. Elle s'effectue toujours à partir de polymères doublement modifiés à base de hyaluronate de sodium, mais, dans cette approche, la réticulation chimique est obtenue *in situ*, directement dans la lésion, par photopolymérisation du polysaccharide modifié à la fois par des chaînes hydrophobes et par des groupements photosensibles. Cette nouvelle voie constitue l'une des perspectives majeures de notre travail et mérite, de ce fait, que les travaux préliminaires entrepris soient présentés.

Chapitre I

Etude bibliographique

1. INTRODUCTION

Certains matériaux, lorsqu'ils sont placés en milieu aqueux, sont capables de gonfler rapidement et de former des réseaux qui absorbent de grandes quantités d'eau, jusqu'à 1000 fois leur poids sec. De tels réseaux de gels aqueux sont appelés hydrogels, ces systèmes étant un état intermédiaire entre l'état solide et l'état liquide et se comportant comme un solide mou facile à déformer.

Depuis plusieurs décennies, les hydrogels font l'objet d'un nombre très important d'études tant sur le plan fondamental que sur celui de leurs applications. Depuis le développement de lentilles de contact à base d'hydrogel de poly(2-hydroxyéthylméthacrylate)¹, des hydrogels présentant des propriétés variées ont été préparés pour répondre aux modifications des conditions environnementales (pH, température, champ électrique, force ionique, sels, solvant, contrainte externe, lumière) et trouvent de nombreuses applications dans les domaines de la pharmacie, l'agriculture, la médecine, les biotechnologies...

Nous pouvons distinguer les gels physiques des gels chimiques. Les gels physiques ou réversibles sont des réseaux maintenus par enchevêtrements moléculaires, interactions ioniques, liaisons hydrogène ou associations hydrophobes, alors que les gels chimiques ou permanents sont des réseaux réticulés de façon covalente. Un gel physique est dit réversible car il peut être détruit par affaiblissement des interactions maintenant sa cohésion, en jouant sur différents paramètres (pH, température, concentration...).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons tout particulièrement aux hydrogels à base de polysaccharides. Après une description des divers types de polysaccharides utilisés pour la préparation des hydrogels, nous étudierons l'intérêt de ces hydrogels dans le domaine de la réparation du cartilage.

2. LES HYDROGELS A BASE DE POLYSACCHARIDES

Il existe un grand nombre de polysaccharides d'origine animale, végétale ou bactérienne capables de former des gels, soit de manière spontanée sous l'influence de paramètres extérieurs (pH, ions, température...), soit après modification chimique du squelette. Les polysaccharides possèdent, en effet, de nombreux groupements réactifs fonctionnalisables (hydroxyle, acide carboxylique, amine), ce qui permet d'envisager de nombreuses applications.

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux gels physiques qui peuvent être obtenus par enchevêtrements moléculaires, interactions ioniques, liaisons hydrogène, stéréocomplexation ou interactions hydrophobes. Dans une seconde partie, nous nous focaliserons sur les gels chimiques obtenus par différentes réactions.

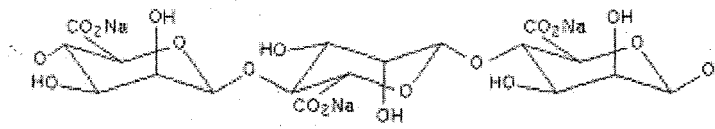
2.1. Les gels physiques

Les gels physiques peuvent être obtenus par enchevêtrements de chaînes macromoléculaires, mais, la plupart du temps, ce sont des gels dans lesquels les chaînes macromoléculaires sont réticulées entre elles par l'intermédiaire d'interactions ioniques, de liaisons hydrogène ou encore d'interactions hydrophobes. Un grand nombre de polysaccharides ont la particularité de former de tels gels, sous l'influence de paramètres extérieurs (ions, pH, température...), ou après modification chimique du squelette.

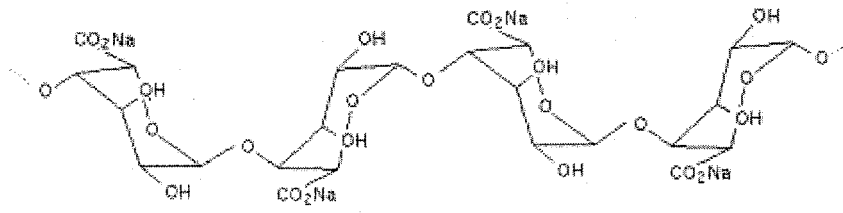
2.1.1. Réticulation par interactions ioniques

Des hydrogels physiques peuvent être formés par interactions ioniques. De manière générale, ces hydrogels sont obtenus par interactions entre un polysaccharide chargé (négativement ou positivement) et des ions de petite taille. Cependant, de nombreux hydrogels sont également obtenus par complexation d'un polyanion avec un polycation. De tels complexes sont appelés coacervats.

L'alginate, la pectine, le carraghénane et le chitosane sont des exemples de polysaccharides formant des gels physiques par interactions ioniques.



poly(acide mannuronique)



poly(acide guluronique)

Figure 1 : Structure des blocs $\beta(1\rightarrow4)$ D-mannuronate et $\alpha(1\rightarrow4)$ L-guluronate d'alginate de sodium

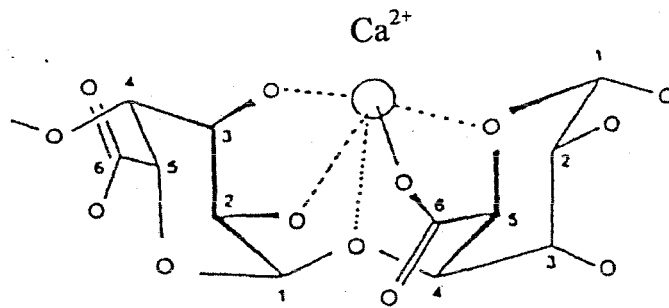


Figure 2 : Chélation des résidus guluronates de l'alginate par le calcium, d'après Smidsrod et Skjak-Braek⁶

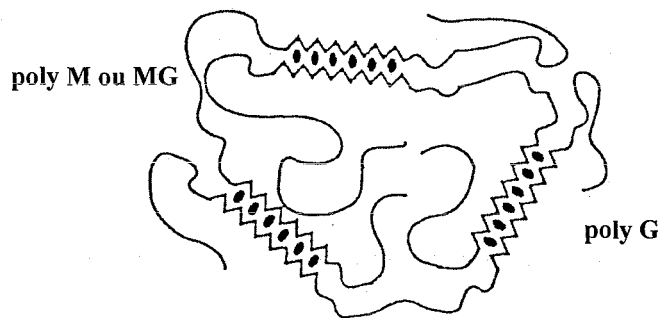


Figure 3 : Représentation schématique du modèle « boîte à œufs », d'après Rees⁷

2.1.1.1. Alginate

L'alginate est un polysaccharide polyanionique naturel, qui se trouve dans la paroi cellulaire de toutes les algues brunes. Il peut être extrait de certaines de ces algues brunes (*Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*) et peut également être produit à partir de bactéries (*Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*).

En 1955, Fischer et Dörfel² ont mis en évidence l'existence de deux acides uroniques dans la macromolécule d'acide alginique : l'acide β -D-mannuronique (M) et l'acide α -L-guluronique (G). Haug *et coll.*³ ont montré que les alginates sont constitués de ces deux monomères associés en 1 \rightarrow 4, selon un enchaînement irrégulier de blocs de trois types :

- un bloc homopolymère de résidus mannuronates –M-M-M-,
- un bloc homopolymère de résidus guluronates –G-G-G-,
- un bloc de résidus mannuronates et guluronates alternés –M-G-M-.

La figure 1 représente la structure de ces deux acides uroniques.

Les propriétés physico-chimiques des solutions et des gels d'alginate en milieu aqueux dépendent de leur structure, c'est-à-dire de la proportion de résidus mannuronates par rapport aux résidus guluronates (noté M/G) ainsi que du nombre et de la longueur des blocs MM, GG et MG^{4,5}.

Les alginates ont été largement étudiés pour leur propriété à former des gels en présence de cations divalents (gélification ionotropique)⁶. Ce phénomène de gélification est dû à la complexation, par les cations divalents, d'une partie des fonctions carboxylates et hydroxyles pouvant appartenir à des chaînes macromoléculaires différentes (Figures 2 et 3^{6,7}).

Suivant la force des interactions ioniques, le pouvoir chélatant et la taille des cations, un réseau tridimensionnel se forme et l'alginate gélifie. Les cations monovalents et Mg^{2+} ne provoquent pas la gélification de l'alginate. La force du gel dépend de la nature du cation, les gels forts étant obtenus avec Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} ⁸. D'autres cations tels que Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} peuvent former des gels avec l'alginate mais leur utilisation est limitée en raison de leur toxicité⁹.

Le principal inconvénient des gels d'alginate de calcium est leur faible stabilité en présence d'agents chélatants du calcium et en présence d'électrolytes non gélifiants dès lors que leur concentration devient importante. Pour augmenter cette stabilité, les gels d'alginate peuvent être renforcés par réticulation chimique.

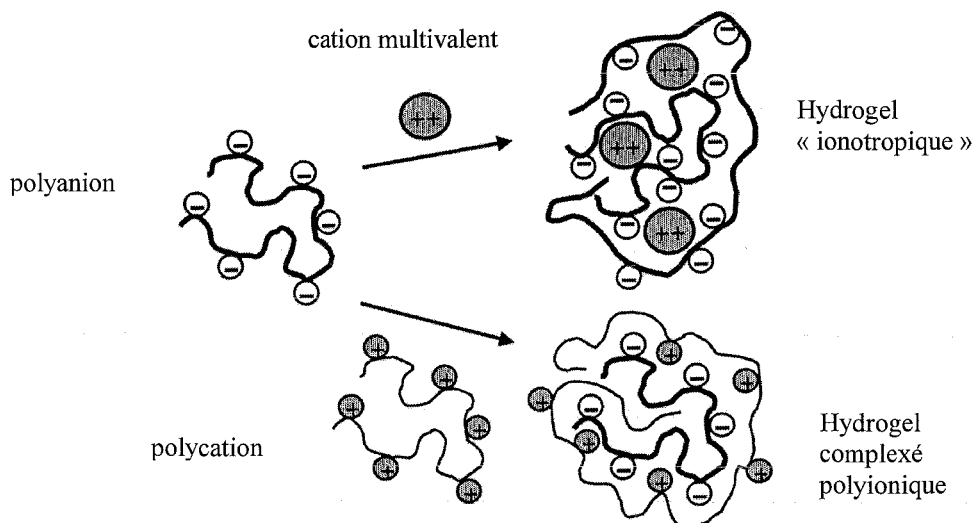


Figure 4 : Schéma de deux méthodes de formation d'hydrogels ioniques

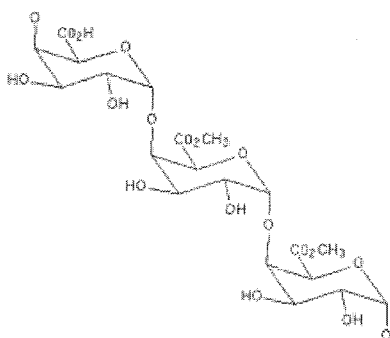


Figure 5 : Structure de la pectine

Type de pectines	Degré de méthylation DM	Gels	Processus
Pectines faiblement méthylées	< 45-50%	En présence de cations divalents, sauf Mg^{2+}	Interactions interchaînes : « egg-box », f(pH, concentration en cations divalents, DM, masse molaire du polymère) Thermoréversibles
Pectines hautement méthylées	> 50%	En milieu acide, sucré et par diminution de la température	Rapprochement des chaînes, f(extrait sec du milieu, pH, DM) Non thermoréversibles

Tableau 1 : Les différents processus de gélification pour les pectines

Parallèlement aux gels obtenus en présence de cations de petite taille, l'alginate peut aussi être complexé par un polycation : par exemple, en mélangeant de l'alginate avec de la poly-L-lysine, on peut obtenir un hydrogel complexe polyionique trouvant des applications dans la microencapsulation^{10,11}.

La figure 4 montre schématiquement deux voies d'obtention d'hydrogels physiques ioniques, à partir de l'alginate.

2.1.1.2. Pectine

Les pectines sont des macromolécules complexes et hétérogènes présentes dans la plupart des parois cellulaires des végétaux supérieurs. Les fruits et les légumes sont les matières premières les plus riches en ce composé. La majeure partie de la production de pectine est utilisée par l'industrie agroalimentaire comme agent gélifiant. Elle est constituée majoritairement d'un enchaînement d'acides D-galacturoniques liés en α (1→4) (Figure 5).

Les fonctions acides carboxyliques de la pectine se trouvent sous forme acide, salifiée (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...) ou encore estérifiée par du méthanol. Le degré de méthylation DM de la chaîne est défini comme le rapport du nombre de carboxylates méthylés au nombre total de groupements carboxyliques, et joue un rôle important sur les propriétés des pectines, notamment concernant le processus de gélification (Tableau 1).

2.1.1.3. Carraghénane

Le carraghénane est un polymère naturel extrait des algues rouges. C'est un polysaccharide linéaire constitué de molécules de galactose plus ou moins substitué par des groupements sulfate (Figure 6).

La chaîne est constituée de sous-unités appelées carrabioses comprenant deux galactoses liés par une liaison β (1→4). Ces carrabioses sont liés entre eux par des liaisons α (1→3). En outre, les galactoses sont soit estérifiés par des groupes sulfate soit porteurs d'un pont oxygène entre les carbones 3 et 6 (anhydrogalactose). La présence de groupes sulfate confère au carraghénane un caractère acide marqué. Les carraghénanes sont composés de plus de 1000 résidus galactoses, la probabilité de variations de structures est donc énorme.

Il existe trois principaux types de carraghénanes :

- le kappa-(κ)-carraghénane qui est un polysaccharide constitué de n unités de κ -carrabiose, présente des propriétés de gélifiant,
- le iota-(ι)-carraghénane crée des gels mous et malléables,
- le lambda-(λ)-carraghénane est un stabilisant et un épaississant.

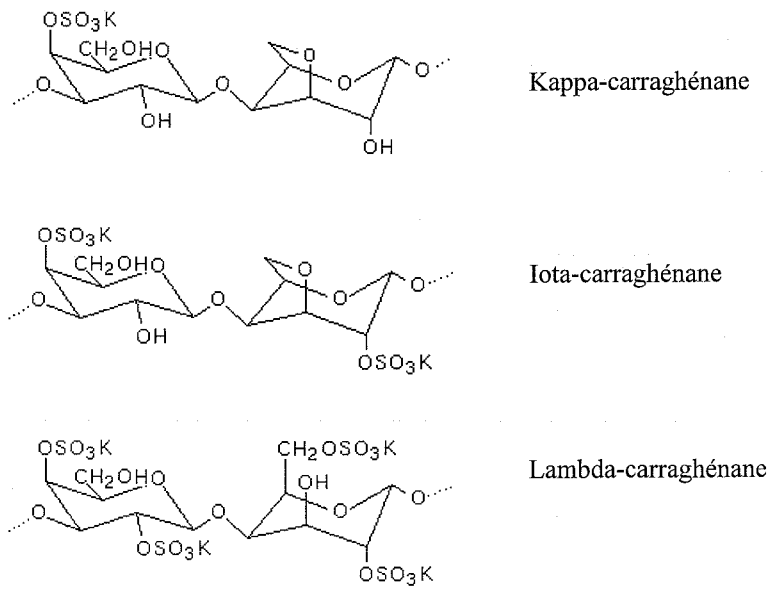
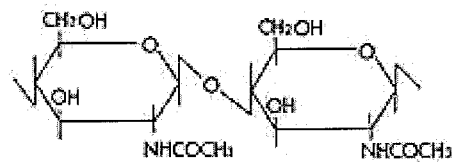
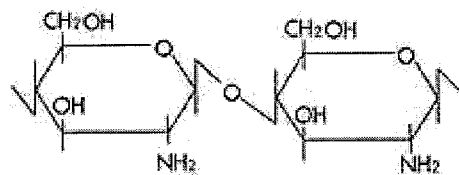


Figure 6 : Structure du carragénane



chitine



chitosane

Figure 7 : Structures de la chitine et du chitosane

Seuls les κ - et ι -carraghénanes ont la particularité de former un gel¹²⁻¹⁴ en présence de cations (K^+ et Ca^{2+}), lors du refroidissement de la solution. La formation de ce gel est liée à la présence d'unités anhydrogalactose dans les chaînes des κ - et ι -carraghénanes. En effet, le pont oxygène entre les carbones 3 et 6 du galactose bloque la conformation de l'anhydrogalactose et la chaîne macromoléculaire adopte une structure en hélice gauche. En présence de cations dans la solution, il y a aggrégation des chaînes hélicoïdales et formation d'un gel. Le λ -carraghénane ne possédant pas ce pont oxygène, il ne peut donc pas former d'hélice gauche et ne peut donc pas être à l'origine d'un gel.

La présence des cations dans la solution de carraghénane induit la formation d'un gel à une température qui dépend de la nature et de la concentration en cations.

En effet, les ions K^+ sont nécessaires à la gélification car ils permettent l'enroulement de deux hélices gauches en double hélice. Plus la concentration en K^+ est élevée, plus le gel est dense. Ainsi, les gels de κ -carraghénanes, obtenus en présence de K^+ uniquement, sont élastiques et transparents.

En revanche, l'addition d'ions Na^+ dans une solution de κ -carraghénanes compacte le gel et le rend cassant, alors qu'une quantité importante de Na^+ perturbe le processus de gélification et assouplit le gel.

Enfin, l'addition d'ions Ca^{2+} dans une solution de κ -carraghénanes augmente la rigidité du gel, tandis qu'une solution de ι -carraghénanes forme un gel très élastique et très cohérent en présence de Ca^{2+} .

2.1.1.4. Chitosane

La chitine est un polysaccharide naturel constituant la carapace des crustacés et des insectes. On la trouve également dans les champignons. C'est un polysaccharide linéaire constitué d'un enchaînement β (1 \rightarrow 4) d'unités glucosamine avec un degré élevé de N-acétylation.

Le chitosane, principal dérivé de la chitine, est obtenu par déacétylation en milieu alcalin (Figure 7) et est polycationique.

Les propriétés du chitosane dépendent de sa masse molaire et de la proportion en unités déacétylées. Le chitosane gélifie en présence d'anions divalents ou de polyanions.

Les contre-ions de faible masse molaire les plus utilisés sont le pyrophosphate, le tripolyphosphate, le tétrapolyphosphate, l'octapolyphosphate, l'hexametaphosphate, $[Fe(CN)_6]^{4-}$ et $[Fe(CN)_6]^{3-}$. La gélification est due à la formation de réticulation inter- et intra-moléculaire par l'intermédiaire des polyanions.

Des polyanions de masse molaire élevée sont également utilisés tels que l'acide polyaldéhydecarbonique et le poly(1-hydroxy-1-sulfonate-2-propène), ainsi que des contre-ions hydrophobes tels que l'octylsulfate, le laurylsulfate, le dioctylsulfosuccinate. Dans ce dernier cas, les interactions hydrophobes contribuent également au mécanisme de gélification.

Tout comme l'alginate avec les polycations, le chitosane peut être réticulé physiquement avec des polyanions par formation d'un coacervat, par exemple avec la chondroïtine sulfate, comme matrice pour la réparation du cartilage^{15,16}, avec le dextrane sulfate ou l'acide polyphosphorique¹⁷.

2.1.2. Réticulation par liaisons hydrogène

Dans ce paragraphe, nous allons voir qu'il est possible de former des hydrogels par modification du pH et de la température. Ces modifications vont avoir une influence sur les associations qui existent entre les chaînes de polymères, qui, pour ce type de réticulation, sont souvent neutres et porteurs de groupements -OH.

2.1.2.1. Les gels pH-réversibles

Les polymères hydrosolubles chargés peuvent former des gels réversibles par modification du pH de la solution. Le changement de pH modifie les charges du polymère, les forces électrostatiques intermoléculaires répulsives vont ainsi être éliminées et des liaisons hydrogène interchaînes vont se créer aboutissant à la formation d'un hydrogel.

Le poly(acide acrylique) est un exemple de ce type de gels. Le chitosane forme également un hydrogel physique par modification du pH : il est soluble dans l'eau à un pH inférieur à 6,2 et les solutions de chitosane montrent une transition sol-gel autour de pH=7, quand le pH varie d'un pH légèrement acide à un pH neutre.

2.1.2.2. Les gels thermoréversibles

Les gels thermoréversibles, dont les propriétés varient par modification de la température, peuvent être préparés avec des polymères relativement courants.

La plupart des solutions aqueuses de polymères naturels forme une phase gélifiée quand la température diminue. C'est le cas de la gélatine (protéine préparée par hydrolyse partielle du collagène) et de polysaccharides tels que l'**agarose**, le **carrhagénane** et le **gellane**.

L'agarose est un polysaccharide extrait des algues marines rouges, c'est un copolymère alterné de 3,6-anhydro-L-galactose en liaisons α (1→4) et de D-galactose en liaisons β (1→3) (Figure 8).

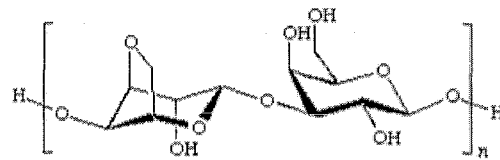


Figure 8 : Structure de l'agarose

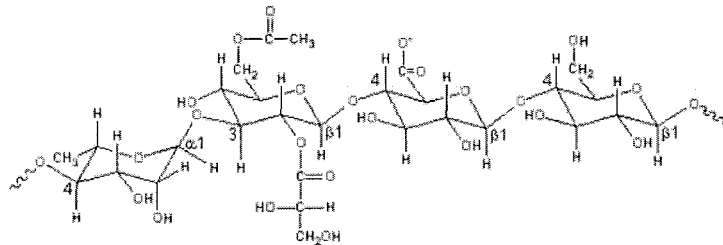


Figure 9 : Structure du gellane

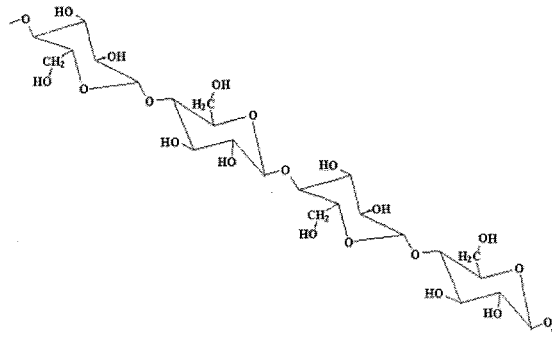


Figure 10 : Structure de la cellulose

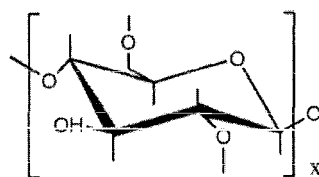
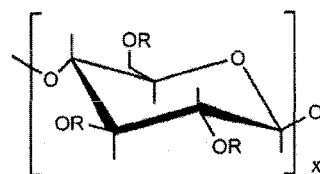


Figure 11 : Structure de la méthylcellulose



R = CH₃ ou CH₂CH(CH₃)OH ou H

Figure 12 : Structure de l'hydroxypropylméthylcellulose

Le gellane est un polysaccharide d'origine bactérienne. Il est composé de la répétition d'une unité tétrasaccharidique linéaire contenant des motifs glucose, acide guluronique et rhamnose en proportion molaire 2 : 1 : 1 (Figure 9).

Ces polymères adoptent en solution une conformation en spirales non ordonnées. En refroidissant, les chaînes s'organisent en adoptant une structure partielle en hélice. L'aggrégation de ces hélices forme les jonctions physiques permettant la formation du gel.

En effet, l'augmentation de la température affaiblit les liaisons hydrogène existant entre les chaînes de polymère, tandis qu'un refroidissement permet de les reformer, amenant ainsi à la formation d'un gel.

En opposition, certains **dérivés de la cellulose** ne répondent pas à ce mécanisme de gélification. La cellulose est le polysaccharide naturel le plus abondant, composée de molécules d'anhydroglucopyranoses liées en β (1 \rightarrow 4) (Figure 10).

Chaque molécule d'anhydroglucopyranose a trois groupes hydroxyle qui ont une réactivité différente et qui peuvent être substitués.

A cause du nombre important de fonctions hydroxyles présentes sur son squelette et des liaisons hydrogène fortes qui en résultent, les chaînes sont ordonnées à un point tel que la cellulose présente un caractère cristallin et une insolubilité dans l'eau et dans les solvants organiques.

Pour réussir à préparer des hydrogels à base de cellulose, il est nécessaire de modifier certaines fonctions hydroxyles de ce polysaccharide. La méthylcellulose (Figure 11) et l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC, figure 12) sont des exemples typiques de ces dérivés formant des hydrogels thermosensibles.

A faible concentration (1-10%), les solutions aqueuses de ces dérivés de cellulose sont liquides à basse température, mais forment des gels à haute température.

Les solutions de méthylcellulose forment des gels opaques entre 40°C et 50°C^{18,19}, tandis que la HPMC montre une température de transition entre 75°C et 90°C. Ces températures de transition de phase peuvent être abaissées par modifications physique ou chimique. L'utilisation d'une solution saline NaCl diminue la température de transition des solutions de méthylcellulose à 32-34°C. En réduisant le taux de substitution en hydroxypropylméthyl de la HPMC, la température de transition peut être diminuée à 40°C.

La gélification de ces solutions est due à des interactions hydrophobes entre les molécules substituées par des groupements méthoxy et HPM. A basse température, les macromolécules sont hydratées et il y a de très faibles interactions polymère-polymère, si ce n'est un simple enchevêtrement. Quand la température augmente, les polymères perdent leur eau d'hydratation, ce

qui renforce les associations polymère-polymère. Le système s'approche alors d'une structure de réseau.

Cela revient à dire que l'augmentation de la température a tendance à affaiblir les liaisons hydrogène existant entre les chaînes de polymères (tout comme dans le cas de l'agarose et du gellane), au profit d'interactions hydrophobes rendues possibles par la présence de groupements méthoxy et HPM sur le squelette polysaccharidique.

Cette transformation sol-gel est très intéressante pour des applications nécessitant une gélification *in situ*, comme par exemple pour des tuteurs en ingénierie tissulaire²⁰.

On peut aussi obtenir des hydrogels thermosensibles à partir du **chitosane**. En effet, Chenite *et coll.*^{21,22} ont développé une nouvelle approche pour produire des solutions neutres thermosensibles basées sur des combinaisons chitosane/sel de polyol. A un pH de 7,2, les solutions de chitosane deviennent thermosensibles par l'addition de sels de polyol. Ainsi, en présence de β -glycérolphosphate, les solutions de chitosane restent liquides en-dessous de la température ambiante et vont, rapidement, former un gel par chauffage. La température à laquelle se passe la transition sol/gel diminue quand le degré de déacétylation du chitosane augmente²³.

La solubilité à basse température est due à l'hydratation du chitosane promue par le glycérolphosphate. Par chauffage, les chaînes de chitosane perdent leur eau d'hydratation, les liaisons entre les chaînes peuvent se former et provoquer la gélification. Trois types d'interactions peuvent s'établir^{22,23}:

- Attraction électrostatique entre les groupements ammonium du chitosane et les groupements phosphate du glycérolphosphate,
- Liaisons hydrogène entre les chaînes de polymères dues à la réduction de la répulsion électrostatique, après neutralisation de la solution de chitosane avec le sel de phosphate,
- Interactions hydrophobes chitosane/chitosane.

Le système chitosane/glycérolphosphate a été évalué pour des applications pharmaceutiques^{23,24}, notamment pour des applications de libération de médicaments, et dans le domaine biomédical pour la réparation du cartilage²⁵⁻²⁷.

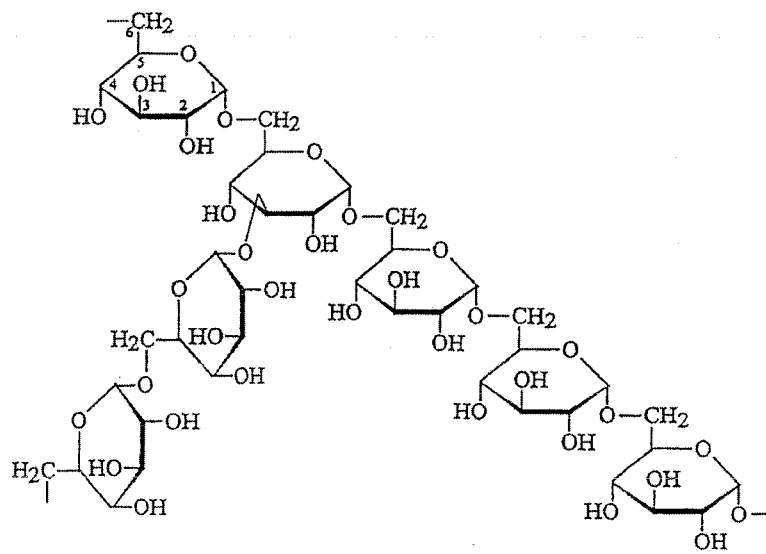


Figure 13 : Structure du dextrane

2.1.3. Réticulation par stéréocomplexation

Le dextrane est un polysaccharide synthétisé à partir de saccharose par des microorganismes. Pour la production commerciale du dextrane, la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* est la plus couramment utilisée. Le dextrane est constitué d'un enchaînement α (1 \rightarrow 6) d'unités glucopyranose (Figure 13).

Pour la plupart de ses applications, en particulier la vectorisation de principes actifs, le dextrane doit être préalablement fonctionnalisé via ses groupes hydroxyle. Les exemples d'hydrogels physiques obtenus à partir du dextrane sont très peu nombreux. En général, le dextrane est réticulé pour former des hydrogels chimiques.

Des copolymères dextrane-g-poly(acide lactique) peuvent être obtenus par réaction d'estérification entre le dextrane et des oligomères stéréoréguliers de poly-(D,D)-acide lactique et poly-(L,L)-acide lactique²⁸. Les deux polymères greffés sont dissous séparément dans l'eau. Le mélange de ces deux solutions provoque la formation d'un gel à température ambiante. Ces hydrogels physiques sont créés par stéréocomplexation des greffons poly-(L,L)-acide lactique et poly-(D,D)-acide lactique. L'association de deux copolymères de stéréorégularité opposée permet d'éviter l'encombrement stérique entre chaînes et d'obtenir des hydrogels plus compacts et plus forts que lorsque la stéréorégularité n'est pas contrôlée. Le gel obtenu est thermoréversible, avec une température de transition se situant autour de 80°C. Ces différents hydrogels ont été préconisés pour la vectorisation de protéines.

2.1.4. Réticulation par introduction de motifs hydrophobes

On a déjà vu dans le paragraphe 2.1.2 que la présence de groupements hydrophobes sur des polysaccharides peut contribuer à la formation d'hydrogels physiques (pectines, HPMC, méthylcellulose).

Un certain nombre de polysaccharides tels que le dextrane, le hyaluronate ou le pullulane ne gélifient pas de manière spontanée en présence d'ions ou sous l'influence de la température ou du pH. Pour former des hydrogels à partir de ces polysaccharides, une solution consiste à les modifier chimiquement, par exemple en leur greffant des groupements hydrophobes.

En effet, les polysaccharides forment des solutions de viscosité plus ou moins élevée selon leur concentration dans l'eau et le degré d'enchevêtrement des chaînes polymères. La viscosité de ces

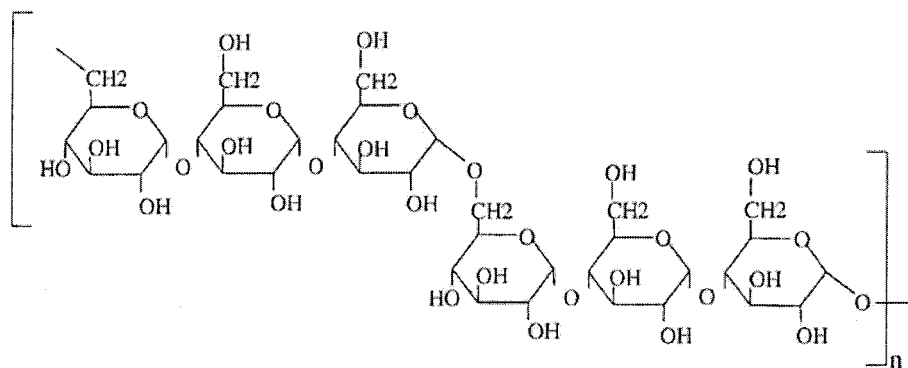


Figure 14 : Structure du pullulane

solutions aqueuses peut être considérablement augmentée par la fixation de groupes hydrophobes sur le squelette polysaccharide grâce à la mise en place d'interactions hydrophobes intra- et intermoléculaires. En solution diluée, les chaînes macromoléculaires de ces polymères amphiphiles sont éloignées les unes des autres et en général seules les interactions hydrophobes intrachânes se mettent en place. En régime semi-dilué, il existe une concentration en polymère à partir de laquelle les chaînes macromoléculaires sont suffisamment proches pour créer des interactions interchaînes et la viscosité du milieu augmente très nettement par rapport à celle du polymère précurseur à la même concentration. Ce phénomène s'intensifie avec la concentration, jusqu'à la formation d'un réseau tridimensionnel qui s'apparente à un gel physique. La nature chimique des groupements hydrophobes immobilisés, leur taux de fixation et leur répartition le long de la chaîne macromoléculaire influencent les propriétés physico-chimiques des polymères amphiphiles et donc leur aptitude à former des hydrogels.

Comme exemples de polysaccharides décrits dans la littérature pour la préparation d'hydrogels réticulés par interactions hydrophobes, nous pouvons citer le pullulane, le carboxyméthylcurdlane, le chitosane, le hyaluronate, l'alginate...

2.1.4.1. Pullulane

Le pullulane est un polysaccharide neutre, hydrosoluble, synthétisé par la levure *Aureobacidium pullulans* (ou *Pullaria pullulans*). Il se compose d'une chaîne macromoléculaire linéaire flexible formée d'unités glucoses liées en α (1→4) qui sont incluses dans des unités maltotriose liées en α (1→6) (Figure 14).

De par ses propriétés, le pullulane trouve de nombreuses applications. C'est un excellent adhésif, épaississant, stabilisant et agent de recouvrement ; il présente des propriétés non irritantes, non toxiques et une perméabilité à l'oxygène sous forme de films, d'où son utilisation dans les industries biotechnologiques, pharmaceutiques et autres.

Le pullulane seul ne forme pas d'hydrogel de manière spontanée. En revanche, le pullulane hydrophobisé forme des réseaux physiques.

Bataille *et coll.*²⁹ ont élaboré des polymères amphiphiles associatifs à partir du pullulane, en fixant des fonctions carboxyliques sur le polymère et en les modifiant par ajout de chaînes grasses (en C₁₆). Glinel *et coll.*³⁰ ont étudié la synthèse et les propriétés en solution de dérivés perfluorés du pullulane. Ces deux études décrivent l'obtention de réseaux tridimensionnels dans certaines conditions (salinité, concentration en polymère, taux de substitution en C_n...).

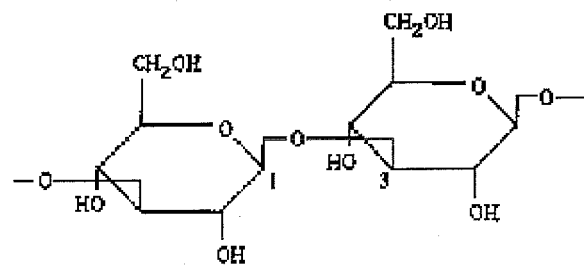


Figure 15 : Structure du curdlane

Des carboxyméthylpullulanes substitués par des chaînes alkyle en C₈ ont également été synthétisés et caractérisés en régime dilué. On observe que les interactions polymère-polymère augmentent avec le degré de substitution en C₈ : à faible taux de greffage (inférieur à 20 chaînes alkyle par unité anhydroglucose), les espèces présentes en solution sont composées de chaînes isolées, alors qu'à fort taux de greffage, il se forme des associations hydrophobes intramoléculaires³¹.

L'équipe de Sunamoto a étudié la formation d'hydrogels à base de pullulane hydrophobisé par fixation de cholestérol³². En régime dilué, les chaînes de polymères s'associent par réticulation physique. Lorsque la concentration en polymère augmente, les auteurs observent une augmentation rapide de la viscosité et, finalement, la formation d'un gel macroscopique constitué de nanogels contenant des microdomaines hydrophobes. L'ajout de tensioactif au système précédent en milieu dilué permet d'obtenir directement un macrogel. A titre indicatif, il est également possible d'obtenir des gels associatifs thermosensibles à base de pullulane modifié à la fois par le cholestérol et par du poly(N-isopropylamide)³³.

2.1.4.2. Carboxyméthylcurdlane

Le curdlane est un polymère extracellulaire produit par fermentation microbienne (*Alcaligenes faecalis*). C'est un polysaccharide linéaire composé de β (1 \rightarrow 3) D-glucose (Figure 15).

Le curdlane possède des zones de jonction composées de triples hélices parallèles, formant une conformation rigide neutre, les chaînes étant associées par des liaisons hydrogène. Le curdlane semble avoir un effet inhibiteur contre l'infection du HIV et une activité anti-coagulante du sang, il montre une faible toxicité *in vivo* et *in vitro*. Le carboxyméthylcurdlane montre de fortes propriétés anti-tumorales et est utilisé comme additif dans l'industrie alimentaire.

Des nanoparticules d'hydrogels ont été obtenues à partir du carboxyméthylcurdlane substitué par de la sulfonyleurée hydrophobe³⁴. Ce dérivé a une forte tendance à s'aggréger dans l'eau (pH neutre), en raison d'interactions entre groupements phényle et hexyle, et de liaisons hydrogène. La libération de médicaments anti-tumoraux de ces nanoparticules est contrôlée par le degré de modification hydrophobe et la quantité de médicament encapsulé.

2.1.4.3. Chitosane

Il est possible d'obtenir du chitosane hydrophobisé, en substituant ce polysaccharide tout d'abord par du glycol (réaction sur les fonctions -CH₂OH du chitosane) puis par des chaînes alkyle en C₁₆ (réaction sur les fonctions -NH₂ du chitosane). En milieu aqueux, ces chaînes s'assemblent en vésicules polymères monolamellaires en présence de cholestérol³⁵. Ces vésicules sont

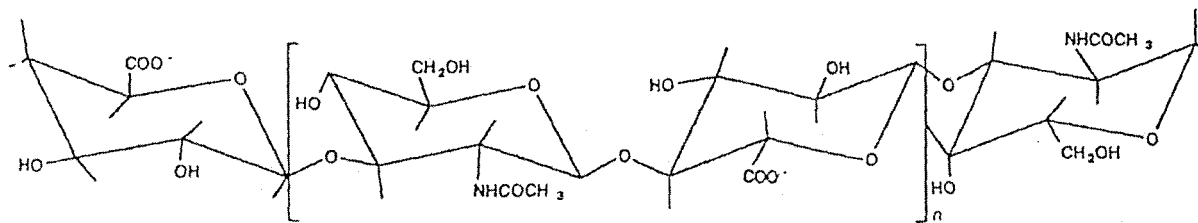


Figure 16 : Structure du hyaluronate de sodium

biocompatibles, hémocompatibles et capables d'encapsuler des médicaments hydrosolubles. La lyophilisation de ces matériaux permet l'obtention d'éponges qui sont proposées pour la libération contrôlée de médicaments³⁶.

Le chitosane peut être modifié par greffage de poly(acide lactique) et de poly(acide glycolique). Ces chaînes latérales polyesters donnent naissance à des interactions hydrophobes dans l'eau³⁷. Un gonflement réversible des matériaux est observé quand le pH augmente de 2,2 à 7,4. Au pH le plus bas, les groupements amine sur le squelette polysaccharidique se protonent, provoquant une répulsion de charge, et un gonflement maximal du gel est observé. Le gonflement maximal sous la forme protonée dépend des teneurs poly(acide glycolique)/poly(acide lactique).

Kjoniksen *et coll.* ont préparé du chitosane amphiphile en modifiant ses fonctions amine par un aldéhyde portant 12 carbones³⁸.

Récemment, des dérivés de chitosane ont été préparés par fixation de lactose et de groupements alkyle sur les fonctions amine du chitosane, avec le borohydrure de potassium. Les hydrogels obtenus ont une hydrophobie modulable et peuvent être utilisés dans le domaine biomédical³⁹.

2.1.4.4. Hyaluronate

Le hyaluronate de sodium est un polysaccharide présent dans de nombreux tissus conjonctifs, chez l'ensemble des vertébrés. Les principales formes de hyaluronane commercialisées sont extraites de crête de coq, de cordon ombilical ou d'humeur vitreuse. L'acide hyaluronique peut également être obtenu par fermentation à partir de bactéries *Streptococcus zooemidemicus*. Ce polysaccharide est composé d'un enchaînement linéaire non ramifié de motifs disaccharidiques constitués d'acide D-glucuronique lié en β (1 \rightarrow 3) à la N-acétyl- β -D-glucosamine. Les motifs sont associés les uns aux autres en β (1 \rightarrow 4) (Figure 16).

Des dérivés amphiphiles de hyaluronate de sodium ont été préparés au laboratoire en greffant des chaînes alkyle longues (12 ou 18 carbones) sur le squelette polysaccharidique^{40,41}. Les dérivés obtenus forment des hydrogels en solution aqueuse et en milieu salin, avec des propriétés dépendant entre autres de la nature de la chaîne greffée et du taux de substitution. L'application visée pour ces hydrogels concerne la réparation du cartilage⁴².

La Société Fidia a déposé un nombre important de brevets sur des dérivés amphiphiles d'acide hyaluronique. Les hydrogels obtenus à partir de ces dérivés sont préconisés dans le domaine biomédical : traitement de tumeurs⁴³, traitement pour la réparation du cartilage^{44,45} ...

2.1.4.5. Autres polysaccharides

D'autres polysaccharides peuvent être modifiés chimiquement pour obtenir des dérivés amphiphiles, dont voici quelques exemples.

Des hydrogels de dérivés amphiphiles de pectine ou d'alginate ont été préparés en fixant des chaînes C₁₂, C₁₆ et C₁₈ sur le squelette polymère^{40,41,46-48}. Dans le cas de la pectine, les chaînes apolaires ont été associées au squelette polymère par des liaisons esters et/ou des liaisons ioniques. Des dérivés amphiphiles de cellulose ont été préparés par modification chimique de l'hydroxyéthylcellulose et de l'hydroxypropylcellulose par le biais de leurs fonctions hydroxyles. Les segments hydrophobes fixés peuvent être soit des chaînes hydrocarbonées, soit des chaînes perfluorées^{49,50}.

Des hydroxypropylguars modifiés ont été obtenus par réaction d'époxyalkyles de 22 à 29 carbones avec les groupements alcool du polymère⁵¹.

2.2. Les gels chimiques

Les gels chimiques sont des réseaux réticulés de manière covalente. Ils ne se dissolvent ni dans l'eau, ni dans les solvants organiques, à moins que les liaisons ne soient rompues. En ce qui concerne les hydrogels chimiques à base de polysaccharides, la plupart ont été préparés par photopolymérisation de macromonomères (obtenus par fixation d'un monomère sur le squelette du polysaccharide) ou par réticulation à l'aide de réactifs multi-fonctionnels.

2.2.1. Réticulation par photopolymérisation

Des hydrogels réticulés chimiquement peuvent être formés par polymérisation radicalaire de polymères hydrosolubles portant des groupements photopolymérisables. La photopolymérisation peut être réalisée *in vivo* ou *in vitro* en présence de photoamorceurs en utilisant la lumière visible ou ultraviolette. Elle permet de faire de la polymérisation radicalaire d'une manière rapide et contrôlée dans des conditions ambiantes ou physiologiques. Comme exemples de polysaccharides modifiés pouvant former des hydrogels chimiques par photopolymérisation, nous décrivons les expériences effectuées avec le dextrane et l'acide hyaluronique.

2.2.1.1. Dextrane

Le dextrane est souvent utilisé pour former des hydrogels dégradables et de nombreuses recherches sur le dextrane photopolymérisable ont été effectuées.

Dans une première approche, Edman *et coll.*⁵² ont fait réagir le dextrane dissous dans l'eau avec du glycidylacrylate. L'hydrogel est formé après l'addition d'un mélange amorceur N,N,N',N'-tétraméthylène-diamine et peroxydisulfate d'ammonium dans une solution aqueuse du dérivé du dextrane contenant du N,N-méthylènebisacrylamide. La synthèse étant réalisée en milieu aqueux, le degré de modification est très faible et difficile à contrôler, à cause de l'hydrolyse du glycidylacrylate avant et après réaction avec le polysaccharide.

Une alternative a été trouvée par l'équipe de Hennink pour synthétiser un dérivé de dextrane portant un groupement méthacrylate^{53,54}. Le dextrane est dissous dans un solvant aprotique (DMSO), la modification avec le glycidylméthacrylate est catalysée par la 4-(N,N-diméthylamino)pyridine, le degré de modification est entièrement contrôlé. L'hydrogel est formé dans les mêmes conditions d'amorçage que pour les travaux d'Edman *et coll.*⁵².

Les groupements (méth)acrylate peuvent être fixés sur les polymères hydrosolubles en utilisant le chlorure de (méth)acryloyle^{55,56}, l'anhydride (méth)acrylique⁵⁷, ou le bromure de bromoacétyle et l'acrylate de sodium⁵⁸.

Un dérivé de dextrane photopolymérisable a été obtenu par réaction du dextrane avec de l'anhydride maléïque⁵⁹. Ces dérivés forment des hydrogels par polymérisation aux rayons UV des groupements vinyliques ($\lambda=360\text{nm}$, pendant 2 heures). L'amorceur utilisé est le 2,2'-diméthoxy-2-phényl acétophénone dissous dans la N-méthylpyrrolidone. Ces gels ne sont pas dégradables dans des conditions physiologiques (sauf s'ils sont hydrolysés de manière enzymatique). Leur taux de gonflement dans l'eau dépend fortement du pH, à cause de la présence des groupements carboxylates.

Une autre méthode pour obtenir des hydrogels chimiques à base de dextrane a été mise au point par Zhang *et coll.*⁶⁰. Ils ont modifié le dextrane avec un groupement photopolymérisable, soit le chlorure d'acryloyle, soit l'isocyanate d'allyle. Ces dérivés sont dissous dans la diméthylformamide avec, d'une part, un macromonomère diacrylé de poly-(D,L)-acide lactique PLA et, d'autre part, l'amorceur, la 2,2'-diméthoxy-2-phényl acétophénone. Un réseau est obtenu par polymérisation aux rayons UV ($\lambda=365\text{nm}$, 8W, pendant 3 heures). Le gonflement des gels

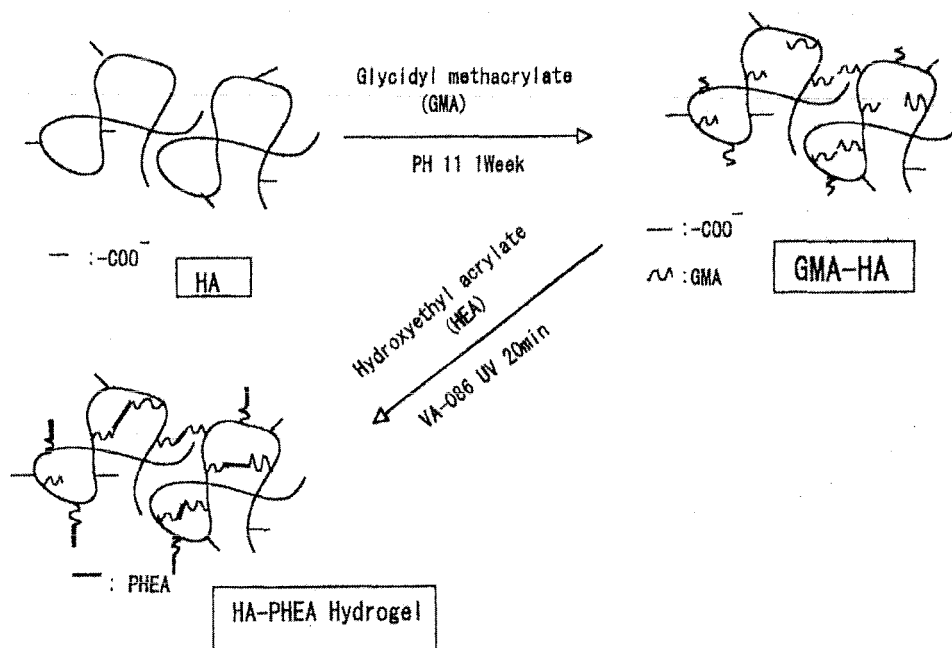


Figure 17 : Schéma de préparation des hydrogels HA-PHEA, d'après Yonese et coll.⁶²

dépend du rapport dextrane/PLA dans le réseau, du degré de modification en groupements photopolymérisables et du temps d'illumination.

Des dextrans modifiés par des groupements méthacrylate et par le poly(N-isopropylacrylamide) forment des hydrogels sensibles à la fois à la lumière, à la température et au pH et partiellement biodégradables⁶¹. Ces hydrogels sont obtenus par irradiation UV ($\lambda=365\text{nm}$, 8W, pendant 22 heures), après avoir mélangé le dextrane modifié au poly(N-isopropylacrylamide) dans l'eau, et avoir ajouté la 2,2'-diméthoxy-2-phényl acétophénone (5% m/m dans la N-méthylpyrrolidone).

2.2.1.2. Hyaluronate

Des recherches concernant l'obtention d'un gel chimique de hyaluronate par photopolymérisation ont été réalisées en parallèle à celles déjà décrites pour le dextrane.

Des hydrogels ont été obtenus par photopolymérisation d'un mélange de deux polymères : un hyaluronate substitué par du glycidylméthacrylate et l'hydroxyéthylacrylate. Le photoamorceur utilisé est le 2,2'-azobis[2-méthyl-N-(2-hydroxyéthyl)-propionamide], la lampe étant une lampe Hg ($\lambda=253,7\text{ nm}$, 400W, pendant 20 minutes) (Figure 17). Ces hydrogels peuvent être préparés dans une large gamme de composition, permettant des propriétés de gonflement et de diffusion très variées⁶².

Les hydrogels préparés par photopolymérisation d'un hyaluronate substitué par du glycidylméthacrylate sont préconisés pour des applications biomédicales (libération de protéines, cicatrisation, tuteur en ingénierie tissulaire, régénération de tissus vocaux)^{63,64}.

Le hyaluronate et l'alginate substitués par des groupements méthacrylate (anhydride méthacrylique) forment également des hydrogels après photopolymérisation ($\lambda=514\text{ nm}$, pendant 30 secondes). L'amorceur est un mélange d'éosine Y et de triéthanolamine dans de la 1-vinylpyrrolidone (Figure 18). Cette étude montre la possibilité de formation d'hydrogels *in situ*⁶⁵.

Des hydrogels à base de hyaluronate ont également été préparés par photopolymérisation d'esters méthacryliques fixés sur les groupements carboxyliques. Le photoamorceur utilisé est la 4-(2-hydroxyéthoxy)phényl-(2-hydroxy-2-propyl)cétone, la photopolymérisation est faite sous irradiation UV ($\lambda=365\text{nm}$, 22 mW/cm², pendant 1 minute). Un copolymère poly(éthylène glycol)

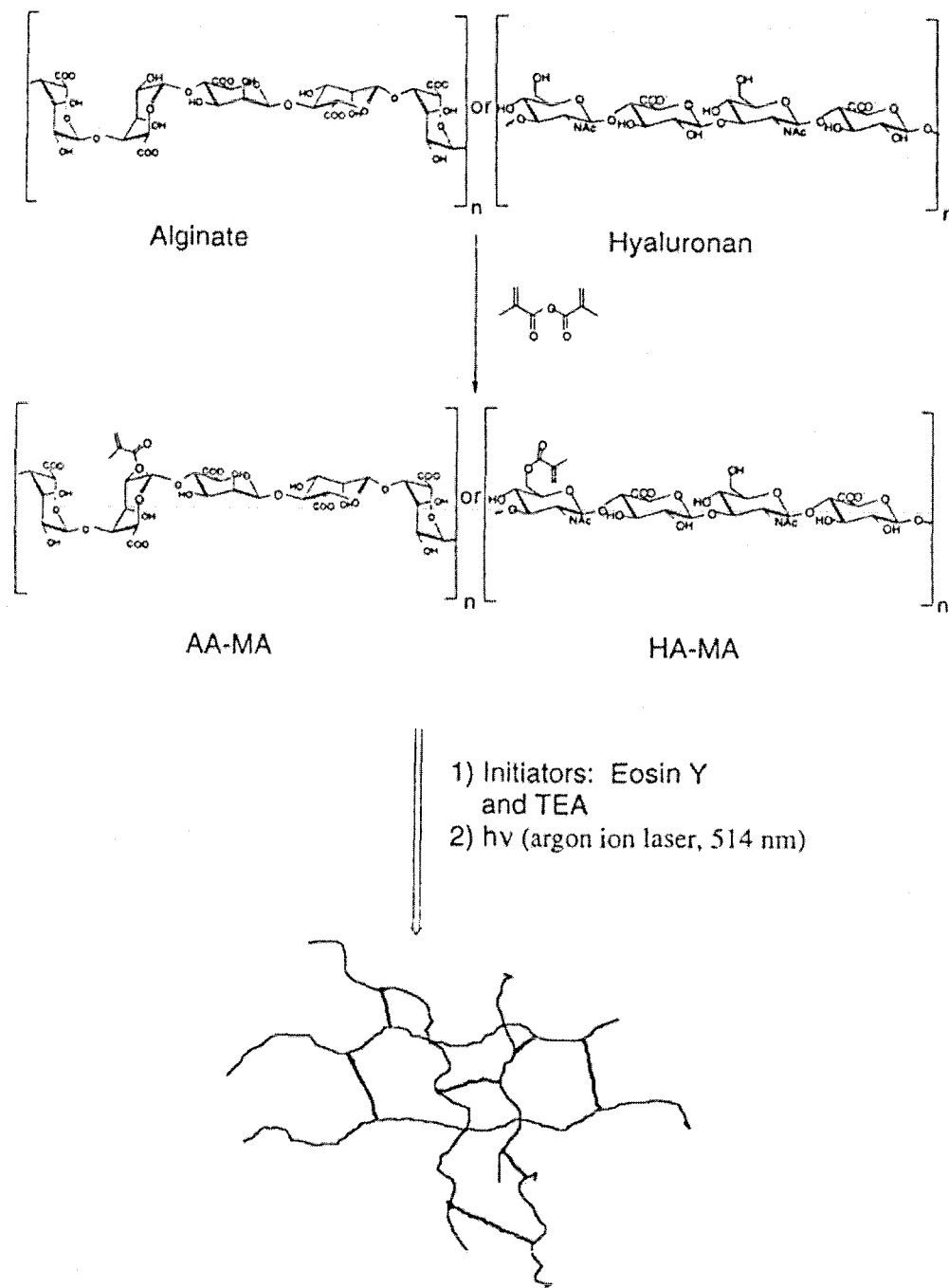


Figure 18 : Modification par le méthacrylate et photopolymérisation de l'alginate et du hyaluronate modifiés, d'après Grinstaff⁶⁵

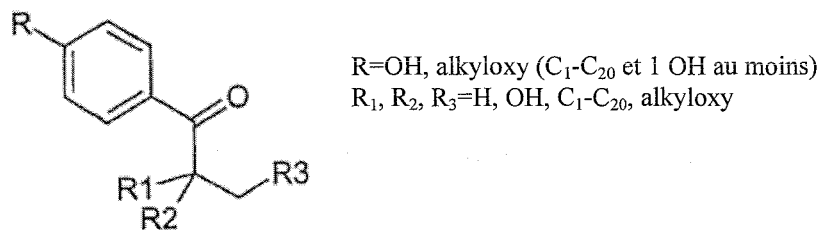


Figure 19 : Dérivés de propiophénone utilisés pour la photopolymérisation de HA modifiés⁶⁷

fonctionnalisé en diacrylate / dérivé du hyaluronate a été synthétisé, afin d'améliorer le module élastique et le comportement de gonflement des gels de hyaluronate⁶⁶.

La Société Fidia a également travaillé sur des hydrogels chimiques à base de hyaluronate obtenus par photopolymérisation. Bellini *et coll.* ont modifié ce polysaccharide avec des dérivés de propiophénone (Figure 19). Après exposition, pendant 3 à 15 minutes, à $\lambda=365\text{nm}$, les hyaluronates partiellement estérifiés ont donné naissance à un système tridimensionnel trouvant des applications biomédicales⁶⁷.

D'autres polysaccharides ont été modifiés pour préparer des hydrogels par photopolymérisation :

- le chitosane modifié par des groupements azide et lactose qui est potentiellement utilisable en tant qu'adhésif tissulaire⁶⁸,
- la chondroïtine sulfate modifiée par des groupements méthacrylate (réaction avec le glycidylméthacrylate)⁶⁹,
- l'agarose modifiée par des groupements méthacrylate (réaction avec l'anhydride méthacrylique)⁷⁰.

2.2.2. Réticulation par réaction entre groupements fonctionnels

Les polysaccharides doivent leurs propriétés de solubilité à la présence de groupements fonctionnels (principalement hydroxyle, acide, amine) qui peuvent aussi être utilisés pour la formation d'hydrogels. Des liaisons covalentes entre les chaînes de polymère peuvent être établies par la réaction de ces groupements fonctionnels avec des groupements de réactivité complémentaire.

2.2.2.1. Réticulation par les aldéhydes

La réaction du glutaraldéhyde avec les groupements hydroxyle de polymères hydrosolubles est possible mais nécessite des conditions drastiques (pH bas, haute température, méthanol utilisé comme désactivateur). En revanche, les polymères contenant des fonctions amine, comme par exemple le chitosane^{71,72}, peuvent être réticulés avec le même réactif mais dans des conditions plus douces. Cette réticulation chimique par le glutaraldéhyde permet d'augmenter la stabilité en milieu gastrique des hydrogels de chitosane, et ceci, d'autant plus que la concentration en agent réticulant et le temps de réticulation augmentent. En outre, la biocompatibilité des hydrogels n'est pas altérée par la réticulation chimique.

Des gels chimiques d'alginate peuvent être préparés par réticulation de l'alginate de sodium par le glutaraldéhyde dans le méthanol⁷³. Kulkarni *et coll.* ont montré que le gonflement du gel diminue lorsque le temps de réticulation augmente.

Hovgaard *et coll.* ont également étudié des hydrogels de dextrane réticulés par du glutaraldéhyde ou du diisocyanate⁷⁴. Pour des dextrans de masses molaires comprises entre 70 000 et 2 000 000 g.mol⁻¹, ils ont observé que l'efficacité de réticulation par le glutaraldéhyde passe par un maximum. En effet, si la concentration en glutaraldéhyde est trop élevée, la densité de réticulation diminue et les gels ne sont plus transparents, probablement en raison d'une séparation de phase dans le gel. Par contre, avec le diisocyanate, la densité de réticulation augmente lorsque la masse molaire du dextrane, la concentration en polymère et la concentration en agent réticulant augmentent. Ils ont également étudié la dégradation des hydrogels, qui se fait par l'érosion de leur surface : leur dégradation diminue quand la densité de réticulation augmente.

Des hydrogels ont été obtenus par modification du hyaluronate par un acide adipique dihydrazine, suivie d'une réaction avec un réticulant macromoléculaire (poly(éthylène glycol) propionaldéhyde). Ces films sont dégradables avec la hyaluronidase (enzyme spécifique au hyaluronate) et peuvent être utilisés comme matrices pour une libération contrôlée de médicaments anti-bactériens et anti-inflammatoires⁷⁵.

2.2.2.2. Réticulation par réactions d'addition

Les polysaccharides peuvent être convertis en hydrogels, en utilisant des agents réticulants multifonctionnels qui réagissent sur les groupements des polysaccharides par des réactions d'addition, comme par exemple avec l'épichlorhydrine, les diépoxydes, les diamines, la divinylsulfone...

Différents polysaccharides forment des gels chimiques par réticulation avec l'**épichlorhydrine**.

Un gel d'alginate de calcium a été réticulé avec l'épichlorhydrine, le calcium étant éliminé à l'aide d'un agent séquestrant tel que l'EDTA⁷⁶.

L'amidon a également été réticulé par l'épichlorhydrine⁷⁷. La réticulation a été étudiée en milieu homogène et hétérogène. L'efficacité de l'épichlorhydrine est très grande lorsqu'elle est utilisée en phase vapeur. Les dérivés hydrosolubles de l'amidon tels que l'hydroxyéthylamidon et le carboxyméthylamidon peuvent également être réticulés et forment des hydrogels totalement résistants en milieu digestif.

Mocanu *et coll.* ont préparé des hydrogels de carboxyméthylcellulose réticulée par de l'épichlorhydrine⁷⁸. Ces hydrogels peuvent être ensuite modifiés hydrophobiquement en faisant réagir des amines aliphatiques.

Des hydrogels de dextrane ont été préparés par réticulation des chaînes à l'épichlorhydrine⁷⁹. Ces hydrogels sont utilisés pour la préparation de microsphères commercialisées sous le nom de Sephadex[®].

Pour former des hydrogels destinés à la libération de médicaments, le xanthane est réticulé par l'épichlorhydrine⁸⁰. Le processus de réticulation dépend de la température et du temps de réaction. La température de réticulation a également une influence sur le gonflement du gel. Lorsque celle-ci augmente, l'hydrogel retient de plus en plus d'eau.

Différents travaux concernant la réticulation chimique du hyaluronate par des **diépoxydes** et par des **diglycidyléthers** ont été réalisés.

Laurent *et coll.*⁸¹ ont réticulé du hyaluronate dans un environnement alcalin avec du 1, 2, 3, 4-diépoxybutane et du borohydrure de sodium (50°C, 2h). Les gels présentent un fort taux de gonflement dans l'eau, mais après séchage, ils ne peuvent pas regonfler jusqu'à ce volume initial. Ce gonflement dépend énormément de la force ionique de la solution environnante.

Yui *et coll.*⁸² ont fait réagir des diglycidyléthers (diglycidyléther d'éthylène glycol) sur le hyaluronate : les gels obtenus ont une forte teneur en eau (95%), malgré les hautes concentrations de réticulant utilisées. De fortes concentrations en hyaluronate sont nécessaires pour former ces gels. Des films de hyaluronates modifiés ont également été obtenus par réaction du diglycidyléther de poly(éthylène glycol) sur le hyaluronate à différents pH⁸³.

Une autre réaction d'addition possible qui permet d'obtenir des hydrogels chimiques est la réaction entre un polysaccharide polycarboxylique et une **diamine**.

Lee *et coll.* ont réticulé l'alginate avec des poly(éthylène glycol) PEG diamines, de l'acide adipique dihydrazine et de l'ester méthylique de la L-Lysine. Par des études rhéologiques, ces auteurs ont mis en évidence que les propriétés mécaniques ainsi que le taux de gonflement peuvent être contrôlés indépendamment, en fonction de la longueur de la chaîne de l'agent réticulant et du degré de réticulation⁸⁴.

Barbucci *et coll.*⁸⁵ ont travaillé sur l'alginate, le hyaluronate et la carboxyméthylcellulose, afin d'obtenir des hydrogels chimiques par réticulation de ces polysaccharides par des diamines (1,3-diaminopropane, 1,6-diaminohexane, PEG₅₀₀diamine, PEG₈₀₀diamine) ; ces auteurs ont envisagé l'utilisation de ces hydrogels comme matériaux tuteurs de matrices extracellulaires et comme biomatériaux cardiovasculaires.

Pour obtenir des hydrogels chimiques à base de polysaccharides, la **divinylsulfone** peut également être utilisée comme réticulant.

Des hydrogels de gellane⁸⁶ ont été formés par réticulation avec la divinylsulfone, ainsi que des hydrogels de différents dérivés de cellulose⁸⁷, ces hydrogels ayant un taux de gonflement dépendant de la température.

Balazs *et coll.* ont travaillé sur les hylanes, gels obtenus en réticulant les fonctions hydroxyles du hyaluronate⁸⁸. Il y a formation d'un réseau insoluble dans l'eau capable de gonfler en milieu aqueux (99% m/m) et de former ainsi un gel mou très hydraté. Ces hylanes gels sont utilisés pour la mise en forme de tissus mous (peau, muscle...), comme vecteurs de principes actifs, comme matériau fluide de viscosupplémentation⁸⁹⁻⁹².

Benedetti *et coll.*⁹³ ont étudié la biocompatibilité et la biodégradabilité d'esters éthylique et benzylique de hyaluronate, sous forme de tablette, de film ou de gaze (HYAFF®). Ils peuvent être utilisés dans diverses applications biomédicales, telles que la culture de chondrocytes articulaires *in vitro*⁹⁴. Tous ces matériaux se sont révélés totalement biocompatibles et biorésorbables, avec un temps de résorption lié au taux d'estérification et à la nature des esters (éthylique ou benzylique). Le hyaluronate peut également être réticulé par du disulfide⁹⁵, du N-hydroxysuccinimide⁹⁶.

Un autre agent permettant la réticulation chimique des polysaccharides est le **trimétaphosphate de trisodium** (STMP). Cette réaction fait intervenir les groupements hydroxyle du polysaccharide et aboutit à des liaisons ester. Le STMP a déjà été utilisé pour réticuler l'amidon⁹⁷⁻⁹⁹, le guar¹⁰⁰, le carboxyméthylpullulane^{101,102} et le hyaluronate¹⁰³. Différents types d'applications sont préconisés : libération de médicaments spécifique au colon pour le guar¹⁰⁰, vecteur de cellules pour la recherche sur le cancer dans le cas des particules de hyaluronate¹⁰³, support pour séparation/purification/immobilisation d'enzymes dans le cas des particules à base de carboxyméthylpullulane. Ces dernières réticulées par le STMP sont également modifiées par des chaînes hydrophobes en C₁₂ : les phénomènes d'adsorption/libération de lysozyme dépendent alors à la fois de la teneur en groupements anioniques et de la teneur en groupements hydrophobes^{101,102}.

2.2.2.3. Réticulation par réactions de condensation

Les réactions de condensation entre les groupements hydroxyle (ou amine) et acide carboxylique (ou dérivés) sont fréquemment utilisées pour obtenir des polyesters et polyamides. Ces réactions peuvent également être utilisées pour la préparation d'hydrogels. Un réactif très efficace pour

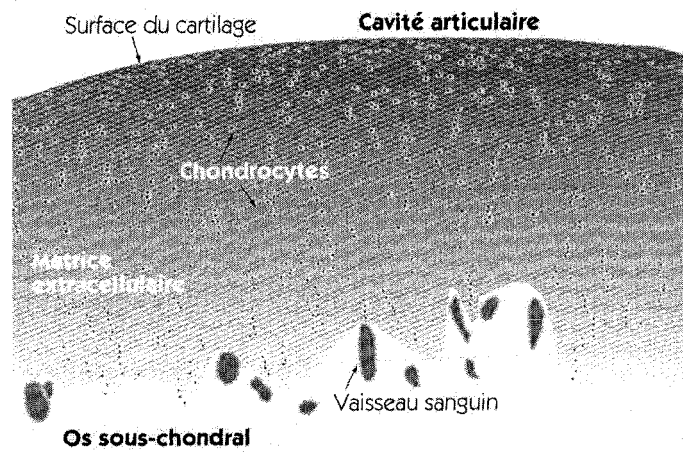


Figure 20 : Constituants du cartilage¹⁰⁶

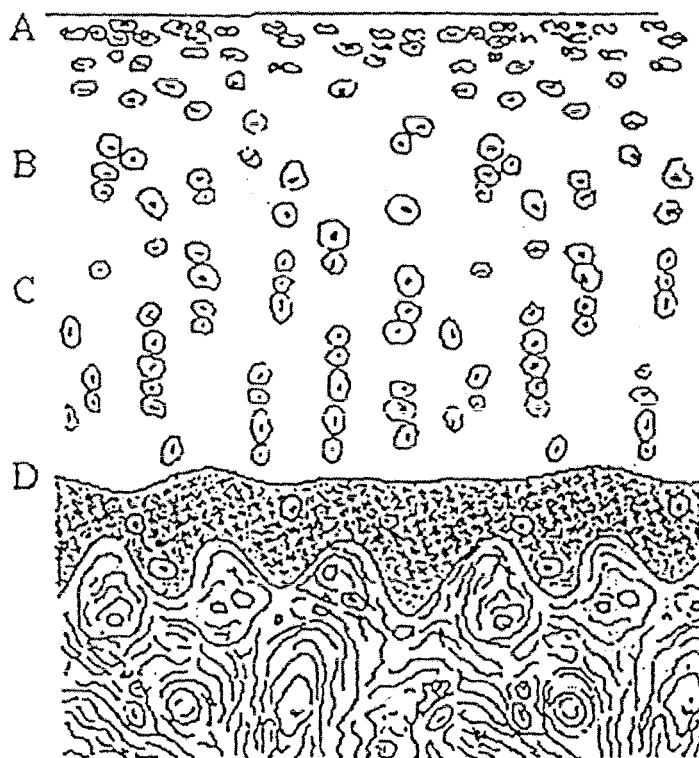


Figure 21 : Les différentes couches de la matrice cartilagineuse¹⁰⁸

réticuler des polymères hydrosolubles avec des liaisons amide est la N,N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthyl carbodiimide (EDC).

Mooney *et coll.* ont développé une méthode pour réticuler de manière covalente l'alginate avec des poly(éthylène glycol) PEG diamines à l'aide de carbodiimide. Les propriétés mécaniques peuvent être contrôlées par la quantité de PEG diamines dans le gel et la masse molaire du PEG¹⁰⁴.

Il est également possible de préparer des hydrogels de hyaluronate en faisant réagir en milieu aqueux des hydrazides difonctionnels sur les groupements carboxylates du polysaccharide, en présence de carbodiimide¹⁰⁵. Ces hydrogels sont essentiellement étudiés dans le cadre de la préparation de vecteurs de principes actifs.

3. LES HYDROGELS DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE ET LA REPARATION DU CARTILAGE

Après cette partie consacrée aux hydrogels à base de polysaccharides, nous allons discuter de l'intérêt des hydrogels pour l'ingénierie tissulaire et la réparation du cartilage. Nous présenterons ce qu'est le cartilage articulaire, les problèmes de l'arthrose et des lésions ostéoarticulaires pour en arriver aux hydrogels comme biomatériaux de comblement pour la réparation du cartilage.

3.1. Le cartilage articulaire, le liquide synovial et le rôle du hyaluronate

3.1.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif avascularisé et non innervé, dont le rôle est d'assurer le glissement harmonieux entre les pièces osseuses articulaires. Il est constitué d'une matrice extracellulaire, composée essentiellement d'eau, de fibres de collagène et de protéoglycanes, dans laquelle est incluse une population éparse de cellules : les chondrocytes¹⁰⁶ (Figure 20).

3.1.1.1. Les chondrocytes

Les chondrocytes ont la particularité de vivre constamment en milieu anaérobie et possèdent à la fois des capacités de synthèse et de catabolisme, assurant ainsi la dégradation et le renouvellement permanents des constituants de la matrice extracellulaire^{106,107}.

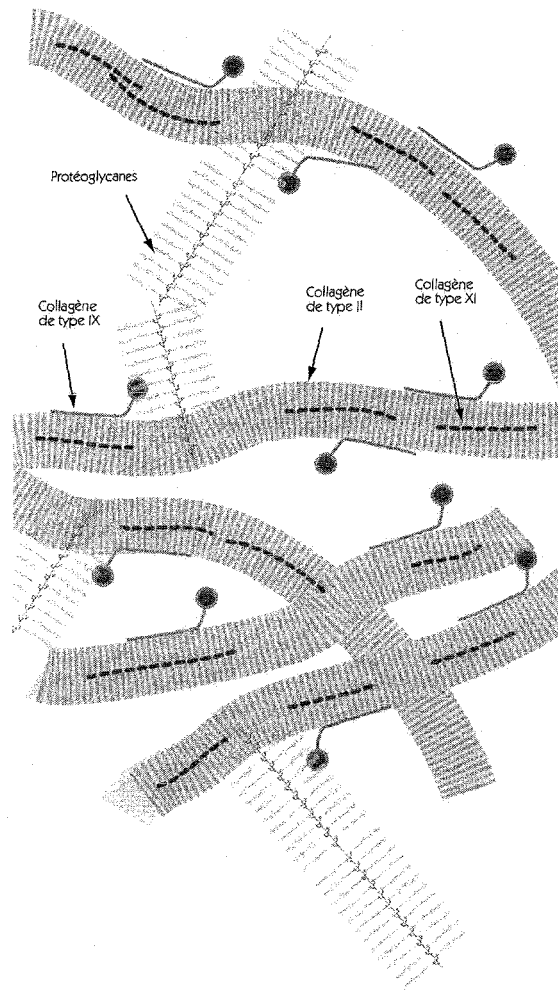


Figure 22 : Schéma du réseau de fibres de collagène et de protéoglycane¹⁰⁶

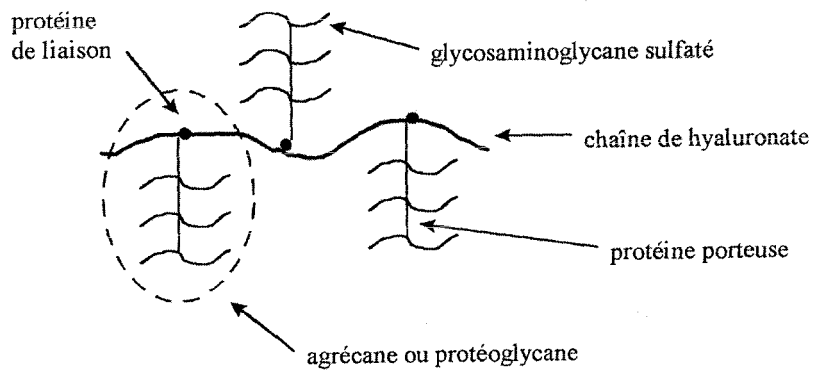


Figure 23 : Schéma du complexe formé par l'association entre les protéoglycane et les chaînes de hyaluronate¹²⁵

Le cartilage se compose de quatre couches, superficielle, transitionnelle, profonde et calcifiée (Figure 21,¹⁰⁸). Selon la couche concernée, les chondrocytes sont de forme, de nombre et d'activité métabolique différents¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Dans la couche superficielle (zone A), les chondrocytes sont peu nombreux et ont une forme ovale aplatie. Ils synthétisent une matrice riche en collagène de type II, mais contenant peu de protéoglycanes.

Dans la zone transitionnelle (zone B), ils sont plus arrondis et parfois regroupés. La matrice synthétisée se compose d'un réseau de fibres de collagène plus lâche avec un taux de protéoglycanes supérieur à celui de la zone A.

Dans la couche profonde (zone C), les chondrocytes sont arrangés en colonnes de 2 à 6 cellules. Par rapport aux autres zones, la teneur en protéoglycanes y est particulièrement élevée.

Enfin, dans la couche calcifiée (zone D), les chondrocytes sont clairsemés et parfois entourés d'une matrice calcifiée, ce qui suggère une activité métabolique faible.

3.1.1.2. Le réseau de collagène et de protéoglycanes

Les chondrocytes synthétisent une matrice constituée d'un réseau dense tridimensionnel de fibres de collagène et d'un gel de protéoglycanes très hydrophile (Figure 22). Cette matrice contient essentiellement du collagène de type II, soit environ 90% du collagène total, le reste correspondant à des collagènes mineurs de type IX et XI^{109,110}.

La disposition des fibres de collagène varie selon la couche cartilagineuse concernée¹⁰⁸. Ainsi, dans la zone A (Figure 21), les fibres sont orientées parallèlement à la surface du cartilage. Elles déterminent les propriétés mécaniques du tissu, notamment en termes de friction. Dans les autres couches, les fibres sont en général plus épaisses et orientées obliquement ou perpendiculairement par rapport à la surface. Leur rôle est de protéger les cellules lors de l'application d'une charge.

Les protéoglycanes sont des édifices moléculaires constitués d'une protéine porteuse sur laquelle se greffent des molécules de glycosaminoglycanes : les chondroïtines sulfates et les kératanes sulfates. Ces édifices, appelés également agrécanes, se branchent à leur tour, par l'intermédiaire d'une protéine de liaison, sur des longues chaînes de hyaluronate pour former des agrégats de protéoglycanes^{106,111} (Figure 23).

Les glycosaminoglycanes et le hyaluronate possèdent des charges négatives qui créent une forte pression osmotique, attirant ainsi l'eau dans le tissu et augmentant le volume du réseau de

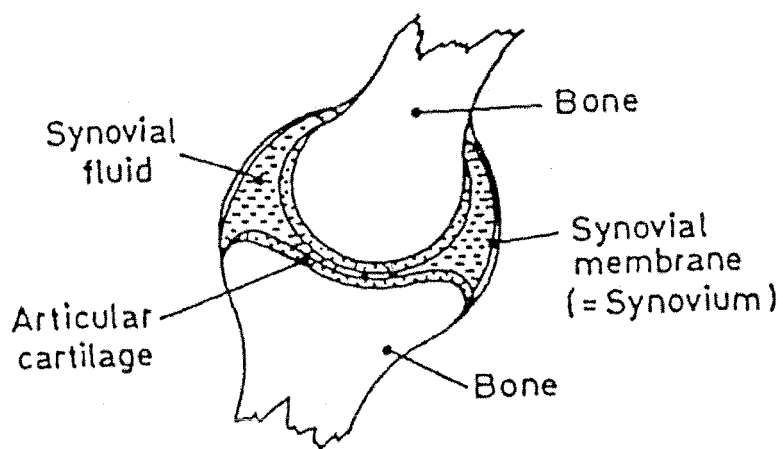


Figure 24 : Schéma de la cavité articulaire¹²⁵

collagène. L'eau constitue environ 75% du poids du cartilage articulaire adulte¹⁰⁷. L'équilibre entre la pression osmotique due aux protéoglycanes et la tension des fibres de collagène assure les propriétés de compressibilité caractéristiques du cartilage^{112,113}.

3.1.1.3. Le rôle du cartilage

Le cartilage est un tissu conjonctif parfaitement adapté à supporter une charge compressive. Il amortit dans le temps et répartit dans l'espace les forces mécaniques auxquelles il est soumis.

Le réseau tendu et orienté de collagène détermine la forme et le volume du tissu cartilagineux. Par opposition, les protéoglycanes fixés sur les chaînes de hyaluronate forment des édifices macromoléculaires possédant un taux d'hydratation important et d'excellentes qualités viscoélastiques, ce qui confère au cartilage sa capacité de déformation réversible. En effet, lorsque celui-ci subit une déformation, l'eau retenue dans le réseau collagène/protéoglycanes/hyaluronate est expulsée. Il s'établit alors un équilibre entre la charge appliquée et la pression osmotique. Une fois la charge supprimée, le réseau reprend son volume initial.

Le réseau collagène/agrécanes/hyaluronate agit également comme une barrière pour réguler le passage de certaines molécules provenant du liquide synovial, comme des protéines ou encore le glucose et les nutriments nécessaires à l'activité des chondrocytes¹¹²⁻¹¹⁴.

De plus, à l'interface entre le cartilage (couche superficielle) et le liquide synovial, des chaînes de hyaluronate de sodium forment un film d'épaisseur 1 à 2 μm , qui assure la protection de la zone superficielle du cartilage en abaissant le coefficient de friction^{106,114}.

3.1.2. Le liquide synovial

Au niveau des articulations, le liquide synovial a plusieurs actions dont, principalement, l'humidification et la lubrification des surfaces cartilagineuses, ainsi que l'absorption des chocs^{111,115}. Ce liquide remplit la cavité articulaire et baigne les surfaces cartilagineuses. Il est principalement constitué de chaînes de hyaluronate de sodium de haute masse molaire (environ 10^7 g.mol^{-1}), à une concentration de 1 à 4 mg.mL^{-1} , et de protéines, à une concentration de 10 à 30 mg.mL^{-1})¹¹⁵.

Le hyaluronate de sodium, de haute masse molaire, possède des propriétés rhéologiques spécifiques en solution, ce qui assure la viscoélasticité et le caractère rhéofluidifiant du liquide synovial. Ce polysaccharide est sécrété et éliminé par la synoviale, tissu conjonctif qui borde la cavité articulaire¹¹⁶ (Figure 24).

3.2. L'arthrose et les lésions articulaires

Les pathologies ostéoarticulaires sont nombreuses et variées. Elles aboutissent la plupart du temps à une dégradation progressive du cartilage puis de l'os au niveau des articulations.

Les arthrites rhumatismales, comme, par exemple, la polyarthrite rhumatoïde, sont des maladies inflammatoires résultant d'une agression microbienne. Quant aux arthrites métaboliques, dont la goutte fait partie, elles ont pour origine une surproduction et un défaut d'élimination d'acide urique que l'on retrouve sous forme de dépôts dans le cartilage.

Parmi l'ensemble des pathologies ostéoarticulaires, l'arthrose est de loin la plus répandue et représente un véritable problème de santé publique. Il s'agit d'une maladie dégénérative des tissus cartilagineux puis osseux, provoquée par une atteinte mécanique de l'articulation.

3.2.1. Manifestations de l'arthrose

L'articulation se compose de l'os sous-chondral, du cartilage, du liquide synovial et de la membrane synoviale. Toute atteinte pathologique à l'un de ces constituants va avoir des effets sur les autres à plus ou moins long terme. L'arthrose peut être ainsi définie comme une maladie du cartilage à causes multiples : intracartilagineuses, synoviales ou osseuses.

En général, quatre stades de la pathologie arthrosique selon l'état du tissu cartilagineux sont observés¹⁰⁶:

- Stade I : couche superficielle normale mais ramollissement et œdème de la couche transitionnelle,
- Stade II : fissuration et aspect fibrillaire des deux couches supérieures,
- Stade III : fissuration des couches profonde et calcifiée, pouvant atteindre l'os sous-chondral,
- Stade IV : disparition du cartilage et mise à nu de l'os sous-chondral.

Cette pathologie conduit donc à de graves lésions atteignant le cartilage et/ou l'os sous-chondral. De telles lésions ostéochondrales sont irréversibles.

En effet, quelle que soit l'origine de la lésion, le cartilage atteint ne se cicatrise pas spontanément dans la plupart des cas, mais évolue vers un tissu fibreux et irrégulier^{109,117}. Ce tissu, dit fibrocartilagineux, est constitué d'un réseau de fibres de collagène dissociées et non orientées, ne possédant, par conséquent, plus les propriétés mécaniques caractéristiques du cartilage sain¹¹⁸.

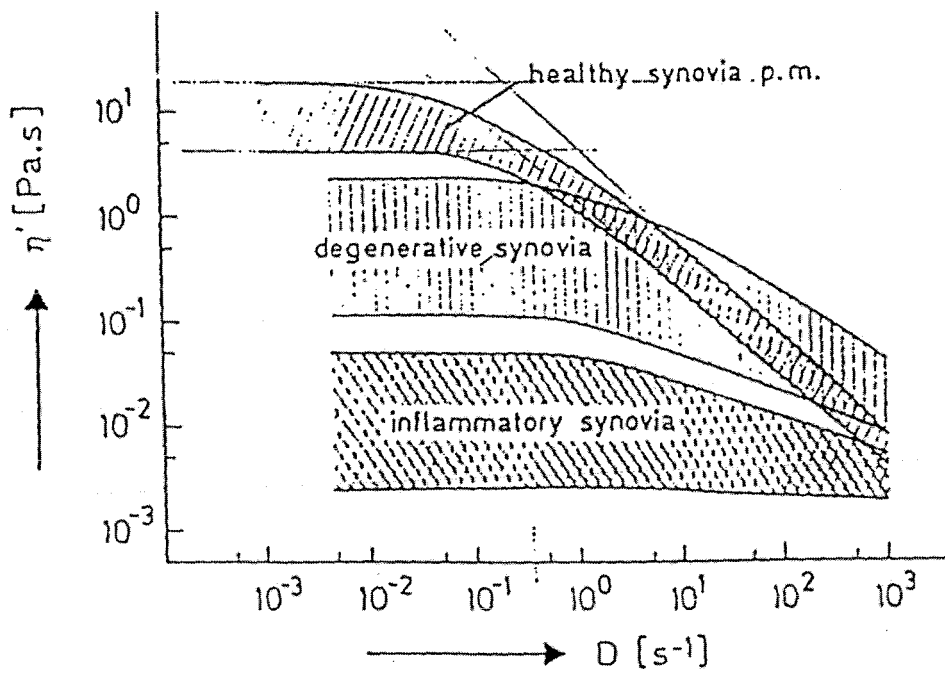


Figure 25 : Courbe d'écoulement du liquide synovial sain, dégénéré et inflammatoire¹²⁵

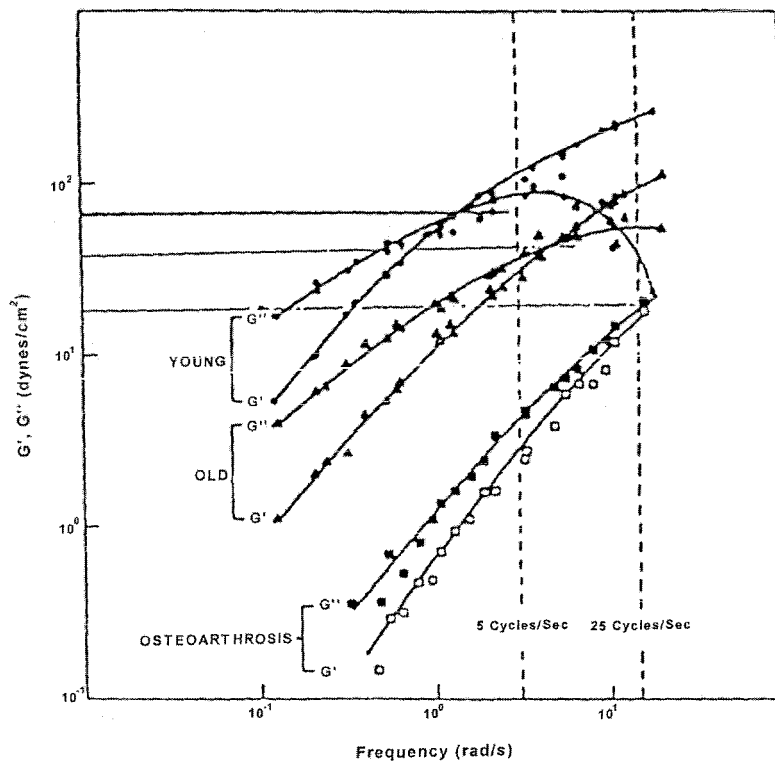


Figure 26 : Evolution du spectre mécanique du liquide synovial en fonction de l'âge du patient et spectre mécanique d'un liquide synovial dégénéré par l'arthrose¹²⁶

Plus encore que le handicap moteur dû à l'enraidissement des articulations, la douleur est le maître symptôme de l'arthrose, d'autant qu'elle peut être provoquée à la fois par les lésions articulaires et par l'inflammation, liées à l'apparition de lésions musculaires ou tendineuses.

3.2.2. Approche physico-chimique et moléculaire de l'arthrose

Les facteurs favorisant l'apparition d'une arthrose sont essentiellement l'hyperutilisation articulaire, qui génère une usure mécanique précoce de l'articulation, et la sénescence. En effet, le cartilage sénescant est fragilisé et est plus sensible aux facteurs mécaniques que le cartilage d'un sujet jeune, car il est de composition biochimique différente¹⁰⁸.

Ces facteurs se traduisent par une altération progressive des chondrocytes : ils s'hypertrophient, se regroupent et synthétisent une matrice extracellulaire abondante mais de composition anormale¹¹⁹. Notamment, ils synthétisent du collagène de type X au détriment du collagène de type II^{108,110}. On observe alors une désorganisation du réseau collagénique et une dégradation enzymatique des chaînes de hyaluronate et des agrégats de protéoglycanes^{120,121}.

La dégradation de la matrice cartilagineuse libère des fragments moléculaires dans le liquide synovial, qui sont phagocytés par la synoviale où ils déclenchent une réaction inflammatoire^{118,120}. Cette réaction génère des radicaux libres principalement de type hydroxyle¹¹¹. Ces derniers diffusent alors dans le liquide synovial et y dégradent les chaînes de hyaluronate^{122,123}.

Même si les interactions entre le hyaluronate de sodium et certains glycosaminoglycanes, comme les chondroïtines sulfates, jouent un rôle non négligeable dans les propriétés rhéologiques spécifiques du liquide synovial (viscoélasticité et rhéofluidification), le hyaluronate peut être considéré comme le principal promoteur de ces propriétés¹²⁴. Une dégradation de son squelette correspond, par conséquent, à une perte de propriétés rhéologiques du liquide synovial.

De nombreux auteurs ont étudié la rhéologie du liquide synovial aux différents stades de l'arthrose^{115,125,126}. Les figures 25 et 26 présentent respectivement le comportement en régime permanent et le spectre mécanique du liquide synovial sain et plus ou moins dégénéré.

Au cours de la maladie, le liquide synovial devient de moins en moins visqueux et perd sa pseudoplasticité. En outre, dans la gamme de fréquences de 1,5 à 8 rad.s⁻¹ (fréquence de marche à fréquence de course), son comportement, viscoélastique pour un sujet sain, devient purement visqueux, pour un sujet arthrosique. Le liquide synovial détérioré ne joue alors plus son rôle de lubrificateur et d'absorbeur des chocs articulaires. Il ne peut plus protéger le cartilage et la

dégradation des différentes couches cartilagineuses va donc en s'accroissant. Des fissures de plus en plus profondes apparaissent progressivement pour finalement conduire à une mise à nu de l'os sous-chondral¹¹¹.

Bien que considérée comme une maladie primitivement cartilagineuse, l'arthrose affecte en réalité petit à petit tous les constituants de l'articulation. Le développement de cette pathologie peut se résumer en un processus cyclique :

- l'usure articulaire et/ou la sénescence provoquent un dérèglement de l'activité cellulaire au sein de la matrice cartilagineuse,
- cette matrice se dégrade, ce qui entraîne une réaction inflammatoire de la synoviale,
- l'inflammation altère les propriétés rhéologiques du liquide synovial,
- la matrice cartilagineuse n'est plus protégée des chocs articulaires par le liquide synovial, et sa dégradation s'en trouve accélérée.

3.3. L'intérêt des hydrogels dans la réparation du cartilage et l'ingénierie tissulaire

Les principaux traitements de la pathologie arthrosique consistent en des prescriptions d'antalgiques et d'anti-inflammatoires afin de calmer la douleur, principal symptôme de la maladie, et réduire l'inflammation liée à l'arthrose.

Mais d'autres techniques sont utilisées, comme par exemple la viscosupplémentation et l'utilisation de biomatériaux de comblement.

3.3.1. La viscosupplémentation

La viscosupplémentation consiste en l'injection intraarticulaire d'un fluide visqueux, afin de redonner au liquide synovial ses propriétés rhéologiques originelles¹²⁷.

Dès les années 1970, la viscosupplémentation a été testée sur les chevaux de course arthrosiques, en leur injectant des solutions de hyaluronate de sodium de haute masse molaire (de l'ordre de 10^6 g.mol⁻¹, Healon® de Biotrics Inc.)¹²⁷. L'injection répétée à intervalles réguliers de hyaluronate permet de redonner au liquide synovial les propriétés rhéologiques essentielles à son rôle de lubrificateur et d'absorbeur de chocs. En outre, chez l'homme (ARTZ®, Seikagaku et Kaken, et Hyalgan®, Fidia), des essais ont montré que l'effet positif de la viscosupplémentation par le hyaluronate perdurait plusieurs semaines après la fin des injections¹²⁸. Il semblerait donc que

l'injection de hyaluronate induit une synthèse de hyaluronate endogène par les synoviocytes, et réduit la réaction inflammatoire¹²⁰. Le hyaluronate synthétisé diffuserait alors directement dans le liquide synovial, restaurant ainsi ses propriétés rhéologiques.

Cependant, le temps de séjour du hyaluronate étant relativement faible dans la cavité articulaire (24 heures)^{112,129}, ses dérivés réticulés, les hylanes, lui sont préférés⁸⁸.

Les hylanes sont obtenus à partir d'un traitement réticulant du hyaluronate (extrait de tissus animaux) soit par le formaldéhyde, soit par la divinylsulfone. La présence de ponts entre les chaînes de hyaluronate permet non seulement de préparer des solutions injectables de viscosité plus élevée, mais également de prolonger le temps de séjour dans l'articulation, la dilution dans le liquide synovial étant plus lente^{128,129}. Ainsi, le Synvisc® (Biomatrix Inc.), un mélange de hylanes réticulés par ces deux types d'agents, est utilisé en viscosupplémentation et fait l'objet de nombreuses recherches⁸⁹⁻⁹².

Bien que la viscosupplémentation se soit révélée relativement efficace, elle ne permet de soulager certains symptômes de l'arthrose qu'à un stade précoce de la maladie, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a pas encore eu apparition de lésions cartilagineuses profondes.

3.3.2. Les biomatériaux de comblement

Dès que les zones profondes du cartilage sont atteintes, c'est-à-dire dès l'apparition de lésions ostéochondrales, la réparation spontanée de ces lésions conduit, dans la plupart des cas, à la formation d'un tissu fibrocartilagineux et le seul remède est leur comblement chirurgical à l'aide de matériaux implantables.

Dans le cas où l'organe lésé est susceptible de se réparer avec une aide exogène, il est préférable d'utiliser des implants à action temporaire, c'est-à-dire biorésorbables, et capable d'interagir avec le tissu lésé afin de servir de tuteur à la synthèse d'un nouveau tissu. Ce type d'implants est plus généralement appelé « biomatériau de comblement ».

3.3.2.1. Cahier des charges d'un biomatériau de comblement

L'objectif est de concevoir un implant capable, d'une part, de combler les lésions ostéochondrales en assumant les exigences mécaniques liées au rôle de l'articulation dans l'appareil locomoteur et, d'autre part, de servir de tuteur à la régénération tissulaire. Pour cela, un cahier des charges des biomatériaux de comblement peut être défini^{117,130-136}.

Le biomatériau de comblement idéal doit :

- posséder des propriétés de dureté, de résistance mécanique et de déformation se rapprochant le plus possible de celles du cartilage articulaire,
- être malléable pour pouvoir être facilement implanté et s'adapter au mieux à la forme de la lésion,
- être stérilisable par des méthodes conventionnelles et être stable à la stérilisation,
- être biodégradable, mais dans un temps assez long pour pouvoir jouer son rôle mécanique tant que le tissu de réparation n'est pas totalement reconstitué,
- être hydrophile et suffisamment poreux pour servir de support à une réhabilitation cellulaire, sa porosité devant alors être un compromis entre les exigences mécaniques et l'aptitude à induire cette réhabilitation,
- être biocompatible, non toxique, non immunogène et non carcinogène,
- si possible, posséder des propriétés vectrices, afin de permettre l'administration conjointe d'un facteur exogène de bioactivation, visant à favoriser et accélérer l'apparition d'un tissu de réparation.

Tout biomatériau de comblement doit être évalué selon les critères énoncés dans ce cahier des charges, par des caractérisations physico-chimiques et mécaniques, des mesures de biocompatibilité *in vitro*, ainsi qu'*in vivo*, par des essais pharmacologiques chez l'animal et thérapeutiques chez l'homme.

Au vu du cahier des charges, il est manifeste que l'élaboration d'un matériau réunissant toutes les qualités requises pour constituer le substitut cartilagineux idéal, est une tâche particulièrement complexe.

3.3.2.2. Les différents types de biomatériaux de comblement

Les premières techniques utilisées pour la réparation ostéochondrale furent des techniques chirurgicales telles que l'induction de chondrogénèse à partir de la moëlle ou de la synoviale ou encore la greffe de cartilage (allogreffe ou autogreffe). Plus récemment, l'implantation de

suspensions cellulaires de haute densité, que l'on maintient dans la lésion à l'aide d'une membrane périostée, a été proposée et commercialisée sous le nom de Carticel® (Genzyme Tissue Repair)^{114,117,137,138}.

Vers la fin des années 80, les recherches se sont dirigées vers la conception de matériaux de comblement à base de polymères synthétiques ou d'origine naturelle, qui peuvent également être utilisés en association avec des cultures cellulaires. Des comblements de lésions ont en effet été effectués avec des polyuréthanes¹³⁹, des poly-éther-imide-uréthane¹⁴⁰, des copolymères d'éthylméthacrylate et de tétrahydrofurfurilméthacrylate¹¹⁷, des polyesters (PLA, PGA, copolymères PLA-PGA)¹⁴¹.

Mais, depuis quelques années, de nombreuses revues soulignent l'intérêt de l'utilisation d'hydrogels dans l'ingénierie tissulaire^{135,142-146}. D'un point de vue mécanique, les hydrogels, qu'ils soient synthétiques ou d'origine naturelle, présentent l'avantage d'utiliser l'eau de la même façon que le cartilage¹⁴⁷. Sous l'action d'une pression, l'eau sort de l'hydrogel, ce qui permet à ce dernier d'absorber le choc. Puis, une fois la pression relâchée, l'eau reprend sa place dans le matériau et celui-ci retrouve son volume initial.

Sur un plan biologique, les hydrogels peuvent également convenir pour jouer le rôle de support de culture cellulaire. En effet, à condition d'avoir contrôlé l'absence d'éléments potentiellement toxiques au sein de ces matériaux, leur caractère hydrophile les rend susceptibles de présenter une bonne biocompatibilité¹⁴⁸. En outre, ils peuvent offrir un environnement tridimensionnel suffisamment poreux pour permettre la prolifération cellulaire et le transport des différents nutriments qui lui sont nécessaires. Certains types d'hydrogels possèdent également un caractère hydrophobe qui favorise l'adsorption de protéines comme par exemple, la fibronectine, et donc l'adhésion cellulaire¹⁴⁹.

Par conséquent, la conception d'hydrogels, adaptés à une utilisation *in vivo* pour assurer et améliorer la réparation tissulaire, et susceptibles de favoriser la réhabilitation cellulaire, est une voie de recherche très intéressante.

Différents hydrogels utilisés comme biomatériaux de comblement ont déjà été préparés :

- à partir de polymères synthétiques : poly(alcool vinylique), dérivés du poly(acide acrylique), poly(oxyde d'éthylène),
- à partir de polymères naturels : collagène, fibrine, polypeptides, chitosane, alginate, hyaluronate.

Nous allons commencer par décrire les différents hydrogels obtenus à partir de polymères synthétiques.

Le **poly(alcool vinylique) PVA** est l'un des premiers polymères synthétiques testés comme cartilage artificiel. Il forme un hydrogel qui contient une teneur en eau proche de celle du cartilage, mais il n'a pas une stabilité mécanique suffisante pour être utilisé, sous une forme non modifiée, en remplacement du cartilage¹⁴⁶. Des modifications du PVA ont alors été envisagées.

Le PVA forme des hydrogels chimiques par réticulation avec la glutaraldéhyde¹⁵⁰, l'épichlorhydrine¹⁵¹, les chlorures de succinyle, adipoyl et sébacoyl¹⁵².

Il peut aussi former des hydrogels physiques (Salubria[®]) qui sont obtenus par cristallisation à partir d'une solution aqueuse de PVA, en utilisant des cycles lyophilisation / dissolution. Les propriétés mécaniques de l'hydrogel dépendent de la teneur en PVA dans l'eau, de sa masse molaire et de la quantité et durée des cycles¹⁵³.

Enfin, il peut également être mélangé avec d'autres polymères hydrosolubles afin de former soit des gels chimiques, soit des gels physiques¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

Pourtant, ces méthodes de gélification sont difficilement applicables *in situ* et le PVA n'est pas dégradé dans la plupart des conditions physiologiques, c'est pourquoi ces gels sont préconisés en ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage articulaire artificiel, en tant que tuteurs permanents¹⁵⁷.

Toutefois, des travaux ont récemment permis d'obtenir un hydrogel dégradé et photopolymérisable à base de PVA : des macromonomères multifonctionnels (méthacrylate) à base d'un copolymère PVA/poly(acide lactique) forment des hydrogels après irradiation UV ($\lambda=365\text{nm}$, 10 minutes), l'amorceur étant la 4-(2-hydroxyéthoxy)phényl-(2-hydroxy-2-propyl)cétone. Les propriétés de ces hydrogels dépendent entre autres du nombre de chaînes PLA, du pourcentage de substitution en groupements photopolymérisables, de la masse molaire du PVA et de la concentration en solution des macromonomères¹⁵⁸. La culture de cellulesensemencées dans ces hydrogels montre une viabilité cellulaire et la production de protéines de la matrice extracellulaire¹⁵⁹.

Différents dérivés du **poly(acide acrylique)** ont été utilisés sous forme d'hydrogels en tant que biomatériaux de comblement, parmi lesquels : le poly(2-hydroxyéthylméthacrylate) pHEMA, le poly(N-isopropylacrylamide) PNIPAAm.

Des gels de **pHEMA** macroporeux ont été préparés par dissolution / lyophilisation pour obtenir un cartilage articulaire artificiel¹⁶⁰. Malmonge et Arruda ont préparé également des hydrogels, en

copolymérisant thermiquement le pHEMA et l'acide acrylique dans différentes proportions. Ces hydrogels ont été évalués mécaniquement et il a été montré que la présence d'acide acrylique augmentait les propriétés mécaniques de ces hydrogels¹⁶¹. Cependant, ces auteurs ont montré que la qualité du néocartilage, synthétisé dans le cas du traitement d'une lésion par un implant de pHEMA, ne correspondait pas mécaniquement à celle du cartilage natif¹⁶².

Le poly(N-isopropylacrylamide) **PNIPAAm** est un dérivé particulièrement attrayant pour les applications dans l'ingénierie tissulaire : Stile *et coll.* l'ont utilisé comme hydrogel injectable pour des applications concernant le cartilage¹⁶³. En effet, le PNIPAAm présente une LCST (température critique inférieure de démixtion) de l'ordre de 32°C. Lorsqu'une solution aqueuse de ce polymère (avec ou sans cellules) est injectée directement dans la lésion du cartilage, un hydrogel réversible se forme, la température de la solution de polymère augmentant jusque 37°C.

Ces mêmes auteurs ont formé des polymères réticulés de PNIPAAm et des copolymères PNIPAAm/acide acrylique : les expériences *in vitro* avec des chondrocytes bovins ont montré que ces polymères permettaient une viabilité cellulaire et la production d'une matrice extracellulaire¹⁶³. Bien que ces hydrogels à base de PNIPAAm sont considérés comme des polymères non dégradables, ce groupe a réussi à synthétiser des PNIPAAm biodégradables avec des réticulants tels que l'éthylène glycol, le poly(acide lactique) et l' ϵ -caprolactone, système semblant fournir une matrice biocompatible pour des applications dans la réparation du cartilage¹⁶³. Huh *et coll.* ont réussi à synthétiser des copolymères PNIPAAm/dextrane également biodégradables¹⁶⁴.

Parmi les polymères synthétiques utilisés dans la réparation du cartilage, nous pouvons citer le poly(oxyde d'éthylène) **POE** qui est un polymère hydrophile couramment utilisé, étant donné sa biocompatibilité et sa faible toxicité.

Les premiers travaux sur le POE injectable ont été entrepris par Sims *et coll.*¹⁶⁵. Ces auteurs ont montré que le POE formait un tuteur biocompatible dans lequel les cellules proliféraient et produisaient les composants de la matrice extracellulaire, mais qu'il présentait une faible stabilité mécanique. C'est pourquoi des recherches pour renforcer cette stabilité ont été réalisées, notamment en formant des dérivés réticulés du POE.

Le POE peut former des hydrogels chimiques par photopolymérisation, après modification soit par des acrylates, soit par une ou plusieurs fonctions méthacrylates¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Des gels ont également été préparés après modification du POE par une séquence peptidique ; ils sont ainsi sensibles aux enzymes existant dans le corps, ce qui les rend intéressants pour des applications dans l'ingénierie tissulaire¹⁶⁷.

Même si des copolymères triblocs poly(oxyde d'éthylène)-poly(oxyde de propylène)-poly(oxyde d'éthylène) forment des hydrogels thermosensibles, leur utilisation dans le domaine biomédical est limitée, à cause de leur manque de biodégradabilité. C'est pourquoi on leur préfère des hydrogels thermosensibles à base de copolymères à blocs POE-PLA, le PLA étant dégradé et biocompatible^{169,170}. Ces gels sont utilisables en ingénierie tissulaire car ils montrent une transition sol-gel à une température proche de la température du corps humain.

Des hydrogels, utilisés pour l'ingénierie tissulaire, ont également été préparés à partir de polymères naturels.

Le **collagène** est un matériau intéressant pour des applications biomédicales. Il est présent dans la plupart des tissus humains et il est le principal composant de la matrice extracellulaire. La structure de base des 19 types de collagènes existants est composée de 3 chaînes polypeptidiques qui s'associent pour former un arrangement en triple hélice. Les brins de collagène peuvent s'aggréger pour former des fibres stables¹⁷¹.

Les études *in vivo* utilisent souvent du collagène de type I comme biomatériau pour la régénération du cartilage. La porosité des gels de collagène est un paramètre très favorable à la prolifération cellulaire et à la synthèse des protéoglycanes. Ceci permet d'obtenir rapidement (2 semaines) un matériau, d'une part, suffisamment rigide pour être implanté et, d'autre part, conduisant *in vivo* à un tissu de réparation de structure proche de celle du cartilage^{172,173}. L'incorporation de chondrocytes ou de facteurs de croissance dans ces gels améliore les propriétés du néocartilage.

Les propriétés mécaniques des hydrogels de collagène peuvent être renforcées :

- par l'introduction de réticulants chimiques (glutaraldéhyde, formaldéhyde, carbodiimide, diphénylphosphorylazide)¹⁷⁴⁻¹⁷⁶,
- par traitements physiques (irradiation UV, lyophilisation, chauffage)^{174,177},
- et également en le mélangeant avec d'autres polymères (hyaluronate, PLA, PGA, copolymères PLA-PGA, chitosane, POE)^{174,175,178-180}.

Néanmoins, le collagène, dérivé protéique d'origine animale, peut provoquer des réactions immunologiques dans l'organisme¹¹⁰.

Des gels de **fibrine** sont également préconisés pour l'ingénierie tissulaire. Un mélange de fibrinogène et de thrombine forme cette « colle » de fibrine, par polymérisation enzymatique et auto-assemblage du fibrinogène¹⁸¹. Différentes études ont été entreprises afin de déterminer si la fibrine pouvait jouer le rôle d'un tuteur dans l'ingénierie tissulaire : ces gels peuvent être mélangés

avec des cellules, être injectés dans une lésion et former *in vitro* un tuteur de forme et de taille spécifiques. Des chondrocytes maintenus dans ces gels gardent leur morphologie, prolifèrent et synthétisent une matrice extracellulaire¹⁸²⁻¹⁸⁸.

La fibrine n'est cependant pas stable dans le temps. Meinhart *et coll.* ont essayé de modifier les gels de fibrine en incorporant de l'aprotinine, polypeptide empêchant l'action des enzymes dégradant ce polymère. Il semble que l'addition d'aprotinine aux gels de fibrine empêche effectivement sa dégradation, sans pour autant compromettre la viabilité des chondrocytes et leur phénotype¹⁸⁵.

Les protéines sont les composants principaux des tissus naturels et il est très intéressant de synthétiser des **polypeptides** qui imitent ces protéines naturelles.

Les polypeptides sont synthétisés à partir de combinaisons variées d'acides aminés, la difficulté étant de contrôler leur séquence. Une étude récente expose une stratégie de synthèse de polypeptides (à partir d'amorceurs organonickel) avec un contrôle de la séquence des acides aminés et une large gamme de masses molaires¹⁸⁹.

Certains peptides sont capables de s'auto-assembler en hydrogels stables à basse concentration en peptides (0,1%-1%), cet auto-assemblage étant lié aux acides aminés et à l'alternance des groupements hydrophiles et hydrophobes (KLD=lysine-leucine-acide aspartique). Il a été montré qu'ils peuvent jouer le rôle de tuteur pour la synthèse d'une matrice extracellulaire à l'intérieur d'un système de culture tridimensionnel¹⁹⁰.

La synthèse de polypeptides génétiquement modifiés permet également d'obtenir des séquences variées de polypeptides avec des propriétés bien définies (élasticité, dureté, dégradation, interactions cellulaires)¹⁹¹. L'introduction de certaines séquences d'acides aminés a permis, soit de former des hydrogels sensibles au pH et à la température (polypeptides imitant la soie, séquence Glu-Ala)¹⁹², soit de former des matrices extracellulaires artificielles (polypeptides imitant l'élastine, séquence Gly-Val-Pro-Gly)¹⁹³. Cependant, cette technique de production n'est pas économiquement envisageable à grande échelle.

Il existe également un grand nombre d'études concernant l'utilisation de **polysaccharides** en tant que biomatériaux de comblement, comme par exemple le chitosane, l'alginate et le hyaluronate.

Le **chitosane** est utilisé dans de nombreuses applications biomédicales, en raison de sa biocompatibilité, sa faible toxicité, sa structure proche des glycosaminoglycanes naturels et sa dégradation possible par des enzymes (chitosanase, lysozyme). Nous avons déjà décrit les possibilités d'obtention d'hydrogels chimiques et physiques à base de chitosane :

- hydrogels chimiques : par photopolymérisation⁶⁸, par réaction avec la glutaraldéhyde^{71,72},
- hydrogels physiques : par interactions ioniques (avec la chondroïtine sulfate entre autres^{15,16}), par changement de pH, par changement de température en présence de polyols et de glycérolphosphate²¹⁻²⁷, par fixation de groupements hydrophobes^{35-37,39}.

Tous ces travaux tendent à montrer que le chitosane est une matrice potentielle pour la réparation du cartilage articulaire.

Les hydrogels d'**alginate** ont une place de choix en ingénierie tissulaire puisqu'ils sont obtenus simplement par gélification de l'alginate en présence d'ions calcium. Au sein de ces hydrogels d'alginate de calcium enrichis en chondrocytes, implantés dans un environnement *in vivo*, la synthèse d'une nouvelle matrice cartilagineuse est possible¹⁹⁴⁻²⁰². Cependant, l'alginate de calcium présente l'inconvénient d'être peu dégradable dans l'organisme et de rester présent à long terme dans le site d'implantation.

Le **hyaluronate** est incapable de former des hydrogels. Au mieux, il est possible d'injecter une solution fortement concentrée de hyaluronate de haute masse molaire, contenant des chondrocytes²⁰³. Pourtant, le hyaluronate présente un double intérêt dans la conception d'un biomatériau de comblement. D'une part, ce polysaccharide possède de remarquables propriétés rhéologiques en solution, notamment en termes de viscoélasticité. D'autre part, sur le plan biologique, il présente une interaction notable avec les chondrocytes, agissant sur leur activité de prolifération et de synthèse par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques¹¹¹⁻¹¹³. Ainsi, la présence de hyaluronate au sein d'un biomatériau peut permettre, non seulement, d'induire la réhabitation cellulaire de ce matériau *in vivo*, mais aussi, de stimuler la prolifération cellulaire et d'activer la synthèse de la matrice extracellulaire. Ce phénomène d'induction est d'autant plus intéressant qu'il permet d'éviter, avant l'implantation, la culture *in vitro*, dans le matériau, de chondrocytes autologues pour y synthétiser un néocartilage.

Le hyaluronate peut être associé à de l'alginate de calcium ou du collagène, pour former une matrice hybride utilisable comme matériau de comblement^{41,175,204-207}.

Une autre possibilité consiste à modifier chimiquement le hyaluronate. De nombreux travaux traitent de cette modification chimique du hyaluronate, en vue de diverses applications biomédicales :

- modification pour obtenir des hydrogels physiques : les hyaluronates hydrophobisés⁴⁰⁻⁴²,
- modification pour obtenir des hydrogels chimiques : les hylanes obtenus par réticulation avec la divinylsulfone⁸⁹⁻⁹², le hyaluronate modifié par des hydrazides difonctionnels en présence de carbodiimide¹⁰⁵, les esters éthylique et benzylique de hyaluronate⁹³, les dérivés de hyaluronate photopolymérisables^{62-67,208} ...

Les résultats positifs obtenus avec ces dérivés de hyaluronate en tant que biomatériaux de comblement nous ont poussés à utiliser ce polysaccharide lors de nos recherches.

4. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons répertorié les principaux polysaccharides utilisés pour la préparation d'hydrogels, qu'ils soient physiques ou chimiques : alginate, hyaluronate, chitosane, pullulane, dextrane... Les gels physiques peuvent être obtenus par enchevêtrements de chaînes macromoléculaires, interactions ioniques, liaisons hydrogène ou encore interactions hydrophobes. La plupart des hydrogels chimiques à base de polysaccharides ont été préparés par photopolymérisation de macromonomères ou par réticulation à l'aide de réactifs multifonctionnels.

Au cours des dernières années, de nombreuses recherches ont été réalisées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et soulignent l'intérêt des hydrogels pour la réparation du cartilage, aussi bien d'un point de vue mécanique que d'un point de vue biologique. Des hydrogels ont déjà été obtenus à partir de polymères synthétiques (PVA, dérivés du poly(acide acrylique), POE) ou bien naturels (collagène, fibrine, polypeptides, chitosane, alginate, hyaluronate) pour des applications dans ces domaines. Ces différents travaux nous ont encouragés à utiliser le hyaluronate de sodium comme polymère de départ pour la préparation de biomatériaux de comblement.

5. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Wichterle O., Lim D. "Hydrophilic gels for biological use" *Nature* **1960**, *185*, 117-118.
- (2) Fischer F.G., Dörfel H. "Polyuronic acids in brown algae" *Z.Physiol.Chem.* **1955**, *302*, 186-203.
- (3) Haug A., Larsen B., Smidsrod O. "Uronic acid sequence in alginate from different sources" *Carbohydrate Research* **1974**, *32*, 217-225.
- (4) Haug A., Myklestad S., Larsen B., Smidsrod O. "Correlation between chemical structure and physical properties of alginates" *Acta Chem. Scand.* **1967**, *21*, 768-778.
- (5) Draguet K.I., Skjak-Braek G., Smidsrod O. "Alginic acid gels : the effect of alginate chemical composition and molecular weight" *Carbohydr. Polym.* **1994**, *25*, 31-38.
- (6) Smidsrod O., Skjak-Braek G. "Alginate as immobilization matrix for cells" *Trends Biotech* **1990**, *8*, 71-78.
- (7) Rees D.A. "Shapely polysaccharides" *Biochem.J.* **1972**, *126*, 257-273.
- (8) Smidsrod O., Haug A. "Dependence upon the gel-sol state of the ion-exchange properties of alginates" *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 2063-2074.
- (9) Gombotz W.R., Wee S.F. "Protein release from alginate matrices" *Adv. Drug Deliver. Rev.* **1998**, *31*, 267-285.
- (10) Strand B.L., Morch Y.A., Espevik T., Skjak-Braek G. "Visualization of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules by confocal laser scanning microscopy" *Biotechnology and bioengineering* **2003**, *82*, 386-394.
- (11) Gonzalez Ferreira M., Tillman L.G., Hardee G., Bodmeier R. "Alginate/poly-L-lysine microparticles for the intestinal delivery of antisense oligonucleotides" *Pharmaceutical Research* **2002**, *19*, 755-764.
- (12) Yuguchi Y., Urakawa H., Kajiwara K. "Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions" *Food Hydrocolloids* **2003**, *17*, 481-485.
- (13) Hossain K.S., Miyana K., Maeda H., Nemoto N. "Sol-gel transition behavior of pure i-carrageenan in both salt-free and added salt states" *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 442-449.
- (14) Takemasa M., Chiba A., Date M. "Gelation mechanism of kappa- and iota-carrageenan investigated by correlation between the strain-optical coefficient and the dynamic shear modulus" *Macromolecules* **2001**, *34*, 7427-7434.
- (15) Lahiji A., Sohrabi A., Hungerford D., Frondoza C. "Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes" *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51*, 586-595.
- (16) Sechrist V., Miao Y., Niyibizi C., Westerhausen-Larson A., Matthew H., Evans C. "GAG-augmented polysaccharide hydrogel : a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis" *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49*, 534-541.
- (17) Janes K.A., Fresneau M.P., Marazuela A., Fabra A., Alonso M.J. "Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin" *J. Control. Release* **2001**, *73*, 255-267.
- (18) Sarkar N. "Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropylmethylcellulose" *J. Appl. Polym. Sci.* **1979**, *24*, 1073-1087.
- (19) Heymann E. "Studies on sol-gel transformations, I. The inverse sol-gel transformation of methylcellulose in water" *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 846-864.
- (20) Tate M.C., Shear D.A., Hoffman S.W., Stein D.G., LaPlaca M.C. "Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury" *Biomaterials* **2001**, *22*, 1113-1123.
- (21) Chenite A., Chaput C., Wang D., Combes C., Buschmann M.D., Hoemann C.D., Leroux J.C., Atkinson B.L., Binette F., Selmani A. "Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ" *Biomaterials* **2000**, *21*, 2155-2161.
- (22) Chenite A., Buschmann M.D., Wang D., Chaput C., Kandani N. "Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions" *Carbohydr. Polym.* **2001**, *46*, 39-47.
- (23) Ruel-Gariépy E., Chenite A., Chaput C., Guirguis S., Leroux J.C. "Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs" *Int.J.Pharm.* **2000**, *203*, 89-98.

**Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire
et la réparation du cartilage**

- (24) Ruel-Gariépy E., Shive M., Bichara A., Berrada M., Le Garrec D., Chenite A., Leroux J.C."A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 57, 53-63.
- (25) Hoemann C.D., Sun J., Légaré A., McKee M.D., Ranger P., Buschmann M.D."A thermosensitive polysaccharide gel for cell delivery in cartilage repair" *Trans. Orthop. Res. Soc.* **2001**, 26, 626.
- (26) Hoemann C.D., Hurtig M., Sun J., McWade D., Rossomacha E., Shive M.S., McKee M.D., Buschmann M.D."Full-thickness cartilage repair using an injectable chitosan scaffold" *BST-CarGel, Third Annual Engineering Tissue Growth, Pittsburgh, PA* **2003**.
- (27) Molinaro G., Leroux J.C., Damas J., Adam A."Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels : an in vivo experimental approach to injectable biomaterials" *Biomaterials* **2002**, 23, 2717-2722.
- (28) De Jong S.J., De Smedt S.C., Demeester J., Van Nostrum C.F., Kettenes-Van Den Bosch J.J., Hennink W.E."Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted dextran" *J. Control. Release* **2001**, 72, 47-56.
- (29) Bataille I., Huguet J., Muller G., Mocanu G., Carpov A."Associative behaviour of hydrophobically modified carboxymethylpullulan derivatives" *International journal of biological macromolecules* **1997**, 20, 179-191.
- (30) Glinel K."Polysaccharides perfluorés dérivés de pullulane : synthèse et étude des propriétés en solution" *thèse présentée à l'Université de Rouen* **1999**.
- (31) Simon S., Dugast J.Y., Le Cerf D., Picton L., Muller G."Amphiphilic polysaccharides. Evidence for a competition between intra and intermolecular associations in dilute system" *Polymer* **2003**, 44, 7917-7924.
- (32) Taniguchi I., Akiyoshi K., Sunamoto J."Self-aggregate nanoparticles of cholesteryl and galactoside groups-substituted pullulan and their specific binding to galactose specific lectin" *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 200, 1555-1560.
- (33) Akiyoshi K., Kang E.-C., Kurumada S., Sunamoto J."Controlled association of amphiphilic polymers in water: thermosensitive nanoparticles formed by self-assembly of hydrophobically modified pullulans and poly(N-isopropylamides)" *Macromolecules* **2000**, 33, 3244-3249.
- (34) Na K., Park K.H., Kim S.W., Bae Y.H."Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2)" *J. Control. Release* **2000**, 69, 225-236.
- (35) Sludden J., Uchegbu I.F., Schatzlein A.G."The encapsulation of bleomycin within chitosan based polymeric vesicles does not alter its biodistribution" *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, 52, 377-382.
- (36) Martin L., Wilson C.G., Koosha F., Uchegbu I.F."Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, 55, 35-45.
- (37) Qu X., Wirsén A., Albertsson A.C."Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water" *Polymer* **2000**, 41, 4589-4598.
- (38) Kjoniksen A.L., Nyström B., Nakken T., Palmgren O., Tande T."Effect of surfactant concentration, pH and shear rate on the rheological properties of aqueous systems of a hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue" *Polym. Bull.* **1997**, 38, 71-79.
- (39) Yang H., Zhou S.B., Deng X.M."Preparation and properties of hydrophilic-hydrophobic chitosan derivatives" *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, 92, 1625-1632.
- (40) Pelletier S., Hubert P., Lapique F., Payan E., Dellacherie E."Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate : synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions" *Carbohydrate polymers* **2000**, 43, 343-349.
- (41) Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L., Dellacherie E."Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair : rheological properties" *Journal of biomedical materials research* **2001**, 54, 102-108.
- (42) Dausse Y., Grossin L., Miralles G., Pelletier S., Mainard D., Hubert P., Baptiste D., Gillet P., Dellacherie E., Netter P., Payan E."Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect" *Osteoarthritis and Cartilage* **2003**, 11, 16-28.
- (43) Fusenig N.E., Willhauck M., Stark H.J., Pavesio A."Biomaterials based on hyaluronic acid for the anti-angiogenic therapy in the treatment of tumours" *European Patent 1463541* **2004**.

**Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire
et la réparation du cartilage**

- (44) Callegaro L.F., Pastorello A., Radice M., Pavesio A. "Injectable hyaluronic acid derivative with pharmaceuticals/cells" *US patent 2004142465* **2004**.
- (45) Callegaro L.F., Paparella A.M., Bellini D., O'Regan M. "Pharmaceutical compositions comprising a mixture of autocross-linked hyaluronic acid and nonautocross-linked hyaluronic acid and their use for the treatment of arthropathies" *Brevet HK 1024865* **2004**.
- (46) Miralles-Houzelle M.C., Hubert P., Dellacherie E. "Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association" *Langmuir* **2001**, *17*, 1384-1391.
- (47) Rastello De Boissesson M., Léonard M., Hubert P., Marchal P., Stequert A., Castel C., Favre E., Dellacherie E. "Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: Bead formation, structure, and stability" *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *273*, 131-139.
- (48) Léonard M., Rastello De Boissesson M., Hubert P., Dellacherie E. "Production of microspheres based on hydrophobically associating alginate derivatives by dispersion/gelation in aqueous sodium chloride solutions" *Journal of biomedical materials research, part A* **2004**, *68A*, 335-342.
- (49) Hwang F., Hogen-Esch T.E. "Fluorocarbon-modified water-soluble cellulose derivatives" *Macromolecules* **1993**, *26*, 3156-3160.
- (50) Landoll L.M. "Modified non-ionic cellulose ethers" *US patent n°4,228,277* **1980**.
- (51) Molteni. "Modified galactomannans and process for their preparation" *US patent n°4,960,876* **1990**.
- (52) Edman P., Ekman B., Sjöholm I. "Immobilization of proteins in microspheres of polyacryldextran" *J. Pharm. Sci.* **1980**, *69*, 838-842.
- (53) Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Franssen O., Talsma H., Van Steenberg M.J., Kettenes-Van Den Bosch J.J., Hennink W.E. "Synthesis, characterization and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran" *Macromolecules* **1995**, *28*, 6317-6322.
- (54) Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Kettenes-Van Den Bosch J.J., Van der Kerk-Van Hoof A., Hennink W.E. "Reaction of dextran with glycidyl methacrylate: an unexpected transesterification" *Macromolecules* **1997**, *30*, 3411-3413.
- (55) Marsano E., Bianchi E., Gagliardi S., Ghioni F. "Hydroxypropylcellulose derivatives: phase behavior of hydroxypropylcellulose methacrylate" *Polymer* **2000**, *41*, 533-538.
- (56) Huang L.K., Metha R.C., DeLucca P.P. "Evaluation of a statistical model for the formation of poly(acryloyl hydroxyethyl starch) microspheres" *Pharmaceutical Research* **1997**, *14*, 475-482.
- (57) Kim S.H., Chu C.C. "Synthesis and characterization of dextran-methacrylate hydrogels and structural study by SEM" *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49*, 517-527.
- (58) Kim S.H., Won C.Y., Chu C.C. "Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking" *Carbohydr. Polym.* **1999**, *40*, 183-190.
- (59) Kim S.H., Won C.Y., Chu C.C. "Synthesis and characterization of dextran-maleic acid based hydrogel" *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *46*, 160-170.
- (60) Zhang Y., Won C.Y., Chu C.C. "Synthesis and characterization of biodegradable hydrophobic-hydrophilic hydrogel networks with a controlled swelling properties" *J. Polym. Sci. part A* **2000**, *38*, 2392-2404.
- (61) Zhang X., Wu D., Chu C.C. "Synthesis and characterization of partially biodegradable, temperature and pH sensitive Dex-MA/PNIPAAm hydrogels" *Biomaterials* **2004**, *25*, 4719-4730.
- (62) Jin Y., Yamanaka J., Sato S., Miyata I., Yomota C., Yonese M. "Recyclable characteristics of hyaluronate-polyhydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled releases" *J. Control. Release* **2001**, *73*, 173-181.
- (63) Leach J.B., Bivens K.A., Patrick C.W.Jr, Schmidt C.E. "Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds" *Biotechnology and bioengineering* **2003**, *82*, 578-589.
- (64) Jia X.Q., Burdick J.A., Kobler J., Clifton R.J., Rosowski J.J., Zeitels S.M., Langer R. "Synthesis and characterization of in situ cross-linkable hyaluronic acid-based hydrogels with potential application for vocal fold regeneration" *Macromolecules* **2004**, *37*, 3239-3248.
- (65) Smeds K.A., Grinstaff M.W. "Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation" *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *54*, 115-121.
- (66) Park Y.D., Tirelli N., Hubbell J.A. "Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks" *Biomaterials* **2003**, *24*, 893-900.

**Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire
et la réparation du cartilage**

- (67) Bellini D., Zanellato A. "Ester derivatives of hyaluronic acid for the preparation of hydrogel materials by photocuring" *European Patent WO03076475* **2003**.
- (68) Obara K., Ishihara M., Ishizuka T., Fujita M., Ozeki Y., Maehara T., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Kikuchi M., Kurita A. "Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice" *Biomaterials* **2003**, *24*, 3437-3444.
- (69) Li Q., Williams C.G., Sun D.D.N., Wang J., Leong K., Elisseff J.H. "Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate" *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *68A*, 28-33.
- (70) De Paepe I., Declercq H., Cornelissen M., Schacht E. "Novel hydrogels based on methacrylate-modified agarose" *Polym.Int.* **2002**, *51*, 867-870.
- (71) Yi H.M., Wu L.Q., Sumner J.J., Gillespie J.B., Payne G.F., Bentley W.E. "Chitosan scaffolds for biomolecular assembly: coupling nucleic acid probes for detecting hybridization" *Biotechnology and bioengineering* **2003**, *83*, 646-652.
- (72) Crescenzi V., Francescangeli A., Taglienti A., Capitani D., L., M. "Synthesis and partial characterization of hydrogels obtained via glutaraldehyde crosslinking of acetylated chitosan" *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1045-1054.
- (73) Kulkarni A.R., Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Dave A.M., Mehta M.H. "Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application" *J. Control. Release* **2000**, *63*, 97-105.
- (74) Hovgaard L., Bronsted H. "Evaluation of biodegradable hydrogels for colon-specific drug delivery" *Macromol. Symp.* **1997**, *123*, 189-194.
- (75) Luo Y., Kirker R.K., Prestwich G.D. "Crosslinked hyaluronic acid hydrogels films: new biomaterials for drug delivery" *J. Control. Release* **2000**, *69*, 169-184.
- (76) Moe S.T., Skjak-Braek G., Smidsrod O. "Covalently cross-linked sodium alginate beads" *Food Hydrocolloids* **1991**, *5*, 119-126.
- (77) Hamdi G., Ponchel G., Duchêne D. "Formulation of epichlorhydrin cross-linked starch microspheres" *J. Microencapsulation* **2001**, *18*, 373-383.
- (78) Mocanu G., Merle L., Carpov A., Muller G. "Immobilisation de biomolécules dans des microparticules de carboxyméthylcelluloses hydrophobiquement modifiées" *Eur. Polym. J.* **2000**, *36*, 2382-2386.
- (79) Park H.J., Park K.H. "Issues of implantable drug delivery systems" *Pharmaceutical Research* **1996**, *13*, 1770-1776.
- (80) Dumitriu S. "Polysaccharides in medicinal applications" *Marcel Dekker, New-York, USA* **1996**.
- (81) Laurent T.C., Helsing K., Gelotte B. "Cross-linked gels of hyaluronic acid" *Acta Chem. Scand.* **1964**, *18*, 274-275.
- (82) Yui N., Okano T., Sakurai Y. "Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels" *J. Control. Release* **1992**, *22*, 105-116.
- (83) Tomihata K., Ikada Y. "Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content" *Biomaterials* **1997**, *18*, 189-195.
- (84) Lee K.Y., Rowley J.A., Eiselt P., Moy E.M., Bouhadir K.H., Mooney D.J. "Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently cross-linker type and cross-linking density" *Macromolecules* **2000**, *33*, 4291-4294.
- (85) Barbucci R., Lamponi S., Borzacchiello A., Ambrosio L., Fini M., Torricelli P., Giardino R. "Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis" *Biomaterials* **2002**, *23*, 4503-4513.
- (86) Annaka M., Ogata Y., Nakahira T. "Swelling behavior of covalently cross-linked gellan gels" *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6755-6760.
- (87) Harsh D.C., Gehrke S.H. "Controlling the swelling characteristics of temperature-sensitive cellulose ether hydrogels" *J. Control. Release* **1991**, *17*, 175-186.
- (88) Cowman M.K., Li M., Dyal A., Balazs E.A. "Tapping mode atomic force microscopy of the hyaluronan derivative, hylan A" *Carbohydrate Polymers* **2000**, *41*, 229-235.
- (89) Lee S., Park D., Chmell S.J. "Viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc): pain and mobility observations from 74 consecutive patients" *J. Knee Surg.* **2004**, *17*, 73-77.
- (90) Goldberg V.M., Coutts R.D. "Pseudoseptic reactions to hylan viscosupplementation: diagnosis and treatment" *Clin. Orthop.* **2004**, *1*, 130-137.

**Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire
et la réparation du cartilage**

- (91) Caglar-Yagci H., Unsal S., Yagci I., Dulgeroglu D., Ozel S. "Safety and efficacy of ultrasound-guided intra-articular hylan G-F 20 injection in osteoarthritis of the hip: a pilot study" *Rheumatol. Int.* **2004**.
- (92) Caborn D., Rush J., Lanzer W., Parenti D., Murray C. "A randomized, single-blind comparison of the efficacy and tolerability of hylan G-F 20 and triamcinolone hexacetonide in patients with osteoarthritis of the knee" *J. Rheumatol.* **2004**, *31*, 333-343.
- (93) Benedetti L., Cortivo R., Berti T., Berti A., Pea F., Mazzo M., Moras M., Abatangelo G. "Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaflon) implanted in rats" *Biomaterials* **1993**, *14*, 1154-1160.
- (94) Giroto D., Urbani S., Brun P., Renier D., Barbucci R., Abatangelo G. "Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds" *Biomaterials* **2003**, *24*, 3265-3275.
- (95) Shu X.Z., Liu Y., Palumbo F., Prestwich G.D. "Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth" *Biomaterials* **2003**, *24*, 3825-3834.
- (96) Luo Y., Prestwich G.D. "Hyaluronic acid-N-hydroxysuccinimide: a useful intermediate for bioconjugation" *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 1085-1088.
- (97) Kasemsuwan T., Bailey T., Jane J. "Preparation of clear noodles with mixtures of tapioca and high-amylose starches" *Carbohydr. Polym.* **1998**, *32*, 301-312.
- (98) Muhammad K., Hussin F., Ghazali Y.C., Kennedy J.F. "Effect of pH on phosphorylation of sago starch" *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42*, 85-90.
- (99) Woo K., Seib P.A. "Crosslinking of wheat starch and hydroxypropylated wheat starch in alkaline slurry with sodium trimetaphosphate" *Carbohydr. Polym.* **1997**, *33*, 263-271.
- (100) Gliko-Kabir I., Yagen B., Penhasi A., Rubinstein A. "Phosphated crosslinking guar for colon-specific drug delivery. I. Preparation and physical characterization." *Journal of controlled release* **2000**, *63*, 121-127.
- (101) Mocanu G., Mihai D., Le Cerf D., Picton L., Muller G. "Synthesis of new associative gel microspheres from carboxymethylpullulan and their interactions with lysozyme" *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 283-289.
- (102) Mocanu G., Mihai D., Picton L., Le Cerf D., Muller G. "Associative pullulan gels and their interaction with biological active substances" *Journal of controlled release* **2002**, *83*, 41-51.
- (103) Dulong V., Lack S., Le Cerf D., Picton L., Vannier J.P., Muller G. "Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization." *Carbohydr. Polym.* **2004**, *57*, 1-6.
- (104) Eiselt P., Lee K.Y., Mooney D.J. "Rigidity of two-component hydrogels prepared from alginate and poly(ethylene glycol)-diamines" *Macromolecules* **1999**, *32*, 5561-5566.
- (105) Prestwich G.D., Marecak D.M., Marecek J.F., Verduyck K.P., Ziebell M.R. "Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives" *J. Control. Release* **1998**, *53*, 93-103.
- (106) Pujol J.P. "Atlas de l'arthrose" *Lequesne M., Menkès C.J., Negma Laboratories* **1995**, 11.
- (107) Kuettner K.E., Aydelotte M.B., Thonar E.J. "Articular cartilage matrix and structure: a minireview" *J. Rheumatol.* **1991**, *27*, 46-48.
- (108) Peyron J., Stanescu V. "Encyclopédie médico-chirurgicale" **1994**, 14-003-A-010.
- (109) Bordji K., Payan E., Oerther S., Baptiste D., Cipolletta C., Jouzeau J.Y., Mainard D., Netter P. "Actualités en biomatériaux : biomatériaux polysaccharidiques" *Rommilat, Paris* **1998**, *4*, 397.
- (110) Bruckner P., Van Der Rest M. "Structure and function of cartilage collagens" *Microsc. Res. Techniq.* **1994**, *28*, 378-384.
- (111) Abatangelo G., O'Regan M. "Hyaluronan: biological role and function in articular joints" *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* **1995**, *15*, 9-15.
- (112) Laurent T.C., Fraser J.R.E. "Hyaluronan" *FASEB J.* **1992**, *6*, 2397-2404.
- (113) Laurent T.C., Laurent U.B.G., Fraser J.R.E. "The structure and function of hyaluronan: An overview" *Immunol. Cell Biol.* **1996**, *74*, A1-7.
- (114) Buckwalter J.A., Mankin H.J. "Articular cartilage repair and transplantation" *Arthritis Rheum.* **1998**, *41*, 1331-1342.
- (115) Schurz J. "Rheology of synovial fluids and substitute polymers" *Pure Appl. Chem.* **1996**, *A33*, 1249.

**Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire
et la réparation du cartilage**

- (116) Bardin T. "Atlas de l'arthrose" *Lequesne M., Menkès C.J., Negma Laboratories 1995*, 24.
- (117) Mainard D., Netter P. "Possibilité de réparation de lésions ostéochondrales" *Cahiers d'enseignement de la sofcot 1997*, 76.
- (118) Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. "The pathophysiology of osteoarthritis and the implication of the use of hyaluronan and hylan as therapeutic agents in viscosupplementation" *J. Rheumatol. 1993*, 39, 19-24.
- (119) Carney S.L., Billingham M.E., Muir H., Sandy J.D. "Structure of newly synthesised (35S)-proteoglycans and (35S)-proteoglycan turnover products of cartilage explant cultures from dogs with experimental osteoarthritis" *J. Orthop. Res. 1985*, 3, 140-147.
- (120) Goa K.L., Benfield P. "Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing" *Drugs 1994*, 47, 536-566.
- (121) Mazières B. "Atlas de l'arthrose" *Lequesne M., Menkès C.J., Negma Laboratories 1995*, 41.
- (122) Praest B.M., Greiling H., Kock R. "Assay of synovial fluid parameters: hyaluronan concentration as a potential marker for joint diseases" *Clin. Chim. Acta 1997*, 266, 117-128.
- (123) Kvam B.J., Fragonas A., Kvam C., Matulova M., Pollesello P., Zanetti F., Vittur F. "Oxygen-derived free radical (ODFR) action on hyaluronan (HA), on two HA ester derivatives, and on the metabolism of articular chondrocytes" *Exp. Cell Res. 1995*, 218, 79-86.
- (124) Nishimura M., Yan M., Mukudai Y., Nakamura S., Nakamura K., Kawata M., Kawamoto T., Noshiro M., Hamada T., Kato Y. "Role of chondroitin sulfate-hyaluronan interactions in the viscoelastic properties of extracellular matrices and fluids" *Biochim. Biophys. Acta. 1998*, 1380, 1-9.
- (125) Schurz J., Ribitsch V. "Rheology of synovial fluid" *Biorheology 1987*, 24, 385-399.
- (126) Laurent T.C., Balazs E.A. "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, structure of hyaluronic acid" *Academic Press, London 1970*, 1241.
- (127) Asari A., Miyauchi S., Matsuzaka S., Ito T., Kominami E., Uchiyama Y. "Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium" *Arch. Histol. Cytol. 1998*, 61, 125-135.
- (128) Balazs E.A., Leshchiner E., Larsen N.E., Band P. "Hyaluronan biomaterials : medical applications" *Handbook of biomaterials and applications, Wise Ed., New York 1995*.
- (129) Roure I. "thèse de doctorat, Université Joseph Fourier (Grenoble I), Grenoble, France 1998.
- (130) Frenkel S.R., Di Cesare P.E. "Scaffolds for articular cartilage repair" *Ann. Biomed. Eng. 2004*, 32, 26-34.
- (131) Coutts R.D., Healey R.M., Ostrander R., Sah R.L., Goomer R., Amiel D. "Matrices for cartilage repair" *Clin. Orthop. 2001*, 391S, 271-279.
- (132) Solchaga L.A., Goldberg V.M., Caplan A.I. "Cartilage regeneration using principles of tissue engineering" *Clin. Orthop. 2001*, 391S, S161-S170.
- (133) Athanasiou K.A., Shah A.R., Hernandez R.J., LeBaron R.G. "Basic science of articular cartilage repair" *Clinics in sports medicine 2001*, 20, 223-247.
- (134) Hunziker E.B. "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects" *Osteoarthritis and Cartilage 2001*, 10, 432-463.
- (135) Temenoff J.S., Mikos A.G. "Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering" *Biomaterials 2000*, 21, 2405-2412.
- (136) Temenoff J.S., Mikos A.G. "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage" *Biomaterials 2000*, 21, 431-440.
- (137) Grande D.A., Pitman M.I., Peterson L., Menche D., Klein M. "The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation" *J. Orthop. Res. 1989*, 7, 208-218.
- (138) Hauselmann H.J., Flura T., Marti C., Hauser N., Hedbom E. "From chondrocyte culture to joint cartilage replacement. Development of de novo cartilage in vitro" *Schweiz Med. Wochenschr. 1998*, 128, 824-832.
- (139) Klompmaker J., Jansen H.W., Verth R.P., Nielsen H.K., De Groot J.H., Pennings M.J. "Porous polymer implants for repair of full-thickness defects of articular cartilage: An experimental study in rabbit and dog" *Biomaterials 1992*, 13, 625-634.
- (140) Mainard D., Benichoux R., Lochon P., Delagoutte J.P., Cuny I. "Progrès récents des Biomatériaux" *Benichoux R. & Lacoste J. (ed), Masson, Paris 1988*, 74.

**Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire
et la réparation du cartilage**

- (141) Ishaug-Riley S.L., Okun L.E., Prado G., Applegate M.A., Ratcliffe A. "Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films" *Biomaterials* **1999**, *20*, 2245-2256.
- (142) Drury J.L., Mooney D.J. "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications" *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337-4351.
- (143) Hoffman A.S. "Hydrogels for biomedical applications" *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2002**, *43*, 3-12.
- (144) Gutowska A., Jeong B., Jasionowski M. "Injectable gels for tissue engineering" *The anatomical record* **2001**, *263*, 342-349.
- (145) Lee K.Y., Mooney D.J. "Hydrogels for tissue engineering" *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 1869-1877.
- (146) Seal B.L., Otero T.C., Panitch A. "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration" *Materials Science and Engineering* **2001**, *34*, 147-230.
- (147) Corkhill P.H., Fitton J.H., Tighe B.J. "Towards a synthetic articular cartilage" *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1993**, *4*, 615-630.
- (148) Jen A.C., Wake M.C., Mikos A.G. "Hydrogels for cell immobilization" *Biotechnology and bioengineering* **1996**, *50*, 357-364.
- (149) Smetana K.Jr. "Cell biology of hydrogels" *Biomaterials* **1993**, *14*, 1046-1050.
- (150) Nuttelman C.R., Mortisen D.J., Henry S.M., Anseth K.S. "Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration" *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *57*, 217-223.
- (151) Bo J. "Study of PVA hydrogel crosslinked by epichlorhydrin" *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, *46*, 783-786.
- (152) Orienti I., Treré R., V., Z. "Hydrogels formed by cross-linked polyvinylalcohol as colon-specific drug delivery systems" *Drug Dev. Ind. Pham.* **2001**, *27*, 877-884.
- (153) Cascone M.G., Laus M., Ricci D., Sbarbati del Guerra R. "Evaluation of poly(vinyl alcohol) hydrogels as a component of hybrid artificial tissues" *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1995**, *6*, 71-75.
- (154) Cascone M.G., Barbani N., Cristallini C., Giusti P., Ciardelli G., Lazzeri L. "Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides" *J. Biomater. Sci.: Polymer Ed.* **2001**, *12*, 267-281.
- (155) Cauich-Rodriguez J.V., Deb S., Smith R. "Effect of cross-linking agents on the dynamic mechanical properties of hydrogel blends of poly(acrylic acid)-poly(vinyl alcohol-vinyl acetate)" *Biomaterials* **1996**, *17*, 2259-2264.
- (156) Cauich-Rodriguez J.V., Deb S., Smith R. "Physicochemical characterization of hydrogels based on polyvinyl alcohol-vinyl acetate blends" *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *82*, 3578-3590.
- (157) Gu Z.Q., Xiao J.M., Zhang X.H. "The development of artificial articular cartilage-PVA-hydrogel" *Biomed. Mater. Eng.* **1998**, *8*, 75-81.
- (158) Nuttelman C.R., Henry S.M., Anseth K.S. "Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds" *Biomaterials* **2002**, *23*, 3617-3626.
- (159) Schmedlen R.H., Masters K.S., West J.L. "Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering" *Biomaterials* **2002**, *23*, 4325-4332.
- (160) Oxley H.R., Corkhill P.H., Fitton J.H., Tighe B.J. "Macroporous hydrogels for biomedical applications: methodology and morphology" *Biomaterials* **1993**, *14*, 1064-1072.
- (161) Malmonge S.M., Arruda A.C. "Artificial articular cartilage: mechano-electrical transduction under dynamic compressive loading" *Artif. Organs* **2000**, *24*, 174-178.
- (162) Malmonge S.M., Zavaglia C.A., Belangero W.D. "Biomechanical and histological evaluation of hydrogel implants in articular cartilage" *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2000**, *33*, 307-312.
- (163) Stile R.A., Burghardt W.R., Healy K.E. "Synthesis and Characterization of Injectable Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels That Support Tissue Formation in Vitro" *Macromolecules* **1999**, *32*, 7370-7379.
- (164) Huh K.M., Hashi J., Ooya T., Yui N. "Synthesis and characterization of dextran grafted with poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethyl-acrylamide)" *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 613-619.
- (165) Sims C.D., Butler P.E.M., Casanova R., Lee B.T., Randolph M.A., Lee W.P.A., Vacanti C.A., Yaremchuk M.J. "Injectable cartilage using polyethylene oxide polymer substrates" *Plast. Reconstr. Surg.* **1996**, *98*, 843-850.

**Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire
et la réparation du cartilage**

- (166) Bryant S.J., Anseth K.S. "The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels" *Biomaterials* **2001**, 22, 619-626.
- (167) West J.L., Hubbell J.A. "Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration" *Macromolecules* **1999**, 32, 241-244.
- (168) Elisseeff J.H., Anseth K. "Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation" *Proc Natl Acad Sci* **1999**, 96, 3104-3107.
- (169) Huh K.M., Bae Y.H. "Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)/poly(L-lactic acid) alternating multiblock copolymers" *Polymer* **1999**, 40, 6147-6155.
- (170) Jeong B., Bae Y.H., Lee D.S., Kim S.W. "Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems" *Nature* **1997**, 388, 860-862.
- (171) Lee C.H., Singla A., Lee Y. "Biomedical applications of collagen" *Int.J.Pharm.* **2001**, 221, 1-22.
- (172) Kawamura S., Wakitani S., Kimura T., Maeda A., Caplan A.I., Shino K., Ochi T. "Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it" *Acta Orthop. Scand.* **1998**, 69, 56-62.
- (173) Nehrer S., Breinan H.A., Ramappa A., Shortkroff S., Young G., Minas T., Sledge C.B., Yannas I.V., Spector M. "Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro" *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 38, 95-104.
- (174) Lee C.R., Grodzinsky A.J., Spector M. "The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation, and biosynthesis" *Biomaterials* **2001**, 22, 3145-3154.
- (175) Park S.N., Park J.C., Kim H.O., Song M.J., Suh H. "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide crosslinking" *Biomaterials* **2002**, 23, 1205-1212.
- (176) Chevally B., Abdul-Malak N., Herbage D. "Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds: influence of crosslinking with diphenylphosphorylazide on matrix reorganization, growth, and biosynthetic and proteolytic activities" *J.Biomed.Mater.Res.* **1999**, 49, 448-459.
- (177) Schoof H., Apel J., Heschel I., Rau G. "Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges" *J.Biomed.Mater.Res.* **2001**, 58, 352-357.
- (178) Tan W., Krishnaraj R., Desai T.A. "Evaluation of nanostructured composite collagen-chitosan matrices for tissue engineering" *Tissue Eng.* **2001**, 7, 203-210.
- (179) Chen G., Ushida T., Tateishi T. "Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering" *Materials Science and Engineering* **2001**, 17, 63-69.
- (180) Huang L.K., Nagapudi K., Apkarian R.P., Chaikof E.L. "Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics" *J.Biomater.Sci.:Polymer Ed.* **2001**, 12, 979-993.
- (181) Perka C., Spitzer R.S., Lindenhayn K., Sittinger M., Schultz O. "Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants" *J.Biomed.Mater.Res.* **2000**, 49, 305-311.
- (182) Homminga G.N., Buma P., Koot H.W., Kraan P.M., Berg W.B. "Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro" *Acta Orthop. Scand.* **1993**, 64, 441-445.
- (183) Sims C.D., Butler P.E.M., Cao Y.L., Casanova R., Randolph M.A., Black A., Vacanti C.A., Yaremchuk M.J. "Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes" *Plast. Reconstr. Surg.* **1998**, 101, 1580-1585.
- (184) Ting V., Sims C.D., Brecht L.E., McCarthy J.G., Kasabian A.K., Connelly P.R., Elisseeff J.H., Gittes G.K., Longaker M.T. "In vitro prefabrication of human cartilage shapes using fibrin glue and human chondrocytes" *Ann.Plast.Surg.* **1998**, 40, 413-421.
- (185) Meinhart J., Fussenegger M., Hobling W. "Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction" *Ann.Plast.Surg.* **1999**, 42, 673-678.
- (186) Silverman R.P., Passaretti D., Huang W., Randolph M.A., Yaremchuk M.J. "Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer" *Plast. Reconstr. Surg.* **1999**, 103, 1809-1818.
- (187) Hunziker E.B. "Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements" *Clin.Orthop.* **1999**, 367, S135-146.

**Chapitre I : Généralités sur les hydrogels et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire
et la réparation du cartilage**

- (188) vanSusante J.L.C., Buma P., Schuman L., Homminga G.N., Berg W.B., Veth R.P. "Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat" *Biomaterials* **1999**, *20*, 1167-1175.
- (189) Deming T.J. "Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture" *Nature* **1997**, *390*, 386-389.
- (190) Kisiday J., Jin M., Kurz B., Hung H., Semino C., Zhang S., Grodzinsky A.J. "Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair" *PNAS* **2002**, *99*, 9996-10001.
- (191) O'Brien J.P. "New structure polymers from nature" *Trends Polym. Sci.* **1993**, *8*, 228.
- (192) Petka W.A., Harden J.L., McGrath K.P., Wirtz D., Tirell D. "Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins" *Science* **1998**, *281*, 389-392.
- (193) McMillan R.A., Conticello V.P. "Synthesis and Characterization of Elastin-Mimetic Protein Gels Derived from a Well-Defined Polypeptide Precursor" *Macromolecules* **2000**, *33*, 4809-4821.
- (194) Mierisch CM, W. H., Turner MA, Milbrandt TA, Berthoux L, Hammarskjold ML, Rekosh D, Balian G, Diduch DR. "Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells" *J. Bone Joint Surg. Am.* **2003**, *85*, 1757-1767.
- (195) Park D.J., Bong J.P., Park S.Y., Hong K.S. "Cartilage generation using alginate-encapsulated autogenous chondrocytes in rabbits" *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **2000**, *109*, 1157-1161.
- (196) Fragonas E., Valente M., Pozzi-Mucelli M., Toffanin R., Rizzo R., Silvestri F., Vittur F. "Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate" *Biomaterials* **2000**, *21*, 795-801.
- (197) Paige K.T., Vacanti C.A. "Engineering new tissue: formation of neo-cartilage" *Tissue Eng.* **1995**, *1*, 97-106.
- (198) Guo J.F., Jourdan G.W., McCallum D.K. "Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads" *Connect. Tissue Res.* **1989**, *19*, 277-297.
- (199) Paige K.T., Cima L.G., Yaremchuk M.J., Vacanti C.A. "Injectable cartilage" *Plast. Reconstr. Surg.* **1995**, *96*, 1390-1400.
- (200) Liu H., Lee Y.W., Dean M.F. "Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads" *Biochim Biophys Acta.* **1998**, *1425*, 505-515.
- (201) Hauselmann H.J., Fernandes R.J., Mok S.S., Schmid T.M., Block J.A., Aydelotte M.B., Kuettner K.E., Thonar E.J. "Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads" *J. Cell Sci.* **1994**, *107*, 17-27.
- (202) Aydelotte M.B., Thonar E.J., Mollenhauer J., Flechtenmacher J. "Culture of chondrocytes in alginate gel: variations in conditions of gelation influence the structure of the alginate gel, and the arrangement and morphology of proliferating chondrocytes" *In Vitro Cell Develop. Biol. Anim.* **1998**, *34*, 123-130.
- (203) Hyc A., Malejczyk J., Osiecka A., Moskalewski S. "Immunological response against allogeneic chondrocytes transplanted into joint surface defects in rats" *Cell Transplant.* **1997**, *6*, 119-124.
- (204) Gigant-Huselstein C., Dumas D., Hubert P., Baptiste D., Dellacherie E., Mainard D., Netter P., Payan E., Stoltz J.F. "Influence of mechanical stress on extracellular matrixes synthesized by chondrocytes seeded onto alginate and hyaluronate-based 3D biosystems" *Journal of Mechanics in Medicine and Biology* **2003**, *1*, 59-70.
- (205) Miralles G., Baudoin R., Dumas D., Baptiste D., Hubert P., Stoltz J.F., Dellacherie E., Mainard D., Netter P., Payan E. "Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: in vitro engineering of cartilage" *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *57*, 268-278.
- (206) Oerther S., Payan E., Lapique F., Presle N., Hubert P., Muller S., Netter P. "Hyaluronate-alginate combination for the preparation of new biomaterials: investigation of the behaviour in aqueous solutions" *Biochim Biophys Acta.* **1999**, *1426*, 185-194.
- (207) Lindenhayn K., Perka C., Heilmann H.H., Pommerening K., Mennicke J., M., S. "Retention of hyaluronic acid in alginate beads: aspects for in vitro cartilage engineering" *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *44*, 149-155.
- (208) Smeds K.A., Pfister-Serres A., Hatchell D.L., Grinstaff M.W. "Synthesis of a novel polysaccharide hydrogel" *Pure Appl. Chem.* **1999**, *A36*, 981-989.

Chapitre II
Synthèse et caractérisation
physico-chimique de dérivés de
hyaluronate

1. INTRODUCTION

L'objectif de ce travail était de préparer des dérivés de hyaluronate de sodium, d'une part substitués par des chaînes alkyle longues et, d'autre part réticulés chimiquement. Ces dérivés sont susceptibles de former des gels forts en milieu aqueux, par l'existence simultanée de deux processus de réticulation : l'un réversible sous l'effet d'associations hydrophobes et l'autre irréversible par liaisons covalentes. Ces hydrogels ont été préparés et étudiés dans l'optique de les utiliser pour la réparation du cartilage.

De précédents travaux ont permis de mettre au point la préparation de dérivés amphiphiles de hyaluronate^{1,2}. Les propriétés physico-chimiques en solution aqueuse des dérivés obtenus ont été étudiées en régime dilué (viscosimétrie, spectroscopie de fluorescence, tensiométrie de surface) et en régime semi-dilué, par des méthodes rhéologiques. L'ensemble de ces études physico-chimiques a permis de mettre en évidence le caractère associatif des dérivés amphiphiles préparés. Etant donnée l'application biomédicale visée (préparation de biomatériaux de comblement de lésions ostéochondrales), les hydrogels obtenus ont été évalués selon le cahier des charges inhérent à ce type de biomatériaux (cf chapitre I). Ces études ont montré que les dérivés amphiphiles de hyaluronate étaient des matériaux prometteurs pour la réparation du cartilage, tant au niveau des propriétés rhéologiques que des propriétés biologiques chez le rat³. En effet, d'un point de vue mécanique, les hydrogels préparés se sont révélés être suffisamment visqueux pour pouvoir être maintenus dans une lésion et leur caractère rhéofluidifiant les a rendu particulièrement malléables pour leur implantation. L'étude *in vitro* a permis de mettre en évidence le caractère biocompatible et non cytotoxique de ces dérivés, et l'existence d'une certaine affinité des chondrocytes à leur égard. Après implantation *in vivo* dans les lésions ostéochondrales de rat, les hydrogels ont effectivement joué leur rôle de tuteur pour la recolonisation cellulaire et la synthèse d'un néotissu.

Pourtant, dans l'hypothèse du comblement d'une lésion ostéochondrale chez l'homme, il y a risque de dilution du biomatériau par les fluides biologiques, par destructuration des réticulations physiques réversibles, avant qu'il ait eu la possibilité de remplir son rôle de tuteur. Le problème du maintien de ce tuteur dans la lésion est donc posé. Nous avons alors projeté de renforcer la stabilité des hydrogels vis-à-vis des milieux aqueux, tout en conservant leurs propriétés rhéofluidifiantes. Dans ce but, nous avons envisagé d'associer à la réticulation physique réversible en milieu aqueux, une réticulation chimique irréversible en faible proportion, afin de conserver le caractère rhéofluidifiant des dérivés amphiphiles (Figure 1). Le moyen utilisé pour parvenir à cet objectif a

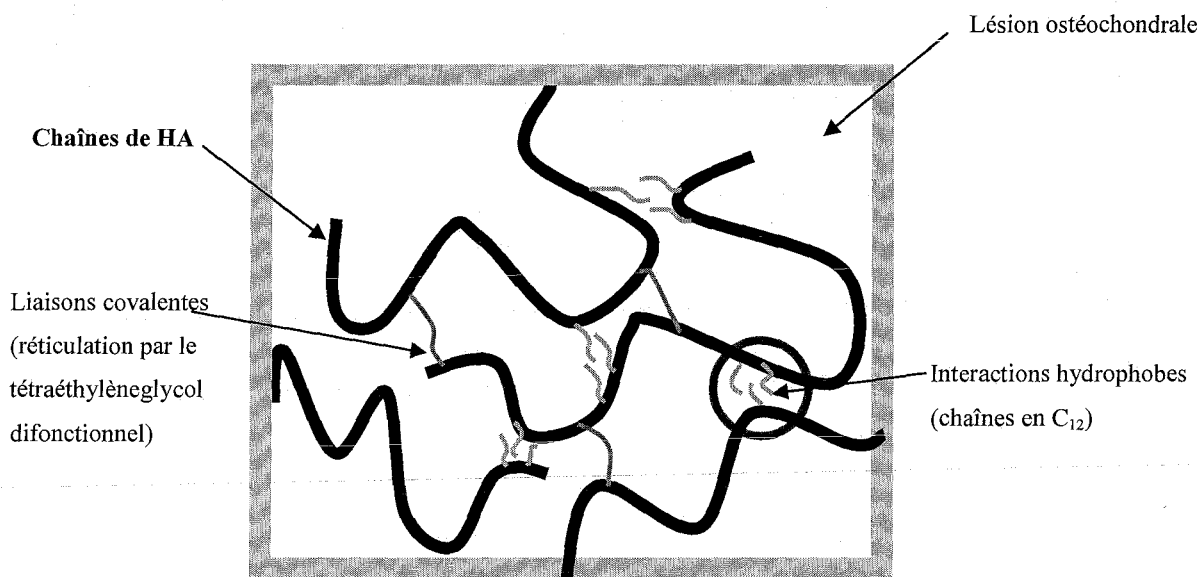


Figure 1 : Structure visée pour l'hydrogel

Origine de l'acide hyaluronique	Concentration (g/100g)
Humeur vitreuse humaine	0,02
Peau (homme adulte)	0,03 à 0,09
Liquide synovial (homme adulte)	0,14 à 0,36
Cordon ombilical humain	0,3
Crête de coq	0,75
Cerveau bovin	0,015

Tableau 1 : Concentrations en acide hyaluronique pour différentes origines, d'après Laurent⁹

Origine de l'acide hyaluronique	Masse molaire moyenne en masse (g.mol ⁻¹)
Cordon ombilical humain	3,4.10 ⁶
Humeur vitreuse bovine	7,7.10 ⁴ à 1,7.10 ⁶
Liquide synovial bovin	14.10 ⁶
Liquide synovial humain	
sain	6.10 ⁶
dégénéré	2,7.10 ⁶
Crête de coq	1,2.10 ⁶

Tableau 2 : Masse molaire moyenne en masse de l'acide hyaluronique selon son origine, d'après Laurent⁹

été la préparation de dérivés de hyaluronate, substitués par des chaînes alkyle sur les groupements carboxylates par l'intermédiaire de liaisons ester, et réticulés par du tétraéthylèneglycol ditosylé.

Les objectifs de ce travail étaient :

- de mettre au point l'élaboration d'hydrogels doublement réticulés et donc la synthèse des dérivés de hyaluronate HA correspondants,
- de réaliser la synthèse de systèmes présentant des caractéristiques mécaniques adaptées à nos applications,
- d'effectuer la caractérisation physico-chimique de ces produits.

2. GENERALITES SUR LE HYALURONATE DE SODIUM

En 1934, Meyer et Palmer isolent de l'humeur vitreuse bovine une substance qu'ils nomment acide hyaluronique⁴. Dans le milieu physiologique, cette substance forme un gel transparent qui recouvre la cornée et protège le globe oculaire des déformations⁵. Ce composé est en fait omniprésent dans le règne animal, de la bactérie à l'homme, et joue d'importants rôles mécaniques et physiologiques (protection cellulaire, activation de la différenciation cellulaire lors de la croissance, lubrification des articulations...)⁵⁻⁷.

2.1. Origine

L'acide hyaluronique est un polysaccharide synthétisé par de nombreux tissus conjonctifs tels que la peau, le cordon ombilical, la synoviale,...et ce chez l'ensemble des vertébrés^{8,9}. Le tableau 1 regroupe les concentrations en acide hyaluronique pour différentes origines.

Les principales formes d'acide hyaluronique commercialisées sont extraites de crête de coq, de cordon ombilical ou d'humeur vitreuse. Selon son origine et son mode d'extraction, le hyaluronane a une masse molaire variable, de 10^4 à 10^6 g.mol⁻¹ (Tableau 2) (le terme hyaluronane est utilisé indifféremment pour désigner l'acide hyaluronique ou le hyaluronate de sodium).

L'acide hyaluronique peut être également obtenu par fermentation à partir des bactéries *Streptococcus zooepidemicus*¹⁰. Cette méthode permet sa production avec des rendements importants (6 à 10 g de hyaluronane pour 1 kg de moûts de fermentation) par rapport aux méthodes d'extraction.

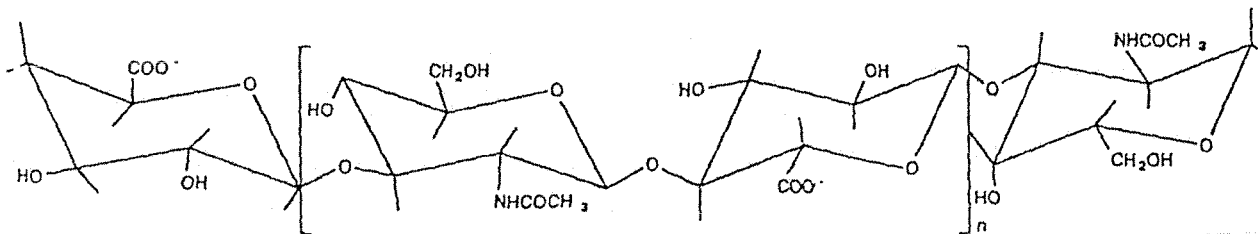


Figure 2 : Représentation schématique de la structure du hyaluronate

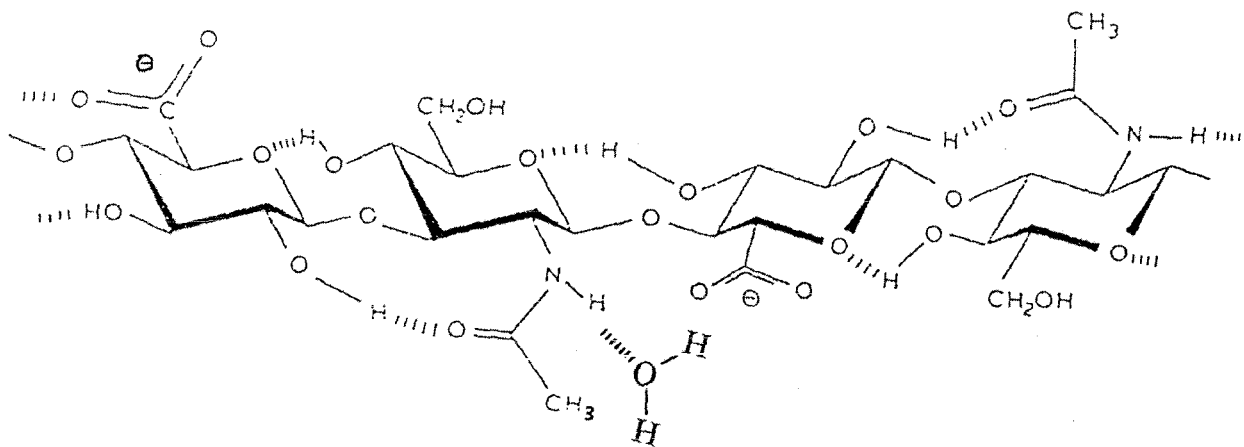


Figure 3 : Structure secondaire d'une chaîne de hyaluronate en solution dans un mélange $\text{Me}_2\text{SO}/\text{H}_2\text{O}$, d'après Kvam et coll.¹⁸

2.2. Structure

D'après les travaux datant des années 60 de Weissmann et Meyer¹¹ et de Jeanloz et Flowers¹², le hyaluronane est un polysaccharide composé d'un enchaînement linéaire non ramifié de motifs disaccharidiques constitués d'acide D-glucuronique lié en β (1 \rightarrow 3) à la N-acétyl-D-glucosamine. Les motifs disaccharidiques sont associés les uns aux autres en β (1 \rightarrow 4) (Figure 2). Il peut exister sous forme acide, l'acide hyaluronique, ou sous forme de sel, essentiellement de sodium, le hyaluronate de sodium HA.

La structure du hyaluronane à l'état solide a été principalement étudiée par diffraction des rayons X. Winter *et coll.*¹³ ont montré que ce polysaccharide possédait une conformation en hélice stabilisée par des liaisons hydrogène. Les structures secondaire et tertiaire du hyaluronate en solution ont principalement été étudiées par dichroïsme circulaire et résonance magnétique nucléaire. Selon Scott¹⁴, la macromolécule de hyaluronate en solution aqueuse est stabilisée sous forme hélicoïdale par des liaisons hydrogène intramoléculaires parallèles à l'axe de la chaîne, impliquant les groupements carboxylate, acétamide, hydroxyle et éther. Cette structure a été confirmée par de nombreuses expériences de RMN (¹H et ¹³C)¹⁵⁻¹⁷, qui ont également mis en évidence que la liaison hydrogène entre les groupements carboxylate et acétamide s'établissait par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Figure 3)^{15,16,18,19}.

De même, par RMN ¹H, Darke *et coll.*²⁰ ont démontré la présence de zones rigides le long de la chaîne macromoléculaire, ces zones bloquant la relaxation des groupements acétamide. La chaîne de hyaluronate serait donc constituée par l'alternance de portions rigides ordonnées, maintenues par les liaisons hydrogène, et de zones désordonnées flexibles.

2.3. Propriétés physico-chimiques du hyaluronate en solution aqueuse

Le HA est un polyélectrolyte. De ce fait, dans l'eau pure, aux faibles concentrations en polymère, les répulsions électrostatiques entre les fonctions carboxylates génèrent une expansion des pelotes macromoléculaires, se traduisant par une augmentation de la viscosité en solution. Son pK_a apparent en solution est de l'ordre de 3,2⁹. Il est parfaitement soluble en solution aqueuse.

Rinaudo *et coll.* ont étudié le comportement du HA, en régime dilué dans l'eau pure ou en présence d'une très faible force ionique^{10,21}. Ils ont montré que la viscosité réduite d'une solution de hyaluronate préparée dans ces conditions varie en fonction de la concentration en polymère et

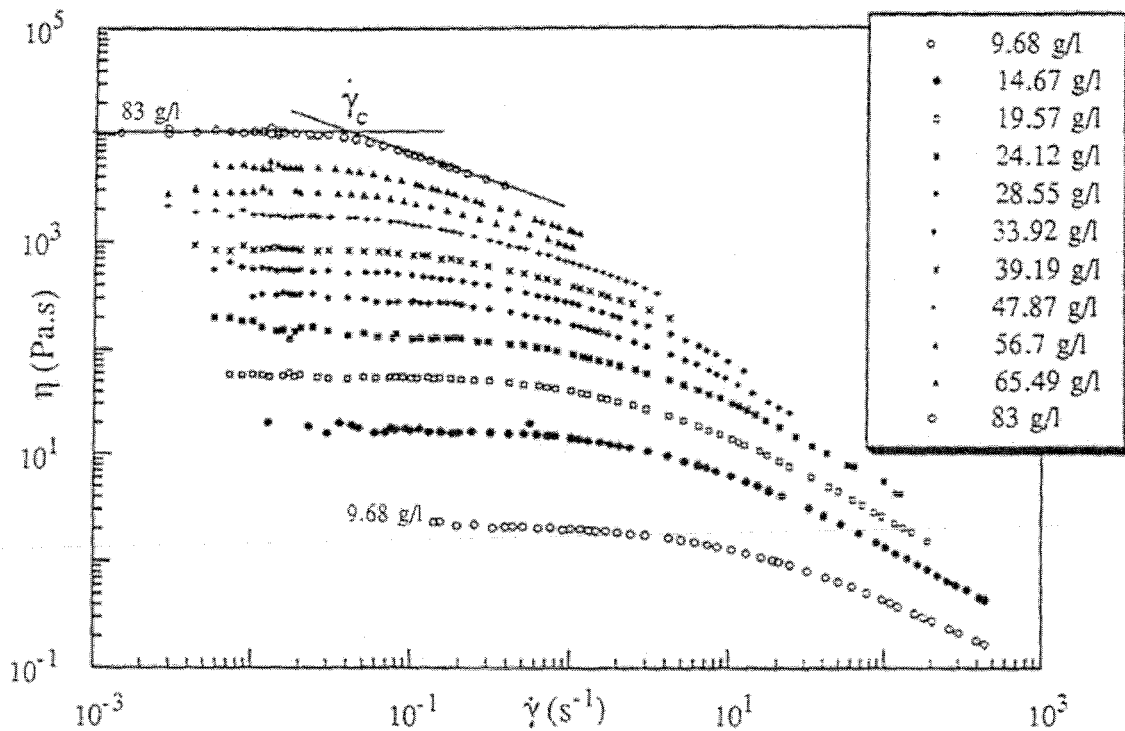


Figure 4 : Variation de la viscosité (η) de solutions de HA (masse molaire $1,3 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), en fonction de la vitesse de cisaillement ($\dot{\gamma}$), à différentes concentrations (en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), NaCl $0,15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7, 25°C^{10}

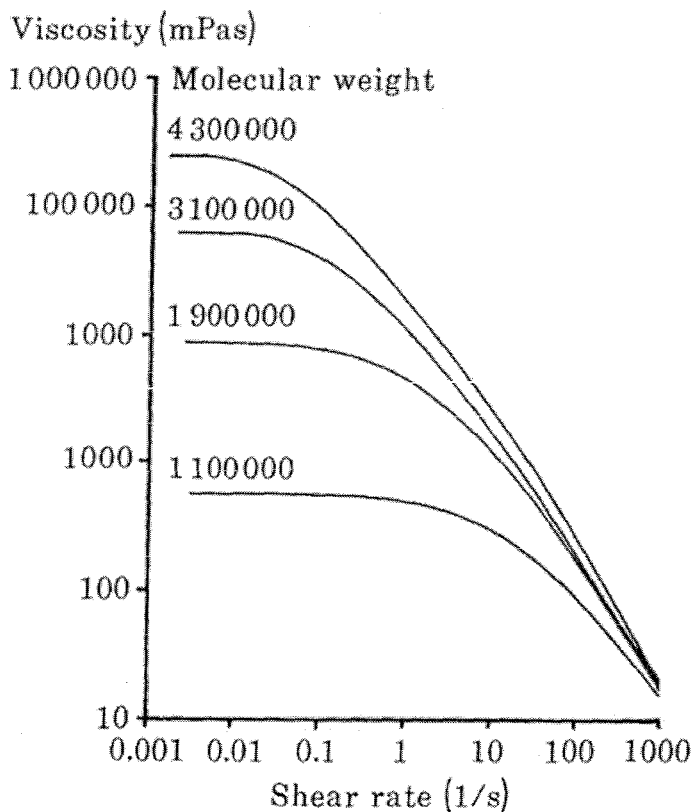


Figure 5 : Variation de la viscosité (η) de solutions de HA de différentes masses molaires en fonction de la vitesse de cisaillement ($\dot{\gamma}$) à $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $0,15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7, 25°C^{22}

passé par un maximum, dont la position ne dépend que de la force ionique. Ce maximum est directement relié à l'existence d'interactions interchaînes à longue distance, dues aux répulsions électrostatiques qui sont d'autant plus fortes que la force ionique diminue. Après calcul de la longueur de persistance (70 \AA) et du paramètre de flexibilité (0,06) en l'absence de répulsions électrostatiques, le HA peut être considéré comme un polysaccharide semi-rigide.

Des études concernant le comportement rhéologique des solutions de HA en régime semi-dilué et les différents paramètres pouvant influencer ce comportement (concentration en polymère, masse molaire, force ionique, pH, nature de l'ion compensateur, température...) ont été réalisées depuis plus de 30 ans. Dans la mesure où les dérivés que nous avons synthétisés n'ont été caractérisés que dans des conditions bien définies (37°C , $[\text{NaCl}]=0,15 \text{ mol.L}^{-1}$), nous ne discuterons que des effets de la masse molaire du HA et de sa concentration sur les propriétés rhéologiques de ses solutions aqueuses.

En régime permanent, aux faibles vitesses de cisaillement, les solutions de HA ont une viscosité constante, nommée viscosité au premier plateau newtonien η_0 . Cette viscosité est d'autant plus élevée que la concentration (Figure 4,¹⁰) ou la masse molaire (Figure 5,²²) augmente.

Au-delà d'une vitesse de cisaillement critique, le système devient pseudo-plastique²³ et adopte un comportement rhéofluidifiant, cette diminution de viscosité étant attribuée au désenchevêtrement progressif des chaînes macromoléculaires de HA²². L'apparition du comportement rhéofluidifiant est, bien évidemment, liée à la concentration en HA ainsi qu'à sa masse molaire. Dans le cas de solutions de HA de faible masse molaire ou de concentrations peu élevées, les chaînes macromoléculaires en solution ne sont pas, ou très peu, enchevêtrées, et leur comportement rhéologique est quasi newtonien²⁴.

En régime oscillatoire, les solutions de HA ont un comportement typiquement viscoélastique. Aux faibles fréquences, leur comportement est visqueux : le module de perte G'' est supérieur au module élastique G' , ces modules G'' et G' variant respectivement en ω et ω^2 . Quand la fréquence augmente, le comportement de ces solutions devient progressivement élastique (G' est supérieur à G'' , les deux modules étant quasiment indépendants de la fréquence) (Figure 6).

Les modules G' et G'' sont d'autant plus élevés que la masse molaire du HA est importante (ou sa concentration en solution). Les plages de fréquence, correspondant aux domaines de comportement visqueux et de comportement élastique, se décalent vers les hautes fréquences avec cette augmentation, ce qui reflète une intensification du niveau d'enchevêtrement des

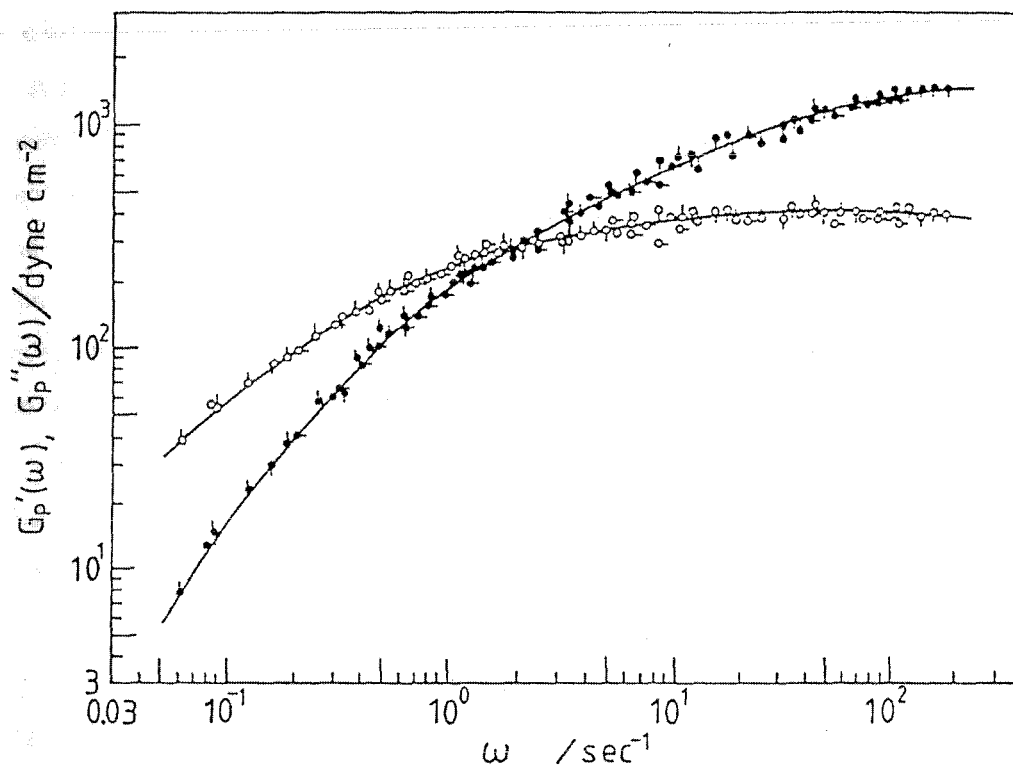


Figure 6 : Variation des modules élastique G' (ronds pleins) et visqueux G'' (ronds vides) pour une solution à 10 g.L^{-1} de HA $\overline{M}_v = 2.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, 25°C ²⁶

macromolécules en solution²⁵. Ainsi, selon Yanaki et Yamaguchi²⁶, si on considère des chaînes de HA courtes (masse molaire moyenne viscosimétrique $\overline{M}_v < 3,5.10^4 \text{ g.mol}^{-1}$) en solution à 10 g.L^{-1} dans $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, les macromolécules sont dispersées. Puis, lorsque \overline{M}_v augmente, les chaînes s'enchevêtrent et forment un réseau de plus en plus compact. Enfin, pour des \overline{M}_v supérieures à $1,6.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, le réseau est dit saturé, ce qui signifie que les propriétés rhéologiques des solutions de HA considérées deviennent quasi indépendantes de la masse molaire. En outre, au réseau dû à l'enchevêtrement des chaînes, se superposerait un réseau temporaire, formé par des liaisons hydrogène intermoléculaires. Ainsi, des interactions transitoires entre les portions rigides, stabilisées par liaisons hydrogène, seraient à l'origine du caractère viscoélastique prononcé des solutions de HA.

2.4. Applications

Les propriétés rhéologiques particulières du HA en solution et ses fonctions biologiques spécifiques ont été mises à profit dans les domaines de l'ophtalmologie (Healon[®], Viscoat[®], Amvisc[®]...) et du traitement des pathologies ostéoarticulaires (Hyalgan[®], ARTZ[®]...).

Pour constituer un réel substitut du liquide synovial, des dérivés réticulés du HA ont été développés, ce sont les hylanes²⁷. Ils sont obtenus par réticulation chimique du HA par l'intermédiaire de ses fonctions hydroxyle. Synvisc[®] en est une des formes commerciales utilisées en viscosupplémentation. De tels dérivés font l'objet de nombreux brevets, principalement déposés par Balasz *et coll.*^{28,29}.

Il intervient également pour des applications cosmétologiques, dans la formulation de crèmes ou de gels, en raison de sa capacité à capter des molécules d'eau³⁰.

Le fort taux d'hydratation des gels de HA, associé à son action positive sur la différenciation et la prolifération cellulaires, en font également des matériaux de choix pour la réparation de nombreux tissus, dont notamment la peau^{5,31}.

Le HA a également été proposé comme polymère porteur pour la vectorisation de principes actifs³², car il présente l'avantage d'être totalement biocompatible et « invisible » pour le système immunitaire. De plus, de nombreuses cellules possèdent des récepteurs spécifiques du HA, ce qui pourrait faciliter le ciblage de médicaments.

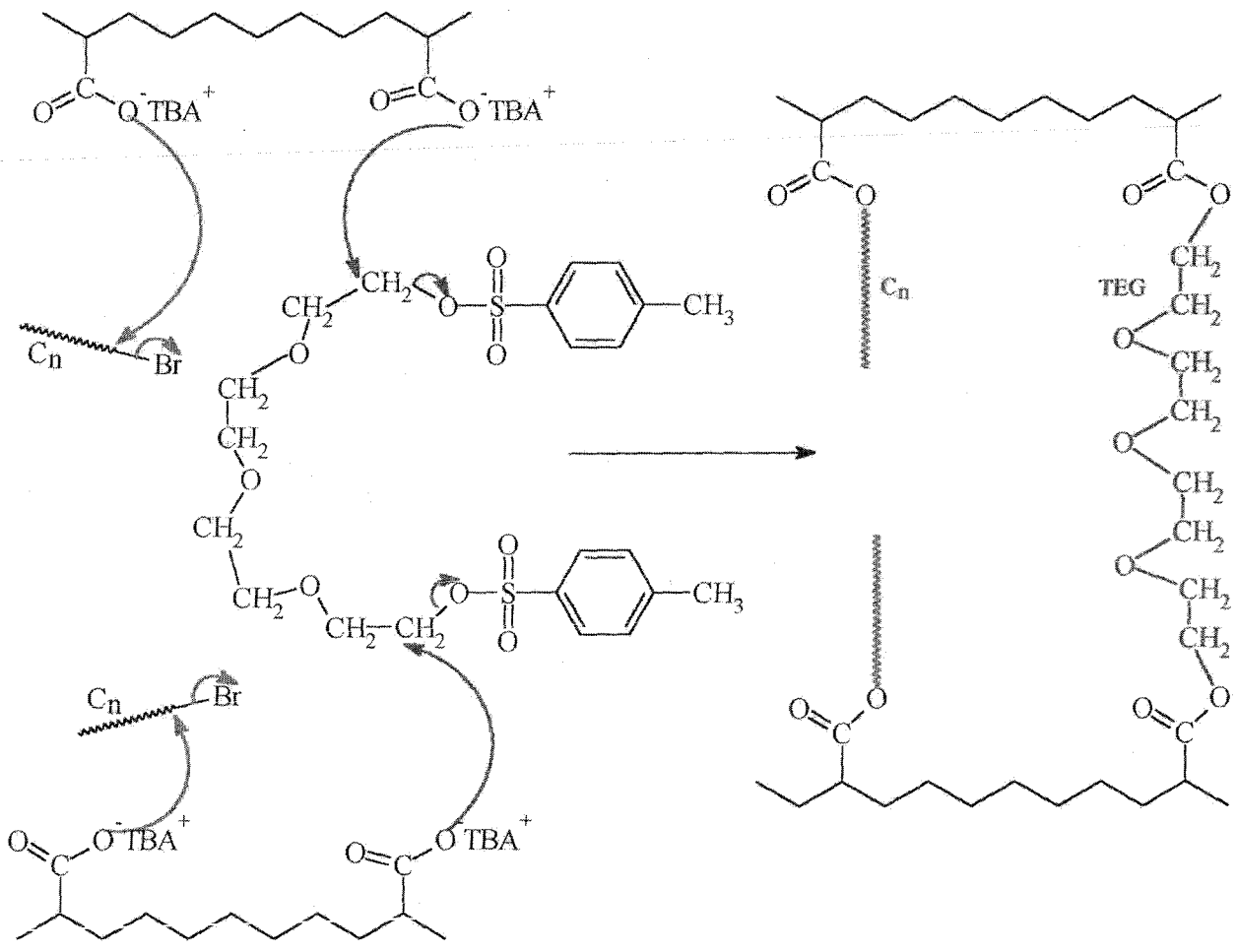


Figure 7 : Mécanisme de la double fonctionnalisation

3. MODIFICATION CHIMIQUE DU HYALURONATE

3.1. Les hyaluronates parents

Différents HA ont été utilisés pour cette étude.

Le premier HA nous a été fourni par la société Bioiberica et possède une masse molaire moyenne en masse \overline{M}_w de 600 000 g.mol⁻¹, mesurée par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser multi-angles.

Le deuxième HA utilisé provient de Acros Organics (Hyaluronate de sodium 95%, lot A0108860) et possède une \overline{M}_w mesurée de 1 300 000 g.mol⁻¹. Il est référencé Acros1.

Le troisième HA utilisé provient également de Acros Organics (Hyaluronate de sodium 95%, lot A0147769) et possède aussi une \overline{M}_w mesurée de 1 300 000 g.mol⁻¹. La quantité de protéines présentes est inférieure à 0,2%. Il est référencé Acros2 et a été le plus souvent utilisé pour nos synthèses.

3.2. Protocole général de préparation des hyaluronates modifiés

Le protocole de synthèse des hyaluronates amphiphiles est inspiré des brevets publiés par Della Valle *et coll.*³³⁻³⁵. Ils décrivent la synthèse de dérivés amphiphiles de polysaccharides, tels que l'alginate de sodium, le hyaluronate de sodium ou encore la carboxyméthylcellulose, par estérification totale ou partielle des fonctions carboxylates par différents dérivés halogénés, en milieu polaire aprotique (diméthylformamide, diméthylsulfoxyde...). L'estérification est réalisée entre un sel d'ammonium quaternaire hydrophobe du polysaccharide et un bromure d'alkyle à chaîne longue. La synthèse de dérivés amphiphiles d'alginate de sodium, de hyaluronate de sodium et de pectine a déjà fait l'objet d'études au laboratoire^{1,2,9,36-38}. Dans cette synthèse, des chaînes hydrophobes (12 ou 18 carbones) sont fixées de façon covalente par liaisons ester sur le squelette polysaccharidique hydrophile, en phase homogène. Elle conduit à l'obtention de polymères amphiphiles à structure en peigne, dont les segments apolaires sont vraisemblablement répartis de façon statistique le long des chaînes macromoléculaires.

En ce qui concerne la synthèse des dérivés de HA doublement modifiés, la réaction chimique a lieu dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Les fonctions carboxylates du HA réagissent par attaque nucléophile en milieu homogène sur l'halogénure d'alkyle à chaîne longue C₁₂H₂₅Br et sur les groupements tosylate d'un tétraéthylèneglycol difonctionnel (TEG ditosylé) (Figure 7).

Afin de mettre en évidence la double modification de ces dérivés (notamment la réticulation chimique avec le TEG), nous avons synthétisé un dérivé de HA substitué par des chaînes alkyle et par un poly(éthylène glycol) monofonctionnel (de masse molaire proche du tétraéthylèneglycol ditosylé utilisé précédemment). La synthèse de ce poly(éthylène glycol) monotosylé a été réalisée de la manière suivante :

5g d'éther monométhyle du poly(éthylèneglycol) 350 sont dissous dans 50 mL de dichlorométhane en présence de 2 mL de triéthylamine. 4,08g de chlorure de tosylé en solution dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés lentement. La réaction est laissée, sous agitation, pendant 6 heures, à température ambiante.

2 mL d'éthanol sont ajoutés goutte à goutte pour neutraliser la solution et on ajoute 30 mL de dichlorométhane.

Une série de lavages est ensuite réalisée : 30 mL d'eau, 30 mL d'HCl 0,5 mol.L⁻¹, 30 mL de NaHCO₃ saturée, 3 * 30 mL d'eau. Du Na₂SO₄ est ajouté pour sécher la phase organique. Après filtration et évaporation sous pression réduite, le produit est repris dans 60 mL de dichlorométhane et est lavé avec 30 mL d'eau, 30 mL d'HCl 0,5 mol.L⁻¹, 2 * 30 mL de NaHCO₃ saturée, 3 * 30 mL d'eau, 60 mL d'eau, 30 mL d'eau. Après séchage sur Na₂SO₄, filtration et évaporation sous pression réduite, le produit est récupéré.

Afin d'éliminer le chlorure de tosylé résiduel, une purification par précipitation dans de l'éther froid et filtration à froid a été réalisée.

3.3. Mise au point de la synthèse

Différentes synthèses ont été réalisées en faisant varier certains paramètres, susceptibles d'influer sur les résultats, comme par exemple la masse molaire du polysaccharide, l'ordre d'addition des réactifs, le type d'agitation. Ci-dessous sont résumées les différentes étapes du protocole de synthèse.

Première étape

Afin de rendre le HA (initialement sous forme de sel de sodium) soluble dans le DMSO, il faut au préalable le transformer en son sel de tétrabutylammonium :

- 0,5g de HA sont mis en suspension dans un mélange contenant 24,5 mL d'EtOH 70% et 0,5 mL d'acide chlorhydrique 0,06 mol.L⁻¹, pendant 20 minutes à 4°C sous agitation.

- Le mélange est filtré (filtre borosilicate n°4) puis lavé avec de l'éthanol 70% afin d'éliminer le chlorure de sodium formé au cours de la réaction. Un test au nitrate d'argent (AgNO₃ 0,1 mol.L⁻¹) permet de s'assurer de l'élimination complète des chlorures.

- Le produit filtré est lavé à l'acétone et laissé à température ambiante pour évaporer l'acétone résiduelle.

- Le hyaluronate sous forme acide est solubilisé dans 500 mL d'H₂O sous agitation. Une solution de TBAOH (hydroxyde de tétrabutylammonium) 0,15 mol.L⁻¹ est ajoutée jusqu'à neutralisation du mélange à pH 7, pour préparer le HA-TBA.

- Le mélange est ensuite lyophilisé.

Deuxième étape

- Le HA-TBA lyophilisé est solubilisé à 1% (poids/volume) dans le DMSO pendant 24 heures.

Ensuite trois protocoles ont été utilisés :

- Le premier protocole consiste à ajouter le dérivé bromé C₁₂H₂₅Br et à laisser sous agitation pendant 24 heures. Le dérivé difonctionnel (tétraéthylèneglycol TEG α,ω -diactivé) est ensuite ajouté et réagit pendant 24 heures.

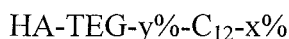
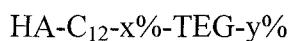
- Le deuxième protocole consiste à ajouter d'abord le TEG ditosylé, à laisser sous agitation pendant 24 heures, et à ajouter ensuite le dérivé bromé qu'on laisse réagir pendant 24 heures.
- Le troisième protocole est une variante du deuxième protocole et consiste à effectuer une étape de précipitation entre les ajouts des deux réactifs. Le TEG ditosylé est ajouté et est laissé sous agitation pendant 24 heures. Le produit est alors précipité dans un volume de diéthyléther et dissous de nouveau dans le DMSO. Le dérivé bromé est ensuite ajouté et réagit pendant 24 heures.

Troisième étape

- Quel que soit le protocole, 5,5 mL de NaCl 2,5 mol.L⁻¹ sont ajoutés au mélange. Celui-ci est laissé sous agitation pendant 1 heure à température ambiante.
- Le produit est précipité dans 300 mL d'acétone, l'agitation étant laissée pendant 15 minutes.
- Le produit filtré (filtre borosilicate n°4) est lavé avec tout d'abord un mélange acétone/eau 5/1, puis avec de l'acétone pure puis il est laissé à température ambiante pour évaporer l'acétone résiduelle.
- Le dérivé de HA est finalement stocké à 4°C.

3.4. Nomenclature

La nomenclature suivante a été adoptée pour permettre l'identification de chacun des dérivés polymères préparés :



HA représente le hyaluronate de sodium.

x est le taux de fixation expérimental en chaînes alkyle exprimé en moles de C₁₂ pour 100 moles de motifs monosaccharidiques.

y est le taux correspondant aux proportions initiales en TEG ajouté, exprimé en moles de TEG pour 100 moles de motifs monosaccharidiques. Nous verrons plus en détails (§ 4.2) que ce taux reste un taux théorique, la technique de chromatographie en phase gazeuse ne permettant pas de déterminer de faibles taux de TEG fixé.

Dans le cas des dérivés HA-C₁₂-x%-TEG-y%, le dérivé difonctionnel a été ajouté 24 heures après le dérivé bromé (protocole n°1). Dans le cas des HA-TEG-y%-C₁₂-x%, le dérivé bromé a été ajouté 24 heures après le dérivé difonctionnel (protocole n°2).

Dans le cas des dérivés HA-TEG-y% // C₁₂-x%, une précipitation du polymère a été réalisée, après réaction pendant 24 heures du TEG ditosylé et avant l'ajout du dérivé bromé, afin d'éliminer le TEG ditosylé résiduel et ainsi d'éviter l'éventuelle compétition entre ces deux réactifs (protocole n°3).

4. CARACTERISATION DES DERIVES OBTENUS

4.1. Etude de l'évolution des masses molaires du hyaluronate au cours de la synthèse

La détermination des masses molaires moyennes du polysaccharide peut être effectuée par différentes techniques. Par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), on obtient des informations sur la distribution des masses molaires mais cette technique nécessite l'utilisation d'étalons tels que le pullulane ou le dextrans³⁹. La technique d'électrophorèse capillaire peut également être utilisée⁴⁰.

Cependant, l'association de la technique SEC avec la diffusion de la lumière laser multi-angles (MALLS), notée SEC-MALLS, est devenue l'une des méthodes les plus efficaces. Elle permet de déterminer entre autres les masses molaires moyennes en nombre et en masse des polymères, ainsi que les profils de distribution pour des polymères polymoléculaires, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer un étalonnage préliminaire.

4.1.1. Généralités

La théorie fondamentale de diffusion de la lumière par des solutions de polymères découle des travaux de Debye et Zimm, et son application a été considérablement développée depuis l'utilisation de sources laser. L'intensité de la lumière diffusée à un angle donné par une solution diluée de polymère polymoléculaire est donnée par l'équation :

$$\frac{KC}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} + 2A_2C + \frac{16\Pi^2}{3\lambda^2} R_g^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad \text{avec} \quad K = \frac{4\Pi n^2}{\lambda N_A} \frac{dn}{dC}$$

où: C est la concentration du polymère en solution,

A_2 est le second coefficient du Viriel,

λ est la longueur d'onde incidente,

R_g est le rayon de giration moyen d'ordre z de la pelote macromoléculaire,

θ est l'angle de mesure par rapport au rayon incident,

N_A est le nombre d'Avogadro,

n est l'indice de réfraction de l'éluant,

dn/dC est la variation de l'indice de réfraction avec la concentration en polymère.

Un photodiffusiomètre permet de déterminer le rapport de Rayleigh : $\Delta R_{\theta} = \frac{I_{\theta}}{I_0} \frac{r^2}{V}$

où I_θ est l'intensité de la lumière diffusée par le volume V , mesurée à la distance r de l'échantillon. I_0 est l'intensité de la lumière incidente.

Ainsi, grâce à la méthode graphique de Zimm qui consiste à faire une double extrapolation à angle nul et à concentration nulle de l'équation $K.C/\Delta R_\theta = f(C,\theta)$, on peut déterminer le rapport $(1/\overline{M_w})$ pour un échantillon polymoléculaire.

4.1.2. Equipements

Le diffusiomètre laser multi-angles dit MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering) est couplé à une série de colonnes chromatographiques d'exclusion stérique. Le système de chromatographie d'exclusion stérique est constitué de :

- une pompe Waters 590,
- un dégazeur (Degazys DG 1310, Uniflow),
- une boucle d'injection de 200 μL ,
- une série de colonnes PL aquagel -OH 30, 40 et 50 $8\mu\text{m}$ (de 100 à 1 000 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) avec une pré-colonne de même type.

Une double détection est effectuée à la sortie des colonnes à l'aide d'un photodiffusiomètre de modèle miniDawn (Wyatt Technology Corporation) et d'un réfractomètre différentiel de type Waters 410 installé en série. La longueur d'onde du laser du MALLS est fixée à 690 nm par le constructeur, et trois photodiodes mesurent l'intensité diffusée à 45, 90 et 140°. Les mesures sont pilotées et traitées avec le logiciel Astra en place.

4.1.3. Conditions expérimentales

Le poids sec des échantillons est déterminé afin de préparer des solutions de concentrations précises. L'éluant NaNO_3 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ utilisé, est préparé avec de l'eau milliQ (système de filtration Millipore), puis filtré sur membrane Millipore de 0,1 μm . Nous avons vérifié que, dans ces conditions, les polymères étaient élués quantitativement. Le débit de la pompe est fixé à 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, et 24 heures sont nécessaires pour que le système soit équilibré. Les solutions de polymère sont préparées la veille dans l'éluant considéré, à des concentrations de 0,7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, puis filtrées juste avant l'injection sur des filtres Millex GS (Millipore) de 0,22 μm . Les solutions sont injectées deux fois et les courbes sont traitées selon la méthode de Zimm.

4.1.4. Evolution des masses molaires moyennes

A chaque étape de la synthèse, les masses molaires moyennes des dérivés ont été déterminées par SEC-MALLS afin d'évaluer l'influence des conditions opératoires sur la stabilité chimique du squelette polysaccharidique. Les propriétés viscoélastiques du polymère reposant en partie sur sa masse molaire, une dégradation entraînerait une altération de ces propriétés.

Polymères	\overline{M}_n (g.mol ⁻¹)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	I
HA natif	1 270 000	1 300 000	1,02
HA après acidification	1 180 000	1 290 000	1,09
HA après acidification, neutralisation et lyophilisation	1 000 000	1 040 000	1,04
HA après synthèse complète (acidification, neutralisation, lyophilisation, 48h dans DMSO, purification)	850 000	1 025 000	1,2

Tableau 3 : Suivi des masses molaires à différentes étapes de la synthèse

Lors des premiers essais de synthèses, les masses molaires moyennes en masse obtenues pour les dérivés s'étalaient de 300 000 à 1 000 000 g.mol⁻¹. On a mis en évidence que cette non-reproductibilité dans les masses molaires moyennes mesurées était due à une dégradation parasite du polysaccharide lors de l'étape d'acidification (concentration en HCl trop forte). Après avoir déterminé les conditions pour qu'il n'y ait pas de dégradation parasite de la chaîne de HA, nous avons obtenu, de manière reproductible, des masses molaires moyennes de l'ordre de 1 000 000 g.mol⁻¹.

L'étude de l'évolution des masses molaires moyennes du HA Acros2 a été réalisée sur les produits obtenus après chaque étape de synthèse puis purifiés par précipitation. Comme les dérivés hydrophobisés du HA ne peuvent pas être étudiés par la technique de SEC-MALLS (ces polymères restant adsorbés sur les colonnes), une synthèse sans ajout de dérivé bromé a été effectuée et a ainsi fourni un polymère contrôle. Le tableau 3 rassemble les masses molaires moyennes en nombre et en masse des différents polymères, ainsi que leur indice de polymolécularité.

Dans le cas des alginates amphiphiles précédemment préparés au laboratoire, on a mis en évidence, lors de la synthèse, que ni l'étape d'acidification d'une ½ heure, ni la transformation en sel de TBA, ni la lyophilisation, n'entraînaient de dégradation du squelette alginique³⁸.

Dans le cas du HA, nous pouvons constater que les masses molaires moyennes du polymère diminuent d'environ 30% pendant la synthèse, ce qui confirme le caractère plus fragile du HA par rapport à l'alginate. Une variation de masse molaire du HA a été observée au cours du même protocole de synthèse par Tokita *et coll.* et ils ont attribué cette diminution au procédé de lyophilisation⁴¹. D'après nos résultats, il est clair que cette dégradation du squelette n'intervient pas lors de l'étape d'acidification, elle est donc due soit à la neutralisation au TBAOH, soit très probablement au procédé de lyophilisation lui-même. En effet, pendant la lyophilisation, on surconcentre la solution : il suffit qu'il y ait un léger excédent d'ions OH⁻ ou H⁺ à la neutralisation pour qu'on obtienne des « solutions » hyperbasiques ou acides en fin de lyophilisation.

4.2. Détermination des taux de substitution

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H ou du carbone ^{13}C est souvent utilisée pour la détermination quantitative des taux de fixation en chaînes alkyle. Cette technique est efficace pour des polymères synthétiques tels que par exemple des polyacrylates de sodium modifiés par des amines à chaînes aliphatiques longues^{42,43}. La RMN ^1H est également utilisée par certains auteurs pour des polymères naturels tels que le chitosane⁴⁴ et le galactomannane⁴⁵ substitués par des chaînes alkyle.

Mais, dans le cas de polysaccharides de masse molaire élevée, tels que le HA utilisé ici, cette technique ne peut pas être employée. En effet, les protons du HA ont des temps de relaxation longs et hétérogènes en raison de son irrégularité de structure, ce qui génère un élargissement et une superposition des pics dans D_2O . En outre, l'intensité globale des protons des chaînes alkyle apparaît supérieure à celle des protons du massif polymère alors que leur nombre est théoriquement moins important. Ceci est essentiellement lié au fait que les protons du massif polymère possèdent des temps de relaxation plus longs car portés par des chaînes polymères peu mobiles. Pour ces deux raisons, une estimation quantitative du taux de substitution en chaînes alkyle du HA amphiphile ne peut donc pas être obtenue par comparaison des différents signaux^{20,46}. Du point de vue purement technique, la solubilisation de l'échantillon donne naissance à une solution extrêmement visqueuse et sa mise en place est quasiment impossible.

C'est pourquoi les taux de fixation en chaînes alkyle (rapport molaire chaînes alkyle/100 motifs monosaccharidiques) ont été déterminés par chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode de dosage a été mise en œuvre au laboratoire pour l'analyse de pectines modifiées par des chaînes alkyle C_{12} , C_{16} et C_{18} ³⁷, d'alginate et de hyaluronate de sodium substitués par des chaînes C_{12} et C_{18} ¹.

Pour un aliquot de polymère modifié, les liaisons ester existant entre les chaînes alkyle et le squelette polysaccharidique subissent une hydrolyse en milieu basique pendant 4h à température ambiante. Les chaînes alkyle sont libérées et passent en solution sous forme de l'alcool correspondant et son extraction se fait par ajout de toluène. L'alcool contenu dans le solvant organique est ensuite dosé par chromatographie en phase gazeuse.

Le mode opératoire est le suivant :

Préparation des solutions étalons

- 250 mL d'une solution de tétradécanol (étalon interne) à 5 mg.mL^{-1} dans le toluène sont préparés.
- 1 fiole de 50 mL et 4 fioles de 10 mL contenant respectivement 50, 20, 40, 60, 80 mg de dodécanol sont complétées jusqu'au trait de jauge par la solution de tétradécanol. Les solutions sont homogénéisées pendant 24 heures.

Préparation des solutions à analyser

- 100 mg de polymère modifié sont dissous dans 5 mL de NaOH $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$. L'hydrolyse des liaisons ester a lieu pendant 4 heures à température ambiante.
- 3 mL de la solution étalon à 1 mg.mL^{-1} de dodécanol préparée précédemment sont ajoutés. Pour bien solubiliser les chaînes alkyle dans le toluène, le mélange est vigoureusement agité à l'aide d'un agitateur de type Vortex pendant 4 minutes.
- Le mélange est centrifugé pendant 20 minutes à 5000 tr.min^{-1} pour séparer les 2 phases.
- La phase organique est prélevée pour effectuer l'analyse en chromatographie. Pour doser le dodécanol, on injecte $0,2 \mu\text{L}$ de phase organique.

Le chromatographe utilisé (Shimadzu GC 17 AAF) est équipé d'une colonne SE30 de 2m de longueur et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 280°C . La température de la colonne est à 230°C pour doser le dodécanol. Le débit de l'azote est de 25 mL.min^{-1} . Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel VP 4.2.

Pour le dosage du tétraéthylèneglycol TEG fixé sur le hyaluronate, une mise au point a été effectuée en se basant sur le principe du dosage des chaînes alkyle.

Lors d'une expérience modèle, nous avons mélangé 100 mg de HA et une quantité connue de TEG (10 mg) ; puis nous avons ajouté 3 mL d'une solution étalon (quantités connues de TEG et de tétradécanol dans du toluène) et nous avons dosé le TEG présent dans la phase organique : seulement 1/3 de la quantité théorique a été trouvée. Une association entre le polysaccharide et le TEG semble donc exister.

Afin d'éliminer cette association et récupérer la quantité totale de TEG, des étapes d'extraction à l'éthanol ont été nécessaires.

Protocole du dosage du TEG fixé

- 100 mg de polymère modifié sont dissous dans 5 mL de NaOH $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$. L'hydrolyse des liaisons ester a lieu pendant 4 heures à température ambiante. Le mélange est lyophilisé.
- Le lyophilisat est extrait avec 50 mL d'éthanol et agité pendant 4 heures. Un volume connu d'éthanol est prélevé après centrifugation (15 minutes à 5000 tr.min^{-1}) et est évaporé dans l'étuve à 80°C .
- 3 mL de la solution étalon contenant 1 mg.mL^{-1} de tétraéthylèneglycol dans une solution de tétradécanol sont ajoutés. Pour bien solubiliser les chaînes dans le toluène, le mélange est vigoureusement agité à l'aide d'un agitateur de type Vortex pendant 4 minutes.
- La phase organique est prélevée pour effectuer l'analyse en chromatographie. Pour doser le tétraéthylèneglycol, on injecte $0,2 \mu\text{L}$ de phase organique.

Cependant, en ce qui concerne la détermination du taux en TEG fixé sur le HA, celui-ci est tellement faible que la technique de chromatographie en phase gazeuse n'a pas permis de le mesurer. Le taux mentionné est donc celui qui correspond aux conditions initiales de réaction. Une

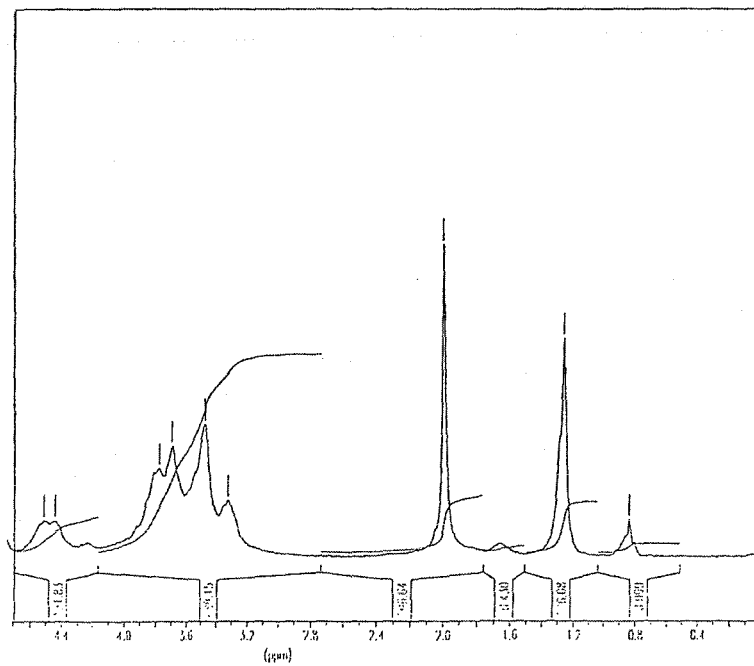


Figure 8 : Spectre RMN ^1H d'un hyaluronate modifié par des chaînes alkyle (concentration de 10 mg.mL^{-1} dans D_2O)

solution aurait peut-être été de doser les produits libérés lors de la synthèse, notamment ceux comportant le groupement tosyloxy, présents dans les eaux de lavage, mais par manque de temps, ce dosage n'a pas pu être mis au point.

Le fait de ne pas connaître le taux en TEG réellement fixé sur le HA est gênant pour les interprétations des résultats ultérieurs. C'est pourquoi, pour pouvoir faire des comparaisons entre les propriétés de HA modifiés par du TEG et des C₁₂ et déterminer l'influence respective de ces deux substituants sur les propriétés physico-chimiques des dérivés, nous avons eu recours au protocole de synthèse n°2 : nous avons préparé, dans un premier temps, des dérivés de HA avec un taux de TEG ditosylate initial fixé et, à partir d'un même lot, nous avons effectué l'étape suivante par ajout de quantités variables de C₁₂H₂₅Br.

4.3. Etude, par RMN ¹H, de la pureté des polymères préparés

Bien que nous ne puissions pas utiliser la RMN pour déterminer le taux de chaînes alkyle, nous pouvons l'utiliser pour vérifier la pureté des produits synthétisés (absence de DMSO, réaction totale d'échange entre les ions Na⁺ et TBA⁺).

Le spectre RMN ¹H d'un HA modifié par des chaînes alkyle comporte trois groupes de pics caractéristiques (Figure 8) :

- autour de 4 ppm : un massif non résolu en raison de l'élargissement des pics représentatifs des protons du squelette polysaccharidique,
- entre 0,8 et 1,8 ppm : les pics représentatifs de la chaîne alkyle,
- vers 1,9 ppm : le pic caractéristique du méthyle du groupe acétamide.

La pureté du dérivé obtenu est vérifiée par l'absence :

- du pic relatif au groupement TBA à 3,1 ppm,
- du pic caractéristique du DMSO à 2,7 ppm.

\overline{M}_w du HA après acidification, neutralisation et lyophilisation (g.mol ⁻¹)	335 000
	880 000
	400 000
	670 000
	1 000 000
Masse de HA-TBA utilisée lors de la synthèse	de 300mg à 3000mg
Ordre d'ajout des réactifs *	C ₁₂ H ₂₅ Br puis TEG ditosylé TEG ditosylé puis C ₁₂ H ₂₅ Br
Temps de réaction **	24h avec ou sans compétition entre réactifs
	48h avec ou sans compétition entre réactifs
Type d'agitation	magnétique mécanique (ancrage)

Tableau 4 : Paramètres de synthèse étudiés

* Dans le cas du protocole n°1, rappelons que nous ajoutons tout d'abord le dérivé bromé, puis, 24 heures après, le TEG ditosylé. Dans le cas du protocole n°2, l'ajout du TEG ditosylé se fait avant celui du dérivé bromé.

** Dans le cas du protocole n°1, le dérivé bromé réagit pendant 48 heures, 24 heures en absence de TEG ditosylé puis 24 heures en sa présence. Les deux réactifs sont donc en compétition pendant 24 heures.

Dans le cas du protocole n°2, le TEG ditosylé réagit pendant 48 heures, 24 heures en absence du dérivé bromé et 24 heures en sa présence. Les deux réactifs sont donc en compétition pendant 24 heures.

Dans le cas du protocole n°3, le TEG ditosylé réagit pendant 24 heures, puis le dérivé polymère est précipité au bout de ces 24 heures pour éliminer le TEG ditosylé résiduel et est ensuite solubilisé dans le DMSO. Le dérivé bromé est alors ajouté et réagit pendant 24 heures. Dans ce cas, il n'y a pas de compétition entre les deux réactifs.

Polymères	\overline{M}_w (HA) (g.mol ⁻¹)	m(HA-TBA) ^a (mg)	Taux en C ₁₂ initial ^b	Taux en C ₁₂ fixé ^c
HA-C ₁₂ -2,7%	335 000	1012	4	2,7
HA-C ₁₂ -3,7%	335 000	522	5	3,7
HA-C ₁₂ -5,5%	335 000	634	8	5,5
HA-C ₁₂ -2,8%-TEG-2,5%	335 000	526	4	2,8
HA-C ₁₂ -3,7%-TEG-3,75%	335 000	547	5	3,7
HA-C ₁₂ -3,7%-TEG-1,25%	335 000	522	5	3,7
HA-C ₁₂ -5,1%	880 000	3000	7,5	5,1
HA-C ₁₂ -5,1%-TEG-2%	880 000	3000	7,5	5,1
HA-C ₁₂ -5,1%-TEG-3%	880 000	3000	7,5	5,1
HA-C ₁₂ -5,1%-TEG-4%	880 000	3000	7,5	5,1
HA-C ₁₂ -4,5%	880 000	2600	7,5	4,5
HA-C ₁₂ -4,5%-TEG-6%	880 000	2600	7,5	4,5
HA-C ₁₂ -4,5%-TEG-8%	880 000	2600	7,5	4,5

Tableau 5 : Taux de fixation en chaînes alkyle pour différents paramètres de synthèse,

^a masse de HA-TBA utilisée lors de la synthèse (concentration identique de 10 g.L⁻¹ dans DMSO)

^b taux en C₁₂H₂₅Br initial en moles pour 100 moles de motifs monosaccharidiques

^c taux en C₁₂ fixé déterminé par chromatographie en phase gazeuse
(moles de C₁₂ pour 100 moles de motifs monosaccharidiques)

L'agitation utilisée dans toutes ces expériences est de type magnétique.

5. RESULTATS ET COMPARAISON DES DIFFERENTES SYNTHESSES

La mise au point de la double modification du HA et la caractérisation physico-chimique des dérivés ont été réalisées en faisant varier différents paramètres de synthèses (Tableau 4).

Nous allons dans la suite examiner l'effet de ces paramètres sur la réactivité du bromure d'alkyle. La réactivité du $C_{12}H_{25}Br$, autrement dit le rendement de fixation des chaînes, peut être définie comme le rapport du taux molaire de fixation en chaînes C_{12} au taux molaire initial du $C_{12}H_{25}Br$. Elle est exprimée en %.

5.1. Cas des dérivés HA- C_{12} -TEG

Rappelons le protocole n°1 utilisé pour obtenir ces dérivés HA- C_{12} -TEG : le dérivé bromé $C_{12}H_{25}Br$ est ajouté et laissé sous agitation pendant 24 heures, le dérivé difonctionnel TEG ditosylé est ensuite ajouté et réagit pendant 24 heures.

Le tableau 5 regroupe les différents résultats obtenus, selon la quantité de HA-TBA utilisée pour la synthèse et la masse molaire du HA mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation. La figure 9 représente la variation de la réactivité du $C_{12}H_{25}Br$ en fonction de la quantité de HA-TBA utilisée pour la synthèse et de la masse molaire du HA.

D'après cette figure 9, on constate que la réactivité du $C_{12}H_{25}Br$ ne varie pas lorsqu'on augmente la quantité de HA-TBA utilisée pour la synthèse, quelle que soit la masse molaire du HA. L'incertitude sur les mesures effectuées en chromatographie en phase gazeuse est estimée à 0,2% en taux de fixation. Il apparaît donc que l'écart entre les résultats est peu significatif. Ceci nous permet de conclure qu'il n'y a pas d'influence de la quantité de HA-TBA sur le taux de fixation final en chaînes alkyle C_{12} (ce qui est en accord avec les résultats de Rastello *et coll.* pour des synthèses à partir d'alginate³⁸).

Si nous comparons la réactivité du $C_{12}H_{25}Br$ pour des masses molaires de HA différentes, nous pouvons constater également que la réactivité ne varie pas de manière significative avec ce paramètre, quelle que soit la masse de HA-TBA utilisée.

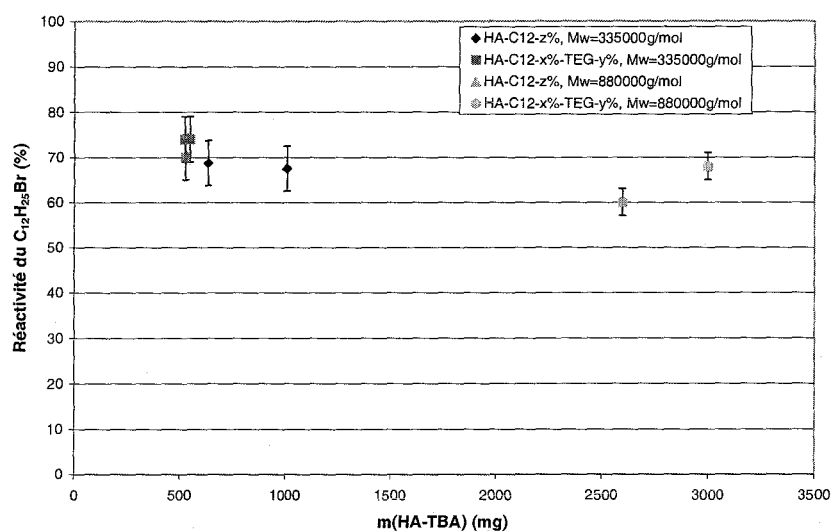


Figure 9 : Réactivité du bromure d'alkyle dans le cas de la synthèse des HA-C₁₂-TEG en fonction de la masse de HA-TBA utilisée lors de la synthèse (concentration en HA-TBA de 10 g.L⁻¹ dans DMSO) et de la masse molaire du HA mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation (agitation de type magnétique)

Polymères	\overline{M}_w (HA) (g.mol ⁻¹)	m(HA-TBA) ^a (mg)	Agitation ^b	Taux en C ₁₂ H ₂₅ Br initial ^c	Taux en C ₁₂ fixé ^d
HA-TEG-2%-C ₁₂ -2,6%	400 000	1230	magn	6,5	2,6
HA-TEG-2%-C ₁₂ -3,7%	400 000	1230	magn	9,8	3,7
HA-TEG-2%-C ₁₂ -5,4%	400 000	1230	magn	13,9	5,4
HA-TEG-4%-C ₁₂ -2,1%	400 000	1310	magn	5,6	2,1
HA-TEG-4%-C ₁₂ -3,7%	400 000	1310	magn	9,9	3,7
HA-TEG-4%-C ₁₂ -5,2%	400 000	1310	magn	14,1	5,2
HA-TEG-6%-C ₁₂ -1,8%	400 000	1240	magn	6	1,8
HA-TEG-6%-C ₁₂ -3,0%	400 000	1240	magn	9,9	3
HA-TEG-6%-C ₁₂ -5,6%	400 000	1240	magn	14,5	5,6
HA-TEG-3%-C ₁₂ -3,7%	670 000	660	magn	9,4	3,7
HA-TEG-3%-C ₁₂ -4,9%	670 000	660	magn	14,9	4,9
HA-TEG-6%-C ₁₂ -3,7%	670 000	750	magn	9,4	3,7
HA-TEG-6%-C ₁₂ -5,7%	670 000	750	magn	14,9	5,7
HA-C ₁₂ -2,3%	1 000 000	2000	ancre	5	2,3
HA-C ₁₂ -4,4%	1 000 000	2000	ancre	10	4,4
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -2,5%	1 000 000	2000	ancre	5	2,5
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -5,4%	1 000 000	2000	ancre	10	5,4
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,8%	1 000 000	2000	ancre	5	2,8
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -4,7%	1 000 000	2000	ancre	10	4,7
HA-TEG-2,5%-C ₁₂ -2,5%	1 000 000	2000	ancre	5	2,5
HA-TEG-2,5%-C ₁₂ -4,2%	1 000 000	2000	ancre	10	4,2
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	1 000 000	500	magn	5,1	2,5
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	1 000 000	500	magn	7,6	3,4
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -1,8%	1 000 000	1700	magn	4,5	1,8
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,7%	1 000 000	1000	magn	6	2,7
HA-C ₁₂ -2,5%	1 000 000	375	magn	4	2,5
HA-TEG-1,5% // C ₁₂ -2,8%	1 000 000	1000	magn	4,5	2,8

Tableau 6 : Taux de fixation en chaînes alkyle pour différents paramètres de synthèse,
^{a, c, d} définis dans le tableau 5

^b agitation de type magnétique ou mécanique (ancre)

Enfin, si l'on compare les résultats obtenus avec les HA-C₁₂ (48 heures de réaction entre le HA et le bromure d'alkyle) et les HA-C₁₂-TEG (48 heures de réaction entre le HA et le bromure, dont 24 heures en présence de TEG ditosylate), on remarque que la réactivité du C₁₂H₂₅Br est quasiment identique, ce qui laisse à supposer que la réaction entre le HA et le bromure est terminée au bout de 24 heures.

5.2. Cas des dérivés HA-TEG-C₁₂

Rappelons que, pour obtenir ces dérivés, les protocoles n°2 et n°3 ont été utilisés. Avec le protocole n°2, le dérivé difonctionnel (TEG ditosylé) est ajouté à la solution de HA-TBA et laissé sous agitation pendant 24 heures. Le dérivé bromé C₁₂H₂₅Br est alors ajouté et réagit pendant 24 heures. Avec le protocole n°3, le TEG ditosylé est ajouté et laissé sous agitation pendant 24 heures. Le polymère est alors précipité dans du diéthyléther et dissous de nouveau dans du DMSO. Le dérivé bromé C₁₂H₂₅Br est alors ajouté et réagit pendant 24 heures.

Le tableau 6 donne les résultats obtenus lors de la synthèse de l'ensemble de ces dérivés HA-TEG-C₁₂.

5.2.1. Influence de la quantité de HA-TBA utilisée pour la synthèse et de la masse molaire du HA sur la réactivité des chaînes alkyle

La figure 10 représente la variation de la réactivité du C₁₂H₂₅Br en fonction de la quantité de HA-TBA utilisée pour la synthèse et de la masse molaire du HA (mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation). Rappelons qu'ici tous les échantillons HA-TEG-C₁₂ ont été préparés à partir du même HA-TEG.

D'après la figure 10, on constate que la réactivité du C₁₂H₂₅Br diminue légèrement lorsqu'on augmente la quantité de HA-TBA utilisée pour la synthèse, quelle que soit la masse molaire du HA, mais cet écart apparaît comme peu significatif vu l'incertitude des mesures du taux de fixation. Ceci nous permet de conclure qu'il n'y a pas d'influence de la quantité de HA-TBA sur le taux de fixation final en chaînes C₁₂ (ce qui est en accord avec les résultats de Rastello *et coll.* pour des synthèses à partir d'alginate³⁸).

Si nous comparons la réactivité du C₁₂H₂₅Br pour des masses molaires de HA différentes (400 000, 670 000 et 1 000 000 g.mol⁻¹), nous pouvons constater également que la réactivité ne varie pas de manière significative avec ce paramètre, quelle que soit la masse de HA-TBA utilisée.

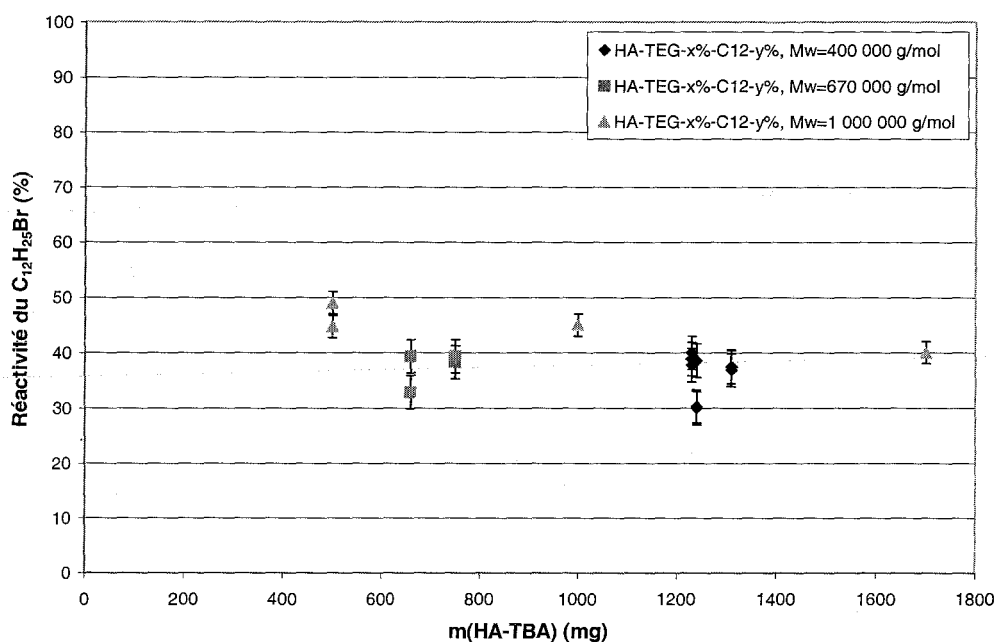


Figure 10 : Réactivité du bromure d'alkyle dans le cas de la synthèse des dérivés $HA-TEG-C_{12}$ (paramètres définis dans la figure 9)

Polymères	Temps de réaction du $C_{12}H_{25}Br$ (h)	Agitation	Réactivité du $C_{12}H_{25}Br$ (%)
$HA-C_{12}-y\%$	24	magnétique	65 ± 8
$HA-C_{12}-y\%$	48	magnétique	63 ± 2
$HA-TEG-x\%-C_{12}-y\%$	24	magnétique	38 ± 3
$HA-TEG-x\%-C_{12}-y\%$	24	ancree	50 ± 5
$HA-TEG-x\% // C_{12}-y\%$	24	magnétique	62 ± 5

Tableau 7 : Réactivité du bromure d'alkyle en fonction du temps de réaction, de la présence ou non du TEG ditosylate et de l'agitation

5.2.2. Influence du temps de réaction, du mode d'agitation et de la précipitation pendant la synthèse

Le tableau 7 représente la variation de la réactivité du $C_{12}H_{25}Br$ en fonction du temps de réaction, de la présence simultanée ou non des deux réactifs et de l'agitation.

On constate tout d'abord que la réaction du $C_{12}H_{25}Br$ en absence de TEG ditosylate est terminée au bout de 24 heures (confirmation des résultats décrits au paragraphe 5.1) et que la réactivité est d'environ 65%.

Si le TEG ditosylate est d'abord mis à réagir avec le HA pendant 24 heures, et que le dérivé bromé $C_{12}H_{25}Br$ est ensuite ajouté et laissé à réagir pendant 24 heures, la réactivité du $C_{12}H_{25}Br$ n'est plus que de 38% sous agitation magnétique.

Ceci laisse à supposer qu'il y a une compétition entre les deux réactifs TEG ditosylé et $C_{12}H_{25}Br$ et que la présence du TEG gêne la réaction de fixation du dérivé bromé. C'est pourquoi nous avons envisagé de précipiter le produit obtenu au bout de 24 heures de réaction avec le TEG ditosylate, afin d'en éliminer l'éventuel excès (c'est le cas du dérivé HA-TEG// C_{12}). Puis nous avons ajouté le dérivé bromé et laissé réagir pendant 24 heures. Par ce procédé, il y a augmentation de la réactivité du $C_{12}H_{25}Br$ par rapport au protocole précédent et cette réactivité atteint alors celle du $C_{12}H_{25}Br$ en absence de tout autre composé.

Nous pouvons également remarquer que, pour ces dérivés, la réactivité du $C_{12}H_{25}Br$ est plus élevée dans le cas d'une agitation mécanique que dans le cas d'une agitation magnétique (en accord avec les résultats de Rastello *et coll.*³⁸).

5.3. Optimisation du taux en chaînes alkyle et en réticulant chimique

Les différents produits synthétisés ont été ensuite dissous à 10 g.L^{-1} dans une solution saline NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, afin d'être dans des conditions de force ionique proches des conditions physiologiques. Après agitation et une nuit au repos, nous avons observé l'aspect des solutions. Selon les taux de substitution, nous avons obtenu des solutions visqueuses, des gels, des systèmes insolubles ou des systèmes diphasiques. En effet, nous avons remarqué que l'augmentation de l'un ou l'autre des taux de substitution peut conduire à l'obtention de systèmes avec séparation de phases et synérèse.

Pour les applications visées, des solutions monophasiques sont souhaitables et nous avons choisi les conditions pour y parvenir à partir du diagramme représenté sur la figure 11.

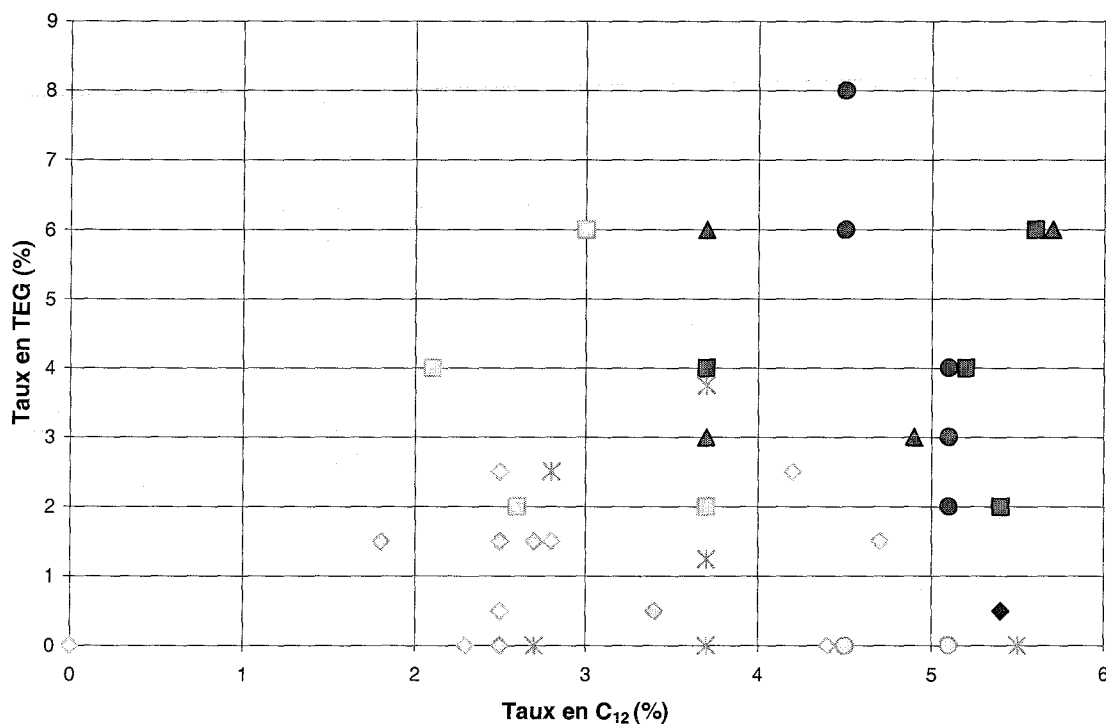


Figure 11 : Caractéristiques des systèmes aqueux des polymères synthétisés, préparés à 10 g.L^{-1} dans $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, selon le taux en TEG (taux initial en moles de TEG pour 100 moles de motifs monosaccharidiques) et le taux en C_{12} fixé (taux en moles de C_{12} pour 100 moles de motifs monosaccharidiques, déterminé en CPG) Chaque symbole représentant une condition de synthèse différente Les symboles clairs correspondent aux solutions monophasiques Les symboles foncés correspondent aux solutions diphasiques

Deux domaines de choix semblent exister :

- soit des polymères avec des taux en TEG inférieurs à 6% et des taux en C₁₂ variant de 0 à 3%,
- soit des polymères avec des taux en TEG inférieurs à 3% et des taux en C₁₂ variant de 0 à 5%.

Nous savons que des hydrogels rhéofluidifiants sont nécessaires pour répondre aux exigences mécaniques des matériaux de comblement (chapitre I). Ce phénomène étant dû à la rupture des points de jonction hydrophobes du réseau sous l'effet de la contrainte appliquée, les hydrogels réticulés chimiquement de manière importante ne présentent pas les propriétés rhéologiques adéquates. Il était donc plus intéressant pour les applications visées de choisir un taux en TEG minimal et un taux en C₁₂ maximal, c'est-à-dire de préparer des polymères avec des taux en TEG inférieurs à 3% et des taux en C₁₂ variant de 0 à 5%.

6. CONCLUSION

Une large gamme de dérivés hydrophobisés (chaînes alkyle en C₁₂) ou doublement modifiés (chaînes alkyle en C₁₂ et TEG ditosylé) du hyaluronate de sodium a été synthétisée, en faisant varier un certain nombre de paramètres pouvant influencer sur cette synthèse :

- la masse molaire du hyaluronate (de 335 000 g.mol⁻¹ à 1 000 000 g.mol⁻¹),
- la quantité de polymère utilisée lors de la synthèse (de 300 à 3000 mg),
- l'ordre d'ajout des réactifs et leur temps de réaction,
- le mode d'agitation (magnétique ou mécanique à l'aide d'une ancre).

Une optimisation des taux de substitution a été nécessaire afin d'obtenir des systèmes monophasiques, répondant au mieux aux exigences mécaniques des biomatériaux de comblement. Etant donné que les hydrogels réticulés chimiquement de manière importante ne donnent pas des propriétés rhéologiques adéquates et que les hydrogels rhéofluidifiants sont intéressants pour les applications visées, notre choix s'est porté sur des polymères ayant des taux en TEG inférieurs à 3% et des taux en C₁₂ variant de 0 à 5%.

Ces différents produits ont été dissous dans une solution saline NaCl 0,15 mol.L⁻¹ afin d'étudier leur aspect visuel dans ces conditions. Notre objectif a ensuite été d'étudier leurs propriétés, de manière quantitative, en régime semi-dilué, notamment à l'aide de méthodes rhéologiques.

7. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Pelletier S., Hubert P., Lapicque F., Payan E., Dellacherie E. "Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate : synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions" *Carbohydrate polymers* **2000**, *43*, 343-349.
- (2) Pelletier S. "Synthèse et caractérisation physico-chimique de dérivés associatifs d'alginate et de hyaluronate de sodium en vue d'applications biomédicales" *thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine INPL* **1999**.
- (3) Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L., Dellacherie E. "Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair : rheological properties" *Journal of biomedical materials research* **2001**, *54*, 102-108.
- (4) Meyer K., Palmer J.W. "The polysaccharide of the vitreous humor" *J.Biol.Chem.* **1934**, *107*, 629-634.
- (5) Goa K.L., Benfield P. "Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing" *Drugs* **1994**, *47*, 536-566.
- (6) Laurent T.C., Fraser J.R.E. "Hyaluronan" *FASEB J.* **1992**, *6*, 2397-2404.
- (7) Laurent T.C., Laurent U.B.G., Fraser J.R.E. "The structure and function of hyaluronan: An overview" *Immunol.Cell.Biol.* **1996**, *74*, A1-7.
- (8) Balazs E.A., Jeanloz R.W. "The amino sugars : The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars" *Academic press, New-York* **1965**, II-A.
- (9) Laurent T.C., Balazs E.A. "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Structure of hyaluronic acid" *Academic Press, London* **1970**.
- (10) Roure I., Rinaudo M., Milas M. "Viscometric behaviour of polyelectrolytes in the presence of low salt concentration" *Ber.Bunsenges.Phys.Chem.* **1996**, *100*, 703-725.
- (11) Weissmann B., Meyer K. "Structure of hyaluronic acid. The glucuronidic linkage" *J.Am.Chem.Soc.* **1952**, *74*, 4729-4729.
- (12) Jeanloz R.W., Flowers H. "The Isolation and Synthesis of the Methyl Ester-Methyl α -Glycoside of 3-O- β -D-Glucuronosyl-N-Acetyl-D-Glucosamine (Hyalobiuronic Acid)" *J.Am.Chem.Soc.* **1962**, *84*, 3030-3030.
- (13) Winter W.T., Smith P.J.C., Arrott S. "Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold helical forms" *J.Mol.Biol.* **1975**, *99*, 219-235.
- (14) Scott J.E. "Secondary Structures in Hyaluronan Solutions : Chemical and Biological Implications in the Biology of Hyaluronan" *Ciba Foundation Symposium 143, Wiley, Chichester, England* **1989**.
- (15) Heatley F., Scott J.E. "A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan" *Biochem.J.* **1988**, *254*, 489-493.
- (16) Cowman M.K., Cozart D., Nakanishi K., Balazs E.A. "1H NMR of glycosaminoglycans and hyaluronic acid oligosaccharides in aqueous solution: the amide proton environment" *Arch.Biochem.biophys.* **1984**, *230*, 203-212.
- (17) Atkins E.D.T., Meader D., Scott J.E. "Model for hyaluronic acid incorporating four intramolecular hydrogen bonds" *Int.J.Biol.Macromol.* **1980**, *2*, 318-319.
- (18) Kvam B.J., Atzori M., Toffanin R., Paoletti S., Biviano F. "1H- and 13C-NMR studies of solutions of hyaluronic acid esters and salts in methyl sulfoxide: comparison of hydrogen-bond patterns and conformational behaviour" *Carbohyd.Res.* **1992**, *230*, 1-13.
- (19) Almond A., Brass A., Sheehan J. "Oligosaccharides as Model Systems for Understanding Water-Biopolymer Interaction: Hydrated Dynamics of a Hyaluronan Decamer" *J.Phys.Chem.B* **2000**, *104*, 5634-5640.
- (20) Darke A., Finer E.G., Moorhouse R., Rees D.A. "Studies of hyaluronate solutions by nuclear magnetic relaxation measurements. Detection of covalently-defined, stiff segments within the flexible chains" *J.Mol.Biol.* **1975**, *99*, 477-486.
- (21) Rinaudo M., Milas M., Jouon N., Borsali R. "On some original properties of dilute polyelectrolyte solutions at low salt content: sodium hyaluronate example" *Polymer* **1993**, *34*, 3710-3715.
- (22) Bothner H., Wik O. "Rheology of hyaluronate" *Acta.Oto-Laryngol.* **1987**, *442*, 25-30.
- (23) Pisarcik M., Bakos D., Ceppan M. "Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution" *Colloid.Surface.A.* **1995**, *97*, 197-202.
- (24) Fouissac E., Milas M., Rinaudo M. "Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte" *Macromolecules* **1993**, *26*, 6945-6951.
- (25) Kobayashi Y., Okamoto A., Nishinari K. "Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights" *Biorheology* **1994**, *31*, 235-244.

- (26) Yanaki T., Yamaguchi T. "Temporary network formation of hyaluronate under a physiological condition. 1. Molecular-weight dependence" *Biopolymers* **1990**, *30*, 415-425.
- (27) Balazs E.A., Leshchiner N.E., Larsen N.E., Band P. "Hyaluronan biomaterials : medical applications" *Handbook of biomaterials and applications, Wise Ed., New York* **1995**.
- (28) Balazs E.A., Leshchiner A., Leshchiner N.E., Larsen N.E., Band P. "Hylan preparation and method recovery thereof from animal tissues" *US patent n°5,099,013* **1992**.
- (29) Balazs E.A., Leshchiner N.E., Leshchiner A., Band P. "US patent n°4,713,448" **1987**.
- (30) Band P. "Drug and Cosmetic Industry" **1985**, 54.
- (31) Weigel P.H., Frost S.J., McGary C.T., LeBoeuf R.D. "The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing" *Int.J.Tissue.Reac.* **1988**, *X(6)*, 355-365.
- (32) Drobnik J. "Hyaluronan in drug delivery" *Advanced drug delivery reviews* **1991**, *7*, 295-308.
- (33) Della Valle F., Crescenzi V., Callegaro L. "Gellan esters" *European Patent 92400352.8* **1992**.
- (34) Della Valle F., Romeo A. "European Patent 89108630.8" **1989**.
- (35) Della Valle F., Romeo A. "Polysaccharide esters and their salts" *US patent 4,965,353* **1990**.
- (36) Rastello de Boissesson M., Leonard M., Hubert P., Marchal P., Stequert A., Castel C., Favre E., Dellacherie E. "Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: bead formation, structure, and stability" *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *273*, 131-139.
- (37) Miralles-Houzelle M.C., Hubert P., Dellacherie E. "Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association" *Langmuir* **2001**, *17*, 1384-1391.
- (38) Rastello de Boissesson M. "Microparticules d'alginate associatifs : élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives" *thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine INPL* **2002**.
- (39) Ci S.X., Huynh T.H., Louie L.W., Yang A., Beals B.J., Ron N., Tsang W.-G., Soon-Shiong P., Desai N.P. "Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion chromatography" *J.Chromatogr.A* **1999**, *864*, 199-210.
- (40) Stefansson. "Assessment of alginic acid molecular weight and chemical composition through capillary electrophoresis" *Anal.Chem.* **1999**, *71*, 2373-2378.
- (41) Tokita Y., Oshima K., Okamoto A. "Degradation of hyaluronic acid during freeze drying" *Polym.Degrad.Stabil.* **1997**, *55*, 159-164.
- (42) Petit F. "Thèse de doctorat, Paris (France)" **1996**.
- (43) Magny B. "Thèse de doctorat, Paris (France)" **1992**.
- (44) Desbrières J., Rinaudo M., Chtcheglova L. "Macromol.Symp." **1997**, *113*, 135.
- (45) Sierakowski M.R., Milas M., Desbrières J., Rinaudo M. "Specific modifications of galactomannans" *Carbohydrate polymers* **2000**, *42*, 51-57.
- (46) Varum K.M., Anthonson M.W., Grasdalen H., Smidsrod O. "Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy" *Carbohyd.Res.* **1991**, *211*, 17-23.

Chapitre III

Etude en régime semi-dilué des dérivés de hyaluronate

1. INTRODUCTION

Les dérivés synthétisés, substitués par des chaînes alkyle, et réticulés par du tétraéthylèneglycol TEG ditosylé, sont destinés à être utilisés sous forme d'hydrogels comme biomatériaux de comblement de lésions ostéochondrales. Il était donc nécessaire d'étudier leur comportement rhéologique en milieu aqueux.

Différents travaux ont déjà été réalisés au laboratoire concernant les propriétés rhéologiques en milieu aqueux de dérivés d'alginate ou de hyaluronate modifiés par des chaînes alkyle. Ces études ont permis de confirmer leur caractère associatif et l'existence d'un réseau tridimensionnel en solution. Ce réseau est créé par les associations hydrophobes, essentiellement intermoléculaires, entre segments alkyle¹⁻⁴. Il s'agit désormais d'étudier les propriétés rhéologiques en régime semi-dilué des dérivés doublement modifiés.

Nous avons tenté, dans un premier temps, de mettre en évidence la double réticulation en milieu aqueux des dérivés préparés, et notamment la réticulation chimique. Nous avons synthétisé et caractérisé des hyaluronates réticulés uniquement de façon chimique, pour comparer leurs propriétés à celles des dérivés doublement modifiés. L'étude d'un hyaluronate modifié par un groupement pendant, de structure voisine de celle du TEG, a également été réalisée.

Les propriétés rhéologiques en régime semi-dilué des dérivés de hyaluronate ont ensuite été étudiées et nous avons analysé notamment l'influence de différents facteurs : taux en chaînes alkyle et en réticulant chimique, masse molaire du polymère, conditions de synthèse, concentration en polymère, solvant utilisé pour préparer le dérivé.

Ces hydrogels de hyaluronate étant destinés à être utilisés comme biomatériaux de comblement de lésions ostéochondrales, des études rhéologiques complémentaires ont été réalisées afin de tenir compte des exigences du cahier des charges de tels biomatériaux. Ces hydrogels doivent, entre autres, être stables à la stérilisation et conserver, une fois implantés, leurs propriétés rhéologiques pour jouer leur rôle de tuteur.

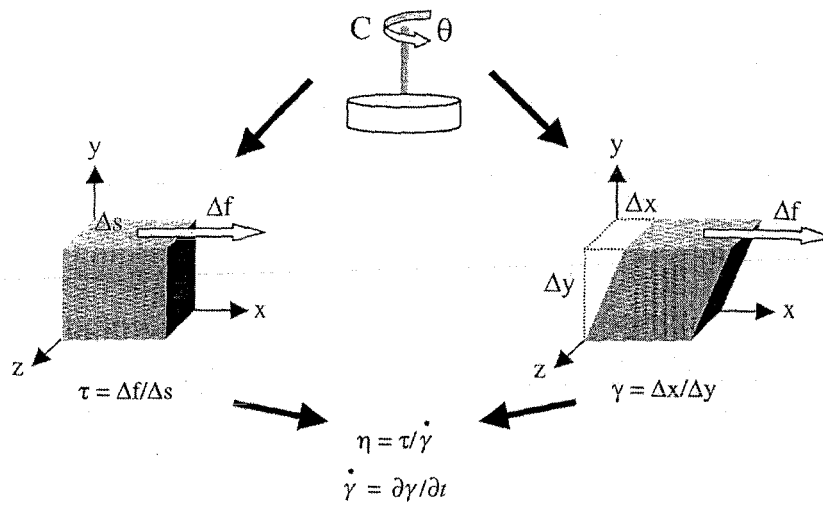


Figure 1 : Principe des mesures rhéologiques en cisaillement simple
 (C : couple ; θ : déplacement angulaire ; échantillon de surface Δs et d'épaisseur Δy ; Δf : force appliquée sur l'échantillon ; Δx : déplacement de l'échantillon)

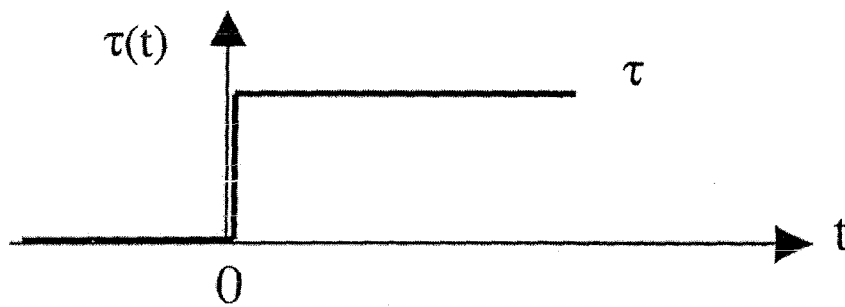


Figure 2 : Représentation graphique d'un échelon de contrainte

2. GENERALITES SUR LA RHEOLOGIE

La rhéologie est l'étude de l'écoulement et de la déformation de la matière, ainsi que des contraintes qui en résultent.

La rhéologie des solutions consiste :

- Soit à appliquer une contrainte τ à l'échantillon et à mesurer la déformation γ ou la vitesse de déformation $\dot{\gamma}$ qui en résultent ($\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$).
- Soit à appliquer une déformation ou une vitesse de déformation à l'échantillon et à mesurer sa résistance à la déformation, c'est-à-dire la contrainte correspondante.

2.1. Introduction à la rhéologie

Un matériau soumis à un ensemble de forces est susceptible de se déformer. Les propriétés rhéologiques de matériaux viscoélastiques sont déterminées en cisillant les échantillons au sein de cellules de mesure axisymétriques de type cône/plan, plan/plan ou cylindres coaxiaux visant à reproduire au mieux des conditions de cisaillement simple. La réalisation d'une mesure consiste alors à imposer un couple C et à mesurer le déplacement angulaire θ qui en résulte (Figure 1).

Connaissant le couple et les caractéristiques géométriques de la cellule, on peut déterminer la contrainte de cisaillement $\tau = \Delta f / \Delta s$ définie comme la force tangentielle par unité de surface qui s'exerce sur un élément de volume de matériau considéré. L'application d'une telle contrainte provoque une déformation de cisaillement définie comme le gradient de déplacement $\gamma = \Delta x / \Delta y$. Comme pour la contrainte, la déformation est déterminée à partir de la mesure du déplacement angulaire et des caractéristiques géométriques de la cellule. Les propriétés rhéologiques sont alors définies par des relations entre la contrainte imposée $\tau(t)$, et les réponses qui en résultent en termes de déformation $\gamma(t, \tau)$ et de vitesse de déformation $\dot{\gamma}(t, \tau)$. La forme du signal $\tau(t)$ que l'on impose à l'échantillon dépend de la propriété que l'on souhaite déterminer. Un signal particulièrement commode est l'échelon de contrainte défini par $\tau(t) = 0$ pour $t < 0$ et $\tau(t) = \tau$ pour $t \geq 0$ (Figure 2). Il permet de définir la complaisance de fluage $J(t, \tau)$ et la viscosité de fluage $\eta(t, \tau)$:

$$J(t, \tau) = \gamma / \tau \quad (1)$$

$$\eta(t, \tau) = \tau / \dot{\gamma} \quad \text{avec} \quad \dot{\gamma} = \dot{\gamma}(t, \tau) \quad (2)$$

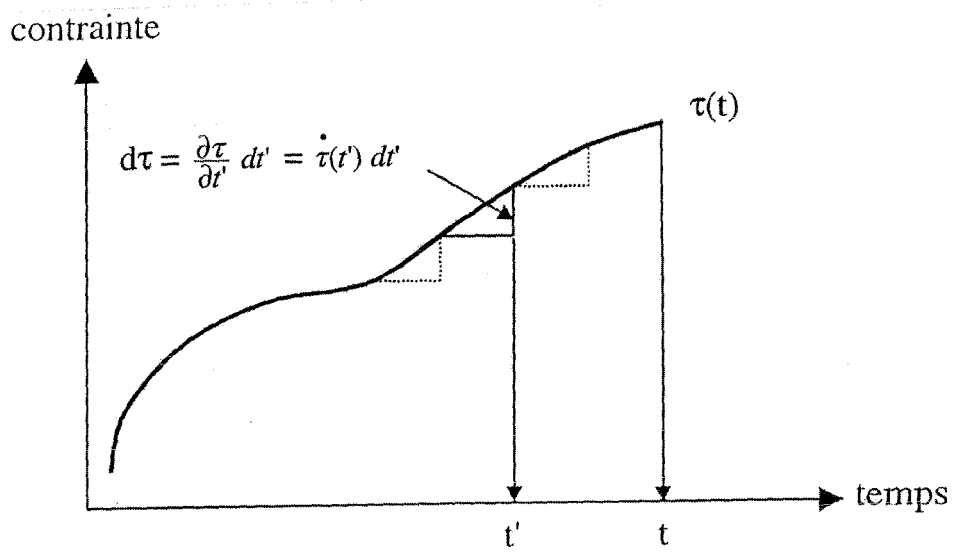


Figure 3 : Représentation graphique de la décomposition en échelons de $\tau(t)$

La viscosité dépend donc de τ , de $\dot{\gamma}$ et du temps d'application t des sollicitations mécaniques. La contrainte et la viscosité peuvent soit augmenter, soit diminuer, avec le temps de cisaillement. De tels changements sont réversibles ou irréversibles. Une diminution de viscosité sous contrainte suivie d'une reprise de structure s'appelle la thixotropie. Le comportement opposé, c'est-à-dire augmentation de la viscosité sous contrainte suivie d'une reprise, s'appelle la thixotropie négative ou anti-thixotropie.

Si l'échelon de contrainte est d'une amplitude suffisamment faible pour ne pas perturber les temps de réorganisation caractéristiques du matériau, les réponses γ et $\dot{\gamma}$ deviennent proportionnelles à τ . Le régime devient donc linéaire dans la limite des faibles contraintes telles que $\tau \rightarrow \Delta\tau$ et $J(t, \tau) \rightarrow J(t)$ où $J(t)$ est la fonction de fluage définie par :

$$J(t) = \gamma/\Delta\tau \quad (3)$$

Tant que le régime de sollicitation mécanique demeure linéaire, la fonction de fluage peut être mise à profit pour établir des relations entre $\gamma(t)$ et $\tau(t)$, quelle que soit la forme du signal $\tau(t)$, en décomposant celui-ci en échelons $d\tau$ infiniment petits tels que (Figure 3) :

$$\tau(t) = \int_{-\infty}^t d\tau = \int_{-\infty}^t \frac{\partial\tau}{\partial t'} dt' = \int_{-\infty}^t \dot{\tau}(t') dt' \quad \text{avec} \quad \dot{\tau}(t') = \frac{\partial\tau}{\partial t'} \quad (4)$$

La réponse $d\gamma$ à un échelon élémentaire $d\tau = \dot{\tau}(t')dt'$ imposé à l'instant t' est déterminée grâce à la connaissance de $J(t)$, par application de l'équation (3) décalée dans le temps :

$$d\gamma = J(t-t')d\tau \quad (5)$$

En vertu du principe de Boltzmann, on écrit alors que la réponse à la somme des échelons est égale à la somme des réponses aux échelons élémentaires $d\tau$. Les bornes de l'intégrale étant imposées par le principe de causalité, il vient :

$$\gamma(t) = \int_{-\infty}^t d\gamma = \int_{-\infty}^t J(t-t') \dot{\tau}(t') dt' \quad (6)$$

Grâce à l'équation (6) et à la connaissance de $J(t)$, on est donc en mesure de déterminer $\gamma(t)$, quelle que soit la contrainte $\tau(t)$. Cette équation linéaire est d'une portée très générale puisqu'elle ne fait appel à aucun modèle rhéologique a priori. Elle est établie sur la base de deux principes (superposition et causalité) et requiert uniquement que les réponses soient proportionnelles aux sollicitations mécaniques.

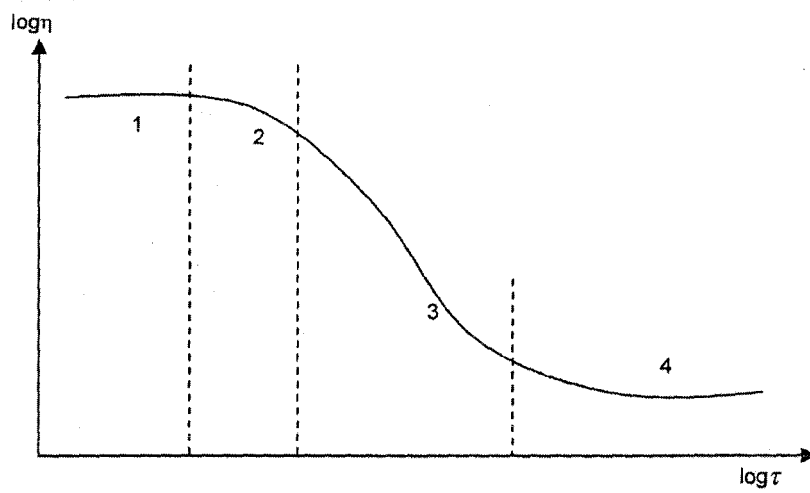


Figure 4 : Variation de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement pour un fluide rhéofluidifiant

2.2. Etude en régime permanent

La contrainte τ appliquée à un matériau est reliée à la vitesse de déformation $\dot{\gamma}$ par l'équation (2), où $\eta(t,\tau)$ est la viscosité. En régime permanent, pour $t \rightarrow +\infty$, ces différentes grandeurs rhéologiques deviennent stationnaires de sorte que $\eta(t,\tau) \rightarrow \eta(\tau)$.

L'équation (2) devient donc :

$$\eta(\tau) = \tau / \dot{\gamma} \text{ où } \eta(\tau) \text{ est la viscosité en régime permanent} \quad (7)$$

Dans le cas d'un fluide newtonien, la viscosité est indépendante de la contrainte imposée.

Tout fluide ayant un comportement différent est non newtonien. Pour certaines solutions de polymères, les dispersions et les émulsions, le comportement est non newtonien. Dans la majorité des cas, la viscosité η diminue en fonction de la contrainte τ et de la vitesse de déformation $\dot{\gamma}$ résultante : ce comportement est appelé rhéofluidifiant. Dans le cas moins fréquent où η augmente avec τ et $\dot{\gamma}$, un tel comportement est appelé rhéoépaississant.

Lorsqu'une solution de macromolécules est soumise à un cisaillement, différentes zones dans la variation de la viscosité en fonction de cette contrainte sont à distinguer (Figure 4) :

- sur le plateau newtonien (zone 1), les molécules ne sont pas perturbées et l'arrangement moléculaire est conservé.
- le régime rhéofluidifiant (3) peut correspondre à une orientation des molécules dans la solution, à une déformation progressive, à un désenchevêtrement, ou à une rupture de liaisons le cas échéant.
- la zone de transition (2) est caractérisée par une contrainte critique τ_c . L'inverse de cette contrainte est du même ordre de grandeur que le temps de relaxation moyen relatif aux processus cités précédemment.
- sur le second plateau newtonien (4), les molécules sont totalement orientées.

Cette courbe indique que, dans la limite des très faibles contraintes, la viscosité est constante et que, dans la limite des très hautes contraintes, elle est également constante mais à un niveau plus bas. La valeur constante la plus élevée s'appelle viscosité à cisaillement nul ou viscosité au premier plateau newtonien. Entre ces deux plateaux, pour les fluides rhéofluidifiants, la viscosité diminue avec la contrainte.

2.3. Etude en régime oscillatoire

Le terme viscoélasticité correspond à l'existence simultanée de propriétés visqueuses et élastiques dans un matériau. Un matériau peut montrer un comportement newtonien (visqueux) ou hookéen (élastique) dans une situation donnée. En effet, si l'expérience est très lente (temps de mesure long), l'échantillon apparaîtra plus visqueux qu'élastique, alors que si l'expérience est très rapide (temps de mesure court), il apparaîtra plus élastique que visqueux. A des échelles de temps intermédiaires, la réponse du matériau sera viscoélastique.

Une application très concrète et d'une grande importance pratique de l'équation (6) concerne les sollicitations sinusoïdales telles que :

$$\tau = \tau_m e^{i\omega t} \quad \Leftrightarrow \quad \dot{\tau} = i\omega \tau_m e^{i\omega t} \quad (8)$$

où τ_m est l'amplitude maximale de la contrainte et ω la fréquence (ou pulsation).

En incorporant l'équation (8) à l'équation (6) et en posant $t-t' = \varphi$, il vient :

$$\gamma = \int_{-\infty}^t \int J(t-t') i\omega \tau_m e^{i\omega t'} dt' = i\omega \tau_m e^{i\omega t} \int_0^{+\infty} J(\varphi) e^{-i\omega\varphi} d\varphi \quad (9)$$

En définissant la complaisance complexe $J^*(\omega)$ par :

$$J^*(\omega) = i\omega \int_0^{+\infty} J(\varphi) e^{-i\omega\varphi} d\varphi = J' - iJ'' \quad (10)$$

l'équation (9) devient:

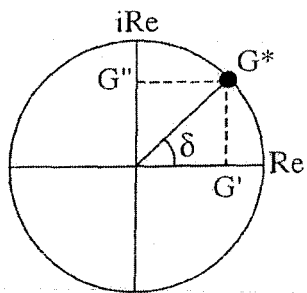
$$\gamma = J^*(\omega) \tau_m e^{i\omega t} = J^*(\omega) \tau \quad \Leftrightarrow \quad \tau = G^*(\omega) \gamma \quad (11)$$

$$\dot{\gamma} = J^*(\omega) i\omega \tau_m e^{i\omega t} = i\omega J^*(\omega) \tau \quad \Leftrightarrow \quad \tau = \eta^*(\omega) \dot{\gamma} \quad (12)$$

où $G^* = \frac{1}{J^*} = G' + iG''$ est le module complexe, G' le module élastique et G'' le module visqueux. G' quantifie l'aptitude d'un matériau à emmagasiner et à restituer réversiblement l'énergie mécanique, alors que G'' quantifie son aptitude à la dissiper de manière irréversible.

De même, $\eta^* = \frac{G^*}{i\omega} = \frac{G''}{\omega} - i\frac{G'}{\omega} = \eta' - i\eta''$ est la viscosité complexe. $\eta' = \frac{G''}{\omega}$ est la viscosité dynamique et $\eta'' = \frac{G'}{\omega}$ n'a pas de nom spécifique.

Afin d'illustrer la signification physique de ces fonctions, nous pouvons considérer deux comportements extrêmes de la matière condensée, le solide hookéen et le fluide newtonien.



$$G^*(\omega) = \frac{\tau}{\gamma} = \frac{\tau_m}{\gamma_m} e^{i\delta}$$

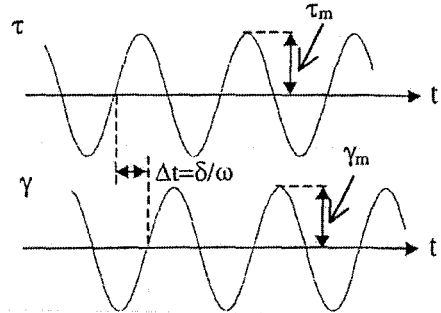


Figure 5 : Principe des mesures expérimentales en régime oscillatoire

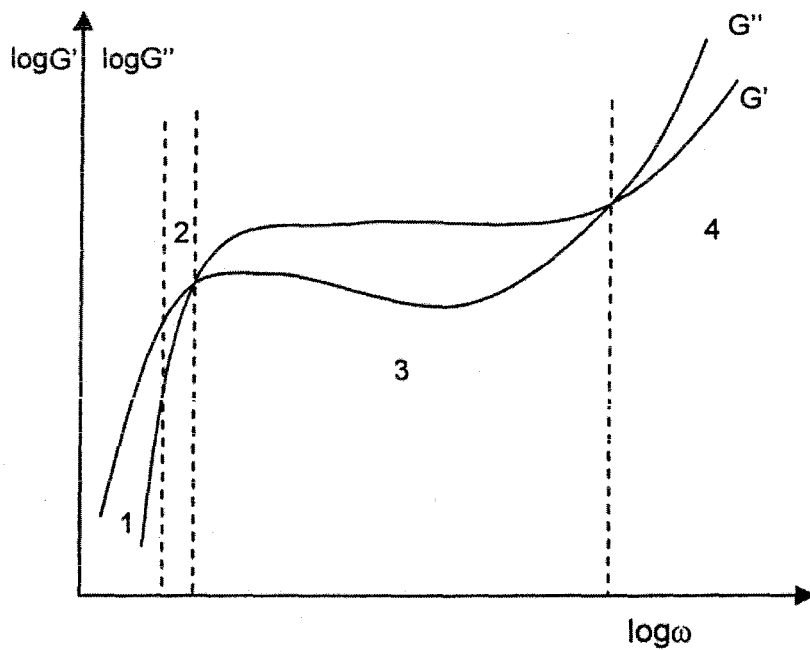


Figure 6 : Comportement viscoélastique d'une solution concentrée de polymère sur un large domaine de fréquences ($G', G''=f(\omega)$)

Pour le solide hookéen, on a $\tau = G\gamma$ ($G = \text{cte}$), et par identification avec l'expression (11), on a $G^* = G = G'$ et $G'' = 0$. Par ailleurs, la contrainte étant proportionnelle à la déformation, τ et γ sont en phase et on a $\gamma = \gamma_m e^{i\omega t}$ avec $\gamma_m = \tau_m / G$.

Pour un fluide newtonien, $\tau = \eta \dot{\gamma}$ ($\eta = \text{cte}$) et par identification avec l'expression (12), on a $\eta^* = \eta = \eta'$ et $\eta'' = 0$ soit $G'' = \omega\eta$ et $G' = 0$. La contrainte étant proportionnelle à la déformation, τ et γ sont en quadrature de phase et on a $\gamma = \gamma_m e^{i(\omega t - \pi/2)}$.

Pour des comportements viscoélastiques intermédiaires, le déphasage δ entre τ et γ est quelconque mais nécessairement borné par les limites hookéenne et newtonienne de sorte que $0 < \delta < \pi/2$ et $\gamma = \gamma_m e^{i(\omega t - \delta)}$; il vient :

$$G^*(\omega) = \frac{\tau}{\gamma} = \frac{\tau_m}{\gamma_m} e^{i\delta} \quad \Rightarrow \quad G' = \frac{\tau_m}{\gamma_m} \cos\delta \quad \text{et} \quad G'' = \frac{\tau_m}{\gamma_m} \sin\delta \quad (13)$$

D'un point de vue expérimental, il suffit donc de mesurer le déphasage δ et les amplitudes maximales τ_m et γ_m , via le couple et la déformation angulaire, pour déterminer l'ensemble des fonctions G^* , G' , G'' , η^* , η' , η'' , J^* , J' , J'' . Le principe des mesures en régime oscillatoire est illustré sur la figure 5.

L'étude de la variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence permet de caractériser le comportement viscoélastique de solutions ou de gels macromoléculaires. Elle donne accès à des informations sur la structure, puisque les valeurs prises par les modules dépendent des mouvements des segments de chaînes, des zones de jonction ainsi que de la durée de vie de ces jonctions et des désenchevêtrements (en régime semi-dilué).

En suivant G' et G'' sur un large domaine de fréquences (Figure 6), il est possible de mettre en évidence quatre zones distinctes :

- La zone terminale pour de petites fréquences (ou des temps de déformation longs) où $G' < G''$, et respectivement, proportionnels à ω^2 et ω .
- Lorsque la fréquence augmente, le caractère élastique est de plus en plus marqué : c'est le comportement viscoélastique type.
- Après le point de croisement, on a le plateau viscoélastique : $G' > G''$, G' et G'' peu dépendants de la fréquence, cette zone caractérise l'état de pseudo-gel en régime semi-dilué ou concentré, on parle également de plateau caoutchoutique ou zone de plateau.
- La dernière zone pour des fréquences très élevées correspond à un comportement vitreux.

3. ETUDE DES PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES DERIVES DE HYALURONATE

3.1. Matériel et conditions opératoires

3.1.1. Préparation des solutions de polymères

Les polymères sont dissous dans une solution saline NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Les solutions sont laissées sous agitation pendant 24 heures. Elles sont ensuite centrifugées à 5000 tr.min⁻¹ (2800g) pendant 30 minutes à 15°C, dans le but d'éliminer les bulles d'air éventuellement formées lors de l'agitation. Avant toute expérience, les échantillons sont placés au repos à 4°C pendant une nuit.

3.1.2. Matériel et conditions opératoires

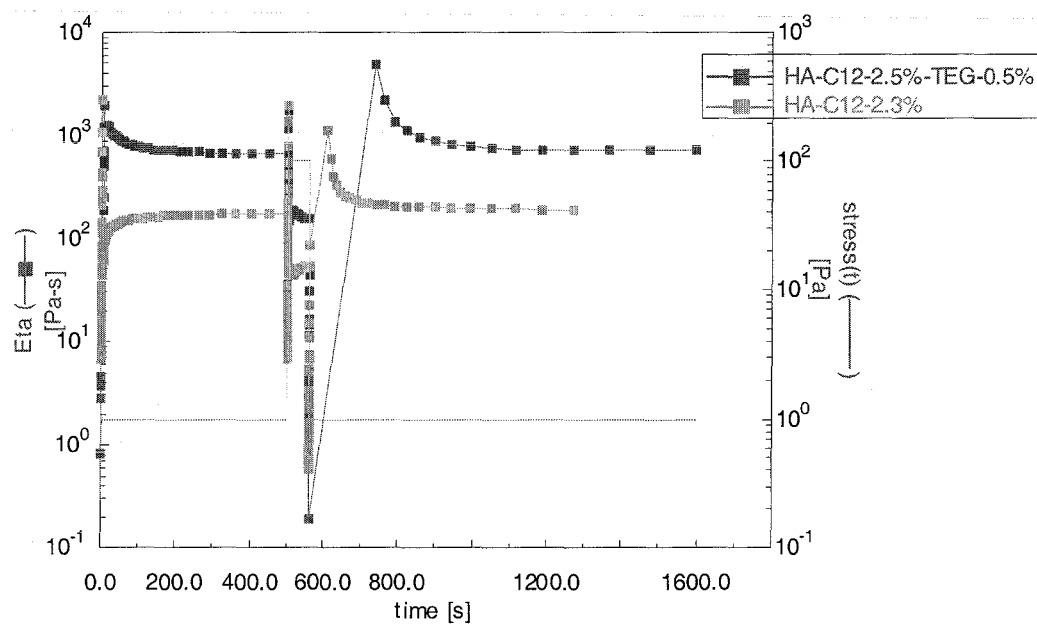
Une partie des mesures rhéologiques a été effectuée au Centre de Génie Chimique des Milieux Rhéologiquement Complexes (GEMICO) de l'ENSIC à Nancy. Les mesures en régimes permanent et oscillatoire ont été effectuées à contrainte imposée, à l'aide d'un rhéomètre SR 200 (Rheometric Scientific, USA). La géométrie utilisée est de type Plan/Plan, de diamètre 25 mm. L'entrefer est compris entre 0,5 et 1 mm.

L'autre partie des mesures rhéologiques a été réalisée au LCPM, avec un rhéomètre à contrainte imposée AR 2000 (TA Instruments, USA) équipé d'une géométrie Plan/Plan, le diamètre des plans étant de 40 mm et l'entrefer de 1 mm.

Sur ces deux appareils, la température a été fixée à 37°C ± 0,1°C et régulée par un système à effet Peltier placé sous le plateau inférieur.

A cette température, les mesures, souvent longues, peuvent entraîner un dessèchement de l'échantillon, l'utilisation d'un dispositif anti-évaporation est donc nécessaire.

En régime permanent, le rhéomètre impose une contrainte τ et donne l'évolution du gradient de cisaillement $\dot{\gamma}$ au cours du temps, sous cette contrainte. La viscosité est alors calculée en fonction de τ et de $\dot{\gamma}$ ($\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$). Les valeurs de viscosité ne sont enregistrées que lorsque l'évolution temporelle de la vitesse de cisaillement devient inférieure à 1% de sa valeur. Si cette condition n'est pas vérifiée, la viscosité est alors enregistrée à l'issue de 800 s, durée maximale d'imposition fixée arbitrairement pour chaque contrainte.



**Figure 7 : Effet du cisaillement sur deux échantillons
(37°C, 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹)**

Les mesures en régime oscillatoire ont été réalisées dans le régime de viscoélasticité linéaire des échantillons (G' et G'' indépendants de la contrainte). Quel que soit le régime considéré, les contraintes imposées sont comprises entre 0,1 et 500 Pa, selon l'échantillon.

3.1.3. Mise en place de l'échantillon

Les solutions de polymères associatifs sont susceptibles de présenter un comportement thixotrope et dépendant de l'histoire thermomécanique qu'elles ont subie. Il est donc primordial de limiter la destructuration de l'échantillon lors de sa mise en place sur le rhéomètre, cette mise en place devant être effectuée de façon la plus reproductible possible. Si des bulles d'air se forment lors de la mise en place, il faut les éliminer par aspiration avant de positionner le plateau supérieur.

3.1.4. Précisaillement de l'échantillon et reprise en viscosité

Le précisaillement est généralement utilisé pour annuler l'histoire thermomécanique subie par chaque échantillon (préparation et mise en place dans le rhéomètre). Pour des solutions de polymères associatifs, par exemple l'hydroxypropylguar modifié par des chaînes alkyle C_{22} - C_{28} ⁵ ou des polymères de type HASE (hydrophobically modified alkali soluble emulsions)^{6,7}, des précisaillements ont été réalisés sur les échantillons en imposant une contrainte de 25 Pa pendant 600 s (ou une vitesse de déformation de 10 s^{-1} pendant 300 s), suivie d'un temps de repos de 200 s (et 300 s).

Nous avons étudié l'effet du précisaillement sur deux échantillons, afin de vérifier s'il était nécessaire de le réaliser avant chaque mesure et s'il y avait éventuellement un endommagement de ces échantillons. Cette étude a été effectuée sur deux polymères modifiés : HA- C_{12} -2,3% et HA- C_{12} -2,3%-TEG-0,5% à 10 g.L^{-1} dans NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$. Nous avons soumis les échantillons à une contrainte de 1 Pa pendant 500 s, puis à une contrainte de 100 Pa pendant 60 s. Nous avons finalement attendu le temps au bout duquel la viscosité reprenait sa valeur initiale (Figure 7). Ce temps de reprise était de l'ordre de 200 s pour le HA- C_{12} -2,3% et de 500 s pour le HA- C_{12} -2,3%-TEG-0,5%.

A partir de cette étude et de celles réalisées au laboratoire par Rastello *et coll.*⁴, nous pouvons conclure que, lorsqu'un échantillon a subi un précisaillement, sa viscosité reprend rapidement sa valeur initiale quels que soient le type d'échantillon, le temps de précisaillement, le nombre de

Polymères	Temps de réaction du TEG ditosylé	Synthèse ^a	Agitation ^b	Aspect du milieu ^c	Fraction sol ^d
HA	sans TEG, 48h dans DMSO	1	ancree	limpide	1
HA-TEG-0,5%	48h	1	ancree	culot	0,74 ± 0,06
HA-TEG-1,5%	48h	1	ancree	culot	0,68 ± 0,04
HA-TEG-1,5%	24h	1	magn	trouble visqueux	
HA-TEG-1,5%	48h	1	magn	culot	0,73 ± 0,04
HA-TEG-1,5%	72h	1	magn	culot	0,75 ± 0,05
HA-TEG-3%	24h	2	ancree	trouble visqueux	
HA-TEG-1,5%	48h	2	ancree	culot	0,68 ± 0,04
HA-TEG-3%	48h	2	ancree	culot	0,54 ± 0,01

Tableau 1 : Etude des HA réticulés chimiquement

^a synthèses réalisées à partir de deux lots de HA-TBA (1 et 2) de

$\bar{M}_w = 1\ 000\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ (mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation)

^b agitation de type magnétique ou mécanique (ancree)

^c après centrifugation à $5000\ \text{tr.min}^{-1}$, pendant 30 minutes, à 15°C

^d définie comme le rapport de la masse de polymère soluble à la masse totale de polymère

créneaux de précisaillement, l'arrêt ou non du rhéomètre au cours de la reprise. On peut donc considérer qu'il n'est pas nécessaire d'annuler leur histoire thermomécanique, à condition que l'on prenne la précaution d'attendre 10 minutes au moins entre la mise en place de l'échantillon dans le rhéomètre et le début des mesures rhéologiques.

3.2. Mise en évidence de la réticulation chimique

Avant de discuter de l'influence de différents paramètres sur les propriétés rhéologiques des produits synthétisés, nous avons au préalable entrepris de mettre en évidence l'existence de la réticulation chimique.

Pour cela, différents hyaluronates réticulés chimiquement ont été synthétisés, à l'aide du protocole utilisé pour les hyaluronates doublement modifiés (chapitre II, §3.3).

- La première étape a consisté à transformer le HA en HA-TBA pour le rendre soluble dans le DMSO.
- Le HA-TBA lyophilisé est ensuite solubilisé à 1% (poids/volume) dans le DMSO pendant 24 heures.
- Le tétraéthylène glycol TEG ditosylé est ajouté et réagit pendant 24, 48 ou 72 heures.
- Le protocole de purification est identique à celui décrit dans le chapitre II (§3.3).
- Le dérivé de HA est finalement stocké à 4°C.

Ces dérivés ont ensuite été mis en contact à une concentration de 10 g.L^{-1} avec une solution NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ et leur aspect, après centrifugation, a été examiné (Tableau 1).

Dans le cas où un culot apparaît après centrifugation, la masse de polymère présent dans le culot et la masse de polymère solubilisé dans la solution saline ont été évaluées. Après avoir vérifié que la somme de ces masses était bien la masse totale de polymère mis à solubiliser, nous avons calculé la fraction sol correspondant à la quantité de polymère n'ayant pas été réticulé (et donc soluble). Nous avons supposé que les chaînes même très peu réticulées n'étaient pas solubles dans l'eau.

Toute autre condition de synthèse similaire, le temps de réaction du TEG ditosylate a une grande importance. Les dérivés obtenus après 24 heures de réaction forment des solutions visqueuses troubles, alors que ceux obtenus après 48 heures donnent naissance à un culot. Les fractions sol obtenues pour les dérivés après 48 et 72 heures étant les mêmes, on peut supposer que la réaction du TEG ditosylate est complète au bout de 48 heures.

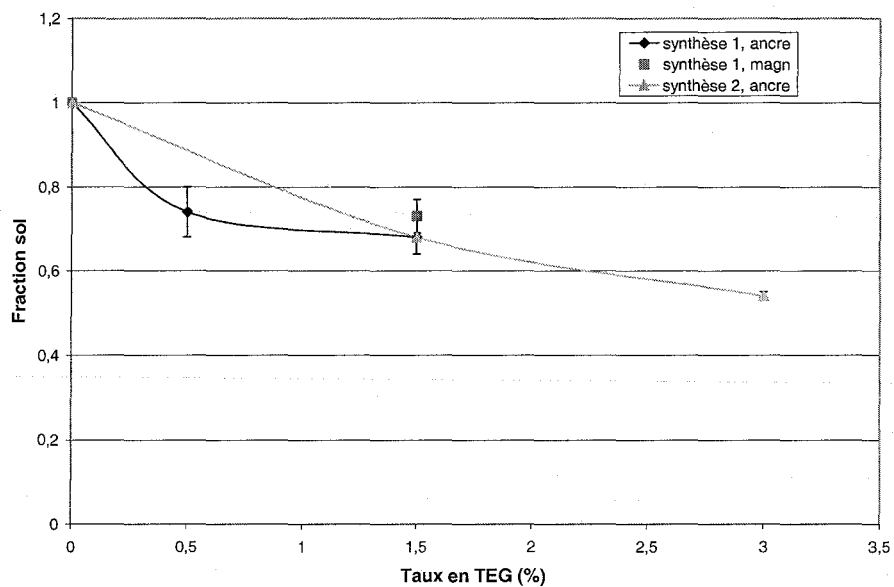


Figure 8 : Fraction sol obtenue pour les dérivés après 48 heures de réaction du TEG ditosylate en fonction du taux en TEG (conditions définies dans le tableau 1)

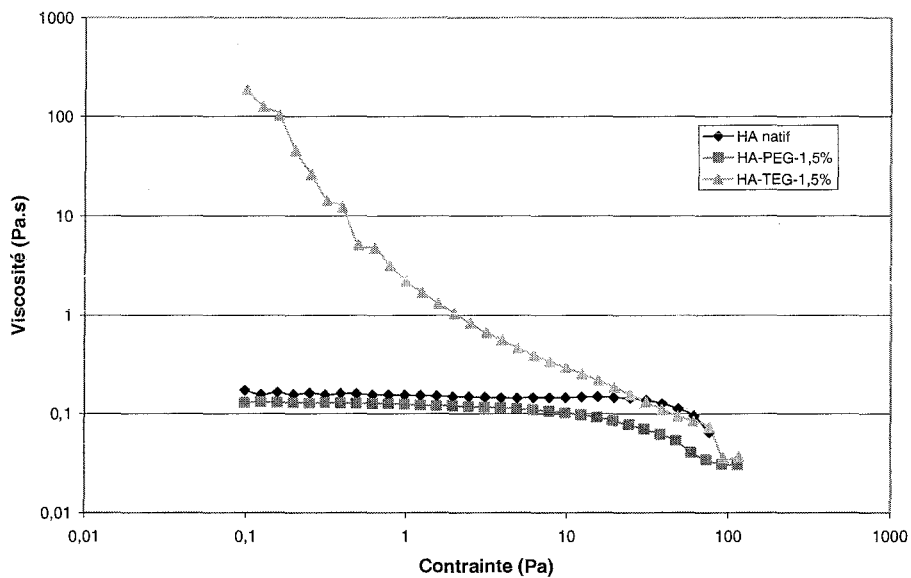


Figure 9 : Comparaison des propriétés rhéologiques du HA, HA-PEG-1,5% et HA-TEG-1,5% paramètres de synthèse : temps de réaction de 24 heures, agitation magnétique étude faite à 37°C pour une concentration de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

Comme l'illustre la figure 8, la fraction sol obtenue pour les dérivés dont le temps de réaction du TEG ditosylate était de 48 heures, diminue avec le taux en TEG, autrement dit avec le degré de réticulation. Cela tend à montrer l'existence de la réticulation chimique.

En outre, la SEC-MALLS nous a donné des informations qualitatives de cette réticulation. En effet, si nous essayons de mesurer la \overline{M}_w des polymères réticulés chimiquement, nous constatons que les indices de polymolécularité sont très importants (pouvant aller jusque 10) et que les valeurs de \overline{M}_w n'ont pas de réelle signification (valeur supérieure à la limite haute de séparation de la colonne) : la quantité de HA réticulé chimiquement éluée est faible, de l'ordre de 40%, ce qui montre que 60% sont retenus par le filtre placé en tête de la colonne d'injection. Nous pouvons en déduire que la réticulation chimique est effective, mais nous ne pouvons pas accéder à des valeurs de masses molaires par cette technique.

Pour compléter cette étude, un hyaluronate modifié par un dérivé monotosylé ($\text{CH}_3\text{O-PEG}_{350}$ -tosylé) a été synthétisé (protocole décrit au chapitre II, §3.2). Le dérivé monotosylé a réagi sur le HA-TBA pendant 24 heures sous agitation magnétique. Les chaînes de $\text{CH}_3\text{O-PEG}_{350}$ sont greffées de façon pendante. Ce produit est noté HA-PEG-1,5%.

Les propriétés rhéologiques du HA-PEG-1,5% sont comparées à celles du HA-TEG-1,5%, sur la figure 9. La ligne continue a été tracée pour plus de clarté mais ne constitue en aucun cas un modèle d'ajustement aux points expérimentaux.

Cette étude nous montre que la viscosité au premier plateau newtonien est identique pour un HA natif et pour un HA-PEG-1,5%. En outre, le comportement du HA-PEG-1,5% est complètement différent de celui du HA-TEG-1,5%. Il semble donc qu'il y ait une réelle réticulation chimique et que le TEG ditosylé n'ait pas été uniquement greffé de manière pendante.

La réticulation chimique ayant été ainsi démontrée, avec pour conséquence la formation possible d'une double réticulation en milieu aqueux entre les chaînes polymères, nous nous sommes alors intéressés au comportement de ces dérivés en régimes permanent et oscillatoire.

Polymères	\overline{M}_w (HA) (g.mol ⁻¹)	Agitation ^a	Viscosité au 1er plateau newtonien ^b (Pa.s)	G' ^c (Pa)	G'' ^c (Pa)
HA-C ₁₂ -2,7%	335 000	magn	0,8	0,02	0,4
HA-C ₁₂ -3,7%	335 000	magn	4	0,3	1,5
HA-C ₁₂ -5,5%	335 000	magn	80	1,2	6
HA-C ₁₂ 2,8%-TEG-2,5%	335 000	magn	2	0,2	0,7
HA-C ₁₂ -3,7%-TEG-3,75%	335 000	magn	150	18,1	17,8
HA-C ₁₂ -3,7%-TEG-1,25%	335 000	magn	20	0,5	1,9
HA-C ₁₂ -5,1%	880 000	magn	10 000	125	54
HA-C ₁₂ -5,1%-TEG-2%	880 000	magn	séparation de phases		
HA-C ₁₂ -5,1%-TEG-3%	880 000	magn	séparation de phases		
HA-C ₁₂ -5,1%-TEG-4%	880 000	magn	séparation de phases		
HA-C ₁₂ -4,5%	880 000	magn	260	22,2	11,2
HA-C ₁₂ -4,5%-TEG-6%	880 000	magn	séparation de phases		
HA-C ₁₂ -4,5%-TEG-8%	880 000	magn	séparation de phases		
HA-TEG-2%-C ₁₂ -2,6%	400 000	magn	3,8	1,2	2,6
HA-TEG-2%-C ₁₂ -3,7%	400 000	magn	140	21,1	19,1
HA-TEG-4%-C ₁₂ -2,1%	400 000	magn	4,5	1,2	1,9
HA-TEG-6%-C ₁₂ -3,0%	400 000	magn	4 800	63	26,7
HA-TEG-3%-C ₁₂ -3,7%	670 000	magn	séparation de phases		
HA-TEG-3%-C ₁₂ -4,9%	670 000	magn	séparation de phases		
HA-TEG-6%-C ₁₂ -3,7%	670 000	magn	séparation de phases		
HA-TEG-6%-C ₁₂ -5,7%	670 000	magn	séparation de phases		
HA	1 000 000	ancr	1,2	0,2	1,2
HA-C ₁₂ -2,3%	1 000 000	ancr	140	21,4	15,6
HA-C ₁₂ -4,4%	1 000 000	ancr	30 000	120,5	32,5
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -2,5%	1 000 000	ancr	700	23,6	12,4
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,8%	1 000 000	ancr	3 000	54,3	24,3
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -4,7%	1 000 000	ancr	80 000	141	33,6
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	1 000 000	magn	12	2,2	3,3
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	1 000 000	magn	80	14,8	13,5
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -1,8%	1 000 000	magn	13	3,1	3
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,7%	1 000 000	magn	21	3,8	4,2
HA-C ₁₂ -2,5%	1 000 000	magn	4	1,2	1,8
HA-TEG-1,5% // C ₁₂ -2,8%	1 000 000	magn	200	8,1	6

Tableau 2 : Paramètres rhéologiques des dérivés en régimes permanent et oscillatoire
(nomenclature des dérivés définie au chapitre II, § 3.4)

^a type d'agitation, magnétique ou mécanique (ancr)

^{b, c} données mesurées à 37°C pour une concentration en polymère de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

^c déterminés à une contrainte de 1 Pa, à une fréquence de 1 rad.s⁻¹

3.3. Comportement en régimes permanent et oscillatoire

Les dérivés doublement modifiés (synthèses décrites au chapitre II) ont été étudiés en régimes permanent et oscillatoire, dans des conditions proches du milieu physiologique, à 37°C et NaCl 0,15 mol.L⁻¹.

L'étude des échantillons en régime permanent consiste à déterminer la viscosité η en fonction de la contrainte imposée τ , lorsque la valeur de la vitesse de cisaillement mesurée $\dot{\gamma}$ est stationnaire. Elle permet de mettre en évidence le caractère associatif des hyaluronates substitués par des chaînes en C₁₂, le comportement des hyaluronates doublement modifiés et de les comparer.

L'évolution des modules élastique G' et visqueux G'' en fonction de la contrainte τ et de la fréquence ω met en évidence le comportement en régime oscillatoire d'un échantillon en solution aqueuse et renseigne ainsi sur le niveau de structuration du réseau formé.

Les résultats de ces études rhéologiques sont regroupés dans le tableau 2 et vont être discutés de manière approfondie dans les paragraphes suivants.

Pour certains polymères, il était impossible d'obtenir une solution visqueuse dans ces conditions. Selon les taux de substitution, nous avons obtenu des solutions non visqueuses, des systèmes insolubles ou des systèmes diphasiques. Cela nous a amenés à les étudier dans l'eau pure, afin de comparer leurs propriétés rhéologiques et structurelles.

Nous verrons l'influence de différents paramètres sur les propriétés rhéologiques des dérivés. Mais, dans un premier temps, nous allons nous attarder sur une série de dérivés HA-C₁₂ ou HA-TEG-C₁₂ synthétisés à partir d'un hyaluronate de \overline{M}_w de 1 000 000 g.mol⁻¹ (mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation), synthèses réalisées sous agitation mécanique à l'aide d'une ancre.

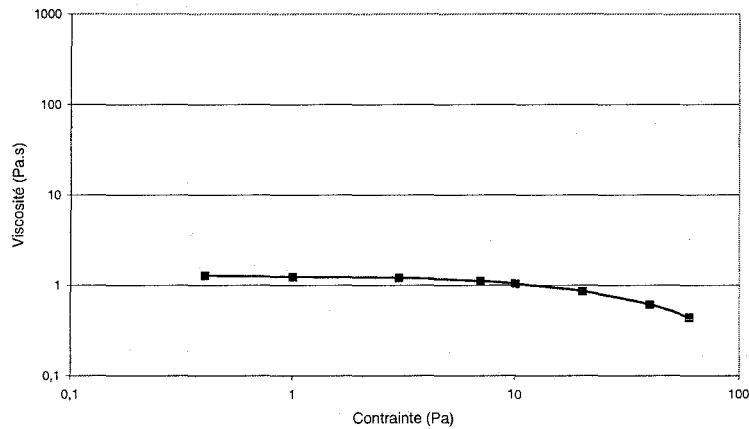


Figure 10 : Propriétés rhéologiques en régime permanent du HA natif (37°C, 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, $\overline{M}_w = 1\,000\,000\text{ g.mol}^{-1}$ (mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation))

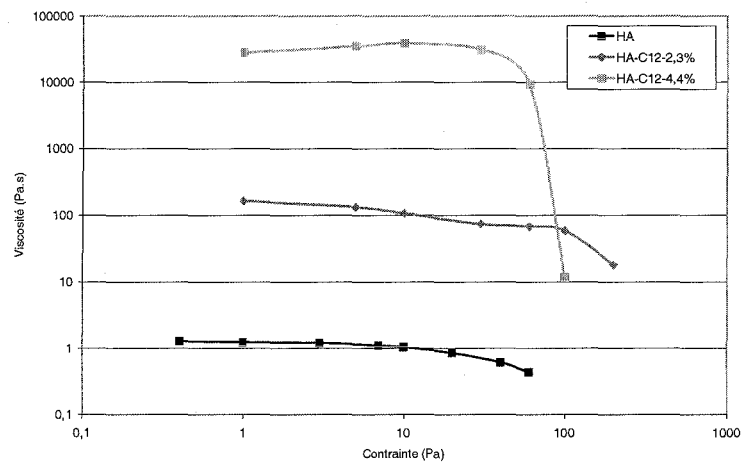


Figure 11 : Propriétés rhéologiques en régime permanent de HA modifiés par des chaînes C₁₂ (mêmes conditions que pour la figure 10, dérivés synthétisés sous agitation mécanique)

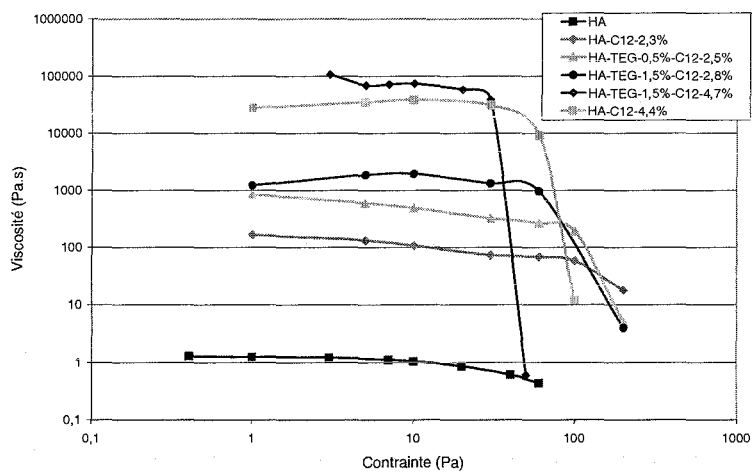


Figure 12 : Propriétés rhéologiques en régime permanent de quelques dérivés (mêmes conditions que pour la figure 10, dérivés synthétisés sous agitation mécanique)

3.3.1. Comportement en régime permanent

La figure 10 présente les variations de la viscosité η en fonction de la contrainte τ pour une solution de HA. La viscosité du HA est relativement faible, de l'ordre de 1 Pa.s, et est pratiquement indépendante de la contrainte. De telles solutions présentent un caractère quasi newtonien, la diminution de la viscosité est due uniquement au désenchevêtrement des chaînes de HA de haute masse molaire.

Un comportement identique a été observé pour d'autres polysaccharides en solution, tels que l'alginate⁴, la pectine⁸, le gellane⁹, le carraghénane¹⁰, la carboxyméthylcellulose et le guar¹¹.

Les valeurs de viscosité dépendent de la masse molaire du polymère et des conditions d'étude, notamment la concentration, le solvant, la force ionique, la température. Le comportement quasi newtonien en solution peut évoluer jusqu'à devenir viscoélastique si l'un de ces paramètres est modifié⁹⁻¹¹.

L'étude des propriétés rhéologiques des alginates et hyaluronates modifiés par des chaînes alkyle a déjà été discutée lors de précédents travaux de thèse du laboratoire^{3,4,8} et nous allons simplement montrer que les dérivés que nous avons synthétisés se comportent d'une manière identique.

Quel que soit le polymère modifié, on constate que sa viscosité en solution, aux faibles contraintes, est nettement supérieure à celle d'une solution de polymère parent à la même concentration (Figure 11).

Cette augmentation de viscosité traduit la formation d'un réseau tridimensionnel créé par les associations hydrophobes intermoléculaires entre chaînes alkyle. Ces associations constituent des points de jonction entre les chaînes macromoléculaires en solution, mais ces interactions étant de faible énergie, elles sont susceptibles de se rompre au-delà d'une contrainte critique. Au-delà de cette contrainte critique, deux phénomènes se superposent :

- la rupture/reformation des interactions hydrophobes
- le désengagement progressif des chaînes macromoléculaires

ce qui provoque une diminution de la viscosité de l'échantillon. Ce phénomène résulte de la rupture des points de jonction hydrophobes du réseau sous l'effet de la contrainte appliquée, ce qui déstructure le réseau et permet le désengagement des chaînes polymères enchevêtrées¹². En effet, les points de jonction formés par les associations hydrophobes intermoléculaires sont temporaires et sont continuellement rompus et reformés. Quand le réseau est soumis à une contrainte de cisaillement croissante, les associations hydrophobes intermoléculaires sont rompues à une vitesse

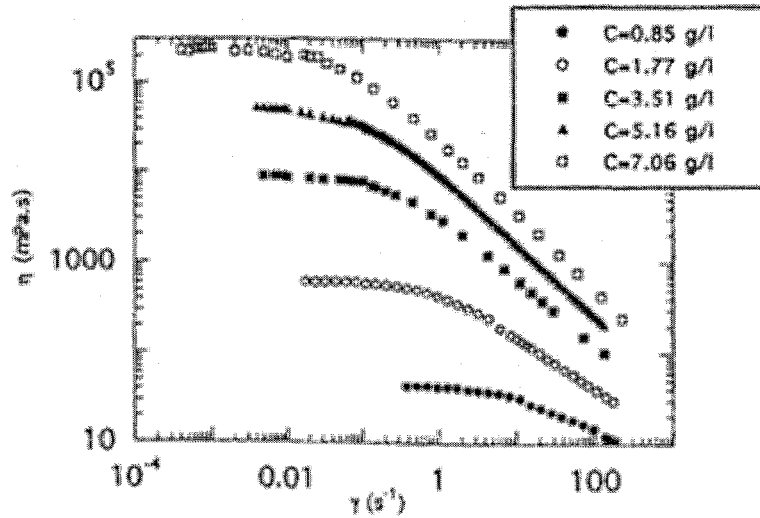


Figure 13 : Viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour un Hylan 49, d'après Milas et coll.¹³
(25°C, concentrations de 0,85 à 7,06 g.L⁻¹ dans NaCl 0,1 mol.L⁻¹)

Polymères	Viscosité au 1er plateau newtonien (Pa.s)	τ_c (Pa)	λ_e (s)
HA	1	30	0,03
HA-C ₁₂ -2,3%	140	90	1,6
HA-C ₁₂ -4,4%	30 000	60	500
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -2,5%	700	90	8
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,8%	3 000	60	50
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -4,7%	80 000	40	2000

Tableau 3 : Temps de relaxation de quelques dérivés
(mêmes conditions que pour la figure 11)

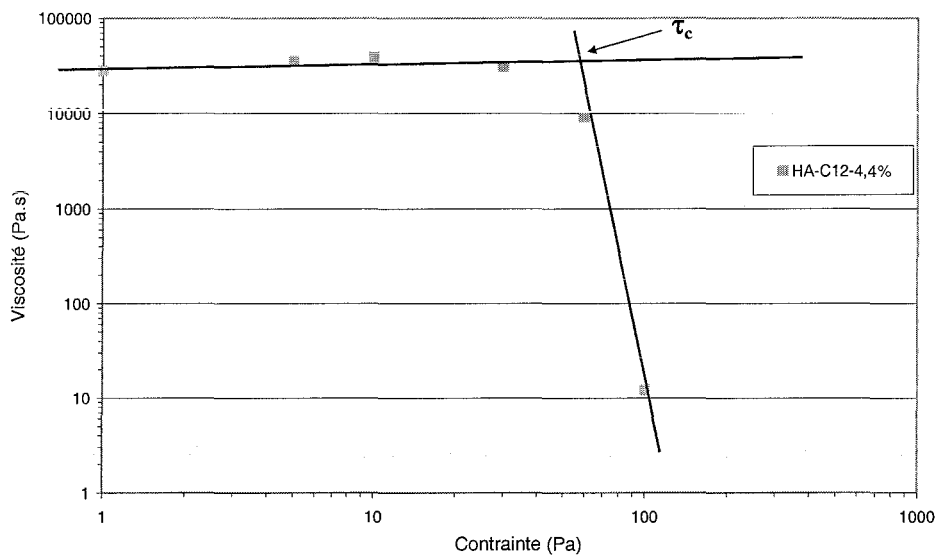


Figure 14 : Evaluation de la contrainte critique τ_c par la méthode des tangentes

plus grande que leur vitesse de formation. Ceci a pour résultat une diminution de la densité des points de jonction et par conséquent une chute de la viscosité^{5,7}.

En ce qui concerne les dérivés doublement modifiés, la figure 12 présente les propriétés rhéologiques de certains d'entre eux, synthétisés sous agitation mécanique (ancres).

Nous constatons nettement l'effet des taux en chaînes alkyle et en réticulant chimique sur les propriétés rhéologiques des matériaux. En effet, pour un taux constant en TEG, il y a augmentation de la viscosité au premier plateau newtonien avec le taux en C₁₂. Pour un taux en TEG de 1,5%, la viscosité au premier plateau newtonien augmente d'environ deux décades, en augmentant le taux en C₁₂ de 2%, ce qui confirme l'effet important des interactions hydrophobes pour ces hydrogels.

En comparant les propriétés du HA-C₁₂-2,3% et HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,8%, nous constatons que, pour un taux pratiquement identique en C₁₂, la viscosité au premier plateau newtonien augmente, d'une décade pour une augmentation du taux en TEG de 1,5%.

Il y a donc renforcement des propriétés rhéologiques en présence de réticulation chimique, tout en conservant le caractère rhéofluidifiant des dérivés amphiphiles (diminution de la viscosité avec la contrainte de cisaillement). Cette conservation du caractère rhéofluidifiant pour des dérivés réticulés chimiquement a déjà été remarquée, comme le prouvent les travaux de Milas *et coll.* sur le Hylan 49 obtenu par réticulation chimique du HA par le formaldéhyde¹³ (Figure 13).

Dans le tableau 3 sont regroupées les valeurs des contraintes critiques τ_c et celles des temps de relaxation λ_c associés, que l'on peut définir comme le rapport de la viscosité au premier plateau newtonien à la contrainte critique. Cette contrainte est évaluée par la méthode des tangentes sur la courbe d'écoulement $\eta = f(\tau)$, méthode illustrée sur la figure 14.

Nous voyons qu'à même concentration en polymère, les valeurs de τ_c pour des HA modifiés sont supérieures à celles du HA natif. Ceci est dû à l'augmentation du nombre et/ou de l'énergie des points de jonction interchaîne. La contrainte critique d'un dérivé avec réticulation chimique est du même ordre de grandeur que celle du dérivé sans réticulation chimique, à taux comparable en chaînes alkyle.

Nous pouvons conclure qu'il y a une synergie entre réticulation physique et réticulation chimique, en ce qui concerne la viscosité. De façon surprenante, on ne la retrouve pas pour les contraintes seuil : les valeurs de τ_c sont finalement peu différentes.

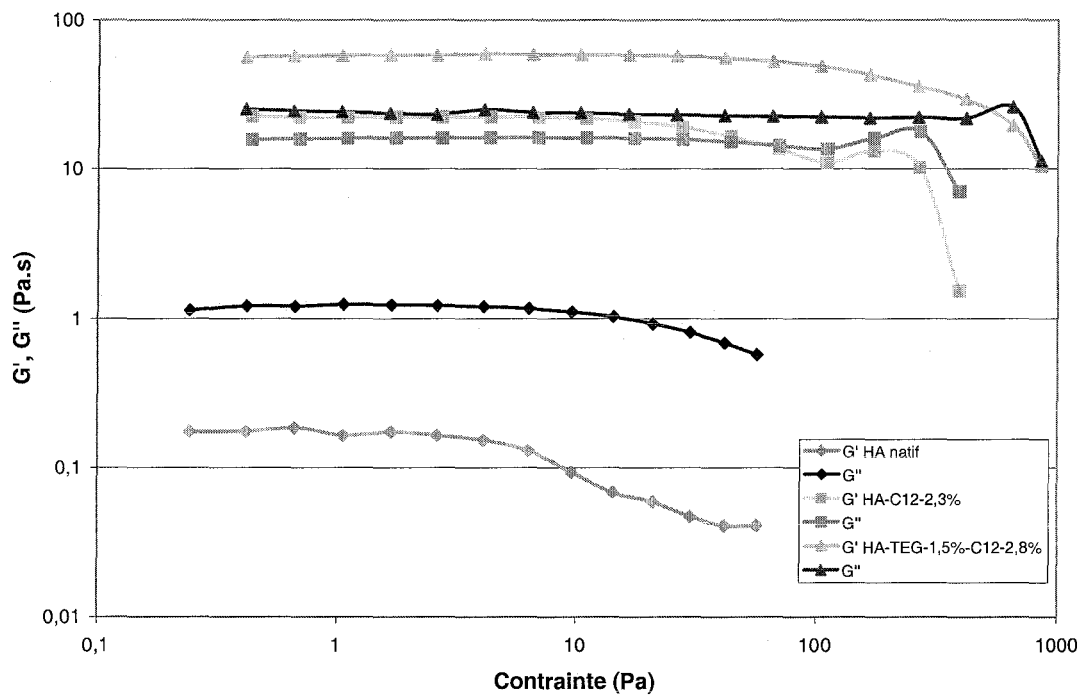


Figure 15 : Propriétés rhéologiques en régime oscillatoire de quelques dérivés (fréquence de 1 rad.s^{-1} , 37°C , 10 g.L^{-1} dans $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, dérivés synthétisés sous agitation mécanique, $\bar{M}_w = 1\,000\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ (mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation)

3.3.2. Comportement en régime oscillatoire

3.3.2.1. G' , G'' en fonction de la contrainte

La figure 15 présente les variations de G' et G'' en fonction de la contrainte appliquée τ , pour une fréquence de 1 rad.s^{-1} , pour des solutions de HA natif, HA-C₁₂-2,3% et HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,8%.

Pour les HA substitués par des chaînes alkyle et pour les HA doublement modifiés, nous observons qu'aux faibles contraintes, les modules G' et G'' sont constants et indépendants de la contrainte, avec G' supérieur à G'' . Lorsque les deux modules sont indépendants de τ , il s'agit du domaine de viscoélasticité linéaire des échantillons.

Après cette zone pour laquelle G' et G'' sont indépendants de la contrainte, nous observons une région où G'' , et dans certains cas G' , augmentent légèrement, que ce soit pour le HA-C₁₂-2,3% ou le HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,8%.

Puis, lorsque la contrainte appliquée augmente encore et atteint une valeur critique, le module G' chute brutalement ce qui signifie que les associations intermoléculaires sont rompues. A taux constant en réticulant chimique, quand un grand nombre d'associations hydrophobes sont rompues, il y a destruction du réseau, d'où une diminution de G'' . La valeur critique correspond à la contrainte à partir de laquelle la densité des points de jonction diminue, c'est-à-dire à partir de laquelle les chaînes polymères se désengagent du réseau.

L'augmentation de G' et G'' à des contraintes légèrement inférieures à cette contrainte seuil a déjà été constatée dans le cas d'autres polymères associatifs, tels que des polymères de type HASE^{6,7,14}, des dérivés associatifs de pectine et d'alginate^{1,4}. Il s'agit du phénomène de rhéoépaississement : dans le domaine de viscoélasticité linéaire, la contrainte appliquée est suffisamment faible pour ne pas provoquer de modification dans le réseau polymère. Mais à plus fortes contraintes, les pelotes polymères s'étirent, entraînant une augmentation du volume occupé par le réseau et par conséquent une augmentation du module G'' . Dans le même temps, quand le réseau polymère s'expande, certaines associations intramoléculaires sont rompues. Davantage de groupements hydrophobes sont alors disponibles pour créer de nouvelles associations intermoléculaires avec les chaînes polymères voisines. En conséquence, le nombre d'associations hydrophobes intermoléculaires augmente, et avec lui le module G' . Ainsi, le rhéoépaississement serait dû à l'augmentation de la densité de chaînes et de volume hydrodynamique, c'est-à-dire au changement d'associations intramoléculaires en intermoléculaires sous l'effet du cisaillement.

D'autres explications sont également proposées. Ainsi, Séréro *et coll.* ont montré sur des solutions de polymères téléchéliques que l'augmentation de G' était due, non pas à la mise en place de nouvelles interactions hydrophobes intermoléculaires, mais plutôt à l'étirement des chaînes sous

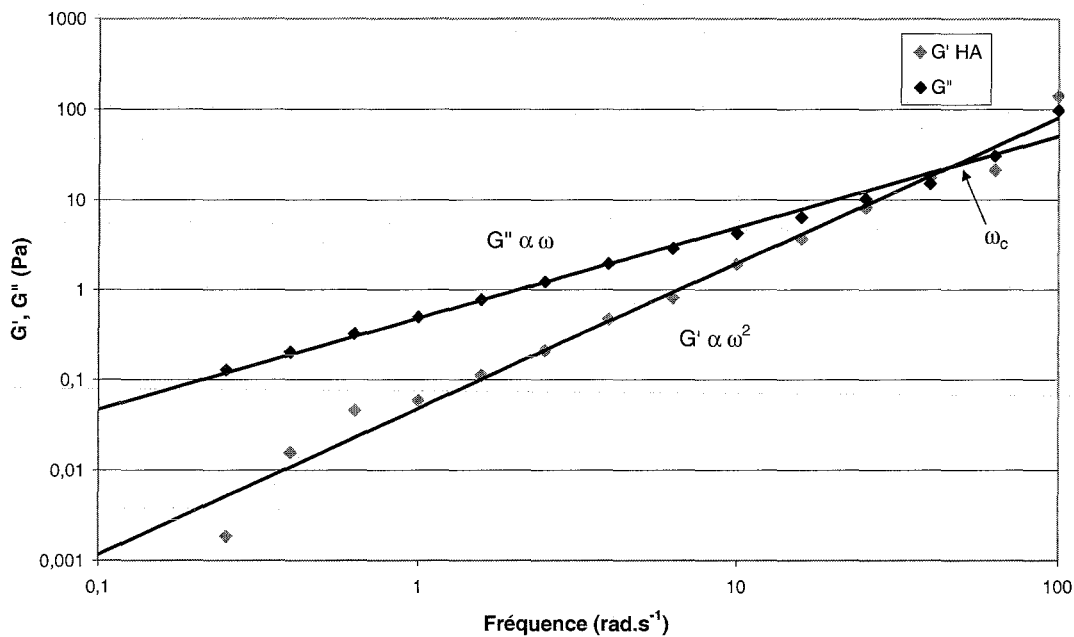


Figure 16 : Spectre mécanique du HA natif
 (contrainte de 1Pa, 37°C, 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹,
 $\bar{M}_w = 1\,000\,000$ g.mol⁻¹ (mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation))

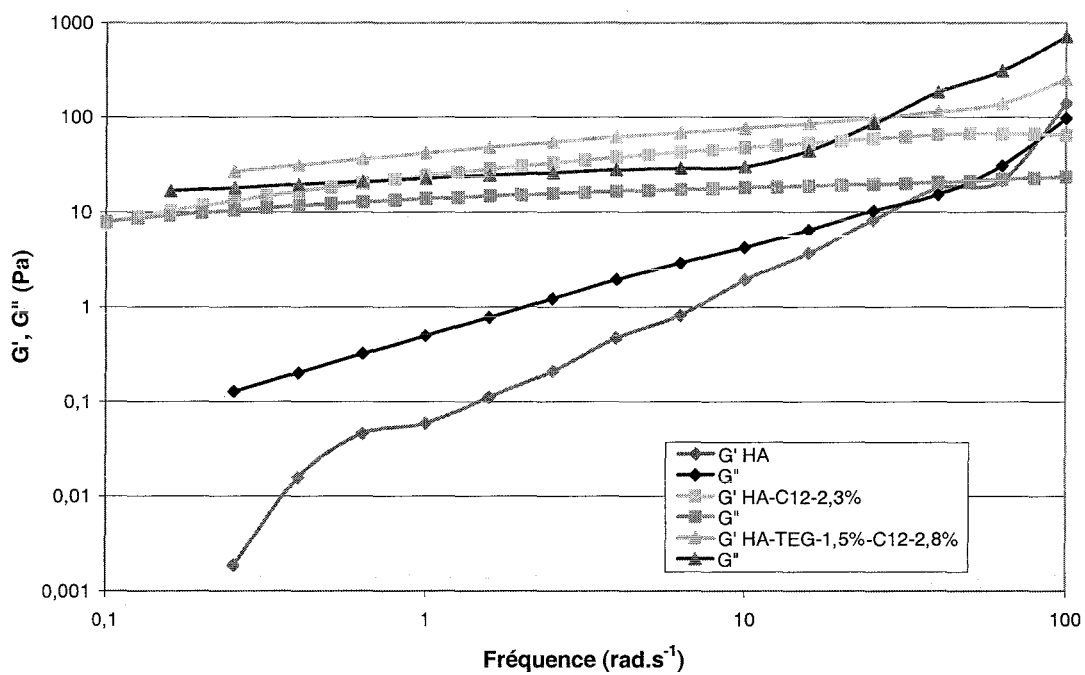


Figure 17 : Propriétés rhéologiques en régime oscillatoire de quelques dérivés
 (mêmes conditions que pour la figure 16, dérivés synthétisés sous agitation mécanique)

l'effet du cisaillement. La réponse non linéaire à cet étirement des chaînes sous l'effet de la contrainte se traduit par une augmentation de la rigidité du réseau et, par conséquent, par une augmentation de G' ¹⁵.

Il faut également noter que le HA doublement modifié présente des modules et des contraintes seuil plus élevés que le HA modifié par des chaînes alkyle, ce qui montre l'intérêt de la réticulation chimique pour le renforcement des propriétés rhéologiques.

3.3.2.2. G' , G'' en fonction de la fréquence

Les spectres mécaniques des échantillons, à savoir l'évolution des modules en fonction de la fréquence, pour une contrainte fixée dans le domaine de linéarité, permettent d'appréhender leur comportement en solution et d'obtenir des informations sur la structure et la dynamique moléculaire. Dans ces conditions, les mesures effectuées ne perturbent pas l'état d'équilibre du réseau.

Lorsqu'un fluide possède plusieurs temps de relaxation ou une distribution continue de temps de relaxation, l'évolution des modules G' et G'' peut être complètement différente avec la présence de plusieurs maxima à des fréquences ω_m bien définies (si les temps de relaxation sont indépendants les uns des autres et suffisamment différents), un élargissement du pic correspondant au maximum de G'' et un étirement du spectre dans son ensemble. Dans le second cas, le maximum de G'' ne peut pas être défini et donc ω_m ne peut pas être déterminée. C'est pourquoi il est d'usage d'utiliser ω_c qui est la fréquence à laquelle G' et G'' se croisent, pour calculer le temps de relaxation déterminé d'après les spectres mécaniques $\lambda_o = \frac{1}{\omega_c}$.

La figure 16 présente le spectre mécanique du HA natif. On constate qu'il présente un comportement de type fluide visqueux dans la zone terminale (faibles fréquences), caractéristique du désenchevêtrement des chaînes macromoléculaires. Son spectre mécanique se caractérise en effet par des modules dépendants de la fréquence, avec G' variant en ω^2 et G'' , supérieur à G' , variant en ω . Le point de croisement des modules G' et G'' se situe à une fréquence de l'ordre de 50 rad.s^{-1} , le temps de relaxation des chaînes de hyaluronate est donc de l'ordre de $0,02 \text{ s}$, ce qui correspond au même ordre de grandeur que celui obtenu en régime permanent.

La figure 17 présente les spectres mécaniques du HA natif, d'un HA modifié par des chaînes alkyle HA-C₁₂-2,3% et d'un HA doublement modifié HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,8%.

Nous constatons que, pour les polymères modifiés, les deux modules G' et G'' varient peu sur une large gamme de fréquences dans le domaine considéré et que G' est supérieur à G'' . Ceci caractérise un comportement de type solide viscoélastique et illustre le fait que les HA modifiés (simple ou double réticulation) forment des gels forts en milieu aqueux.

Des études rhéologiques en régime oscillatoire sur des dérivés réticulés chimiquement ont montré des résultats similaires. Ainsi, Barbucci *et coll.*¹⁶ ont montré sur des hydrogels de HA, d'AA et de carboxyméthylcellulose que l'introduction de réticulation chimique entre les chaînes mène à un réseau permanent stable ayant des spectres mécaniques proches de ceux présentés ici. Il en est de même pour les travaux de Dentini *et coll.* sur des gels de gellane réticulé par la 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide¹⁷.

Les modules du HA doublement modifié sont supérieurs à ceux du HA modifié par des chaînes alkyle, ce qui montre bien l'effet de la double réticulation.

La remontée de G'' aux fortes fréquences pour le HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,8% peut être expliquée par un phénomène de relaxation autre que celui des chaînes polymères enchevêtrées.

Quant au point de croisement de G' et G'' pour le dérivé doublement modifié, il se situe à une fréquence de 0,1 rad.s⁻¹, ce qui donne un temps de relaxation d'environ 10 s, du même ordre de grandeur que celui obtenu en régime permanent.

3.3.3. Conclusion

Nous avons montré que l'introduction de chaînes hydrophobes et de réticulation chimique sur le hyaluronate conduit à une augmentation plus ou moins prononcée de la viscosité des solutions au premier plateau newtonien et des modules G' et G'' . Cette augmentation de la viscosité et des modules G' , G'' est due à la formation d'un réseau polymère tridimensionnel stabilisé par les associations hydrophobes intermoléculaires et renforcé par l'existence d'une faible réticulation chimique.

La formation d'un réseau tridimensionnel par l'introduction de chaînes hydrophobes a été couramment démontrée, dans le cas des polymères associatifs, notamment de type HASE¹⁸ ou HEUR¹², pour des dérivés associatifs d'alginate de sodium⁴, de hyaluronate de sodium³, de pectine¹, de cellulose¹⁹, de polyacrylamides²⁰ ou de carboxyméthylpullulanes²¹.

Concentration en polymère dans l'eau (g.L ⁻¹)	G' ^a (Pa)	G'' ^a (Pa)	Viscosité au 1er plateau newtonien ^b (Pa.s)
5	3	3	1 000
7	24	10,5	10 750
9	236	47	100 000

Tableau 4 : Paramètres rhéologiques du HA-TEG-4,5%-C₁₂-3,7% en fonction de la concentration
^{a, b} données mesurées à 37°C pour une certaine concentration en polymère dans l'eau

^a déterminés à une contrainte de 1 Pa, à une fréquence de 1 rad.s⁻¹

Dérivés synthétisés sous agitation magnétique,

$\bar{M}_w = 670\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ (mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation)

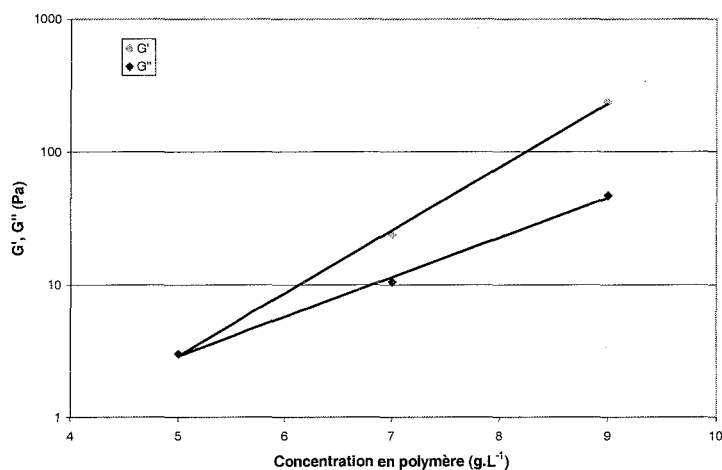


Figure 18 : Modules G' et G'' en fonction de la concentration de HA-TEG-4,5%-C₁₂-3,7%
(mêmes conditions que dans le tableau 4)

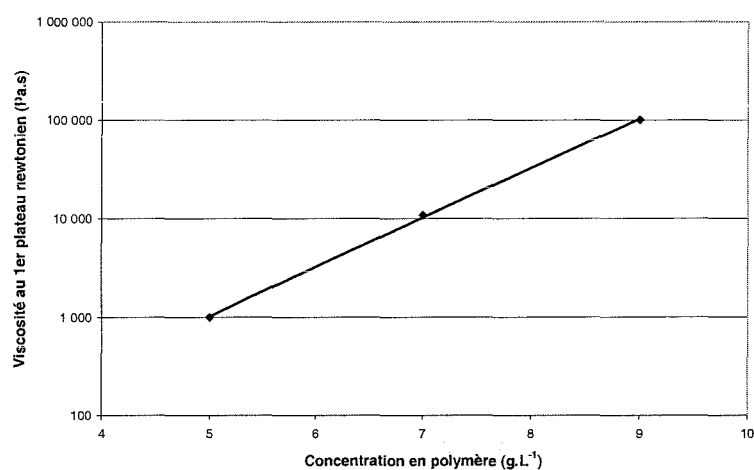


Figure 19 : Viscosité au 1^{er} plateau newtonien en fonction de la concentration de HA-TEG-4,5%-C₁₂-3,7%
(mêmes conditions que pour la figure 18)

La présence de réticulant chimique à un taux relativement faible permet d'augmenter la viscosité au premier plateau newtonien et les modules élastiques et visqueux, ce qui est conforme à la littérature^{13,16,17}, et n'empêche pas la conservation du caractère rhéofluidifiant des polymères amphiphiles associatifs, utile pour les applications visées.

Nous avons ensuite étudié l'influence de différents paramètres sur les propriétés rhéologiques de ces dérivés : solvant, concentration en polymère, taux en chaînes alkyle et en réticulant chimique, masse molaire moyenne du polymère, type d'agitation, précipitation pendant la synthèse.

3.4. Influence de la concentration en polymère

Les résultats concernant les propriétés rhéologiques du HA-TEG-4,5%-C₁₂-3,7% étudiées à trois concentrations différentes (5, 7 et 9 g.L⁻¹ dans l'eau à 37°C) sont présentés dans le tableau 4.

La figure 18 représente l'évolution des modules G' et G'' de HA-TEG-4,5%-C₁₂-3,7% en fonction de la concentration en polymère, pour les trois concentrations dans l'eau, à 37°C.

La figure 19 présente la variation de la viscosité au premier plateau newtonien de ce même HA-TEG-4,5%-C₁₂-3,7% pour les trois concentrations étudiées.

Lorsque la concentration en polymère augmente, les valeurs de G' et G'' et leur écart augmentent, les modules restant indépendants de la fréquence. Ceci illustre le fait que les gels formés dans l'eau ont un comportement de plus en plus élastique et sont de plus en plus structurés quand la concentration augmente. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Rastello *et coll.*⁴ sur des alginates amphiphiles.

Nous observons une augmentation importante de la viscosité au 1^{er} plateau newtonien, lorsque la concentration en polymère augmente.

A taux constant de réticulant chimique, lorsque la concentration en polymère augmente, la concentration de groupements hydrophobes en solution augmente également d'où une plus grande probabilité pour ces groupements de former des jonctions hydrophobes. L'augmentation du nombre des associations intermoléculaires se traduit par une extension et une densification du réseau en solution.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour des dérivés amphiphiles d'alginate et de hyaluronate de sodium^{3,4} et pour d'autres polymères associatifs de type HASE²², des pectines modifiées par des chaînes alkyle à 12 et 18 carbones⁸, des dérivés de cellulose^{19,23} et des polyacrylamides modifiés par des groupes hydrophobes de N,N-dihéxylacrylamide²⁴.

\overline{M}_w du HA après acidification, neutralisation et lyophilisation (g.mol ⁻¹)	335 000
	880 000
	400 000
	670 000
	1 000 000
Masse de HA-TBA utilisée lors de la synthèse	de 300mg à 3000mg
Ordre d'ajout des réactifs *	C ₁₂ H ₂₅ Br puis TEG ditosylé TEG ditosylé puis C ₁₂ H ₂₅ Br
Temps de réaction **	24h avec ou sans compétition entre réactifs
	48h avec ou sans compétition entre réactifs
Type d'agitation	magnétique mécanique (ancree)

Tableau 5 : Paramètres de synthèse étudiés

* Différents protocoles de synthèse ont été utilisés. Dans le cas du protocole n°1, nous ajoutons tout d'abord le dérivé bromé, puis, 24 heures après, le TEG ditosylé. Dans le cas du protocole n°2, l'ajout du TEG ditosylé se fait avant celui du dérivé bromé.

** Dans le cas du protocole n°1, le dérivé bromé réagit pendant 48 heures, 24 heures en absence de TEG ditosylé puis 24 heures en sa présence. Les deux réactifs sont donc en compétition pendant 24 heures.

Dans le cas du protocole n°2, le TEG ditosylé réagit pendant 48 heures, 24 heures en absence du dérivé bromé et 24 heures en sa présence. Les deux réactifs sont donc en compétition pendant 24 heures.

Dans le cas du protocole n°3, le TEG ditosylé réagit pendant 24 heures, puis le dérivé polymère est précipité au bout de ces 24 heures pour éliminer le TEG ditosylé résiduel et est ensuite solubilisé dans le DMSO. Le dérivé bromé est alors ajouté et réagit pendant 24 heures. Dans ce cas, il n'y a pas de compétition entre les deux réactifs.

Polymères	Quantité de HA-TBA (mg)	Viscosité au 1er plateau newtonien ^a (Pa.s)	G' ^b (Pa)	G'' ^b (Pa)
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	500	12	2,2	3,3
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,7%	1000	21	3,8	4,2

Tableau 6 : Paramètres rhéologiques de deux produits en fonction de la masse de HA-TBA
^{a, b} données mesurées à 37°C pour une concentration en polymère de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹
^b déterminés à une contrainte de 1 Pa, à une fréquence de 1 rad.s⁻¹

Dérivés synthétisés sous agitation magnétique,

$\overline{M}_w = 1\ 000\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ (mesurée après acidification, neutralisation et lyophilisation)

Polymères	Agitation	Viscosité au 1er plateau newtonien ^a (Pa.s)	G' ^b (Pa)	G'' ^b (Pa)
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,7%	magnétique	21	3,8	4,2
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,8%	ancree	3 000	28,3	10,4

Tableau 7 : Paramètres rhéologiques de deux produits en fonction du mode d'agitation
(mêmes conditions que dans le tableau 6, masse de HA-TBA = 1000 mg)

3.5. Discussion sur les effets de différents paramètres de synthèse

Nous nous sommes, jusqu'à présent, intéressés à une seule série de polymères, avec des paramètres de synthèse bien définis (polymère de \overline{M}_w de 1 000 000 g.mol⁻¹, agitation à l'aide d'une ancre, ajout du dérivé ditosylé puis du dérivé bromé), l'étude de l'influence de la concentration en polymère sur les propriétés rhéologiques mise à part. Nous allons maintenant rapporter les résultats d'étude de l'influence de différents paramètres de synthèse sur les propriétés rhéologiques (chapitre II, §5). Les paramètres qui ont été étudiés sont rappelés dans le tableau 5.

3.5.1. Influence de la masse de HA-TBA utilisée lors de la synthèse

Le tableau 6 regroupe les paramètres rhéologiques de deux produits synthétisés à partir d'un polymère de même \overline{M}_w (1 000 000 g.mol⁻¹), sous agitation magnétique, seule la quantité de HA-TBA mise dans le réacteur diffère.

Nous constatons que les valeurs de viscosité au premier plateau newtonien, de G' et de G'' sont du même ordre de grandeur pour les deux dérivés. La quantité de HA-TBA utilisée lors de la synthèse n'a donc que peu d'influence sur les propriétés rhéologiques.

3.5.2. Influence du type d'agitation

Le tableau 7 présente les paramètres rhéologiques de produits synthétisés dans les mêmes conditions, si ce n'est le mode d'agitation (ancre ou agitation magnétique).

Nous constatons que le HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,8%, dont l'agitation a été faite avec une ancre, présente des modules G' et G'' significativement plus élevés (7 fois) que ceux de HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,7% préparés sous agitation magnétique, et une viscosité au 1^{er} plateau newtonien 15 fois plus élevée, à des taux de fixation comparables.

Rastello *et coll.* avaient déjà mentionné que les gels d'alginate amphiphile formés en milieu aqueux à partir d'un polymère synthétisé avec une ancre d'agitation étaient beaucoup plus forts que ceux obtenus à partir d'un polymère synthétisé avec une agitation magnétique⁴.

Nous pouvons supposer que la nature de l'agitation utilisée lors de la synthèse a une influence sur la répartition des chaînes alkyle et du réticulant chimique sur la chaîne polysaccharidique et que ceci a un effet sur les propriétés rhéologiques. Cette hypothèse n'a cependant pas pu être vérifiée.

Polymères	Précipitation	Viscosité au 1er plateau newtonien ^a	G' ^b	G'' ^b
		(Pa.s)	(Pa)	(Pa)
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,7%	non	21	3,8	4,2
HA-TEG-1,5% // C ₁₂ -2,8%	oui	200	8,1	6

Tableau 8 : Paramètres rhéologiques de deux produits obtenus avec ou sans précipitation intermédiaire (mêmes conditions que dans le tableau 6)

Polymères	\bar{M}_w (g.mol ⁻¹)	Agitation ^a	Viscosité au 1er plateau newtonien ^b	G' ^c	G'' ^c
			(Pa.s)	(Pa)	(Pa)
HA-C ₁₂ -2,7%	335 000	magn	0,8	0,02	0,4
HA-C ₁₂ -3,7%	335 000	magn	4	0,3	1,5
HA-C ₁₂ -5,5%	335 000	magn	80	1,2	6
HA-TEG-2%-C ₁₂ -2,6%	400 000	magn	3,8	1,2	2,6
HA-TEG-2%-C ₁₂ -3,7%	400 000	magn	140	21,1	19,1
HA-C ₁₂ -4,5%	880 000	magn	260	22,2	11,2
HA-C ₁₂ -5,1%	880 000	magn	10 000	125	54
HA	1 000 000	ancre	1,2	0,2	1,2
HA-C ₁₂ -2,3%	1 000 000	ancre	140	21,4	15,6
HA-C ₁₂ -4,4%	1 000 000	ancre	30 000	120,5	32,5
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,8%	1 000 000	ancre	3 000	54,3	24,3
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -4,7%	1 000 000	ancre	80 000	141	33,6

Tableau 9 : Effet du taux en C₁₂ et de \bar{M}_w sur les paramètres rhéologiques de différents dérivés

^a agitation de type magnétique ou mécanique (ancre)
^{b, c} mêmes conditions que dans le tableau 6

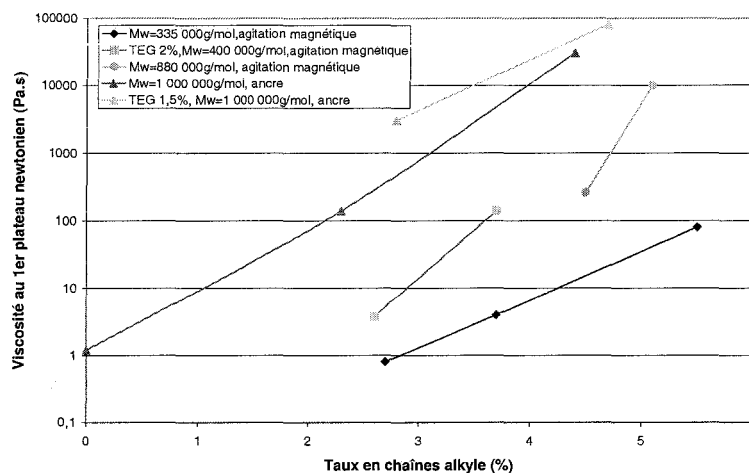


Figure 20 : Variation de la viscosité au premier plateau newtonien en fonction du taux en C₁₂ et du mode opératoire (10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, 37°C)

3.5.3. Influence de la précipitation pendant la synthèse

Dans le tableau 8 sont regroupés les paramètres rhéologiques de produits synthétisés dans les mêmes conditions, seule une précipitation entre l'ajout du réticulant chimique et l'ajout du dérivé bromé est réalisée pour l'un de ces produits noté HA-TEG//C₁₂. Ce protocole avait été établi pour éliminer la compétition entre le TEG ditosylé résiduel et le dérivé bromé C₁₂H₂₅Br lors de la synthèse, la présence du TEG ditosylé gênant la réaction de fixation du dérivé bromé.

Le HA-TEG-1,5%/C₁₂-2,8%, qui a subi une précipitation entre les deux ajouts de réactifs, présente des modules G' et G'' plus élevés (2 à 3 fois) que ceux de HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,7%, et une viscosité au 1^{er} plateau newtonien 10 fois plus élevée, à des taux de fixation comparables. Dans ce cas également, nous n'avons pu apporter d'explication vérifiable expérimentalement.

3.5.4. Influence des taux en C₁₂ et TEG et de la masse molaire du polymère

3.5.4.1. Effet du taux en chaînes alkyle et de la \overline{M}_w

Le tableau 9 regroupe les paramètres rhéologiques en fonction du taux en C₁₂, pour les produits synthétisés selon différents modes opératoires et à partir de polymères de \overline{M}_w différentes.

La figure 20 présente, pour ces produits, l'évolution de la viscosité au premier plateau newtonien en fonction du taux en C₁₂. Quant aux figures 21 et 22, elles présentent l'évolution des modules G' et G'' en fonction de ce même taux.

Nous pouvons constater que, quelles que soient les conditions de synthèse utilisées, il y a une augmentation des paramètres rhéologiques des dérivés avec le taux en C₁₂, à taux constant en TEG, ce qui confirme les discussions des paragraphes 3.3.1 et 3.3.2.

La viscosité au premier plateau newtonien pour les HA doublement modifiés peut atteindre une valeur 10⁴-10⁵ fois plus élevée que le HA natif ; quant aux modules G' et G'', la valeur de G' peut être multipliée jusque 700 fois et G'' 30 fois.

Nous avons déjà vu que ces valeurs dépendent de manière importante du type d'agitation utilisé lors de la synthèse, les dérivés ayant été synthétisés à l'aide d'une ancre présentant des paramètres rhéologiques plus élevés.

On discutera dans le paragraphe suivant de l'effet du TEG sur les propriétés rhéologiques des matériaux.

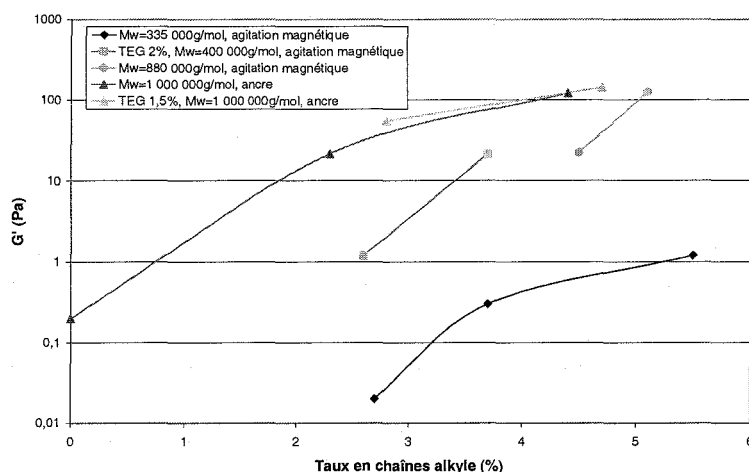


Figure 21 : Variation de G' en fonction du taux en C_{12} et du mode opératoire

(10 g.L^{-1} dans $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, 37°C , mesuré à une contrainte de 1 Pa et à une fréquence de 1 rad.s^{-1})

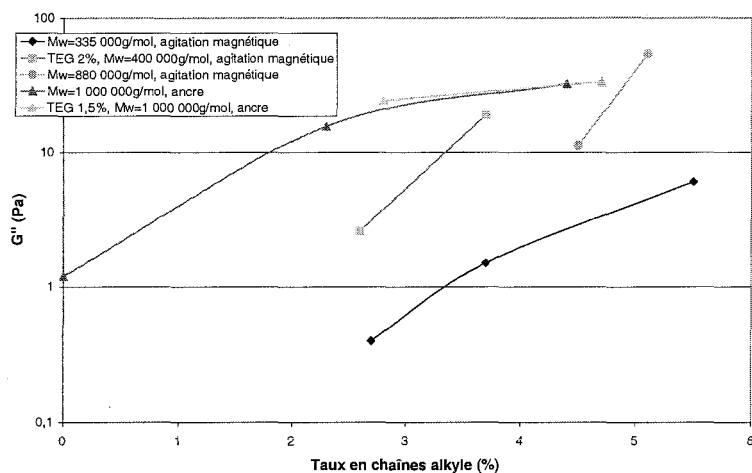


Figure 22 : Variation de G'' en fonction du taux en C_{12} et du mode opératoire

(mêmes conditions que pour la figure 21)

Polymères	\bar{M}_w (g.mol^{-1})	Agitation ^a	Viscosité au 1er plateau newtonien ^b (Pa.s)	$G' c$ (Pa)	$G'' c$ (Pa)
HA- C_{12} -2,7%	335 000	magn	0,8	0,02	0,4
HA- C_{12} -2,8%-TEG-2,5%	335 000	magn	2	0,2	0,7
HA- C_{12} -3,7%	335 000	magn	4	0,3	1,5
HA- C_{12} -3,7%-TEG-1,25%	335 000	magn	20	0,5	1,9
HA- C_{12} -3,7%-TEG-3,75%	335 000	magn	150	18,1	17,8
HA- C_{12} -2,3%	1 000 000	ancre	140	21,4	15,6
HA-TEG-0,5%- C_{12} -2,5%	1 000 000	ancre	700	23,6	12,4
HA-TEG-1,5%- C_{12} -2,8%	1 000 000	ancre	3 000	54,3	24,3
HA- C_{12} -4,4%	1 000 000	ancre	30 000	120,5	32,5
HA-TEG-1,5%- C_{12} -4,7%	1 000 000	ancre	80 000	141	33,6
HA- C_{12} -2,5%	1 000 000	magn	4	1,2	1,8
HA-TEG-1,5%- C_{12} -2,5%	1 000 000	magn	12	2,2	3,3

Tableau 10 : Effet du taux en TEG et de \bar{M}_w sur les paramètres rhéologiques de différents dérivés
(mêmes conditions que dans le tableau 9)

Un autre facteur important pour les propriétés rhéologiques des produits est la \overline{M}_w du polymère mesurée avant ajout des réactifs. Plus cette \overline{M}_w est élevée, plus les paramètres sont élevés. Toute autre condition de synthèse conservée, lorsque la \overline{M}_w augmente de 335 000 à 880 000 g.mol⁻¹, il y a augmentation de la viscosité au premier plateau newtonien de deux décades, multiplication par 100 de G' et multiplication par 10 de G''.

Les résultats les plus intéressants pour les applications visées dans ce travail ont été obtenus avec des HA de \overline{M}_w de 1 000 000 g.mol⁻¹. Ceux-ci présentent une haute viscosité et des modules G', G'' élevés avec G' supérieur à G'', ce qui n'est pas le cas de tous les polymères synthétisés.

Pour des solutions obtenues à partir des polymères de \overline{M}_w de 335 000 et 400 000 g.mol⁻¹, les propriétés rhéologiques sont moins marquées, aussi bien pour la viscosité au premier plateau que pour les modules élastique et visqueux. Il faut remarquer que, pour ces dérivés, G' est inférieur à G'' et que les valeurs ne varient pas de manière significative en fonction du taux en C₁₂.

L'effet remarqué de la \overline{M}_w sur les propriétés rhéologiques est en accord avec les données de la littérature²⁵.

3.5.4.2. Effet du taux en TEG et de la \overline{M}_w

Le tableau 10 regroupe les paramètres rhéologiques en fonction du taux en TEG, pour les produits synthétisés selon différents modes opératoires et à partir de polymères de \overline{M}_w différentes.

La figure 23 présente l'évolution de la viscosité au premier plateau newtonien en fonction du taux en TEG, les figures 24 et 25 présentent celle de G' et G'' en fonction de ce même taux.

Quels que soient les paramètres de synthèse utilisés, la viscosité au premier plateau newtonien et les modules élastique et visqueux des dérivés augmentent avec le taux en TEG, à taux constant en chaînes alkyle.

Nous pouvons remarquer que cette augmentation est beaucoup moins importante que l'augmentation due aux chaînes alkyle, les pentes des courbes étant beaucoup moins fortes.

Nous pouvons toujours constater l'importance de la \overline{M}_w du polymère sur les propriétés rhéologiques (§3.5.4.1).

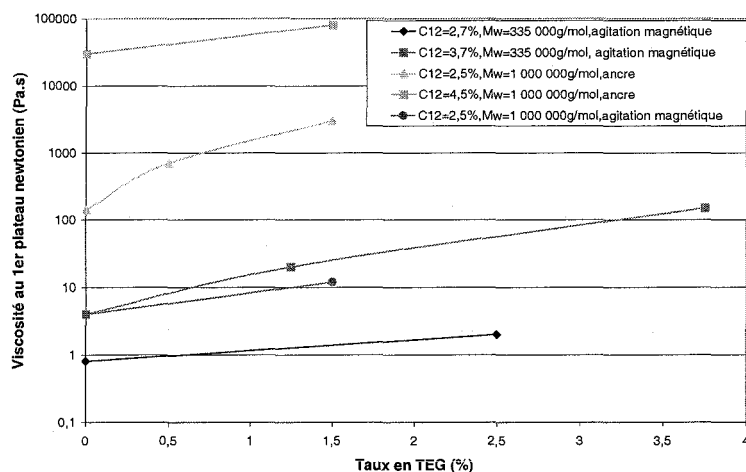


Figure 23 : Variation de la viscosité au premier plateau newtonien en fonction du taux en TEG et du mode opératoire (mêmes conditions que pour la figure 20)

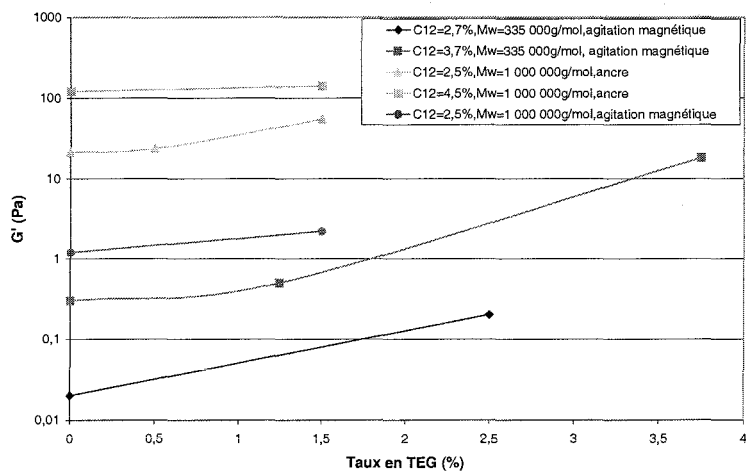


Figure 24 : Variation de G' en fonction du taux en TEG et du mode opératoire (mêmes conditions que pour la figure 21)

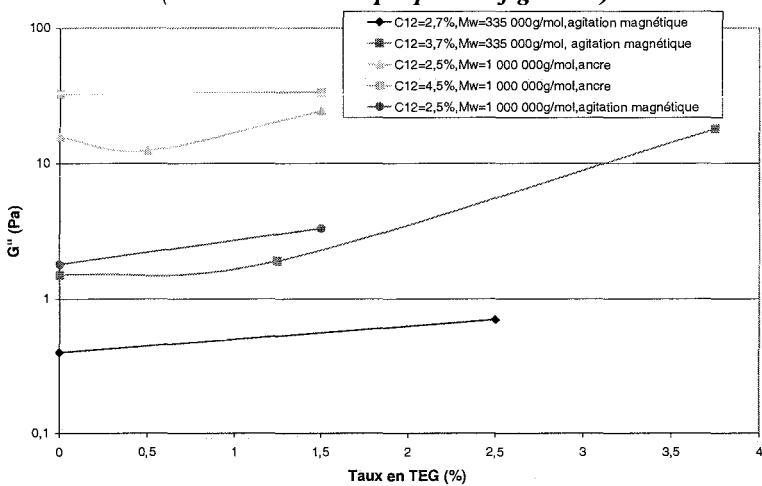


Figure 25 : Variation de G'' en fonction du taux en TEG et du mode opératoire (mêmes conditions que pour la figure 21)

3.5.4.3. Effet des taux en C_{12} et TEG

Il faut tout de même signaler que, selon les taux de substitution en C_{12} et en réticulant chimique, des solutions visqueuses, des gels mais également des systèmes diphasiques ont été obtenus. En effet, l'augmentation de l'un ou l'autre des taux de substitution a conduit à l'obtention de systèmes avec séparation de phases et avec synérèse (chapitre II, §5.3, figure 11). On observe assez nettement un domaine de taux en C_{12} /taux en TEG où les polymères préparés forment des hydrogels ou des solutions visqueuses et un domaine où il y a séparation de phases à 10 g.L^{-1} dans $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$.

4. EFFETS DE LA STERILISATION

Etant donné les applications visées pour les matériaux présentés dans ce mémoire, il est nécessaire d'étudier l'effet de la stérilisation sur leurs propriétés rhéologiques. Nous allons dans un premier temps décrire les différentes méthodes de stérilisation existantes, pour ensuite nous intéresser à l'effet de la stérilisation par chaleur humide sur les propriétés rhéologiques.

4.1. Les méthodes conventionnelles de stérilisation

4.1.1. Stérilisation chimique à l'oxyde d'éthylène

L'oxyde d'éthylène est un gaz utilisable pour la stérilisation, qui se dissout dans l'échantillon à traiter et détruit les micro-organismes présents (bactéries, spores...).

Bien que très efficace, cette méthode de stérilisation présente un inconvénient majeur : elle nécessite une importante ventilation (une semaine minimum) de l'échantillon stérilisé, avant usage, afin d'éliminer toute trace de gaz toxique. En outre, il a été montré que l'oxyde d'éthylène pouvait avoir des effets mutagènes et cancérogènes, même à faibles doses. Il est donc de plus en plus recommandé de n'utiliser cette technique de stérilisation que dans certaines conditions, voire de lui préférer des techniques présentant moins de risques toxiques²⁶.

En général, la stérilisation à l'oxyde d'éthylène est considérée comme non dégradante pour les polymères. Par exemple, Hooper *et coll.*²⁶ ont traité des polycarbonates et de l'acide polylactique par cette technique. Ils n'ont constaté aucun changement de ces échantillons, en termes de masses molaires ou de propriétés mécaniques. Cependant, une fois dissous dans le matériau, l'oxyde d'éthylène peut parfois modifier les propriétés mécaniques en jouant un rôle de plastifiant ou

encore former des sous-produits toxiques, comme par exemple le chloro-2-éthanol formé lors de la stérilisation du poly(chlorure de vinyle)²⁷.

En ce qui concerne les polysaccharides, Leo *et coll.*²⁸ ont étudié les effets de la stérilisation à l'oxyde d'éthylène sur des solutions d'alginate de sodium. Ils ont constaté que la viscosité de ces solutions diminuait de plus de 50% après la stérilisation. Il semblerait que le gaz réagisse avec les fonctions carboxylates de l'alginate pour former des fonctions ester. On obtient ainsi l'alginate d'éthylène glycol, sous sa forme alcoolate. Cette fonction réactive générerait alors une dégradation du squelette alginate par β -élimination^{28,29}.

4.1.2. Rayonnements ionisants

Cette technique consiste à soumettre les échantillons à stériliser à des rayonnements ionisants de haute énergie, qui sont, en général, des rayonnements β (faisceau d'électrons) et γ (rayonnement électromagnétique)³⁰.

Les rayonnements β sont produits par des accélérateurs d'électrons. Ils présentent l'inconvénient d'être peu pénétrants. Ainsi, une intensité de 10 MeV ne peut pénétrer que 5 cm d'un matériau de 1 g.cm⁻³ avant d'être totalement dissipée. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser une forte dose de rayonnements β pour stériliser un matériau³⁰.

Les rayonnements γ , quant à eux, sont produits par des sources radioactives comme le cobalt ⁶⁰Co et le césium ¹³⁷Cs. Ces rayonnements pénètrent très facilement tout type de matériau. Ils peuvent donc être utilisés à de plus faibles doses que les rayonnements β . Cependant, contrairement aux rayonnements β qui stérilisent en moins d'une minute, il faut une exposition aux rayonnements γ de 6 à 24 heures pour stériliser un échantillon³⁰.

L'irradiation de matériaux polymères par des rayonnements β ou γ peut entraîner des modifications des structures macromoléculaires. Les deux principaux mécanismes de modification qui peuvent intervenir sont :

- une scission aléatoire des chaînes polymères,
- une réticulation chimique.

En général, ces deux mécanismes interviennent simultanément. La prédominance de l'un par rapport à l'autre dépend de nombreux paramètres tels que la nature du polymère, la dose d'irradiation ou la température et il est donc difficile de prévoir la réaction d'un polymère vis-à-vis des rayonnements ionisants. Cependant, pratiquement tous les polymères sont, à des degrés divers, altérés par cette technique de stérilisation.

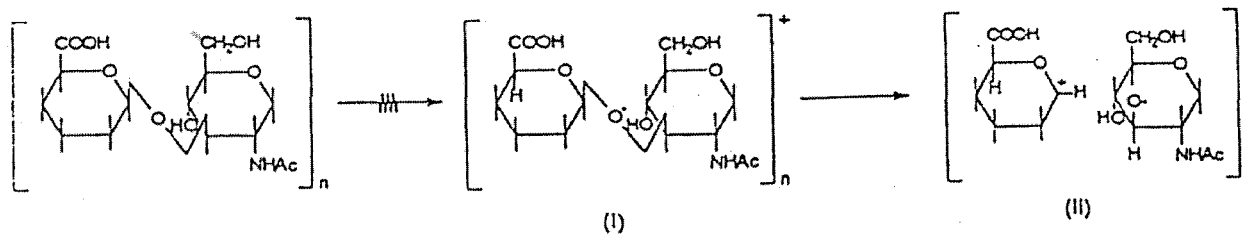


Figure 26 : Mécanisme de dégradation de l'acide hyaluronique à l'état solide sous l'effet de rayonnements ionisants (d'après Sintzel et coll.³⁰)

En ce qui concerne les polysaccharides, l'irradiation conduit principalement à une rupture des liaisons glycosidiques. Dans le cas de l'acide hyaluronique, son mécanisme de dégradation, à l'état solide, sous l'effet de rayonnements ionisants, présenté sur la figure 26, mettrait en jeu la formation d'un radical au niveau de la liaison glycosidique, suivie de la rupture de cette liaison³⁰.

En solution aqueuse, la dégradation du HA est due à la formation de radicaux libres de type OH^\bullet , HO_2^\bullet ,... par irradiation de l'eau. Ces radicaux attaquent le squelette polymère au niveau de la liaison glycosidique³¹, et la dégradation se produit alors de la même façon que pour le HA à l'état solide. Toutefois, dans ce cas, il est possible de limiter la dégradation en formant un complexe entre le HA et des cations cétyl pyridinium, ce qui entraîne un transfert d'énergie et permet la réduction chimique des radicaux libres³⁰.

En ce qui concerne les alginate, la dégradation a également lieu via une scission des ponts glycosidiques et la formation de radicaux libres uroniques stables³⁰.

A la dégradation intervenant au cours de l'étape de stérilisation, s'ajoute le fait que les radicaux libres générés lors de l'irradiation peuvent contribuer à la poursuite de la dégradation du matériau après stérilisation, ce qui accélère son vieillissement.

4.1.3. Stérilisation par chaleur humide ou autoclavage

L'autoclavage consiste à traiter l'échantillon à stériliser pendant 20 minutes à 121°C sous une pression de 2 bars en atmosphère saturée d'eau.

Malheureusement, la plupart des matériaux polymères, et notamment les polysaccharides, se dégradent aux températures élevées.

La dégradation des chaînes polysaccharidiques par la température est souvent le résultat d'un clivage au niveau des ponts glycosidiques, dû à la formation de radicaux libres. Ainsi, Leo *et coll.*²⁸ ont montré que l'alginate est très sensible à des températures supérieures à 100°C. Pour cela, ils ont suivi l'évolution de la viscosité de solutions d'alginate de sodium à 3%, chauffées pendant 15 minutes à différentes températures. Au-delà de 100°C, la viscosité de ces solutions diminue de plus de la moitié.

4.1.4. Stérilisation par irradiation UV

La technique de stérilisation par rayons ultraviolets développée dans des laboratoires d'ingénierie tissulaire représente une alternative aux autres méthodes de stérilisation. Ce traitement par lumière UV est une procédure simple, peu coûteuse et efficace³² ; il permet l'élimination des contaminants

Polymères	Viscosité au premier plateau newtonien ^a avant autoclavage (Pa.s)	Viscosité au premier plateau newtonien ^a après autoclavage (Pa.s)
HA	1,2	0,2
HA-C ₁₂ -2,3%	140	0,5
HA-C ₁₂ -4,4%	30 000	245
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -2,5%	700	17
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,8%	3 000	500
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -4,7%	80 000	15 000

Tableau 11 : Effet de l'autoclavage sur la viscosité au premier plateau newtonien de certains dérivés
^a données mesurées à 37°C pour une concentration en polymère de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

biologiques (champignons, bactéries) par exposition à une dose mortelle d'énergie délivrée sous forme de lumière.

Dès les années 1930, l'irradiation du sang par les rayons UV est une technique reconnue pour le traitement de certaines infections, comme la poliomyélite ou autres virus³³.

Cependant, différents travaux ont mis en évidence la dégradation des polymères, comme le polyéthylène, le polypropylène ou les polymères souples, lors de la stérilisation par rayons UV³⁴⁻³⁶.

Des études ont donc été menées pour vérifier si les propriétés des polymères étaient modifiées de manière importante par exposition aux rayons UV. Fischbach *et coll.*³⁷ ont travaillé sur des copolymères diblocs poly(oxyde d'éthylène)-b-poly-(D,L)-acide lactique pour des applications en ingénierie tissulaire : ils ont montré que la stérilisation par irradiation UV pendant une durée de 2 heures était une technique appropriée pour ces polymères, mais qu'il était nécessaire de bien contrôler la durée d'exposition aux rayons UV pour ne pas altérer leurs propriétés. En effet, un traitement prolongé (5 heures) dégrade le copolymère et altère l'adhésion des cellules sur les films de POE-b-PLA. Les mécanismes contribuant à cette dégradation peuvent être une photooxydation (mécanisme courant pour les polymères synthétiques) et un clivage des liaisons ester présentes dans les polymères biodégradables.

4.2. Effets de la stérilisation par chaleur humide sur les propriétés rhéologiques des hydrogels

La stérilisation qui a été utilisée dans ce travail est l'autoclavage pendant 20 minutes à 121°C, sous une pression de 2 bars en atmosphère saturée d'eau, et a été réalisée sur des échantillons secs, sous forme de poudres.

Certains dérivés, possédant des propriétés rhéologiques avant autoclavage intéressantes du point de vue des applications visées, ont été autoclavés puis dissous à 10 g.L⁻¹ dans une solution NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Leurs propriétés ont été étudiées en régimes permanent et oscillatoire.

Comme le montrent les résultats présentés dans le tableau 11, il y a une réelle diminution de la viscosité au premier plateau newtonien après stérilisation. Cependant, la grande variabilité de cette altération est difficile à expliquer : il ne semble pas y avoir de facteur de diminution de la viscosité commun à tous les produits étudiés.

Taux en C ₁₂ ^a avant autoclavage (%)	Taux en C ₁₂ ^b après autoclavage (%)
2,3	2,5
4,4	4,3
2,5	2,7
2,8	3
4,7	4,9

Tableau 12 : Taux en C₁₂ avant et après autoclavage
^a déterminés par chromatographie en phase gazeuse
^b déterminés par chromatographie en phase gazeuse, après lavage des poudres à l'éthanol

\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_n	\bar{M}_w
avant autoclavage		après autoclavage	
850 000	1 025 000	650 400	726 400

Tableau 13 : Effet de l'autoclavage sur les masses molaires du HA natif (g.mol⁻¹)

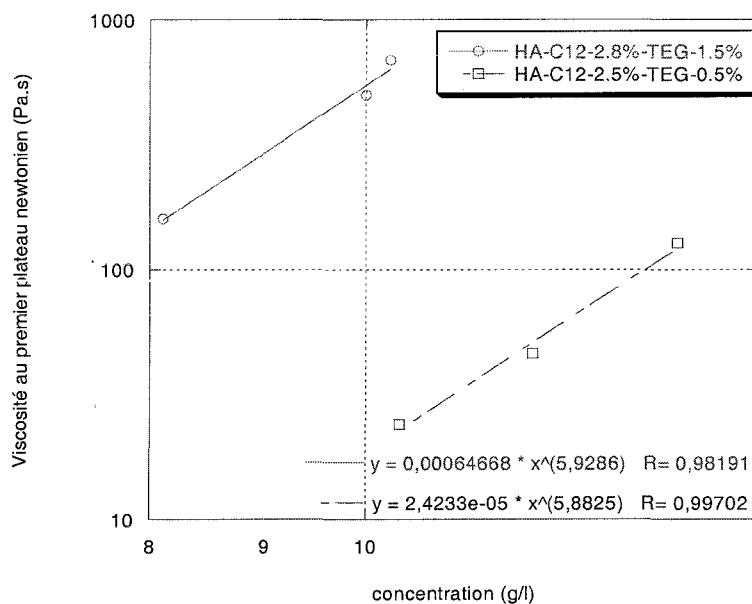


Figure 27 : Viscosité au premier plateau en fonction de la concentration en polymère
 (étude à 37°C, concentration en g.L⁻¹ dans une solution NaCl 0,15 mol.L⁻¹)

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette altération des propriétés rhéologiques. L'autoclavage peut avoir des effets dégradants soit sur le squelette polysaccharidique, notamment par des scissions de chaînes au niveau des ponts glycosidiques, soit sur les propriétés associatives, en hydrolysant les liaisons ester entre les fonctions carboxylates et les chaînes alkyle ou le TEG.

Le dosage des C₁₂ restant fixées sur le HA, effectué par chromatographie en phase gazeuse après lavage à l'éthanol des poudres autoclavées, nous a permis de constater qu'il n'y avait pas d'hydrolyse des liaisons ester (Tableau 12).

Une étude en SEC-MALLS sur le HA natif a mis en évidence une diminution de ses \overline{M}_n et \overline{M}_w , signe de la dégradation du squelette polysaccharidique (Tableau 13).

La chute des paramètres rhéologiques est donc due à la dégradation du squelette de HA, résultats en cohérence avec les résultats de Pelletier *et coll.*³. L'hypothèse de l'hydrolyse des liaisons ester entre les fonctions carboxylates et le TEG n'est cependant pas à écarter, même s'il ne nous a pas été possible de vérifier par dosage le TEG restant fixé sur le HA.

Dans les applications biologiques, on peut envisager de pallier cette chute de viscosité en augmentant la concentration en polymère lors de la préparation de l'hydrogel. En effet, une relation d'interpolation de type loi de puissance entre la viscosité au premier plateau newtonien et la concentration en polymère lors de la préparation de l'hydrogel a été trouvée pour les différents dérivés : la viscosité au premier plateau newtonien est proportionnelle à la concentration du polymère à la puissance 6 (Figure 27). Cette relation permet ainsi de déterminer la concentration en polymère nécessaire pour obtenir une viscosité définie.

5. STABILITE EN MILIEU PHYSIOLOGIQUE

Un biomatériau de comblement de lésions ostéochondrales doit pouvoir s'éliminer de l'organisme, mais dans un laps de temps suffisamment long, pour pouvoir jouer son rôle mécanique tant que le tissu de réparation n'est pas totalement élaboré.

Nous avons donc réalisé une étude du vieillissement d'un hydrogel HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,7% à 37°C, conservé à 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, pendant 21 jours (durée des manipulations prévue pour l'étude *in vitro*), parallèlement à l'étude du vieillissement du HA.

Temps d'incubation (jours)	\overline{M}_w (g.mol ⁻¹)	I
0	1 426 500	1,03
21	1 038 050	1,40

Tableau 14 : Masse molaire moyenne en masse et indice de polymolécularité du HA conservé à 37°C en solution à 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

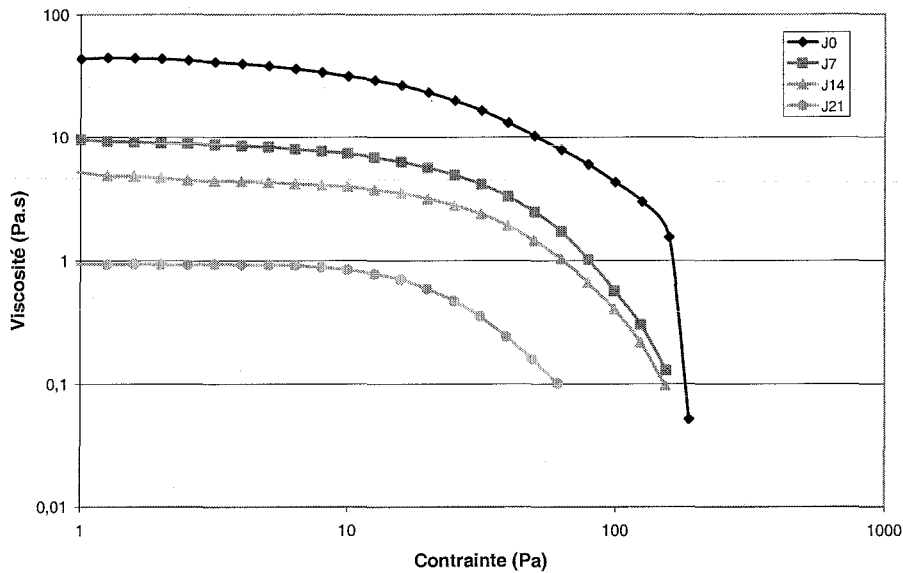


Figure 28 : Viscosité en fonction de la contrainte pour un HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,7% conservé à 37°C, pendant 0, 7, 14 et 21 jours, à 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

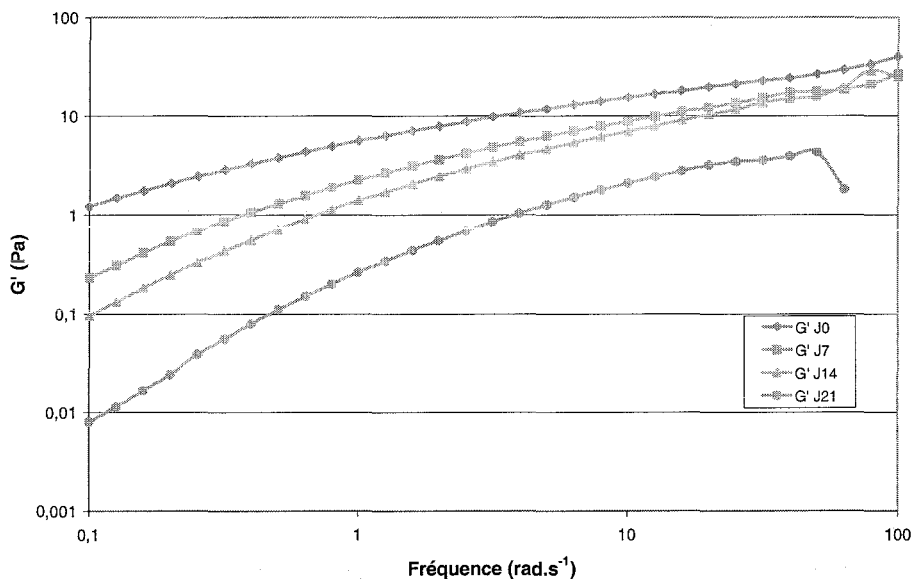


Figure 29 : Module élastique G' en fonction de la fréquence et du temps de conservation pour un HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,7% (mêmes conditions que pour la figure 28)

Comme précédemment, deux phénomènes de dégradation chimique peuvent apparaître :

- la scission de la chaîne de HA au niveau des ponts glycosidiques
- l'hydrolyse des liaisons ester entre le squelette polysaccharidique et les chaînes alkyle ou le TEG.

Afin d'évaluer l'importance de ces phénomènes, la stabilité chimique de l'échantillon a été évaluée en termes de stabilité du squelette de HA (en mesurant la \overline{M}_w par SEC-MALLS) et de stabilité des liaisons ester (par dosage chromatographique en phase gazeuse des C_{12} restant fixés sur le HA).

Une solution de HA natif a été préparée à 10 g.L^{-1} dans $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ et mise dans un incubateur à 37°C . Au bout de 21 jours, la solution a été prélevée, dialysée pour éliminer l'excès de sel présent dans le solvant et étudiée par SEC-MALLS. Le tableau 14 présente les valeurs de \overline{M}_w de la solution de HA, ainsi que les indices de polymolécularité, mesurés après 0 et 21 jours.

On constate une très légère diminution de \overline{M}_w ; il semble donc que le squelette de HA est peu dégradé sur une période de 21 jours, à 37°C , en milieu salin. Ce résultat est en accord avec les résultats de Pelletier *et coll.*³ qui n'avait que peu de modification de \overline{M}_w du HA sur une période de 40 jours.

3 échantillons de HA-TEG-1,5%- C_{12} -2,7% ont été dissous à 10 g.L^{-1} dans une solution $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ et conservés à 37°C . A intervalles de temps réguliers (après 0, 7, 14 et 21 jours), nous avons effectué une étude rhéologique (variation de la viscosité en fonction de la contrainte et spectre mécanique) et un dosage des chaînes alkyle restant fixées. Les figures 28, 29 et 30 présentent respectivement les variations de la viscosité η en fonction de la contrainte τ , le module élastique G' et le module visqueux G'' en fonction de la fréquence, pour le hyaluronate doublement modifié, au bout de 0, 7, 14 et 21 jours.

A l'examen de la figure 28, nous constatons une diminution de la viscosité au premier plateau newtonien après 21 jours, de 40 à 1 Pa.s. Avec les figures 29 et 30, on observe l'évolution du comportement mécanique de l'échantillon au cours du temps. On passe progressivement d'un état où G' est supérieur à G'' à un état de fluide visqueux où G'' est supérieur à G' .

Nous avons vu que le squelette de HA est faiblement dégradé à 37°C . Nous pouvons supposer que la détérioration des propriétés rhéologiques observée est également liée à une diminution du taux de substitution en chaînes alkyle ou en TEG, due à l'hydrolyse des liaisons ester.

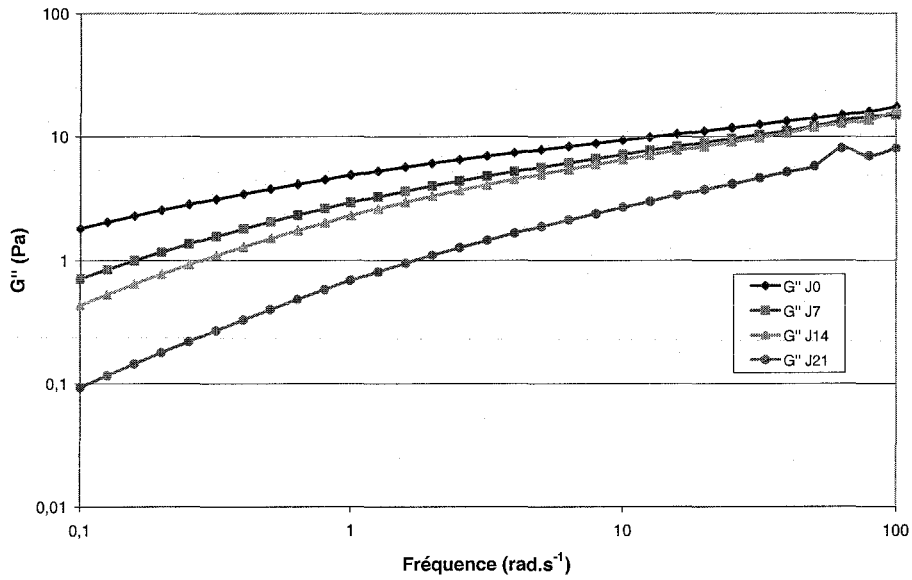


Figure 30 : Module visqueux G'' en fonction de la fréquence et du temps de conservation pour un HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,7% (mêmes conditions que pour la figure 28)

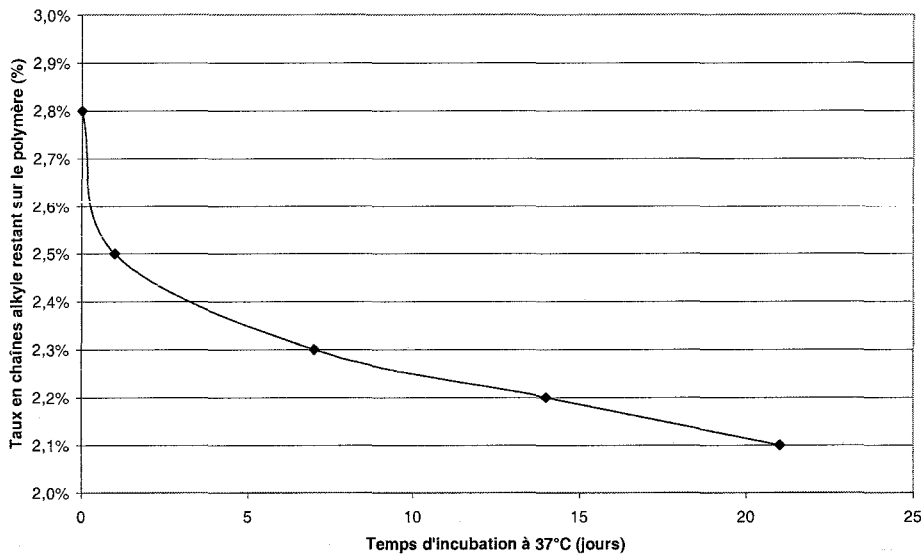


Figure 31 : Evolution du taux en chaînes alkyle en fonction du temps d'incubation pour un HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,7% conservé à 37°C en solution à 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹

Pour le dosage des C₁₂, l'échantillon est, dans un premier temps, dialysé, pour éliminer l'excès de sel, puis lyophilisé. Il est ensuite dispersé dans de l'éthanol à 70% et filtré, dans le but d'éliminer les éventuelles chaînes de dodécanol libérées par rupture des liaisons ester. Les chaînes alkyle résiduelles, présentes sur le squelette polymère, sont dosées par chromatographie en phase gazeuse.

La figure 31 présente l'évolution du taux en chaînes alkyle en fonction du temps d'incubation dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, à 37°C, pour le HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,7%.

Sur 21 jours à 37°C, il y a une hydrolyse de 20% des fonctions ester, ce qui peut effectivement expliquer la chute partielle des paramètres rhéologiques du matériau. Une étude faite précédemment sur un AA modifié à 8% en C₁₂ a montré qu'au bout de 4 mois à 37°C, seulement la moitié des chaînes alkyle initiales restaient liées au squelette polymère³.

Il apparaît donc que les solutions visqueuses ou les hydrogels de HA modifié ne sont pas très stables chimiquement sur une longue période, mais sur une période de 21 jours, on peut estimer que les propriétés rhéologiques restent suffisamment bonnes pour qu'ils puissent être utilisés comme matériaux de comblement de lésions ostéochondrales.

6. CONCLUSION

Nous avons montré que l'introduction de chaînes hydrophobes et de réticulation chimique sur le hyaluronate conduit à une augmentation plus ou moins prononcée de la viscosité des solutions au premier plateau newtonien et des modules G' et G''. Cette augmentation de la viscosité et de G', G'' est due à la formation d'un réseau polymère tridimensionnel stabilisé par les associations hydrophobes intermoléculaires et renforcé par l'existence d'une réticulation chimique.

En régime semi-dilué, les chaînons hydrophobes distribués le long du squelette polysaccharidique ont tendance à créer des associations intermoléculaires, entraînant la formation de points de jonction entre les chaînes macromoléculaires en solution. Les interactions intermoléculaires prédominantes forment ainsi un réseau associatif temporaire qui se superpose à l'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires. Ces associations intermoléculaires conduisent à la formation d'entités de volume hydrodynamique élevé et ainsi à des solutions de très haute viscosité, et éventuellement à des réseaux tridimensionnels réticulés physiquement ayant les propriétés d'hydrogels.

Dans notre cas, il y a renforcement de ces propriétés par une réticulation chimique, renforcement qui reste de faible proportion par rapport à l'apport des interactions hydrophobes. En réalité, les temps de relaxation des dérivés doublement modifiés sont beaucoup plus longs. La réticulation chimique apporte des jonctions supplémentaires d'énergie supérieure, permettant d'augmenter la viscosité au premier plateau newtonien et les modules G' et G'' .

La fixation de ces chaînes hydrophobes et du réticulant chimique sur le squelette hyaluronate se traduit par la formation de polymères aux propriétés associatives plus ou moins prononcées selon le taux de fixation en chaînes alkyle et le taux en tétraéthylèneglycol difonctionnel.

Nous avons également mis en évidence l'influence de différents paramètres du procédé de synthèse, notamment le type d'agitation utilisé lors de la synthèse, sur le comportement rhéologique des hyaluronates doublement modifiés. Les dérivés synthétisés sous agitation mécanique présentent une viscosité au premier plateau newtonien très supérieure à celle du HA natif à la même concentration. En solution aqueuse, ils présentent à la fois un comportement associatif fort et un caractère rhéofluidifiant approprié à l'application visée.

Une augmentation de la concentration en polymère ou du taux de fixation en C_{12} et TEG se traduit par un comportement de plus en plus élastique, ce qui peut conduire à la formation d'hydrogels, mais une augmentation trop forte de l'un ou l'autre des taux de substitution peut conduire à l'obtention de systèmes diphasiques, avec séparation de phases.

Pour l'étude biologique *in vitro*, nous avons choisi d'étudier le HA natif, le HA- C_{12} -2,3% et le HA-TEG-0,5%- C_{12} -2,5% afin de mettre en évidence l'intérêt éventuel de la double réticulation sur les réponses biologiques données par les cellules.

7. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Miralles-Houzelle M.C., Hubert P., Dellacherie E. "Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association" *Langmuir* **2001**, *17*, 1384-1391.
- (2) Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L., Dellacherie E. "Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair : rheological properties" *Journal of biomedical materials research* **2001**, *54*, 102-108.
- (3) Pelletier S. "Synthèse et caractérisation physico-chimique de dérivés associatifs d'alginate et de hyaluronate de sodium en vue d'applications biomédicales" *thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine INPL* **1999**.
- (4) Rastello de Boissesson M. "Microparticules d'alginate associatifs : élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives" *thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine INPL* **2002**.
- (5) Aubry T., Moan M. "Rheological behavior of a hydrophobically associating water soluble polymer" *Journal of Rheology* **1994**, *38*, 1681-1692.
- (6) Tirtaatmadja V., Tam K.C., Jenkins R.D. "Rheological properties of model alkali-soluble associative (HASE) polymers: effect of varying hydrophobe chain length" *Macromolecules* **1997**, *30*, 3271-3282.
- (7) Tirtaatmadja V., Tam K.C., Jenkins R.D. "Superposition of oscillations on steady shear flow as a technique for investigating the structure of associative polymers" *Macromolecules* **1997**, *30*, 1426-1433.
- (8) Houzelle M.C. "Dérivés amphiphiles associatifs de la pectine : diverses voies de synthèse. Etude comparative des propriétés physico-chimiques des solutions aqueuses en régimes dilué et semi-dilué." *thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine INPL* **1998**.
- (9) Jampen S., Britt I.J., Tung M.A. "Gellan polymer solution properties: dilute and concentrated regimes" *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 579-586.
- (10) Chronakis I.S., Doublier J.L., Piculell L. "Viscoelastic properties for kappa- and iota-carrageenan in aqueous NaI from the liquid-like to the solid-like behaviour" *Int.J.Biol.Macromol.* **2000**, *28*, 1-14.
- (11) Wientjes R.H.W., Duits M.H.G., Jongschaap R.J.J., Mellema J. "Linear rheology of guar gum solutions" *Macromolecules* **2000**, *33*, 9594-9605.
- (12) Tam K.C., Jenkins R.D., Winnik M.A., Bassett D.R. "A structural model of hydrophobically modified urethane-ethoxylate (HEUR) associative polymers in shear flows" *Macromolecules* **1998**, *31*, 4149-4159.
- (13) Milas M., Rinaudo M., Roure I., Al-Assaf S., Phillips G.O., Williams P.A. "Comparative rheological behavior of hyaluronan from bacterial and animal sources with cross-linked hyaluronan (Hylan) in aqueous solution" *Biopolymers* **2001**, *59*, 191-204.
- (14) Mewis J., Kaffashi B., Vermant J., Butera R.J. "Determining relaxation modes in flowing associative polymers using superposition flows" *Macromolecules* **2001**, *34*, 1376-1383.
- (15) Séréro Y., Jacobsen V., Berret J.F., May R. "Evidence of nonlinear chain stretching in the rheology transient networks" *Macromolecules* **2000**, *33*, 1841-1847.
- (16) Barbucci R., Rappuoli R., Borzacchiello A., Ambrosio L. "Synthesis, chemical and rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels" *Journal of biomaterial science polymer edition* **2000**, *11*, 383-399.
- (17) Dentini M., Desideri P., Crescenzi V., Yuguchi Y., Urakawa H., Kajiwara K. "Synthesis and physicochemical characterization of gellan gels" *Macromolecules* **2001**, *34*, 1449-1453.
- (18) Tan H., Tam K.C., Tirtaatmadja V., Jenkins R.D., Bassett D.R. "Extensional properties of model hydrophobically modified alkali-soluble associative (HASE) polymer solutions" *J.Non-Newtonian Fluid. Mech.* **2000**, *92*, 167-185.
- (19) El Ghzaoui A., Trompette J.L., Cassanas G., Bardet L., Fabregue E. "Comparative rheological behavior of some cellulosic ether derivatives" *Langmuir* **2001**, *17*, 1453-1456.
- (20) Candau F., Selb J. "Hydrophobically modified polyacrylamides prepared by micellar polymerisation" *Adv. Colloid. Interfac.* **1999**, *79*, 149-172.
- (21) Bataille I., Huguet J., Muller G., Mocanu G., Carпов A. "Associative behaviour of hydrophobically modified carboxymethylpullulan derivatives" *Int.J.Biol.Macromol.* **1997**, *20*, 179-191.
- (22) English R.J., Raghavan S.R., Jenkins R.D., Khan S.A. "Associative polymers bearing n-alkyl hydrophobes : rheological evidence for microgel-like behavior" *Journal of Rheology* **1999**, *43*, 1175-1194.

- (23) Zhang Y., Won C.Y., Chu C.C. "Synthesis and Characterization of Biodegradable Hydrophobic-Hydrophilic Hydrogel Networks with a Controlled Swelling Property" *Journal of Polymer Science: part A: Polymer Chemistry* **2000**, 38, 2392-2404.
- (24) Candau F., Regalado E.J., Selb J. "Scaling behavior of the zero shear viscosity of hydrophobically modified poly(acrylamide)s" *Macromolecules* **1998**, 31, 5550-5552.
- (25) Bothner H., Wik O. "Rheology of hyaluronate" *Acta Oto-Laryngol.* **1987**, 442, 25-30.
- (26) Hooper K.A., Cox J.D., Kohn J. "Comparison of the effect of ethylene oxide and gamma-irradiation on selected tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lactic acid)" *J.Appl.Polym.Sci.* **1997**, 63, 1499-1510.
- (27) Grizzi I. "thèse de doctorat, Université de Montpellier I, Montpellier (France) **1995**."
- (28) Leo W.J., McLoughlin A.J., Malone D.M. "Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels" *Biotechnol.Prog.* **1990**, 6, 51-53.
- (29) Sinquin A. "Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine INPL, Nancy (France) **1995**."
- (30) Sintzel M.B., Merkli A., Tabatabay C., Gurny R. "Influence of irradiation sterilization on polymers used as drug carriers—a review" *Drug development & Industrial Pharmacy* **1997**, 23, 857-878.
- (31) Al-Assaf S., Phillips G.O., Deeble D.J., Parsons B., Starnes H., Von Sonntag C. "The enhanced stability of the cross-linked hylan structure to hydroxyl (OH) radicals compared with the uncross-linked hyaluronan" *Radiation physics and chemistry* **1995**, 46, 207-217.
- (32) Philipps A.G. "Desinfektion mit UV-Strahlung" *Strahlenquellen, technische Hinweise und Anwendung, Wünbach, Germany* **1999**.
- (33) Knott E.K. "Development of Ultra Violet Blood Irradiation" *Am.J.Surg.* **1948**, 76, 165-171.
- (34) Praschak D., Bahners T., Schollmeyer E. "PET surface modifications by treatment with monochromatic excimer UV lamps" *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **1998**, A 66, 69-75.
- (35) Mc Kellar J.F., Allen N.S. "Photochemistry of Man-Made Polymers" *Applied Science Publishers, Barking, England* **1979**.
- (36) Gritz D.C., Lee T.Y., Mc Donnell P.J., Shih K., Baron N. "Ultraviolet radiation for sterilization of contact lenses" *CLAO J.* **1990**, 16, 294-298.
- (37) Fischbach C., Tessmar J., Lucke A., Schnell E., Schmeer G., Blunk T., Gopferich A. "Does UV irradiation affect polymer properties relevant to tissue engineering?" *Surface Science* **2001**, 491, 333-345.

Chapitre IV
Etude biologique *in vitro*
en culture tridimensionnelle
des dérivés de hyaluronate

1. OBJECTIFS

Les biomatériaux à base de hyaluronate de sodium sont potentiellement utilisables pour le comblement des lésions ostéochondrales. Ces biomatériaux doivent se présenter sous forme d'hydrogels semi-rigides, biocompatibles et biorésorbables, et posséder des caractéristiques physico-chimiques et biologiques adaptées à une utilisation *in vivo*, pour assurer et améliorer la réparation tissulaire par réhabilitation cellulaire.

Des hydrogels ont été préparés par double modification chimique des fonctions carboxylates du hyaluronate de sodium (cf chapitre II). Dans un premier temps, ils ont été évalués par différents tests physico-chimiques, notamment au niveau rhéologique : certains de ces polymères doublement modifiés remplissent, de manière satisfaisante, les premiers points du cahier des charges d'un biomatériau de comblement (propriétés rhéologiques adéquates, malléabilité, aptitude à être stérilisés sans altération notable de leurs propriétés, cf chapitre III).

Pour réaliser des études biologiques *in vitro*, en particulier caractériser l'effet du hyaluronate (modifié ou non) sur la prolifération et le métabolisme des chondrocytes, il est nécessaire de le placer dans une structure tridimensionnelle. En effet, les chondrocytes articulaires ne conservent pas leur phénotype, lorsqu'ils sont cultivés en monocouche, et évoluent vers une morphologie et un comportement de type fibroblastique, ce qui n'est pas le cas dans un système de culture tridimensionnel¹⁻⁶.

Les dérivés synthétisés ont la particularité de former des hydrogels dans des conditions proches de celles du milieu physiologique (température, force ionique, pH,...) et à des concentrations en hyaluronate de l'ordre de 10 g.L⁻¹, mais ces hydrogels évoluent vers des solutions visqueuses après autoclavage, ou lorsqu'ils sont en contact prolongé avec une solution saline. Aussi pour pallier cet inconvénient en présence des milieux de culture, ces hydrogels ont été associés à une matrice d'alginate de calcium capable de jouer un rôle structurant et conduisant ainsi à un système tridimensionnel utilisable en culture cellulaire *in vitro*.

En effet, la culture en billes d'alginate de calcium est l'une des principales méthodes de culture cellulaire tridimensionnelle utilisées pour les chondrocytes⁷⁻¹⁰. Cette méthode consiste à mélanger une suspension cellulaire avec une solution aqueuse d'alginate de sodium, puis à réticuler ce polysaccharide, goutte à goutte, dans du chlorure de calcium. On obtient ainsi des billes d'alginate

dans lesquelles les cellules sont immobilisées. En conservant ces billes dans du milieu de culture, il est possible d'étudier la viabilité, la prolifération et l'activité de synthèse des cellules au cours du temps. Les billes d'alginate de calcium ont l'avantage d'être particulièrement stables à 37°C dans les milieux de culture couramment utilisés. En outre, elles possèdent une porosité suffisante pour permettre le passage des nutriments nécessaires à l'activité cellulaire⁸.

Au cours de notre travail, le hyaluronate (modifié ou non) a été préalablement mélangé à l'alginate afin d'obtenir des billes d'alginate enrichies en hyaluronate. Des résultats controversés sont trouvés dans la littérature concernant cette association alginate / hyaluronate. Selon une étude récente¹¹, les mélanges alginate / hyaluronate n'ont pas d'effet significatif sur la multiplication des chondrocytes et l'activité métabolique, alors que d'autres études indiquent un effet positif du hyaluronate sur cette dernière¹²⁻¹⁴.

Ce travail a donc consisté à vérifier si la présence de hyaluronate (modifié ou non) dans la matrice alginique modifiait les réponses biologiques des chondrocytes, en termes de viabilité, de prolifération cellulaire et de synthèse de protéoglycanes. Cet effet sur le comportement biologique des chondrocytes est directement lié à la quantité de hyaluronate susceptible d'être maintenue dans les billes d'alginate. Aussi une étude de la rétention du hyaluronate a été entreprise, par l'étude cinétique de sa libération, pour tenter de relier la réponse biologique au taux de hyaluronate en présence.

Parallèlement aux études menées sur des billes formées à partir d'alginate natif / hyaluronate (modifié ou non), nous avons préparé des billes à partir d'alginate amphiphile. En effet, pour améliorer la rétention de hyaluronate dans les billes d'alginate, nous avons envisagé de favoriser les associations hydrophobes intermoléculaires entre les chaînes alkyle d'un alginate amphiphile et celles d'un hyaluronate modifié.

La question de l'influence de la stimulation mécanique sur les réponses biologiques a également été abordée. En effet, de précédents travaux¹⁵ ont montré que l'agitation et l'entrechoquement des billes, simulant les contraintes et les mouvements liquidiens existant au sein de l'articulation, ont une influence sur le métabolisme des chondrocytes.

L'ensemble de cette étude a été effectué au Laboratoire de Physiopathologie et de Pharmacologie Articulaires (UMR CNRS-UHP 7561, Nancy).

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Synthèse des matériaux polysaccharidiques

2.1.1. Synthèse des alginates modifiés

L'alginate AA utilisé pour cette évaluation *in vitro* est extrait d'une algue brune, *Macrocystis pyrifera* (moyenne viscosité, lot 112K0939, Sigma Aldrich, France). La masse molaire moyenne en masse \overline{M}_w , mesurée par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser multi-angles (SEC-MALLS), est de 400 000 g.mol⁻¹. La proportion entre résidus guluronate et mannuronate est de G/M = 30/70. La viscosité intrinsèque à 25°C pour une solution à 20 g.L⁻¹ est de 3500 cps. Le pH de la solution d'alginate à 10 g.L⁻¹ dans du NaCl 0,15 mol.L⁻¹ (Braun, France) est de 7,2.

La synthèse des alginates modifiés par des chaînes alkyle AA-C₁₂-x% a été réalisée selon le protocole suivant^{16,17} :

- 10g de AA sont mis en suspension dans un mélange contenant 190 mL d'EtOH 70% et 10 mL d'acide chlorhydrique commercial à 37% (12 mol.L⁻¹), pendant 30 minutes à 4°C sous agitation.
- Le mélange est filtré (filtre borosilicate n°4) puis lavé avec de l'éthanol 70% afin d'éliminer le chlorure de sodium formé au cours de la réaction. Un test au nitrate d'argent (AgNO₃ 0,1 mol.L⁻¹) permet de s'assurer de l'élimination complète des chlorures.
- Le produit filtré est lavé à l'acétone et laissé à température ambiante pour évaporer l'acétone résiduelle.
- L'AA sous forme acide est mis en suspension dans 500 mL d'H₂O sous agitation. Une solution de TBAOH (hydroxyde de tétrabutylammonium) 0,15 mol.L⁻¹ est ajoutée jusqu'à neutralisation du mélange à pH 7.
- Le mélange est ensuite lyophilisé.
- 5 g d'AA-TBA lyophilisé est solubilisé à 1% (poids/volume) dans le DMSO pendant 24 heures.
- Le dérivé bromé C₁₂H₂₅Br est alors ajouté et réagit pendant 24 heures.
- 30 mL de NaCl 2,5 mol.L⁻¹ sont ajoutés au mélange. Celui-ci est agité à l'aide d'un ultra-turrax (5000 tr.min⁻¹, 5 min) puis laissé sous agitation pendant 1 heure à température ambiante.
- Le mélange est versé dans 2 L d'éthanol 70% puis l'ensemble est soumis à l'action d'un ultra-turrax (5000 tr.min⁻¹) pendant 15 minutes afin de précipiter l'alginate modifié.
- Le mélange est filtré (filtre borosilicate n°4) puis lavé à l'éthanol 70% jusqu'à élimination des chlorures (test au nitrate d'argent). Il est ensuite lavé à l'acétone et laissé à température ambiante pour évaporer l'acétone résiduelle.
- L'AA modifié purifié est finalement stocké à 4°C.

La détermination du taux de fixation en chaînes alkyle se fait par chromatographie en phase gazeuse (protocole décrit dans le chapitre II, §4.2), ce taux est donné en moles de chaînes C₁₂ pour 100 moles de motifs monosaccharidiques.

2.1.2. Synthèse des hyaluronates modifiés

Le hyaluronate HA utilisé est fourni par Acros Organics (Hyaluronate de sodium 95%, lot A0147769). Il possède une \overline{M}_w , mesurée en SEC-MALLS, de 1 300 000 g.mol⁻¹. La quantité de protéines présentes est inférieure à 0,2%.

Le protocole de synthèse des hyaluronates modifiés a été décrit en détails dans le chapitre II.

Pour cette étude, des hyaluronates modifiés par des chaînes alkyle en C₁₂ ou en C₁₈ HA-C₁₂(ou C₁₈)-x% sont utilisés, ainsi que des hyaluronates doublement modifiés HA-TEG-y%-C₁₂-x% (modifié par des chaînes alkyle en C₁₂ et réticulé par le tétraéthylène glycol TEG ditosylé).

Le taux en chaînes alkyle est déterminé en chromatographie en phase gazeuse (chapitre II, §4.2) et est exprimé en moles de C₁₂ (ou C₁₈) pour 100 moles de motifs monosaccharidiques. Le taux en TEG est un taux correspondant aux proportions initiales en TEG ajouté, exprimé en moles de TEG pour 100 moles de motifs monosaccharidiques.

2.2. Caractérisation rhéologique des solutions de polymères, seuls ou en mélange

Le chapitre III traite en détails du principe de la rhéologie. Les principales conditions opératoires sont rappelées dans les paragraphes suivants.

2.2.1. Préparation des solutions de polymères

Les polymères sont dissous dans une solution saline NaCl 0,15 mol.L⁻¹ et sont laissés sous agitation pendant 24 heures. La concentration d'étude en polymère seul est de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Lors de l'étude des mélanges, une proportion massique AA (modifié ou non) / HA (modifié ou non) spécifique est choisie, en général 8 / 2, la concentration totale en polysaccharides étant de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹.

Les solutions sont ensuite centrifugées à 5000 tr.min⁻¹ pendant 30 minutes à 15°C, dans le but d'éliminer les bulles d'air éventuellement formées lors de l'agitation.

Avant toute expérience, les échantillons sont placés au repos à 4°C pendant une nuit.

2.2.2. Appareillage

Cette caractérisation rhéologique a été réalisée, au LCPM, avec un rhéomètre à contrainte imposée AR 2000 (TA Instruments, USA) équipé d'une géométrie Plan/Plan, le diamètre des plans étant de

40 mm et l'entrefer de 1 mm. La température est fixée à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, température régulée par un système à effet Peltier placé sous le plateau inférieur. A cette température, les mesures, souvent longues, peuvent entraîner un dessèchement de l'échantillon, l'utilisation d'un dispositif anti-évaporation est donc nécessaire.

2.2.3. Etudes réalisées

En régime permanent, le rhéomètre impose une contrainte τ et donne l'évolution du gradient de cisaillement $\dot{\gamma}$ au cours du temps, sous cette contrainte. La viscosité est alors calculée en fonction de τ et de $\dot{\gamma}$ ($\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$). Les valeurs de viscosité ne sont enregistrées que lorsque l'évolution temporelle de la vitesse de cisaillement devient inférieure à 1% de sa valeur. Si cette condition n'est pas vérifiée, la viscosité est alors enregistrée à l'issue de 800 s, durée maximale d'imposition fixée arbitrairement pour chaque contrainte.

Les mesures en régime oscillatoire ont été réalisées dans le régime de viscoélasticité linéaire des échantillons (G' et G'' indépendants de la contrainte), il s'agit de mesurer les modules G' et G'' en fonction de la fréquence angulaire : le spectre mécanique est obtenu à une contrainte de 1 Pa, pour des fréquences allant de 100 à $0,1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.3. Formulation des polymères sous forme de billes

Les billes d'AA seul constituent le modèle de référence pour la culture tridimensionnelle des chondrocytes.

Les solutions d'AA (modifié ou non) enrichies ou non en HA (modifié ou non) sont préparées selon le protocole suivant : l'AA ou le mélange AA / HA est stérilisé par passage à l'autoclave sous forme de poudres. Cette étape consiste à maintenir les polymères en chaleur humide à 121°C pendant 20 minutes. Ce procédé de stérilisation entraîne une diminution des masses molaires moyennes en masse de l'ordre de 30% (cf chapitre III). Les polymères stériles sont ensuite solubilisés dans du NaCl 0,9% stérile sous hotte à flux laminaire (Jouan, France) afin d'obtenir une solution de concentration en polysaccharides de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Le mélange contient $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'AA et $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de HA. Les billes sont réalisées en laissant tomber les solutions, goutte à goutte, au travers d'une aiguille (18G, Terumo, Belgique), dans du CaCl_2 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ stérile (Merck, France). Une réticulation en périphérie se produit instantanément et, une fois formées, les billes sont laissées 15 minutes dans le CaCl_2 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ afin d'obtenir une gélification homogène. Un lavage de 2

minutes au NaCl 0,9% permet d'éliminer le CaCl₂ résiduel. Les billes sont rapidement placées dans le milieu de culture complet surchargé en CaCl₂, ce constituant permettant de maintenir l'intégrité structurale des matériaux pendant les trois semaines de culture cellulaire¹⁸.

Pour l'étude des paramètres influençant la cinétique de libération du HA hors des billes d'AA, les billes (sans cellules) sont déposées dans des eppendorfs contenant 1 mL de milieu complet supplémenté en CaCl₂, à raison de 2 billes/eppendorf et de 3 eppendorfs étudiés.

Pour l'étude de la cytocompatibilité, les billes (avec et sans cellules) sont déposées à raison de 10 billes/tube contenant 10 mL du même milieu.

2.4. Culture des chondrocytes en billes

2.4.1. Prélèvement et culture en monocouche des chondrocytes de rat issus de languettes sternales

Le prélèvement des languettes sternales est effectué stérilement sous hotte sur des rats de moins de 300 grammes (Wistar, Charles Rivers, France). Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine et d'acépromazine (Imalgène 500[®], Vétranquil 0.5[®]) en proportion 3 : 1 (v/v) (CERP, France). Après sacrifice par dislocation cervicale et incision en région abdominale, la languette sternale est récupérée et placée :

- dans du NaCl supplémenté en pénicilline-streptomycine (Gibco, USA),
- puis dans une solution de pronase issue de *Streptomyces griseus* (Sigma Aldrich, France) (1,5 mg.mL⁻¹ dans du NaCl supplémenté en pénicilline-streptomycine) durant 2 heures,
- puis dans la collagénase B issue de *Clostridium histolytium* (2 mg.mL⁻¹ dans du milieu complet sans sérum de veau fœtal) (Roche, Allemagne) pendant une la nuit.

Le tout est centrifugé (1500g, 5min) afin de récupérer les cellules qui sont alors mises en culture monocouche primaire P0.

Ces chondrocytes sont cultivés dans du milieu complet à raison de 15 mL par flacon de 75 cm². Ce milieu est constitué de :

- milieu DMEM (Dulbelcco's Modified Eagle's Medium) NUT FIX F-12,
- sérum de veau fœtal SVF (10%),
- L-glutamine (200 mmol.L⁻¹),
- pénicilline-streptomycine (10 mg.mL⁻¹),
- amphotéricine B (0,1%),

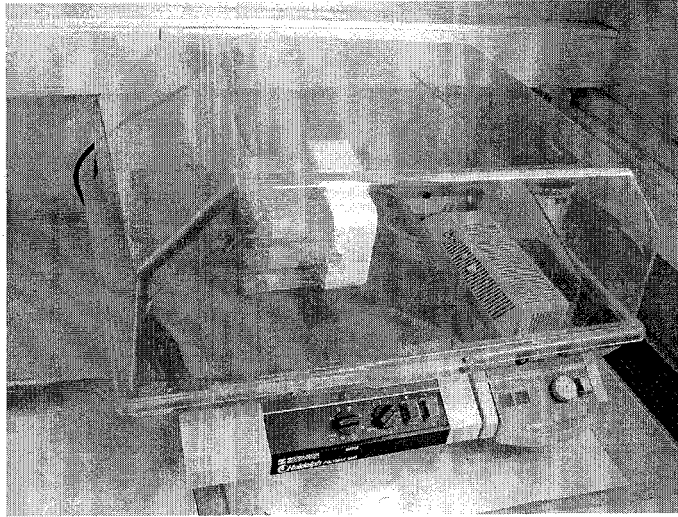


Figure 1 : Agitateur tridimensionnel Polymax 1040

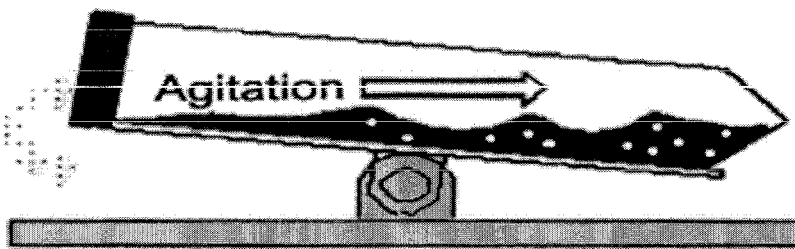


Figure 2 : Schéma du processus d'agitation

tous ces produits provenant de Gibco Life Technologies (USA).

La culture est réalisée dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ et le milieu est changé tous les 2-3 jours.

2.4.2. Culture en billes

Une fois les cellules à confluence, le tapis cellulaire est lavé au PBS (Tampon phosphate, GibcoBRL, France), avant d'ajouter 2 mL de trypsine/EDTA (trypsine 0,5 g.L⁻¹, Acide Ethylène Diamine Tétracétique, 0,2 g.L⁻¹, GibcoBRL, France) et de laisser incuber 5 minutes à 37°C. Cette étape consiste à décoller les cellules entre elles et de la boîte. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de 6 mL de milieu complet. La suspension cellulaire obtenue est comptée puis centrifugée. Le culot cellulaire est repris dans une solution d'AA ou de mélange AA / HA préparés dans NaCl 0,9% stérile à raison de 3.10⁶ cellules/mL de gel.

Le protocole de préparation des solutions et de fabrication des billes est décrit au paragraphe 2.3. Les billes formées sont placées dans des tubes (10 billes/tube) et incubées à 37°C, en présence de 10 mL de milieu complet surchargé en CaCl₂ 3 mmol.L⁻¹ (milieu défini dans le §2.4.1).

Les milieux de culture sont changés tous les 2-3 jours.

Des billes d'AA et de mélange AA / HA ont également été réalisées sans cellules pour servir de blanc réactif.

2.5. Protocole de la stimulation mécanique

L'influence de la stimulation mécanique sur la cinétique de libération du HA des billes d'AA et sur les réponses biologiques données par les chondrocytes a été étudiée sur un seul temps d'incubation (21 jours après la mise en culture en billes des chondrocytes).

La technique développée par Gigant-Huselstein *et coll.*^{15,19} est une technique basée sur un entrechoquement entre les billes.

L'entrechoquement des billesensemencées par des chondrocytes de rat a été réalisé à l'aide d'un agitateur tridimensionnel (Polymax 1040, Heidolf, Fisher Bioblock Scientific, France, Figure 1).

Les tubes contenant les billes immergées dans le milieu de culture sont fixés sur le plateau de l'agitateur, ce qui permet de les rendre solidaires au plateau et de leur appliquer un mouvement tridimensionnel avec un angle de 10° (Figure 2).

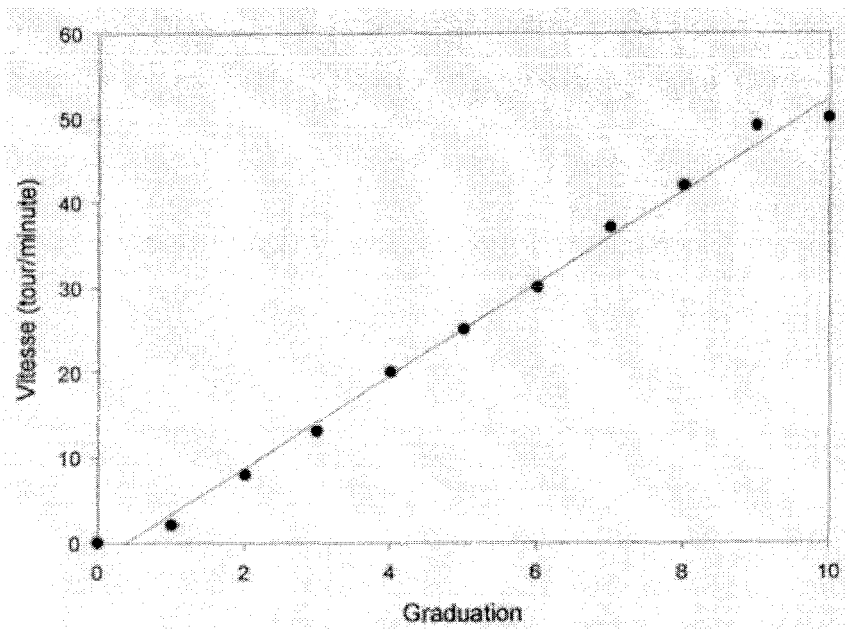


Figure 3 : Etalonnage de l'agitateur permettant de relier la graduation à la vitesse ($\text{tr.}\cdot\text{min}^{-1}$)

Un étalonnage de l'appareil est donné par le constructeur reliant la graduation au nombre de tours par minute (Figure 3). La graduation 6 utilisée correspond à 30 cycles par minute (1Hz). Ces entrechoquements simulent entre autres les contraintes et/ou les mouvements liquidiens existant au sein de l'articulation.

Un seul essai de stimulation mécanique a été réalisé : les tubes contenant 10 billes (avec et sans cellules) et 10 mL de milieu complet surchargé en CaCl_2 3 mmol.L^{-1} ont été agités pendant les dernières 48 heures de culture (de J19 à J21), pour chaque type de mélange. La température est maintenue à 37°C grâce au thermostat de l'agitateur.

2.6. Microscopie optique : études histologiques

Cette méthode a été utilisée pour visualiser l'aspect des cellules et des billes obtenues et pour étudier qualitativement la matrice extracellulaire synthétisée par des chondrocytes cultivés *in vitro*.

2.6.1. Préparation des réactifs de fixation et de déshydratation

Le tampon de fixation est composé d'un mélange de paraformaldéhyde à 4%, de cacodylate de sodium à 0,1 mol.L^{-1} et de CaCl_2 à 10 mmol.L^{-1} (tous ces produits étant fournis par Sigma Aldrich, France), le pH étant ajusté à 7,4.

Le tampon de lavage est constitué d'un mélange de cacodylate de sodium à 0,1 mol.L^{-1} et de BaCl_2 à 50 mmol.L^{-1} , le pH étant ajusté à 7,4.

Les solutions d'éthanol (Descharmes, France) sont préparées en proportions variables dans de l'eau distillée.

Le toluène est fourni par Carlo Erba Reagents (France).

La paraffine « Tissu Tek » est fournie par Bayer Diagnostic (France).

Les lames histologiques de verre sont fournies par Labonord (France).

2.6.2. Traitement des échantillons

Après 14 et 21 jours de culture, 10 billes contenant des cellules sont fixées par 2 mL du tampon de fixation pendant 4 heures à 20°C. Le tampon est ensuite remplacé par 2 mL de tampon de lavage, les billes sont laissées ainsi une nuit au réfrigérateur.

Les billes sont ensuite déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (30 minutes à 70%, 2 fois 30 minutes à 95%, 30 minutes à 100%) puis dans 3 bains de toluène (15

minutes chacun) qui facilitent l'infiltration de la paraffine. Les échantillons sont ensuite inclus dans la paraffine chaude (un premier bain d'1 heure, un second bain de 2 heures).

Après refroidissement à 4°C, les blocs de paraffine obtenus sont découpés en coupes de 5 µm d'épaisseur grâce à un microtome (Leica RM 2135, France). Les coupes sont déposées sur des lames de verre préalablement chauffées afin de ramollir la paraffine et de permettre aux coupes de s'étaler et d'adhérer.

2.6.3. Coloration des échantillons

Les colorations sont réalisées à l'aide d'un appareil à coloration (Tissue-Tek[®]DRS[™], Sakura).

2.6.3.1. La coloration HES

L'hématoxyline colore les noyaux en bleu foncé, le safran colore les collagènes en jaune et l'éosine colore en rose les éléments cellulaires acidophiles.

La solution de coloration hématoxyline est préparée en mélangeant à chaud 1000 mL d'alumine de potassium (Merck, Allemagne) à 100 g.L⁻¹ dans de l'eau distillée, 50 mL d'hématoxyline (GURR BDH Chemicals, Royaume-Uni) à 0,01 g.L⁻¹ dans de l'éthanol à 95% (Descharmes, France) et 2,5g d'oxyde de mercure (Prolabo, France). Après refroidissement, 20 mL d'acide acétique à 96% (Merck, Allemagne) sont ajoutés au mélange.

L'acool ammoniacal est réalisé en mélangeant 58% d'éthanol à 95%, 39% d'eau distillée et 3% d'ammoniaque diluée (1/4 dans l'eau distillée) (Labonord, France).

La solution de coloration safran est préparée à 10 g.L⁻¹ de safran (Réactifs RAL, France) dans l'éthanol absolu.

La solution de coloration éosine est préparée à 10 g.L⁻¹ d'érythrosine (Réactifs RAL, France) dans l'eau distillée.

Le fixateur Vogel[®] est commercialisé par Bayer Diagnostic (France).

Les coupes sont mises en contact avec l'hématoxyline pendant 5 minutes puis elles sont lavées pendant 3 minutes avec la solution d'alcool ammoniacal. Les lames sont ensuite déshydratées dans des bains d'alcool de pureté croissante puis placées 5 minutes dans le colorant safran. Après 2 lavages de 3 minutes respectivement dans l'éthanol absolu et le toluène, les coupes sont colorées 5 minutes dans la solution d'éosine puis elles sont fixées avec Vogel[®].

2.6.3.2. La coloration au bleu alcian

Le bleu alcian a la particularité de colorer les groupements acides des polysaccharides en bleu turquoise. Une contre coloration dite de « Kernechtrot » fait également partie de ce protocole. Elle colore les noyaux et les cytoplasmes cellulaires en rose et permet de mieux distinguer les cellules dans la matrice extracellulaire riche en protéoglycanes (colorés en bleu).

La solution de coloration bleu alcian est préparée à 1 g.L^{-1} de bleu alcian (GURR BDH Chemicals, Royaume-Uni) dans l'acide acétique à 3%.

La solution de contre coloration Kernechtrot contient $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de Kernechtrot (Merck, Allemagne) et $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfate d'aluminium (GURR BDH Chemicals, Royaume-Uni) dans l'eau distillée. Avant utilisation, la solution est portée à ébullition, puis filtrée.

Les lames sont colorées pendant 2 heures dans la solution de bleu alcian. Après 30 secondes de rinçage à l'eau distillée, elles subissent une contre coloration de Kernechtrot pendant 10 minutes. Elles sont ensuite lavées 3 fois pendant 30 secondes dans des bains respectifs d'éthanol 95%, d'éthanol absolu puis de toluène. Au final, elles sont fixées au Vogel[®].

2.6.3.3. La coloration au bleu de toluidine

Cette coloration métachromique est peu spécifique et elle colore les mucopolysaccharides acides, carboxylés, sulfatés ou phosphatés.

Le colorant au bleu de toluidine (Réactifs RAL, France) est préparé à 10 g.L^{-1} dans de l'eau distillée.

Les lames sont immergées pendant 5 minutes dans la solution de bleu de toluidine. Elles sont ensuite lavées 3 fois pendant 30 secondes dans de l'eau distillée, de l'éthanol absolu puis du toluène. Au final, les lames sont plongées dans un bain de Vogel[®].

2.6.3.4. La coloration au rouge sirius

Cette technique a la particularité de colorer en rouge vif la matrice extracellulaire riche en collagène sous une lumière non polarisée. Les fibres de collagène apparaissent sous lumière polarisée, avec une coloration orange et verte, en raison de leur aspect biréfringent.

Le colorant rouge sirius est obtenu par dissolution de Direct Red 80 à 1 g.L^{-1} (Sigma Aldrich, France) dans de l'acide picrique à 0,1% (Merck, Allemagne).

L'acide chlorhydrique $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ dans l'eau distillée est fourni par Merck.

Les lames sont immergées pendant 1 heure dans le rouge sirius puis elles sont lavées 2 minutes à l'acide chlorhydrique 0,01 mol.L⁻¹ (Merck, Allemagne) et enfin fixées avec le Vogel[®].

2.6.4. Analyse des échantillons

L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope optique Nikon équipé de 3 objectifs (4X, 10X et 40X). La caméra couleur numérique qui permet de visualiser les coupes est une Sony N50 (modèle SSC-DC58AP). Les photographies sont numérisées à l'aide du programme Silicone Valley.

Le dosage de l'ADN total par fluorescence n'ayant pas permis d'aboutir à cette quantité, l'évaluation du nombre de cellules présentes dans les billes s'est faite par histologie. Toutes les billes prélevées ayant été préparées dans les mêmes conditions (épaisseur de coupe, bain de coloration identiques), leur coloration à l'HES nous a permis de mettre en évidence les noyaux de ces cellules et de les compter pour une surface de coupe équivalente. 5 comptages ont été réalisés à un grossissement X4 pour chaque type de mélange et pour chaque condition d'incubation.

2.7. Incorporation des précurseurs radiomarqués

Ce paramètre a été étudié sur les chondrocytes issus de languettes sternales de rat cultivés en systèmes billes et a permis d'appréhender la synthèse d'ADN par incorporation de ³H-thymidine et la synthèse des protéoglycanes par incorporation de Na₂³⁵SO₄.

2.7.1. Principe

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture contenant conjointement les deux précurseurs radiomarqués. La thymidine est un des constituants de base de l'ADN. Lors de la prolifération cellulaire, les chondrocytes incorporent la ³H-thymidine présente dans le milieu. En conséquence, les brins d'ADN néosynthétisés le sont sous forme radiomarquée. Dans le même temps, le Na₂³⁵SO₄ est incorporé par les cellules qui, au cours de leur phase d'anabolisme, produisent des protéoglycanes radiomarqués.

2.7.2. Produits

La ³H-thymidine et le Na₂³⁵SO₄ sont fournis par Perkin Elmer (USA).

Le scintillant « High flash point Ultima Gold » est fourni par Packard (USA).

Des tampons sont nécessaires :

- Tampon de lyse citrate/EDTA : citrate de sodium (55 mmol.L^{-1}) (Sigma Aldrich, France), EDTA (50 mmol.L^{-1}) (Gibco Life Technologies, USA) dans eau distillée,
- Solution de papaïne : papaïne issue de *Papaya latex* (Sigma Aldrich, France) préparée extemporanément à 6 mg.mL^{-1} dans de l'eau p.p.i. (« pour préparation injectable », Braun, France),
- Tampon papaïne : acétate de sodium (100 mmol.L^{-1}) (Merk, Allemagne), EDTA (50 mmol.L^{-1}), L-cystéine (5 mmol.L^{-1}) (Sigma Aldrich, France) dans eau distillée,
- Solution papaïne/tampon papaïne : $350 \mu\text{l}$ de la solution de papaïne dans 10 mL de tampon papaïne

Une solution d'acide monoiodoacétique (MIA) est préparée à 220 mmol.L^{-1} dans eau distillée (Merck, Allemagne).

2.7.3. Protocole

L'évaluation de la synthèse d'ADN et de l'activité de synthèse des protéoglycanes se fait à J14 et J21 après encapsulation des chondrocytes de rat dans les billes.

Pour les billes soumises à une stimulation mécanique pendant 48 heures, la double incorporation des précurseurs radiomarqués est réalisée à 37°C durant les dernières 24 heures de la stimulation mécanique dans un milieu complet supplémenté avec $5 \mu\text{Ci.mL}^{-1}$ de ^3H -thymidine et $10 \mu\text{Ci.mL}^{-1}$ de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$. L'incorporation pour les autres échantillons se fait avec le même milieu, au même temps, mais en mode statique.

Les billes sont ensuite lavées 6-7 fois avec du NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, afin d'éliminer la radioactivité non spécifique, et sont placées individuellement dans des tubes de comptage de radioactivité (Packard, France).

Les billes sont détruites avec $100 \mu\text{L}$ de tampon citrate/EDTA à température ambiante pendant 10-15 minutes. En effet, le tampon citrate/EDTA agit comme un agent chélatant qui provoque la déstructuration des matrices par rupture des interactions ioniques Ca^{2+} -alginate.

$150 \mu\text{L}$ de la solution papaïne/tampon papaïne sont ensuite ajoutés. La papaïne lyse les chondrocytes, permettant ainsi la libération de l'ADN.

Après une nuit à 60°C , $10 \mu\text{L}$ de MIA sont ajoutés, afin de stopper l'action de la papaïne.

$4,5 \text{ mL}$ de scintillant sont ajoutés pour mesurer la radioactivité en double marquage grâce à un compteur de scintillation (Beckman Coulter, France).

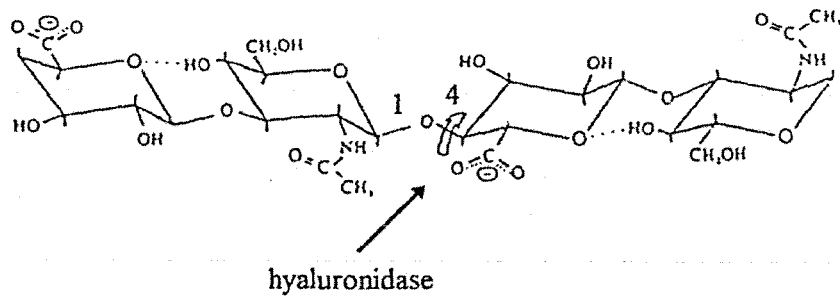


Figure 4 : Illustration de l'attaque de la hyaluronidase au niveau de la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$, d'après Zhong et coll.²⁰

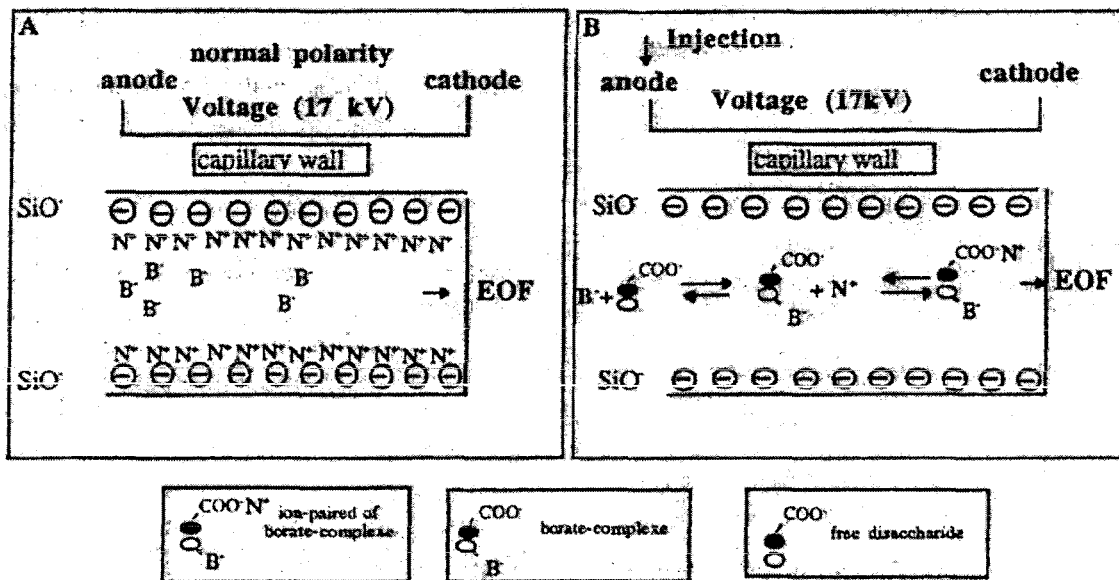


Figure 5 : Principe de la chromatographie capillaire en présence d'un contre-ion, d'après Payan et coll.²³
 EOF : flux électroosmotique, B⁻ : ions borate négatifs, N⁺ : ions tétrabutylammonium positifs,
 SiO⁻ : capillaire chargé négativement

Dix tubes contenant 1 bille sont comptés pour chaque temps et pour chaque type de mélange.

Des billes, avec ou sans HA, mais ne contenant pas de cellules, subissent le même traitement au titre de blancs réactifs.

2.7.4. Expression des résultats

Les résultats sont présentés sous la forme de :

dpm³H / nombre de cellules (obtenu à partir des coupes histologiques, §2.6.4)

dpm³⁵S / nombre de cellules,

dpm représentant le nombre de désintégrations par minute.

Ils reflètent respectivement les activités de prolifération et de synthèse des protéoglycanes des chondrocytes cultivés dans les différents matériaux.

2.8. Dosage du hyaluronate en IA-ECZ

Le but de ce dosage était de quantifier les quantités de hyaluronate maintenues dans les billes d'alginate, à 37°C, à différents temps d'incubation.

2.8.1. Principe

Les billes sont hydrolysées par une hyaluronidase spécifique au hyaluronate. Elle agit essentiellement par rupture des ponts glycosidiques en β 1→4 (Figure 4,²⁰⁻²²), pour former des résidus tétra- et hexasaccharides.

Les produits obtenus après hydrolyse enzymatique du hyaluronate sont séparés par **électrophorèse capillaire de zone par association ionique** : les résidus sont séparés en fonction de leur masse et de leur charge sous l'effet d'une différence de potentiel qui génère un flux électrophorétique et un flux électroosmotique au sein d'un capillaire. La présence d'un contre-ion dans le tampon de travail permet de séparer des constituants ayant des mobilités électrophorétiques très proches, par formation de paires d'ions (Figure 5,²³).

2.8.2. Produits

L'enzyme utilisée est la hyaluronidase issue de *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma Aldrich, France), reconstituée à 100 UI.mL⁻¹ dans du tampon acétate 20 mmol.L⁻¹, pH=6 (Merck, Allemagne).

La solution d'étalon interne est composée d'acide (benzoyl,1-4,phényl)-2-butyrique (BPBA, Rhône Poulenc Rorer, France) à $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du tampon acétate 20 mmol.L^{-1} , pH=6.

Le Mixture B (Beckman Coulter, France) composé d'acide 4-hydroxy-benzoïque ($0,72 \text{ mmol.L}^{-1}$) et d'acide (4-hydroxyphényl)-acétique ($0,66 \text{ mmol.L}^{-1}$) a également servi d'étalon interne.

Des billes d'AA sans cellules ont été réalisées pour servir de blanc réactif dans la préparation de la gamme.

Le tampon de travail est composé d'un mélange borate de sodium 10 mmol.L^{-1} / acide borique 50 mmol.L^{-1} (Merck, Allemagne) et de 50 mmol.L^{-1} de phosphate de tétrabutylammonium (réactif Pic A[®], Waters, France).

Les solutions de conditionnement du capillaire NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sont préparées extemporanément à partir d'un Titrisol[®] $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck, Allemagne) dans 100 mL d'eau distillée puis diluée au 1/10. Celles de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sont préparées extemporanément à partir d'une solution HCl 1 mol.L^{-1} obtenue par dilution de HCl commercial 37% (12 mol.L^{-1}).

2.8.3. Protocole

Après avoir éliminé le milieu de culture, 2 billes sont hydrolysées 72 heures à 37°C par $80 \mu\text{L}$ de hyaluronidase, le volume final du milieu d'hydrolyse étant complété à $880 \mu\text{L}$ par le tampon acétate (pour 1 bille, $30 \mu\text{L}$ de hyaluronidase suffisent, le volume final du milieu d'hydrolyse étant complété à $330 \mu\text{L}$ par le tampon acétate).

$220 \mu\text{L}$ des échantillons hydrolysés sont ensuite centrifugés à $10\,000 \text{ tr.min}^{-1}$ pendant 1 heure dans des systèmes d'ultrafiltration (Ultrafree[®]-MC-10000-polysulfone, Millipore Corporation, USA).

Les filtrats sont alors congelés en attente du dosage.

Après décongélation, $170 \mu\text{L}$ de l'hydrolysate filtré sont additionnées de $10 \mu\text{L}$ de BPBA ou de $5 \mu\text{L}$ de MixB.

Le dosage se fait en double par rapport à une gamme d'étalonnage contenant du HA (Acros, lot A0147769, à 25, 50, 100, 200 et $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) hydrolysée à la hyaluronidase dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les quantités de hyaluronate restant dans les billes s'obtiennent à partir de l'équation :

$$(\text{aire pic tétrasaccharide} + \text{aire pic hexasaccharide}) / \text{aire pic standard interne} = f(C_{\text{hyaluronate}})$$

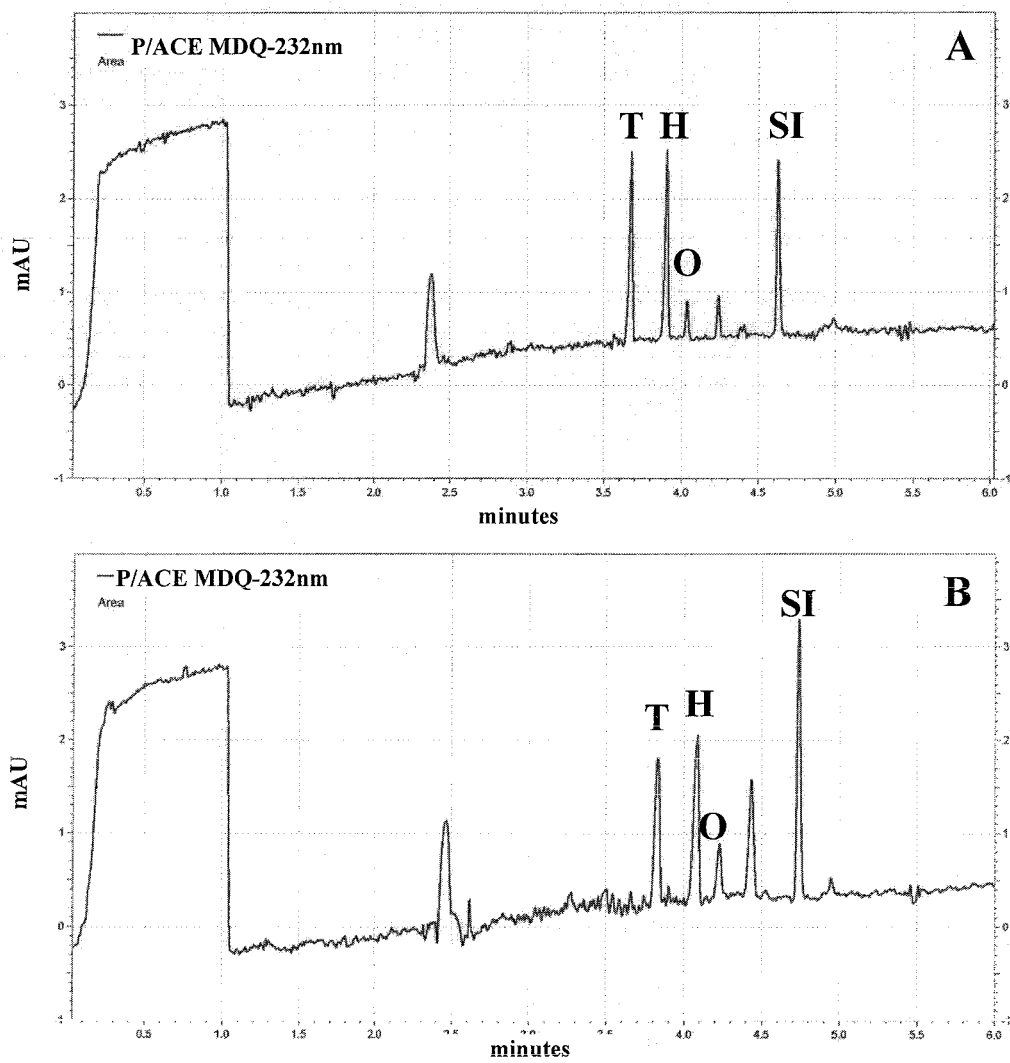


Figure 6 : Electrophorégramme classique obtenu lors du dosage du hyaluronate
A électrophorégramme correspondant au point de gamme $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$
B électrophorégramme d'un échantillon
(T : Tétraccharide, H : Hexasaccharide, O : Octasaccharide, SI : standard interne)

2.8.4. Analyse des échantillons

L'analyse se fait à l'aide de l'électrophorèse capillaire Beckman Coulter P/ACE MDQ (France), équipé d'un capillaire (type eCAP[®] capillary tubing, Beckman Coulter, USA) de 50 cm de long et 75 μm de diamètre. Avant analyse, le capillaire est régénéré par une longue phase de conditionnement. Cette dernière consiste en des lavages successifs à température ambiante avec les solutions de HCl 0,1 mol.L⁻¹ (10 minutes), eau (4 minutes), NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (15 minutes), eau (4 minutes) et enfin avec le tampon de travail (10 minutes). Lors d'une séquence de plusieurs échantillons, ce rinçage est régulièrement effectué. Avant utilisation, tous ces réactifs sont dégazés et filtrés sur Millex HV13-0,45 μm (Millipore Corporation, France).

Les hydrolysats filtrés et surchargés en standard interne sont injectés en mode hydrodynamique pendant 5 secondes. La différence de potentiel appliquée entre les deux électrodes est de 30 kV. La détection se fait à la longueur d'onde $\lambda = 232 \text{ nm}$ avec un détecteur UV-visible.

Le traitement des résultats se fait à l'aide du logiciel 32 Karat Software. Chaque électrophorégramme présente 3 pics principaux, l'un correspondant au standard interne (temps de rétention de l'ordre de 4,7 minutes) et les deux autres correspondant aux tétra- T et hexasaccharides H formés lors de l'hydrolyse enzymatique (temps de rétention de l'ordre de 3,6 et 3,8 minutes). Dans certains cas, un pic apparaît à un temps supérieur, il s'agit du pic correspondant à l'octasaccharide O, qui correspond à la ré-association de deux tétrasaccharides (Figure 6).

2.9. Dosage des chondroïtines sulfates en IA-ECZ

Le but de cette analyse était d'observer, de manière qualitative, la présence de chondroïtines sulfates CS synthétisées par les chondrocytes dans les billes. Différentes sortes de CS peuvent être synthétisées et détectées : la chondroïtine C0S qui correspond à des unités disaccharidiques non sulfatées et qui sert de précurseur à la synthèse des autres chondroïtines sulfates, la chondroïtine sulfate C4S sulfatée en position 4 de la galactosamine, la chondroïtine sulfate C6S sulfatée en position 6.

2.9.1. Principe

Les billes sont traitées par la chondroïtinase ABC qui dégrade les glycosaminoglycanes sulfatés et non sulfatés (chondroïtines sulfates et hyaluronate) en résidus disaccharidiques. Tout comme pour le dosage du hyaluronate, les résidus obtenus sont séparés par **électrophorèse capillaire de zone par association ionique**²³.

2.9.2. Produits

L'enzyme utilisée est la chondroïtinase ABC provenant de *Proteus vulgaris* (Sigma Aldrich, France), reconstituée à 10 UI.mL⁻¹ dans du tampon Tris, HCl 50 mmol.L⁻¹, pH=8 (Euromedex, France).

La solution d'étalon interne est le Mixture B (Beckman Coulter, France) composé d'acide 4-hydroxy-benzoïque (0,72 mmol.L⁻¹) et d'acide (4-hydroxyphényl)-acétique (0,66 mmol.L⁻¹).

Des billes d'AA sans cellules ont été réalisées pour servir de blanc réactif dans la préparation de la gamme.

La présence des Δ diHA présents après l'hydrolyse enzymatique oblige à l'utilisation de deux tampons de travail pour que la séparation des pics Δ diHA et Δ diC0S soit optimale.

Le tampon de travail utilisé pour les Δ diC4S est composé d'un mélange borate de sodium 10 mmol.L⁻¹/acide borique 50 mmol.L⁻¹ pH=8 (Merck, Allemagne) et de 50 mmol.L⁻¹ de phosphate de tétrabutylammonium (réactif Pic A[®], Waters, France).

Le tampon de travail utilisé pour les Δ diC0S est composé d'un mélange borate de sodium 10 mmol.L⁻¹/acide borique 50 mmol.L⁻¹ pH=11 et de 50 mmol.L⁻¹ de phosphate de tétrabutylammonium.

Les solutions de conditionnement du capillaire NaOH 0,1 mol.L⁻¹ sont préparées extemporanément à partir d'un Titrisol[®] 0,1 mol.L⁻¹ (Merck, Allemagne) dans 100 mL d'eau distillée puis diluée au 1/10. Celles de HCl 0,1 mol.L⁻¹ sont préparées extemporanément à partir d'une solution HCl 1 mol.L⁻¹ obtenue par dilution de HCl commercial 37% (12 mol.L⁻¹).

2.9.3. Protocole

Après avoir aspiré les 10 mL du milieu de culture, les 20 billes avec et sans cellules sont agitées pendant 30 minutes dans 10 mL de tampon Tris, HCl.

Après aspiration du tampon, les 20 billes sont hydrolysées 48 heures à 37°C par 50 μ L de chondroïtinase ABC, le volume final du milieu d'hydrolyse étant complété à 300 μ L par le tampon Tris, HCl.

220 μ L des échantillons hydrolysés sont ensuite centrifugés à 10 000 tr.min⁻¹ pendant 1 heure dans des systèmes d'ultrafiltration (Ultrafree[®]-MC-10000-polysulfone, Millipore Corporation, USA). Les filtrats sont alors congelés en attente du dosage.

Après décongélation, 170 μ L de l'hydrolysate filtré sont additionnées de 3 μ L de MixB.

Le dosage se fait en double par rapport à une gamme d'étalonnage contenant des C0S et des C4S (3, 10, 30 et 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) hydrolysée à la chondroïtinase ABC dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les quantités de disaccharides peuvent s'obtenir à partir des équations :

$$(\text{aire } \Delta\text{diC0S}) / \text{aire pic standard interne} = f(C_{\Delta\text{diC0S}})$$

$$(\text{aire } \Delta\text{diC4S}) / \text{aire pic standard interne} = f(C_{\Delta\text{diC4S}})$$

2.9.4. Analyse des échantillons

La présence des ΔdiHA présents après l'hydrolyse enzymatique a obligé à deux analyses (avec des tampons de travail de pH différents, §2.9.2) car le temps de rétention de ces résidus était trop proche de celui des ΔdiC0S .

Tout comme le dosage du hyaluronate, l'analyse se fait à l'aide de l'électrophorèse capillaire Beckman Coulter et le capillaire doit être régénéré de la même manière (§2.8.4).

Les hydrolysats filtrés et surchargés en standard interne sont injectés en mode hydrodynamique pendant 5 secondes.

Dans le cas de l'analyse des ΔdiC4S , la différence de potentiel appliquée entre les deux électrodes est de 15 kV, avec un temps d'analyse de 20 minutes.

Dans le cas de l'analyse des ΔdiC0S , la différence de potentiel appliquée entre les deux électrodes est également de 15 kV, avec un temps d'analyse de 40 minutes.

La détection est identique à celle décrite au paragraphe 2.8.4 et le traitement des résultats se fait également à l'aide du logiciel 32 Karat Software.

2.10. Protocole de la cinétique de libération du hyaluronate d'une matrice tridimensionnelle d'alginate de calcium

Cette étude de cinétique de libération du HA hors des billes d'alginate de calcium s'est déroulée sur 21 jours. Les billes de différents mélanges, préparées selon le protocole décrit dans les paragraphes 2.3 et 2.4.2, ont été incubées à 37°C, dans le milieu de culture complet surchargé en CaCl_2 3 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$.

Différents temps ont été choisis pour cette étude : à la fabrication des billes (J0), 8 heures après la fabrication des billes, 1 jour après la fabrication (J1), 3 jours après (J3), 7 jours après (J7), 14 jours

après (J14), 21 jours après (J21), les billes étant incubées à 37°C, dans le milieu, pendant ces différentes périodes.

A ces différents temps d'incubation, les billes ont été prélevées et le HA maintenu dans les billes a été dosé selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.8. La quantité de HA maintenue dans les billes est calculée grâce à la droite d'étalonnage obtenue avec les points de gamme.

Par la suite, les résultats sont exprimés de deux manières :

- soit par le taux de HA maintenu dans les billes d'AA au temps d'incubation Jt :

$\%HA \text{ maintenu} = (\text{masse de HA dosée à Jt} / \text{masse des billes à Jt}) / (\text{masse de HA dosée à J0} / \text{masse des billes à J0})$

- soit par le taux de HA libéré des billes au temps d'incubation Jt :

$\%HA \text{ libéré} = 100 - \%HA \text{ maintenu}$. En effet, il a été vérifié que la somme du HA présent dans les billes et celui présent dans le surnageant correspondant est bien égale à 100%²⁴.

Les résultats de la cinétique de libération sont exprimés en %HA libéré en fonction du temps d'incubation.

Différents facteurs pouvant influencer cette cinétique de libération ont été étudiés :

- Le milieu de libération,
- L'autoclavage des polymères,
- La concentration totale en polysaccharides,
- La stimulation mécanique,
- La présence de cellules,
- Les AA modifiés utilisés,
- Les HA modifiés utilisés (simple ou double modification).

2.11. Protocole de l'étude de la cytocompatibilité

Différentes matrices ont été préparées, selon les protocoles décrits dans les paragraphes 2.3 et 2.4.2, avec et sans cellules :

Type d'alginate	Type de hyaluronate
AA natif	HA natif
AA natif	HA-C ₁₂ -2,3%
AA natif	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -2,5%
AA natif	HA-C ₁₈ -1,3%
AA natif	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%
AA-C ₁₂ -6%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%
AA-C ₁₂ -6%	HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%

Tableau 1 : Mélanges étudiés pour la cinétique de libération du HA des billes d'alginate de calcium

- une matrice d'AA qui nous a servi de référence,
- une matrice d'AA enrichie en HA natif,
- une matrice d'AA enrichie en HA-C₁₂-2,3%,
- et une matrice d'AA enrichie en HA-TEG-0,5%-C₁₂-2,5%

et ont été incubées à 37°C, pendant 14 ou 21 jours, en mode statique ou agité (§2.5), dans un milieu de culture complet surchargé en CaCl₂ 3 mmol.L⁻¹.

Différentes études ont été réalisées :

- Influence de la présence de HA (modifié ou non) sur la prolifération cellulaire, sur la synthèse des protéoglycanes (§2.7), dont la synthèse des chondroïtines sulfates (§2.9)
- Influence de la stimulation mécanique (§2.5) sur ces mêmes paramètres.

3. CINETIQUE DE LIBERATION DU HYALURONATE D'UNE MATRICE TRIDIMENSIONNELLE D'ALGINATE DE CALCIUM

3.1. Mélanges étudiés et conditions pour préparer les billes

Le protocole de cette étude a été décrit dans le paragraphe 2.10. Différents mélanges AA (modifié ou non) / HA (modifié ou non) ont été préparés sous forme de billes, sous différentes conditions, afin d'évaluer la quantité de HA libérée des billes d'alginate de calcium, incubées à 37°C, pendant 21 jours, dans un milieu complet surchargé en CaCl₂ 3 mmol.L⁻¹.

Le tableau 1 regroupe les différents mélanges préparés.

Ce type de matrices a déjà été utilisé, entre autres par Gigant-Huselstein *et coll.*^{15,19}, Miralles *et coll.*²⁵, Pelletier *et coll.*¹⁶, Oerther *et coll.*^{18,26,27} et Lindenhayn *et coll.*²⁸.

Ces travaux ont montré que des billes pouvaient être formées à partir d'un mélange AA natif / HA natif ou modifié par des chaînes alkyle, de concentration totale en polysaccharides 20 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, avec une proportion massique AA / HA 16 / 4, résultats que nous avons effectivement vérifiés.

Ayant cependant constaté que, dans ces conditions, les mélanges à base d'AA modifié ne formaient pas de billes, des nouvelles conditions ont donc dû être mises au point, en modifiant la concentration totale en polysaccharides et la proportion massique AA / HA.

	Viscosité au 1er plateau newtonien ^a	G' ^b	G'' ^b
	(Pa.s)	(Pa)	(Pa)
AA natif	0,02	faible	0,03
AA-C ₁₂ -6%	0,8	0,3	0,4
AA-C ₁₂ -8%	3 000	19,4	5,5
HA natif	0,2	0,02	0,5
HA-C ₁₂ -2,3%	0,5	0,2	0,03
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -2,5%	17	4,5	5,3
HA-C ₁₈ -1,3%	14 000	69,4	12
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	1,3	0,3	1,1
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	0,5	0,1	0,4

Tableau 2 : Paramètres rhéologiques après autoclavage des produits intervenant dans l'étude de libération du HA des billes d'alginate de calcium
^{a, b} données mesurées à 37°C pour une concentration totale en polymères de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹
^b déterminés à une contrainte de 1 Pa, à une fréquence de 1 rad.s⁻¹

Alginate	Hyaiuronate	proportion massique AA/HA	Viscosité au 1er plateau ^a	Viscosité au 2ème plateau ^a	G' ^b	G'' ^b
			(Pa.s)	(Pa.s)	(Pa)	(Pa)
AA natif	HA natif	8/2	0,1		0,02	0,1
AA natif	HA-C ₁₂ -2,3%	8/2	0,04		0,002	0,04
AA natif	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -2,5%	8/2	0,05		0,003	0,05
AA natif	HA-C ₁₈ -1,3%	8/2	0,1		0,005	0,06
AA natif	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	8/2	0,05		0,005	0,06
AA-C ₁₂ -6%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	8/2	130		6,9	4,7
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	8/2	2 000	70	29,4	16,1
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	7/3	600	24	7,8	6,8
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	6/4	200	27	9,9	9,1
AA-C ₁₂ -6%	HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	8/2	160		7,1	3,5
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	8/2	2000	10	10,7	5,1
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	7/3	600	20	6,9	4,9
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	6/4	300	15	5,1	4,4

Tableau 3 : Paramètres rhéologiques des mélanges, après autoclavage, dans différentes proportions massiques AA / HA
^{a, b} définis dans le tableau 2

Après différents essais, il s'est avéré que les conditions optimales pour obtenir des billes avec ces mélanges étaient d'avoir une concentration totale en polysaccharides de 10 g.L^{-1} et une proportion massique de 8 / 2 en AA modifié / HA modifié. Des mélanges réalisés avec des rapports massiques de 7 / 3 ou 6 / 4 n'ont pas donné pas de billes stables sur la durée, elles se sont déstructurées au fur et à mesure de l'expérience.

Les conditions de concentration totale en polysaccharides de 10 g.L^{-1} , avec une proportion massique de 8 / 2 en AA / HA ont donc été adoptées pour tous les mélanges.

3.2. Caractérisation rhéologique des produits utilisés, seuls ou en mélange

Les propriétés rhéologiques des polymères utilisés sont connues en régimes permanent et oscillatoire, avant et après autoclavage, à 10 g.L^{-1} dans NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$. Le tableau 2 rassemble les paramètres rhéologiques de ces produits après autoclavage.

Les propriétés rhéologiques des mélanges préparés ont également été étudiées, après autoclavage, à 10 g.L^{-1} dans NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ (Tableau 3).

Les propriétés rhéologiques des différents produits ont déjà été discutées dans le chapitre III.

En ce qui concerne les mélanges, nous pouvons remarquer la présence de deux plateaux, lors de l'étude en régime permanent de certains mélanges, résultats qui sont discutés dans le paragraphe 3.3.6.

3.3. Résultats de la cinétique de libération du HA des billes d'alginate de calcium et discussion

3.3.1. Influence du milieu de libération

Oerther *et coll.* ont démontré que selon le milieu de libération utilisé (tampon phosphate, milieu enrichi en albumine, en hyaluronate) la cinétique de libération du HA variait¹⁸. La présence d'agents chélatants (EDTA, lactate, citrate, phosphate, une forte concentration en Na^+ ou Mg^{2+}) provoque la déstructuration des billes par capture des Ca^{2+} et ainsi rupture des liaisons Ca^{2+} -alginate^{29,30}. Ces déstructurations peuvent être évitées en supplémentant le milieu en Ca^{2+} ³¹, c'est pourquoi le milieu que nous avons utilisé est surchargé en CaCl_2 à 3 mmol.L^{-1} .

Alginate	Hyaluronate	SVF	%HA libéré J14	Coefficient de variation (%)	%HA libéré J21	Coefficient de variation (%)	n
AA natif	HA natif	oui	14	10	17	9	6
AA natif	HA natif	non	10	5	16	8	3
AA-C ₁₂ -6%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	oui	81	10	96	9	6
AA-C ₁₂ -6%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	non	95	7	100	1	3

**Tableau 4 : Taux de HA libéré à J14 et J21,
dans un milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal SVF ou non
(37°C, mélanges autoclavés, concentration totale en polymères de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹,
proportion massique AA / HA 8 / 2)
Le coefficient de variation est défini comme le rapport de l'écart-type à la moyenne des masses de HA
maintenues, n étant le nombre d'échantillons dosé**

Lors de l'observation macroscopique des billes formées, nous avons confirmé, comme décrit dans la littérature^{16,18,32}, la formation au cours du temps d'une matrice blanchâtre au cœur de ces billes, notamment celles ne contenant pas de cellules. Il semblerait que cette matrice soit de nature protéique et qu'elle soit due à une précipitation du sérum de veau foetal, contenu dans le milieu de culture, en présence des ions Ca^{2+} ²⁵.

La présence de ce sérum de veau foetal dans le milieu de culture complet utilisé pouvait entraîner d'autres difficultés. En effet, ce constituant peut éventuellement contenir des estérases et une dégradation des liaisons ester existant entre les chaînes hydrophobes (ou le TEG) et le squelette polysaccharidique pouvait se produire et avoir un effet sur la cinétique de libération du HA.

Nous avons donc préparé des billes à partir de deux mélanges et nous les avons incubées pendant 21 jours à 37°C, en présence ou non de sérum de veau dans le milieu de culture, toutes autres conditions restant identiques.

Le dosage du HA libéré des billes a été réalisé à différents temps d'incubation (J0, J1, J3, J7, J14 et J21). La cinétique de libération étant très peu différente qu'il y ait ou non le sérum de veau foetal, seuls sont donnés les taux de HA libérés au bout de 14 jours et au bout de 21 jours, à 37°C, dans le milieu (Tableau 4).

Il n'y a pas de différence significative entre les quantités de HA libérées des billes au bout de 14 et 21 jours, pour un mélange AA natif / HA natif, que le milieu de culture contienne ou non du sérum de veau foetal, ce qui paraît cohérent, les liaisons ester n'étant pas présentes dans le cas d'un mélange natif / natif. De la même façon, le résultat de libération pour un mélange AA amphiphile / HA doublement modifié ne varie pas, qu'il y ait ou non du sérum de veau foetal dans le milieu.

Nous pouvons donc conclure que les estérases, si elles existent dans le sérum de veau foetal, n'ont pas d'influence sur la cinétique de libération du HA des billes d'alginate de calcium et que nous pouvons utiliser ce sérum de veau foetal, afin d'être dans des conditions plus proches des conditions physiologiques.

3.3.2. Influence de l'autoclavage

De nombreux travaux physico-chimiques ont été réalisés sur la diffusion d'espèces (hyaluronate, poly(éthylène glycol), protéines, nitrate, glycérol...) dans ou en dehors des billes d'alginate de

Alginate	Hyaluronate	Autoclavage	%HA libéré J14	Coefficient de variation (%)	%HA libéré J21	Coefficient de variation (%)	n
AA natif	HA natif	oui	14	10	17	9	6
AA natif	HA natif	non	20	10	21	7	3
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	oui	100	1	99	4	6
AA-C ₁₂ -8%	HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	non	98	3	97	4	3

Tableau 5 : Taux de HA libéré au bout de 14 et 21 jours, les mélanges étant autoclavés ou non (n et conditions définis dans le tableau 4)

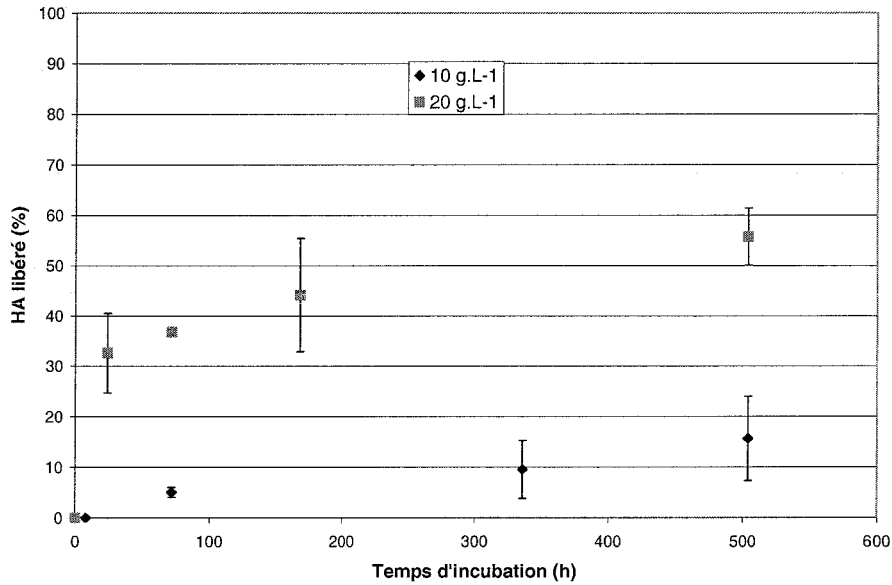


Figure 7 : Cinétique de libération du HA pour un mélange AA / HA natif à une concentration totale en polymères de 10 ou 20 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹ (37°C, milieu complet, mélanges autoclavés, proportion massique AA / HA 8 / 2 ou 16 / 4)

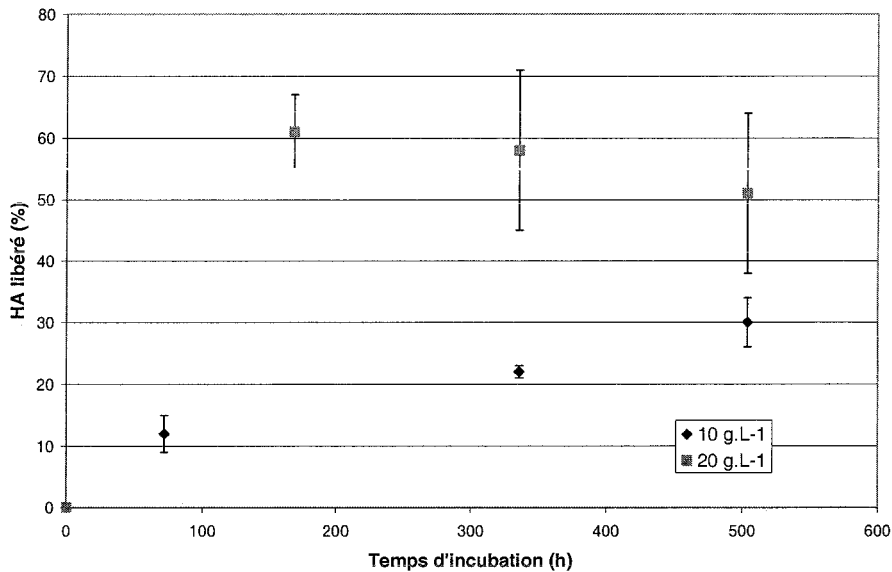


Figure 8 : Cinétique de libération du HA modifié pour un mélange AA / HA-C₁₈-1,3% (conditions décrites dans la figure 7)

calcium^{17,31,33-37} et ces études tendent à montrer que la masse molaire des espèces diffusives est un facteur important pour la cinétique de libération.

Nous avons vu que l'étape de stérilisation des composés par autoclavage est dégradante. Il est possible que la coupure des chaînes polysaccharidiques, et donc la diminution de la masse molaire du HA, accélère la cinétique de libération. C'est pourquoi une série de manipulations avec des billes obtenues à partir de mélanges autoclavés et non autoclavés a été effectuée.

Le dosage du HA libéré des billes a été réalisé à différents temps d'incubation (J0, J1, J3, J7, J14 et J21). La cinétique de libération étant très peu différente qu'il y ait ou non autoclavage, le tableau 5 donne les taux de HA libérés au bout de 14 et 21 jours, à 37°C, dans chacune de ces conditions.

Il n'y a pas d'amélioration de la rétention du HA dans les billes d'alginate de calcium dans le cas où le mélange n'est pas autoclavé. Il semble donc que la diminution de masse molaire moyenne du HA causée par la stérilisation ne soit pas suffisante pour avoir une influence sur la cinétique de libération du HA, ce qui est un avantage pour nos études qui doivent être faites, avec les cellules, en milieu stérile.

3.3.3. Influence de la concentration totale en polysaccharides

Nous avons trouvé que la quantité de HA libérée des billes d'alginate de calcium (proportion massique 16 / 4, concentration totale de 20 g.L⁻¹ en polysaccharides) au bout de 21 jours, à 37°C, dans un milieu complet surchargé en CaCl₂ 3 mmol.L⁻¹, était de 55 ± 6 % (nombre d'échantillons dosés=3).

Cette valeur semble conforme à des travaux précédents. Oerther *et coll.*^{18,26,27} ont également travaillé sur des matrices AA moyenne viscosité / HA natif ($\overline{M}_w = 10^6$ g.mol⁻¹) et ont montré que, pour une proportion massique 16 / 4, à la concentration totale de 20 g.L⁻¹ en polysaccharides, il y avait une libération de HA de l'ordre de 30% dans les 2 premières heures après la formation des billes, puis que ce taux se stabilisait à 50% pendant les 4 jours suivants. Même si ces auteurs ont utilisé un temps de réticulation au Ca²⁺ de 48 heures, le temps de gélification de 15 minutes que nous avons utilisé semble suffisant pour une gélification homogène puisque les résultats sont identiques en terme de cinétique de libération.

		J21 statique		J21 agité	
		HA ^a (%)	Coefficient de variation(%)	HA ^a (%)	Coefficient de variation(%)
AA / HA	blanc	17	9	40	6
	cellules	34	8	45	4
AA / HA-C ₁₂ -2,3%	blanc	46	10	24	1
	cellules	45	2	41	5
AA / HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -2,5%	blanc	85	4	58	5
	cellules	64	6	55	11

Tableau 6 : Taux de HA libéré des billes (° moyenne sur 5 billes), à 37°C, en fonction du mélange étudié, de la stimulation mécanique et de la présence des cellules (Mélanges autoclavés, concentration totale en polymères de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, proportion massique AA / HA 8 / 2)

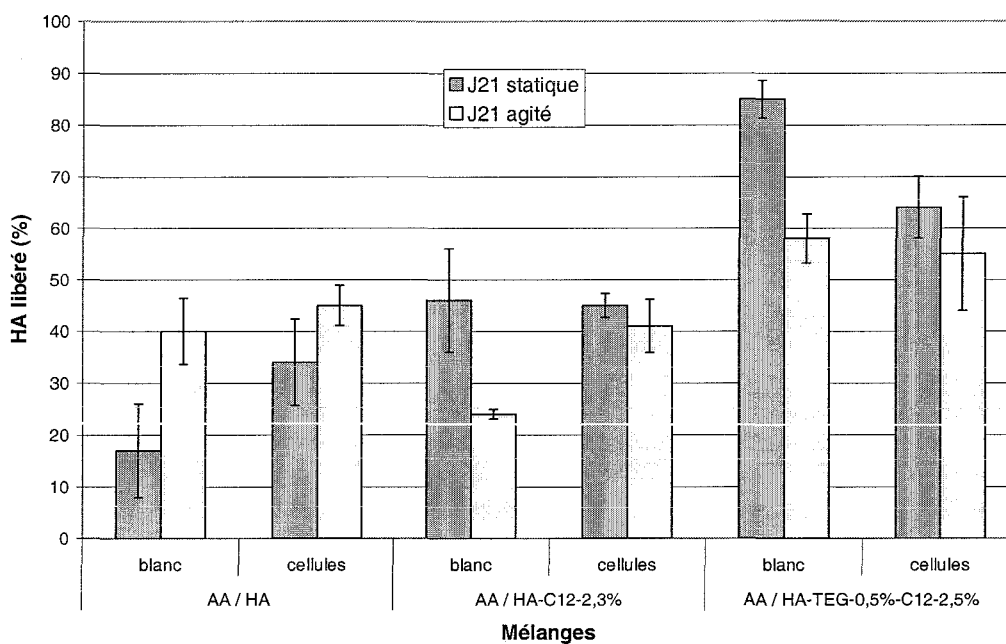


Figure 9 : Taux de HA libéré des billes (° moyenne sur 5 billes) (paramètres et conditions définis dans le tableau 6)

Lindenhayn *et coll.*²⁸ ont réalisé le même type d'étude sur 28 jours, avec des polymères de masse molaire semblable. Ils ont évalué la libération du HA à environ 60% après 28 jours pour des billes d'alginate de calcium, à la concentration totale de 23 g.L⁻¹ en polysaccharides, et enrichies en HA en proportion 3,5 / 1.

Cependant, à partir de mélanges à la concentration totale de 10 g.L⁻¹ en polysaccharides, à une proportion massique AA / HA 8 / 2, il est à noter que la quantité de HA libérée n'est seulement que de 17 ± 9 % (nombre d'échantillons dosés=6), ce qui tend à montrer l'influence importante de la concentration totale en polysaccharides sur la cinétique de libération du HA des billes.

La figure 7 représente la cinétique de libération du HA natif hors des billes d'alginate de calcium natif obtenue dans le cas de concentrations totales en polysaccharides de 10 et 20 g.L⁻¹. Cette influence de la concentration totale en polysaccharides sur la cinétique de libération du HA a également été mise en évidence pour un mélange AA natif / HA-C₁₈-1,3% (Figure 8).

La libération du HA (natif ou modifié par des chaînes alkyle) s'accélère donc lorsque la concentration en polymères augmente. Ceci peut être expliqué par le phénomène de partage du HA entre les billes et le milieu extérieur. Ainsi, plus la concentration en HA à l'intérieur des billes est élevée (concentration de 16 g.L⁻¹ comparée à 8 g.L⁻¹), plus sa tendance à quitter l'hydrogel sera marquée.

La condition de concentration totale en polysaccharides à laquelle nous avons travaillé (10 g.L⁻¹) semble plus intéressante, en ce qui concerne la rétention du HA dans les billes, qu'une concentration totale en polysaccharides de 20 g.L⁻¹, la question étant de savoir si cette proportion n'est pas trop faible pour voir un effet du HA sur les réponses biologiques.

3.3.4. Influence de la stimulation mécanique et de la présence des cellules

Le tableau 6 et la figure 9 regroupent les valeurs des taux de HA libérés hors des billes, 21 jours après leur fabrication, pour les différents mélanges étudiés, à 37°C, dans le milieu complet, en fonction de la stimulation mécanique et de la présence des cellules.

A J21, pour des billes ne contenant pas de cellules (blanc), nous voyons que la stimulation mécanique a une influence différente sur la quantité de HA libérée selon le mélange. En effet, pour

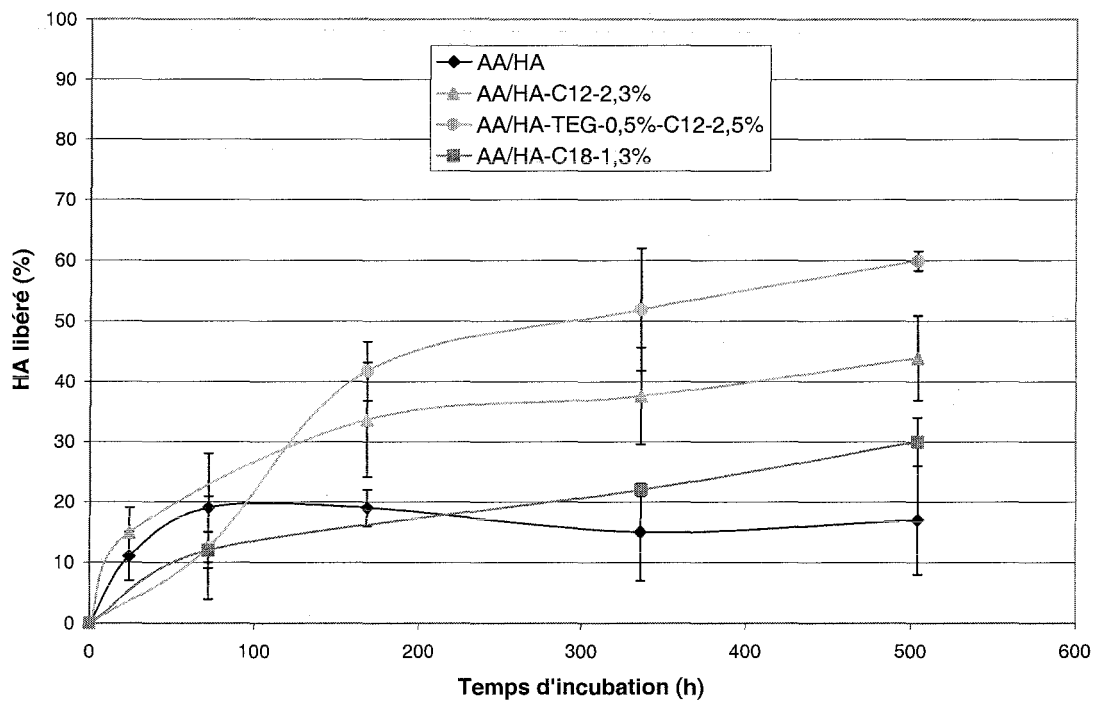


Figure 10 : Cinétique de libération de différents HA des billes d'alginate de calcium (37°C, milieu complet, mélanges autoclavés, concentration totale en polymères de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, proportion massique AA / HA 8 / 2, sans cellules, en mode statique)

un mélange AA / HA natif, il y a augmentation du taux de HA libéré lors de l'agitation, alors que, pour les mélanges AA / HA modifié, on observe une diminution. En revanche, en présence de cellules, il semble que la stimulation mécanique n'a que peu d'influence sur le taux de HA libéré.

La présence des cellules est importante pour une meilleure rétention du HA dans les billes. En effet, il est connu que le hyaluronate se lie aux cellules, comme les chondrocytes, par différents récepteurs (CD44, RHAMM, ICAM-1)³⁸⁻⁴⁰. Le CD44 a été identifié comme une glycoprotéine exprimée par les chondrocytes qui fonctionne comme un récepteur de l'acide hyaluronique à la surface des cellules de chondrocytes⁴¹. Il est donc compréhensible que la présence des chondrocytes dans les billes augmente la rétention du hyaluronate. Cependant, pour le dérivé doublement modifié, cette hypothèse ne semble pas vérifiée : cela suggère que l'affinité pour les récepteurs est moins grande pour ce dérivé.

3.3.5. Influence du type de hyaluronate utilisé

Des mélanges AA / HA natif, AA / HA modifié par des chaînes alkyle en C₁₂ et C₁₈, AA / HA doublement modifié ont été réalisés afin de déterminer l'influence de la modification du HA sur la cinétique de libération.

La figure 10 représente la cinétique de libération de différents HA hors des billes d'alginate de calcium natif, en absence de cellules, en mode statique. Nous pouvons constater que la cinétique de libération du HA hors des billes d'alginate de calcium est différente selon le type de HA utilisé. Il semble que plus le HA est modifié, plus sa cinétique de diffusion hors des billes d'alginate de calcium est rapide.

En effet, il reste, au bout de 21 jours, à 37°C, dans le milieu complet surchargé en CaCl₂ 3 mmol.L⁻¹:

- 80% de HA natif dans les billes,
- 70% de HA-C₁₈-1,3%,
- 55% de HA-C₁₂-2,3%,
- 40% de HA-TEG-0,5%-C₁₂-2,5%.

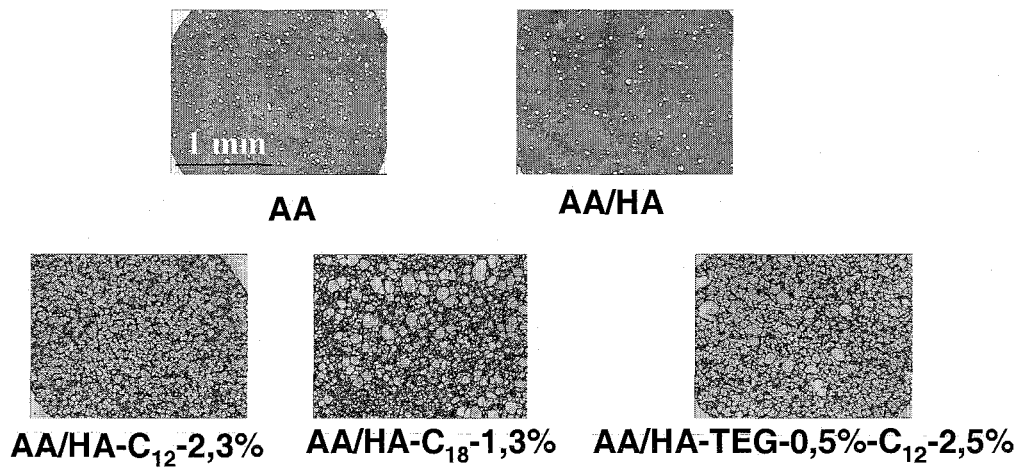


Figure 11 : Images microscopiques des différents types de billes fixées et colorées au bleu de toluidine (grossissement X4)

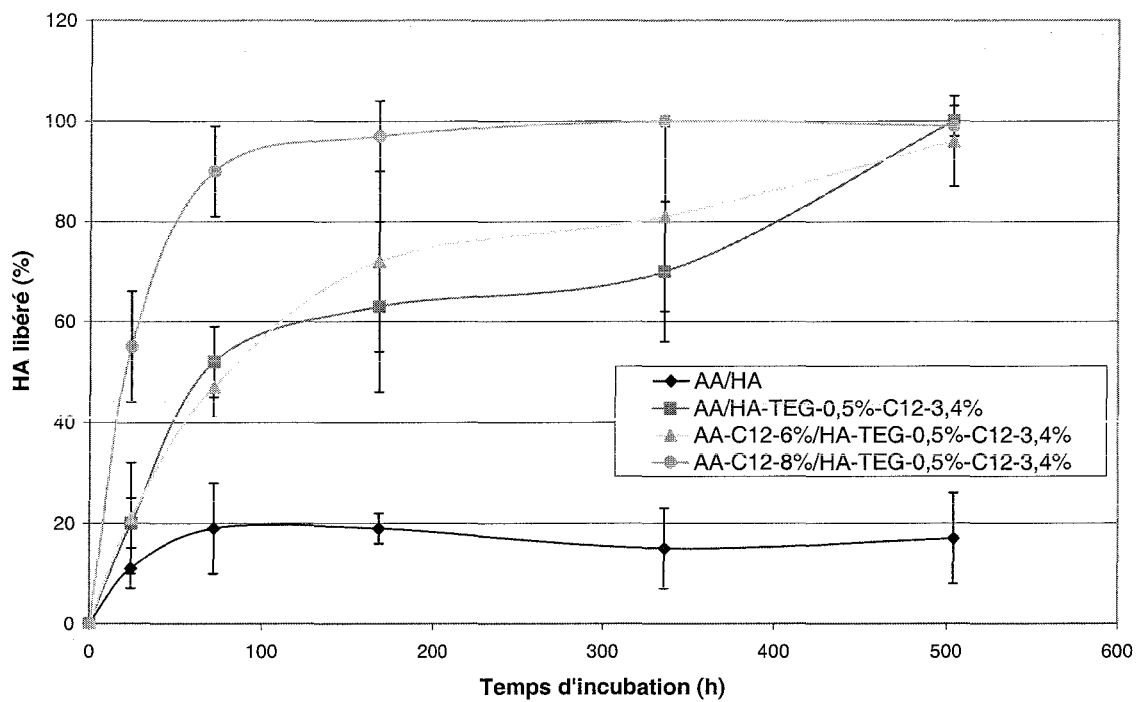


Figure 12 : Cinétique de libération d'un HA modifié des billes de différents alginates de calcium (conditions définies sur la figure 10)

Le taux de HA libéré obtenu pour un mélange AA natif / HA natif semble surprenant par rapport aux résultats obtenus lors d'autres travaux^{18,26-28}, mais nous avons déjà parlé de l'effet « concentration totale en polysaccharides » sur la cinétique de libération du HA.

L'observation structurale par microscopie optique des billes issues de ces différents mélanges peut donner une explication à ce phénomène. La figure 11 montre les structures des différents types de billes observées par microscopie optique, après coloration au bleu de toluidine, le grossissement étant de 4.

Nous constatons que les billes composées d'AA / HA simplement ou doublement modifié sont constituées de réseaux plus lâches que ceux obtenus pour des billes d'AA et d'AA / HA natif.

D'après des observations en microscopie électronique à transmission de leurs billes, Oerther *et coll.*¹⁸ ont montré également des différences au niveau du réseau obtenu. L'introduction du HA tend à rendre le réseau alginique plus lâche et, plus la masse molaire du HA est importante, plus la trame du gel devient lâche.

Ces constatations d'ordre structural expliqueraient :

- la libération plus rapide des HA modifiés par des chaînes alkyle par rapport au HA natif, compte tenu du fait que la trame du réseau est plus lâche dans le cas d'un HA amphiphile,
- la libération plus rapide du HA doublement modifié par rapport à un HA modifié uniquement par des chaînes alkyle : la masse molaire élevée du HA-TEG-0,5%-C₁₂-2,5% entraîne la formation d'un réseau encore plus lâche que dans le cas du HA-C₁₂-2,3%, et donc une accélération dans la cinétique de libération.

3.3.6. Influence du type d'alginate utilisé

Des mélanges à partir d'AA (natif ou amphiphiles) / HA modifié ont été réalisés. Pour améliorer la rétention du HA dans les billes d'alginate de calcium, nous avons envisagé de favoriser les associations hydrophobes intermoléculaires entre les chaînes alkyle d'un AA amphiphile et celles d'un HA modifié.

La figure 12 représente la cinétique de libération d'un HA doublement modifié (HA-TEG-0,5%-C₁₂-3,4%) hors des billes de différents AA, en absence de cellules, en mode statique.

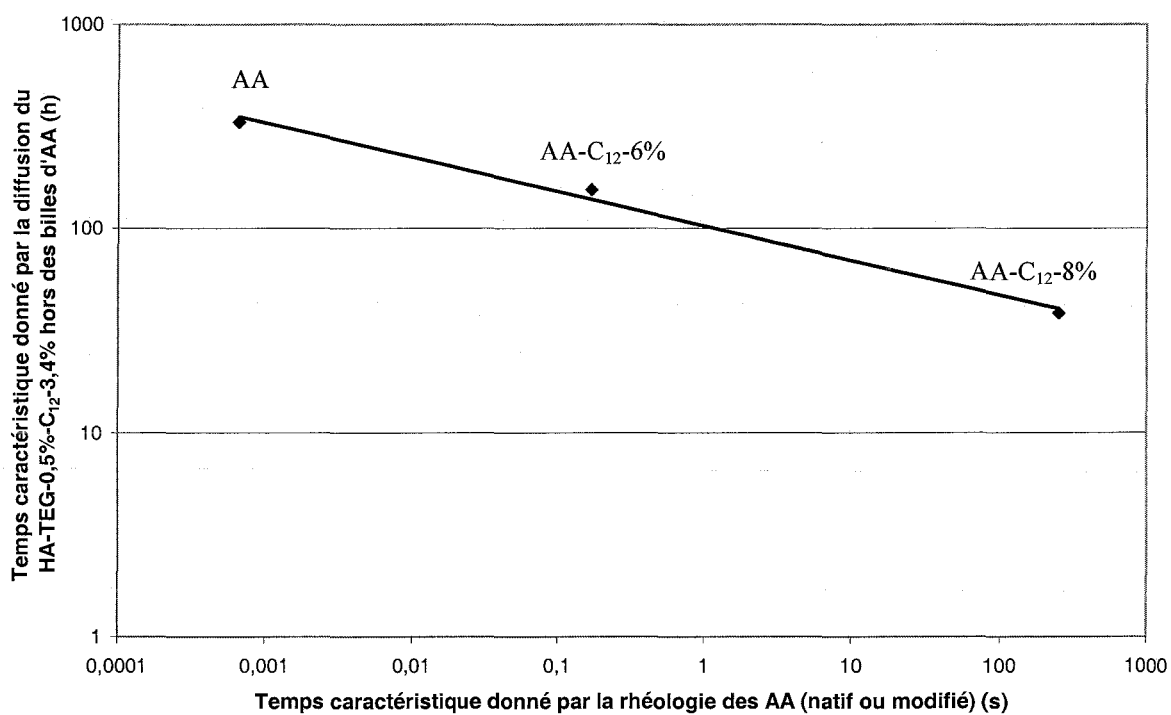


Figure 13 : Corrélation entre propriétés rhéologiques des AA et diffusion du HA-TEG-0,5%-C₁₂-3,4% hors des billes (37°C, mélanges autoclavés, concentration totale en polymères de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, proportion massique AA / HA 8 / 2)

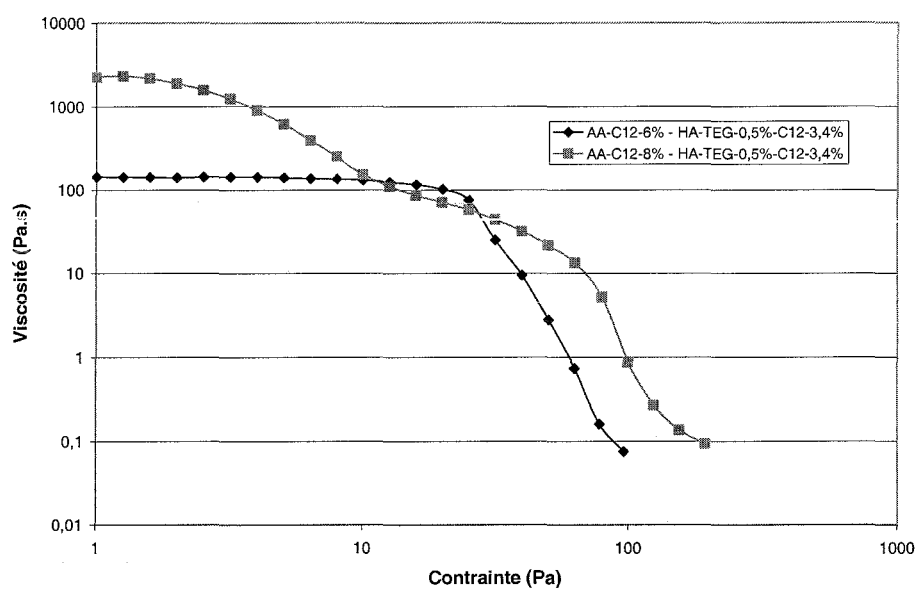


Figure 14 : Viscosité en fonction de la contrainte pour deux des mélanges étudiés (conditions décrites sur la figure 13)

Nous pouvons voir l'importance de la modification de l'AA utilisé lors des mélanges sur la cinétique de libération d'un même HA. Contrairement à nos attentes, la cinétique de libération du HA modifié est beaucoup plus rapide pour des billes d'AA à 8% en C₁₂ que pour des billes d'AA natif. Il en est de même pour le HA-TEG-1,5%-C₁₂-2,5%, dont les résultats de cinétique de libération ne sont pas montrés. La libération du HA modifié est totale au bout de 21 jours pour tous les mélanges et seul le mélange AA natif / HA natif permet une bonne rétention du HA.

3.3.6.1. Hypothèse basée sur la rhéologie

La vitesse de libération des HA peut être liée aux propriétés rhéologiques des différents AA ou des mélanges obtenus.

Dans un premier temps, nous avons pu établir une certaine corrélation entre les propriétés rhéologiques des AA modifiés et la diffusion du HA-TEG-0,5%-C₁₂-3,4%.

Nous avons, d'une part, défini le temps caractéristique donné par la diffusion comme le temps au bout duquel le taux de HA libéré atteint 70% (cette valeur respecte la monotonie de toutes les courbes de diffusion obtenues). Nous avons, d'autre part, défini le temps caractéristique donné par la rhéologie des alginates (natif ou modifié) comme l'inverse de la vitesse de cisaillement critique, qui est elle-même le rapport de la contrainte critique à la viscosité au 1^{er} plateau newtonien.

Nous avons alors tracé le temps caractéristique donné par la diffusion du HA-TEG-0,5%-C₁₂-3,4% en fonction du temps donné par la rhéologie des AA modifiés (Figure 13) et nous voyons clairement une corrélation entre les propriétés rhéologiques des AA modifiés et la diffusion du HA doublement modifié : le temps de relaxation des chaînes augmente avec le taux de substitution du AA et la cinétique de libération du HA modifié s'accélère avec ce même paramètre.

D'autre part, il semble que l'AA modifié et le HA doublement modifié forment en mélange des réseaux individuels non-interpénétrés.

En effet, si nous nous reportons aux résultats du tableau 3 et si nous étudions les courbes d'écoulement associées (viscosité en fonction de la contrainte), nous pouvons constater que, pour les mélanges mettant en jeu l'AA modifié à 8% en chaînes C₁₂, il y a existence de deux plateaux pour cette courbe, alors que, pour les mélanges utilisant l'AA natif ou modifié à 6% en C₁₂, il n'y a présence que d'un seul plateau (Figure 14).

Dans chaque cas, nous avons pu calculer la vitesse de cisaillement critique qui se définit comme le rapport de la contrainte critique à la viscosité au plateau ; ces résultats sont regroupés dans le tableau 7.

	Nombre de plateau(x)	Vitesse de cisaillement critique(s ⁻¹)	
		1er plateau	2ème plateau
AA-C ₁₂ -6%	1	14	
AA-C ₁₂ -8%	1	3.10 ⁻³	
HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4%	1	46	
HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5%	1	14	
AA-C ₁₂ -6% / HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4% 8/2	1	0,1	
AA-C ₁₂ -6% / HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5% 8/2	1	0,1	
AA-C ₁₂ -8% / HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4% 8/2	2	1,5.10 ⁻³	1
AA-C ₁₂ -8% / HA-TEG-0,5%-C ₁₂ -3,4% 6/4	2	3.10 ⁻³	2,3
AA-C ₁₂ -8% / HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5% 8/2	2	1,5.10 ⁻³	1,5
AA-C ₁₂ -8% / HA-TEG-1,5%-C ₁₂ -2,5% 6/4	2	3.10 ⁻³	1,5

Tableau 7 : Vitesse de cisaillement critique calculée pour les mélanges utilisés (37°C, mélanges autoclavés, concentration totale en polymère de 10 g.L⁻¹ dans NaCl 0,15 mol.L⁻¹, proportion massique AA / HA 8 / 2, 7 / 3 et 6 / 4)

Dans le cas de l'existence de deux plateaux, la valeur de la vitesse de cisaillement critique correspondant au premier plateau est du même ordre de grandeur que celle du plateau de l'AA modifié étudié de manière isolée. Celle correspondant au deuxième plateau est du même ordre de grandeur que celle du plateau du HA modifié seul. En revanche, pour les mélanges mettant en jeu l'AA-C₁₂-6%, la valeur de vitesse de cisaillement critique trouvée est intermédiaire entre celles des deux constituants du mélange.

Ainsi, bien que macroscopiquement compatibles, les réseaux formés par un AA-C₁₂-8% et un HA doublement modifié semblent se comporter comme des réseaux individuels non-interpénétrés : les interactions hydrophobes se font uniquement entre les chaînes portées par un même polysaccharide. Cela semble vouloir dire que l'on ne peut pas augmenter la rétention du HA dans les billes d'AA en créant des associations hydrophobes intermoléculaires entre les chaînes alkyle d'un AA amphiphile et celles d'un HA amphiphile, raison initiale des études des mélanges AA amphiphile / HA modifié.

3.3.6.2. Hypothèse basée sur la structure des hydrogels

Une explication complémentaire peut être trouvée dans les travaux de Rastello-De Boissesson *et coll.*^{17,42}. En effet, lors de la détermination des coefficients de partage de pullulanes de masses molaires variées entre des billes millimétriques de différents AA (natif ou amphiphile) et le milieu extérieur, ces auteurs se sont rendu compte que les coefficients de partage de tous les pullulanes obtenus avec les AA modifiés étaient toujours supérieurs à ceux de l'AA natif, ce qui tendait à montrer que le pullulane rentrait plus facilement dans les billes d'AA modifié que dans celles d'AA natif. Ce phénomène a été interprété par le fait que le réseau était plus lâche dans les AA modifiés que dans l'AA natif. Les auteurs ont aussi constaté que plus l'AA était substitué en chaînes alkyle, plus ce réseau était lâche.

La présence de chaînes hydrophobes affecte donc les propriétés physico-chimiques de l'hydrogel résultant. Ceci peut s'expliquer par un effet antagoniste entre les interactions hydrophobes et la fixation des ions Ca²⁺, l'immobilisation de chaînes hydrophobes sur le squelette de l'AA, même en proportion relativement faible, perturbant la structure dite en « boîte à œufs » du réseau tridimensionnel d'alginate de calcium qui se forme lors de l'addition de CaCl₂.

Ainsi, nous pouvons nous attendre à ce que l'AA natif montre une capacité plus grande à retenir des molécules de masse molaire plus élevée, dans notre cas le HA, par rapport aux AA modifiés.

3.4. Conclusion

A l'aide de travaux antérieurs^{31,43}, nous savions déjà que la cinétique de libération du HA hors des billes d'AA dépendait de certains facteurs tels que :

- la masse molaire de l'AA utilisé, sa structure séquentielle (rapport M/G), sa concentration ainsi que le protocole de préparation des billes, ces facteurs influençant la densité des billes formées,
- la masse molaire du HA et sa concentration.

Cette étude de cinétique de libération du HA vers le milieu extérieur a mis en évidence un certain nombre d'autres paramètres pouvant influencer sur cette libération. Parmi les plus importants, nous pouvons citer :

- la concentration totale en polysaccharides choisie pour la fabrication des billes,
- le type de HA, modifié ou non,
- le type d'AA, modifié ou non.

Le changement de structure des billes a été le problème majeur rencontré lors de cette étude. D'une part, lors de la préparation des billes d'AA enrichies en HA natif, nous avons constaté que la trame du réseau était plus lâche que dans les cas des billes d'AA natif. D'autre part, la masse molaire du HA doublement modifié est plus élevée que celle du HA-C₁₂-2,3%, ce qui peut entraîner la formation d'un réseau encore plus lâche. On peut donc supposer que l'accélération de la cinétique de libération des HA modifiés, par rapport à celle du HA, résulte en partie de la modification de la nature du réseau de l'hydrogel.

Ainsi, les modifications chimiques apportées au HA ne permettent pas d'augmenter la rétention de celui-ci dans les billes. Au contraire, la double modification a un effet négatif sur la quantité de HA maintenue par rapport à un HA natif.

Cependant, les résultats obtenus avec des billes d'AA natif nous ont encouragés à poursuivre nos investigations sur la viabilité des chondrocytes, sur leur prolifération et sur la synthèse des constituants du cartilage, en présence de HA modifié, et notamment à étudier l'influence d'un HA natif, d'un HA modifié par des chaînes hydrophobes et d'un HA doublement modifié, sur les réponses biologiques données par les chondrocytes.

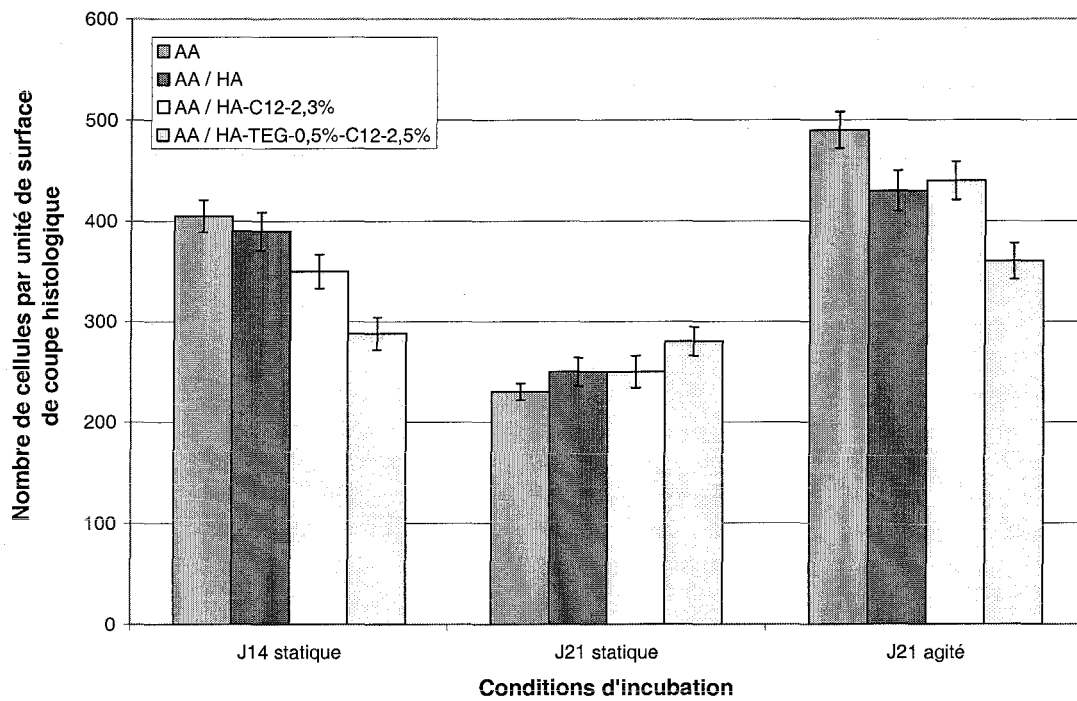


Figure 15 : Evaluation du nombre de cellules par unité de surface de coupe histologique des différentes billes, en fonction du type de matrice et des conditions d'incubation (nombre de comptages = 5)

4. ETUDE DE LA CYTOCOMPATIBILITE

4.1. Evaluation du nombre de cellules présentes dans les billes

La première étude a consisté à évaluer le nombre de cellules contenues dans les billes grâce aux coupes histologiques colorées en HES (§2.6.4). La figure 15 représente le nombre de cellules par unité de surface présentes pour chaque type de matrice et pour chaque condition d'incubation (temps et mode d'agitation).

A une condition d'incubation donnée (temps et mode d'agitation), il semble en général que le nombre de cellules est plus important pour les billes d'AA natif et que plus le HA est modifié, plus le nombre de cellules diminue, exception faite de la condition J21 statique où le nombre de cellules est quasiment identique pour toutes les matrices. Une explication possible est le changement de porosité dû à la présence du HA dans les billes d'AA.

Nous avons remarqué que, la concentration en AA étant moindre dans les cas des mélanges AA / HA que dans celui des billes d'AA seul, la densité du réseau obtenu lors de la gélification avec des ions calcium est donc plus faible, ce qui peut expliquer ces différences¹⁶.

Nous pouvons également constater une diminution du nombre de cellules présentes dans les billes entre les temps d'incubation J14 et J21. Cette perte cellulaire a déjà été observée par Oerther *et coll.*¹⁸, Pelletier *et coll.*¹⁶, et peut être expliquée par la structure du réseau polysaccharidique.

Nous voyons une augmentation du nombre de cellules entre le mode statique et le mode agité. La stimulation mécanique semble avoir un effet positif sur le nombre de cellules présentes dans les billes, ce qui est en accord avec les résultats de Gigant-Huselstein *et coll.*¹⁵ dont nous allons discuter dans le paragraphe 4.3.

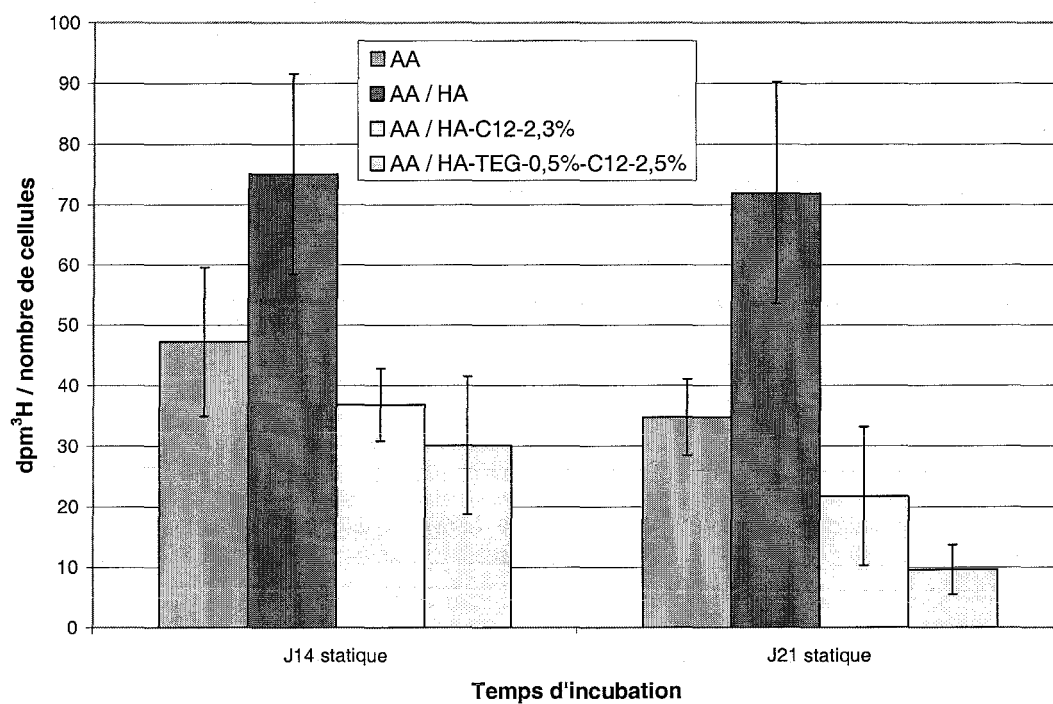


Figure 16 : Evolution du rapport dpm^3H / nombre de cellules par bille en fonction du type de matrice et du temps d'incubation (nombre d'échantillons = 10)

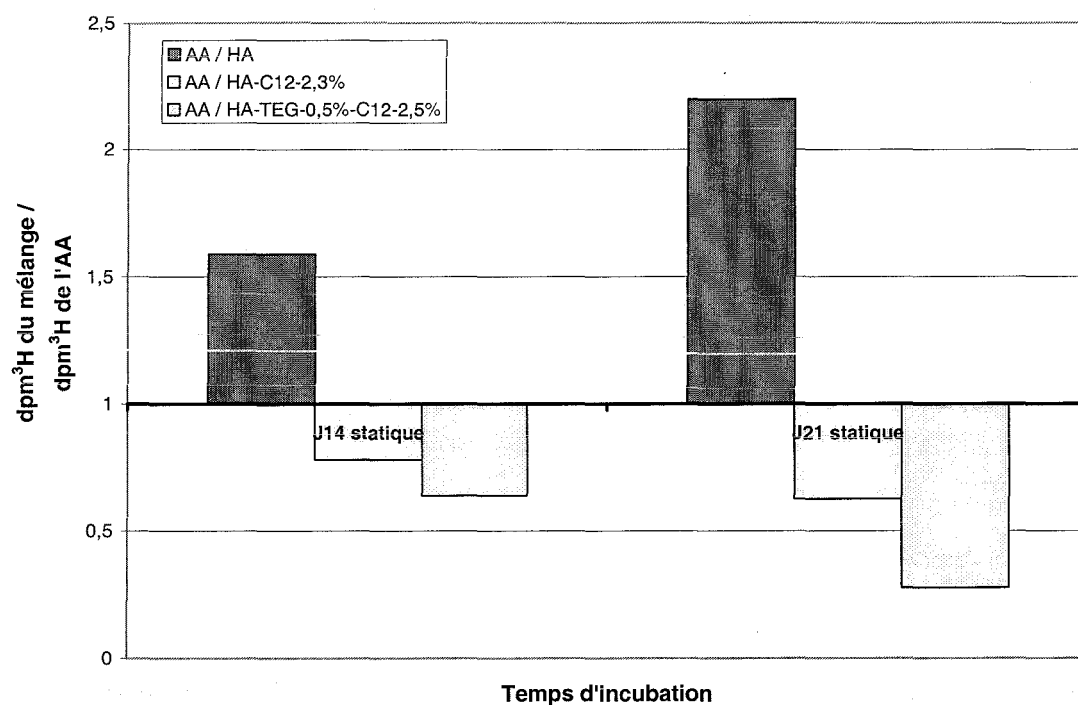


Figure 17 : Evolution du rapport $dpm^3H(\text{mélange}) / dpm^3H(\text{aginate})$ en fonction du type de matrice et du temps d'incubation

4.2. Influence de la présence de HA sur les synthèses d'ADN et de protéoglycanes

4.2.1. Influence de la présence de HA sur la prolifération cellulaire

La figure 16 présente l'évolution de thymidine incorporée par les cellules (dpm^3H) par rapport au nombre de cellules présentes dans les billes, en fonction du type de matrice et du temps d'incubation. Ce phénomène est suivi sur une durée de 24 heures.

Pour chaque type de matrice, il y a une très légère diminution de la prolifération cellulaire entre les temps J14 et J21 en mode statique, même si cette différence est peu significative. Il semblerait que ces phases de diminution et d'augmentation successives dans la prolifération cellulaire soient relativement connues^{16,18,28}. Elles traduisent une alternance de l'activité cellulaire dans les matrices, les cellules ayant des phases de prolifération suivies de phases de synthèse matricielle. En effet, lorsque les chondrocytes prolifèrent, ils synthétisent très peu et inversement.

Pour différents temps d'incubation, le profil d'évolution de la prolifération cellulaire en fonction du type de matrice est identique. Nous avons tracé le rapport de la prolifération cellulaire des mélanges à celle de l'AA seul, en fonction du type de matrice : ce rapport n'est autre que le rapport des dpm^3H des mélanges au dpm^3H de l'AA (Figure 17).

Au vu de cette figure 17, il semblerait que, dans le cas de cultures tridimensionnelles, la présence de HA augmente la prolifération cellulaire. Au contraire, dans les matrices enrichies en HA modifié (simple ou double modification), l'activité cellulaire se traduit par une prolifération modérée, inférieure à la prolifération obtenue avec de l'AA seul.

Les résultats obtenus avec des matrices enrichies en HA natif et HA modifiés par des chaînes alkyle sont en accord avec ceux obtenus par Oerther *et coll.*¹⁸, Miralles *et coll.*²⁵, Pelletier *et coll.*¹⁶ et Gigant-Huselstein *et coll.*¹⁵.

Ces résultats de prolifération cellulaire confirment d'autres travaux antérieurs où il est décrit que le HA a un effet stimulant sur l'activité de synthèse d'ADN^{44,45}. En effet, en se fixant sur les chondrocytes via des récepteurs spécifiques (CD44), le HA activerait un phénomène de transduction du signal, conduisant à une activation de prolifération cellulaire⁴⁶.

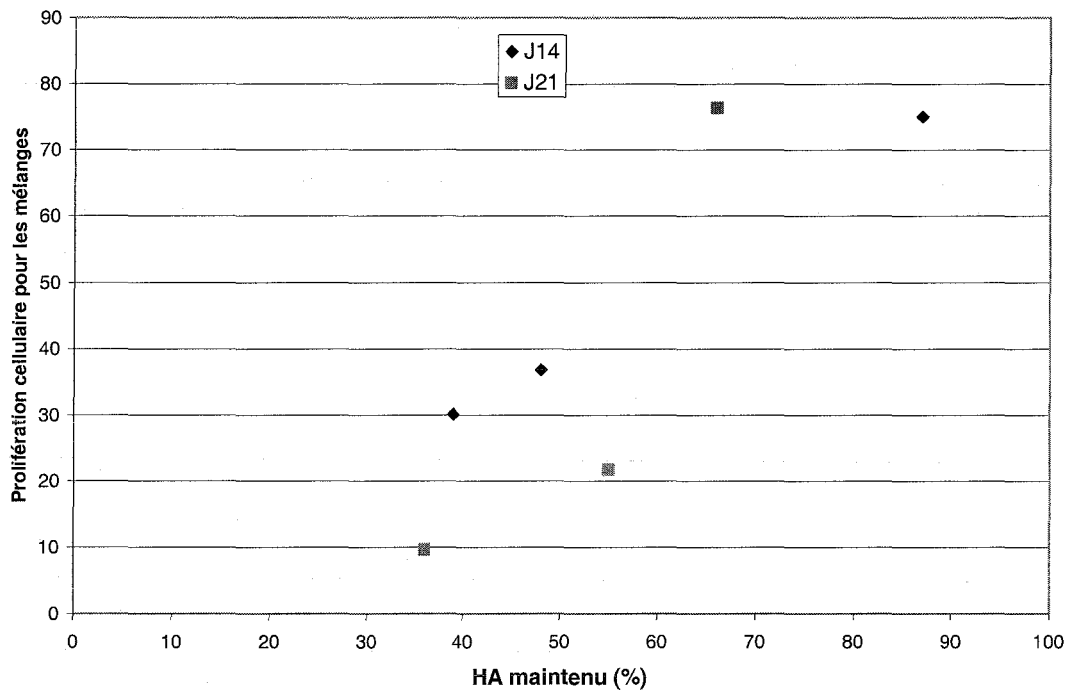


Figure 18 : Corrélation entre prolifération cellulaire et taux de hyaluronate maintenu à l'intérieur des billes

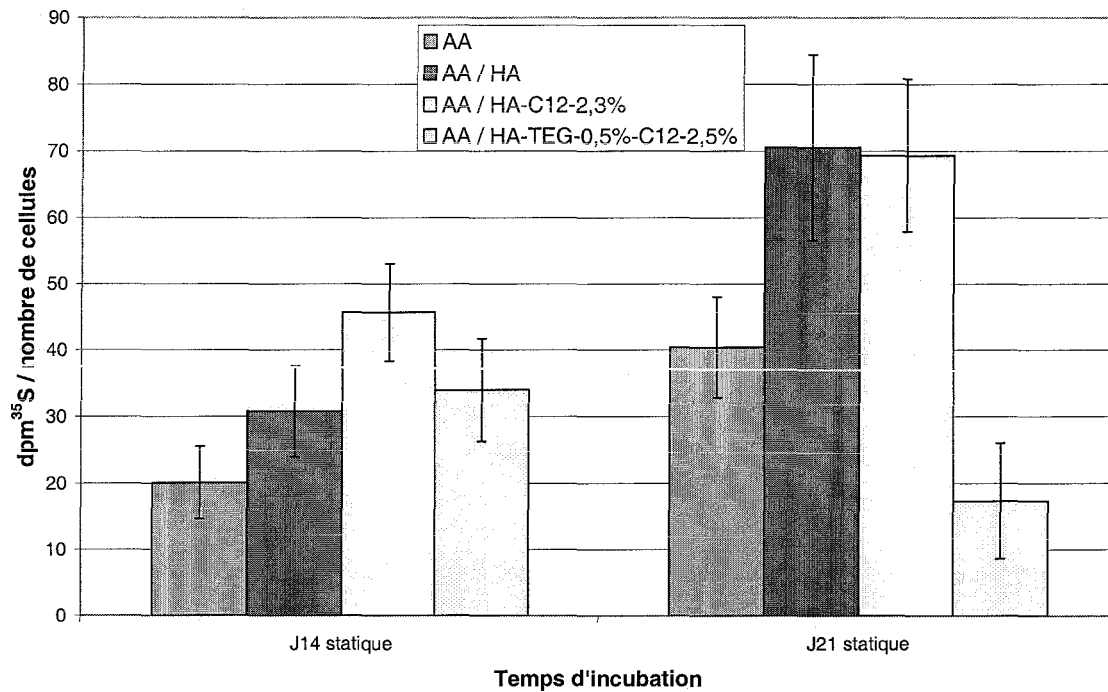


Figure 19 : Evolution du rapport $dpm^{35}S$ / nombre de cellules par bille en fonction du type de matrice et du temps d'incubation

En ce qui concerne l'inhibition de la prolifération cellulaire par les HA modifiés, une hypothèse donnée par Gigant-Huselstein *et coll.*¹⁵ consiste à évoquer un effet de masquage entraîné par la présence de HA modifié autour des cellules, ce qui réduirait leur activité métabolique.

Ce phénomène peut également être expliqué par la quantité de HA-C₁₂-2,3% et HA-TEG-0,5%-C₁₂-2,5% maintenue dans les billes à ces temps d'incubation. En effet, si l'on trace la variation de la prolifération cellulaire en fonction du taux de HA modifié maintenu dans les billes, il est clair que ces deux paramètres sont corrélés (Figure 18) ; on peut en conclure que, si le HA a un effet favorable sur la prolifération cellulaire, le fait que la concentration des HA modifiés dans les billes diminue fortement avec le temps, peut expliquer le moindre effet sur la prolifération par rapport au HA natif.

4.2.2. Influence de la présence de HA sur la synthèse des protéoglycanes

La figure 19 présente l'évolution de la quantité de soufre incorporée dans les billes (dpm³⁵S) par rapport au nombre de cellules présentes, en fonction du type de matrice et du temps d'incubation. Cette incorporation de soufre renseigne sur le métabolisme, c'est-à-dire sur la synthèse des protéoglycanes par les chondrocytes.

Nous constatons une augmentation de la synthèse des protéoglycanes entre les temps J14 et J21, ce qui est conforme à la balance synthèse/prolifération observée pour les chondrocytes. Lorsque la prolifération cellulaire diminue entre les temps J14 et J21, les chondrocytes sont en phase de synthèse matricielle.

Pour différents temps d'incubation, le profil d'évolution de la synthèse des protéoglycanes en fonction du type de matrice est pratiquement identique. Nous avons tracé le rapport des dpm³⁵S des mélanges au dpm³⁵S de l'AA seul en fonction du temps d'incubation (Figure 20).

La présence de HA et de HA modifié par des chaînes alkyle semble augmenter la synthèse des protéoglycanes, alors que, dans les matrices enrichies en HA doublement modifié, la synthèse de protéoglycanes est plus faible que celle observée pour les autres matrices.

Ces résultats concernant le HA natif et le HA amphiphile sont cohérents avec les résultats trouvés par Oerther *et coll.*¹⁸, Pelletier *et coll.*¹⁶ et Miralles *et coll.*²⁵, Gigant-Huselstein *et coll.*¹⁵.

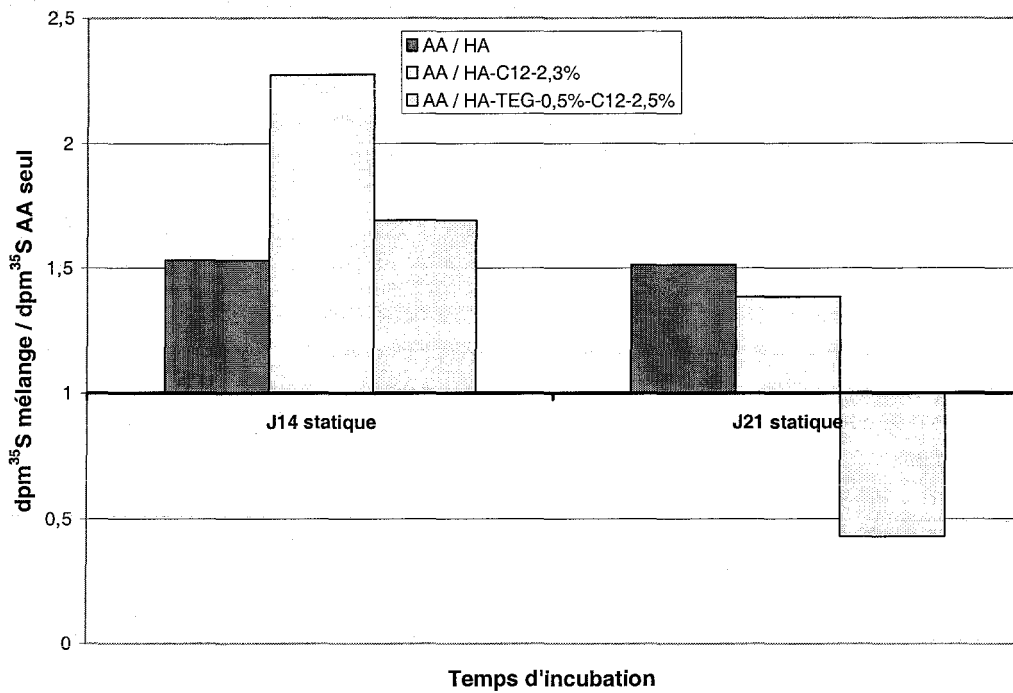


Figure 20 : Evolution du rapport $dpm^{35}S$ (mélange) / $dpm^{35}S$ (aginate) en fonction du type de matrice et du temps d'incubation

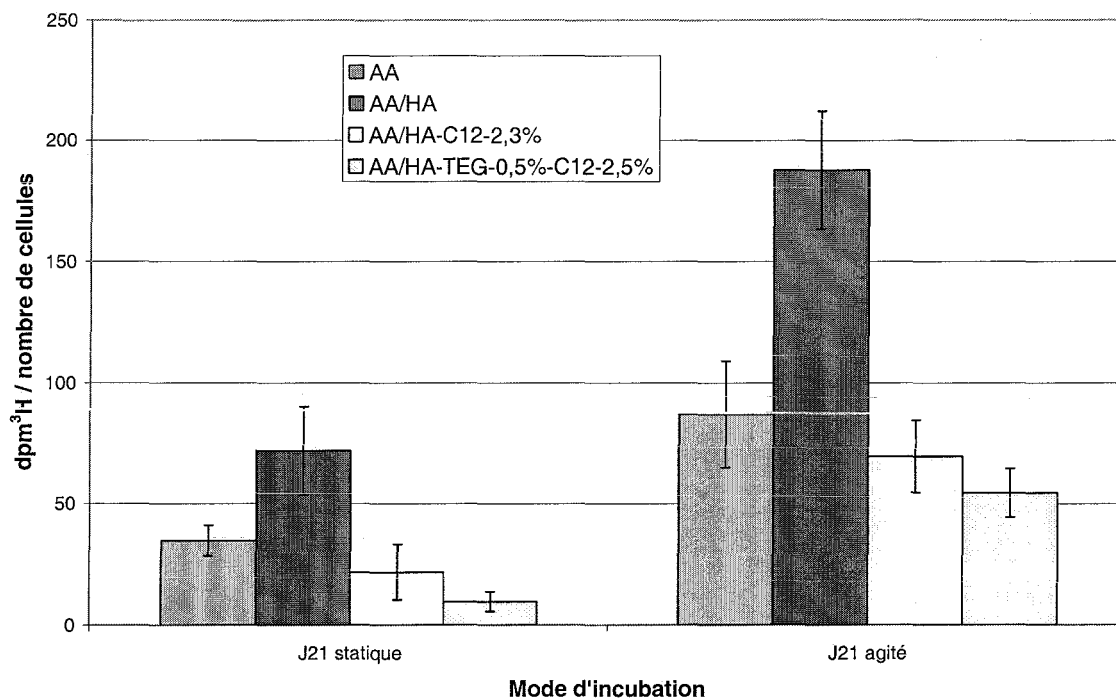


Figure 21 : Evolution du rapport dpm^3H / nombre de cellules par bille en fonction du type de matrice et du mode d'incubation (nombre d'échantillons = 10)

Il a déjà été montré que l'addition de HA dans les billes d'AA augmentait la taille du réseau poreux et que ce relâchement du réseau pouvait ménager un espace plus important favorisant la diffusion des nutriments à l'intérieur des billes et une synthèse accrue de la matrice extracellulaire¹⁸.

En outre, Kawasaki *et coll.* ont montré que l'addition de HA dans des gels tridimensionnels de collagène stimulait la synthèse de chondroïtines sulfates, composant essentiel des protéoglycanes⁴⁵.

En ce qui concerne l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes pour le HA doublement modifié, l'hypothèse donnée par Gigant-Huselstein *et coll.*¹⁵, évoquant l'effet de masquage entraîné par la présence de HA modifié autour des cellules, semble valable.

Il est possible également que la faible quantité de HA-TEG-0,5%-C₁₂-2,5% maintenue dans les billes par rapport à celle maintenue pour les autres HA explique ce phénomène.

Une étude qualitative du type de chondroïtines présentes dans les matrices nous a permis de constater la présence de chondroïtines sulfates C0S, pour toutes les matrices. En revanche, la présence des chondroïtines sulfates C4S n'est visible que pour les billes d'AA natif. Ces résultats sont bien évidemment à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons.

4.3. Influence de la stimulation mécanique sur les synthèses d'ADN et de protéoglycanes

4.3.1. Influence de la stimulation mécanique sur la prolifération cellulaire

La figure 21 présente l'évolution de thymidine incorporée par les cellules par rapport au nombre de cellules présentes dans les billes, en fonction du type de matrice et du mode d'incubation.

Pour le temps d'incubation choisi, nous constatons que la stimulation mécanique a un effet positif sur la prolifération cellulaire pour toutes les matrices : la prolifération cellulaire va être multipliée selon les cas par un facteur de 3 à 6.

Cette augmentation est en accord avec l'étude de Gigant-Huselstein *et coll.*^{15,19} qui a établi que la contrainte mécanique appliquée sur les biomatériaux à travers une agitation augmentait la prolifération cellulaire. Ces résultats obtenus sous entrechoquement se rapprochent de ceux décrits

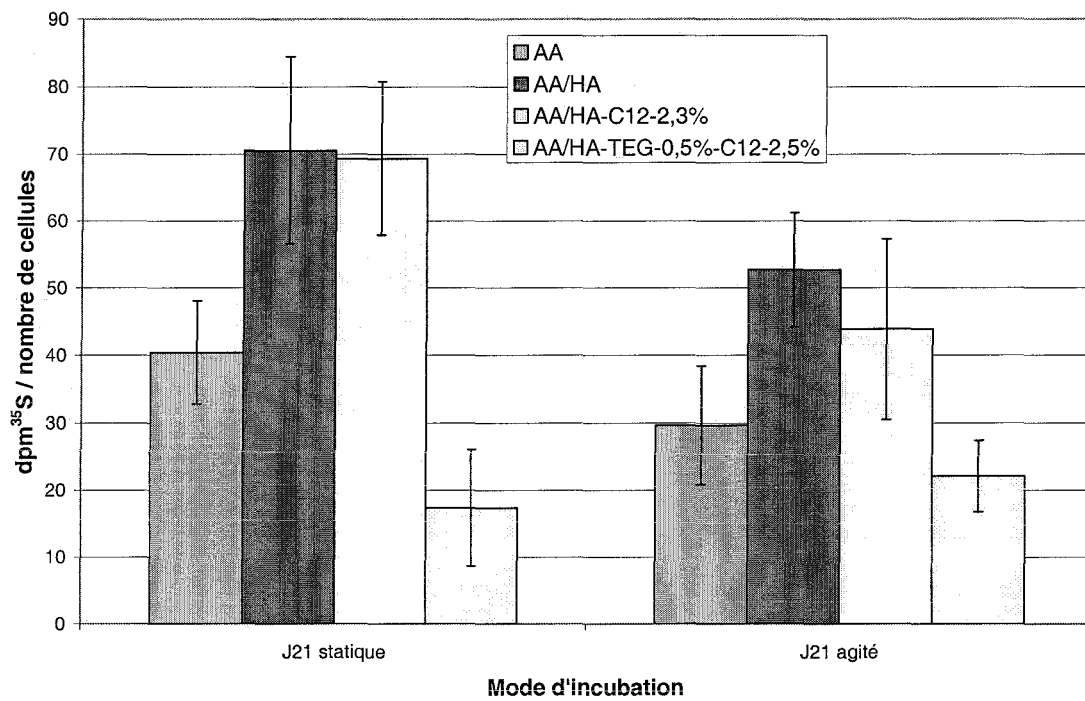


Figure 22 : Evolution du rapport $dpm^{35}S$ / nombre de cellules par bille en fonction du type de matrice et du mode d'incubation (nombre d'échantillons = 10)

lors de compression dynamique^{47,48} ou de ceux observés dans les bioréacteurs qui prennent en compte les facteurs mécaniques⁴⁹.

La différence essentielle entre notre étude et celle de Gigant-Huselstein *et coll.*^{15,19} concerne les facteurs de cette augmentation de la prolifération cellulaire. En effet, dans le cas de l'étude de Gigant-Huselstein, ce facteur de multiplication peut atteindre 144, alors que le maximum de ce facteur pour notre étude ne s'élève qu'à 6.

Il se trouve que Gigant-Huselstein *et coll.* ont utilisé des chondrocytes articulaires, avec une densité cellulaire plus faible (1/3 de moins que notre étude)^{15,19}.

Une autre hypothèse pouvant expliquer cette différence est la concentration totale en polysaccharides utilisée lors de la préparation des billes dans ces deux études : pour notre étude, ce paramètre est de 10 g.L⁻¹, alors qu'il est de 20 g.L⁻¹ pour Gigant-Huselstein. Une des perspectives de ce travail pourrait consister à vérifier l'influence de la concentration totale en polymères sur les réponses biologiques des chondrocytes, et notamment l'importance de l'agent structurant, l'alginate, au sein de la matrice.

4.3.2. Influence de la stimulation mécanique sur la synthèse de protéoglycanes

La figure 22 présente l'évolution de la quantité de soufre incorporée dans les billes par rapport au nombre de cellules présentes, en fonction du type de matrice et du mode d'incubation.

Pour le temps d'incubation choisi, nous constatons que la stimulation mécanique n'a pas un effet considérable sur la synthèse des protéoglycanes pour toutes les matrices.

Ce résultat n'est pas totalement en accord avec l'étude de Gigant-Huselstein *et coll.*^{15,19} qui a établi que la contrainte mécanique appliquée sur les biomatériaux à travers une agitation avait un effet modéré sur la synthèse des protéoglycanes. Il semble que la présence d'impacts ponctuels associé à un flux pour des constructions tridimensionnelles permet une augmentation significative de l'activité de synthèse des protéoglycanes^{6,48}.

Comme lors de l'étude de l'influence de la stimulation mécanique sur la prolifération cellulaire, l'utilisation de chondrocytes articulaires à une densité cellulaire plus faible (1/3 de moins que notre étude) peut expliquer ces différences de résultats^{15,19}. La concentration totale en

polysaccharides peut également expliquer ce phénomène inverse, mais de plus amples études doivent être réalisées.

Une autre hypothèse concerne la différence du nombre de cellules présentes dans les billes, selon le type de HA inclus. Les cellules, présentes à un nombre inférieur dans les matrices enrichies en HA doublement modifié, risquent de ne pas se comporter de la même façon que les cellules, plus nombreusesensemencées dans les matrices enrichies en HA natif. En effet, même si les valeurs des réponses biologiques sont normalisées par le nombre de cellules, il ne faut pas oublier de prendre en considération les relations intercellulaires qui ne sont pas étrangères au comportement biologique.

Il est connu que les chondrocytes reçoivent les signaux mécaniques à travers la déformation des cellules et des interactions biologiques et biophysiques avec la matrice extracellulaire. Un changement de forme des cellules peut modifier le métabolisme des chondrocytes. Il est possible que, dans notre système, s'établissent à la fois une déformation mécanique et une pression hydrostatique, ce qui changerait le comportement des chondrocytes. Les modifications du HA peuvent également empêcher les signaux induits par la stimulation mécanique de circuler entre les cellules et d'inhiber alors l'effet mécanique.

4.4. Conclusion

Nous avons constaté que, pour le temps d'incubation choisi, la stimulation mécanique a un effet positif sur la prolifération cellulaire pour toutes les matrices et un effet minime sur la synthèse des protéoglycanes. Ces résultats sont à confirmer ou infirmer par des études complémentaires.

De par cette étude de cytocompatibilité, nous avons montré que :

- La présence de HA dans les cultures tridimensionnelles augmente la prolifération cellulaire et la synthèse des protéoglycanes.
- Dans les matrices enrichies en HA modifié par des C₁₂, l'activité cellulaire se traduit par une prolifération modérée, inférieure à la prolifération obtenue avec de l'AA seul, alors que l'activité de synthèse des protéoglycanes est augmentée.
- La présence de HA doublement modifié provoque une diminution de la prolifération cellulaire et une synthèse de protéoglycanes plus faible que celle observée pour les autres matrices.

Ces résultats semblent directement liés aux propriétés structurales et physico-chimiques des dérivés établies lors de l'étude de la cinétique de libération du HA hors des billes d'alginate de calcium. En effet, le changement de structure des billes en présence de HA (modifié ou non), provoque vraisemblablement une accélération de la libération de HA, et la faible quantité de HA modifié maintenue avec le temps a des conséquences sur les réponses biologiques des cellules.

5. CONCLUSION

L'étude de la cinétique de libération du hyaluronate (modifié ou non) hors des billes d'alginate de calcium nous a montré que cette cinétique dépendait de nombreux facteurs tels que la masse molaire de l'AA utilisé, sa structure séquentielle (rapport M/G), sa concentration, la masse molaire du HA, sa concentration, la concentration totale en polysaccharides choisie pour la fabrication des billes, la nature du HA, modifié ou non, la nature de l'AA, modifié ou non, et leurs propriétés rhéologiques en mélange.

A un temps donné, pour des billes d'alginate natif de calcium, la quantité de hyaluronate maintenue dans les billes est maximale dans le cas du HA natif. La libération du HA modifié par des chaînes C₁₂ est moindre que celle d'un HA doublement modifié, cas le moins intéressant en terme de quantité maintenue. Ainsi, les modifications chimiques apportées au hyaluronate ne permettent pas d'augmenter la rétention de celui-ci dans les billes, bien au contraire.

Il semblerait que les propriétés rhéologiques des mélanges étudiés et le changement de structure des billes d'alginate en présence de hyaluronate expliquent ce phénomène de libération prématurée.

En ce qui concerne les réponses biologiques données par les chondrocytesensemencés dans différents matériaux, nous avons vu que la présence de hyaluronate dans les cultures tridimensionnelles augmentait la prolifération cellulaire et la synthèse des protéoglycanes, alors que ces paramètres biologiques, en présence de HA doublement modifié, sont apparemment plus faibles que ceux observés dans les autres cas. Ces résultats sont vraisemblablement à mettre en relation avec le fait que les HA doublement modifiés sont beaucoup moins retenus dans les billes que les autres HA, pour des raisons liées au réseau des matrices, comme on l'a précisé plus haut.

Il aurait été intéressant de tester ces biomatériaux *in vivo*, directement dans une lésion ostéocondrale, afin de voir si les hydrogels de polymères doublement modifiés présentaient une meilleure résistance à la dilution aux fluides biologiques par rapport à un hydrogel de polymères modifiés uniquement par des chaînes alkyle, et afin d'évaluer les réponses biologiques données dans ces conditions. Ces expériences n'ont cependant pas pu être réalisées dans le temps imparti.

6. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Binette F., McQuaid D.P., Haudenschild D.R., Yaeger P.C., McPherson J., Tubo R. "Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes *in vitro*" *Journal of Orthopaedic Research* **1998**, *16*, 207-216.
- (2) Liu H., Lee Y.W., Dean M.F. "Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads" *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1425*, 505-515.
- (3) Häuselmann H.J., Fernandes R.J., Mok S.S., Schmid T.M., Block J.A., Aydelotte M.B., Kuettner K.E., Thonar E.J.-M.A. "Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads" *Journal of Cell Science* **1994**, *104*, 17-27.
- (4) Stevens M.M., Qanadilo H.F., Langer R., Prasad Shastri V. "A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering" *Biomaterials* **2004**, *25*, 887-894.
- (5) Mierisch C.M., Wilson H.A., Turner M.A., Milbrandt T.A., Berthoux L., Hammarskjold M.L., Rekosh D., Balian G., Diduch D.R. "Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells" *J. Bone Joint Surg. Am.* **2003**, *85-A*, 1757-1767.
- (6) Lee D.A., Reisler T., Bader D.L. "Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques" *Acta Orthop. Scand.* **2003**, *74*, 6-15.
- (7) Aydelotte M.B., Thonar E.J.-M.A., Mollenhauer J., Flechtenmacher J. "Culture of chondrocytes in alginate gel: variations in conditions of gelation influence the structure of the alginate gel, and the arrangement and morphology of proliferating chondrocytes" *In vitro Cell. Dev. Biol. Animal* **1998**, *34*, 123-130.
- (8) Smidsrod O., Skjak-Braek G. "Alginate as immobilization matrix for cells" *Trends in Biotechnology* **1990**, *8*, 71-78.
- (9) Masuda K., Sah R.L., Hejna M.J., Ma E.J. "A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method" *Journal of Orthopaedic Research* **2003**, *21*, 139-148.
- (10) Grunder T., Gaissmaier C., Fritz J., Stoop R., Hortschansky P., Mollenhauer J., Aicher W.K. "Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads" *Osteoarthritis and Cartilage* **2004**, *12*, 559-567.
- (11) Stove J., Gerlach C., Huch K., Gunther K.P., Puhl W., Scarf H.P. "Effects of hyaluronan on proteoglycan content of osteoarthritic chondrocytes *in vitro*" *Orthopedic Research* **2002**, *29*, 551-555.
- (12) Homandberg G.A., Hui F., Wen C., Kuettner K.E., Williams J.M. "Hyaluronic acid suppresses fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis: I. *In vitro*." *Osteoarthritis and Cartilage* **1997**, *5*, 309-319.
- (13) Pelletier S., Hubert P., Lapique F., Payan E., Dellacherie E. "Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate : synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions" *Carbohydrate polymers* **2000**, *43*, 343-349.
- (14) Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L., Dellacherie E. "Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair : rheological properties" *Journal of biomedical materials research* **2001**, *54*, 102-108.
- (15) Gigant-Huselstein C. "Etude des phénomènes de mécanoactivation et de mécanotransduction des chondrocytes" *thèse de doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy I* **2003**.

- (16) Pelletier S. "Synthèse et caractérisation physico-chimique de dérivés associatifs d'alginate et de hyaluronate de sodium en vue d'applications biomédicales" *thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine INPL 1999.*
- (17) Rastello de Boissesson M. "Microparticules d'alginate associatifs : élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives" *thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine INPL 2002.*
- (18) Oerther S. "Conception et évaluation de biomatériaux polysaccharidiques pour le comblement de lésions ostéocondrales. Intérêt de l'association alginate - hyaluronate" *thèse de doctorat, Université Henri Poincaré (Nancy I) 1998.*
- (19) Gigant-Huselstein C., Hubert P., Dumas D., Dellacherie E., Netter P., Payan E., Stoltz J.F. "Expression of adhesion molecules and collagen on rat chondrocyte seeded into alginate and hyaluronate based 3D biosystems. Influence of mechanical stresses." *Biorheology* **2004**, *41*, 423-431.
- (20) Zhong S.P., Campoccia D., Doherty P.J., Williams R.L., Benedetti L., Williams D.F. "Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase" *Biomaterials* **1994**, *15*, 359-365.
- (21) Ohya T., Kaneko Y. "Novel hyaluronidase from streptomyces" *Biochimica et Biophysica Acta* **1979**, *198*, 607-609.
- (22) Shimada E., Matsumura G. "Degradation process on hyaluronic acid by Streptomyces hyaluronidase" *Journal of biochemistry* **1980**, *88*, 1015-1023.
- (23) Payan E., Presle N., Lopicque F., Jouzeau J.Y., Bordji K., Oerther S. "Separation and quantification by ion-association capillary zone electrophoresis of unsaturated disaccharide units of chondroitin sulfates and oligosaccharides derived from hyaluronan" *Anal.Chem.* **1998**, *70*, 4780-4786.
- (24) Laroui H. "Biosystèmes enrichis en hyaluronate natif et associatif : influence de l'environnement sur la cinétique de libération du hyaluronate" *DEA, Henri Poincaré Nancy I et Institut National Polytechnique de Lorraine (ENSIC, Nancy) (France) 2003.*
- (25) Miralles G. "Biomatériaux de comblement pour la réparation de lésions ostéocondrales : intérêt des éponges polysaccharidiques à base de hyaluronate de sodium" *thèse de doctorat, Université de Nancy I, Nancy (France) 2001.*
- (26) Oerther S., Le Gall H., Payan E., Lopicque F., Presle N., Hubert P. "Hyaluronate-alginate gel as a novel biomaterial: mechanical properties and formation mechanism" *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, *63*, 206-215.
- (27) Oerther S., Payan E., Lopicque F., Presle N., Hubert P., Muller S., Netter P., Lopicque F. "Hyaluronate-alginate combination for the preparation of new biomaterials: investigation of the behaviour in aqueous solutions" *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1426*, 185-194.
- (28) Lindenhayn K., Perka C., Spitzer R.S., Heilmann H.-H., Pommerening K., Mennicke J., Sittinger M. "Retention of hyaluronic acid in alginate beads : aspects for *in vitro* cartilage engineering" *Journal of biomedical materials research* **1999**, *44*, 149-155.
- (29) Kwok K.K., Groves M.J., Burgess D.J. "Production of 5-15 µm diameter alginate-polylysine microcapsules by air-atomization technique" *Pharmaceutic.Res.* **1991**, *8*, 341-344.
- (30) Sutherland I.W. "Alginates" *Biomaterials, Stockton Press, New York* **1991**, 309-331.
- (31) Martinsen A., Skjak-Braek G., Smidsrod O., Zanetti F., Paoletti S. "Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates" *Carbohydr.Polym.* **1991**, *15*, 171-193.
- (32) Miralles G., Baudoin R., Dumas D., Baptiste D., Hubert P., Stoltz J.F. "Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: in vitro engineering of cartilage" *Journal of biomedical materials research* **2001**, *57*, 268-278.
- (33) Tanaka H., Matsumura M., Veliky I.A. "Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads" *Biotechnology and Bioengineering* **1983**, *26*, 53-58.
- (34) Garbayo I., Leon R., Vigarà J., Vilchez C. "Diffusion characteristics of nitrate and glycerol in alginate" *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **2002**, *25*, 1-9.
- (35) Handrikova G., Stefuca V., Polakovic M., Bales V. "Determination of effective diffusion coefficient of substrate in gel particles with immobilized biocatalyst" *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *18*, 581-584.

- (36) Favre E., Léonard M., Laurent A., Dellacherie E. "Diffusion of polyethyleneglycols in calcium alginate hydrogels" *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* **2001**, 194, 197-206.
- (37) Gombotz W.R., Wee S.F. "Protein release from alginate matrices" *Advanced drug delivery reviews* **1998**, 31, 267-285.
- (38) Ghosh P. "The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid" *Clin. Exp. Rheumatol.* **1994**, 12, 75-82.
- (39) Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon L.Y. "Signaling properties of hyaluronan receptors" *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 4589-4592.
- (40) McCourt P.A., Ek B., Forsberg N., Gustafson S. "Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan" *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 30081-30084.
- (41) Chow G., Knudson C.B., Homandberg G., Knudson W. "Increased expression of CD44 in bovine articular chondrocytes by catabolic cellular mediators" *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 27734-27741.
- (42) Rastello de Boissesson M., Leonard M., Hubert P., Marchal P., Stequert A., Castel C., Favre E., Dellacherie E. "Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: bead formation, structure, and stability" *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 273, 131-139.
- (43) Smidsrod O. "The relative extension of alginates having different chemical composition" *Carbohydr. Res.* **1973**, 27, 107-118.
- (44) Goodstone N.J., Cartwright A., Ashton B. "Effects of high molecular weight hyaluronan on chondrocytes cultured within a resorbable gelatin sponge" *Tissue Eng.* **2004**, 10, 621-631.
- (45) Kawasaki K., Ochi M., Uchio Y., Adachi N., Matsusaki M. "Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels" *J. Cell Physiol.* **1999**, 179, 142-148.
- (46) Slevin M., Krupinski J., Kumar S., Gaffney J. "Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation" *Lab Invest.* **1998**, 78, 987-1003.
- (47) Lee D.A., D.L., B. "Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose" *J. Orthop. Res.* **1997**, 15, 181-188.
- (48) Mauck R.L., Soltz M.A., Wang C.B.B., Wong D.D., Chao P.H., Valhmu W.B., Hung C.T. "Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels" *J. Biomech. Eng.* **2000**, 122, 252-260.
- (49) Vunjak-Novakovic G., Obradovic B., Martin I., Freed L.E. "Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage" *Biorheology* **2002**, 39, 259-268.

Chapitre V

Perspectives

1. INTRODUCTION

L'objectif de notre travail était de préparer des dérivés de hyaluronate de sodium, d'une part substitués par des chaînes à 12 carbones et d'autre part réticulés chimiquement, ceci dans l'optique de les utiliser pour la réparation du cartilage. Certains des produits obtenus présentent des propriétés de gels forts en milieu salin ($\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$) répondant aux exigences mécaniques des biomatériaux de comblement. Cependant, les études biologiques *in vitro* ont montré que, contrairement au hyaluronate natif, ces dérivés doublement modifiés inclus dans des matrices tridimensionnelles d'alginate de calcium se libéraient prématurément de ces matrices. Leur effet sur la prolifération cellulaire et sur la synthèse de protéoglycanes par les chondrocytes n'a donc pas pu être évalué, ce qui a mis un terme aux études biologiques *in vitro*.

Une nouvelle approche pour l'obtention de biomatériaux de comblement a donc été envisagée. Au lieu d'utiliser un protocole d'implantation des dérivés doublement réticulés au sein de la lésion, nous avons entrepris de préparer des hydrogels rhéofluidifiants en solution saline, donc injectables dans la lésion, mais qui seraient porteurs de groupements susceptibles de réticuler *in situ* sous l'influence d'un stimulus (Figure 1).

Pour cela, notre objectif a été de préparer des dérivés de HA doublement substitués, d'une part par des chaînes en C_{12} , responsables en milieu aqueux du caractère rhéofluidifiant, et d'autre part par des groupements sensibles, qui, sous l'action d'un stimulus, formeraient des liaisons covalentes entre les chaînes de HA.

Nous avons vu dans le chapitre I qu'un grand nombre de stimuli permettait l'obtention d'hydrogels : température, pH, champ électrique, force ionique... La littérature décrit également beaucoup d'exemples d'hydrogels photopolymérisables obtenus à partir du hyaluronate¹⁻¹¹, du dextrane¹²⁻¹⁶, de la chondroïtine sulfate¹⁷, du chitosane¹⁸ et de l'agarose¹⁹. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ce stimulus qu'est la lumière.

Dans cette nouvelle approche, en raison du coût élevé du HA, nous avons choisi comme polymère de départ l'alginate de sodium. Ce polysaccharide peut en effet servir de modèle pour la mise au point des différentes étapes de synthèse compte tenu de ses similitudes de structure et de réactivité avec le HA. Nous nous sommes donc attachés à la synthèse et à la caractérisation physico-

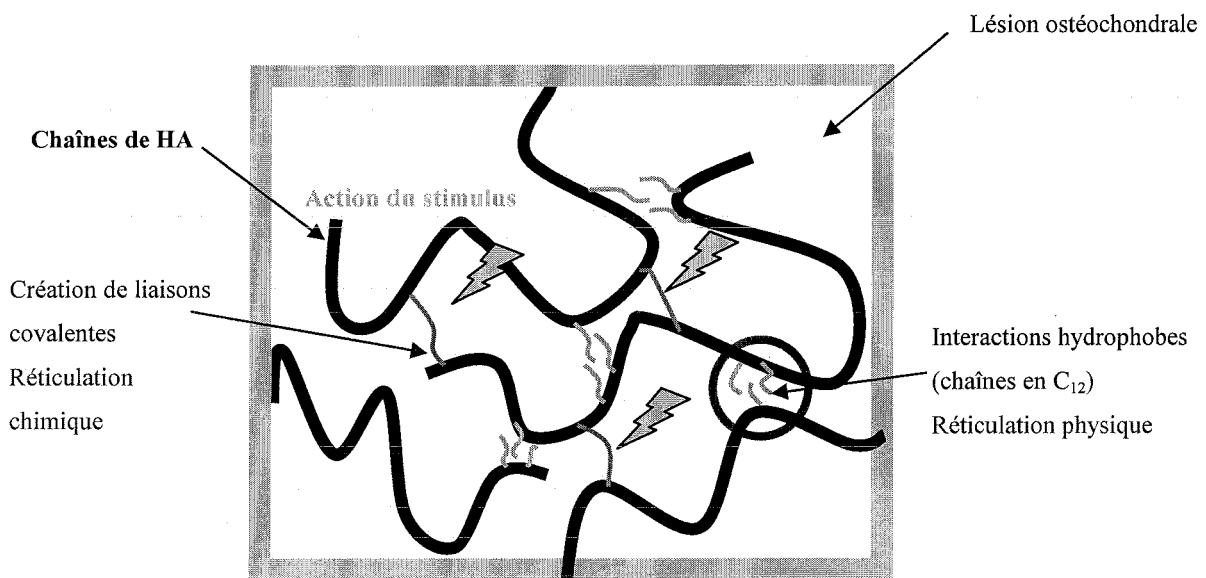


Figure 1 : Nouvelle structure visée pour le biomatériau de comblement

chimique d'AA modifiés, d'une part par des chaînes C₁₂ et d'autre part par des groupements méthacrylate, réputés photopolymérisables.

Dans un premier temps, différentes voies de synthèse ont été envisagées afin de fixer les groupements méthacrylate sur l'AA. La synthèse d'AA doublement modifiés a ensuite été mise au point.

Des essais de photopolymérisation ont été réalisés sur les produits synthétisés : l'évolution des propriétés des hydrogels formés a été suivie par des études rhéologiques.

2. PRINCIPE DE LA PHOTOPOLYMERISATION

La photopolymérisation permet de faire de la polymérisation radicalaire d'une manière rapide et contrôlée dans des conditions ambiantes ou physiologiques. La lumière visible ou ultraviolette interagit avec des photoamorceurs, composés sensibles à la lumière, conduisant à la formation de radicaux libres et à l'amorçage de la polymérisation radicalaire. De cette manière, des hydrogels réticulés chimiquement peuvent être formés à partir de polymères hydrosolubles portant des groupements photopolymérisables.

Les hydrogels photopolymérisés sont au centre de nombreuses applications biomédicales comme la prévention de la thrombose^{20,21}, la formation d'adhésifs post-opératoires²²⁻²⁴, la libération de médicaments²³⁻²⁷. L'utilisation de lumière pour effectuer une polymérisation *in vivo* se retrouve également dans le domaine de la dentisterie pour former des ciments et des restaurations *in situ*^{28,29}. Cette technique est utilisée aussi pour l'obtention de matériaux dans des domaines tels que l'électronique, l'impression, l'optique, les membranes, les recouvrements ou modifications de surface³⁰.

2.1. Avantages de cette technique

La photopolymérisation a plusieurs avantages par rapport aux autres techniques de polymérisation. La production des radicaux et la polymérisation qui s'ensuit peuvent être contrôlées spatialement (autrement dit confinées à certaines régions) et dans le temps, par simple mise en marche ou arrêt de la source lumineuse. La cinétique est, en général, rapide à température ambiante ou physiologique, et une quantité minimale de chaleur est produite³¹. Mais, l'un des avantages de cette technique est qu'elle permet de créer des hydrogels *in situ*, de manière non invasive.

Cette formation de polymères *in situ* est très attrayante pour un grand nombre d'applications biomédicales. Ainsi, dans le cas de l'arthrose par exemple, il suffirait d'injecter, dans la lésion, une solution d'un polymère porteur de résidus photopolymérisables, de moyenne viscosité, qui épouserait les contours de la lésion et qui créerait un contact optimal entre le matériau et le tissu résiduel et ensuite de déclencher la réticulation. On pourrait ainsi former des hydrogels possédant la résistance mécanique nécessaire pour que le matériau joue son rôle de tuteur dans la régénération de la matrice cartilagineuse.

Il faut par ailleurs garder à l'esprit que les conditions de polymérisation doivent être compatibles avec les applications biologiques qui nous intéressent : température du corps humain, force ionique, pH proches du milieu physiologique, conditions expérimentales non nocives pour les cellules et les tissus, absence d'espèces toxiques comme des monomères résiduels ou des solvants organiques. Les systèmes photopolymérisables que nous allons décrire par la suite peuvent répondre à ces exigences, avec des conditions de polymérisation suffisamment douces (intensité lumineuse faible, temps d'irradiation court, température physiologique, peu ou pas de solvant organique) pour être testés en présence de cellules et de tissus.

2.2. Les photoamorceurs

Le processus de photopolymérisation utilise généralement un photoamorceur qui absorbe la lumière à une longueur d'onde spécifique et qui produit, à cette longueur d'onde, des espèces amorçant la polymérisation. Toutefois, en particulier pour les applications biologiques qui nous intéressent, d'autres facteurs doivent être pris en compte pour choisir l'amorceur : sa biocompatibilité, sa solubilité dans l'eau, sa stabilité, sa cytotoxicité^{30,32}. Cette dernière décennie, différents photoamorceurs ont été proposés pour répondre à ces exigences.

Le photoamorçage peut être classé selon le mécanisme de polymérisation mis en jeu : par voie radicalaire, par photoclivage et par arrachement d'hydrogène, et par voie cationique³⁰⁻³². Les photoamorceurs cationiques ne sont pas utilisés dans les applications d'ingénierie tissulaire, en raison de la formation, lors de l'étape d'amorçage de la polymérisation, d'acides protonés nocifs pour les cellules et les tissus.

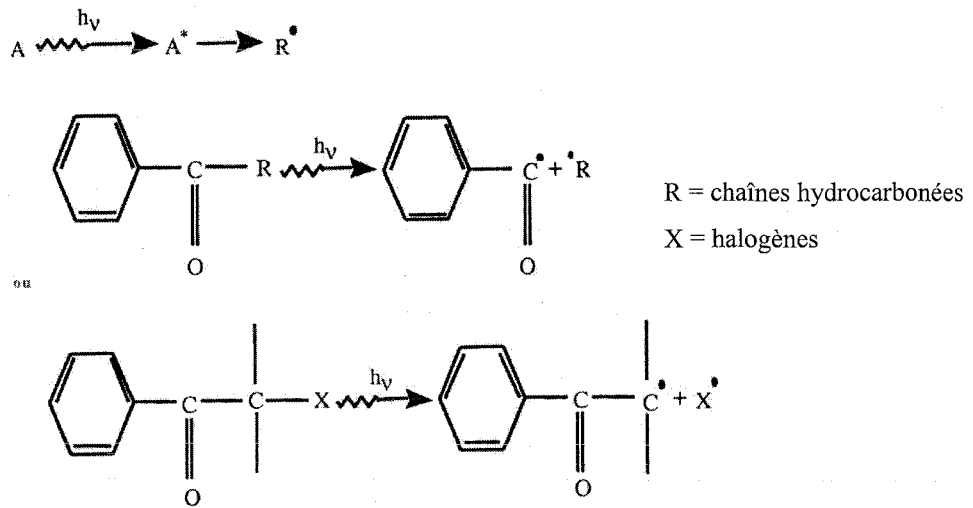


Figure 2 : Photopolymérisation radicalaire par photoclivage³³

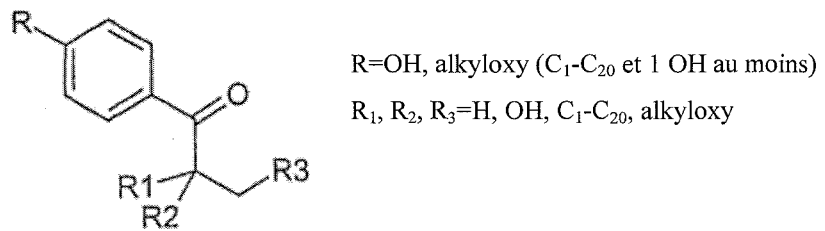


Figure 3 : Dérivés de propiophénone utilisés pour la photopolymérisation de HA modifiés³⁷

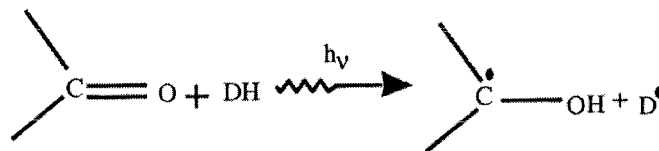


Figure 4 : Photopolymérisation radicalaire par arrachement d'hydrogène³³
 DH : molécule donneuse de protons

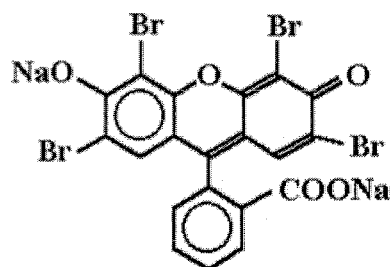


Figure 5 : Formule chimique de l'éosine Y

2.2.1. Photopolymérisation radicalaire par photoclivage³³

Quand ils sont soumis à la lumière, certains photoamorceurs peuvent subir un clivage de leurs liaisons C-C, C-Cl, C-O ou C-S pour former des radicaux (Figure 2).

Cette classe de photoamorceurs est essentiellement constituée de composés carbonylés aromatiques.

Des dérivés de l'acétophénone (par exemple la 2,2'-diméthoxy-2-phényl acétophénone) ont été utilisés pour former des hydrogels à partir de dérivés de poly(éthylène glycol) acrylé³⁴⁻³⁶ et à partir de dérivés du dextrane^{12,15,16}. Ces hydrogels ont été préconisés comme biomatériaux de comblement.

Des dérivés de propiophénone ont également été utilisés, par la société Fidia entre autres³⁷. Des hydrogels chimiques ont été obtenus à partir de HA modifiés par différents groupements propiophénone photopolymérisables (Figure 3). Ces matériaux sont potentiellement utilisables dans le domaine biomédical (chirurgie, libération contrôlée de médicaments).

2.2.2. Photopolymérisation radicalaire par arrachement d'hydrogène³³

Sous irradiation UV, certains photoamorceurs, comme par exemple les cétones aromatiques (benzophénone, thioxanthrone...), arrachent un hydrogène à une molécule donneuse pour générer un radical cétyl et un radical donneur (Figure 4).

L'amorçage de la photopolymérisation se fait généralement à partir du radical donneur d'hydrogène (D'), alors que le radical cétyl se recombine avec les macroradicaux en croissance. Un exemple de cette classe de photoamorceurs est l'isopropylthioxanthrone qui présente des propriétés de cytocompatibilité³⁸.

2.2.3. Le système photoamorceur utilisé

Le système amorceur que nous avons utilisé lors de cette étude est composé d'éosine Y (Figure 5) et de triéthanolamine, en présence de 1-vinylpyrrolidone. Il a déjà été utilisé à de nombreuses reprises^{26,39-43}, notamment avec le HA^{4,7,8}.

Le colorant qu'est l'éosine Y est photoexcité et réagit avec la triéthanolamine pour donner naissance à des radicaux capables d'amorcer la polymérisation. Le mécanisme fait intervenir un système redox avec transfert électronique entre le colorant excité et la triéthanolamine qui joue le rôle de donneur d'électrons⁴⁴. La 1-vinylpyrrolidone joue, quant à elle, le rôle de comonomère dans cette polymérisation et augmente la vitesse de photopolymérisation.

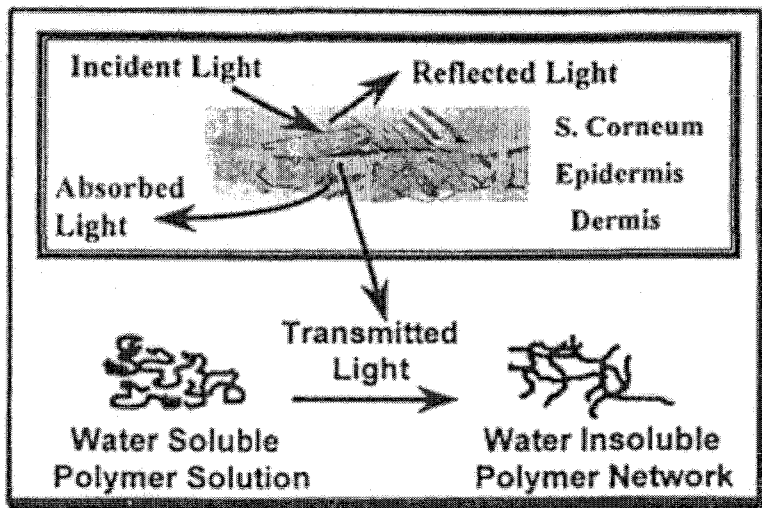


Figure 6 : Schéma de principe de la photopolymérisation transdermale⁴⁵

Les essais que nous avons réalisés constituent des travaux préliminaires sur la faisabilité de la photopolymérisation de dérivés de HA et d'AA. Compte tenu du temps dont nous disposions, nous nous sommes intéressés à des systèmes déjà bien décrits dans la littérature. Par la suite, il sera nécessaire d'approfondir le mécanisme de photopolymérisation mis en jeu et de s'interroger sur l'opportunité d'utiliser d'autres systèmes photoamorceurs, éventuellement plus adaptés.

2.3. La photopolymérisation *in situ*

La formation d'hydrogels par photopolymérisation *in vivo* peut être obtenue soit par photopolymérisation interfaciale, soit par photopolymérisation en volume³³.

La photopolymérisation interfaciale est une technique originale permettant la création de films d'hydrogels (<100 µm) sur les cellules ou tissus. L'amorceur est, dans ce cas, adsorbé sur la surface des tissus ou cellules. Quand cette surface est mise en contact avec la solution précurseur, contenant le monomère, et irradiée à une longueur d'onde appropriée, il y a polymérisation à partir des sites où le photoamorceur est adsorbé^{20,21,26}.

La photopolymérisation en volume est la plus couramment utilisée : le photoamorceur est, dans ce cas, solubilisé dans la solution précurseur et, sous exposition à une lumière de longueur d'onde appropriée, la solution est convertie en hydrogel. C'est la technique qui semble la plus adaptée à l'application visée et que nous avons utilisée lors de nos essais.

Pour les applications *in vivo*, il est nécessaire d'avoir une transmission de la lumière (visible ou UV) à travers la peau, ce qui représente un défi supplémentaire pour trouver les conditions de photopolymérisation adéquates. En effet, la solution précurseur, contenant le photoamorceur approprié et le monomère, est injectée de manière sous-cutanée et doit se convertir en hydrogel sous illumination transdermale et par arthroscopie.

Elisseff *et coll.* ont vérifié que la lumière pénétrant à travers les tissus, y compris la peau, permettait la photopolymérisation d'un POE diméthacrylate ou diacrylate (Figure 6)⁴⁵⁻⁵¹. En effet, une solution de ce polymère injectée en sous-cutané a été réticulée lors de l'exposition à la lumière de la surface extérieure de la peau. Ces auteurs ont également constaté que les systèmes polymère/chondrocytes, injectés dans des lésions de souris et de rats, et photopolymérisés, ont conduit à la production de collagènes et de protéoglycanes et à la formation d'un tissu de structure comparable à celle du cartilage natif, ce qui atteste que la fonctionnalité des chondrocytes a été conservée.

Ces études concernant des systèmes d'amorçage sensibles aux rayons UV ont donc montré que, même si l'intensité lumineuse transmise à travers la peau à cette longueur d'onde reste faible, une quantité suffisante de lumière réussit à pénétrer pour convertir le précurseur en hydrogel, et ce à des puissances d'irradiation compatibles avec les tissus.

La photopolymérisation transdermale peut donc aboutir au développement de nouveaux protocoles chirurgicaux non-invasifs préconisés en chirurgie plastique et orthopédique, en ingénierie tissulaire et pour la libération de médicaments⁴⁵⁻⁵¹.

2.4. Les matériaux photopolymérisables

De nombreuses recherches ont pour thème la photopolymérisation de monomères par irradiation visible ou UV^{30,31}. Mais, même si de tels systèmes fonctionnent bien pour de nombreuses applications, ils ne peuvent généralement pas être utilisés en ingénierie tissulaire à cause de la cytotoxicité des monomères. C'est pourquoi, pour ces applications, la recherche s'oriente vers des hydrogels formés à partir de groupements photopolymérisables fixés de façon covalente sur des polymères hydrosolubles porteurs. Nous pouvons citer comme exemples les dérivés de poly(éthylène glycol) PEG acrylé⁵², les dérivés de PEG méthacrylé^{51,53}, les dérivés du poly(alcool vinylique)⁵⁴⁻⁵⁷ et les polysaccharides modifiés comme le dextrane méthacrylé¹²⁻¹⁶ et les dérivés de HA¹⁻¹¹.

Ces différents travaux nous ont encouragés à préparer des biomatériaux de comblement à base de HA modifié à la fois par des groupements méthacrylate et par des chaînes en C₁₂. L'approche a consisté tout d'abord à mettre au point cette synthèse sur l'AA (moins onéreux) pour ensuite la transposer et la développer sur le HA.

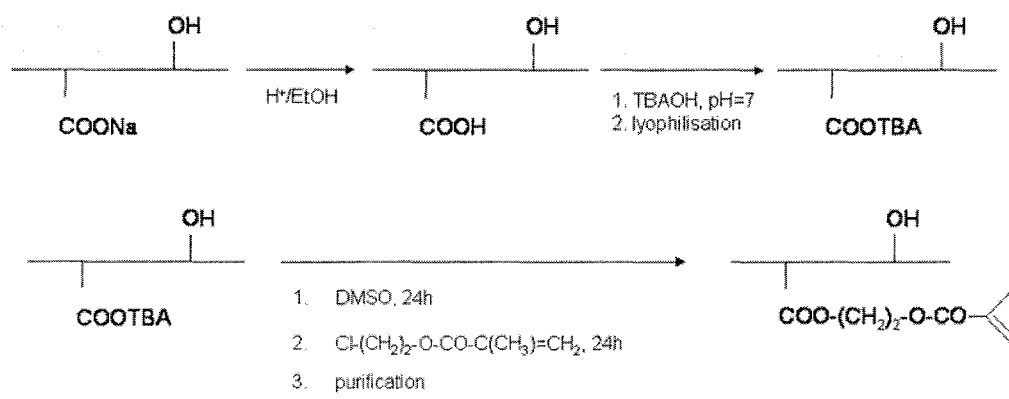


Figure 7 : Fixation de groupements méthacrylate sur l'AA avec le 2-chloroéthylméthacrylate

3. MISE AU POINT DE LA SYNTHÈSE DE CES DÉRIVÉS DOUBLEMENT MODIFIÉS

Dans un premier temps, nous avons mis au point la fixation des groupements méthacrylate sur les fonctions réactives de l'AA. Différentes réactions permettant cette fixation ont été trouvées dans la littérature.

Le glycidylméthacrylate a déjà été utilisé pour la fixation de ces groupements photopolymérisables sur le dextrane¹³. Cependant, la réaction entre le glycidylméthacrylate et ce polysaccharide s'accompagne d'un réarrangement (transestérification) aboutissant à la formation de deux dérivés.

Une autre méthode consiste à utiliser la N,N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthyl carbodiimide (EDC). Une réaction de condensation se produit entre les fonctions carboxylates de l'AA et les fonctions amine d'un dérivé méthacrylé aminé, comme par exemple la $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-C(CH}_3\text{)=CH}_2$. Cependant, la production de dérivés secondaires d'urée difficilement éliminables et la formation éventuelle d'un composé de réarrangement non réactif posent quelques problèmes.

Lors ce travail, nous avons envisagé deux autres voies de synthèse :

- La première voie met en jeu la fixation du 2-chloroéthylméthacrylate sur les fonctions carboxylates du squelette polysaccharidique. Ce dérivé présente l'avantage de porter un groupement -Cl susceptible de réagir dans les mêmes conditions qu'un dérivé alkyle halogéné : le mode opératoire sera donc proche de celui largement utilisé au laboratoire⁵⁸.
- La deuxième voie concerne la réaction de l'anhydride méthacrylique sur les fonctions hydroxyle de l'AA⁸.

Une fois ces voies de synthèse validées, nous avons travaillé sur la mise au point de la fixation, sur le même squelette alginique, des groupements méthacrylate et des chaînes alkyle, double fixation qui s'est révélée plus délicate que prévu.

3.1. Voie de synthèse mettant en jeu le 2-chloroéthylméthacrylate

3.1.1. Fixation des groupements méthacrylate

3.1.1.1. Protocole de fixation

La figure 7 représente la réaction entre le 2-chloroéthylméthacrylate et l'alginate de tétrabutylammonium AA-TBA, afin d'obtenir l'AA substitué par des groupements méthacrylate par l'intermédiaire de liaisons ester.

La première étape a consisté à transformer l'AA (Sigma Aldrich, moyenne viscosité, extrait des algues *Macrocystis pyrifera*, $\overline{M}_w = 400\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) en AA-TBA, afin de le rendre soluble dans le DMSO, solvant dans lequel se déroule la réaction de couplage^{58,59}.

- 10g de AA sont mis en suspension dans un mélange contenant 190 mL d'EtOH 70% et 10 mL d'acide chlorhydrique commercial à 37% (12 mol.L⁻¹), pendant 30 minutes à 4°C sous agitation.
- Le mélange est filtré puis lavé avec de l'éthanol 70% et de l'acétone. Il est laissé à température ambiante pour évaporer l'acétone résiduelle.
- L'AA sous forme acide est mis en suspension dans 500 mL d'H₂O sous agitation. Une solution de TBAOH (hydroxyde de tétrabutylammonium) 0,15 mol.L⁻¹ est ajoutée jusqu'à neutralisation du mélange à pH 7.
- Le mélange est ensuite lyophilisé.

Dans la deuxième étape, nous avons fait réagir le 2-chloroéthylméthacrylate sur cet AA-TBA, afin de fixer les groupements méthacrylate sur le squelette alginique.

- 1g d'AA-TBA lyophilisé est solubilisé à 1% (poids/volume) dans le DMSO pendant 24 heures.
- Le dérivé chloré méthacrylé est ensuite ajouté (avec un rapport molaire de 400 à 1000 pour 100 motifs monosaccharidiques) et réagit pendant 24 heures.
- 6 mL de NaCl 2,5 mol.L⁻¹ sont ajoutés au mélange. Celui-ci est agité à l'aide d'un ultra-turrax (5000 tr.min⁻¹, 5 min) puis laissé sous agitation pendant 1 heure à température ambiante.
- Le mélange est versé dans 500 mL d'éthanol 70% puis l'ensemble est soumis à l'action d'un ultra-turrax (5000 tr.min⁻¹) pendant 15 minutes, afin de précipiter l'AA modifié.
- Le mélange est filtré (filtre borosilicate n°4) puis lavé à l'éthanol 70% jusqu'à élimination des chlorures (test au nitrate d'argent). Il est ensuite lavé à l'acétone et laissé à température ambiante pour évaporer l'acétone résiduelle.
- L'AA modifié purifié est finalement stocké à 4°C.

3.1.1.2. Détermination du taux de fixation en méthacrylate

La détermination du taux de fixation en méthacrylate, défini comme le nombre de moles de méthacrylate pour 100 moles de motifs monosaccharidiques, a été effectuée par analyse RMN ¹H.

Les échantillons ont été préparés de la manière suivante :

- Une masse précise d'environ 50 mg d'AA modifié est dissous dans 25 mL d'HCl 0,001 mol.L⁻¹, sous agitation, à 100°C, pendant 5 heures.
- Après refroidissement de la solution, le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH à 0,2 mol.L⁻¹.
- 1g (masse précise) d'une solution de phtalate de potassium (100mg dans 25 mL d'H₂O) est ajouté.
- Une lyophilisation permet d'éliminer l'eau du mélange.
- 10 mg d'échantillon sont dissous dans un mélange D₂O/DMSO deutéré (800µL/200µL) et l'analyse en RMN ¹H est effectuée.

Le phtalate de potassium ajouté sert d'étalon interne : les pics correspondants sont facilement identifiés sur le spectre et, la quantité de phtalate ajoutée à nos échantillons étant connue précisément, l'intégration des pics nous donne le rapport molaire méthacrylate/phtalate et donc le taux de fixation en méthacrylate.

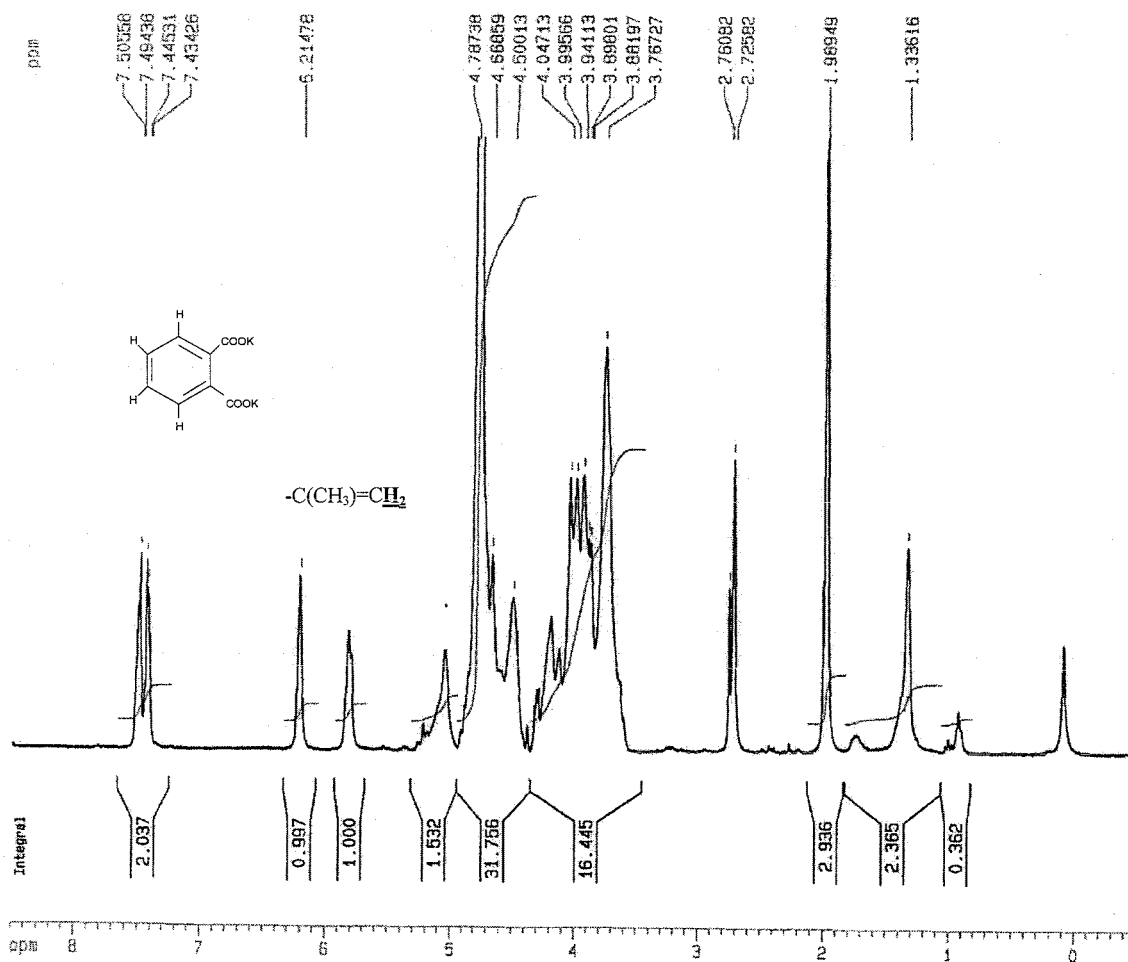


Figure 8 : Spectre RMN ^1H d'un AA substitué par des groupements méthacrylate en présence de phthalate de potassium ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans un mélange $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ deutéré en proportion 8/2)

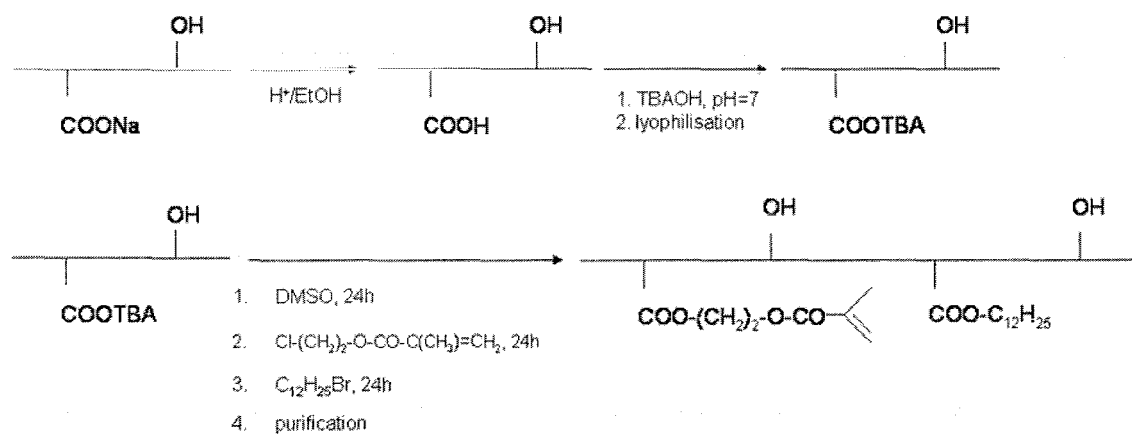


Figure 9 : Fixation de groupements méthacrylate et de chaînes en C_{12} sur l'AA (voie 2-chloroéthylméthacrylate)

Le spectre RMN ^1H d'un AA modifié par des groupements méthacrylate est présenté sur la figure 8. Deux groupes de pics caractéristiques nous ont intéressés :

- vers 7,5 ppm, on retrouve les 2 pics correspondant aux 4 protons du phtalate de potassium (étalon interne), la somme des intensités des massifs correspondants nous donne l'intensité globale due aux 4 protons phtalate.
- Vers 6,2 et 5,8 ppm, on retrouve les pics correspondant aux protons CH_2 du groupement méthacrylate, la somme des intensités des massifs nous donne l'intensité globale due aux 2 protons.

Le rapport des intensités globales phtalate/méthacrylate étant proportionnel au rapport molaire phtalate/méthacrylate et la quantité de phtalate introduite étant connue, le calcul du taux de fixation en groupements méthacrylate est donc aisé.

3.1.1.3. Résultats

Différents produits ont été synthétisés selon le protocole de fixation décrit dans le paragraphe 3.1.1.1 et ont été analysés ensuite par RMN ^1H (§3.1.1.2).

Les premiers essais ont montré que la fixation des groupements méthacrylate ne comportait pas de difficultés particulières et qu'une assez bonne reproductibilité était obtenue : un rapport molaire de 400 de 2-chloroéthylméthacrylate pour 100 motifs monosaccharidiques conduit à un taux de fixation de l'ordre de 10% et un rapport molaire de 800 à un taux de 15-20% (15-20 moles pour 100 moles de motifs monosaccharidiques).

Ces résultats nous ont poussés à tenter de fixer sur le squelette alginique, d'une part ces groupements méthacrylate et d'autre part les chaînes en C_{12} .

3.1.2. Fixation des groupements méthacrylate et des chaînes alkyle

3.1.2.1. Protocole de la double fixation

La figure 9 donne le schéma de la réaction du 2-chloroéthylméthacrylate et du dérivé alkylé $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{Br}^{58,59}$ sur l'AA-TBA, afin d'obtenir un AA modifié à la fois par des groupements méthacrylate et des chaînes alkyle en C_{12} , par l'intermédiaire de liaisons ester.

Comme le protocole décrit précédemment (§3.1.1.1), la première étape a consisté à transformer l'AA en son sel de tétrabutylammonium. Il s'agit ensuite de faire réagir cet AA-TBA avec le 2-chloroéthylméthacrylate, puis avec le bromododécane.

	Rapport molaire initial en 2-chloroéthylméthacrylate ^a	Rapport molaire initial en C ₁₂ H ₂₅ Br ^b	Rapport molaire méthacrylate fixé ^c	Rapport molaire C ₁₂ fixé ^d
1	400	3	12,8	2,7
2	400	4	11	3,2
3	400	6	7,6	5,7
4	400	8	7,6	6,6
5	800	3	18,5	1,1
6	1000	5	13,4	2,8
7	1000	10	8,6	4

**Tableau 1 : Caractéristiques des alginates doublement modifiés,
synthétisés avec le 2-chloroéthylméthacrylate et le 1-bromododécane**

^a rapport molaire initial de 2-chloroéthylméthacrylate pour 100 motifs monosaccharidiques

^b rapport molaire initial de C₁₂H₂₅Br pour 100 motifs monosaccharidiques

^c rapport molaire de méthacrylate fixé pour 100 motifs monosaccharidiques,
déterminé à partir des résultats de RMN ¹H

^d rapport molaire de C₁₂ fixé pour 100 motifs monosaccharidiques,
déterminé à partir des résultats de CPG

- 1g d'AA-TBA lyophilisé est solubilisé à 1% (poids/volume) dans le DMSO pendant 24 heures.
- Le dérivé chloré méthacrylé est ensuite ajouté (avec un rapport molaire de 400 à 1000 pour 100 motifs monosaccharidiques) et réagit pendant 24 heures.
- Le 1-bromododécane est alors ajouté et réagit pendant 24 heures.
- Les étapes de purification sont identiques à celles décrites dans le paragraphe 3.1.1.1.
- L'AA modifié purifié est finalement stocké à 4°C.

3.1.2.2. Détermination des taux de fixation en méthacrylate et en chaînes C₁₂

La détermination des taux de fixation en méthacrylate a été effectuée par analyse RMN ¹H (§3.1.1.2).

Les taux de fixation en C₁₂ (rapport molaire chaînes alkyle/100 motifs monosaccharidiques) ont été déterminés par chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode de dosage a déjà été utilisée dans le cas des dérivés de HA décrits au chapitre II, §4.2.

3.1.2.3. Tableau récapitulatif des produits synthétisés

Différents produits ont été synthétisés à l'aide du protocole décrit au paragraphe 3.1.2.1.

La détermination des taux de fixation en groupements méthacrylate et en C₁₂ a donné les résultats récapitulés dans le tableau 1.

3.1.2.4. Conclusions

Ces résultats montrent qu'il est possible de fixer sur le squelette alginique, d'une part des groupements méthacrylate et d'autre part des chaînes alkyle. Néanmoins le contrôle de cette synthèse, notamment celui des taux de substitution en méthacrylate et en C₁₂, présente certaines difficultés. En effet, comme tendent à le montrer les résultats du tableau 1, il y a une compétition entre le 2-chloroéthylméthacrylate et le C₁₂H₂₅Br lors de leur fixation respective.

Si on compare les échantillons de 1 à 4, nous constatons que, pour un rapport molaire constant de 400 de dérivé méthacrylé, le taux en C₁₂ fixé augmente avec le rapport molaire en C₁₂H₂₅Br initial, sans modification de la réactivité du C₁₂H₂₅Br (réactivité de l'ordre de 85%, définie comme le rapport du taux fixé au rapport molaire initial). En revanche, le taux en méthacrylate fixé diminue avec le taux en C₁₂ fixé.

Si on compare les échantillons 1 et 5, pour un rapport molaire en C₁₂H₂₅Br initial relativement faible (de l'ordre de 3), plus le rapport molaire initial en 2-chloroéthylméthacrylate est élevé, plus le taux fixé en méthacrylate est élevé, mais le taux en C₁₂ fixé est lui beaucoup plus faible. Il y a une diminution de la réactivité du C₁₂H₂₅Br.

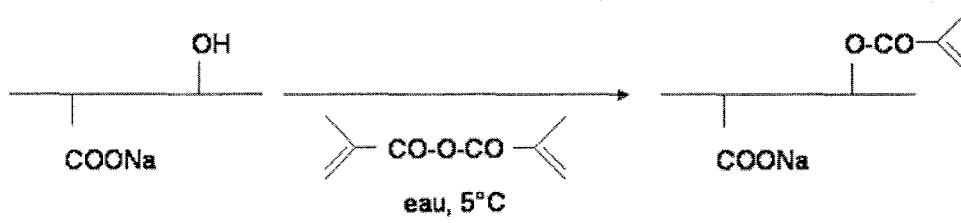


Figure 10 : Fixation de groupements méthacrylate sur l'AA avec l'anhydride méthacrylique

Nous avons pour objectif de préparer des hydrogels rhéofluidifiants en solution saline et porteurs de groupements photosensibles susceptibles de créer une réticulation chimique. Nous avons donc tenté de préparer des dérivés avec des taux élevés en C₁₂ fixé et en 2-chloroéthylméthacrylate fixé (conditions des échantillons 6 et 7). Nous avons constaté que ni la fixation des groupements méthacrylate, ni celles des C₁₂ n'atteint les valeurs attendues compte tenu des quantités de réactifs initiales.

Cette réaction de modification présente l'avantage de se faire dans le même solvant, ce qui permet un enchaînement direct des réactions et une facilité de mise en œuvre non négligeable. Mais, avec le protocole utilisé, il semble difficile d'obtenir un taux en méthacrylate élevé (15%) avec un taux en C₁₂ de 4-6%.

Pour essayer de remédier à cette compétition, il serait intéressant de « séparer les compétiteurs », par exemple en précipitant, dans un solvant adéquat, le polymère obtenu après la réaction de 24 heures avec le 2-chloroéthylméthacrylate, en le solubilisant de nouveau dans le DMSO et en ajoutant ensuite le dérivé alkyle bromé.

Ce protocole permettrait d'éliminer l'excès de 2-chloroéthylméthacrylate et peut-être de mieux contrôler les taux de fixation des deux groupements. Mais l'avantage du procédé « one-pot » sera perdu, ce qui nous pousse à nous interroger sur l'intérêt de poursuivre dans cette voie.

3.2. Voie de synthèse mettant en jeu l'anhydride méthacrylique

Une autre voie explorée pour la synthèse de ces AA doublement modifiés utilise la réaction de l'anhydride méthacrylique sur le squelette alginique⁸. Nous avons également étudié la possibilité de modifier le squelette alginique à la fois par des groupements méthacrylate et par des chaînes en C₁₂.

3.2.1. Fixation des groupements méthacrylate

3.2.1.1. Protocole de fixation

La figure 10 représente la réaction de l'anhydride méthacrylique sur l'AA. Dans ce cas, la réaction met en jeu les fonctions hydroxyle du polysaccharide et s'effectue simplement en milieu aqueux, à 5°C.

Le protocole de fixation de l'anhydride méthacrylique sur l'AA est le suivant :

- 1g d'AA est dissous dans 100 mL d'eau distillée (1% poids/volume). L'anhydride méthacrylique est ajouté avec un rapport molaire de 1000 pour 100 motifs monosaccharidiques d'AA présent dans le

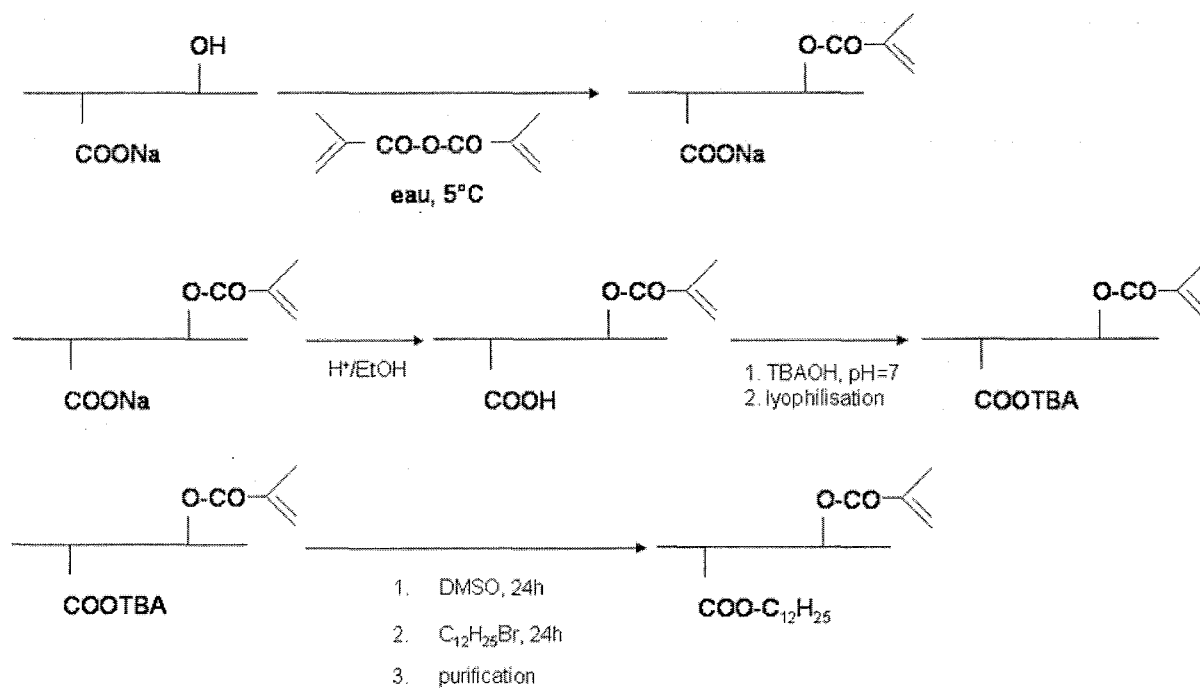


Figure 11 : Fixation de groupements méthacrylate et de chaînes alkyle sur l'AA (voie anhydride méthacrylique)

milieu. Le pH est ajusté à 8 par l'ajout de NaOH 5 mol.L⁻¹. Le milieu est laissé à 5°C, pendant 24 heures, sous agitation.

- Le produit est récupéré après précipitation dans l'éthanol, filtration (filtre borosilicate n°4) et lavages à l'éthanol et à l'acétone.
- L'AA modifié purifié est finalement stocké à 4°C.

3.2.1.2. Détermination du taux de fixation en méthacrylate

La détermination du taux de fixation en méthacrylate, défini comme le nombre de moles de méthacrylate pour 100 moles de motifs monosaccharidiques, a été effectuée par analyse RMN ¹H (§3.1.1.2).

3.2.1.3. Résultats

Différents produits ont été synthétisés selon le protocole de fixation décrit dans le paragraphe 3.2.1.1 et ont été caractérisés par RMN ¹H (§3.1.1.2).

La fixation des groupements méthacrylate sur le squelette alginique s'effectue sans problème particulier et de façon reproductible : un rapport molaire de 10 en anhydride méthacrylique par motif monosaccharidique conduit à un taux de fixation de l'ordre de 7% (7 moles pour 100 moles de motifs monosaccharidiques).

Nous avons alors tenté de fixer, sur le même squelette alginique, à la fois les groupements méthacrylate et les chaînes en C₁₂.

3.2.2. Fixation des groupements méthacrylate et des chaînes alkyle

3.2.2.1. Première voie de synthèse envisagée et problèmes rencontrés

Nous avons envisagé, dans une première approche, de fixer tout d'abord les groupements méthacrylate, puis ensuite les chaînes C₁₂ (Figure 11).

Nous avons été rapidement confrontés à des problèmes de solubilité du polymère. D'une part, l'alginate (initialement sous forme acide) modifié par des groupements méthacrylate n'était pas soluble dans l'eau à la fin de l'étape de neutralisation par le TBAOH, ce qui n'est pas le cas d'un alginate non modifié. D'autre part, l'alginate modifié par des groupements méthacrylate, sous sa forme TBA, ne s'est pas solubilisé dans le DMSO.

Il semble donc que la présence de ces groupements méthacrylate sur le squelette alginique change les propriétés de solubilité de celui-ci et ne permette pas de synthétiser des AA doublement modifiés en utilisant les conditions opératoires décrites précédemment.

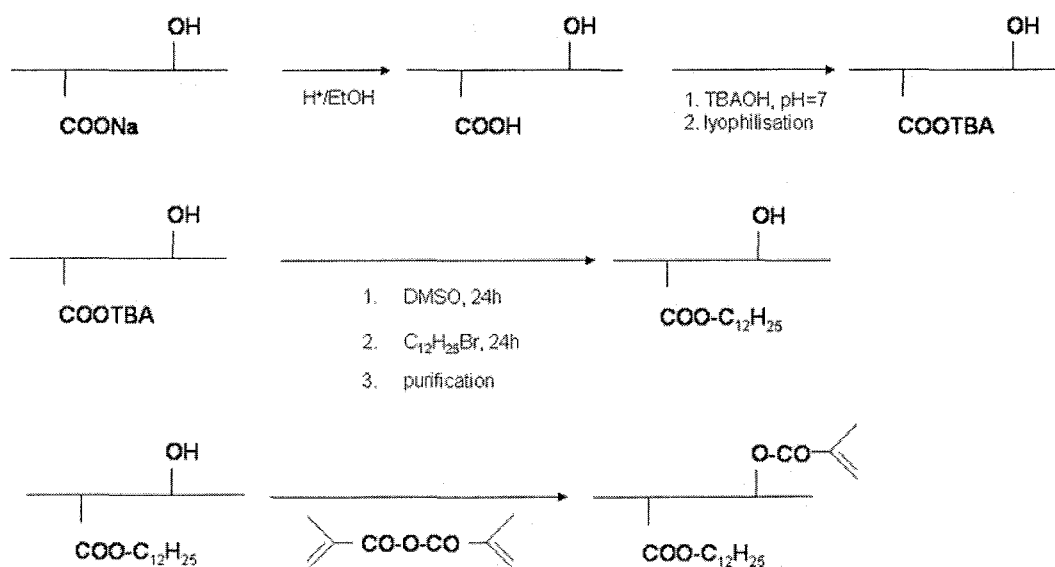


Figure 12 : Fixation de chaînes alkyle et de groupements méthacrylate sur l'AA (voie anhydride méthacrylique)

Rapport molaire C ₁₂ fixé avant réaction ^a	Rapport molaire initial anhydride méthacrylique ^b	Rapport molaire méthacrylate fixé ^c	Rapport molaire C ₁₂ fixé après réaction ^d
4	800	4	3
6,4	800	4	4,1

Tableau 2 : Caractérisation des algines doublement modifiés, synthétisés avec l'anhydride méthacrylique et le 1-bromodécane, dans un tampon pH 8
^a rapport molaire en C₁₂ fixé pour 100 motifs monosaccharidiques avant la réaction avec l'anhydride méthacrylique, déterminé par CPG
^b rapport molaire initial en anhydride méthacrylique pour 100 motifs monosaccharidiques
^c rapport molaire en méthacrylate pour 100 motifs monosaccharidiques, déterminé à partir de résultats de RMN ¹H
^d rapport molaire en C₁₂ fixé pour 100 motifs monosaccharidiques après la réaction avec l'anhydride méthacrylique, déterminé par CPG

3.2.2.2. Autres voies pour synthétiser les alginates doublement modifiés

Nous avons alors décidé de fixer, dans un premier temps, les chaînes C₁₂ sur le squelette alginique, et, ensuite, de greffer les groupements méthacrylate par réaction avec l'anhydride méthacrylique. Nous nous sommes en particulier attachés à déterminer les conditions optimales pour que les liaisons ester par lesquelles les chaînes alkyle sont fixées sur le squelette polysaccharidique ne soient pas hydrolysées (Figure 12).

Les AA modifiés par des chaînes alkyle ont été préparés par le protocole de fixation utilisé au laboratoire^{58,59} (chapitre IV, §2.1.1). La nomenclature adoptée pour ces AA hydrophobisés est : AA-C₁₂-x% avec AA l'alginate de sodium parent et x le taux de fixation en chaînes C₁₂ (exprimé en moles de C₁₂ pour 100 moles de motifs monosaccharidiques). Différents essais de fixation d'anhydride méthacrylique sur ces AA hydrophobisés ont été réalisés.

Le premier essai a été réalisé dans l'eau avec un AA-C₁₂-4%, selon le protocole décrit au paragraphe 3.2.1.1. Après analyses RMN ¹H (§3.1.1.2) et CPG (chapitre II, §4.2), nous avons mis en évidence la présence de groupements méthacrylate (taux de fixation de l'ordre de 3%), mais également une complète hydrolyse des liaisons ester existant entre les chaînes C₁₂ et le squelette polysaccharidique. En effet, lors de la réaction avec l'anhydride méthacrylique, il y a formation d'acide méthacrylique susceptible d'hydrolyser ces liaisons ester.

Nous avons alors cherché à limiter cette hydrolyse des liaisons ester, tout d'abord en employant une **solution tamponnée à pH 8**^{60,61} :

- Préparation de la solution tamponnée à pH 8 : 50 mL d'une solution de dihydrogénophosphate de potassium à 0,1 mol.L⁻¹, 46,1 mL d'une solution de NaOH à 0,1 mol.L⁻¹ et 3,9 mL d'eau sont mélangés.
- Le protocole utilisé est similaire à celui décrit au paragraphe 3.2.1.1, si ce n'est que l'AA hydrophobisé est dissous dans 100 mL du tampon pH 8.

Deux essais ont été réalisés avec un AA-C₁₂-4% et un AA-C₁₂-6,4% : les résultats des dosages en RMN ¹H et CPG sont donnés dans le tableau 2. Nous constatons que travailler en milieu tamponné limite l'hydrolyse des liaisons ester existant entre les chaînes C₁₂ et le squelette alginique. Ces essais de synthèses en milieu tamponné donnent des résultats prometteurs puisque nous arrivons à obtenir des AA doublement modifiés sans difficultés. Néanmoins, il est clair que les conditions de préparation de cette solution tampon peuvent être optimisées, notamment en modifiant sa force ionique ou son pH, pour tenter d'éviter totalement l'hydrolyse des liaisons ester.

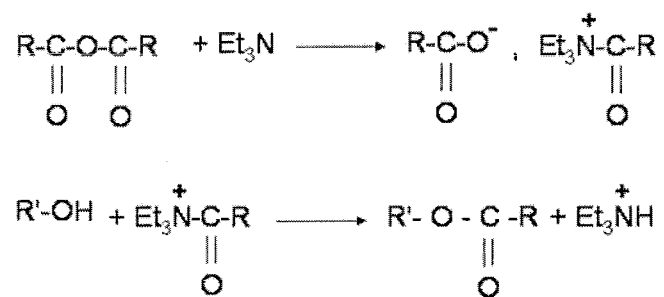


Figure 13 : Réaction entre l'anhydride méthacrylique et les fonctions hydroxyle de l'AA en présence de triéthylamine

Une autre méthode envisagée pour limiter l'hydrolyse des liaisons ester a mis en jeu la **triéthylamine**. En effet, il est connu que cette amine peut neutraliser l'acide formé lors de la réaction de l'anhydride méthacrylique avec l'AA et ainsi empêcher l'hydrolyse des liaisons ester.

Le protocole utilisé est le suivant :

- 1g d'AA hydrophobisé est dissous dans 100 mL d'eau distillée (1% poids/volume). L'anhydride méthacrylique est ajouté avec un rapport molaire de 800 pour 100 motifs monosaccharidiques d'AA présent dans le milieu. La triéthylamine est alors ajoutée et le pH est ajusté à 8 par ajout de NaOH 5 mol.L⁻¹. Le milieu est laissé à 5°C, pendant 24 heures, sous agitation.
- La purification a déjà été décrite dans le paragraphe 3.2.1.1.

Un essai unique a été effectué et a donné des résultats analogues aux précédents. En effet, l'AA initialement mis en solution contenait 6,4% de chaînes C₁₂. Après fixation de l'anhydride méthacrylique, le taux de substitution en C₁₂ était de 4,7%. Cependant, avec le protocole utilisé, les fluctuations du pH entre les ajouts d'anhydride et de triéthylamine sont relativement brutales et difficiles à contrôler : le polysaccharide peut non seulement subir une dégradation (diminution de la masse molaire) mais également voir ses liaisons ester hydrolysées.

Différentes voies sont envisageables pour optimiser le protocole^{62,63} :

- mélanger l'anhydride méthacrylique et la triéthylamine (proportions stoechiométriques) avant de l'ajouter à l'AA, ainsi l'acide méthacrylique est immédiatement neutralisé (Figure 13),
- mélanger de l'anhydride méthacrylique et de la pyridine (quantités stoechiométriques), la pyridine pouvant également neutraliser l'acide formé lors de la réaction de l'anhydride méthacrylique avec l'AA, solution alternative à l'utilisation de la triéthylamine,
- mélanger de l'anhydride méthacrylique, de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) et de la triéthylamine (proportions stoechiométriques entre anhydride méthacrylique et triéthylamine, proportions catalytiques pour la DMAP).

L'intérêt de la pyridine et de la DMAP, comme alternatives à l'utilisation de la triéthylamine, a déjà été observé en synthèse organique.

3.2.2.3. Conclusions

Ces différents résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des AA doublement modifiés par des chaînes alkyle et des groupements méthacrylate avec l'anhydride méthacrylique. Il est clair que des mises au point seraient nécessaires, pour contrôler de manière plus reproductible les taux de fixation de l'un et l'autre des groupements, et pour étudier l'éventuelle dégradation que le polysaccharide peut subir lors de l'ajout des différents réactifs.

Voie de synthèse	Rapport molaire C ₁₂ fixé ^a	Rapport molaire méthacrylate fixé ^b
2-chloroéthyl méthacrylate	5,7	7,6
	6,6	7,6
	4	8,6
	0	11
	3,2	11
	2,7	12,8
	2,8	13,4
	0	14
	1,1	18,5
	0	19,5
anhydride méthacrylique	0	7
	3	4
	4,1	4
	4,7	4
	0	3

Tableau 3 : Récapitulatif des AA doublement modifiés
^{a, b} définis dans le tableau 2

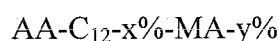
3.3. Conclusion

La fixation sur le squelette polysaccharidique de groupements méthacrylate et de chaînes alkyle est délicate à mettre au point, et ce quelle que soit la voie de synthèse utilisée (2-chloroéthylméthacrylate, anhydride méthacrylique). Il est à noter que d'autres voies de synthèse sont à notre disposition et restent à explorer.

Cependant, nous avons pu obtenir un certain nombre de dérivés doublement modifiés qui ont été caractérisés en terme de taux de fixation en méthacrylate et chaînes C₁₂ (Tableau 3).

4. ESSAIS DE PHOTOPOLYMERISATION

La nomenclature utilisée ci-après des AA doublement substitués est définie comme suit :



AA représente l'alginate de sodium,

x est le taux de fixation expérimental en chaînes alkyle C₁₂, déterminé par chromatographie en phase gazeuse, exprimé en moles de C₁₂ pour 100 moles de motifs monosaccharidiques,

y est le taux de fixation en méthacrylate MA, déterminé par RMN ¹H, exprimé en moles de méthacrylate pour 100 moles de motifs monosaccharidiques.

Ces systèmes ont été soumis aux conditions de photopolymérisation sous l'action de la lumière pour évaluer leur capacité à former des hydrogels réticulés chimiquement.

4.1. Préparation des échantillons et études envisagées

Les différents échantillons (présentés dans le tableau 3) ont été dissous à 20 g.L⁻¹ dans une solution précurseur pour la photopolymérisation⁸ contenant, pour 100 mL d'eau :

- 1,49g de triéthanolamine (100 mmoles)
- 69mg d'éosine Y (1mmole)
- 1g de 1-vinylpyrrolidone (9 mmoles)
- 0,87g de NaCl (15 mmoles), force ionique proche des conditions physiologiques.

Différentes études ont été réalisées :

- Des essais qualitatifs pour vérifier la polymérisation sous l'action de la lumière,
- Des essais quantitatifs pour quelques échantillons, en effectuant des mesures rhéologiques, afin de mettre en évidence cette photopolymérisation et d'évaluer les propriétés rhéologiques des produits obtenus.

Voie de synthèse	Rapport molaire C ₁₂ fixé ^a	Rapport molaire méthacrylate fixé ^b	Temps d'exposition à la lumière (minutes) ^c
2-chloroéthyl méthacrylate	5,7	7,6	10
	6,6	7,6	10
	4	8,6	10
	0	11	5
	3,2	11	5
	2,7	12,8	6
	2,8	13,4	5
	0	14	5
	1,1	18,5	3
	0	19,5	3
anhydride méthacrylique	0	7	2
	3	4	3
	4,1	4	3
	4,7	4	3
	0	3	4

Tableau 4 : Résultats qualitatifs de photopolymérisation pour différents dérivés de AA
^{a, b} définis dans le tableau 2

^c temps d'exposition à la lumière au bout duquel les AA doublement modifiés
sont considérés comme insolubles dans l'eau

4.2. Aspect qualitatif

Dans un premier temps, des essais qualitatifs de photopolymérisation ont été réalisés.

4.2.1. Matériel et méthodes

Les solutions des échantillons décrits précédemment ont été déposées sur une lame de microscope. Une lampe Optilux, typiquement une lampe pistolet de dentiste (Demetron Research Corporation, 75W, large spectre UV-visible, puissance lumineuse de 0,2W à 4 cm de la source), a été placée perpendiculairement à cette lame, à une hauteur de 4 cm.

Nous avons alors observé l'évolution des propriétés du matériau sous l'action de la lumière. Le changement de viscosité et la solubilité dans l'eau ont été nos deux critères d'évaluation qualitative.

Nous avons noté le temps d'exposition au bout duquel le polymère, soumis à l'action de la lumière, devient insoluble dans une solution aqueuse, signe qualitatif de sa réticulation chimique.

Pour vérifier cette insolubilité dans l'eau, le dérivé photopolymérisé a été soumis à une forte agitation (Vortex) pendant 10 minutes.

4.2.2. Résultats et discussion

Le tableau 4 regroupe les différents résultats de ces essais de photopolymérisation.

Nous pouvons tout d'abord remarquer que, quelle que soit la voie de synthèse utilisée, tous les échantillons obtenus après illumination étaient insolubles dans l'eau, ce qui confirme la photopolymérisation de ces produits.

Cependant, des différences apparaissent en terme de cinétique de photopolymérisation entre les deux voies de synthèse mises en oeuvre. En effet, pour des taux de fixation en méthacrylate proches (voire inférieurs), les temps nécessaires pour obtenir l'insolubilité des dérivés obtenus par la voie anhydride méthacrylique sont beaucoup plus courts que ceux des dérivés préparés par la voie 2-chloroéthylméthacrylate.

Cette différence de réactivité des groupements méthacrylate pourrait être due à la nature chimique de la chaîne porteuse de ces groupements :

- $-O-CO-C(CH_3)=CH_2$ dans le cas de la synthèse avec l'anhydride méthacrylique,
- $-CO-O-(CH_2)_2-O-CO-C(CH_3)=CH_2$ pour le 2-chloroéthylméthacrylate.

On a supposé dans un premier temps que l'effet électronique attracteur du groupement ester supplémentaire dans les dérivés obtenus à partir du 2-chloroéthylméthacrylate, pourrait diminuer la réactivité des groupements méthacrylate. Mais, l'effet électroattracteur de la fonction ester n'est certainement que peu ressenti par la double liaison, ces deux fonctions étant séparées par un groupement $-CH_2-CH_2-$ peu favorable à un transfert d'effet électronique.

Une autre hypothèse concerne la différence de flexibilité des chaînes. Dans le cas des dérivés obtenus à partir de l'anhydride méthacrylique, cette chaîne est rigide, ce qui n'est pas le cas pour les autres dérivés : la chaîne obtenue à partir du 2-chloroéthylméthacrylate est beaucoup plus flexible et pourrait adopter une conformation repliée limitant ainsi l'accessibilité des doubles liaisons. La probabilité de rencontre de ces groupes s'en trouverait alors diminuée et la cinétique de photopolymérisation ralentie.

Une autre conclusion concerne l'influence de la quantité de méthacrylate fixée sur l'AA sur la cinétique de photopolymérisation. En comparant les temps donnés dans le tableau 4 pour un taux en C_{12} équivalent, le temps d'exposition nécessaire à l'obtention de polymères réticulés chimiquement est d'autant plus court que le taux en méthacrylate fixé est élevé, quelle que soit la voie de synthèse utilisée : plus le nombre de groupements méthacrylate est important, plus la probabilité de rencontre est élevée.

Un autre paramètre pouvant influencer sur cette cinétique est la viscosité de la solution. Si nous voulons photopolymériser des polymères porteurs de chaînes alkyle en C_{12} , la présence d'un taux élevé de C_{12} peut être un handicap. En effet, ces dérivés présentent un caractère associatif (interactions hydrophobes en milieu aqueux) et une viscosité élevée. La mobilité des chaînes porteuses de groupements méthacrylate s'en trouve alors réduite. Cependant, dans l'hypothèse de l'injection de ces produits, la poussée de l'hydrogel hors de la seringue va provoquer sa rhéofluidification et la diminution de sa viscosité. Nous pourrions alors exploiter le temps de reprise de la viscosité de l'hydrogel pendant l'action du stimulus, si tant est que la cinétique de photopolymérisation soit plus rapide que ce temps de reprise, autrement dit que la densité et la réactivité des groupements méthacrylate soient suffisantes pour cela. Une optimisation de la balance taux en chaînes alkyle / taux en méthacrylate est donc nécessaire.

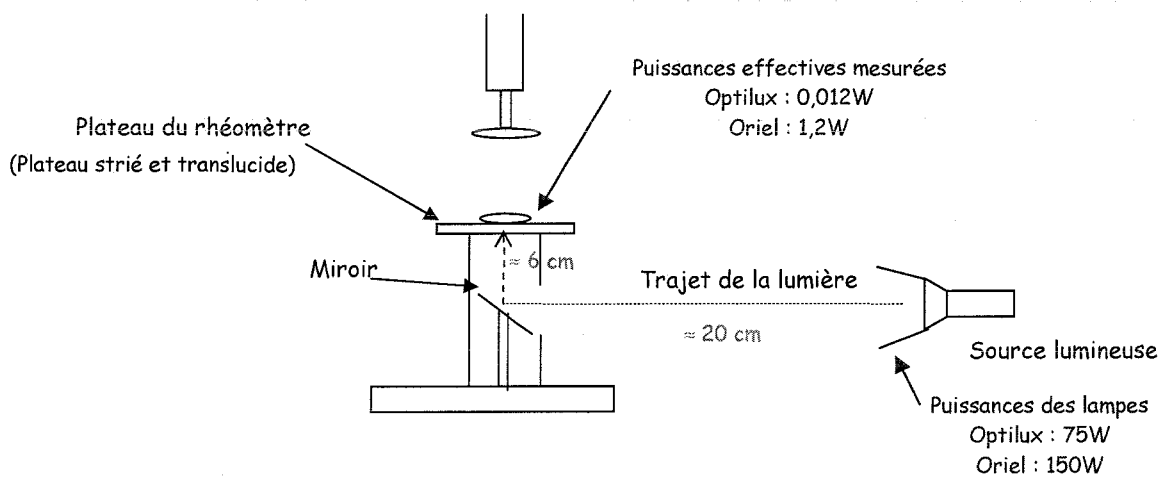


Figure 14 : Schéma de l'installation du rhéomètre pour les études rhéologiques

4.3. Aspect quantitatif

Après ces résultats qualitatifs, nous avons voulu déterminer les propriétés de certains des polymères synthétisés avant, pendant et après le traitement par illumination.

4.3.1. Matériel et méthodes

Les mesures rhéologiques en régime oscillatoire ont été effectuées avec un rhéomètre à contrainte imposée AR 2000 (TA Instruments, USA). Ce rhéomètre n'étant pas équipé de cellule permettant le suivi de la photopolymérisation, nous avons donc construit un module complémentaire afin d'être dans des conditions optimales pour cette étude (Figure 14).

Il a fallu créer un dispositif permettant d'orienter la lumière de la lampe sur le plateau inférieur du rhéomètre, tout en soumettant l'échantillon aux mesures rhéologiques. Un cylindre muni d'un miroir a permis d'orienter la lumière de la lampe sur le plateau inférieur. Un plateau translucide en poly(chlorure de vinyle) a été utilisé comme plateau inférieur.

Les plateaux (inférieur et supérieur) sont striés pour éviter le glissement de l'échantillon. La géométrie considérée est une géométrie Plan/Plan, le diamètre des plans étant de 20 mm et l'entrefer de l'ordre de 1 mm.

Deux sortes de lampes ont été utilisées :

- Lampe de dentiste Optilux (Demetron Research Corporation) : 75W, large spectre UV-visible,
- Lampe halogène Oriol : 150W, type 66195, spectre visible.

Il est à noter que la lumière arrivant sur le plateau inférieur est relativement faible, compte tenu du trajet optique qu'elle a à parcourir. Nous avons mesuré à l'aide d'un capteur, la lumière effective arrivant sur l'échantillon : la lampe Optilux donne une puissance lumineuse de 0,012W sur le plateau du rhéomètre où est déposé l'échantillon et la lampe halogène 1,2W, soit 100 fois plus.

Les mesures en régime oscillatoire ont été réalisées dans le régime de viscoélasticité linéaire des échantillons (G' et G'' indépendants de la contrainte) et nous avons principalement suivi l'évolution de ces modules en fonction du temps d'illumination.

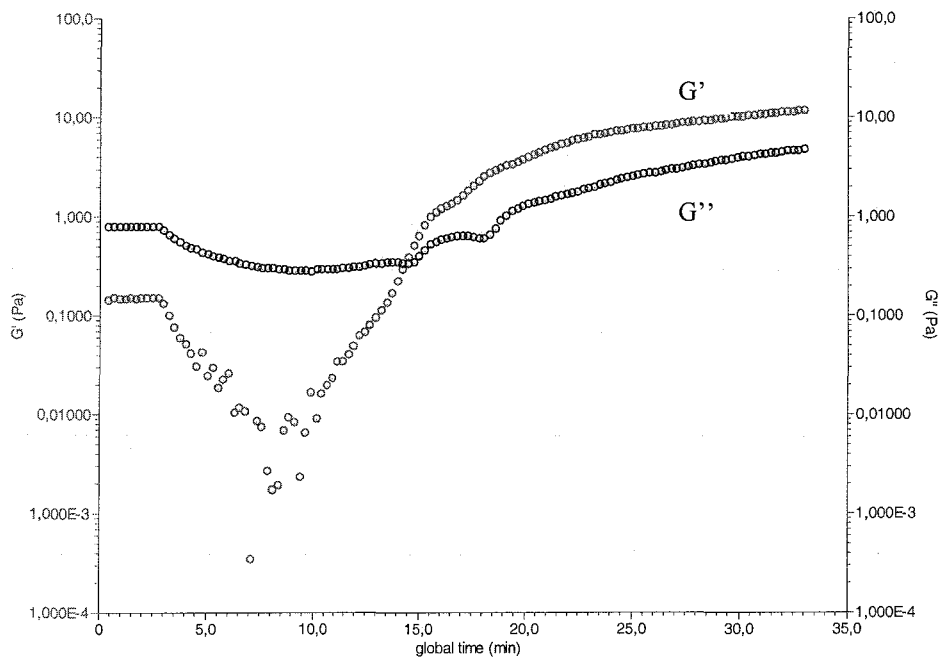


Figure 15 : G' , G'' en fonction du temps d'illumination pour AA- C_{12} -2,8%-MA-13,4% ($20^{\circ}C$, 20 g.L^{-1} dans la solution de photopolymérisation définie au §4.1, lampe Oriet) G' , G'' déterminés dans le milieu réactionnel à une contrainte de 1Pa et à une fréquence de 1 rad.s^{-1}

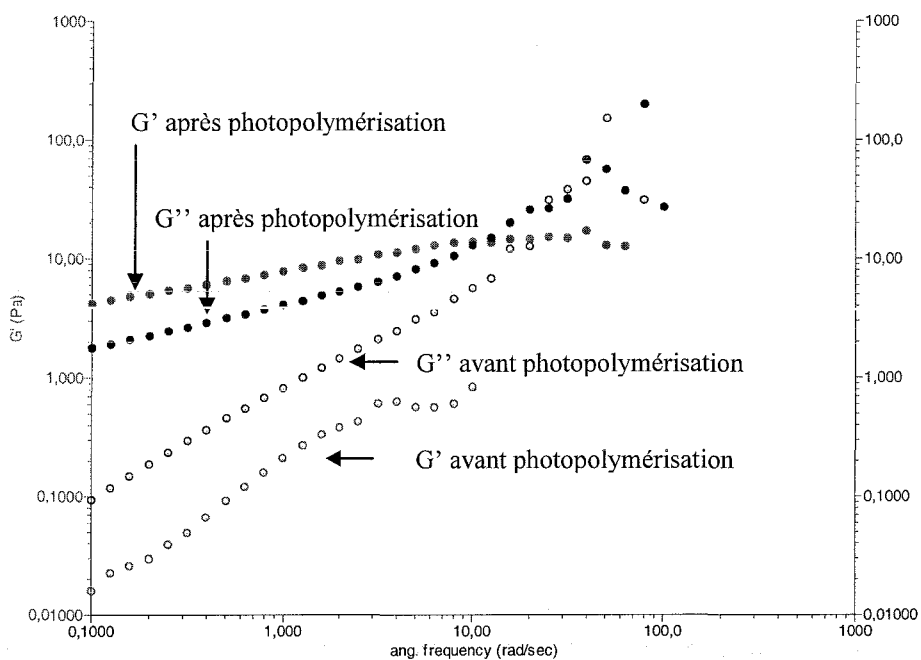


Figure 16 : G' , G'' en fonction de la fréquence pour AA- C_{12} -2,8%-MA-13,4% avant et après photopolymérisation (conditions sur la figure 15)

4.3.2. Résultats et discussion

4.3.2.1. Etudes rhéologiques sur les dérivés obtenus avec le 2-chloroéthylméthacrylate

Pour certains systèmes, nous avons pu montrer que la puissance de la lampe utilisée avait une influence sur le déclenchement de la réticulation. Ainsi certains systèmes ne polymérisent qu'avec la lampe Oriel.

Les résultats obtenus pour le AA-C₁₂-2,8%-MA-13,4% avant, pendant et après illumination avec la lampe Oriel sont illustrés sur les figures 15 et 16. Le tableau 5 rassemble les valeurs des modules élastique G' et visqueux G'' des différents produits étudiés.

Nous pouvons constater qu'avant illumination, les propriétés rhéologiques dépendent du taux de fixation en C₁₂. En effet, pour un taux en C₁₂ de 0% ou 2,8%, les solutions préparées présentent des propriétés de solutions visqueuses (avec un module élastique G' inférieur au module visqueux G''). En revanche, le dérivé ayant un taux de C₁₂ de 4% possède les propriétés d'un hydrogel avec un G' supérieur au G'' : la présence des chaînes alkyle à un tel taux permet d'obtenir en solution aqueuse un réseau physique créé par les interactions hydrophobes.

En ce qui concerne l'effet des groupements méthacrylate, après illumination, nous constatons que tous les dérivés possèdent des propriétés d'hydrogels avec des G' supérieurs aux G'', et ceci qu'il y ait ou non des interactions hydrophobes. Nous avons donc montré la formation d'une réticulation chimique par les groupements méthacrylate lors de l'action de la lumière, réticulation qui peut conduire à renforcer la réticulation physique apportée par les interactions hydrophobes, si tant est que la polymérisation ne les ait pas détruites.

En outre, l'hypothèse sur l'effet des chaînes alkyle et sur le handicap que pouvait représenter une viscosité élevée des hydrogels sur la cinétique de photopolymérisation ne semble pas se vérifier dans ce cas. Il faut choisir un rapport taux en chaînes alkyle / taux en méthacrylate de sorte que la balance viscosité finale / temps de photopolymérisation soit optimisée.

Nous pouvons également remarquer que, pour les échantillons étudiés, la photopolymérisation peut être considérée comme complète après une exposition à la lumière de l'ordre de 20 à 25 minutes (G' et G'' atteignant des valeurs plateau en fonction du temps d'illumination). Nous avons tenté de diminuer ce temps en augmentant la concentration de 1-vinylpyrrolidone dans la solution de photopolymérisation (augmentation de la concentration de 1% à 5%).

Rapport molaire C_{12} fixé ^a	Rapport molaire méthacrylate fixé ^b	avant photopolymérisation		après photopolymérisation	
		G' ^c (Pa)	G'' ^c (Pa)	G' ^c (Pa)	G'' ^c (Pa)
4	8,6	40	10	110	30
2,8	13,4	0,2	0,7	9	4
0	14	0,01	0,5	80	8

Tableau 5 : Paramètres rhéologiques de différents AA- C_{12} -x%-MA-y% avant et après photopolymérisation (20°C, 20 g.L⁻¹ dans la solution de photopolymérisation définie au §4.1, lampe Oriol)
^{a, b} définis dans le tableau 2

^c G' , G'' déterminés dans le milieu réactionnel à une contrainte de 1Pa et à une fréquence de 1 rad.s⁻¹

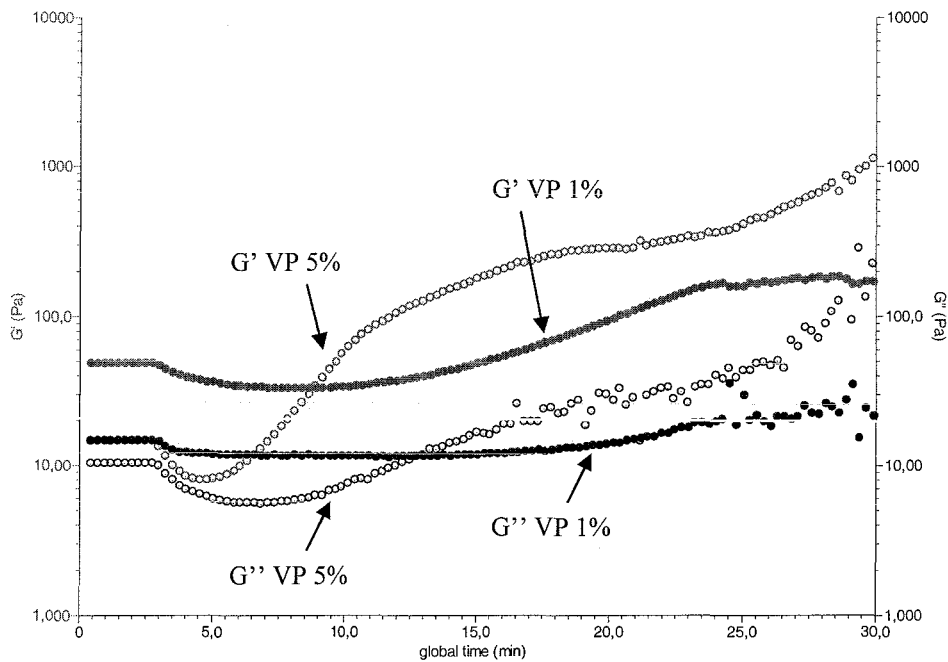


Figure 17 : G' , G'' en fonction du temps d'illumination pour AA- C_{12} -4%-MA-8,6% pour deux concentrations en 1-vinylpyrrolidone VP (conditions sur la figure 15)

En effet, la 1-vinylpyrrolidone VP joue le rôle de comonomère dans la polymérisation et devrait permettre de surmonter l'encombrement stérique autour de la double liaison portée par le HA modifié et ainsi d'augmenter la vitesse de polymérisation.

Sur la figure 17, nous constatons que, lorsque la concentration en VP est multipliée par 5, le temps nécessaire pour obtenir un polymère réticulé chimiquement diminue de 25 minutes à 12 minutes, les valeurs des paramètres G' et G'' étant approximativement conservées. L'hypothèse sur le rôle de la VP semble donc confirmée.

4.3.2.2. Etudes rhéologiques sur les dérivés obtenus avec l'anhydride méthacrylique

Un essai de photopolymérisation d'un dérivé monosubstitué par l'anhydride méthacrylique, AA-MA-7%, a été réalisé dans les mêmes conditions que celles de l'étude décrite au paragraphe 4.3.2.1, avec la lampe Oriel. Les résultats rhéologiques de cet essai sont présentés sur la figure 18. Ils sont comparés à ceux d'un dérivé monosubstitué par du 2-chloroéthylméthacrylate, AA-MA-14%.

Comme nous l'avons remarqué lors des essais qualitatifs, nous pouvons constater des cinétiques de photopolymérisation très différentes. En effet, la photopolymérisation est beaucoup plus rapide dans le cas d'un dérivé obtenu par la voie anhydride méthacrylique (10 minutes) que dans le cas d'un dérivé obtenu par la voie du 2-chloroéthylméthacrylate (30 minutes), et ce, malgré un taux de fixation en méthacrylate plus faible pour le dérivé de l'anhydride méthacrylique (7% au lieu de 14%). Pour expliquer ce phénomène, nous avons émis l'hypothèse de la différence de flexibilité des chaînes porteuses des groupements méthacrylate selon le réactif utilisé (§4.2.2).

En outre, nous pouvons remarquer que les valeurs des modules G' et G'' du AA-MA-7% -voie anhydride méthacrylique- sont supérieures à celles du AA-MA-14% -voie 2-chloroéthylméthacrylate.

Des études rhéologiques pour deux produits synthétisés à partir d'anhydride méthacrylique ont été réalisées avec la lampe Optilux : AA-MA-3% et AA-C₁₂-3%-MA-4%. Les résultats sont donnés sur la figure 19.

Nous voyons qu'à l'état initial, l'AA portant des chaînes alkyle présente des propriétés d'hydrogel dues à l'existence d'interactions hydrophobes en milieu salin, ce qui n'est pas le cas de l'AA modifié uniquement par les groupements méthacrylate. A l'état final, le dérivé réticulé chimiquement et le dérivé doublement réticulé présentent des valeurs de G' et G'' du même ordre de grandeur. Il semble donc qu'il n'y ait pas de synergie entre la réticulation physique et la réticulation chimique.

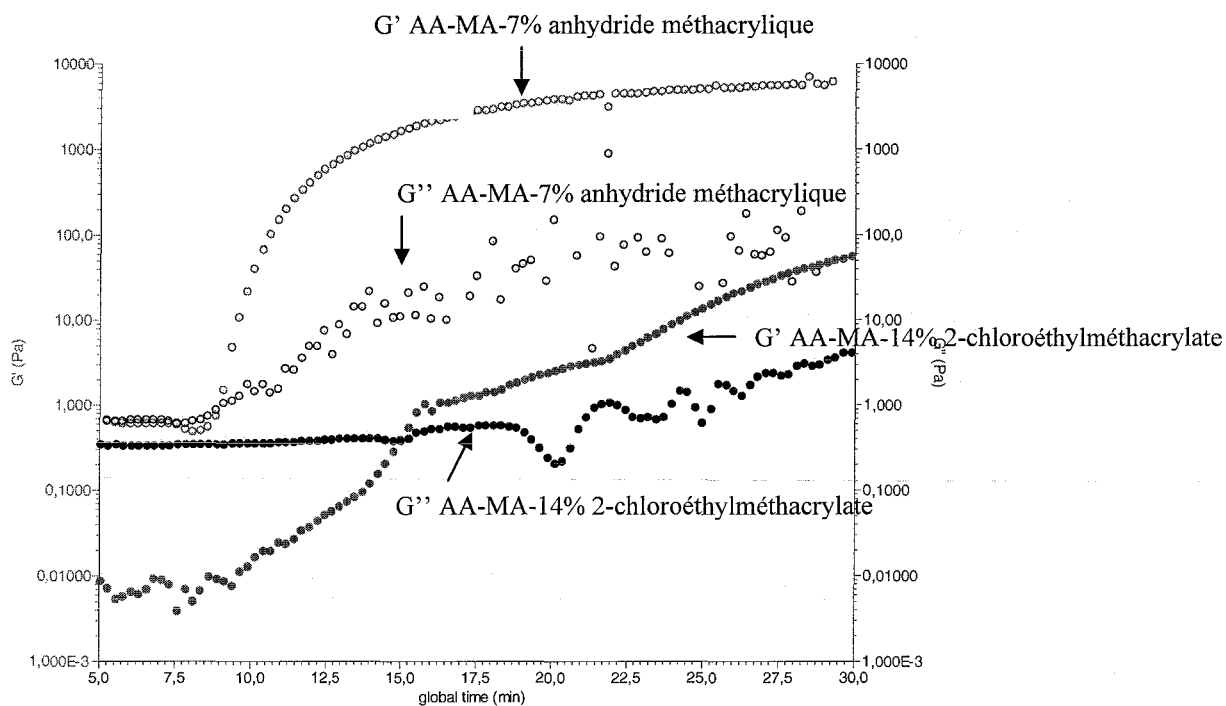


Figure 18 : G' , G'' en fonction du temps d'illumination pour deux AA doublement modifiés, groupements méthacrylate fixés selon les deux voies de synthèse (conditions sur la figure 15)

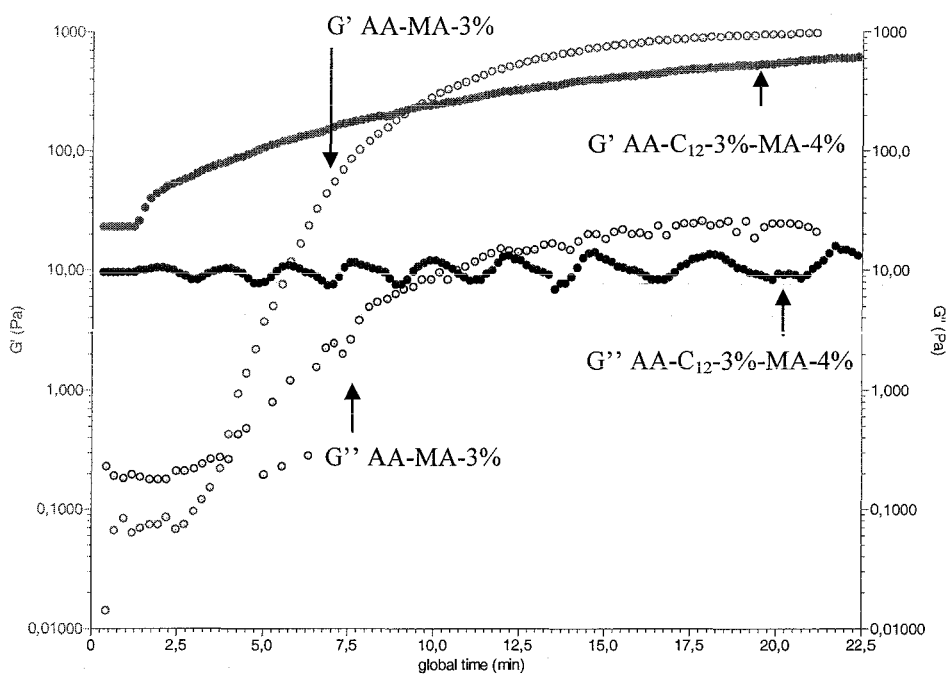


Figure 19 : G' , G'' en fonction du temps d'illumination pour deux AA modifiés, groupements méthacrylate fixés par la voie de l'anhydride méthacrylique (conditions sur la figure 15, lampe Optilux)

4.4. Conclusion

Après la synthèse de dérivés d'AA doublement substitués, à la fois par des groupements méthacrylate et par des chaînes alkyle, nous avons évalué leur capacité à former des hydrogels réticulés chimiquement et nous avons pu mettre en évidence de manière qualitative et quantitative l'existence de la réticulation chimique obtenue par photopolymérisation.

Cette polymérisation se réalise quelle que soit la voie de synthèse envisagée, voie anhydride méthacrylique ou voie 2-chloroéthylméthacrylate. Cependant, des différences de cinétique de photopolymérisation existent entre ces deux voies : les dérivés obtenus à partir de l'anhydride méthacrylique polymérisent beaucoup plus rapidement que les dérivés obtenus à partir du 2-chloroéthylméthacrylate.

Nous avons donc mis en évidence la formation d'une réticulation chimique par les groupements méthacrylate sous l'action de la lumière. Mais, les études réalisées tendent à montrer qu'il n'y a pas forcément de synergie entre la réticulation physique, créée par les interactions hydrophobes, et la réticulation chimique. En effet, après photopolymérisation, un dérivé réticulé chimiquement et un dérivé doublement réticulé présentent des valeurs de G' et G'' du même ordre de grandeur.

Pour les applications *in vivo* visées, le fait de ne pas avoir de système réticulé physiquement après injection n'est pas gênant. En effet, à partir du moment où les avantages du système rhéofluidifiant existent lors de l'injection, il n'est pas obligatoire de conserver ce caractère pour la suite de l'opération. Le maintien du matériau dans la lésion semble possible avec la création de la réticulation chimique après injection.

5. CONCLUSION

Lors de ce travail préliminaire, nous avons préparé des dérivés d'AA doublement substitués, d'une part par des groupements méthacrylate et d'autre part par des chaînes alkyle, et ceci dans l'optique de les utiliser comme biomatériaux de comblement. Nous avons évalué la capacité de ces produits à former des hydrogels réticulés chimiquement, sous l'action de la lumière.

Différentes voies de synthèse étaient à notre disposition pour l'introduction des groupements méthacrylate sur le squelette alginique : réaction avec le glycidylméthacrylate, réaction de condensation, avec une carbodiimide, entre une amine porteuse de groupements méthacrylate et les fonctions carboxylates de l'AA, réactions mettant en jeu le 2-chloroéthylméthacrylate et l'anhydride méthacrylique. Nous nous sommes dans un premier temps focalisés sur ces deux dernières réactions pour la mise au point de la synthèse des AA doublement substitués.

En ce qui concerne la voie de synthèse mettant en jeu le 2-chloroéthylméthacrylate, nous avons réussi à fixer, sur le squelette alginique, à la fois les groupements méthacrylate et les chaînes alkyle. Cependant, le contrôle des taux de substitution présente certaines difficultés : il y a compétition entre le 2-chloroéthylméthacrylate et le dérivé bromé alkylé lors de leur fixation respective. Pour essayer de remédier à cette compétition, il serait intéressant d'effectuer une précipitation entre les ajouts des différents réactifs, pour séparer les compétiteurs, mais nous perdrons l'avantage du procédé « one pot », qui permet de réaliser les modifications avec un enchaînement direct des réactions et une facilité de mise en œuvre non négligeable. Nous avons vu, en outre, que la cinétique de photopolymérisation de ces dérivés doublement substitués était beaucoup plus lente que dans le cas des dérivés obtenus par la voie anhydride méthacrylique. L'intérêt de cette voie de synthèse semble limité.

La deuxième voie de synthèse utilisée a mis en jeu l'anhydride méthacrylique. Dans une première approche, nous avons envisagé de fixer tout d'abord les groupements méthacrylate, puis ensuite les chaînes alkyle. Des problèmes de solubilité du polymère lors de la synthèse nous ont obligés à fixer, dans un premier temps, les chaînes alkyle sur le squelette alginique, et ensuite à greffer les groupements méthacrylate. Une étude approfondie des conditions optimales pour que les liaisons ester par lesquelles les chaînes alkyle sont fixées sur le squelette polysaccharidique ne soient pas hydrolysées, a été menée. En effet, lors de la réaction avec l'anhydride méthacrylique, il y a formation d'acide méthacrylique susceptible d'hydrolyser en partie ces liaisons ester.

Différentes solutions peuvent être envisagées :

- L'emploi d'un milieu tamponné lors de cette synthèse limite l'hydrolyse des liaisons ester. Une étude de l'influence de la force ionique et du pH de cette solution tampon permettrait d'optimiser ce protocole.
- Une autre méthode consiste à utiliser la triéthylamine, la pyridine ou un mélange triéthylamine/dérivé de la pyridine, composés connus pour neutraliser l'acide formé lors de la réaction de l'anhydride méthacrylique avec des fonctions hydroxyle. Nous avons déjà vérifié que l'hydrolyse des liaisons ester était limitée avec la triéthylamine.

Les essais qualitatifs et quantitatifs de photopolymérisation de ces différents dérivés ont permis de mettre en évidence que la réticulation chimique des groupements méthacrylate fixés sur le squelette alginique, sous l'action de la lumière, était effective.

Nous avons cependant remarqué des différences de cinétique de photopolymérisation entre ces deux voies : la réticulation des dérivés issus de l'anhydride méthacrylique est beaucoup plus rapide que celle des dérivés issus du 2-chloroéthylméthacrylate. Ce comportement est sans doute dû à la différence de flexibilité des chaînes porteuses des groupements méthacrylate rendant les fonctions polymérisables plus ou moins accessibles selon le réactif utilisé.

Nous avons également montré qu'il n'y avait pas obligatoirement coexistence des interactions hydrophobes et de la réticulation chimique. En effet, après photopolymérisation, un dérivé réticulé chimiquement et un dérivé doublement réticulé présentent des valeurs de G' et G'' du même ordre de grandeur. Pour les applications *in vivo* visées, le fait d'avoir un système rhéofluidifiant est nécessaire pour l'injection mais ne présente pas de caractère indispensable après injection. C'est la réticulation chimique obtenue par illumination, après injection, qui rendrait possible le maintien du matériau dans la lésion.

Pour l'un des dérivés préparés, un essai de photopolymérisation a été entrepris dans des conditions proches de la photopolymérisation transdermale. En effet, un échantillon dissous dans la solution photoamorceuse a été placé dans une cuve en verre de forme conique de 2-3 centimètres d'épaisseur et a été recouvert d'une peau de rat totale de 1 millimètre d'épaisseur. La lampe Optilux (utilisée lors de nos essais qualitatifs) a été ensuite mise en route pour illuminer pendant 15 minutes la peau de rat couvrant l'échantillon. Au bout de ce temps d'illumination, la solution de polymère modifié s'était convertie en un hydrogel photopolymérisé, dans tout le volume de la cellule.

La recherche actuelle s'intéresse largement à ce type de matériaux stimulus-sensibles. La réunion de la Société de Recherche Orthopédique qui s'est déroulée à San Francisco en mars 2004 est une preuve de cet intérêt^{11,49,50}. De nombreux travaux sur des hydrogels chimiques obtenus par photopolymérisation ont été présentés, notamment leur effet biologique *in vitro* et *in vivo*. Ces biomatériaux se révèlent prometteurs aussi bien au niveau mécanique que biologique pour des applications d'ingénierie tissulaire et de réparation du cartilage, ce qui nous encourage à continuer dans cette voie de recherche.

6. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Barbucci R., Lamponi S., Borzacchiello A., Ambrosio L., Fini M., Torricelli P., Giardino R. "Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis" *Biomaterials* **2002**, *23*, 4503-4513.
- (2) Jin Y., Yamanaka J., Sato S., Miyata I., Yomota C., Yonese M. "Recyclable characteristics of hyaluronate-polyhydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled releases" *J. Controlled Rel.* **2001**, *73*, 173-181.
- (3) Leach J.B., Schmidt C.E. "Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds" *Biomaterials* **2005**, *26*, 125-135.
- (4) Park Y.D., Tirelli N., Hubbell J.A. "Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks" *Biomaterials* **2003**, *24*, 893-900.
- (5) Prestwich G.D., Marecak D.M., Marecek J.F., Vercruyse K.P., Ziebell M.R. "Controlled chemical modification of hyaluronic acid : synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives" *J. Controlled Rel.* **1998**, *53*, 93-103.
- (6) Shu X.Z., Liu Y., Palumbo F.S., Luo Y., Prestwich G.D. "In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering" *Biomaterials* **2004**, *25*, 1339-1348.
- (7) Smeds K.A., Pfister-Serres A., Hatchell D.L., Grinstaff M.W. "Synthesis of a novel polysaccharide hydrogel" *Pure Applied Chemistry* **1999**, *A36*, 981-989.
- (8) Smeds K.A., Grinstaff M.W. "Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation" *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *54*, 115-121.
- (9) Zanellato A., Bellini D. "European patent n°ITPD20020064 **2003**.
- (10) Bulpitt P., Aeschlimann D. "New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels" *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *47*, 152-169.
- (11) Nettles D., Hsu D., Vail T.P., Morgan M.T., Grinstaff M.W., Setton L.A. "In situ crosslinkable hyaluronan for cartilage repair" *50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, paper 202* **2004**.
- (12) Zhang X., Wu D., Chu C.-C. "Synthesis and characterization of partially biodegradable, temperature and pH-sensitive dex-MA/PNIPAAm hydrogels" *Biomaterials* **2004**, *25*, 4719-4730.
- (13) Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Franssen O., Talsma H., Van Steenberg M.J., Kettenes-Van Den Bosch J.J., Hennink W.E. "Synthesis, characterization and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran" *Macromolecules* **1995**, *28*, 6317-6322.
- (14) Zhang Y., Won C.Y., Chu C.-C. "Synthesis and characterization of biodegradable network hydrogels having both hydrophobic and hydrophilic components with controlled swelling behavior" *Journal of Polymer Science: part A: Polymer Chemistry* **1999**, *37*, 4554-4569.
- (15) Zhang Y., Won C.Y., Chu C.-C. "Synthesis and characterization of biodegradable hydrophobic-hydrophilic hydrogel networks with a controlled swelling property" *Journal of Polymer Science: part A: Polymer Chemistry* **2000**, *38*, 2392-2404.
- (16) Kim S.H., Won C.Y., Chu C.C. "Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking" *Carbohydrate Polymers* **1999**, *40*, 183-190.
- (17) Li Q., Williams C.G., Sun D.D.N., Wang J., Leong K., Elisseeff J.H. "Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate" *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *68A*, 28-33.
- (18) Ishihara M., Nakanishi K., Ono K., Sato M., Kikuchi M., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Uenoyama M., Kurita A. "Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process" *Biomaterials* **2002**, *23*, 833-840.
- (19) De Paep I., Declercq H., Cornelissen M., Schacht E. "Novel hydrogels based on methacrylate-modified agarose" *Polymer Int* **2002**, *51*, 867-870.
- (20) West J.L., Hubbell J.A. "Separation of the arterial wall from blood contact using hydrogel barriers reduces intimal thickening after balloon injury in the rat: the roles of medial and luminal factors in arterial healing" *Proc Natl Acad Sci* **1996**, *93*, 13188-13193.
- (21) Hill-West J.L., Chowdury S.M. "Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers" *Proc Natl Acad Sci* **1994**, *91*, 5967-5971.

- (22) Sawhney A.S., Pathak C.P. "Optimization of photopolymerized bioerodible hydrogel properties for adhesion prevention" *J.Biomed.Mater.Res.* **1994**, *28*, 831-838.
- (23) Hill-West J.L., Dunn R.C. "Local release of fibrinolytic agents for adhesion prevention" *J.Surg.Res.* **1995**, *59*, 759-763.
- (24) Chowdury S.M., Hubbell J.A. "Adhesion prevention with anicrod released via a tissue-adherent hydrogel" *J.Surg.Res.* **1996**, *61*, 58-64.
- (25) Peppas N.A., Keys K.B. "Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery" *J.Controlled Rel.* **1999**, *62*, 81-87.
- (26) An Y., Hubbell J.A. "Intraarterial protein delivery via intimately adherent bilayer hydrogels" *J.Controlled Rel.* **2000**, *64*, 205-215.
- (27) Lu S., Ramirez W.F. "Photopolymerized, multilaminated matrix devices with optimized nonuniform initial concentration profiles to control drug release" *J.Pharm.Sci.* **2000**, *89*, 45-51.
- (28) Fleming M.G., Maillet W.A. "Photopolymerization of composite resin using the argon laser" *J.Can.Dent.Assoc.* **1999**, *65*, 447-450.
- (29) Maffezzoli A., Della Pietra A. "Photopolymerization of dental composite matrices" *Biomaterials* **1994**, *15*, 1221-1228.
- (30) Scranton A.B., Bowman C.N., Peiffer R.W. "Photopolymerization : fundamentals and applications" *New Orleans, ACS publishers* **1996**.
- (31) Decker C. "UV-curing chemistry: past, present and future" *J.Coat.Technol.* **1987**, *59*, 97-106.
- (32) Fouassier J.P. "Photoinitiation, photopolymerization and photocuring" *Hanser/Gardner Publications, Inc., Cincinnati* **1995**.
- (33) Nguyen K.T., West J.L. "Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications" *Biomaterials* **2002**, *23*, 4307-4314.
- (34) West J.L., Hubbell J.A. "Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration" *Macromolecules* **1999**, *32*, 241-244.
- (35) Mann B.K., Gobin A.S. "Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering" *Biomaterials* **2001**, *22*, 3045-3051.
- (36) Dumanian G.A., Dascombe W. "A new photopolymerizable blood vessel glue that seals human vessel anastomoses without augmenting thrombogenicity" *Plast.Reconstr.Surg.* **1995**, *95*, 901-907.
- (37) Bellini D., Zanellato A. "Ester derivatives of hyaluronic acid for the preparation of hydrogel materials by photocuring" *European Patent WO03076475* **2003**.
- (38) Bryant S.J., Nuttelman C.R. "Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on culture NIH/3T3 fibroblasts in vitro" *J.Biomater.Sci.Polym.Sci.Ed.* **2000**, *11*, 439-457.
- (39) Kim K., Shin K., Kim H., Kim C., Byun Y. "In situ photopolymerization of a polymerizable poly(ethylene glycol)-covered phospholipid monolayer on a methacryloyl-terminated substrate" *Langmuir* **2004**, *20*, 5396-5402.
- (40) Abe R., Hara K., Sayama K., Domen K., Arakawa H. "Steady hydrogen evolution from water on eosin Y-fixed TiO₂ photocatalyst using a silane-coupling reagent under visible light irradiation" *Journal of photochemistry and photobiology and chemistry* **2000**, *137*, 63-69.
- (41) Islam S.D.M., Konishi T., Fujitsuka M., Ito O., Nakamura Y., Usui Y. "Photosensitized reduction of methyl viologen using eosin-Y in presence of a sacrificial electron donor in water-alcohol mixture" *Photochemistry and photobiology* **2000**, *71*, 675-680.
- (42) Orban J.M., Faucher K.M., Dluhy R.A., Chaikof E.L. "Cytomimetic biomaterials. 4. In-situ photopolymerization of phospholipids on an alkylated surface" *Macromolecules* **2000**, *33*, 4205-4212.
- (43) Fisher J.P., Dean D., Engel P.S., Mikos A.G. "Photoinitiated polymerization of biomaterials" *Annual review of materials research* **2001**, *31*, 171-181.
- (44) Odian G. "Principles of polymerization" *3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York* **1994**, 248.
- (45) Elisseeff J.H., Anseth K. "Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation" *Proc Natl Acad Sci* **1999**, *96*, 3104-3107.

- (46) Elisseeff J.H., Anseth K. "Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage" *Plast.Reconstr.Surg.* **1999**, *104*, 1014-1022.
- (47) Langer R.S., Elisseeff J.H., Anseth K., Sims D. "Semi-interpenetrating or interpenetrating polymer networks for drug delivery and tissue engineering" *US Patent n°6,224, 893* **2001**.
- (48) Anseth K., Langer R.S., Shastri V. "Biodegradable polymer networks for use in orthopaedic and dental applications" *US Patent n°5,902,599* **1999**.
- (49) Williams C.G., Anseth K., Gurkan I., Sharma B., Parks B., Wang D., Meyers J., Wenz J., Elisseeff J.H. "Cartilage repair using a photocurable-mesenchymal stem cell hydrogel in a large animal" *50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, paper 664* **2004**.
- (50) Williams C.G., Sharma B., Kim T.K., Khan M., Manson P., Elisseeff J.H. "In vitro photoencapsulation of mesenchymal stem cells in an injectable hydrogel for cartilage tissue engineering" *50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, paper 711* **2004**.
- (51) Elisseeff J.H., McIntosh W. "Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks" *J.Biomed.Mater.Res.* **2000**, *51*, 164-171.
- (52) Sawhney A.S., Pathak C.P. "Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(a-hydroxy acid) diacrylate macromers" *Macromolecules* **1993**, *26*, 581-587.
- (53) Kim I., Jeong Y. "Self-assembled hydrogel nanoparticles composed of dextran and poly(ethylene glycol) macromer" *Int.J.Pharm.* **2000**, *205*, 109-116.
- (54) Muller B. "Photocrosslinked polymers" *US Patent, Ciba Vision Corporation 678,437* **1996**.
- (55) Martens P., Anseth K. "Characterization of hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers" *Polymer* **2000**, *41*, 7715-7722.
- (56) Nuttelman C.R., Henry S.M., Anseth K.S. "Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds" *Biomaterials* **2002**, *23*, 3617-3626.
- (57) Schmedlen R.H., Masters K.S., West J.L. "Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering" *Biomaterials* **2002**, *23*, 4325-4332.
- (58) Rastello-de Boisseson M. "Microparticules d'alginate associatifs : élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives" *thèse de doctorat, ENSIC, INPL, Nancy, France* **2002**.
- (59) Pelletier S. "Synthèse et caractérisation physico-chimique de dérivés associatifs d'alginate et de hyaluronate de sodium en vue d'applications biomédicales" *thèse de doctorat, ENSIC, INPL, Nancy, France* **1999**.
- (60) Bower V.E., Bates R.G. "Standard potential of the silver-silver chloride electrode" *J.Res.Natl.Bur.Stand.* **1954**, *55*, 197.
- (61) Perrin D.D., Dempsey B., Albert A. "Buffers for pH and metal ion control" *Chapman and Hall, London* **1974**, 8-42.
- (62) Höfle G., Steglich W., Vorbrüggen H. "4-Dialkylaminopyridines as highly active acylation catalysts" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 569-583.
- (63) Scriven E.F.V. "4-Dialkoxylaminopyridines: super acylation and alkylation catalysts" *Chem. Soc. Rev.* **1983**, *12*, 129-161.

Conclusion

Conclusion

Ce travail de thèse avait pour but d'évaluer la capacité de dérivés de hyaluronate doublement modifiés à former des hydrogels stables en milieu aqueux, pouvant être utilisés comme biomatériaux de comblement de lésions ostéocondrales. Pour atteindre cet objectif, nous avons associé à la réticulation physique réversible en milieu aqueux de dérivés amphiphiles de hyaluronate, une réticulation chimique irréversible en faible proportion.

Au cours de ce travail, nous avons préparé une large gamme de dérivés amphiphiles et doublement modifiés du HA. Cette synthèse a consisté à fixer, de façon covalente, par l'intermédiaire de liaisons ester, des chaînes hydrophobes en C₁₂ et du tétraéthylèneglycol difonctionnel, sur le squelette polysaccharidique, en phase homogène.

Un certain nombre de paramètres pouvant avoir une influence sur cette synthèse a été étudié et une optimisation des taux de substitution a été nécessaire, afin d'obtenir des systèmes monophasiques, répondant au mieux aux exigences mécaniques des biomatériaux de comblement.

Les dérivés synthétisés, substitués d'une part par des chaînes alkyle, et réticulés d'autre part par du tétraéthylèneglycol ditosylé, sont destinés à être utilisés sous forme d'hydrogels, lors de leurs applications. Il a donc été nécessaire d'étudier leur comportement rhéologique en milieu aqueux, en régime semi-dilué.

Nous avons, dans un premier temps, mis en évidence la double réticulation en milieu aqueux des dérivés préparés, après avoir étudié des HA réticulés uniquement de façon chimique et un HA substitué par un groupement, en chaîne pendante, de structure voisine du tétraéthylèneglycol.

Nous avons ensuite montré que l'introduction de chaînes hydrophobes et de réticulation chimique sur le HA conduisait à une augmentation de la viscosité des solutions au premier plateau newtonien et des modules G' et G'' par rapport au HA parent : il y a formation, en régime semi-dilué, d'un réseau polymère tridimensionnel stabilisé par les associations hydrophobes intermoléculaires et renforcé par l'existence d'une réticulation chimique.

La fixation de ces groupements sur le squelette polysaccharidique se traduit donc par la formation de polymères aux propriétés associatives plus ou moins prononcées selon le taux de fixation en chaînes alkyle et le taux en tétraéthylène glycol fixé. L'influence de différents paramètres du procédé de synthèse sur le comportement rhéologique des HA doublement modifiés a également été mise en évidence, notamment l'agitation utilisée.

Conclusion

Ces hydrogels de HA étant destinés à être utilisés comme biomatériaux de comblement de lésions ostéochondrales, des études rhéologiques complémentaires ont été réalisées, afin de tenir compte des exigences du cahier des charges de tels biomatériaux.

Lors de l'étude de la stérilisation de ces dérivés, nous avons constaté que l'autoclavage dégradait les chaînes de polymère. Il serait préférable d'utiliser une autre technique de stérilisation, potentiellement moins dégradante, par exemple les rayons UV.

Par ailleurs, à 37°C, en milieu physiologique, les solutions visqueuses ou les hydrogels de HA modifié ne sont pas très stables chimiquement sur une longue période, mais, sur une période de 21 jours, on peut estimer que les propriétés rhéologiques restent suffisamment bonnes pour qu'ils puissent être utilisés comme matériaux de comblement de lésions ostéochondrales.

Certains des polymères doublement modifiés remplissaient, de manière satisfaisante, les premiers points du cahier des charges d'un biomatériau de comblement (propriétés rhéologiques adéquates, malléabilité, stabilité suffisante à la stérilisation et dans les conditions d'usage). Nous avons alors étudié l'intérêt éventuel de la double réticulation sur les réponses biologiques données par les chondrocytes, en termes de viabilité, de prolifération cellulaire et de synthèse de protéoglycanes. Pour réaliser ces études biologiques, il était nécessaire de placer les cellules dans une structure tridimensionnelle d'alginate de calcium, pour qu'elles conservent leur phénotype.

Nous avons tout d'abord évalué la rétention du HA (modifié ou non) inclus dans une matrice tridimensionnelle d'alginate de calcium, en quantifiant la cinétique de libération du HA dans différentes conditions. De nombreux facteurs influencent cette cinétique : la masse molaire de l'alginate utilisé, sa structure séquentielle, sa concentration, la masse molaire du HA, sa concentration, la concentration totale en polysaccharides choisie pour la fabrication des billes, le type de modification effectuée sur le HA ou éventuellement sur l'alginate, et leurs propriétés rhéologiques en mélange.

A un temps donné, pour des billes d'alginate de calcium natif, la quantité de HA maintenue dans les billes est maximale dans le cas du HA natif. La libération du HA modifié par des chaînes C₁₂ est moindre que celle d'un HA doublement modifié, cas le moins intéressant en terme de quantité maintenue. Ainsi, les modifications chimiques apportées au HA ne permettent pas d'augmenter la rétention de celui-ci dans les billes, bien au contraire. Il semblerait que les propriétés rhéologiques des mélanges étudiés et le changement de structure des billes d'alginate en présence de hyaluronate expliquent ce phénomène de libération non désirée.

Conclusion

En ce qui concerne les réponses biologiques données par les chondrocytes ensemencés dans différents matériaux, nous avons vu que la présence de hyaluronate dans les cultures tridimensionnelles augmentait la prolifération cellulaire et la synthèse des protéoglycanes, alors que ces paramètres biologiques, en présence de HA doublement modifié, sont apparemment plus faibles que ceux observés dans les autres cas. Ces résultats sont vraisemblablement à mettre en relation avec le fait que les HA doublement modifiés sont beaucoup moins retenus dans les billes que les autres HA, pour des raisons liées au réseau des matrices.

Il aurait été intéressant de tester ces biomatériaux *in vivo*, directement dans une lésion ostéochondrale, afin de voir si les hydrogels de polymères doublement modifiés présentaient une meilleure résistance à la dilution aux fluides biologiques par rapport à un hydrogel de polymères modifiés uniquement par des chaînes alkyle, et afin d'évaluer les réponses biologiques données dans ces conditions. Faute de temps, nous n'avons pu réaliser ces expériences.

Parallèlement, une nouvelle approche pour l'obtention de ces biomatériaux de comblement a été envisagée : au lieu d'implanter des hydrogels doublement réticulés dans la lésion, nous avons préparé des hydrogels injectables à partir de polymères rhéofluidifiants en solution saline, et susceptibles d'être réticulés chimiquement *in situ* sous l'influence d'un stimulus. Pour mettre au point les conditions de synthèse, nous avons commencé par préparer des dérivés d'alginate (beaucoup moins coûteux que le HA) doublement substitués, d'une part par des groupements méthacrylate photopolymérisables et, d'autre part par des chaînes alkyle.

Différentes voies de synthèse étaient à notre disposition pour la fixation des groupements méthacrylate sur le squelette alginique ; nous nous sommes focalisés sur les réactions mettant en jeu le 2-chloroéthylméthacrylate et l'anhydride méthacrylique. Par ces deux voies de synthèse, nous avons réussi à fixer, sur le squelette alginique, à la fois les groupements méthacrylate et les chaînes en C₁₂. Cependant, le contrôle des taux de substitution n'est pas très aisé.

Par des essais qualitatifs et quantitatifs, nous avons mis en évidence que, sous l'action de la lumière, la réticulation chimique des groupements méthacrylate fixés sur le squelette alginique était effective pour les différents dérivés. Une différence en terme de cinétique de photopolymérisation est cependant à noter : les dérivés obtenus à partir de l'anhydride méthacrylique réticulent plus rapidement que ceux synthétisés avec le 2-chloroéthylméthacrylate.

Conclusion

Nous avons également montré qu'il n'y avait pas obligatoirement coexistence des interactions hydrophobes et de la réticulation chimique. Ceci n'est pas gênant pour les applications *in vivo* visées, puisque le fait d'avoir un système rhéofluidifiant ne présente pas de caractère indispensable après injection ; la réticulation chimique obtenue par action de la lumière, après injection, rendra possible le maintien du matériau dans la lésion.

Actuellement, les hydrogels chimiques obtenus par photopolymérisation, et plus généralement les matériaux stimulus-sensibles, font l'objet de nombreux travaux. Ces biomatériaux semblent prometteurs aussi bien d'un point de vue mécanique que biologique pour des applications d'ingénierie tissulaire et de réparation du cartilage. Ces recherches nous poussent à continuer dans cette voie, d'autant plus que la photopolymérisation de l'un des dérivés préparés, réalisée dans des conditions proches de la photopolymérisation transdermale, a donné des résultats encourageants : la solution de polymère modifié, recouverte d'une peau de rat totale, s'est convertie, après 15 minutes d'illumination, en un hydrogel photopolymérisé.

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Guy MULLER, Directeur de Recherche, LPBM, Université de Rouen, Rouen

Monsieur Denis LABARRE, Professeur, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame AMARGIER Épouse HUIN Cécile

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Contribution à la mise au point d'un biomatériau de comblement à base de
hyaluronate pour la réparation du cartilage"**

en vue de l'obtention du titre de :

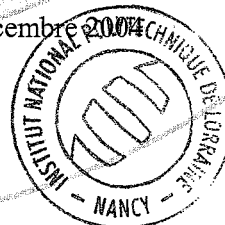
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des Procédés** »

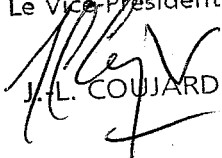
Fait à Vandoeuvre, le 16 décembre 2004

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



Pour le Président
Le Vice-Président,


J.-L. COUJARD

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE :
F - 54500
VANCEUVRE CEDEX

Résumé

Différents dérivés du hyaluronate ont été préparés en fixant chimiquement sur le squelette polymère, d'une part des chaînes alkyle longues (12 carbones) et, d'autre part, du tétraéthylène glycol difonctionnel, par l'intermédiaire de liaisons ester. Ce travail avait pour but d'évaluer la capacité de ces dérivés de hyaluronate doublement modifiés à former des hydrogels stables en milieu aqueux, dans l'optique de les utiliser comme biomatériaux de comblement de lésions ostéochondrales.

Les propriétés rhéologiques de ces dérivés ont ensuite été étudiées en régime semi-dilué. L'introduction de chaînes hydrophobes et de réticulant chimique sur le hyaluronate conduit à la formation d'un réseau polymère tridimensionnel stabilisé par les associations hydrophobes intermoléculaires et renforcé par l'existence d'une réticulation chimique.

Après évaluation *in vitro* de ces matériaux, nous avons montré que, contrairement au hyaluronate natif, les dérivés doublement modifiés, inclus dans des matrices tridimensionnelles d'alginate de calcium, se libéraient prématurément de ces matrices. Dans ces conditions, leur effet sur la prolifération cellulaire et sur la synthèse de protéoglycanes par les chondrocytes a donc été difficile à évaluer.

Comme nouvelle approche pour obtenir des biomatériaux de comblement, nous avons entrepris de préparer des hydrogels rhéofluidifiants en solution saline, donc injectables, et porteurs de groupes photosensibles, susceptibles de former la réticulation chimique *in situ* sous l'influence de la lumière.

Mots-clés : hyaluronate, hydrogel, biomatériau de comblement, réparation du cartilage.

Summary

Various hyaluronate derivatives were prepared by covalent fixation of both alkyl chains (12 carbons) and a difunctional tetraethyleneglycol onto the polysaccharide, via ester functions. The aim of this work was to evaluate the ability of these dually-modified hyaluronate derivatives to form hydrogels, stable in aqueous solution, that can be used as scaffolds for cartilage regeneration.

The rheological properties of the derivatives in semi-dilute regime were studied. The dually-modified polysaccharide formed a three-dimensional network, stabilized by intermolecular hydrophobic interactions and reinforced by the chemical covalent crosslinks.

After an *in vitro* evaluation of these materials, we demonstrated that, contrary to native hyaluronate, the dually-modified derivatives, embedded in three-dimensional matrices of calcium alginate, were rapidly released from these matrices. In these conditions, their effect on cell proliferation and proteoglycan syntheses by chondrocytes was consequently difficult to assess.

As a new approach to obtain scaffolds, we investigated the possibility to prepare injectable hydrogels, obtained from derivatives exhibiting a shear-thinning behavior in saline solution and modified with photosensitive groups, which could form *in situ* a chemical crosslinking, after the stimulus action.

KeyWords : hyaluronate, hydrogel, scaffold, cartilage repair.