



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>

THESE



Présentée et soutenue

le 13 Novembre 1998

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY 1

Mention Génie Biologique et Médical

par

Sandra OERTHER

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

Génie des Procédés (INPL)

**Conception et évaluation de biomatériaux polysaccharidiques
pour le comblement de lésions ostéochondrales .
Intérêt de l'association alginate - hyaluronate**

MEMBRES DU JURY

Président : Professeur D. MAINARD

Rapporteurs : Professeur W. HORNEBECK
Professeur A. ESCOUSSE

Juges : Professeur E. DELLACHERIE
Docteur F. LAPICQUE
Docteur E. PAYAN

BIBLIOTHEQUE MEDECINE NANCY 1



D

007 148001 6

Je dédie ce travail,

A mon ami

A mes parents

A mon fils

A mon frère

A tous mes proches

Sans lesquels, je n'aurais pas eu la volonté de finir ces années de recherches.

Ce travail a été réalisé dans l'unité de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires (UMR 7561) à la Faculté de Médecine de Nancy.

Je remercie le Professeur Patrick NETTER, Directeur du Laboratoire, de m'avoir accueillie au sein d'une de ses équipes.

Je tiens également à remercier le Professeur Didier MAINARD, Directeur de l'IEBM de bien vouloir assister le jury de cette thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur André ESCOUSSSE, Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Médecine de Dijon et Monsieur William HORNEBECK, Directeur de Recherches CNRS à la Faculté de Médecine de Reims, de juger ce travail.

Je suis profondément reconnaissante à Madame Françoise LAPICQUE, Maître de Conférences des Universités, pour l'aide et le soutien permanents qu'elle m'a apportés tout au long de ces années. Je veux également la remercier pour la gentillesse et la disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard.

Je tiens à remercier Madame Elisabeth PAYAN, Chargée de Recherche au CNRS, d'avoir guidé mes travaux de recherche. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie Madame Edith DELLACHERIE, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur François LAPICQUE, Directeur de Recherches au CNRS à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, pour ses précieux conseils scientifiques. Je tiens également à le remercier pour le temps qu'il m'a accordé ainsi que pour son soutien moral et sa gentillesse.

Je remercie Monsieur Hans-Günther LINTZ, Directeur du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, de m'avoir donné l'accès au matériel d'études rhéologiques de son Laboratoire. Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur Hervé LE GALL, Assistant Ingénieur, pour ses conseils et son aide technique.

Je remercie Monsieur Jean-François STOLZ, Professeur à la Faculté de Médecine de Nancy, de m'avoir donné l'accès au viscosimètre de son Laboratoire et j'associe mes remerciements à Mesdames Ghislaine CAUCHOIS et Monique GENTILS pour leur assistance technique.

Je remercie Monsieur Jean DEXHEIMER, Professeur au Laboratoire de Biologie Forestière à la Faculté des Sciences de Nancy, de m'avoir initiée au Microscope Electronique à Transmission. Je tiens tout particulièrement à remercier à Joëlle GERARD pour son aide technique ainsi que Monsieur AYATI.

Je tiens également à remercier Mademoiselle Anne-Catherine Maurin, étudiante en DEA (1996-97) à l'université Henri Poincaré de Nancy, pour sa contribution à ce travail.

Je ne saurais oublier de remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire et tout spécialement Monsieur BORDJI Karim, Madame Dominique BAPTISTE et Mademoiselle Marie-Hélène PIET.

Un très grand merci à mes camarades du Laboratoire et en particulier à Mesdemoiselles Corinne GUINGAMP et Emmanuelle NEDELEC pour leur amitié et leur soutien.





SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	16
I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
1. CARTILAGE ARTICULAIRE.....	19
1.1. COMPOSITION DU CARTILAGE.....	19
1.2. CONSTITUANTS DU CARTILAGE.....	20
1.2.1. Chondrocytes.....	20
1.2.2. Collagènes.....	21
1.2.3. Protéoglycanes.....	22
1.1.2. Glycoprotéines non collagéniques.....	24
1.2. ROLE DU CARTILAGE.....	24
1.3. LESIONS OSTEOCHONDRALES.....	26
2. LES BIOMATERIAUX.....	27
2.1. EXEMPLES DE BIOMATERIAUX.....	28
2.2. BIOMATERIAUX POLYMERES SYNTHETIQUES.....	28
2.3. BIOMATERIAUX POLYMERES NATURELS.....	30
3. L'ALGINATE ET LE HYALURONATE.....	32
3.1. ALGINATE.....	32
3.1.1. Sources de l'alginate.....	32
3.1.2. Structure et arrangement moléculaire.....	32
3.1.3. Propriétés de l'alginate.....	36
3.1.4. Méthodes de gélation.....	39
3.1.5. Applications industrielles et médicales.....	40
3.2. HYALURONATE.....	43
3.2.1. Sources du hyaluronate.....	43
3.2.2. Structure.....	44
3.2.3. Propriétés du hyaluronate.....	44
3.2.4. Applications industrielles, médicales.....	47
II. PRESENTATION DE L'ETUDE	
1. CHOIX DES POLYSACCHARIDES.....	51
2. DEROULEMENT DES TRAVAUX.....	52
III. MATERIELS ET METHODES	
1. REACTIFS.....	55
1.1. POLYSACCHARIDES.....	55
1.2. AUTRES REACTIFS ET CONSOMMABLES.....	55
2. SOLUTIONS.....	56
2.1. POLYSACCHARIDES.....	56
2.2. AUTRES SOLUTIONS.....	57
3. APPAREILLAGES.....	58
4. PREPARATION DES MATRICES.....	59
4.1. DEACETYLATION DU HYALURONATE.....	59
4.2. GELATION.....	59
4.2.1. Formation des gels en forme de plaque.....	60
4.2.2. Formation des gels en forme de bille.....	61
5. RHEOLOGIE.....	61
5.1. ELEMENTS DE RHEOLOGIE.....	62
5.1.1. Cisaillement.....	62
5.1.2. Déformation et vitesse de cisaillement.....	63

5.2. APPLICATION A L'ETUDE DES POLYSACCHARIDES.....	64
5.2.1. Viscosité.....	64
5.2.2. Fluides newtoniens et non newtoniens.....	65
5.2.3. Solutions diluées newtoniennes.....	65
5.2.4. Solutions concentrées non-newtoniennes.....	68
5.2.5. Analyse des gels.....	70
5.3. PROTOCOLE D'ETUDE DE LA RHEOLOGIE DES POLYSACCHARIDES.....	74
5.3.1. Rhéologie des solutions diluées.....	74
5.3.2. Rhéologie des solutions concentrées.....	78
5.3.3. Rhéologie des gels.....	78
6. METHODES D'ETUDE DE LA BIOCOMPATIBILITE.....	80
6.1. CULTURES CELLULAIRES.....	80
6.1.1. Prolifération et viabilité cellulaires.....	81
6.1.2. Mesure de l'anabolisme des protéoglycanes.....	81
6.2. EXPERIMENTATIONS ANIMALES.....	81
7. METHODES BIOCHIMIQUES.....	82
7.1. EVALUATION DE L'HYDRATATION DES GELS.....	82
7.2. DOSAGE DU CALCIUM.....	82
7.3. DOSAGE DES GLYCOSAMINOGLYCANES.....	84
7.4. DOSAGE DE L'ACIDE HYALURONIQUE.....	84
7.4.1. Dosage par CLHP.....	84
7.4.2. Dosage radiométrique.....	85
7.4.3. Dosage des groupements N-acétyl.....	86
7.5. NUMERATION DES GLOBULES BLANCS.....	87
7.6. DOSAGE DES PROTEINES.....	87
7.7. DOSAGE DES PROSTAGLANDINES E2.....	88
8. METHODES OPTIQUES.....	88
8.1. LALLS.....	88
8.2. DICHROÏSME CIRCULAIRE.....	89
8.3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.....	89
9. INTERPRETATION DES RESULTATS.....	90
9.1. MODELISATION DE LA DIFFUSION.....	90
9.2. METHODES STATISTIQUES.....	92

IV. RESULTATS

1. MODIFICATION CHIMIQUE DU HYALURONATE.....	94
1.1. CINETIQUE DE DEACETYLATION.....	94
1.2. VARIATION DE LA MASSE MOLAIRES.....	95
1.3. CONCLUSION.....	95
2. COMPORTEMENT DES POLYSACCHARIDES EN SOLUTION.....	96
2.1. DICHROÏSME CIRCULAIRE.....	96
2.1.1. Solutions individuelles.....	96
2.1.2. Solutions de polysaccharides en mélange.....	98
2.2. COMPORTEMENT RHEOLOGIQUE DES POLYSACCHARIDES EN SOLUTION.....	100
2.2.1. Etude des solutions diluées.....	101
2.2.2. Solutions concentrées.....	110
3. ETUDE DE LA FORMATION DES GELS.....	116
3.1. OBSERVATION STRUCTURALE.....	116
3.2. PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES GELS.....	118
3.2.1. Déformation et modélisation des gels.....	118
3.2.2. Complaisance des gels.....	119
3.2.3. Coefficient de rigidité des gel.....	121
3.2.4. Coefficients de viscosité des gels.....	122
3.2.5. Conclusion.....	124
3.3. COMPOSITION DES GELS.....	125
3.3.1. Evaluation de l'hydratation des gels.....	125

3.3.2. Calcium.....	126
3.3.3. Hyaluronate.....	128
3.3.4. Détermination des coefficients de diffusion.....	131
4. ETUDE DU COMPORTEMENT DES GELS ET DE LEUR BIOCOMPATIBILITE.....	134
4.1. STABILITE DES MATRICES.....	134
4.2. CYTOCOMPATIBILITE ET ACTIVITE CELLULAIRE IN VITRO.....	136
4.2.1. Observation macroscopique.....	137
4.2.2. Mortalité cellulaire.....	137
4.2.3. Prolifération cellulaire.....	138
4.2.4. Anabolisme et catabolisme des protéoglycanes.....	140
4.3. BIOCOMPATIBILITE.....	141
4.3.1. Observations générales.....	142
4.3.2. Dosages biochimiques.....	143
4.3.3. Biofonctionnalité.....	145
 CONCLUSION GENERALE ET PESPECTIVES.....	 149
 REFERENCES.....	 152

LISTE ALPHABETIQUE DES ABREVIATIONS

DC	:	Dichroïsme circulaire
CLHP	:	Chromatographie Liquide Haute Performance
C ₄ S	:	Chondroïtine 4 sulfate
EDTA	:	Ethylène diamine tétra-acétate
DMB	:	Diméthyl-méthylène blue
DMEM	:	Dubbelco Modified Eagles Medium
F	:	Fréquences des blocs
G	:	Résidu d'acide guluronique dans l'alginate
GAGs	:	Glycosaminoglycanes sulfatés
GDL	:	D-glucono-δ-lactone
G-G	:	Bloc homopolymérique d'acide guluronique dans l'alginate
G-M, M-G	:	Bloc hétéropolymérique d'acides guluronique et mannuronique dans l'alginate
HA	:	Hyaluronate
LALLS	:	Diffusion de lumière aux petits angles
M	:	Résidus d'acide mannuronique dans l'alginate
MET	:	Microscopie électronique à transmission
M-M	:	Blocs homopolymériques d'acide mannuronique dans l'alginate
PDMA	:	4-diméthylaminobenzaldéhyde
PGA	:	Acide polyglycolique
PLA	:	Acide polylactique
Tris	:	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

LISTE ALPHABETIQUE DES SYMBOLES

a	:	Constante dans la relation de Mark-Houwink (éq 10)
a	:	Rayon du capillaire (m)
b	:	Constante dans la relation de Mark-Houwink (éq 10)
C	:	Concentration (mg/mL)
dF	:	Force de cisaillement (N)
dS	:	Unité de surface (m ²)
D	:	Coefficient de diffusion (m ² .s ⁻¹)
G	:	Module de rigidité (N.m ⁻²)
$\text{ierfc}(x)$	:	Intégrale première de la fonction erreur complémentaire $\text{erfc}(x)$
J	:	Complaisance du solide élastique (m ² .N ⁻¹)
k_H	:	Coefficient de Huggins
K	:	Constante de viscosité dans la relation de Cross (s)
K_2	:	Constante de viscosité dans la relation de Poiseuille (Pa.s ²⁻ⁿ)
l	:	Déplacement (m)
M_0	:	Masse molaire associée à chaque liaison (g.mol ⁻¹)
$\overline{M}_v$	:	Masse molaire moyenne viscosimétrique (g.mol ⁻¹)
$\overline{M}_w$	:	Masse molaire moyenne (g.mol ⁻¹)
n	:	Constante dans les relations des viscosités en fonction du gradient de vitesse
r	:	Rayon du cône (m)
R	:	Constante des gaz parfaits (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)
t	:	Temps (s)
T	:	Température (K)
x	:	Cote (m)
γ	:	Déformation de cisaillement
γ_0	:	Amplitude de la pulsation de l'excitation sinusoïdale
$\dot{\gamma}$	:	Vitesse de cisaillement ou gradient de vitesse (s ⁻¹)
$\dot{\gamma}_w$	:	Gradient de vitesse à la paroi (s ⁻¹)
Δl	:	Longueur du capillaire (m)
Δt	:	Temps nécessaire pour parcourir Δl (s)
$[\eta]$	:	Viscosité intrinsèque (mL/mg)



η	:	Viscosité dynamique (Pa.s^{-1} ou Poiseuille)
η_{red}	:	Viscosité réduite
η_{rel}	:	Viscosité relative
η_s	:	Viscosité dynamique du solvant (Pa.s^{-1} ou Poiseuille)
η_{sp}	:	Viscosité spécifique
θ	:	Ellipticité (deg)
λ	:	Longueur d'onde (nm)
ν	:	Viscosité cinématique ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)
ξ	:	Variable d'intégration
ρ	:	Masse volumique (kg/m^3)
τ	:	Contrainte de cisaillement (bar ou N.m^{-2})
τ_0	:	Constante de temps dans l'équation 22 (s)
ϕ	:	Déphasage
ω	:	Pulsation de l'excitation sinusoïdale (s^{-1})
ω_0	:	Vitesse de rotation (s^{-1})

INDICES

a à d	:	Hyaluronate déacétylé sur différents temps
Ch	:	Chondrocytes
exp	:	Expérimental
i	:	Constituant considéré
moy	:	Moyen
surf	:	Surface
stead	:	Etat stationnaire
théo	:	Théorique
I à IV	:	Origine du hyaluronate
0	:	Relatif à la vitesse de cisaillement nulle
∞	:	Relatif à la vitesse de cisaillement infinie



INTRODUCTION

Les recherches sur la régénération et/ou la réparation tissulaire sont actuellement en plein essor. L'un des domaines les plus activement exploités aujourd'hui est sans doute la réparation cartilagineuse. En effet, l'une des grandes préoccupations de ce siècle est de soulager, voire de traiter, les handicaps générés lors de pathologies articulaires inflammatoires (arthrite) et/ou dégénératives (arthrose). Celles-ci entraînent à plus ou moins long terme une destruction du cartilage. Leurs traitements classiques, tels que l'administration intra-articulaire de corticoïdes n'ont qu'un effet ponctuel et symptomatique sur la douleur et l'inflammation présentes localement, et ne sont en aucun cas capables de réparer les lésions ostéochondrales qui causent parfois un handicap fonctionnel irréversible.

Le cartilage est un tissu avascularisé qui n'est malheureusement pas capable de se restaurer spontanément sous sa forme initiale. Le tissu obtenu alors est généralement fibreux et ne possède pas les caractéristiques mécaniques nécessaires à cette structure pour jouer son rôle de protecteur et d'amortisseur au niveau des extrémités osseuses des articulations.

L'objectif de ce travail a été de concevoir un matériau de comblement capable de traiter et réparer localement les lésions cartilagineuses profondes des régions condyliennes liées ou consécutives à des chocs traumatiques ou dégénératifs.

Parmi les matériaux supports proposés dans ce type d'application, les polymères naturels semblent tenir une place importante, et plus particulièrement les polymères polysaccharidiques. Un polysaccharide structurant tel que l'alginate de sodium est un bon candidat, en raison de sa capacité à gélifier en présence de cations divalents. La matrice rigide obtenue est largement décrite dans la littérature comme modèle tridimensionnel pour la culture *in vitro* des cellules cartilagineuses, les chondrocytes. Les propriétés physico-chimiques et mécaniques de cette matrice offrent, en effet, aux chondrocytes un environnement adapté d'une part à une prolifération lente et d'autre part au maintien de leur phénotype, leur permettant ainsi de synthétiser *in situ* une matrice extracellulaire.

Nous avons introduit au sein de l'alginate de sodium, avant gélation, un composé dont les propriétés biologiques potentielles auraient pour conséquence de stimuler la prolifération des chondrocytes et surtout d'activer la production de la matrice extracellulaire. L'acide hyaluronique, qui est un des constituants de la matrice cartilagineuse, a été choisi. En effet, outre le rôle important qu'il pourrait jouer au sein de la matrice hybride grâce à ses propriétés viscoélastiques, déjà mises en oeuvre en viscosupplémentation, il serait susceptible de servir de chondro-inducteur au sein de cette matrice. De plus, la structure polysaccharidique commune de l'alginate et du hyaluronate laisse espérer l'existence d'interactions entre eux, qui stabiliseraient

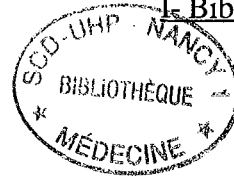
la matrice hybride obtenue. Nous avons par ailleurs envisagé de modifier chimiquement l'acide hyaluronique pour augmenter l'association de nos polymères par des liaisons ioniques.

Pour exposer l'ensemble de notre travail, une première partie bibliographique rappelle brièvement les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du cartilage ainsi que les différents biomatériaux proposés en rhumatologie. Nous développons ensuite, de manière plus approfondie, les caractéristiques des deux polysaccharides constitutifs de la matrice hybride, l'alginate de sodium et le hyaluronate de sodium, tant sur le plan physico-chimique que biologique, en mettant l'accent sur leurs applications médicales actuelles et potentielles. Ces rappels nous permettent de situer alors les travaux que nous avons réalisés.

Nos résultats sont présentés dans quatre chapitres, dont le premier correspond à la modification chimique du hyaluronate de sodium. Le deuxième chapitre correspond à l'étude des caractéristiques physico-chimiques des polysaccharides en solution, visant à mettre en évidence les interactions entre les polymères associés grâce à différentes méthodes, telles que le dichroïsme circulaire et le comportement rhéologique. La troisième partie est consacrée à la formation des gels : nous avons particulièrement analysé leur composition et les phénomènes de diffusion existant au sein des matrices. Le dernier chapitre rassemble les résultats concernant les essais de biocompatibilité *in vitro* (culture de chondrocytes) et *in vivo* (modèle de la poche à air) réalisés pour les matrices les plus adaptées physico-chimiquement.

L'ensemble des résultats obtenus nous permettra enfin de dégager les aspects importants de l'élaboration et l'évaluation de nos biomatériaux, afin de proposer des améliorations indispensables à la conception de matrices pour le comblement ostéochondral.





I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

L'objectif de ce travail est d'obtenir un matériau de comblement des lésions cartilagineuses à partir d'un mélange polysaccharidique. Avant de présenter les études réalisées sur ce mélange, nous faisons un bref rappel concernant le cartilage articulaire et ses constituants. Ce paragraphe est suivi de quelques rappels sur les biomatériaux. Les principales caractéristiques des deux polysaccharides retenus pour l'élaboration du matériau seront ensuite exposées.

1. CARTILAGE ARTICULAIRE

Le cartilage est un tissu conjonctif avasculaire recouvrant les surfaces osseuses qui est nourri par la diffusion du liquide synovial. Sa consistance est ferme, légèrement élastique et compressible.

L'étude macroscopique du cartilage articulaire met en évidence un tissu lisse, homogène, translucide, d'où son nom de cartilage hyalin. L'épaisseur de la couche cartilagineuse à la surface des os varie en fonction de sa localisation dans l'organisme et des charges physiologiques appliquées (Athanasίου et coll 1991).

Le test à l'encre de chine a montré l'existence d'un réseau, fibreux à la surface et dont la taille des pores varie selon la profondeur du cartilage. Par exemple pour la tête fémorale, le diamètre de pores augmente de 4 nm en surface jusqu'à 9 nm en couche plus profonde (Freeman 1979).

1.1. Composition du cartilage

Le cartilage est composé de cellules, les chondrocytes, et d'une matrice extracellulaire constituée d'eau (65 à 85%), d'un réseau de collagène (10 à 30 %) essentiellement de type II, de protéoglycanes (5 à 10 %) et de glycoprotéines non collagéniques. Les cellules jouent un rôle important dans la production, l'organisation et le maintien de la matrice extracellulaire. Cette dernière sert de barrière protectrice autour des chondrocytes et leur permet d'assurer une bonne homéostasie du cartilage par la dégradation et le renouvellement des composants. Dans le cartilage, lorsque l'on passe de la surface articulaire à l'os sous-chondral, on observe un changement de morphologie pour les chondrocytes et la matrice, ce qui permet de distinguer quatre couches : la superficielle, la transitionnelle, la profonde et la calcifiée (Peyron et Stanescu 1994) (Figure I.1). La taille et l'apparence relative de ces zones dépendent de l'espèce et de l'articulation considérées (Buckwalter et Mankin 1998).

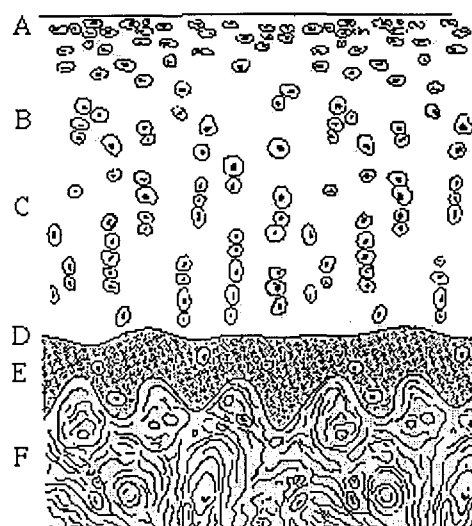


Figure I.1 : Schéma de l'organisation cellulaire du cartilage : A: couche superficielle à cellules aplaties; B: couche transitionnelle à cellules rondes; C: couche profonde aux cellules souvent groupées; D: front de calcification; E: couche calcifiée; F: os sous-chondral (d'après Peyron et Stanescu 1994)

1.2. Constituants du cartilage

1.2.1. Chondrocytes

Les chondrocytes sont des cellules polygonales de 10 à 30 μm de diamètre. Ils sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire, résultat de la balance entre l'anabolisme et le catabolisme des macromolécules concernées (Kuettner et coll 1991). Leur densité cellulaire augmente avec la profondeur du tissu (passage de la couche A à la couche D de la Figure I.1), mais varie également selon la nature de l'articulation considérée, en zone portante ou non.

Les chondrocytes des différentes couches du cartilage diffèrent dans la taille, la forme, et probablement dans l'activité métabolique (Adeylotte et coll 1996), mais tous contiennent les organelles nécessaires à la synthèse de la matrice. Les cellules répondent différemment selon la charge mécanique appliquée, suggérant que le développement et la maintenance du cartilage articulaire normal dépendent en partie des différentes populations de chondrocytes des couches cartilagineuses (Buckwalter et Mankin 1998). Dans la couche superficielle (zone A), les chondrocytes ont une forme ovale et aplatie et sont disposés parallèlement à la surface articulaire (Figure I.2). Ils synthétisent une matrice dont la concentration en collagène est importante mais qui comporte peu de protéoglycanes. Dans la zone B (transitionnelle), ils sont plus arrondis et sont parfois regroupés et disposés verticalement (Kuettner 1994). Les cellules synthétisent une matrice avec des diamètres de fibres de collagène plus gros, une teneur en protéoglycanes plus élevée et une concentration en eau et en collagène plus faible que les chondrocytes de la zone superficielle (Poole 1997, Buckwalter et Mankin 1998). Dans la couche profonde (zone C), les cellules sont elliptiques avec l'axe perpendiculaire à la surface du cartilage et sont souvent arrangées en colonnes de 2 à 6 cellules. Par rapport aux autres zones, la teneur en eau est plus

faible et la concentration en protéoglycanes est plus importante. Dans la couche calcifiée (zone D), les chondrocytes sont clairsemés et certains sont entourés d'une matrice calcifiée suggérant que les cellules ont une activité métabolique faible. Des travaux récents ont, cependant, montré que les chondrocytes de cette zone, plus hypertrophiques, jouaient un rôle dans le développement et la progression de l'arthrose (Oegema et Thompson 1995).

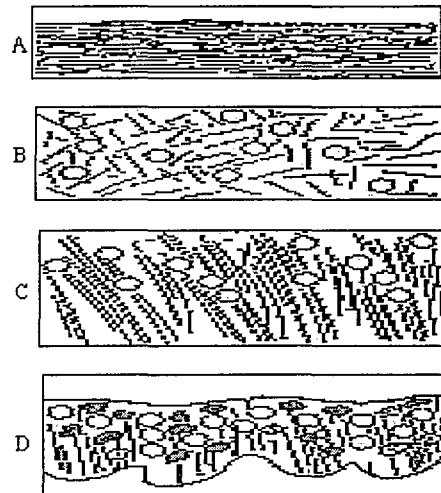


Figure I.2 : Aspect des chondrocytes et des fibres de collagène en fonction de leur localisation dans la couche cartilagineuse, les lettres A à D ont la même signification que dans la Figure I.1 (Peyron et Stanescu 1994).

Les chondrocytes synthétisent et dégradent les macromolécules de la matrice (Hardingham et Venn 1996). Les mécanismes qui contrôlent la balance entre ces activités sont peu connus, mais les cytokines qui ont des effets anaboliques et cataboliques semblent jouer un rôle important (Lotz et coll 1995, Poole 1995, Morales 1995, Trippel 1995). Ainsi, l'interleukine 1 induit l'expression des métalloprotéases qui peuvent dégrader les macromolécules de la matrice et interférer au niveau de la transcription avec la synthèse des protéoglycanes. En revanche des facteurs de croissance comme l'IGF-1 (insulin growth factor) ou le TGF- β (transforming growth factor) s'opposent à cette activité catabolique en stimulant la synthèse matricielle et la prolifération cellulaire. En réponse à de nombreux stimuli, ces cytokines sont produites et libérées par les chondrocytes et restent soit liées aux récepteurs des cellules de surface, soit au sein de la matrice.

1.2.2. Collagènes

Les collagènes sont une famille de protéines dont la structure présente un ou plusieurs domaines en configuration de triple hélice. Les différents types de collagènes ont été nommés de I à XVIII selon leur ordre de découverte (Ranshaw et coll 1995). Récemment, un collagène XIX a été découvert (Maynes 1997).

Le réseau fibrillaire du cartilage hyalin est constitué essentiellement de fibres de collagène de type II associées à des fibres de collagène de type IX et de type XI (Figure I.3) (Bruckner et van der Rest 1994).

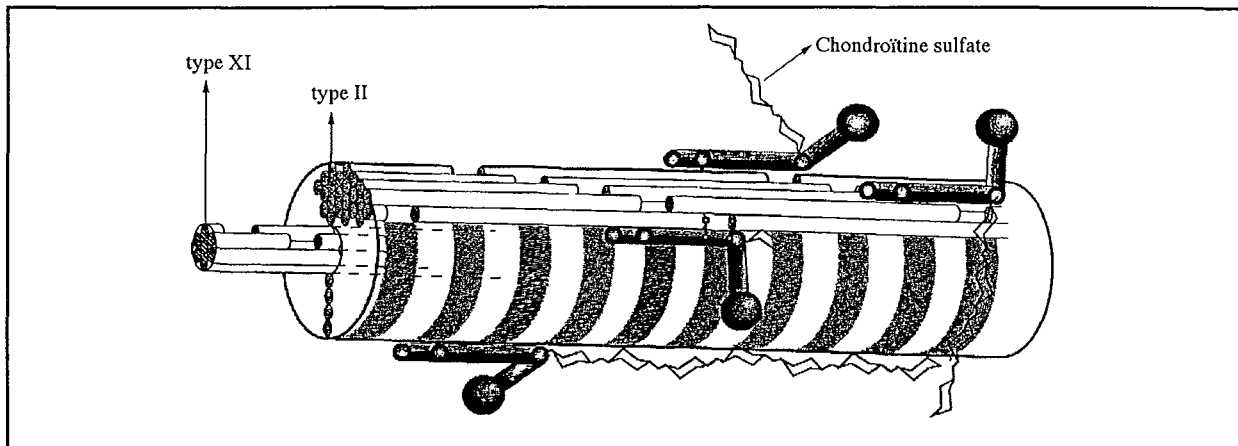


Figure I.3 : Représentation schématique de l'organisation de collagène de type II et XI dans une fibre de cartilage (Bruckner et van Der Rest 1994).

La disposition des fibres de collagène dépend de leur localisation au sein du cartilage (Peyron et Stanescu 1994). Dans la couche A, la matrice dense contient des fibres de collagène orientées parallèlement à la surface du cartilage ; celles-ci déterminent les propriétés mécaniques du tissu et jouent un rôle dans le mouvement d'entrée et de sortie des molécules dans le cartilage. Ce réseau de collagène agit comme une barrière pour le passage entre le liquide synovial et le cartilage articulaire de molécules de type antibiotiques ou protéiques (Buckwalter et Mankin 1998). Dans la couche B, les fibres de collagène semblent être orientées obliquement, alors que pour les zones C et D, ces fibres sont généralement plus épaisses et orientées verticalement par rapport à la surface. Il existe, dans la zone C, d'autres fibres, plus fines, qui entourent les chondrocytes et forment ainsi les chondrons isolant plus ou moins les cellules entre elles; ces fibres ont un rôle protecteur pour les cellules lors de l'application d'une charge (Buckwalter et Mankin 1998).

1.2.3. Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des complexes protéine-polysaccharides dont le poids moléculaire varie de 2000 à 3000 KDa. Ces protéoglycanes sont constitués par l'association d'une protéine avec une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (chondroïtine sulfate, kératane sulfate et oligosaccharides). Chaque unité disaccharidique contient au moins une charge négative (carboxylique et groupement sulfaté) qui confère aux glycosaminoglycanes une forme de long lacet. En effet, ces charges négatives se repoussent entre elles et éloignent également d'autres molécules négatives tout en attirant des cations. La concentration en glycosaminoglycanes

dépend de l'âge, du site et de la pathologie articulaire. Plusieurs catégories de protéoglycanes existent dans le cartilage :

- Les protéoglycanes de haut poids moléculaire ou agrécans (Figure I.4) qui s'associent à l'acide hyaluronique, par l'intermédiaire d'une protéine de liaison pour former des agrégats et sont immobilisés dans le réseau de collagène (Muir 1995). Leurs poids moléculaire varie de $1,5$ à 4.10^6 Da. Ils sont riches en chondroïtine sulfate (environ 100 chaînes) et en kératane sulfate (30 chaînes environ) (Vertel 1995).

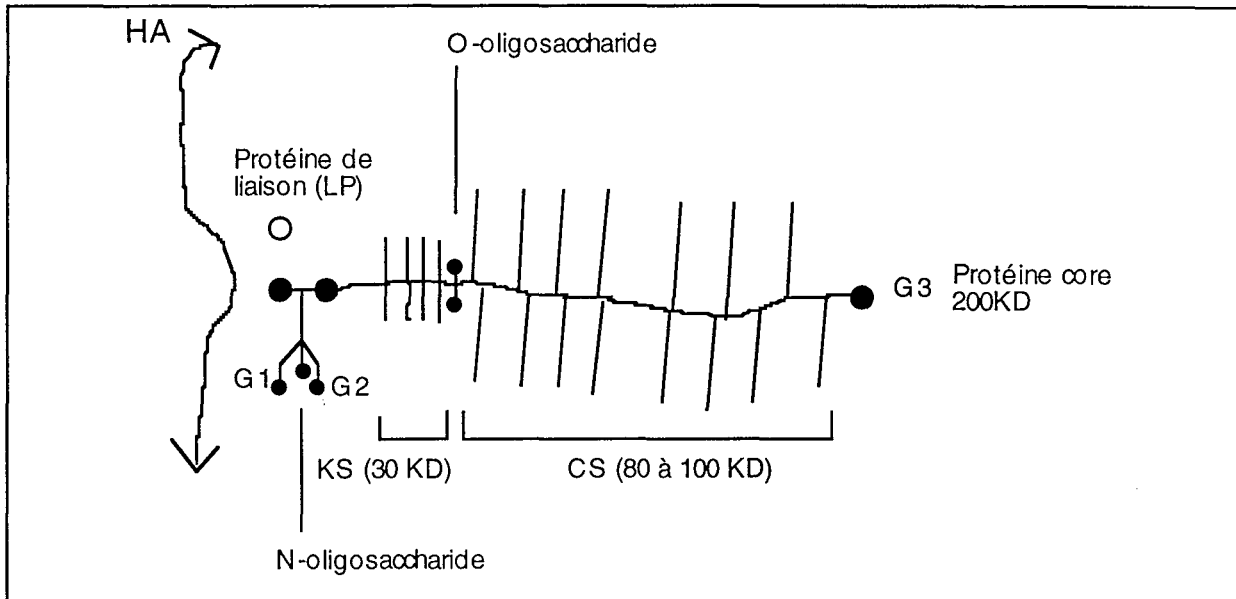


Figure I.4 : Schéma de l'agrégane avec HA: acide hyaluronique; KS: kératane sulfate; CS: chondroïtine sulfate; LP: protéine de liaison (45 KDa); et G1, G2 et G3: domaines globulaires (Macro 1993).

- Les protéoglycanes de haut poids moléculaire (supérieur à 10^6 Da et contenant peu de chondroïtine sulfate) qui ne s'associent pas à l'acide hyaluronique.

- Les protéoglycanes de faible poids moléculaire (inférieur à 10^5 Da). C'est le cas de la décorine, du biglycane, qui contiennent des chaînes de chondroïtine sulfate ou de dermatane sulfate selon la nature du tissu. Ils s'associent aux fibres de collagène et sont également capables, à travers leur protéine core, de fixer les facteurs de croissance (TGF- β) et de modifier leur activité au sein du cartilage (Hildebrand et coll 1994). La fibromoduline diffère par la nature du glycosaminoglycane (chaîne de kératane sulfate) (Heinegard et Pimentel 1992).

- Les protéoglycanes constitutifs de la membrane cellulaire dans lesquels se trouve principalement du kératane sulfate. Ils joueraient un rôle dans l'adhésion cellulaire.

- Des fragments de grands protéoglycanes restant liés à l'acide hyaluronique et qui s'accumulent avec l'âge dans la matrice.

1.1.2. Glycoprotéines non collagéniques

Les protéoglycanes et le collagène sont les constituants majeurs du cartilage. Leur association conditionne les propriétés mécaniques et biologiques de ce tissu. Cependant il existe d'autres protéines spécifiques du cartilage ou se situant dans les tissus voisins (Figure I.5). Leur rôle n'est pas forcément connu, à l'exception de la protéine de liaison qui stabilise les interactions agrécane - acide hyaluronique.

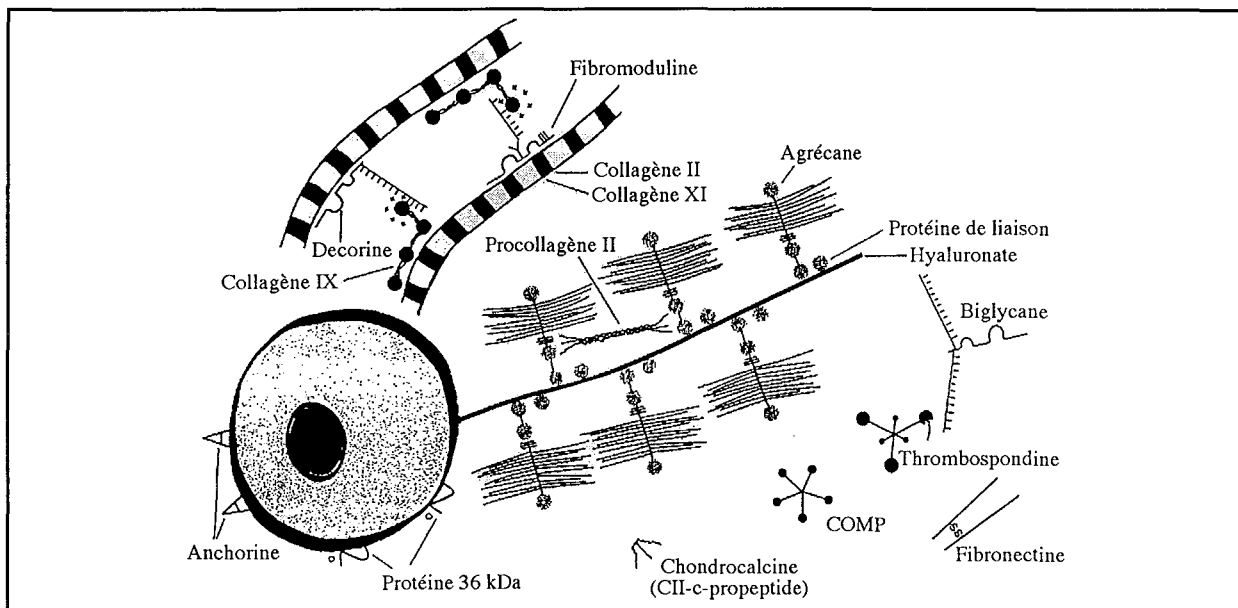


Figure I.5 : Constitution du cartilage avec l'ensemble des éléments présents (Vertel 1995).

1.2. Rôle du cartilage

Le cartilage est un tissu spécialisé et adapté aux contraintes de compression mécanique. Il amortit dans le temps et répartit dans l'espace les forces mécaniques auxquels il est soumis et il maintient le glissement entre les deux épiphyses opposées lors de l'application d'une charge. La lubrification entre les deux surfaces est assurée par le liquide synovial, riche en hyaluronate.

Le cartilage est un tissu semi-dur ; il est légèrement déformable lorsqu'une force est appliquée et peut reprendre sa forme initiale à l'arrêt de cette compression. Les propriétés biomécaniques du cartilage dépendent de l'intégrité des éléments fibrillaires ou non de la matrice (Lohmander 1996). Le réseau de collagène donne sa forme au tissu et le taux d'agrécane influence la résistance à la compression (Hardingham et Venn 1996). Les agrégats de protéoglycanes et d'acide hyaluronique lui confèrent une densité de charges négatives élevée. Ces charges, qui se repoussent mutuellement, attirent les cations extracellulaires et de grandes quantités d'eau

(équilibre de Donnan) (Hadler et Napier 1977). La présence du réseau fibrillaire collagénique diminue l'hydrophilie du cartilage par la mise en tension permanente des fibres avec les agrégats de protéoglycanes.

La compréhension du mécanisme de fonctionnement du cartilage se fait surtout au niveau macroscopique (Kovach 1996). En effet, il existe une théorie biphasique qui considère le cartilage comme un mélange de deux phases : une phase solide, qui est supposée jouer un rôle dans l'équilibre des propriétés mécaniques, et une phase liquide, considérée comme incompressible et qui est présente dans le réseau poreux de la phase solide. La théorie triphasique inclut l'existence des effets de charge qui sont traités avec l'approximation de Donnan. En réalité, le cartilage est un complexe liquide ressemblant plus à un gel très hydraté qu'à une structure poreuse.

Les propriétés rhéologiques du cartilage lui permettent de supporter des charges importantes (10 MPa) (Afoke et coll 1987). Lorsqu'il subit une déformation, la pression osmotique s'élève en raison des fuites d'eau et d'électrolytes qui s'effectuent vers l'extérieur du réseau de protéoglycanes. Il s'établit alors un équilibre avec la charge appliquée (Oloyede et Broom 1993). Sa capacité à se déformer de façon réversible lui permet de jouer un rôle d'amortisseur aux extrémités osseuses en répartissant, de façon homogène, les forces appliquées (Figure I.6).

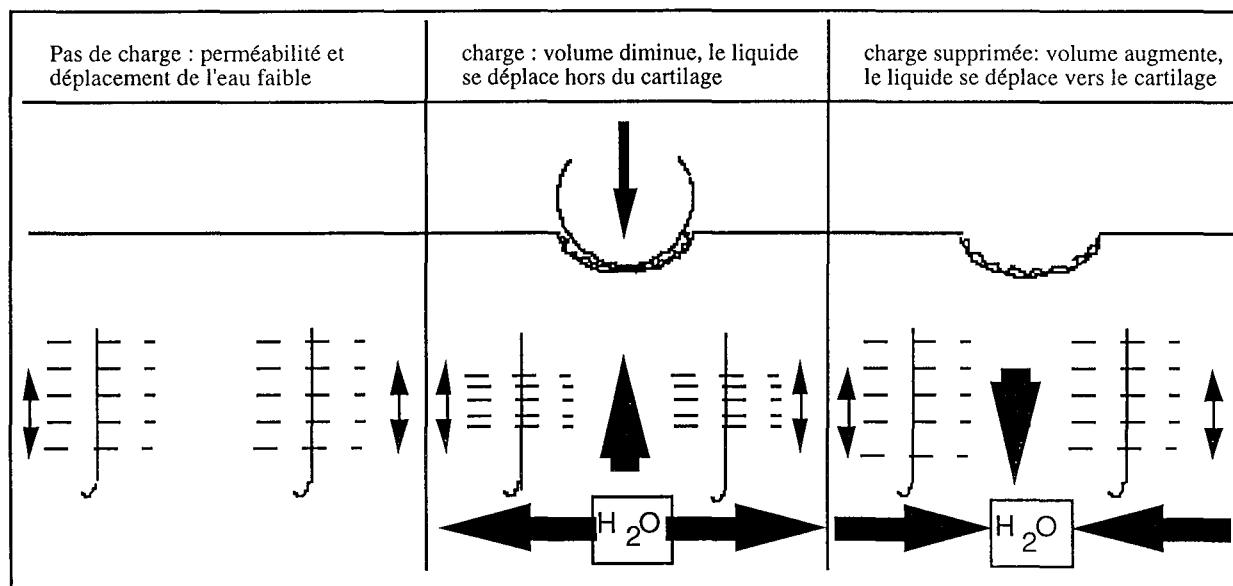


Figure I.6 : Répartition de l'eau et des électrolytes lors de l'application d'une charge sur le cartilage (Kuettner 1994).

Si cette force appliquée est trop importante, le réseau fibreux se rompt, les protéoglycanes s'hydratent fortement et provoquent une dégradation du cartilage (Johnson 1997).

Le bon glissement et la bonne lubrification entre deux surfaces osseuses se fait grâce au cartilage et au liquide synovial présent dans la cavité articulaire (Hadler et Napier 1977). Le liquide synovial est un liquide incolore, visqueux, sécrété par la membrane synoviale. C'est un

dialysât plasmatique constitué de hyaluronate de sodium dont la concentration varie selon l'âge et la pathologie. Cette concentration est de l'ordre de 1,3 à 3,6 mg/mL dans un liquide synovial normal (Chun 1988 et coll) et diminue avec l'âge et l'arthrose. Le rôle de l'acide hyaluronique doit encore être éclairci, mais sa nécessité pour le bon glissement des surfaces cartilagineuses est connue.

La faible teneur en protéines associées au hyaluronate (1 à 2 %) jouerait également un rôle dans la lubrification. En effet, ces complexes anioniques hyaluronate-protéine ont la capacité de s'adsorber au cartilage (Maroudas 1990). De plus, lors de la dégradation des protéoglycanes par la hyaluronidase, la viscosité diminue rapidement sans altérer les propriétés de lubrification, contrairement à ce qui peut être observé lors d'une dégradation protéolytique (Linn et Radin 1968, Hadler et Napier 1977, Jay et Hong 1992).

1.3. Lésions ostéochondrales

Lors d'une lésion cartilagineuse, et quelle qu'en soit l'origine (vasculaire, traumatique, dégénérative ...), le cartilage ne guérit pas spontanément ; sa structure devient généralement fibreuse et irrégulière, ce qui perturbe le glissement harmonieux des surfaces et par conséquent la fonction articulaire (Mainard et Netter 1997). Il existe plusieurs types de lésions cartilagineuses : superficielle, profonde et celle produite par des chocs répétitifs.

La lésion superficielle est localisée dans les couches superficielle et transitionnelle du cartilage. Dans ce cas, la réparation du cartilage est inachevée et la lésion est comblée par un tissu fibreux (De Palma et coll 1962, Mankin 1982, Thompson 1975), mais, à long terme, aucun signe d'apparition ou de développement d'une arthrose n'est observé. Les lésions plus profondes, qui atteignent l'os sous-chondral, provoquent une évolution défavorable pour le cartilage : la cicatrisation à long terme est de type fibrocartilagineux (sans continuité des fibres de collagène). Les propriétés mécaniques sont plus ou moins satisfaisantes, mais, sous l'action de contraintes biomécaniques, le tissu s'altère (Shapiro et coll 1993, Furakawa et coll 1980). Les contusions cartilagineuses sont obtenues par application de contraintes de compression itérative et impulsive (Radin et coll 1978). Des lésions de surface sont alors observées ainsi qu'une rupture du réseau collagénique.

Certains facteurs favorisent la cicatrisation cartilagineuse : l'oxygène, les facteurs biochimiques (Mankin 1992), les champs électriques (Baker et coll 1974), le faisceau laser (Schultz et coll 1985), et l'immobilisation (Salter et coll 1975). La réparation du cartilage est généralement traitée par des méthodes chirurgicales du type ostéotomie, induction d'une chondrogénèse à partir de la moelle et de la synoviale, autogreffes, allogreffes. Des études de comblement des lésions à l'aide de tissus et de cellules sont également abordées.

L'utilisation de biomatériaux dans différents domaines de l'orthopédie est actuellement en plein essor et permet d'espérer une avancée importante dans la réparation des lésions

ostéochondrales. Proposés avant 1980, ils ont pris plus d'importance à partir des années 1990 ; à l'heure actuelle, ils sont étudiés également en association pour former des biomatériaux hybrides.

2. LES BIOMATERIAUX

Les biomatériaux sont utilisés pour fabriquer des prothèses, des organes artificiels implantables ou non, ou du matériel utilisé en biologie ou en médecine. Il peut s'agir de métaux, de céramiques, de polymères naturels ou synthétiques, de dérivés du carbone ... (voir tableau I.1) Avant d'utiliser un matériau en tant que substitut ou tuteur, il est nécessaire d'effectuer certaines études mécaniques et biologiques pour déterminer son comportement mécanique à l'interface avec le tissu et son évolution dans le temps. En effet, les biomatériaux doivent avoir des propriétés proches (voire identiques) à celles du tissu à remplacer ou à soutenir. L'évolution dans le temps du matériau ainsi que son adhésion sur le tissu sain environnant sont deux autres facteurs à connaître. L'étude du comportement chimique et biochimique d'un matériau dans le milieu biologique est nécessaire. En effet, ce milieu est souvent plus complexe que l'eau et les différents constituants présents dans ce milieu (de type Na^+ , Cl^- , HCO_3^- ..., O_2 , CO_2), la température physiologique (37°C) et les variations de pH (autour de 7,4) peuvent entraîner des modifications du matériau qui n'auraient pas forcément eu lieu dans l'eau. La dégradation du matériau peut également libérer certains composants susceptibles d'entraîner une modification du milieu environnant (Crousier 1987).

En réalité, avant de devenir un biomatériau, un matériau doit répondre à certaines caractéristiques contenues dans un cahier des charges. De nombreux auteurs (Piskin 1994, Rubin et Yaremchuk 1997) ont défini les principaux critères de ce cahier des charges.

- Un biomatériau doit être conçu, purifié et stérilisé avec, de préférence, des méthodes conventionnellement utilisées.

- Il doit avoir les propriétés biomécaniques requises : résistance aux forces de tension, de compression et de cisaillement.

- Il doit avoir des propriétés physico-chimiques adaptées à son utilisation (structure cristalline, enchevêtrement, perméabilité, élasticité, hydrophobicité ou hydrophilie, mouillabilité, polarité, charge de surface...) et résistantes à l'épreuve du temps, de la température et du milieu environnant (*in vitro* et/ou *in vivo*).

- Il ne doit pas être toxique ni comporter impuretés, additifs ou composés de synthèse toxiques libérables dans le temps après application médicale.

- Il doit être biocompatible et ne doit pas donner lieu (lui ou ses produits de dégradation) à des réactions indésirables (inflammatoires, immunologiques, ...).

2.1. Exemples de biomatériaux

Dans le tableau I.1 sont décrits les différentes catégories de biomatériaux avec quelques exemples d'applications médicales.

CATEGORIE	EXEMPLES DE BIOMATERIAUX	EXEMPLES D'UTILISATION MEDICALE
Métaux	Aciers inoxydables Alliage de cobalt Or Titane et alliage...	Implants articulaires Vis Implants dentaires
Céramiques	Oxyde d'alumine Hydroxyapatite Verres...	Implants articulaires Implants dentaires Valves cardiaques
Composites	Matériau recouvert de céramique ou de carbone...	Implants articulaires
Matériaux biologiques	Peau et valve de coeur du bovin Artères bovine Auto et allogreffes...	Remplacement ou réparation de tissus mous ou durs
Polymères naturels ou synthétiques	Acryliques Polyuréthannes Silicone Téflon... Collagène Alginate Hyaluronate...	Lentilles oculaires Implants articulaires Membranes d'hémodialyse Substitut de tissus mous Cicatrisation de la peau Viscosupplémentation

Tableau I.1 : Exemples de quelques biomatériaux avec leur utilisation (Piskin 1994, Sedel 1995).

Ces quelques exemples montrent l'existence de nombreux types de biomatériaux pour des applications très diverses. Dans le paragraphe suivant, nous aborderons essentiellement les biomatériaux polymères, synthétiques ou naturels, afin de justifier notre choix de l'association de deux polysaccharides pour concevoir un biomatériau de comblement.

2.2. Biomatériaux polymères synthétiques

Les polymères synthétiques, biodégradables ou non, ont la particularité d'avoir de nombreuses compositions et donc de pouvoir être fabriqués sous différentes formes avec des structures plus

ou moins complexes (Zignani et coll 1997, Mc Govern et coll 1997, Gutowska et coll 1997). Ces polymères sont employés sous formes de fibres creuses, de feuilles, de tubes, de nano- ou microsphères, d'objets moulés, de gels... avec une structure semi-cristalline (cas du polyéthylène, des fluorocarbones, des polyesters...) ou amorphe (cas du chlorure de polyvinyle, des silicones, des acrylates...). L'obtention du biomatériau final sans irrégularité de surface pouvant libérer des éléments toxiques, est une difficulté majeure pour ce type de polymères.

Les biomatériaux polymères synthétiques dégradables se dégradent *in vivo* de façon contrôlée et sur un temps défini. Cette élimination progressive permet une reconstruction lente du tissu, ce qui présente l'avantage d'éviter une deuxième intervention chirurgicale. La dégradation hydrolytique est le mécanisme le plus fréquent (Piskins 1994). Ainsi, la pénétration des molécules d'eau au sein d'une matrice hydrophile se traduit par une dégradation rapide débutant au centre de cette matrice. Dans le cas d'une matrice hydrophobe, la dégradation est plus lente et se fait par la surface de la matrice. Les polymères de faible poids moléculaire se dégradent plus rapidement que leurs homologues de haut poids moléculaire. La morphologie du polymère influence également le processus puisqu'une structure amorphe laisse pénétrer plus facilement l'eau qu'une structure cristalline. La forme géométrique, le rapport surface sur volume, le pH, la température, la force ionique... sont d'autres facteurs intervenant dans le processus de dégradation.

L'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique (PLA) sont des biomatériaux polymères dégradables. Ils sont obtenus par polycondensation du monomère (d'acide glycolique ou d'acide lactique) pour former du PGA ou du PLA de faible poids moléculaire. Cependant, ces derniers possèdent des propriétés de moins bonnes qualités que ceux obtenus par polymérisation par ouverture du cycle glycolide (diester cyclique de l'acide glycolique) ou lactide. Leur dégradation *in vivo* peut durer de quelques heures à quelques mois selon le poids moléculaire, la morphologie et le rapport surface sur volume du polymère. Ces polymères et leur association PGA-PLA sont employés comme fils de sutures, comme objets orthopédiques (vis, mèches, plateau de fixation pour fractures) mais sont également étudiés comme support pour la fabrication de tissus mous ou durs (Athanasίου et coll 1996, Miki 1996) et dans les systèmes de libération contrôlée (de TGF- β , de protéines) (Athanasίου et coll 1996, Bourry et coll 1997).

Le poly-(ϵ -caprolactone) est un polymère hydrophobe, dégradé lentement *in vivo*. Seul, il est utilisé dans des systèmes de libération contrôlée, et, en association avec un copolymère d'acide lactide, il sert de fil de suture ou est étudié pour le comblement de petites lacunes nerveuses (Den Dunnen et coll 1997).

Les poly-(ortho esters) sont employés comme système de libération contrôlée d'hormones ou de facteurs de croissance (polymères hydrophobes) (Bernatchez et coll 1993).

Les polyanhydrides, dégradés depuis la surface, servent à l'encapsulation d'agent de chimiothérapie et sont largement étudiés pour la libération contrôlée d'autres médicaments ou de macromolécules (Thomas et coll 1997).

Le Proplast®, qui est un mélange de poly-tétrafluoro-éthylène et de fibres de graphite, a été implanté chez le lapin par Kessler et coll (1980) ; le cartilage réparé est du type hyalin. Une étude similaire chez le lapin a utilisé un polymère hydrosoluble, le poly-HEMA (Kon et De Visser 1981). Dans ce cas, la réparation produit un cartilage granuleux pour un implant dont la taille de pore est voisine de 50 µm ; lorsque cette dernière est de 100 µm, le resurfaçage n'est pas complet. D'autres études de comblement ont été effectuées avec des polymères synthétiques de type polyuréthane (copolymère de L-lactide et de caprolactone) (Klompmaaker et coll 1992), ou de type poly-éther-imide-uréthane (Porimid®) (Mainard et coll 1991). Chez le lapin et le chien, le cartilage formé est fibreux mais présente toutefois une qualité mécanique suffisante. Des résultats similaires ont été obtenus après implantation chez le lapin d'un copolymère de polyméthacrylate et de tétrahydrofurfuryl méthacrylate (Downes et coll 1994) polymérisant *in situ* dans la lésion, et également de polyester et de Téflon® recouvert ou non de polyuréthane (Messner et Gillquist 1993).

Certains auteurs ont proposé de synthétiser un néocartilage *in vitro* par incorporation de chondrocytes dans des associations de polymères (PGA-PLA) (Freed et coll 1993, Puelacher et coll 1994, Vacanti et coll 1991).

2.3. Biomatériaux polymères naturels

Les polymères naturels existent en l'état dans la nature et leur provenance peut être bactérienne, végétale, ou animale. L'extraction bactérienne est souvent privilégiée, car la production du polymère est plus homogène que l'extraction à partir de végétaux, par exemple, dans ce dernier cas la structure dépend souvent du temps et du lieu de récolte (Indergard et Skjak-Braek 1987). Malgré une exploitation industrielle délicate en raison des faibles quantités extraites, un grand nombre de polysaccharides ou de protéines trouvent leur application dans le domaine médicale. Ainsi, l'albumine, protéine plasmatique majeure, est employée pour le « recouvrement » de biomatériaux en contact avec le sang. Les microsphères d'albumine radiomarquées servent surtout pour les diagnostics médicaux comme marqueurs d'organes et de tissus.

Le collagène est une protéine principalement située dans la peau, les tendons, le cartilage et dans l'os (Pachence 1996). Le collagène peut être préparé sous diverses formes (feuilles, tubes, éponges et poudres), par différentes techniques de réticulation physique (irradiation U.V.) ou chimique (formation de liaisons ioniques inter- et intramoléculaires avec des ions trivalents métalliques Al³⁺ ou Cr³⁺ ou encore formation de liaisons covalentes avec le glutaraldéhyde). Ces techniques de réticulation stabilisent la structure du collagène et augmentent ses propriétés mécaniques en diminuant également son pouvoir antigénique. Il est employé dans les sutures

chirurgicales, dans les greffes (vasculaires, valves du coeur, organes creux), comme agent hémostatique, substitut de tissus mous, pansement pour brûlures et blessures, matériau pour la libération contrôlée de médicaments (Panduranga Rao 1995)... La gélatine, forme dénaturée du collagène, est surtout employée sous forme de microsphères pour la libération contrôlée de produits biologiquement actifs (Tabata et Ikeda 1989). Le collagène a été également étudié dans le cas des lésions ostéochondrales (Speer et coll 1979) où le cartilage de réparation est fibreux. Lorsqu'on lui associe des chondrocytes, un cartilage hyalin est obtenu (Nakitani et coll 1989).

Les protéines sont cependant susceptibles d'induire des réactions immunologiques. On peut leur préférer pour cela l'utilisation de polysaccharides. Certains d'entre eux présentent d'ailleurs des propriétés pharmacologiques intrinsèques. Ainsi le fucane et la carragénine sont employés en tant qu'anticoagulants et antithrombotiques, et on cherche à développer leurs propriétés anti-inflammatoires, antivirales ou anti-tumorales (Boisson-Vidal et coll 1995). La chitine et son dérivé, le chitosan sont étudiés pour l'élaboration de pansements pour brûlures, de lentilles de contact, de membranes à dialyse mais également pour la libération contrôlée de médicaments (Shigemasa et Minami 1995, Aiedeh et coll 1997).

D'autres polymères naturels sont utilisés, tels le dextran (sutures, pansements...), l'amidon (traitements de brûlures, capsule de médicaments), la caséine, la pectine (transit intestinal), l'héparine (anticoagulant), l'alginate (pansements gastriques, antireflux...), le hyaluronate (viscosupplémentation)... Très récemment, on a proposé d'associer des cellules à des biomatériaux naturels : le polymère sert alors de tuteur pour un développement cellulaire *in vitro* préalable dans l'objectif d'implanter le matériau résultant (Puelacher et coll 1994, Paige et coll 1996).

3. L'alginate et le hyaluronate

Parmi les polysaccharides précédemment évoqués, deux d'entre eux ont retenu notre attention pour la conception et la préparation d'un biomatériau destiné au comblement de lésions ostéocondrales : l'alginate et le hyaluronate. Nous détaillerons donc, dans ce chapitre, les propriétés de ces polymères, leurs utilisations industrielles et médicales ainsi que les domaines actuellement étudiés.

3.1. Alginate

L'alginate est un polysaccharide employé dans de nombreux domaines d'application alimentaire : il joue le rôle d'épaississant et de stabilisant. Il sert également d'agent pour la formation de gel ou de film. Sa production industrielle mondiale actuelle est d'environ 30000 tonnes par an (Onsoyen 1996).

3.1.1. Sources de l'alginate

Dans l'algue brune, l'alginate représente la majorité des polysaccharides (environ 40 % de la matière sèche) : il est localisé dans la matrice extracellulaire sous la forme d'un gel contenant différents ions du type Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , et Ba^{2+} et son rôle est de donner force et flexibilité à l'algue (Smidsrod et Draget 1996). L'extraction de l'alginate à partir d'algues brunes marines, dont le premier brevet date de 1881 (Stanford), s'applique actuellement à quelques lignées exploitées industriellement : *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia nigrescens* and *Sargassum spp.*

Certaines bactéries sont capables de produire de l'alginate, mais son obtention ne connaît pas, actuellement, de développement industriel. Les premières souches de bactéries produisant de l'alginate ont été découvertes en 1966 et sont l'*Azotobacter vinelandii*, le *Pseudomonas aeruginosa* (Gaseca 1988).

3.1.2. Structure et arrangement moléculaire

Structure

Jusqu'en 1955, l'acide mannuronique était supposé être le seul constituant de l'alginate. Depuis cette date, on a montré la présence d'un autre monosaccharide dans la molécule : l'acide

guluronique (Fischer et Dorfel 1955). L'alginate est donc un polysaccharide linéaire de poids moléculaire élevé, composé de 2 résidus, l'acide β -D-mannuronique (M) et l'acide α -L-guluronique (G) liés en (1-4). Leurs formules chimiques sont présentées dans la Figure I.7.

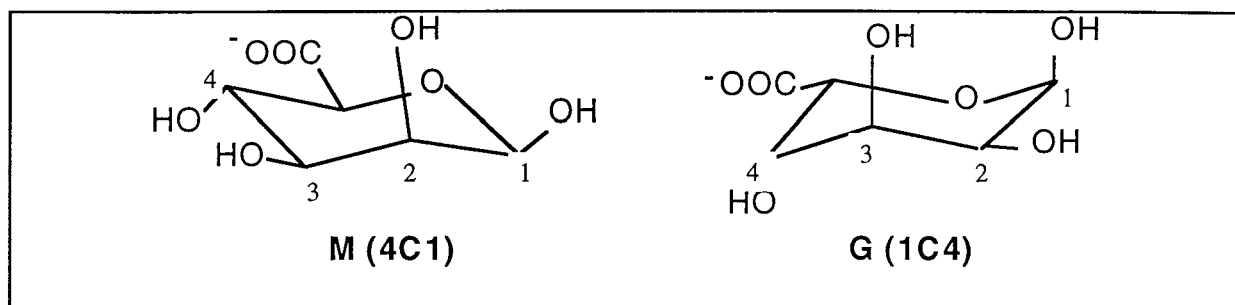


Figure I.7 : Structure chimique des monomères guluronique (G) et mannuronique (M).

Arrangement moléculaire

Après hydrolyse acide partielle de l'alginate et après séparation électrophorétique, Haug et coll (1967) ont obtenu trois fractions d'alginate de composition différente. Deux fractions se composaient uniquement de résidus (G) ou de résidus (M) et la troisième était constitué d'un mélange des deux types de résidus. Il en a été déduit que les monomères (M) et (G) s'associaient alternativement en blocs homopolymériques (M-M ou G-G) espacés de blocs hétéropolymériques (M-G ou G-M) (Figure I.8). La composition de différents alginates a alors été estimée par spectroscopie infrarouge, après hydrolyse partielle (Makie 1971).

Des études aux rayons X d'alginates riches en résidus (G) et d'alginates riches en résidus (M) ont permis d'étudier la conformation de ces deux cycles pyranosyles (Atkins et coll 1970, Atkins et coll 1973). En fait, les blocs homopolymériques (G-G) ont une conformation de type 1C_4 (correspondant à une position α pour l'oxygène situé sur le carbone 4 et une position β pour l'oxygène situé sur le carbone 1), alors que les blocs homopolymériques (M-M) ont une conformation de type 4C_1 . Ceci entraîne une différence structurale entre (M) et (G), due à la position inversée par rapport au plan des groupements hydroxyles. L'alginate présente alors la possibilité de quatre types de liaisons glycosidiques : diéquatoriale entre les résidus (M-M), impliquant un arrangement linéairement pour les résidus (M); diaxiale entre les résidus (G-G), entraînant une structure en boucle; équatoriale-axiale entre les résidus (M-G) ; et axiale-équatoriale entre les résidus (G-M) (Figure I.8).

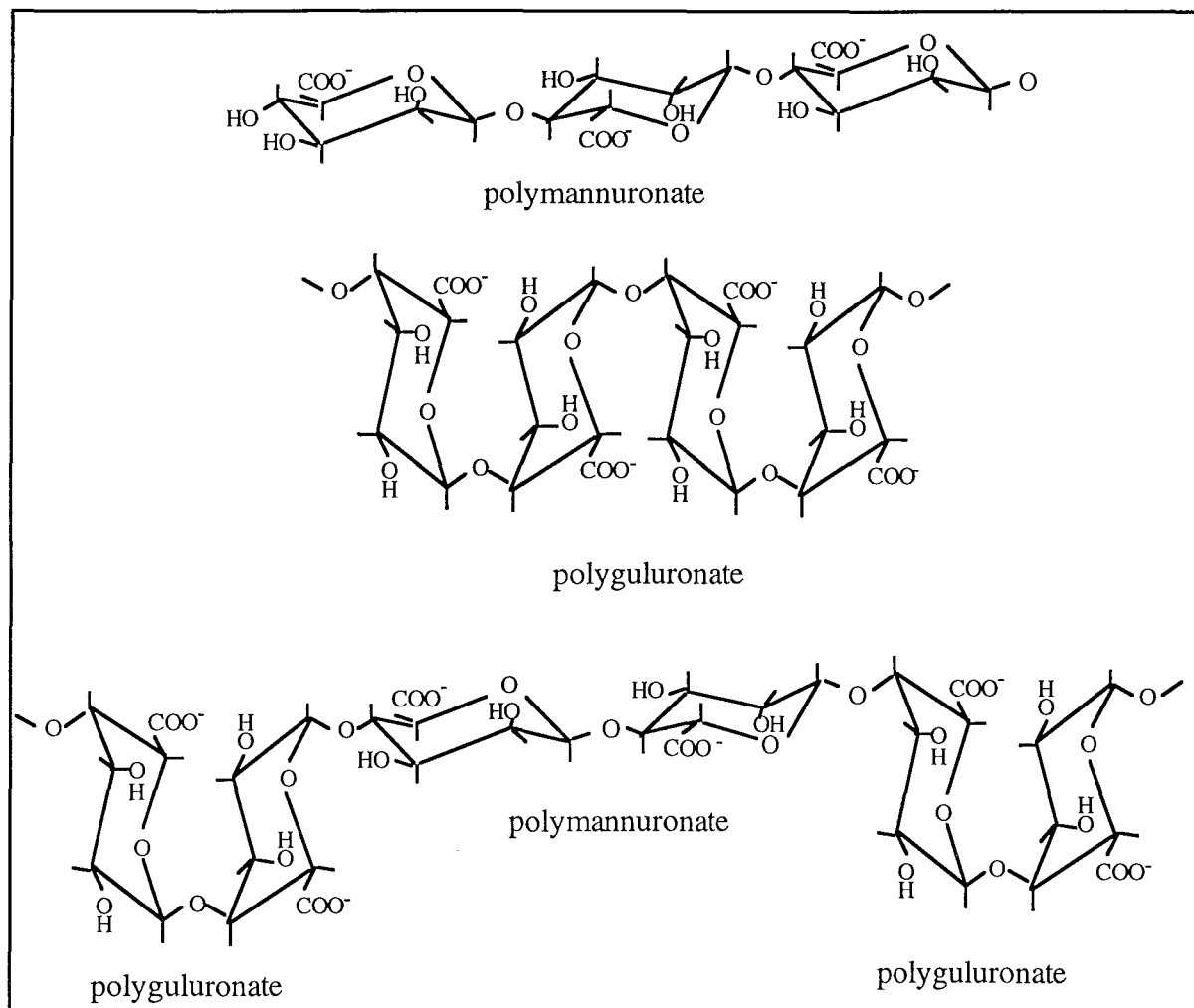


Figure I.8 : Arrangements structuraux des monomères dans une molécule d'alginate.

L'étude en résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'alginate après hydrolyse partielle (Haug et coll 1967) est également une méthode pour la détermination de l'arrangement des blocs. Des travaux ultérieurs (Min et coll 1977, Boyd et Turvey 1978, Grasdalen et coll 1981), réalisés en présence d'une enzyme spécifique et par spectrométrie RMN, ont confirmé la présence de séquences plus complexes (MMG) et (GMM).

Ces études ont montré que la répétition des blocs de monomères n'est pas régulière dans les alginates. La connaissance des blocs (M) et (G) n'est donc pas suffisante pour déterminer la structure séquentielle. Des études supplémentaires (Grasdalen et coll 1977, Grasdalen et coll 1979, Grasdalen 1983) en RMN du proton (^1H) ou de carbone (^{13}C) ont permis de déterminer des fréquences de monades (F_G et F_M), de diades qui correspondent aux quatre voisins proches (F_{GG} , F_{GM} , F_{MG} , F_{MM}) et de triades qui sont les huit voisins suivants (F_{GGG} , F_{MGG} , F_{GGM} , F_{GMM} , F_{MMG} , F_{MGM} , F_{GMM} , F_{MMM}). Ces fréquences de longueurs de chaînes permettent ensuite de calculer des longueurs de blocs moyennes :

$$N_G = \frac{F_G}{F_{MG}} \quad \text{et} \quad N_M = \frac{F_M}{F_{GM}}$$

ou

$$N_{G>1} = \frac{F_G - F_{FMGM}}{F_{GGM}} \quad \text{et} \quad N_{M>1} = \frac{F_M - F_{FMGM}}{F_{MMG}}$$

La détermination de ces fréquences ont également permis de confirmer la variation interespèces des alginates (voir tableau I.2).

SOURCES	Monomères		Dimères		
	F _G	F _M	F _{GG}	F _{MM}	F _{GM, MG}
ALGUES ^(a)					
Laminaria japonica	0,35	0,65	0,18	0,48	0,17
Laminaria digita	0,41	0,59	0,25	0,43	0,16
Laminaria hyperborea, brin	0,55	0,45	0,38	0,28	0,17
Laminaria hyperborea	0,68	0,31	0,56	0,20	0,12
Laminaria hyperborea, cortex ext.	0,75	0,25	0,66	0,16	0,09
Lessonia nigrescens	0,38	0,62	0,19	0,43	0,19
Ecklonia maxima	0,45	0,55	0,22	0,32	0,32
Macrocystis pyrifera	0,39	0,61	0,16	0,38	0,23
Durvillea antarctica	0,29	0,71	0,15	0,57	0,14
Ascophyllum nodosum, fruit	0,10	0,90	0,04	0,84	0,06
Ascophyllum nodosum, tissu agé	0,36	0,64	0,16	0,44	0,20
BACTERIES ^(b)					
Azotobacter vinelandii TL	0,45	0,55	0,43	0,52	0,02
Azotobacter vinelandii IV	0,94	0,06	0,93	0,04	0,01
Pseudomonas fluorescens 10255	0,40	0,60	0	0,20	0,40
Pseudomonas mendocina 10541	0,26	0,74	0	0,48	0,26
Pseudomonas putida 1007	0,37	0,63	0	0,26	0,37
Pseudomonas aeruginosa CF492a	0,26	0,74	0	0,48	0,26
Pseudomonas aeruginosa 3763	0,44	0,56	0	0,12	0,44

Tableau I.2 : Variation de la fréquence des résidus (G) et (M) et des dimères (G-G, M-M, G-M) en fonction de l'origine d'extraction de l'alginate obtenus par RMN ¹H et ¹³C. ^(a) Smidrod et Draget (1996); ^(b) Gacesa (1988).

Les études par dichroïsme circulaire ne nécessitent pas, contrairement aux méthodes précédentes, d'hydrolyser préalablement le polysaccharide. L'évolution de l'ellipticité en fonction de la longueur d'onde montre l'existence d'un signal négatif, attribué à la transition

$n \rightarrow \pi^*$ du carboxylate, dont le maximum varie avec le rapport (M)/(G) (Figure I.9) (Morris et coll 1973).

Il est maintenant bien établi que le nombre de résidus (G) ou (M) varie selon l'organisme ou le tissu. De plus, pour l'alginate extrait des algues, cette différence de composition structurale est également liée aux conditions de culture (pluie, température...) et à la période des récoltes (Indergaard et Skjak-Braek 1987). Cette variation des nombres de résidus (G) et (M) confère aux alginates des caractéristiques physiques (viscosité, poids moléculaires...) voisines.

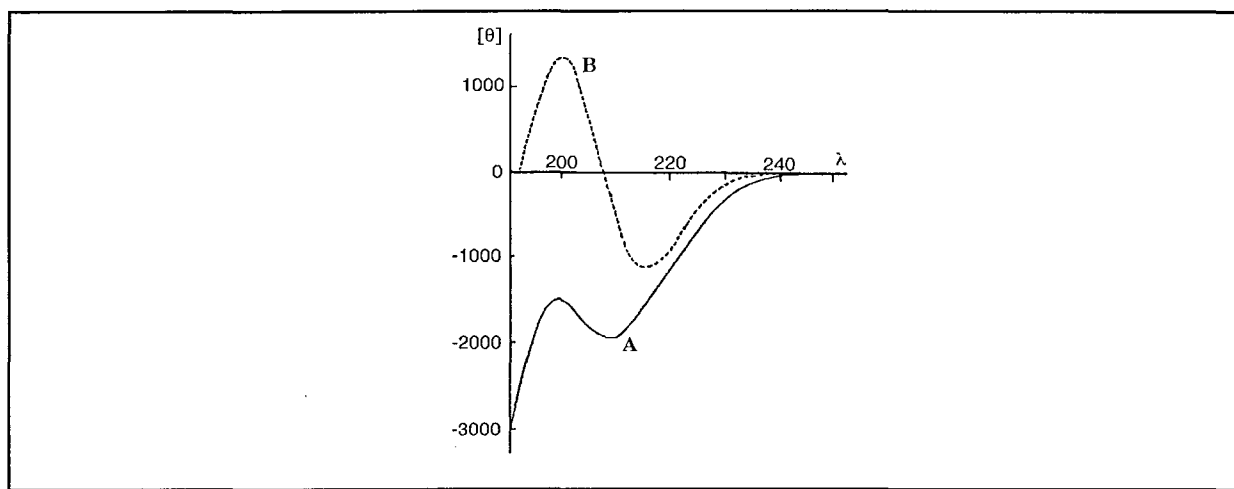


Figure I.9 : Spectre en dichroïsme circulaire d'alginates de composition différente. A : alginate de rapport (M)/(G) de 29/71; B : blocs poly- mannuroniques (Morris et coll 1973).

3.1.3. Propriétés de l'alginate

Propriétés physiques

L'alginate de sodium se présente sous forme d'une poudre blanche ou jaunâtre, inodore et sans saveur. Il est insoluble dans les alcools et les solvants organiques mais soluble dans l'eau.

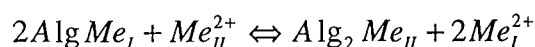
Lorsque l'alginate est produit par les bactéries, le groupement carboxylique des résidus d'acide mannuronique est acétylé ou di-acétylé (Skjak-Braek et coll 1985, Rehm et Valla 1997). Une hydrolyse douce (soude 100 mM à 25°C, pendant 20 minutes) permet de déacétyler ce groupement (Gacesa 1988).

Les valeurs des pKa des acides D-mannuronique et L-guluronique sont respectivement de 3,4 et 3,7. A un pH inférieur à 3-4, l'alginate est sous forme acide et donc insoluble dans l'eau. A pH supérieur, il se trouve sous forme de sel soluble pouvant s'hydrater.

L'alginate possède les propriétés d'un polyélectrolyte, en effet une solution d'alginate montre une diminution de sa viscosité intrinsèque lorsque des ions sont mis en présence dans le milieu de dissolution (Haug et Smidsrod 1962).

Propriétés structurantes

La propriété principale de l'alginate est sa capacité à former des gels en présence de cations divalents ou multivalents (ex.: Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} ...) selon l'équilibre suivant :



avec Alg qui représente l'alginate

Me_I un sel monovalent

Me_{II} le cation chélateur

La gélification se fait par diffusion lente du cation dans la solution visqueuse d'alginate. Elle provoque un changement de conformation, montré par dichroïsme circulaire, qui se limite à la région des transitions des groupes carboxyliques (Figure I.10) (Morris et coll 1973, Rees et Welsch 1977). La liaison cation-polysaccharide se fait donc essentiellement avec les résidus (G).

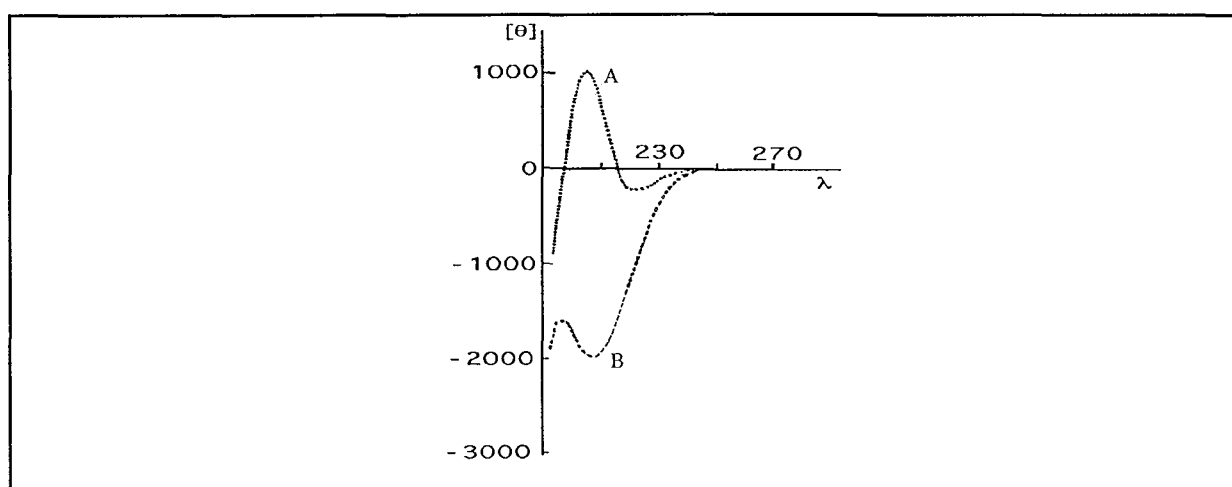


Figure I.10 : Evolution du spectre en dichroïsme circulaire de l'alginate ($M/G = 21/79$) en présence de cations calcium (A) et en l'absence de calcium (B) (Morris et coll 1973).

Les trois blocs (M-M, G-G et M-G) sont polyanioniques. Les blocs (G-G) forment préférentiellement des liaisons ioniques intermoléculaires entre deux groupements carboxyles libres voisins et un cation multivalent (calcium par exemple). L'arrangement des résidus (G) en forme de boucle permet aux oxygènes des groupements hydroxyles voisins de renforcer cette liaison ionique. La liaison est donc plus forte et les zones de jonction ressemblent à la coupe transversale d'une "boîte à œufs" où le cation représente l'œuf à l'intersection des chaînes polysaccharidiques (Figure I.11). Les blocs (M-M) et (G-M) n'interviennent que faiblement dans ce type de liaison (Grant et coll 1973).

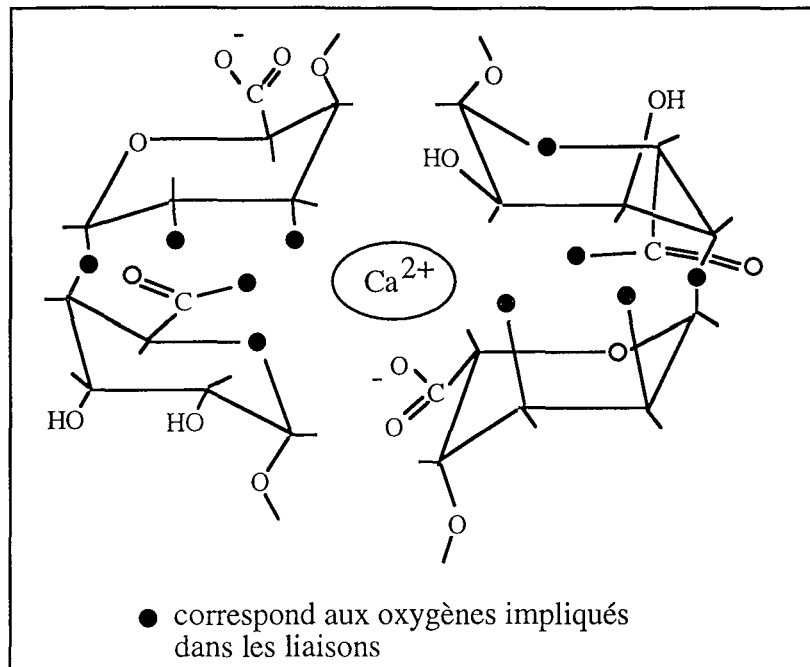
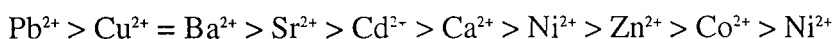


Figure I.11 : Gélation de l'alginate en présence de Ca^{++} : "modèle de la boîte à œufs" (Grant 1973). les cercles pleins correspondent aux oxygènes impliqués ou renforçant la liaison ionique des résidus (G) avec le calcium.

L'origine de l'alginate, dont les proportions (M-M), (G-G) et (M-G) sont variables, influence donc la rigidité des gels formés. Si l'alginate est riche en (G), il forme un gel solide mais cassant. Par opposition, s'il est plus riche en (M), le gel est moins solide et plus souple (Penman et Sanderson 1972; Martinsen et coll 1989). L'explication proposée par Draget (1997) est la suivante : les gels d'alginate riches en résidus (G) ont des chaînes longues de blocs (G-G) rigides et de chaînes courtes élastiques de blocs (M-M), conférant au réseau d'alginate une structure plus dure et plus statique que celui des alginate riches en résidus (M) dont les chaînes longues de blocs (M-M) sont majoritaires. La rigidité d'un gel d'alginate dépend des proportions des blocs structuraux dans la molécule mais aussi de l'affinité du cation vis-à-vis de l'alginate (Smidsrod et Skjak-Braek 1990). L'ordre d'affinité (donc l'augmentation de la rigidité du gel) pour certains cations est la suivante:



Comme décrit ci-dessus, il existe différentes sources d'extraction de l'alginate, qui ont des proportions d'acide uroniques (G) et (M) variables et qui induisent des différences dans les nombres de réarrangements structuraux (G-G, M-M, G-M). L'affinité des cations pour l'alginate et les propriétés des gels résultants dépendent donc du contenu relatif des deux monomères (G) et (M) et de leur distribution. De ce fait, la viscosité des solutions d'alginate est surtout rapportée au poids moléculaire (Martinsen et coll 1991).

Les gels d'alginate de calcium peuvent être destabilisés par certaines substances comme les phosphates, l'éthylène diamine tétra-acétate (EDTA) ou le citrate dont l'affinité pour les ions Ca^{2+} est plus importante que pour l'alginate (Smidsrod et Skjak-Braek 1989).

3.1.4. Méthodes de gélation

Lorsqu'une solution d'alginate est mise en présence d'une solution de chlorure de calcium, un précipité ou un gel d'alginate de calcium se forme instantanément. Cette gélation rapide provoque souvent une irrégularité au sein du gel (Skjak-Braek et coll 1989). Pour éviter ce problème, deux techniques de gélation ont été développées : la méthode de dialyse et la méthode de gélation interne.

3.1.4.1. Gélation par diffusion ou par dialyse

Cette technique permet au cation de diffuser au sein de la solution d'alginate. Les gels obtenus peuvent être des billes dont le diamètre est contrôlé par la taille de la pièce d'extrusion, par la viscosité de la solution d'alginate de départ et par l'application d'un courant d'air pour expulser les gouttelettes de la solution d'alginate avant gélation. On peut également obtenir des fibres en appliquant un processus d'extrusion continu. Pour former des gels plus larges, l'alginate est introduit dans un récipient surmonté ensuite d'une membrane à dialyse à travers laquelle le cation chélatant peut migrer.

En fonction du pH du milieu, deux procédés de gélation par dialyse sont distingués : la diffusion neutre et la diffusion acide (Onsoyen 1996).

Dans le système de gélation par diffusion neutre, les cations Ca^{2+} diffusent depuis un bain externe ou par pulvérisation de CaCl_2 dans le mélange contenant l'alginate. Le temps de contact de la solution calcique à la surface de ce mélange dépend de la vitesse et du type de gélation voulu. Une vitesse rapide de gélation avec un temps de contact court provoque la formation d'une couche externe gélifiée. Par opposition, un temps de contact long avec une gélation lente donne lieu à une gélation partielle voire totale du mélange contenant l'alginate.

Dans le cas du système de gélation par diffusion acide, un sel de calcium insoluble est incorporé dans l'alginate. L'application d'un acide à la surface de ce mélange permet au sel de calcium de se dissoudre et provoque ainsi le début de la gélation.

3.1.4.2. Gélation interne

Cette technique est surtout employée dans l'industrie alimentaire ou pour la réalisation d'un milieu stérile lors de cultures de cellules végétales (Draget 1997). En général, la solution

d'alginate est mélangée à un complexe inactif du cation chélatant (de type EDTA, phosphate carbonate ou citrate de calcium). Un agent retardateur (souvent une D-glucono- δ -lactone) est introduit dans ce mélange, et libère des ions H^+ qui provoquent alors la libération du cation chélatant, par exemple le calcium, Figure (I.12) suivie de la gélification de la solution.

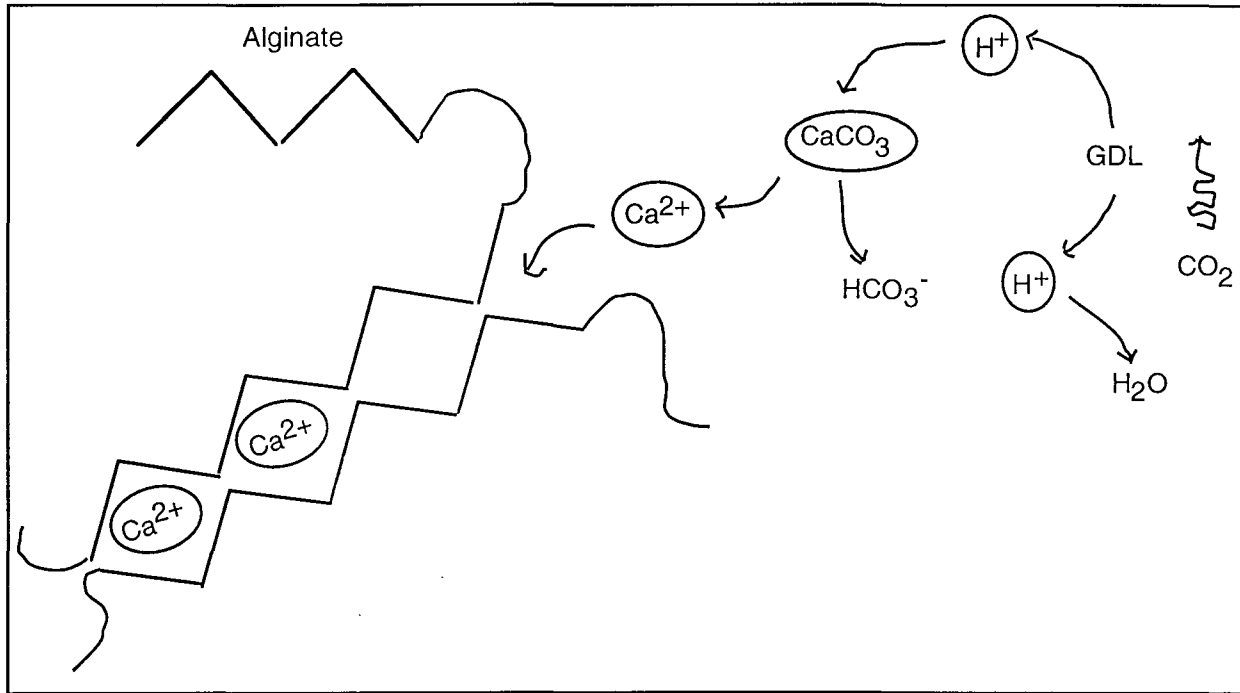


Figure I.12 : Technique de gélification interne de l'alginate, utilisant le carbonate de calcium ($CaCO_3$) comme agent de chélation et la D-glucono- δ -lactone (GDL) comme agent retardateur (Onsoyen 1996)

3.1.5. Applications industrielles et médicales

Applications industrielles

L'alginate de sodium en solution est employé dans l'industrie pour ses propriétés rhéologiques, et sous forme de gel pour ses propriétés de gonflement et d'insolubilité (revue récente par Onsoyen 1996).

Il entre dans la composition des teintures de textile, car il est un bon épaississant et ne réagit pas avec les colorants anioniques.

L'alginate est employé également dans l'industrie du papier pour le dimensionnement et/ou pour le lissage du papier. Dans le dimensionnement du papier, l'alginate est associé à l'amidon dont il limite la pénétration dans le papier. Il permet ainsi d'améliorer certaines propriétés du papier telle la douceur ou la rugosité et l'uniformité. L'alginate donne au papier final une meilleure résistance à l'huile, à la graisse et aux solvants et une plus grande qualité d'impression.

Dans le traitement de l'eau, l'alginate sert de co-floculant. Les longues chaînes de l'alginate se lient aux impuretés et aux autres floculants et forment ainsi des agrégats qui sont facilement séparables de l'eau.

L'alginate est un polymère très largement utilisé dans l'industrie alimentaire. On y utilise l'alginate riche en résidus (G), l'alginate riche en résidus (M) mais également des alginates modifiés de type alginate de propylèneglycol. La liste citée ci-dessous ne représente que quelques exemples de l'emploi de l'alginate dans l'industrie alimentaire.

- * La moutarde ou les sauces à base de moutarde : l'alginate permet d'obtenir les propriétés rhéologiques désirées pour les moutardes ou les sauces utilisées dans les distributeurs automatiques. L'alginate sert à la stabilisation de l'émulsion de la moutarde évitant une séparation entre les phases solide et liquide.

- * Les boissons : l'alginate est employé comme stabilisant, épaississant ou comme émulsifiant. Ainsi dans la bière, son interaction avec des protéines augmente la durée de vie de la mousse en la rendant moins fragile vis-à-vis des impuretés.

- * Les confitures, marmelades, pâtisseries, aliments reconstitués (fruits secs, farces pimentées des olives ...), alimentations animales et produits laitiers utilisent les propriétés de gélification de l'alginate. Il existe de nombreuses formulations pour obtenir des gels stables à haute température et qui ne se dégradent pas lorsque la température diminue (cas des crèmes renversées, confitures...). L'alginate permet également d'améliorer la stabilité des produits vis-à-vis de la congélation et/ou de la décongélation.

Applications médicales

Sa capacité à former des gels et des films, son rôle de stabilisant, sa biocompatibilité et sa biodégradabilité confèrent à l'alginate une grande utilisation pour différentes applications médicales.

- * Traitement du reflux œsophagien (Graham et coll 1997) : L'alginate forme en présence du suc gastrique un gel acide capable de stagner environ trois heures dans l'estomac et de constituer ainsi une barrière entre l'estomac et l'œsophage.

- * Dermatologie et brûlures (Blair et coll 1990, Lawrence et Blake 1991) : En présence d'exsudat d'une blessure, les fibres ou poudres d'alginate forment un gel hydrophile, protecteur, non pliable, non toxique, et adhérent, ce qui permet de conserver un environnement humide pour la blessure. Ce gel est également compatible et permet la diffusion de médicaments. Les propriétés du gel et sa vitesse de formation dépendent de la méthode de fabrication, de l'origine et du rapport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de l'alginate. Par ailleurs, plus l'alginate est riche en résidus (G), plus les fibres résultantes seront cassantes et absorbantes.

- * Système de libération contrôlée : Lorsque l'alginate est en contact avec de l'eau ou un milieu biologique, il gonfle. S'il est combiné à un agent bioactif soluble dans l'eau, ce dernier se dissout et diffuse au sein de la matrice gonflée. Selon que l'alginate soit riche en résidus (G) ou en (M), les propriétés de gonflement et de porosité seront différentes et provoqueront une libération plus ou moins rapide du médicament.

- * Matériaux d'empreintes dentaires : L'utilisation de l'alginate dans les matériaux d'empreintes dentaires repose sur la réaction entre un sel de calcium peu soluble (CaSO_4) et

d'un alginat de sodium, de potassium ou d'un alginat de triéthanolamine. Les matériaux d'empreintes dentaires commerciaux sont des mélanges de composés (retardateur de réaction, modificateurs de pH...), qui, lorsqu'ils entrent en contact avec l'eau, développent les propriétés requises variant avec le nombre de résidus (G) ou (M).

Domaines de recherches et associations

L'utilisation de l'alginate dans d'autres domaines est actuellement à l'étude.

Ses propriétés de gélification sont ainsi employées pour la microencapsulation de cellules vivantes (type Ilots de Langerhans dans le traitement du diabète) et pour l'élaboration d'un pancréas artificiel (Perrier 1997). On évalue également l'encapsulation d'enzymes ou de petites molécules (prednisolone, indométhacine...) (Sugawara et coll 1994, Bodmeier et Paeratakul 1991) dans le but d'obtenir une libération prolongée de ces médicaments.

L'alginate sous forme de gel sert de support pour la culture cellulaire tridimensionnelle. En effet, la transplantation de ce support est proposée comme méthode de réparation tissulaire. Un prélèvement tissulaire réalisé sur un patient est dissocié en cellules individuelles qui doivent proliférer et adhérer sur une matrice support, après production d'un tissu néoformé *in vitro*, une transplantation de l'ensemble est réalisée pour restaurer la perte de tissu. Cette matrice support doit permettre une bonne nutrition des cellules mais doit également conserver sa structure tridimensionnelle et avoir une flexibilité et une dureté appropriée pour la fabrication du nouveau tissu (Puelacher et coll 1994).

L'alginate est généralement employé tel quel. Cependant, certains dérivés et des associations avec d'autres polymères sont également proposés.

Actuellement, un seul dérivé de l'alginate est commercialisé : l'alginate de propylène-glycol qui est obtenu par estérification de l'alginate avec de l'oxyde de propylène (Squin 1995, Draget 1997). D'autres types de dérivés alginiques sont en cours d'études (Della Valle et coll, Soon-Shoing et coll).

La chitine et ses dérivés jouent un rôle important dans le processus de cicatrisation des blessures (Chung et coll 1994). L'association de l'alginate et du chitosan est obtenue par une liaison ionique entre le polysaccharide cationique (groupement NH_3^+ du chitosan) et le polysaccharide anionique (groupements COO^- de l'alginate) (Matsumoto et coll 1993). Kauffmann et coll (1992) a réalisé différentes matrices (proportions variables de ces deux polysaccharides) en utilisant un alginate estérifié, permettant d'obtenir les viscosités adaptées à son utilisation en tant qu'agent gélifiant dans des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques. Leur association donne des gels limpides, partiellement biodégradables et ayant de bonnes propriétés physico-chimiques. Miyazaki et coll (1994) a réalisé une matrice d'alginate de sodium et de chitosan par simple compression. Cette matrice permet d'obtenir la libération contrôlée du kétoprofène à partir d'un comprimé bioadhésif.

L'association de fibres de collagène imprégnées d'alginate (90:10) est connue sous le nom de Fibrocol® et commercialisée en Angleterre. Elle est utilisée pour favoriser la cicatrisation de la peau lors de brûlures ou de greffes.

De nombreuses autres associations avec l'alginate sont également mentionnées : alginate - poly-L-Lysine-alginate (Thu et coll 1996), alginate-mucin (Fuonfuchat et coll 1996)...

3.2. Hyaluronate

Le hyaluronate est un mucopolysaccharide des tissus conjonctifs. Sa particularité est d'emmagasiner une grande quantité d'eau formant une matrice visqueuse autour des cellules. Il est le constituant majeur de l'humeur vitrée où il agit comme un gel transparent de faible indice de réfraction permettant au globe oculaire de garder sa forme (Atkins et coll 1972). Il représente également la majorité des constituants du liquide synovial où il est présent en grande partie sous forme libre (non complexé avec d'autres macromolécules). Il entre dans la composition de la matrice cartilagineuse où il s'organise en réseau avec les fibres de collagène et les protéoglycanes.

3.2.1. Sources du hyaluronate

Le hyaluronate est synthétisé dans de nombreux tissus : liquide synovial, la peau, le cordon ombilical, la crête de coq.... Il fût isolé de l'humeur vitrée bovine pour la première fois en 1934 (Meyer et Palmer 1934). Il peut également être synthétisé par une bactérie, *Streptococcus zooepidemicus*. Selon l'origine et le mode de préparation du hyaluronate (extraction liquide-liquide, échange d'ions, précipitations, procédés enzymatiques ou électrophorétiques...), son poids moléculaire peut varier de quelques 10^4 à 10^6 Da (tableau I.3).

Le hyaluronate est une macromolécule localisée dans les espaces intercellulaires. Il est synthétisé dans la membrane cellulaire de nombreux types de cellules mais n'est jamais stocké dans la cellule elle-même. Après synthèse du polymère, ce dernier est éjecté vers les espaces extracellulaires vides où son rôle est de combler ce vide, stabiliser la structure et protéger les cellules (Balazs et Denlinger 1993).

ORIGINE DU HYALURONATE	TECHNIQUE DE PREPARATION	POIDS MOLECULAIRE x 10 ⁶ (Da)*
Humeur vitrée bovine	papaïne, cétylpyridinium électrophorèse	1,6 1,8
Cordon ombilical humain	papaïne, cétylpyridinium électrophorèse enzymes, rouge de phénol, cétylpyridinium	5,8 2,7 3,0
Crête de coq	papaïne, cétylpyridinium électrophorèse	1,3 1,3-4,2

Tableau I.3 : Evolution du poids moléculaire de l'acide hyaluronique en fonction de son origine et de la méthode d'extraction. * : Balazs 1958.

3.2.2. Structure

Le hyaluronate est un polysaccharide linéaire composé alternativement de résidus acide β -D-glucuronique et N-acétyl- β -D-glucosamine liés en (1-4) et en (1-3). L'enchaînement de ces deux résidus donne une unité disaccharidique appelée acide N-acétyl-hyalobiuronique (Figure I.13).

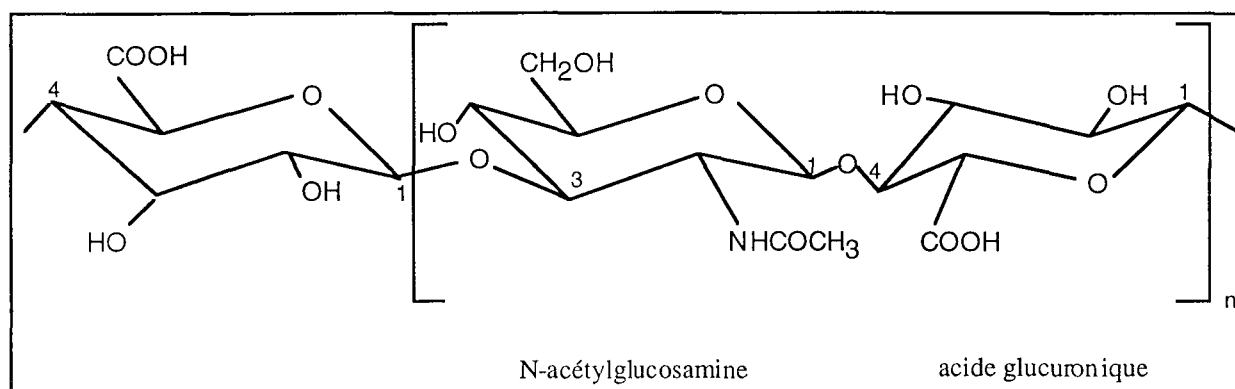


Figure I.13 : Formule chimique du hyaluronate.

Le polysaccharide est formé de 10 000 à 12 000 unités disaccharidiques. Il est fortement hydraté et se replie en pelote de 0,5 μ m de diamètre environ (Balazs et Denlinger 1985).

3.2.3. Propriétés du hyaluronate

Le hyaluronate de sodium se présente sous forme de filaments blancs enchevêtrés à l'aspect proche de celui du coton.

En première approximation, on peut dire que l'acide hyaluronique, en solution neutre de force ionique faible, a une structure de serpent dont le repliement semble obéir au hasard (random coil) et dont le rayon de giration est compris entre 2400 et 6400 Angströms (Balazs 1958).

Chaque unité disaccharidique comporte une fonction carboxylique, qui confère un comportement légèrement acide à la macromolécule (pKa de l'ordre de 3.2) (Hadler et Napier 1977). Le hyaluronate a une grande affinité pour l'eau puisqu'il peut s'hydrater jusqu'à mille fois son volume anhydre. La majorité des molécules d'eau est maintenue mécaniquement au sein du polysaccharide et n'est donc pas liée chimiquement au hyaluronate (Laurent et Fraser 1992).

La plupart des travaux publiés sur la détermination de sa viscosité intrinsèque sont relatifs à des mesures de temps d'écoulement à travers un tube capillaire. Dans le tableau I.3 sont reportées certaines valeurs de la viscosité intrinsèque de l'acide hyaluronique à 25°C.

Provenance	Poids moléculaire (10 ⁶ g/mol)	Milieu d'étude	Viscosité intrinsèque $[\eta]$ (mL/mg)	Référence
Crête de coq	1,3		0,95 - 3,13	Balazs (1958)
Cordon ombilical	5,8		1,33 - 2,99	
Humeur vitrée bovine	1,6		0,9 - 4,8	
Crête de coq	1,3	0,2 M NaCl 0,5 M NaCl	2,22 1,33	Cleland et Wang (1970)
Cordon ombilical		pH 5, Na ⁺ ou Li ⁺ pH 5, Ca ²⁺ ou Mg ²⁺	2,5 1,9 - 2,1	Chakrabarti (1977)
Cordon ombilical	1	pH 9,5 pH 12,5	1,8 1,0	Matthews et Decker (1977)
Crête de coq	1,3	pH 2,6	1,1	Park et Chakrabarti (1977)
Crête de coq	1,6 4	pH 7 NaCl 0,15 M	2,6 5,9	Morris et coll (1980)
Crête de coq	1,3	0,02 M acétate pH 6	2,47	Payan et coll (1993)

Tableau I.3 : Valeurs de la viscosité intrinsèque de l'acide hyaluronique selon l'origine et le milieu étudié.

La nature du milieu influence la valeur de la viscosité intrinsèque : l'augmentation de la force ionique à un même pH entraîne sa diminution (Cleland et Wang 1970) ; sa valeur est plus faible en présence d'ions divalents qu'en présence d'ions monovalents (Chakrabarti et Balazs 1973).

Ce phénomène est dû à une rigidification de la structure par les ions divalents dont le nombre de coordination est plus élevé. L'acidification du milieu entraîne une diminution des charges négatives du polymère : les molécules se repoussent moins et sont plus indépendantes les unes des autres. Ceci se traduit par une diminution de la viscosité intrinsèque (Morris et coll 1980).

Les études de rhéologie des solutions de hyaluronate ont mis en évidence ses propriétés de viscoélasticité particulières (Bothner et Wik 1987) :

A une concentration de l'ordre de 1 mg/mL, les molécules de hyaluronate, en pelote, entrent en contact les unes avec les autres. Au delà de cette concentration, elles s'interpénètrent pour former un réseau tridimensionnel flexible. A partir de 10 mg/mL, le réseau devient très serré et confère à la solution de hyaluronate un aspect de gel de grande viscosité. En réalité, cette viscosité, mesurée par viscosimétrie capillaire (Figure I.14), varie avec sa concentration et son poids moléculaire. Ainsi, une molécule de hyaluronate en pelote étendue va modifier la trajectoire de certains courants de flux provoquant ainsi une augmentation de la viscosité (Figure I.14a). Dans le cas d'un hyaluronate de poids moléculaire inférieur en concentration identique, la trajectoire des courants n'est plus altérée, d'où une diminution de la viscosité (Figure I.14b). Avec une concentration croissante d'un même hyaluronate, ce sont les frictions internes au capillaire qui provoqueront une augmentation de la viscosité (Figure I.14c).

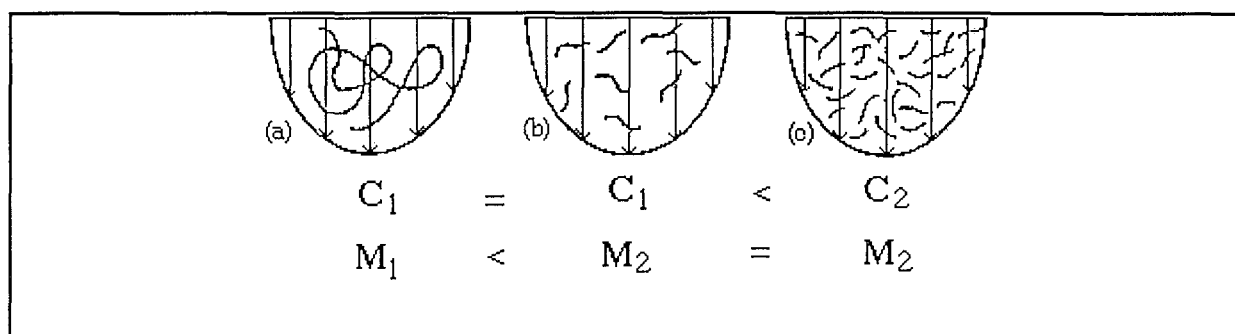


Figure I.14 : Ecoulement du hyaluronate dans un tube capillaire, écoulement dépendant de la concentration et du poids moléculaire (Bothner et Wik 1987).

En milieu neutre, les charges négatives de l'acide lui donne un caractère polyélectrolytique comme pour la plupart des polysaccharides. Cette propriété permet au hyaluronate d'avoir une certaine affinité pour les cations de type métaux alcalins ou alcalino-terreux, métaux de transition, protons Ces cations peuvent intervenir dans un changement de conformation de cet acide comme cela a été observé par dichroïsme circulaire (Chakrabarti 1977) (Figure I.15). L'acide hyaluronique présente en effet deux bandes en dichroïsme à 210 et 190 nm, correspondant respectivement aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ des groupements amides (Stone 1969, 1971). La bande à 210 nm correspond à une forte ellipticité négative dont l'amplitude est réduite en présence d'ions divalents (Chakrabarti 1977), ou lorsque le milieu est acidifié (Park

et Chakrabarti 1978). La bande à 190 nm change de sens avec le pH du milieu (Chakrabarti et Balazs 1973) : elle est positive et forte en milieu acide et devient négative pour des pH supérieurs à 4,5. Ce changement de signe est attribué au changement de conformation d'une chaîne isolée de polysaccharide ou à une interaction intermoléculaire, induite par le changement d'ionisation des groupements carboxyliques.

Dans le liquide synovial, les molécules d'acide hyaluronique s'interpénètrent et joueraient ainsi un rôle de filtrant pour les solutés circulants mais auraient également la capacité d'exclure des molécules de haut poids moléculaire. Le hyaluronate donne au liquide synovial le pouvoir d'absorber les chocs (Balazs et Denlinger 1993) et lui procure des propriétés rhéologiques particulières : lorsque la force de cisaillement appliquée est faible (dans le cas de la marche par exemple), le liquide synovial a un comportement visqueux. Si cette force de cisaillement augmente (lors d'une course par exemple), son comportement devient élastique. Cette élasticité est régie par la déformation des molécules d'acide hyaluronique. La transition entre ces deux comportements dépend de la concentration en acide hyaluronique mais aussi de son poids moléculaire.

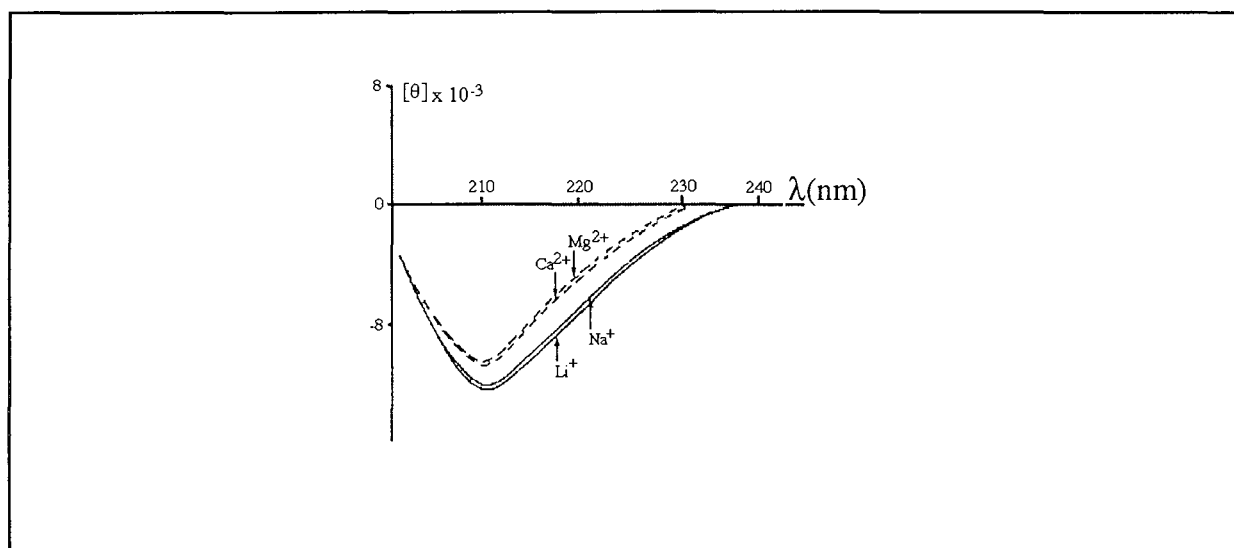


Figure I.15 : Variation du spectre de dichroïsme circulaire du hyaluronate en fonction de la nature des ions présents dans le milieu de dissolution (Johnson 1987).

3.2.4. Applications industrielles, médicales

Applications industrielles et recherches

Le hyaluronate et ses dérivés (hylans) sont très largement employés pour leur propriétés rhéologiques mais également pour leur grande compatibilité biologique.

La capacité du hyaluronate à capter des molécules d'eau est mise à profit dans l'industrie cosmétique pour la formulation de crèmes, de gels ... (Sakurai 1987).

Les propriétés rhéologiques particulières du hyaluronate, c'est-à-dire sa forte viscosité en présence d'une faible vitesse de cisaillement (ou en l'absence de cette contrainte), permet de manipuler les tissus ophtalmologiques et de maintenir la profondeur et la forme de la chambre antérieure. Lors d'une vitesse de cisaillement forte (injection au travers d'une canule) sa viscosité est faible et permet au hyaluronate d'être injecté. Ces caractéristiques lui valent une utilisation pour les interventions chirurgicales oculaires (HEALONID®, HYALGAN®) (Goa et Benfield 1994). Toujours dans le domaine oculaire, il sert de vecteur pour la libération contrôlée de la pilocarpine (Larsen et Balazs 1991).

Le hyaluronate est utilisé comme marqueur diagnostique pour certaines pathologies. Par exemple, dans le cas d'une cirrhose, le taux de hyaluronate sanguin est 10 à 100 fois plus élevé que le taux normal (Laurent et Fraser 1992). Son dosage dans différents types de tissus et de fluides (plasma, liquide synovial et urine) peut être utile aussi pour le diagnostic des arthropathies inflammatoires (Jouzeau et coll 1992), hépatiques et rénales mais également pour des cancers et des scléroses systémiques.

Le hyaluronate joue un rôle dans la cicatrisation. Il a le pouvoir d'immobiliser de l'eau dans le tissu et donc de changer le volume dermal et sa compressibilité. Il peut également influencer la prolifération, la différenciation cellulaire et la réparation tissulaire (Laurent et Fraser 1992, Juhlin 1997). Il a été testé dans le cas de perforations de la membrane du tympan (Martini et coll 1991) pour favoriser la cicatrisation mais est également testé pour la réparation de la peau (Burd et coll 1991).

Ses propriétés de viscoélasticité sont exploitées dans le concept de la viscosupplémentation, basé sur l'hypothèse que des injections intra-articulaires de hyaluronate peuvent restaurer les caractéristiques du liquide synovial (Maheu 1995) et donc protéger le cartilage.

Associations avec le hyaluronate

Comme la plupart des polymères, l'acide hyaluronique a également été employé en association avec d'autres constituants.

Le hyaluronate a ainsi été associé à la fibronectine et au collagène pour favoriser le processus de cicatrisation (éponges de collagène). L'association polysaccharide-protéine se fait soit par liaison ionique entre le hyaluronate et le collagène, soit par liaison covalente entre le collagène et le hyaluronate activé par du bromure de cyanogène (Huang-Lee et Nimni 1993).

Le hyaluronate a été réticulé avec différents composés pour former des gels de hyaluronate appelés hylans. Ces polymères ont des poids moléculaires plus élevés que le hyaluronate (lors de la réticulation avec du formaldéhyde), ou présentent un réseau moléculaire infini (réticulation

via des groupements vinylsulfone) (Larsen et Balazs 1991). Ils servent à la libération contrôlée de médicaments (pilocarpine ou betaxolol, gentamicine...) mais aussi en viscosupplémentation. Dans l'objectif de comblement de lésions ostéochondrales, un hyaluronate de haut poids moléculaire mélangé à des chondrocytes a été introduit au sein de la cavité articulaire (Robinson et coll 1990). La réparation tissulaire obtenue est proche du cartilage hyalin.

II. PRESENTATION DE L'ETUDE

Dans cette étude bibliographique, nous avons présenté les principales caractéristiques des deux polysaccharides choisis : l'alginate pour ses propriétés structurantes et le hyaluronate pour ses propriétés biologiques. L'objectif attendu de leur association est d'obtenir un gel plus ou moins solide dans le but de favoriser la restauration du cartilage lors du comblement de lésions ostéochondrales.

Ces deux polymères sont commercialisés sous différentes formes. Nous exposerons donc les raisons qui ont guidé nos choix, avant de présenter le déroulement des études que nous avons réalisées.

1. Choix des polysaccharides

L'alginate a été choisi pour sa capacité à gélifier en présence de cations multivalents. Le polymère extrait de *Macrocystis pyrifera* est commercialisé sous trois formes, dont la viscosité est soit faible, soit moyenne, soit forte. Notre choix s'est porté principalement sur l'alginate de moyenne viscosité afin d'obtenir un gel ni trop souple ni trop rigide. Son comportement en biologie cellulaire a néanmoins été comparé à celui d'un alginate de faible viscosité, plus généralement employé dans la littérature.

Pour le hyaluronate, plusieurs origines sont commercialisées, et, à chacune correspond un poids moléculaire et des caractéristiques rhéologiques spécifiques, ainsi que nous l'avons décrit précédemment (§ I.3.2.3). Nous avons souhaité évaluer l'incidence de la viscosité de l'acide hyaluronique sur le comportement du gel obtenu : pour cela nous avons utilisé plusieurs variétés. Certaines sont extraites de la crête de coq (nommée HA I dans la suite de ce mémoire), du cordon ombilical humain (HA III) ou de l'humeur vitrée bovine (HA IV). Enfin, une forme commerciale (HA II) dont l'origine n'est pas spécifiée, a été retenue pour son faible coût, en vue d'un développement ultérieur du biomatériau.

Les caractéristiques du biomatériau hybride dépendant à priori des proportions des deux polysaccharides, nous avons préparé des mélanges de rapport massique hyaluronate / alginate variable : les valeurs de rapport 1:3; 2:3 et 3:3, correspondant respectivement aux fractions massiques en hyaluronate de 0,25; 0,4 et 0,5, ont été retenues.

Pour augmenter les interactions possibles entre nos polymères, nous avons également envisagé de modifier chimiquement l'un d'entre eux.

2. Déroulement des travaux

La première étape de nos travaux a concerné l'étude des propriétés physico-chimiques de nos polymères, dans le but de mettre en évidence une éventuelle interaction entre eux. Pour cela, nous avons utilisé tout d'abord la possibilité offerte par le dichroïsme circulaire de montrer des modifications de conformation locale des polysaccharides. Le comportement rhéologique des polysaccharides en solutions est une deuxième méthode : elle a en effet été utilisée précédemment par Fuongfuchat et coll (1996), qui a montré ainsi l'existence d'interactions entre l'alginate et la mucine. L'étude rhéologique a été réalisée d'une part sur des solutions diluées par des mesures de viscosité intrinsèque ainsi qu'il est souvent réalisé pour des solutions saccharidiques (Haug et Smidsrod 1962, Smidsrod 1970, Thu et coll 1996...), et d'autre part pour les solutions concentrées qui serviront ultérieurement à la formation des gels. L'ensemble de cette étude a concerné plus spécialement deux hyaluronates de poids moléculaires différents, HA I et HA II.

L'étude de la formation des gels a constitué la deuxième étape de ce travail. A partir d'un mélange d'alginate et de hyaluronate (HA I ou HA II) en solution concentrée, il est possible de préparer un gel en présence de cations divalents. Le choix du cation s'est porté sur l'ion calcium car il est très employé dans les études de gélation de l'alginate mais également parce qu'il est très présent dans l'organisme et particulièrement dans le cartilage. Pour des raisons techniques d'analyse, des gels ont été préparés sous deux formes. La gélation dans des cassettes a permis d'obtenir des gels rectangulaires d'une épaisseur d'environ 2,5 mm, qui sont découpés en disques de 10 mm de diamètre, pour déterminer les propriétés mécaniques des gels au rhéomètre à plans striés parallèles. Le mécanisme de gélation au sein des différentes matrices, sous forme de billes, a été étudié en déterminant les paramètres de diffusion des ions calcium, de l'eau et du hyaluronate lors de la formation des gels. Les gels ont enfin été soumis à une observation macroscopique et microscopique pour visualiser le réseau polysaccharidique des gels.

La troisième partie correspond à l'étude du comportement des matrices dans des milieux simulant les conditions physiologiques et à l'observation de leur biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*. L'étude de la stabilité des gels dans différents milieux est réalisée sur des billes, pour différentes espèces de hyaluronate (HA I, HA III et HA IV), par le dosage du hyaluronate libéré par chromatographie liquide haute performance. Différents constituants endogènes, présents dans la cavité articulaire, ont plus particulièrement été étudiés : des protéines comme l'albumine, et l'acide hyaluronique lui-même. Ce travail a été suivi d'une étude de cytocompatibilité des matrices vis-à-vis de chondrocytes, en comparant les matrices hybrides au modèle de référence que constitue l'alginate de calcium. La prolifération et la viabilité cellulaire ont constitué, avec les caractéristiques biochimiques de la matrice extracellulaire synthétisée, l'ensemble des paramètres qui nous ont permis d'évaluer l'éventuelle incompatibilité de telles matrices avec les chondrocytes. *In vivo*, l'implantation de certaines de ces matrices (alginate, HA I-alginate),

dans un modèle de poche à air chez le rat a permis enfin d'observer la présence ou non de réactions inflammatoires liées à ces matériaux. Le mélange HA I-alginate-chondrocytes (HA ICh) hétérologues a été utilisé en tant que témoin positif. Les réactions inflammatoires éventuelles ont été évaluées par les dosages biochimiques des exsudats ou de l'eau de lavage des poches lors du sacrifice.

Parallèlement à ces travaux et au vu des premiers résultats, nous avons cherché à augmenter les interactions entre les polysaccharides, en modifiant chimiquement le hyaluronate. La déacétylation partielle du hyaluronate a ainsi été envisagée : les groupements amines libérés sont, en effet, susceptible d'établir une liaison ionique avec les fonctions carboxyliques de l'alginate. Pour cela, nous avons appliqué et adapté la méthode proposée par Dahl et coll (1988) pour obtenir plusieurs dérivés (noté HA II_a à HA II_d) présentant un taux de déacétylation variable. Pour des raisons de coût de mise au point de la synthèse, cette réaction chimique n'a été réalisée que pour HA II. La variation du poids moléculaire en cours de synthèse a été suivie par des mesures de diffusion de lumière laser aux petits angles (LALLS) et le pourcentage de groupements amine libérés est obtenu par un dosage colorimétrique des groupements N-acétyl-glucosamine restant dans la molécule de hyaluronate. Dans un souci de clarté de présentation, nous présenterons dans ce mémoire les résultats concernant le hyaluronate déacétylé avec ceux du hyaluronate natif. Néanmoins, lors de l'étude de certains facteurs, seules les conditions optimisées pour le hyaluronate natif ont été appliquées au polysaccharide modifié.

Ces études ont donné lieu à différentes publications :

A) S. Oerther, H. Le Gall, E. Payan, F. Lapique, N. Presle, P. Hubert; J. Dexheimer, P. Netter, F. Lapique. *Hyaluronate-alginate gel as a novel biomaterial: Mechanical properties and formation mechanism*. Biotechnology and Bioengineering, sous presse 1998.

B) S. Oerther, E. Payan, F. Lapique, N. Presle, P. Hubert, S. Muller, P. Netter, F. Lapique. *Hyaluronate-alginate combination for the preparation of new biomaterials: Investigation of the behaviour in aqueous solutions*. Biochimica and Biophysica Acta, sous presse 1998.

C) S. Oerther, A.C. Maurin, E. Payan, P. Hubert, F. Lapique, J. Dexheimer, P. Netter, F. Lapique. *High interaction alginate-hyaluronate associations by hyaluronate deacetylation for the preparation of efficient biomaterials*. Biopolymers, soumis 1998.

III. MATERIELS ET METHODES

1. Réactifs

1.1. Polysaccharides

L'alginate de sodium : Sigma (La Verpillière, France)

Extrait de *Macrocystis pyrifera*

Rapport mannuronique / guluronique : 61/39 (Rajaonarivony et coll 1993)

* Viscosité, pour une solution à 20 mg/mL : 3,5 Pa.s à 25°C (Alg)

* Viscosité, pour une solution à 20 mg/mL : 0,25 Pa.s à 25°C (Alg FV)

Le hyaluronate de sodium :

* Extrait de la crête de coq (HA I), Sigma (La Verpillière, France)

* Origine non connue (HA II), pureté : 85 % en poids, Acros (Noisy le Grand, France)

Viscosité, pour une solution à 20 mg/mL : 5,3 Pa.s à 25°C

* Extrait de cordon ombilical humain (HA III), Sigma

* Extrait d'humeur vitrée bovine (HA IV), Sigma

1.2. Autres réactifs et consommables

Eau ultrapure (résistivité > 18 M.Ωm) obtenue par Purite prestige (Osi, France).

Les réactifs et consommables ont été obtenus chez les différents fournisseurs suivants :

Boehringer (France) : Collagénase Bactérienne (*Clostridium histolyticum*).

Cole-Palmer Instruments (USA) : Filtres nylon (0,45 µm)

Euromedex (France) Dosage des prostaglandines E2 par kit Elisa : 1 flacon de EIA BUFFER de 30 mL sert de tampon de dilution du conjugué, des standards et des essais. 1 flacon de WASH BUFFER de 20 mL sert de tampon de lavage, employé dilué au 1/10ème. 1 flacon de K-BLUE SUBSTRATE DE 20 mL correspondant au substrat de l'enzyme. 1 flacon de conjugué de 150 µL correspond à des prostaglandines E2 couplées à la peroxidase. 1 flacon de standard de 100 µL.

Gibco BRL (France) : Amphotéricine B, DMEM, DMEM/HAMF12, EDTA, EDTA-trypsine, gentamicine, L - glutamine, sérum de veau foetal décomplémenté, trypsine, tampon phosphate sans ions calcium ni magnésium (PBS).

Merck (Nogent/Marne, France) : Acétone, acide acétique, acide chlorhydrique concentré, 4-diméthylaminobenzaldéhyde (PDMA), K₂HPO₄, méthanol, NaCl, NaH₂PO₄.H₂O, toluène,

tris(hydroxyméthyl)amino-méthane (Tris).

Pharmacia diagnostic (St Quentin en Yveline, France) : Kit radiométrique «HA test 50» : 5 flacons d'acide hyaluronique de concentrations 25, 75, 200, 500 et 1000 µg/L pour effectuer la gamme. 1 étalon pour réaliser le blanc. 1 traceur d'iode 125 couplée à une protéine support (¹²⁵I-HABP) (18,5 Mbq/0,5 mL). 1 solvant de reconstitution bleu (15 mL). 1 solution jaune d'HA-sépharose (6 mL). 1 solution de suspension Tween 20® (150 mL).

Pierce (USA) : Cassettes à dialyse, format 34 x 25 mm, (Slide-A-Lyse).

SDS (Villeurbanne, France) : Ethanol, acétonitrile.

Sigma (La Verpillière, France) : Acétate de sodium, N-acétylglucosamine, acide benzoïque, acide phosphorique, bleu alcian, bleu Trypan, CaCl₂, chondroïtinase ABC (EC 4224), chondroïtine sulfate 4, hyaluronate lyase (EC 4221), hydrazine anhydre, hydrazine sulfate, NaNO₃, NaN₃, pronase, rouge de ruthénium, sérum albumine bovine, tétraborate de sodium.

Kit dosage des protéines n°TPRO-562 : Solution d'acide bicinchoninique (pH 11,25) (B-9643) contenant du carbonate de sodium, du tartrate de sodium, du bicarbonate de sodium dans la soude. Solution à 4 % de sulfate de cuivre II pentahydraté (C-2284). Solution de dosage (chromogène) : 50 volume de B-9643 + 1 volume de C-2284.

Spectrum medical Industries (USA) : Membranes à dialyse dont le seuil de diffusion est de 12 à 14000 Dalton.

TAAB (France) : Acétate d'uranyle, anhydre dodécénylsuccinique, anhydre méthylnadique, citrate de plomb, résine Epon 812®, tétr oxyde d'osmium, 2-4-6 trisdiméthylaminométhylphénol, glutaraldéhyde, grille en cuivre ou en or.

Wanlin (France) : Seringue insuline.

Waters (St Quentin en Yveline, France) : Phosphate de tétrabutylammonium (Pic A).

2. Solutions

2.1. Polysaccharides

Les différentes solutions de polysaccharides ont été préparées soit individuellement ou soit en mélange en fonction des études réalisées .

Les solutions individuelles de polysaccharides sont préparées soit à une concentration à 20 mg/mL pour des études en milieu concentré mais également lors de la réalisation des gels, soit à une concentration de 2 mg/mL en milieu dilué. Cependant cette dernière concentration subit des dilutions successives pour certaines mesures (de type Ubbelohde ou dichroïsme circulaire).

Les solutions de polysaccharides en mélange sont préparées à une concentration de base en alginate à 20 mg/mL pour les solutions concentrées mais également pour la réalisation des gels.

Le hyaluronate est additionné à l'alginate pour obtenir des rapports massiques HA/alginate de 1:3, 2:3 et 3:3, c'est-à-dire pour des fractions massiques en HA équivalant à 0,25, 0,4 et 0,5. Pour les études des solutions en mélange étudiées dans des conditions de forte dilution, l'alginate est à concentration de 2mg/mL et le hyaluronate est toujours incorporé de façon à obtenir les mêmes rapports massiques que ci-dessus. L'ensemble de ces solutions peut subir des dilutions et peut également être préparé en présence de NaCl (concentration variable).

2.2. Autres solutions

* Eluants :

NaNO₃ 0,1M contenant NaN₃ (bactéricide) à 400mg/mL. L'ensemble de la solution est filtrée sur du 0,22 µm.

HPLC : Mélange de phosphate de tétrabutylammonium 10mM et d'acétonitrile 83:17 (v/v) ajusté à pH 7,35 avec de l'acide phosphorique

* **Anesthésie** : mélange anesthésique composé d'un flacon de 10 mL d'Imalgène 500 (Rhône Mérieux) plus 3,3 mL de Vétranquil® à 0,5% (Sanofi Santé Nutrition Animale).

* Tampons et solutions :

Acétate pH 6 : Solution de CH₃COONa, 3H₂O à 100 mM, ajustée à pH 6.

Acétone de 0 à 100% : solutions acétone à 10, 20, 30, 50, 75 et 100 % dans l'eau.

Acide hyaluronique à 2 mg/mL dans tampon phosphate 0,05M pH 5. Deux dilutions avec du tampon acétate pH 6 pour obtenir de l'acide hyaluronique à 1 et 0,1 mg/mL.

Cacodylate pH 7,2 : glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M.

Citrate - EDTA (55 mM- 20mM) dissous dans NaCl 0,15 M.

1,9 DMB : 16 mg de diméthyl-méthylène blue + 3,04 g de glycine + 2,37 g de NaCl, le tout est ajusté à un volume de 1L avec l'eau bidistillée. Le pH ajusté à 3 avec du NaOH.

EDTA 50 mM dissous dans l'eau.

Hyaluronidase 1 ampoule à environ 500 UI est préparée par addition de 5 mL de tampon phosphate (0,05M) pH 6.

PDMA : le réactif PDMA est préparé juste avant utilisation à 160 mg/mL dans un mélange acide acétique 95 % - HCl concentré 5 %.

Phosphate pH 7,4 : mélange de K₂HPO₄ (8 mM), NaH₂PO₄,H₂O (2 mM) et de NaCl (150 mM). Cette solution est ajustée à pH 7,4.

Résine Epon : 9,1 mL d'Epikote 812 (Epon) + 6,2 mL d'anhydre dodécénysuccinique + 4,7 mL d'anhydre méthylnadique + 0,35 mL de 2-4-6 trisdiméthylaminométhylphénol. L'ensemble est placé sous agitation lente pendant 1 heure.

Résine Epon -acétone : 6 mélanges de concentration croissante en résine sont employés dont les proportions résine-acétone (v/v) sont les suivantes : 1/5, 2/5, 5/10, 3/5, 4/5 et 1/0.

Tétraborate de sodium à 5% pH9 : 20 mL d'eau bidistillée sont ajoutés à 1 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, et le pH est ajusté à 9 avec de l'HCl concentré.

Tris-HCl 5 mM pH8 : 121,2 mg de $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ sont dissous dans 20 mL d'eau distillée et le pH est ajusté à 8 avec de l'HCl concentré.

3. Appareillages

Les appareillages sont listés par ordre alphabétique et sont disponibles dans l'UMR 7561 sauf spécification contrainte donnée.

Autoclave (Bioblock Scientific).

Cellules de Malassez (Bioblock Scientific).

CLHP : pompe modèle 590, vanne d'injection avec une boucle d'injection de 50 μL , un détecteur UV modèle 481 et d'une colonne Radial-pack C-18 (100 x 8 mm) (Waters).

Compteur gamma automatique LKB 2070 (Pharmacia LKB).

Cytomètre de flux pour numération de globules blancs (Laboratoire d'Hématologie, CHU Brabois).

Dicrographe CD6TM (Jobin Yvon Optics and Spectroscopy) couplé à un micro-ordinateur, et les résultats exploités à l'aide du logiciel CDmax[®] (version 1.1), (service commun, UHP Nancy 1).

Diffusion de lumière laser aux petits angles (LALLS) Chromatix KM6, (Milton Roy, USA) couplé à un chromatographe d'exclusion stérique, d'une pompe HPLC (Waters) avec une boucle d'injection de 100 μL et d'un réfractomètre (410, Waters), (UMR 7568, ENSIC-INPL). Les colonnes chromatographiques sont des colonnes Shodex 806-805-804 OH Pack.

Evaporateur rotatif Rotavapor R (Buchi).

Microtome MT-7 (RMC, France) équipé d'un couteau diamant (Diatome, France), (Laboratoire de Biologie Forestière, Faculté des Sciences, UHP Nancy 1).

Microscope électronique à transmission (MET) Zeiss $\alpha 902\text{A}$, Allemagne (Laboratoire de Biologie Forestière, Faculté des Sciences, UHP Nancy 1).

Microscope optique (Nikon).

Rhéomètre cône-plan (CLS 100, Rheo, France), (Laboratoire du Génie Chimique (LSGC), ENSIC-INPL).

Rhéomètre à plans striés parallèles (CLS 100, Rheo, France), (LSGC, ENSIC-INPL).

Rhéomètre de type Couette : Low-Shear 30 TM (Contraves, Suisse), (Laboratoire d'Hématologie - UHP Nancy 1).

Spectromètre d'absorption atomique : SpectrAA-20, Varian, France, (LSGC, ENSIC-INPL).

Spectrophotomètre UV-visible 1601, (Shimazu).

Viscosimètres de type Ubbelohde (Schott Geräte) des capillaires de différents diamètres, ont été utilisés avec un système de pompe et de mesure automatique AVS 310 (Schott Geräte), (LSGC, ENSIC-INPL).

4. Préparation des matrices

4.1. Déacétylation du hyaluronate

Nous avons utilisé la méthode de déacétylation décrite pour le hyaluronate par Dahl et coll. (1988) et par Höök et coll. (1982). Dans un tube à vis, 10 mg (ou 200 mg) d'HA pur sont dissous dans 0,5 mL (ou 10 mL) d'hydrazine contenant 5 mg (ou 100 mg) d'hydrazine sulfate. Le mélange est balayé par de l'azote pendant 30 minutes pour chasser l'air du tube, puis ce dernier est fermé hermétiquement avant d'être placé dans un bain de sable à 100 °C pendant un temps défini (30, 60, 120, ou 240 minutes). La réaction est stoppée en plaçant le tube dans la glace. Le produit est débarassé de la plus grande partie de l'hydrazine et de l'hydrazine sulfate par entraînement à la vapeur avec du toluène, à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide, et l'opération est répétée deux ou trois fois. Il est ensuite dissous dans 1 mL (ou 15 mL) d'eau ultra pure avant d'être dialysé contre l'eau pendant 24 heures, puis lyophilisé. Les produits de synthèse seront désignés dans la suite du texte par les symboles suivants en fonction de la durée d'hydrazinolyse.

Symbole	HA IIa	HA IIb	HA IIc	HA IId
Temps de réaction (h)	0,5	1	2	4

Les produits de synthèse sont caractérisés ensuite par leur taux de déacétylation (dosage des groupements N-acétyl, cf § III.7.4.3) et par leur poids moléculaire, déterminé au LALLS (cf § III.8.1).

4.2. Gélation

La technique de gélation par diffusion a été employée pour préparer, d'une part, des matrices en plaque (pour les études rhéologiques) et, d'autre part, des billes (pour les études de diffusion et de comportement des matrices *in vitro* et *in vivo*). La réalisation des gels se fait à partir des solutions concentrées, c'est-à-dire pour la solution d'alginate à 20 mg/mL, mais également pour les mélanges de polysaccharides alginate à 20 mg/mL et hyaluronate (plusieurs origines), de façon à obtenir des rapports massiques de HA-alginate de 1:3, 2:3, 3:3. Dans le cas des

hyaluronates déacétylés, seul le mélange de rapport massique de 1:3 est employé pour la réalisation de gels.

4.2.1. Formation des gels en forme de plaque

Des plaques de gels sont réalisées à l'aide de cassettes à dialyse et leur support en silicone, d'épaisseur égale à 2,7 mm (Figure III.1). Ce support rectangulaire comporte au centre une surface vide (34 x 25 mm) et chaque face est recouverte d'une membrane de dialyse dont la limite de diffusion est de 12 à 14 000 Daltons. L'ensemble est placé dans la cassette à dialyse avant d'être immergé dans l'eau bidistillée jusqu'à son remplissage avec la solution à gélifier.

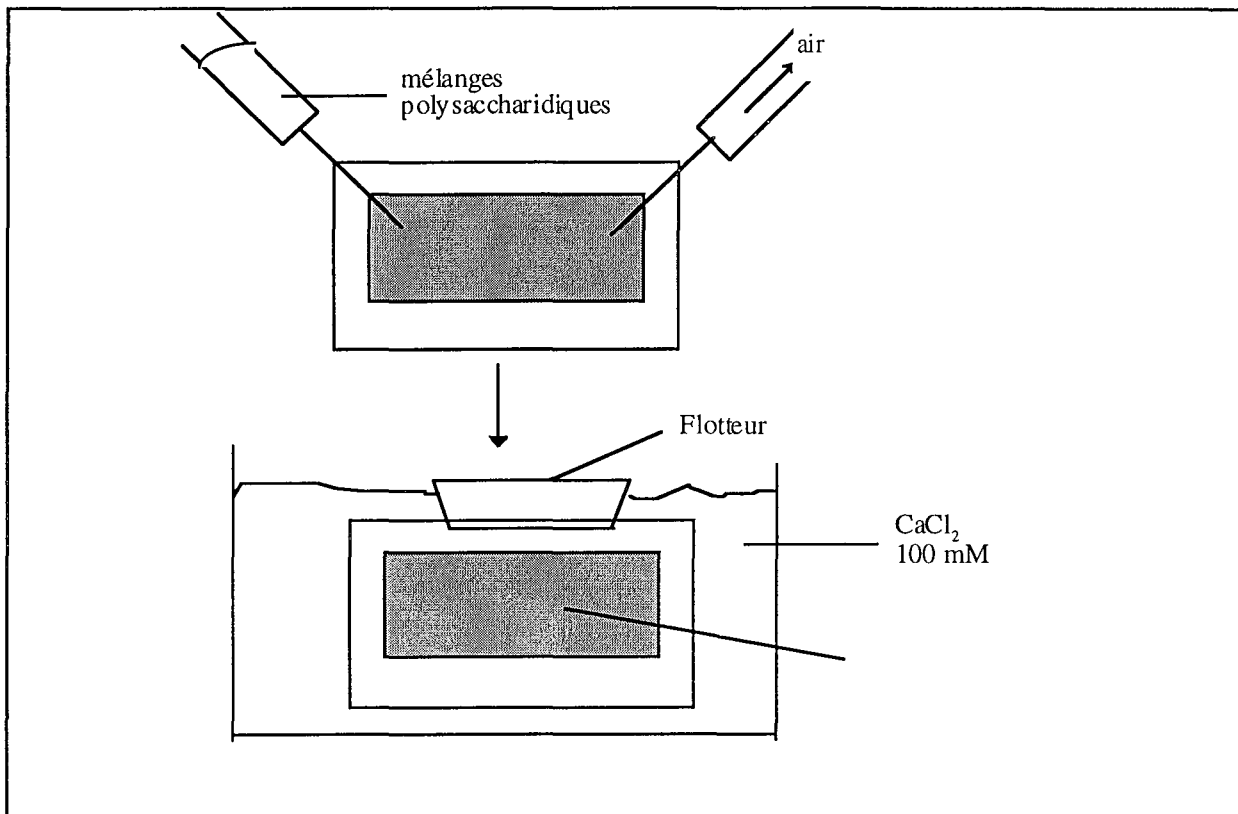


Figure III.1 : Technique de formation des gels polysaccharidiques (alginate, et mélanges alginate-HA I, HA II et/ou HA II déacétylé) sous forme de plaque dans CaCl_2 100 mM à température ambiante.

Les solutions de polymère sont introduites entre les membranes de dialyse à l'aide d'une seringue traversant le support en silicone et simultanément, l'air présent initialement dans la cassette est expulsé à l'aide d'une seconde seringue. Le tout est placé à température ambiante dans une solution de CaCl_2 100 mM et après une heure la cassette est démantelée. Les plaques de gels formées sont introduites dans un flacon contenant du chlorure de calcium jusqu'à gélation complète. Cette technique permet d'obtenir des gels rectangulaires dont l'épaisseur est d'environ $2,5 \pm 0,3$ mm.

Ces plaques sont formées pour deux espèces de hyaluronate HA I et HA II en mélange avec l'alginate et sur une durée variant de 24 à 120 heures.

4.2.2. Formation des gels en forme de bille

Des gels en forme de bille sont réalisés, à température ambiante, par injection manuelle des solutions polysaccharidiques dans 1 mL de CaCl_2 100 mM (figure III.2). Ces billes sont maintenues dans la solution durant une durée variable (t), de 2 minutes à 96 heures, selon l'étude à réaliser sur les gels. Au temps (t), la bille est lavée avec 1 mL d'eau bidistillée puis séchée en surface sur un papier absorbant, avant de réaliser l'étude prévue. Pour chaque solution, plusieurs billes sont formées par injection et ont un poids initial moyen de 11 ± 1 mg, correspondant à un volume initial de solution d'environ 10 μL .

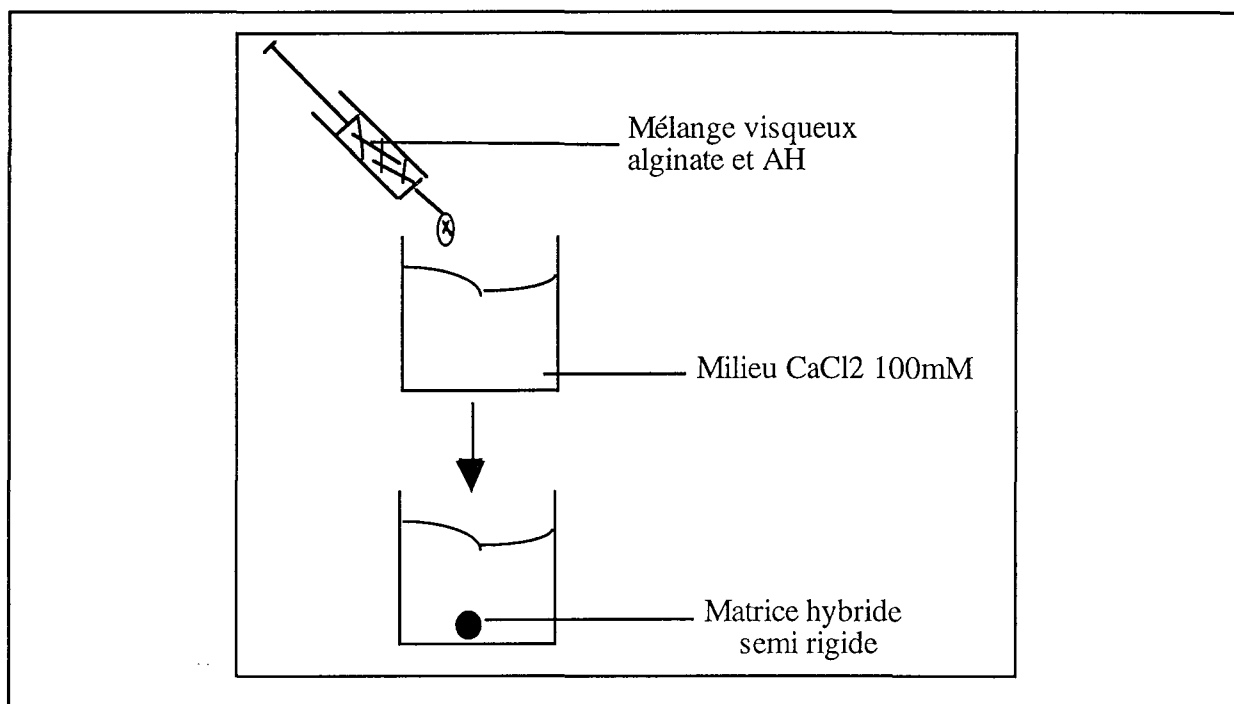


Figure III.2 : Technique de formation des gels polysaccharidiques (alginate, et mélanges alginate -HA I, HA II, HA III, HA IV ou HA II déacétylé) sous forme de bille dans CaCl_2 100 mM à température ambiante.

5. Rhéologie

Nous présentons dans ce paragraphe quelques rappels de rhéologie, directement appliqués à la spécificité des polysaccharides étudiés. Ils nous permettront d'expliquer nos choix d'appareillage et de préciser les paramètres adaptés à chacune de nos conditions d'étude (solutions diluées ou concentrées, gels).

5.1. *Éléments de rhéologie*

Un matériau peut être soumis à différents types de forces : pesanteur, forces de pression, de glissement, d'arrachement, de traction, forces électrostatiques ... par exemple. La résultante des forces appliquées en un point du matériau considéré va entraîner le déplacement de ce point : l'intensité et la direction de ce déplacement dépendent de la force appliquée, mais aussi des réactions et des contraintes exercées par le reste du matériau environnant. De manière générale, chaque point du matériau subira un déplacement dont la résultante est la déformation du matériau tout entier. La déformation globale, correspondant à la distribution spatiale des déplacements locaux, constitue la réponse du matériau à la force appliquée.

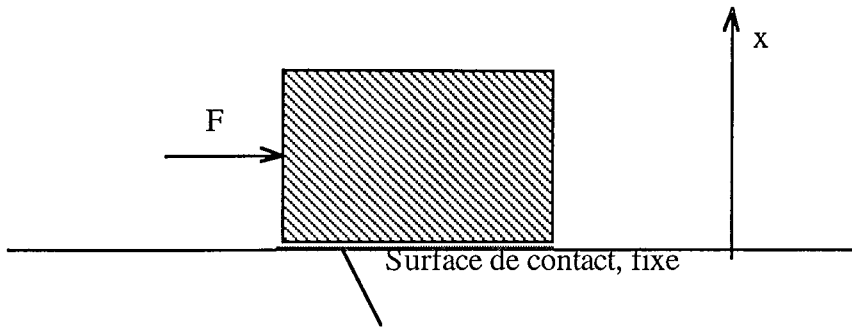
La rhéologie peut être définie comme la science des lois du comportement des matériaux : elle cherche donc à établir une relation entre les contraintes appliquées et la réponse en déformation. L'effet d'une force appliquée à un matériau peut avoir deux effets limites principaux (Courraze et Grossiord 1991):

- s'il s'agit d'un fluide, le matériau sera mis en mouvement de manière continue : la vitesse de l'élément de fluide considéré atteint rapidement une vitesse limite constante correspondant à l'équilibre entre la force appliquée et la force de viscosité, sorte de résistance à cette force et fonction croissante de la vitesse;
- dans le cas d'un solide élastique, le matériau subit une déformation instantanée et réversible : le solide reprend sa forme initiale au moment où cesse l'application de la force.

Certains matériaux présentent un comportement rhéologique intermédiaire entre le fluide visqueux et le solide élastique, comme nous le verrons plus loin. Selon le type de matériau étudié, les réponses à la contrainte imposée seront la déformation ou l'écoulement, et des grandeurs comme l'élasticité, la plasticité ou la viscosité seront ainsi estimées à partir des données expérimentales.

5.1.1. Cisaillement

Dans ce qui suit, nous limiterons les rappels de mécanique à la théorie du cisaillement simple (Midoux 1983), correspondant à l'application d'une force unique sur une face perpendiculaire à la surface de contact de ce matériau et maintenue fixe, comme le montre le schéma ci-dessous :



Dans ces conditions, le déplacement de chaque point du matériau s'effectue de manière colinéaire avec la force F et dont l'intensité est fonction exclusive de la cote x . Le matériau possède ainsi une structure constituée de couches adjacentes d'épaisseur élémentaire dx : la déformation lamellaire correspond au mouvement laminaire de cisaillement, par glissement relatif des couches les unes sur les autres, sans qu'il y ait transfert ou échange d'une couche à l'autre. C'est un mouvement strictement ordonné et stratifié qui se produit sans brassage du matériau et sans variation de son volume.

Deux couches adjacentes en mouvement provoquent l'apparition de forces appelées forces de cisaillement. Ramenées à l'unité de surface dS sur laquelle elles s'exercent, elles donnent naissance à la contrainte de cisaillement τ :

$$\tau = \frac{dF}{dS} \quad (\text{éq. 1})$$

τ est homogène à une pression et s'exprime en bar (N m^{-2}). Dans la pratique et pour caractériser le comportement rhéologique de matériaux, les contraintes de cisaillement appliquées par le rhéomètre peuvent être engendrées à l'aide de différents dispositifs mécaniques : cylindres de Couette, dispositifs cône-plan ou à plans parallèles ...

5.1.2. Déformation et vitesse de cisaillement

Considérons le cas simple d'un matériau dont le cisaillement, appliqué à partir du temps $t=0$, le divise en couches parallèles glissant les unes sur les autres. Au temps t , la couche d'épaisseur dx et située à une distance x du plan inférieur immobile a subi un déplacement l qui est une fonction de x et de t : $l(x,t)$. Dans le cas de cette structure plane, la déformation de cisaillement, notée γ , est définie par le gradient de l par rapport à x :

$$\gamma = \frac{\partial l(x,t)}{\partial x} \quad (\text{éq. 2})$$

La vitesse de cisaillement, $\dot{\gamma}$, n'est autre que la dérivée de la déformation de cisaillement γ par rapport au temps :

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial \gamma(x,t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} \left[\frac{\partial l(x,t)}{\partial x} \right] = \frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{\partial l(x,t)}{\partial t} \right] = \frac{\partial u(x,t)}{\partial x} \quad (\text{éq. 3})$$

si $u(x,t)$ représente la vitesse de la couche (x) à l'instant t. La vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ correspond au gradient de vitesse u du milieu, comme le montre la relation ci-dessus. La déformation γ et le gradient de vitesse $\dot{\gamma}$ représentent les grandeurs cinématiques fondamentales du matériau et permettent d'en décrire le mouvement géométrique.

Chaque système plus ou moins complexe obéit à une équation fondamentale constituant une relation entre des grandeurs dynamiques (forces, contraintes) aux propriétés cinématiques comme la déformation ou le gradient de vitesse. Comme nous l'avons vu, cette relation est la caractéristique rhéologique du matériau. Ainsi, les rhéogrammes représentent généralement l'évolution de la déformation de cisaillement en fonction de la contrainte appliquée. Cette déformation dépend de plus des conditions de température et de pression dans lesquelles se déroulent les mesures.

5.2. Application à l'étude des polysaccharides

L'écoulement de polymères ou de solutions de polymères peut être caractérisé à l'aide de modèles établis à partir de données expérimentales obtenues au moyen de diverses techniques. Nous avons choisi d'utiliser des techniques relativement classiques pour nos études rhéologiques, tant pour les solutions, fluides visqueux, que pour les gels préparés dont le comportement est intermédiaire entre un fluide fortement visqueux et un solide élastique.

Abordons tout d'abord quelques généralités sur les fluides visqueux et la description des techniques mises en œuvre pour l'étude rhéologique des solutions de polysaccharides, avant de traiter des techniques utilisées pour les gels.

5.2.1. Viscosité

Les coefficients de viscosité sont des grandeurs physiques permettant de caractériser le comportement rhéologique d'un matériau ou d'un fluide. De manière générale, ces coefficients traduisent la résistance du corps étudié à se déplacer sous l'effet d'une contrainte. Rappelons rapidement les définitions de deux viscosités essentielles.

La viscosité dynamique, η , est définie comme le rapport de la contrainte de cisaillement sur la vitesse de cisaillement (ou gradient de vitesse) d'un matériau :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (\text{éq. 4})$$

Cette viscosité s'exprime en Pa.s, appelé autrefois Poiseuille.

La viscosité cinématique ν est définie comme le rapport de la viscosité dynamique sur la masse volumique ρ du matériau :

$$\nu = \eta / \rho \quad (\text{éq. 5})$$

Cette deuxième viscosité, exprimée en m^2/s , représente également une sorte de diffusivité de quantité de mouvement, par analogie avec les coefficients de diffusion de matière ou de chaleur.

5.2.2. Fluides newtoniens et non newtoniens

La réponse d'un matériau étudié à une contrainte τ dépend de la température et de la pression mais également de l'amplitude de la contrainte appliquée.

Les solutions diluées, peu visqueuses, c'est-à-dire mises facilement en mouvement sous l'action d'une contrainte, ont une viscosité η constante, quelle que soit la contrainte appliquée : ces solutions sont dites newtoniennes. De nombreuses solutions aqueuses d'électrolytes ou de molécules de bas poids moléculaire sont newtoniennes. En revanche, des solutions plus pâteuses, plus concentrées, et/ou de substances présentant de fortes interactions avec le solvant, ont un autre comportement rhéologique (Midoux 1993) : c'est le cas de nombreux fluides biologiques naturels ou produits dans l'industrie agro-alimentaire ; c'est le cas également de milieux pâteux de nature très diverse, homogènes ou constitués de suspensions de particules solides dans le solvant.

Le comportement de solutions de polysaccharides a été étudié dans ce travail pour diverses concentrations. Selon l'ordre de grandeur de la concentration, la solution de polysaccharides peut présenter un comportement newtonien ou non. Les deux paragraphes suivants traitent de solutions diluées de polymères, qui ont un comportement relativement newtonien, et des moyens d'étude utilisés. Nous verrons par la suite le cas de solutions plus concentrées, au comportement non-newtonien.

5.2.3. Solutions diluées newtoniennes

5.2.3.1. Viscosités relative, spécifique et intrinsèque

Ces grandeurs sont utilisées pour caractériser les solutions diluées de substances le plus souvent d'intérêt biologique ou de polymères. En premier lieu, la viscosité relative η_{rel} compare la viscosité de la solution considérée à celle du solvant, η_s :

$$\eta_{\text{rel}} = \frac{\eta}{\eta_s} \quad (\text{éq. 6})$$

De même, on peut définir la viscosité spécifique, η_{sp} , comme la viscosité relative diminuée de l'unité : η_{sp} représente l'effet viscosifiant de la substance dissoute rapporté à celui du solvant :

$$\eta_{\text{sp}} = \eta_{\text{rel}} - 1 = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s} \quad (\text{éq. 7})$$

Ces deux premières grandeurs sont sans dimension et leurs valeurs dépendent de la substance dissoute (nature chimique, masse molaire) et de la concentration C en cette substance : on imagine facilement que η_{sp} et η_{rel} augmentent avec la concentration.

On définit la viscosité réduite, η_{red} , comme le rapport de la viscosité spécifique à la concentration C :

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{C} = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s \cdot C} \quad (\text{éq. 8})$$

Dans de nombreuses études rhéologiques de solutions diluées de polymères, on introduit la notion de viscosité intrinsèque $[\eta]$ qui correspond à la limite de la viscosité spécifique réduite à dilution infinie :

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{\text{red}} = \lim_{C \rightarrow 0} \left[\frac{\eta - \eta_s}{\eta_s \cdot C} \right] \quad (\text{éq. 9})$$

La dimension de la viscosité intrinsèque est l'inverse de celle de la concentration (par exemple mL/mg ou dL/g). En fait $[\eta]$ donne une représentation du volume hydrodynamique de la substance dissoute, c'est-à-dire de la taille occupée par une molécule de soluté en solution. De ce fait, $[\eta]$ constitue une grandeur caractéristique de cette substance en solution. La molécule d'un polysaccharide ou une autre molécule fortement hydrophile est entourée d'une grande quantité d'eau : l'interaction entre la macromolécule et le solvant est de nature physico-chimique (interactions dipôle-dipôle par exemple) mais peut être également de nature hydrodynamique : dans le cas d'une solution en écoulement, une partie du solvant se déplace dans le sillage de la macromolécule hydratée, assimilable à une particule solide sub-micronique. La fraction "liée de manière hydrodynamique" peut être sensible au gradient de vitesse alors que l'autre l'est beaucoup moins. Cette description qualitative de la macromolécule en solution indique que la détermination de la viscosité intrinsèque doit être effectuée dans des conditions d'écoulement contrôlées, sous de faibles gradients de vitesse.

La littérature relative à l'écoulement de solutions de polysaccharides tels que l'alginate rapporte des valeurs de viscosité intrinsèque de l'ordre de 1 mL/mg. Si l'on considère l'ordre de grandeur usuel de la masse volumique de la plupart des composés organiques ou biologiques (1 g/mL), la valeur de $[\eta]$ illustre la très forte hydrophilie de ces polysaccharides. Par ailleurs, pour une famille de polymères considérée, la viscosité intrinsèque est liée à la masse molaire

moyenne viscosimétrique $\overline{M}_v$ selon la relation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = a \overline{M}_v^b \quad (\text{éq. 10})$$

où les coefficients a et b dépendent de la nature chimique de polymère; b est souvent compris entre 0,4 et 0,6.

Pratiquement, afin de déterminer cette caractéristique hydrodynamique d'une substance, on procède à la mesure de la viscosité η de solutions diluées à différentes concentrations de la substance considérée : l'extrapolation de la viscosité réduite, dont les valeurs sont calculées à partir des mesures, à concentration nulle donne accès à la viscosité intrinsèque, comme nous l'expliquons dans le paragraphe ci-dessous.

5.2.3.2. Relation de Huggins

La viscosité d'une solution augmente très rapidement avec la concentration, et tout particulièrement pour les polymères. Cette forte dépendance est généralement exprimée par la loi de Huggins valable dans une faible gamme de concentrations (Stickler et Sütterlin 1989) :

$$\eta_{\text{red}} = [\eta] \cdot (1 + k_H [\eta] \cdot C) \quad (\text{éq. 11})$$

La constante k_H est le coefficient de Huggins et traduit l'intensité des interactions entre les chaînes des macromolécules en relation avec le solvant environnant. La plupart des polymères produits dans l'industrie chimique ont une constante k_H comprise entre 0,5 et 1. Toutefois, dans le cas de polysaccharides linéaires et possédant une structure de serpent, la théorie de Risemann et Ullmann (Stickler et Sütterlin 1989) montre que k_H peut être nettement inférieur à 0,6. Dans le cas de l'alginate et du hyaluronate, polysaccharides connus pour leur forte affinité avec l'eau, on peut s'attendre à des valeurs relativement faibles de k_H .

5.2.3.3. Viscosité de polyélectrolytes: loi de Fuoss

Les propriétés de solutions de polymères solubles sont dues à leur structure dans le milieu, en relation avec leur environnement, notamment la concentration en ions et la présence d'autres macromolécules. En particulier, les polysaccharides substitués par un groupement aminé ou une fonction acide carboxylique possèdent une charge électrique dont le signe et l'intensité dépendent du pH : ceci constitue un effet de polyélectrolyte à ce type de macromolécules.

La relation de Huggins est valide en toute rigueur pour des molécules neutres. Les

polysaccharides considérés dans ce travail sont des polyélectrolytes et, lorsqu'ils sont dissous dans de l'eau pure, on peut s'attendre à ce que leur viscosité augmente très rapidement avec la dilution, comme l'a observé Fuoss en 1948 :

$$\eta_{\text{red}} = \frac{A}{1 + B \cdot \sqrt{C}} + D \quad (\text{éq. 12})$$

où A, B et D sont des constantes.

En présence d'un électrolyte support, c'est-à-dire d'un sel dissocié dans le solvant, l'effet polyélectrolytique du polysaccharide est atténué. Le comportement rhéologique de telles solutions est une fonction de la force ionique. A titre d'exemple, l'augmentation de la concentration en électrolyte fort comme le chlorure de sodium dans une solution d'alginate à 100 mM permet de réduire la viscosité de la solution, phénomène attribué par Smidrod et coll (1970) à un changement de conformation : cet auteur a montré que la viscosité de solutions contenant moins de 1 mg/mL d'alginate variait comme l'inverse de la racine carrée de la force ionique.

5.2.4. Solutions concentrées non-newtoniennes

5.2.4.1. Fluides non-newtoniens

De nombreux fluides ne présentent pas un comportement newtonien et ces fluides ne présentent pas une viscosité, définie par le rapport $(\tau/\dot{\gamma})$, constante quel que soit le gradient de vitesse. Plusieurs écarts au comportement newtonien peuvent être rencontrés (Midoux 1993) et, par exemple, citons les fluides de Bingham pour lesquels il existe un seuil de contrainte avant que puisse être observé un gradient de vitesse (Figure III.3).

Un autre exemple de fluides non-newtoniens fréquemment rencontrés en rhéologie des polymères est constitué par les fluides rhéo-fluidifiants ou pseudoplastiques : la viscosité apparaît diminuée par une augmentation de la contrainte appliquée (Figure III.3). Physiquement, cela correspond à la perte, au moins momentanée et partielle, de la structure du milieu. D'autres fluides, appelés fluides dilatants ou rhéo-épaississants ont une viscosité qui croît avec le gradient de vitesse : ce comportement, observé notamment pour les suspensions de solides, correspond à l'intensification des interactions particules-solvant par l'agitation ou l'écoulement turbulent.

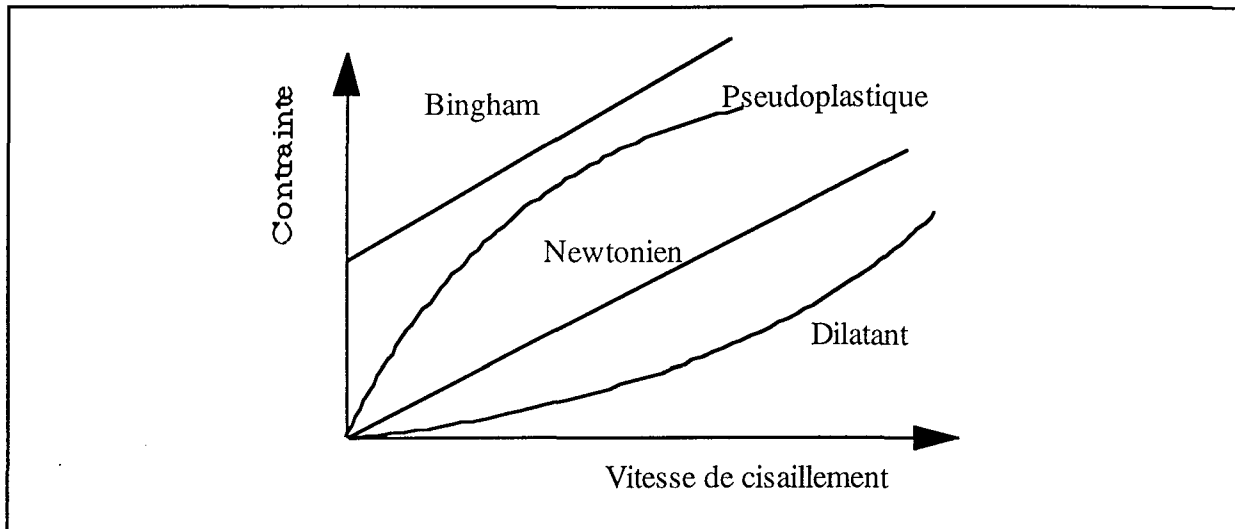


Figure III.3 : Allure schématique de rhéogrammes de différents fluides.

Un tel comportement peut être réversible, c'est-à-dire, par exemple, que la viscosité d'un fluide pseudoplastique augmente à nouveau au fur et à mesure qu'est réduite la contrainte. Dans d'autres cas, la modification de la structure est définitive et le fluide a perdu une partie de ses propriétés : ce phénomène est appelé thixotropie. Par exemple, un yaourt battu vigoureusement devient liquide, au détriment de sa structure voisine d'un gel à l'état initial.

Les mesures rhéologiques de fluides visqueux sont généralement réalisées par la mesure du gradient en fonction de la contrainte qui est augmentée linéairement au cours du temps jusqu'à une valeur maximum, puis diminuée à la même vitesse. Le gradient de vitesse est mesuré en continu et le rapport instantané ($\tau/\dot{\gamma}$) représente la viscosité à τ . Dans le cas d'un fluide thixotrope, la courbe "de montée" est significativement différente de la deuxième partie (descente) et l'importance de l'hystérèse, d'autant mieux observable que la vitesse de variation de la contrainte est forte, donne une image de la destruction de l'organisation locale de la structure du fluide. Un fluide non thixotrope sera mis en évidence par des courbes "montée" et "descente" très proches l'une de l'autre.

5.2.4.2. Fluides rhéo-fluidifiants ou pseudoplastiques

Le comportement rhéologique de tels fluides est exprimé par l'équation de Cross :

$$\frac{\eta_0 - \eta}{\eta - \eta_\infty} = (K \cdot \dot{\gamma})^n \quad (\text{éq. 13})$$

où les indices 0 et ∞ sont relatifs à des vitesses de cisaillement nulle et infinie. K est une constante exprimée en secondes et n est une constante sans dimension. Selon cette loi, le fluide possède un comportement relativement newtonien à de très faibles vitesses de cisaillement alors

que la viscosité mesurée à forte contrainte décroît très fortement avec le gradient de vitesse. Lorsque les fluides possèdent une viscosité très forte à faible gradient de vitesse, sans que puisse être défini un plateau dans la courbe η en fonction de $\dot{\gamma}$, et que la viscosité devient presque nulle à très forte vitesse de cisaillement, la relation de Cross est réduite à la loi simple de Ostwald-de- Waele, de type puissance :

$$\eta = K_2 \dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{éq. 14})$$

Cette dernière relation est largement utilisée pour la caractérisation de nombreux fluides. Toutefois, le nombre réduit de paramètres de la loi puissance - 2 seulement - ne permet pas toujours un ajustement très précis des variations expérimentales τ en fonction de $\dot{\gamma}$ et on a alors recours à la loi plus complète, établie avec 4 paramètres. De plus, comme nous l'avons vu, la signification physique de ces deux lois diffère quelque peu.

5.2.5. Analyse des gels

La plupart des travaux de la littérature sur les gels formés par diffusion chélatante de calcium dans une matrice d'alginate font état de leur caractère viscoélastique, c'est-à-dire présentent des points communs avec un solide élastique et une fluide visqueux. Avant de décrire les techniques de mesure pour la caractérisation de gels des polysaccharides, nous présentons quelques rappels de mécanique.

5.2.5.1. Rappels de mécanique

La notion de solide élastique est nécessaire à la compréhension du concept de matériau viscoélastique (Midoux 1993, Couarraze et Grossiord 1991, Young 1981). Un solide parfaitement élastique est caractérisé par une déformation γ proportionnelle à la contrainte de cisaillement :

$$\tau = G.\gamma \quad (\text{éq. 15})$$

G est le module élastique, ou encore coefficient de rigidité du solide. On peut définir la complaisance J du solide comme la déformation à contrainte unité :

$$J = \frac{1}{G} \quad (\text{éq. 16})$$

Le solide élastique est fréquemment représenté comme un ressort, comme le montre la Figure III.4. La réponse à une contrainte constante au cours du temps est une constante proportionnelle à la complaisance.

Par ailleurs, un fluide visqueux soumis à une contrainte constante s'écoule en continu, ce qui peut se traduire par une déformation augmentant de manière linéaire avec le temps (Figure III.4). La pente de cette variation est l'inverse la viscosité η du fluide. Le fluide est assimilé à une capacité, ou encore à un amortisseur visqueux symbolisé en Figure III.4.

Les fluides réels peuvent être représentés comme des assemblages en série ou en parallèle de ces deux éléments de base. Par exemple, le fluide Maxwell est une association en série de ces deux éléments (à droite sur la Figure III.4). De même, le solide Voigt, non montré sur la figure, est l'assemblage en parallèle d'un solide élastique et d'un liquide visqueux.

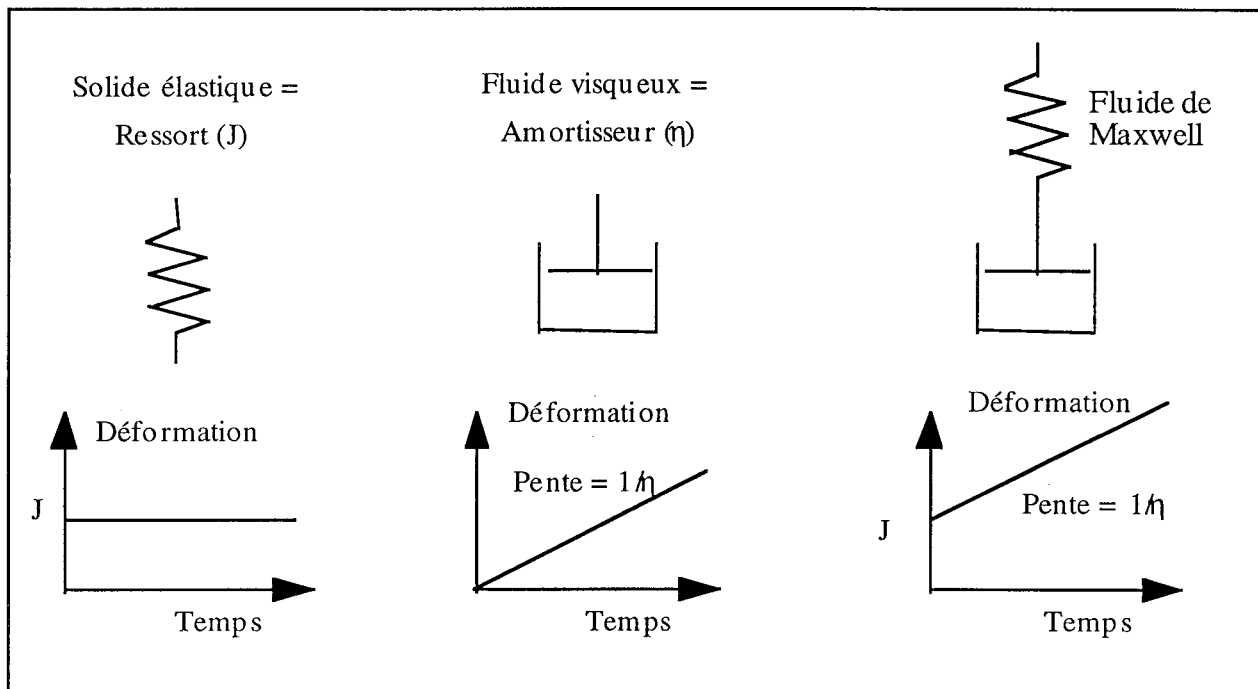


Figure III.4 : Représentation schématique d'un solide élastique, d'un fluide visqueux et d'un fluide de Maxwell, avec leur déformation à contrainte constante.

Sous une contrainte constante, la plupart des solides ou des gels ont une réponse en déformation plus complexe, comme le montre la Figure III.5.

Cette courbe fait apparaître un saut brutal de déformation à l'instant initial ; puis la déformation augmente régulièrement au cours du temps : cette variation n'est généralement pas linéaire mais tend à s'amortir après quelques secondes, voire quelques minutes. Lorsque cesse la contrainte, la déformation passe instantanément à une valeur plus faible avant de décroître avec le temps selon une loi de type exponentielle. Un tel comportement est souvent représenté par le modèle de Kelvin-Voigt généralisé : selon ce modèle, le solide est représenté par une combinaison en série d'un ressort J_0 et d'un amortisseur η_0 , en série avec des solides de Voigt (circuits parallèles de solides élastiques et de liquides visqueux) de paramètres J_i et η_i . Dans la pratique, le modèle est souvent simplifié en considérant un seul solide de Voigt (J_1, η_1) en série avec le

liquide de Maxwell (J_0, η_0), comme le montre la Figure III.6.

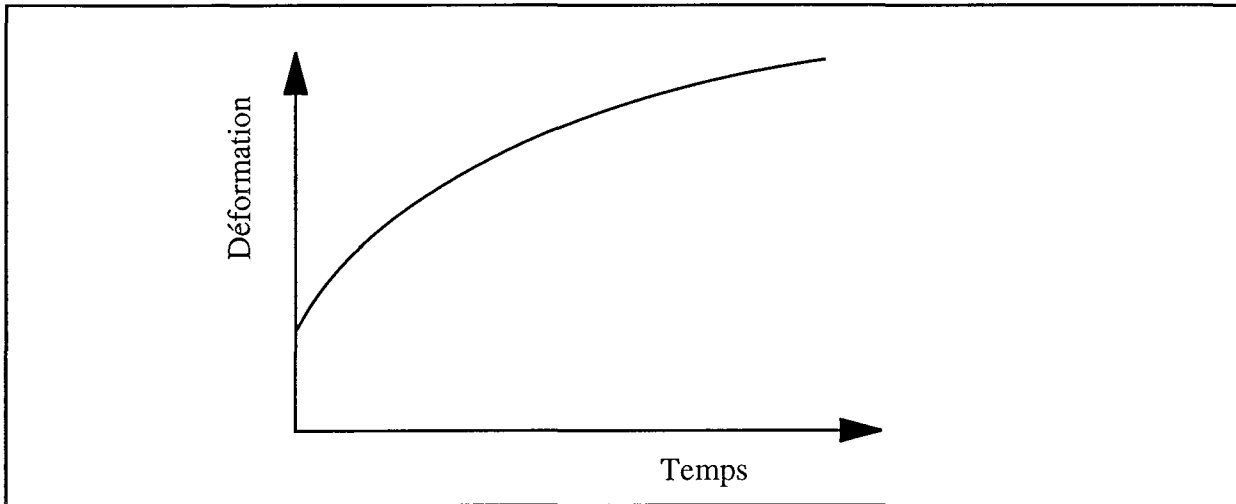


Figure III.5 : Déformation d'un solide ou d'un gel sous l'action d'une contrainte constante.

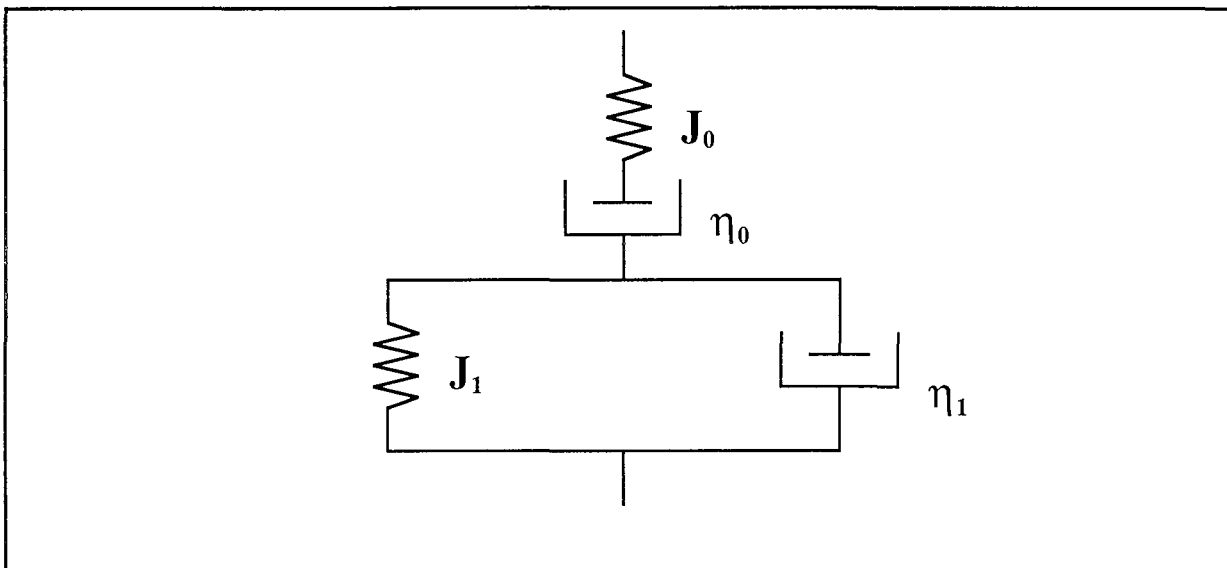


Figure III.6 : Modèle généralisé de Kelvin-Voigt

5.2.5.2. Méthodes de mesures

Le comportement des matériaux viscoélastiques dépend du temps, comme nous l'avons vu précédemment, et les méthodes de caractérisation sont ainsi de nature transitoire. Deux méthodes principales sont utilisées (Midoux 1993, Couarraze et Grossiord 1991) :

5.2.5.2.1.Méthode oscillatoire

Cette méthode consiste à soumettre le matériau à un cisaillement sinusoïdal du type :

$$\gamma(\omega) = \gamma_0 \cos \omega t$$

si ω est la pulsation de l'excitation sinusoïdale et γ_0 , son amplitude.

On mesure la contrainte qui, si le système est linéaire, est une fonction sinusoïdale de même fréquence présentant un déphasage ϕ avec la déformation. Pratiquement, on travaille dans le domaine complexe et on détermine la rigidité complexe G du matériau, définie comme le rapport de la contrainte et de la déformation. L'analyse des parties réelles et imaginaires de la rigidité G et son identification à une formule théorique établie à partir d'un assemblage modèle de solides et de fluides visqueux, permettent la représentation rhéologique du matériau et donnent accès aux valeurs des paramètres mis en jeu.

5.2.5.2.2.Méthode de fluage

Le matériau est soumis à une contrainte τ_0 fixée pendant une période T avant sa relaxation soudaine et la réponse en déformation du matériau est enregistrée au cours du temps. L'expression de la déformation d'un matériau de Kelvin-Voigt généralisé au cours du temps (t) peut être déduite de l'équation différentielle écrite pour l'assemblage modèle de la Figure III.5 :

$$t \leq T \quad f(t) = J_0 + \frac{t}{\eta_0} + J_1 \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\eta_1 \cdot J_1}\right) \right] \quad (\text{éq. 17 a})$$

$$t \geq T \quad f(t) = \frac{T}{\eta_0} + J_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\eta_1 \cdot J_1}\right) \cdot \left[\exp\left(\frac{T}{\eta_1 \cdot J_1}\right) - 1 \right] \quad (\text{éq. 17 b})$$

L'identification des variations expérimentales aux relations (17 a et b) conduit aux valeurs des paramètres J_0 , J_1 , η_0 , et η_1 .

Les paramètres significatifs déduits dans la caractérisation des gels sont la complaisance instantanée J_0 mesurée dans les premiers temps de la mesure et la complaisance à l'état stationnaire J_0^e avec :

$$J_0^e = J_0 + J_1$$

et le coefficient η_0 obtenu à partir de la pente de l'asymptote de la variation croissante de la déformation et qui correspond à une sorte de viscosité du gel.

Le produit $(J_1 \eta_1)$ est la constante de temps pour la variation exponentielle de la force et la viscosité η_1 est généralement plus faible que η_0 mais du même ordre de grandeur. La

signification physique de η_i est difficile à différencier de celle de η_0 sans le support du "circuit" équivalent de la Figure III.6.

5.3. Protocole d'étude de la rhéologie des polysaccharides

5.3.1. Rhéologie des solutions diluées

5.3.1.1. Viscosimètre de Ubbelohde

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un viscosimètre capillaire de Ubbelohde. Le diamètre du tube capillaire interchangeable varie de 0,53 à 1,50 mm selon la concentration et la nature des solutions à étudier et selon le temps d'écoulement approximativement voulu dans le tube capillaire. Dans notre étude, nous avons fixé un temps minimum d'écoulement de 200 s afin d'éviter l'application de corrections de mesures (corrections de Hagenbach) données par le fabricant. Le viscosimètre est composé de différentes parties numérotées de 1 à 8 sur la figure III.7 et de deux traits de jauge notés M_1 et M_2 .

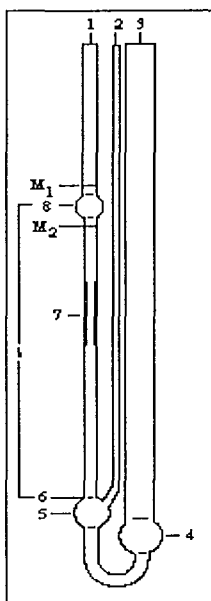


Figure III.7 : Viscosimètre capillaire de Ubbelohde.

Le polymère en solution diluée est introduit dans le réservoir 4 par le tube 3. En bouchant le tube 2 et en plaçant une aspiration sur le tube 1, la solution est aspirée au delà du réservoir 8. L'ouverture du tube 2 permet au liquide de s'écouler au travers du capillaire et le temps (t) mis par la solution pour passer entre M_1 et M_2 est mesuré automatiquement par déclenchement et arrêt du chronomètre de l'appareil au passage du ménisque du liquide entre M_1 et M_2 , au moyen d'un capteur optique. Généralement, on procède à plusieurs mesures (trois voire plus) en série

et l'appareil permet d'aspirer automatiquement la solution, de la maintenir pendant une durée choisie, à la température voulue, puis de libérer le fluide, permettant l'écoulement et la mesure du temps (t). La viscosité cinématique (ν) est obtenue par la formule suivante :

$$\nu = K(t - v) \quad (\text{éq. 18})$$

Où ν représente la viscosité spécifique en cSt ou mm²/s
 K correspond à la constante du capillaire
 t est le temps d'écoulement entre M₁ et M₂
 v représente la valeur de la correction de Hagenbach.

Pour chaque concentration de polymère étudiée, la viscosité spécifique (η_{sp}) est obtenue à partir de la viscosité relative η_r qui dépend directement du temps d'écoulement du polymère en solution dans un solvant mais également du temps d'écoulement du solvant pur :

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{\text{tps écoulement du polymère dans le solvant}}{\text{tps écoulement du solvant}} - 1 \quad (\text{éq. 19})$$

Dans notre étude, les mesures sont réalisées à 20°C (bain thermostaté à $\pm 0,1^\circ\text{C}$) pour les solutions de polysaccharides individuels diluées à 2 mg/mL en alginate, HA I, HA II ou HA II déacétylés mais également pour les solutions d'alginate à 2 mg/mL en mélange avec HA I et HA II avec des rapports massiques de hyaluronate sur alginate de 1:3, 2:3 et 3:3. Dans le cas des hyaluronates déacétylés en mélange avec l'alginate à 2 mg/mL, seul le rapport 1:3 est étudié. Pour observer l'effet de la force ionique, du chlorure de sodium est additionné pour obtenir des solutions à 0,3; 1; 3 et 10 g/L. L'ensemble de ces solutions a subi des dilutions successives afin de déterminer, pour chaque solution, des viscosités spécifiques qui varient avec la concentration des polymères. D'un point de vue expérimental, la viscosité intrinsèque correspond à l'ordonnée à l'origine de cette droite et le coefficient de Huggins correspond à la pente de la droite (divisée par la viscosité intrinsèque au carré) lorsque l'on trace la viscosité spécifique en fonction de la concentration en polysaccharide.

Les viscosités intrinsèques et les coefficients de Huggins des solutions préparées en présence de NaCl, sont déterminés par ajustement des données expérimentales par minimisation de la fonction objective définie entre la somme de la déviation au carré des viscosités spécifiques calculées et expérimentales.

5.3.1.2. Viscosimètre de Couette

Le rhéomètre Low-Shear 30® est un rhéomètre rotatif de type Couette, équipé de deux cylindres

co-axiaux d'une hauteur de 20 mm. Les diamètres des cylindres intérieur et extérieur, sont respectivement de 11 et de 12 mm.

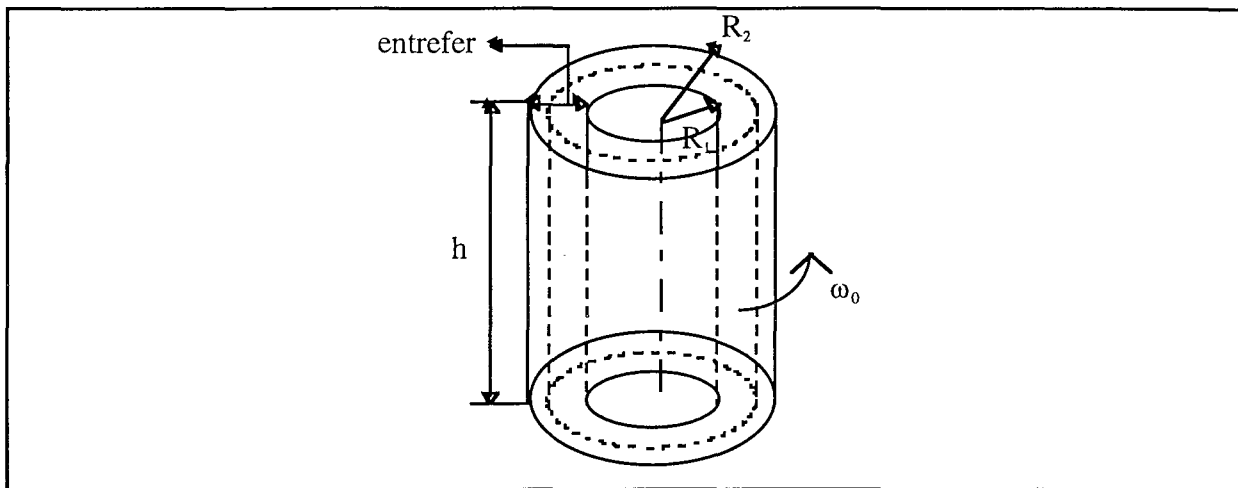


Figure III.8 : Configuration des deux cylindres dans un rhéomètre cylindrique rotatif de type Couette.

Le mouvement de cisaillement laminaire sur le matériau, placé entre les deux cylindres, est obtenu par la rotation du cylindre extérieur alors que le cylindre interne reste immobile. La vitesse de rotation (ω_0) varie 10^2 à 10^{-2} min^{-1} et lors d'une étude rhéologique, ω_0 est fixée à une valeur constante.

Les mesures sont réalisées avec les solutions de polysaccharides seuls (alginate, HA I et HA II) à une concentration de 0,5 mg/mL comme dans le cas des mesures avec le viscosimètre capillaire.

Trois vitesses de rotation sont appliquées ($0,512$; $0,945$ et $4,39 \text{ s}^{-1}$) pour observer le comportement des fluides et également pour connaître la nature de ces fluides.

5.3.1.3. Contrôle du caractère newtonien des solutions

La mesure de la viscosité intrinsèque et du coefficient de Huggins repose sur l'hypothèse implicite que les fluides soient effectivement newtoniens, c'est-à-dire que la viscosité est la même quel que soit le gradient de vitesse imposé par l'appareil de mesure. Bien que la plupart des études rhéologiques de solutions de biopolymères ne fassent que rarement mention du possible écart au comportement newtonien en deçà de 1mg/mL, nous avons estimé préférable de quantifier cet écart à l'aide des travaux déjà anciens de Golub (1954) et de Bueche (1957).

En effet, selon Bueche, la viscosité η mesurée à un gradient de vitesse $\dot{\gamma}$ peut s'exprimer en fonction de la viscosité η_0 à gradient de vitesse nul selon :

$$\eta - \eta_s = (\eta_0 - \eta_s) \left[1 - (\tau_0 \dot{\gamma})^{1/2} \right] \quad (\text{éq. 20})$$

où τ_0 est une constante exprimée en secondes (éq.22). Cette relation montre que la viscosité η peut différer fortement de η_0 à fortes vitesses de cisaillement.

Le gradient de vitesse du fluide dans un tube capillaire varie avec la cote radiale et sa valeur maximale, $\dot{\gamma}_w$, est atteinte à la paroi. Dans le cas d'un fluide newtonien, $\dot{\gamma}_w$ est donné par la relation :

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4.\Delta l}{a.\Delta t} \quad (\text{éq. 21})$$

si Δl est la longueur du capillaire entre les points M_1 et M_2 , a le rayon du capillaire et Δt le temps requis pour un élément du fluide à parcourir la distance Δl . Comme nous l'avons exposé précédemment (Cf III, § 5.3.3.1), Δt a été choisi pour être supérieur à 200 secondes et, en tenant compte du rayon des tubes utilisés, entre 0,24 et 0,75 mm, le gradient pariétal de vitesse était compris entre 1 et 10 s⁻¹. Par ailleurs, rappelons que le viscosimètre de Couette a été utilisé avec des gradients de vitesse compris entre 0,51 et 4,4 s⁻¹.

La constante τ_0 varie avec la différence de viscosité ($\eta - \eta_s$) et l'inverse de la concentration en polymère :

$$\tau_0 = 1.98 \cdot \left(\frac{r}{b} \right) \left[\frac{\eta - \eta_s}{C} \right] \frac{\sqrt{M.M_0}}{RT} \quad (\text{éq. 22})$$

où M_0 est la masse molaire associée à chaque liaison sur la chaîne d'un résidu monomère (à titre d'exemple, M_0 est de la moitié la masse molaire du monomère pour des polymères de type vinylique), R est la constante des gaz parfaits, T est la température absolue et (r/b) est le rapport adimensionnel estimé à 1,88 par Bueche pour de nombreux polymères. La relation (eq 22) a été appliquée dans le cas suivant :

$$M = 10^6 \text{ Daltons}, M_0 = 100 \text{ g/mol et } C = 0,5 \text{ mg/mL}$$

La viscosité intrinsèque a été estimée à 1 mL/mg, valeur correspondant à l'ordre de grandeur prévisible pour des polysaccharides de poids moléculaire de l'ordre de 10⁶ Da (Smidrod 1970). La viscosité à gradient de vitesse nul a été estimée à partir des valeurs de C et de $[\eta]$ et en négligeant le terme $k_H[\eta]C$ de la relation de Huggins. Les valeurs considérées conduisent à une valeur de τ_0 de l'ordre de 1,6 10⁻⁵ s. Les gradients de vitesse étaient inférieurs à 10 s⁻¹ et on montre ainsi que le terme correctif $(\tau_0 \dot{\gamma})^{1/2}$ est inférieur à 0,0125. L'erreur commise en assimilant la viscosité mesurée dans les deux dispositifs décrits ci-dessus à la viscosité à gradient nul est ainsi négligeable et l'écart au comportement newtonien est d'importance secondaire dans les conditions opératoires considérées.

5.3.2. Rhéologie des solutions concentrées

Cette étude est réalisée à l'aide d'un rhéomètre cône-plan où le matériau à étudier est placé entre un plateau et un cône de révolution (voir figure III.9) de rayon r . Dans notre étude, le rhéomètre est thermostaté à 20 °C ($\pm 0,1$) et équipé d'un cône de 5 mm de rayon faisant un angle de 1 ° entre sa génératrice et le plateau.

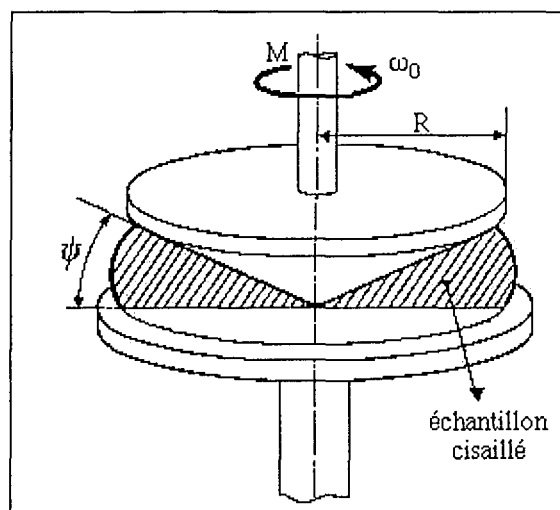


Figure III.9 : Mise en place d'un échantillon dans un rhéomètre cône-plan pour des mesures d'écoulement.

Une vitesse de rotation (ω_0) est appliquée au cône alors que le plateau reste immobile. La substance qui est placée entre le cône et le plateau se divise en couches parallèles dont les vitesses de rotation varient de 0 à ω_0 du plateau vers le cône. La vitesse modérée du cône et la faible dimension de l'appareil permettent de maintenir un écoulement laminaire du fluide.

La contrainte est modifiée linéairement au cours du temps entre 0 et une valeur maximale, de l'ordre de 500 N.m⁻², puis baissée à 0 N.m⁻² à la même vitesse. La détermination du coefficient de viscosité en mode écoulement est réalisée pour les solutions concentrées, c'est-à-dire pour des solutions polysaccharidiques seuls à 20 mg/mL dans l'eau (alginate, HA I, HA II et HA II déacétylés). Pour les solutions de polysaccharides en mélange, la concentration en alginate est fixée à 20 mg/mL et celle du HA I ou HA II est telle qu'elle correspond au rapport massique HA-alginate de 1:3; 2:3 ou 3:3; dans le cas des hyaluronates déacétylés, seul le rapport 1:3 est considéré.

5.3.3. Rhéologie des gels

Les propriétés mécaniques des plaques de gels sont déterminées en fonction du temps de gélation, par des mesures de rhéologie en mode fluage. Le rhéomètre CLS 100 a été modifié par

l'adjonction d'une chambre de saturation (ou anti-évaporation) pour éviter la déshydratation de l'échantillon. Cette chambre (figure III.10), simplement posée sur le plan thermostaté du rhéomètre, équivaut à une coiffe cylindrique munie d'un réservoir à solvant annulaire qui agit comme un joint hydraulique.

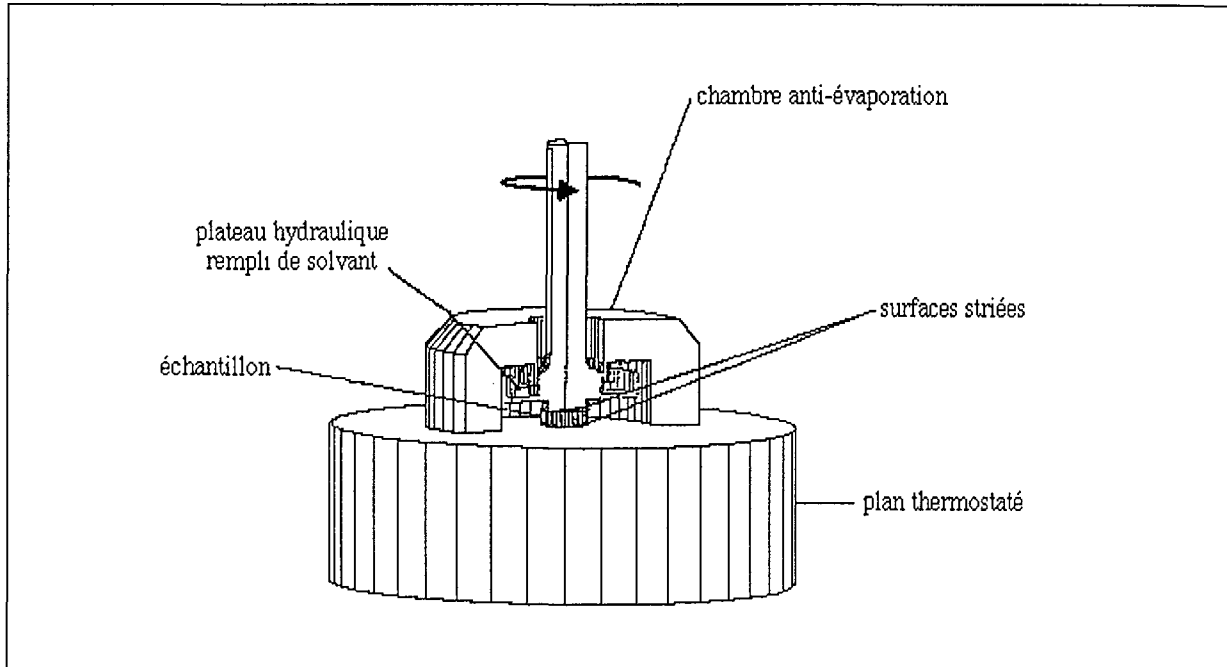


Figure III.10 : Rhéomètre à plans parallèles équipé d'une chambre anti-évaporation.

A différents temps de gélation (variant de 24 à 96 heures), un échantillon de gel est préparé par poinçonnage des plaques à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre, et le reste de la plaque est ensuite réintroduit dans la solution de CaCl_2 . L'échantillon est placé entre les deux plans du rhéomètre dont les surfaces rugueuses limitent son glissement, lors de l'application de la force angulaire. Ces plans sont des pièces en acier inoxydables dont l'aspérité moyenne est d'environ 0,4 mm. Pour obtenir une bonne répétabilité inter-essais, le gel est "écrasé" entre les deux plateaux de façon à réduire son épaisseur d'environ 10 %. Le plateau inférieur est thermostaté à 40 °C pour réaliser les mesures dans des conditions proches des conditions physiologiques, tout en tenant compte de la perte de chaleur liée à l'objet.

Une étude préliminaire a été réalisée en appliquant différentes forces de rotation, variant de 10 à 200 N.m^2 . Pour des forces faibles, aucune mesure répétable n'est observée sur un même gel, alors que certains échantillons se déchirent pour des pressions supérieures à 100 N.m^2 . La contrainte de cisaillement est donc choisie à 50 N.m^2 et les déformations enregistrées sont alors appréciables par le rhéomètre et varient de 10^{-3} à 0,03 radians selon la nature et le temps de gélation.

La force est appliquée sur une période t , fixée à 60 secondes, avant une relaxation soudaine sur le même laps de temps. La déformation de l'échantillon est donc mesurée pendant deux minutes. Une seconde mesure sur le même échantillon de gel est difficile à entreprendre car la

technique de mesure mécanique endommage partiellement le gel : en effet, la déformation mesurée varie systématiquement de 15 % environ entre la première et la deuxième mesure. Pour chaque condition expérimentale (temps de gélation, nature du mélange de polymères) étudiée, trois échantillons de gels ont été préparés puis soumis au test de rhéologie. Cette procédure systématique a permis de valider les résultats expérimentaux et la précision, des valeurs de paramètres, a été estimée à 15 %.

Les solutions étudiées sont les mêmes que celles utilisées pour la détermination d'un coefficient de viscosité de solutions concentrées en mode écoulement (cf III. 5.3.2). Ces solutions sont gélifiées sous forme de plaques en présence de calcium (cf III. 4.2.1).

6. Méthodes d'étude de la biocompatibilité

6.1. Cultures cellulaires

Culture primaire

Le cartilage est prélevé dans des conditions stériles à partir de languettes sternales ou de têtes fémorales des rats ou de bovins. Les fragments sont digérés pendant 2 heures à la pronase à 2 mg/mL suivie d'une digestion à la collagénase bactérienne pendant une nuit. Après trois lavages avec le milieu complet (DMEM/HAM F12), elles sont placées dans des flacons de 75 cm² à raison de 2 à 3 millions de cellules. La culture est réalisée jusqu'à confluence visuelle des chondrocytes avec des changements réguliers du milieu (tous les deux ou trois jours).

Culture en billes

Les chondrocytes sont rincés à l'aide de PBS ne contenant ni calcium et ni magnésium. Les chondrocytes sont trypsinés à 37°C pendant 10 minutes environ, puis la trypsine est neutralisée par du milieu de culture. Après centrifugation, les chondrocytes sont remis dans une solution d'alginate enrichie ou non en hyaluronate, à raison d'environ 3 millions de cellules par mL. Les polysaccharides sous forme de poudre ont été stérilisés par autoclavage (121 °C, 1 bar pendant 15 minutes). En effet, en raison de la forte viscosité des solutions, il n'a pas été possible de les passer sur des filtres pour les stériliser comme il est très souvent préconisé dans la littérature (Vandenbossche et Remon 1993).

Les billes de gels contenant les chondrocytes sont réalisées 30 minutes dans du CaCl₂ 100 mM. Elles sont ensuite séparées du milieu calcique, lavées deux fois dans du sérum physiologique puis une fois dans le milieu de culture complet.

Chaque bille est placée dans un puit d'une plaque 96 puits contenant 200 µL de DMEM/HAM F12 - 3mM Ca²⁺. L'incubation est réalisée à 37°C en atmosphère humide à 5 % en CO₂ et le milieu complet est changé tous les deux ou trois jours.

6.1.1. Prolifération et viabilité cellulaires

Ces tests sont réalisés sur des billes incubées à J0, J4 ou J7, J13 ou J14, J20, J27 et J34.

La viabilité cellulaire est évaluée par coloration vitale d'exclusion au bleu de trypan. Aux différents temps, chaque bille est éclatée dans 150 µl de tampon citrate-EDTA (55 mM-20 mM). A cette solution, 30 µL de bleu de Trypan sont introduits et le comptage cellulaire se fait au microscope. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules mortes par rapport au nombre total de cellules.

6.1.2. Mesure de l'anabolisme des protéoglycanes

Après 10 et 17 jours de culture, les billes sont placées dans du milieu complet en présence de 10 µCi/mL de Na₂³⁵SO₄. Après une incubation de 3 heures à 37°C, le milieu est éliminé, les billes sont lavées abondamment afin d'éliminer la radioactivité non incorporée avant d'être lysées par du tampon citrate-EDTA. Les cellules et la matrice ainsi libérées sont ensuite soumises à une digestion à la papaïne (250 µg/mL) pendant une nuit à 60°C dans un tampon à pH 6 contenant du NaH₂PO₄ 0,1M, de la cystéine-HCl 5 mM et de l'EDTA 5 mM. L'incorporation de ³⁵SO₄ est évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

6.2. *Expérimentations animales*

Animaux : Rats mâles d'espèces Wistar (Charles River, France) d'un poids d'environ 140 g.

Une poche d'air est formée dans le dos des rats anesthésiés en insufflant 10 mL d'air en sous-cutané. L'air est stérilisé à l'aide d'un filtre 0,22 µm placé entre le bout de la seringue et l'aiguille. La poche est maintenue gonflée par injection d'air tous les deux ou trois jours. La poche est réellement formée au bout de six jours et peut servir de cavité pour l'implant à étudier.

La mise en place des implants est réalisée dans des conditions stériles après incision de la poche.

Au jour du sacrifice (8, 15 et 21 jours), la poche est rincée avec 2 mL de sérum physiologique répartis en deux fractions : l'une, utilisée pour le dosage des prostaglandines E2, est stockée dans un tube contenant du complexon et de l'indométhacine. L'autre, prévue pour la numération des globules blancs, est prélevée dans un tube sec à l'abri de la lumière et stockée à température ambiante. Les implants sont également prélevés et observés macroscopiquement.

7. Méthodes biochimiques

7.1. Evaluation de l'hydratation des gels

Pour tous les mélanges de polysaccharides et à des intervalles de temps réguliers variant de 10 minutes à 120 heures, cinq billes sont préparées dans du CaCl_2 100mM. Elles sont lavées rapidement avec de l'eau bidistillée et leur surface est séchée sur du papier filtre afin de supprimer l'excès de liquide puis elles sont pesées avant leur emploi pour d'autres analyses.

7.2. Dosage du calcium

Dosage du calcium contenu dans HA II

Le polymère HA II n'est pas d'une grande pureté et un dosage préliminaire avait attiré l'attention sur l'éventuelle présence de calcium. Nous avons voulu nous assurer de cette présence et voulu connaître les proportions de sodium et de calcium présents dans l'échantillon.

Le monomère de HA II, sous forme acide, peut être représenté par la formule brute $\text{C}_{13} \text{H}_{21} \text{O}_{12}$ (avec une seule fonction carboxylique), ce qui lui confère une masse molaire de 369 g/mole. Sous forme basique, le monomère ne pèse que 368 g/mole. Calculons la masse molaire du monomère en présence de sodium et de calcium. Supposons pour cela que la fonction carboxylique est neutralisée par une fraction x en ion sodium et une fraction $(1-x)$ en ion calcium. Tenant compte des masses molaires du sodium (23 g/mol) et du calcium (40 g/mol) et de la nature divalente de l'ion calcium, la masse molaire du monomère neutralisé est :

$$\text{masse molaire monomère} = 368 + 23x + 40(1-x)/2 = 388 + 3x \text{ (g/mol)}$$

Considérons une solution à 1 g/L de HA II et calculons la teneur massique en ions sodium et calcium :

$$[\text{Na}^+] = \frac{23x}{388 + 3x} \text{ (en g/L)}$$

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{40(1-x)}{2(388 + 3x)} \text{ (en g/L)}$$

Pratiquement, nous avons préparé une solution à 1 g/L en produit commercial, correspondant à 0,85 g/L de HA (si on suppose que les impuretés contenues dans le produit sont essentiellement de l'eau). Les dosages par absorption atomique ont conduit aux valeurs suivantes :

$$[\text{Na}^+] = 37 \text{ ppm} \quad \text{et} \quad [\text{Ca}^{2+}] = 9,3 \text{ ppm}$$

à partir desquelles nous avons pu déduire les valeurs de x , en tenant compte de la vraie masse de polymère :

$$\text{Na}^+ \quad x = 0,74 \quad (\text{fraction des } \text{COO}^- \text{ neutralisés par } \text{Na}^+)$$

$$\text{Ca}^{2+} \quad 1-x = 0,21 \quad (\text{fraction des } \text{COO}^- \text{ neutralisés par } \text{Ca}^{2+})$$

Maintenant, considérons une solution à 20 g/L en HA II : cette solution contient 0,22 g/L en calcium, soit $5,48 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en cette espèce. Ajoutons de l'alginate à 20 g/L. Le monomère de l'alginate (acide guluronique) pèse 216 g/mole et la solution mixte contiendra 0,0926 mol/L d'acide. Rappelons que chaque ion calcium peut complexer 4 fonctions carboxyliques selon le modèle de la boîte à œufs et ainsi, la fraction de COO^- complexée par le calcium apporté par l'acide HA II sera :

$$\text{Fraction } \text{COOH} = \frac{0,00548 \times 4}{0,0926} = 0,237$$

Cette valeur est la fraction maximale puisqu'une partie des ions calcium reste probablement liée au hyaluronate.

Dosage du calcium lors de la formation des gels

La détermination du contenu en ions calcium permet d'étudier sa vitesse de diffusion lors de la formation de la bille. Pour chaque mesure et à l'aide d'un vortex vibrant, la bille est lavée dans l'eau bidistillée afin d'enlever l'excès de calcium qui ne serait pas associé aux polysaccharides. Les gels sont ensuite détruits en les plaçant deux heures dans 1 mL d'EDTA 50 mM. 500 µL de cette solution sont diluées avec 4 mL d'eau bidistillée et 40 µL d'HCl 2 N sont ajoutés pour décomplexer le calcium de l'EDTA. Afin de supprimer tous les résidus solides formés lors de la décomplexation, la solution est filtrée immédiatement sur des filtres en nylon de 0,45 µm de diamètre. Les ions Ca^{2+} libres sont analysés par spectroscopie d'absorption atomique.

Sur des temps d'agitation au vortex vibrant variant de quelques secondes à 10 minutes, des billes ont été rincées et leur taux de calcium a été comparé à celui des billes immergées dans un grand volume d'eau bidistillée immobile pendant plusieurs jours. Ces manipulations ont été réalisées pour estimer si la totalité du calcium situé autour de la bille et non associé a été supprimée sans toutefois avoir endommagé la structure du gel formé. Pour une période de deux minutes au vortex, l'efficacité de lavage est identique à celle dans l'eau stagnante d'où le choix du lavage par agitation au vortex pendant deux minutes pour l'étude des billes par spectroscopie d'absorption atomique.

7.3. Dosage des glycosaminoglycanes

Principe :

C'est un dosage colorimétrique basé sur la complexation des glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs) avec un colorant, le 1,9 DMB (diméthyl-méthylène blue) à pH acide (pH = 3) où les GAGs sont chargés négativement. Le complexe formé absorbe à 525 nm.

Procédure :

La gamme réalisée entre 0 et 100 µg/mL est obtenue à partir de chondroïtine sulfate 4 (C₄S). A 100 µL du liquide de lavage (dilué ou non) ou du point de gamme sont ajoutés 2,5 mL de réactif 1,9 DMB. L'absorbance du complexe est lue dans les 15 secondes.

Expression des résultats :

La droite d'étalonnage est réalisée en traçant les absorbances en fonction de la concentration des points de gammes en C₄S. Cette droite est une relation linéaire de la forme :

$$Y = aX + b$$

avec Y = Densité optique

X = Concentration en C₄S (µg/mL)

a et b sont les constantes correspondant respectivement à la pente et à l'ordonnée à l'origine.

7.4. Dosage de l'acide hyaluronique

7.4.1. Dosage par CLHP

Principe :

L'acide hyaluronique est un polysaccharide hydrolysé spécifiquement par la hyaluronidase en deux produits de dégradation terminaux : le tétrasaccharide et l'hexasaccharide. Le dosage se fait selon la procédure Payan et coll (1993) qui comporte 2 étapes : une digestion enzymatique, puis le dosage par CLHP en phase inverse des oligosaccharides produits.

Procédure :

La gamme réalisée entre 0 et 100 µg/mL est obtenue à partir de hyaluronate.

Digestion enzymatique : A 100 µL de standard de hyaluronate ou d'échantillon sont ajoutés 10 µL d'enzyme à 100 UI/mL et 90 µL de tampon acétate pH 6. Le tout est incubé pendant 48 heures à 37°C.

Dosage CLHP : Dans chaque tube d'hydrolyse sont ajoutés 10 μL d'étalon interne (acide benzoïque à 0,33 mg/mL) puis 50 μL de mélanges est injecté. L'éluant appliqué à 1,3 mL/min permet de séparer les pics de tétrasaccharide, de l'hexasaccharide et l'étalon interne en respectivement 4,5; 9,9 et 12 minutes ($\lambda = 232 \text{ nm}$).

Expression des résultats :

La droite d'étalonnage est réalisée en traçant le rapport de la somme des hauteurs de pic du tétrasaccharide et d'hexasaccharide sur la hauteur du pic de l'étalon interne en fonction de la concentration des points de gammes. Cependant si la hauteur du pic hexasaccharide n'est pas détectable, cette relation reste également valable pour le rapport de la hauteur de pic tétrasaccharide sur celle du pic de l'étalon interne. Cette droite est une relation linéaire de la forme :

$$Y = aX + b$$

avec $Y = \text{Rapport des hauteurs de pics}$

$X = \text{Concentration en acide hyaluronique } (\mu\text{g/mL})$

a et b sont les constantes correspondant respectivement à la pente et à l'ordonnée à l'origine.

Pour l'étude du comportement des gels mélanges HA-alginate, différents hyaluronates (HA I, HA III et HA IV) ont été testés. Les gels ont été formés 48 heures dans CaCl_2 , 100 mM avant d'être employés pour les mesures de libération du hyaluronate.

Les matrices hybrides formées, rincées trois fois à l'eau distillée, sont introduites dans différents milieux, tampon phosphate pH 7,4, milieu DMEM enrichi en albumine à 20 mg/mL et milieu DMEM - albumine enrichi en HA IV à 1 mg/mL). La libération du hyaluronate est étudiée en fonction du temps d'incubation (2, 24, 48, 72 et 96 heures). La quantité de hyaluronate est évaluée par la technique CLHP décrite ci-dessus.

7.4.2. Dosage radiométrique

Principe :

Ce dosage radiométrique est basé sur l'affinité de l'acide hyaluronique pour une protéine (HABP, hyaluronan binding protein) isolée du cartilage bovin. L'acide hyaluronique contenu dans l'échantillon est incubé avec un excès de cette protéine marquée à l'iode 125. La quantité de HABP qui n'a pas réagi est précipitée par des particules de HA-sépharose. Après centrifugation, la radioactivité du précipité est mesurée comparativement à une courbe d'étalonnage. Elle est inversement proportionnelle à la quantité d'acide hyaluronique présent initialement dans l'échantillon.

Procédure :

100 µL de standard ou d'échantillon sont incubés 60 minutes à température ambiante en présence de 200 µL de solution HABP iodée puis 100 µL de la solution d'HA-sépharose sont additionnés. Le mélange est incubé 45 minutes à température ambiante. Une solution de décantation de Tween 20® est additionnée à chaque tube (2 mL). Le surnageant est éliminé après 10 minutes de centrifugation à 1500 g et le culot contenant de la radioactivité résiduelle est compté pendant 5 minutes avec un compteur gamma.

Expression des résultats :

La mesure de la radioactivité du standard 0 permet de définir une valeur B0 en coups par minutes (cpm). Pour chaque point de gamme ou d'échantillon on obtient une valeur B (cpm). Le pourcentage B/B0 peut s'exprimer en fonction de la concentration par la relation :

$$\log (B/B0) = aX+b$$

avec X = Concentration en acide hyaluronique

a et b sont les constantes correspondant respectivement à la pente et l'ordonnée à l'origine.

Le seuil de détection est de 10 µg/L et les précisions intra-et interassais sont données par le fabricant à 10 %.

7.4.3. Dosage des groupements N-acétyl

Principe :

Le dosage des groupements N-acétyl se fait par une réaction colorimétrique au para-diméthylaminobenzaldéhyde (PDMA), après digestion enzymatique des polysaccharides (Saito et coll. 1968).

Procédure :

Digestion enzymatique : 40 µL d'une solution à 5 mg/mL de hyaluronate natif (HA II) ou de déacétylé (HA II_a à HA II_d) sont digérés en présence de 50 µL de chondroïtinase ABC 10 UI/mL, en ajustant le volume à 500 µL avec du Tris-HCl pH8. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures.

Dosage colorimétrique : La courbe d'étalonnage est réalisée pour des concentrations en N-acétylglucosamine comprises entre 5 et 15 µg/mL. Une quantité connue de standard (0,5 mg/mL) ou d'échantillon hydrolysé (0,4 mg/mL) est complétée à 75 µL avec du tampon Tris-HCl pH 8. Après addition de 75 µL de tétraborate de sodium 5 % pH9, le mélange est placé au bain-marie bouillant pendant 7 minutes, puis refroidi. 600 µL d'acide acétique et 250 µL de réactif PDMA sont ajoutés et les tubes sont vortexés puis placés au bain-marie à

37°C pendant 20 minutes. La densité optique (DO) est lue immédiatement au spectrophotomètre à 585 nm.

Expression des résultats :

La courbe d'étalonnage est réalisée en exprimant la densité optique des points de gamme en fonction de leur concentration. La courbe est une régression linéaire du type

$$Y = aX + b.$$

avec Y = Densité optique

X = Concentration en N-acétylglucosamine

a et b sont les constantes correspondant respectivement à la pente et à l'ordonnée à l'origine.

Le pourcentage de déacétylation de hyaluronate est obtenu par comparaison avec le taux d'acétylation du HA II natif.

7.5. Dosage des globules blancs

Cette numération est réalisée au CHU Brabois (Laboratoire d'hématologie) par cytométrie de flux.

Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en nombre de globules blancs par mL.

7.6. Dosage des protéines

Principe :

C'est un dosage colorimétrique basé sur la formation d'un complexe absorbant à 562 nm, entre l'acide bicinchoninique et le cuivre I (Cu I), formé après la réduction du Cu II par les protéines en milieu.

Procédure :

La gamme est réalisée avec de la sérum albumine bovine (SAB) pour des concentrations variant de 0 à 1 mg/mL.

A 100 µL d'échantillon ou de SAB sont ajoutés 2 mL de réactif (le chromogène) et l'ensemble est incubé à 37 °C pendant 30 minutes. La lecture est réalisée au spectrophotomètre à 232 nm, après 10 minutes de repos.

Expression des résultats :

La courbe d'étalonnage est réalisée en exprimant les densités optiques des points de gamme en fonction de leur concentration. La courbe est une régression linéaire du type

$$Y = aX + b$$

avec

Y = Densité optique

X = Concentration en BSA

a et b sont les constantes correspondant respectivement à la pente et à l'ordonnée à l'origine.

7.7. Dosage des prostaglandines E2

Principe :

Le dosage est basé sur la compétition entre les PGE2 contenues dans une aliquote du liquide biologique et celles additionnées sous forme de PGE2 couplées à la peroxidase. La compétition se fait vis-à-vis des anticorps présents au fond des puits de la plaque.

Procédure :

La gamme est réalisée en double à partir du standard à 1 µg/mL pour des concentrations de 0, 0,1; 0, 2; 0,4; 1; 2; 4; 10 ng/mL.

Préparation de la plaque : Dans chaque puit et pour 50 µL de standard ou d'échantillon sont ajoutés 50 µL de PGE2 couplés à la peroxidase. Après agitation, la plaque est incubée à température ambiante pendant 1 heure. Chaque puit est lavé trois fois avec 200 µL de tampon de lavage puis 150 µL de substrat enzymatique sont ajoutés avant incubation pendant 30 minutes sous agitation. La plaque est lue à 650 nm.

Expression des résultats :

La densité optique mesurée est inversement proportionnelle à la quantité de PGE2 présentes initialement dans le liquide biologique. Les résultats des points de gamme sont exprimé en % (densité optique des standards / densité optique du blanc) en fonction de la concentration en PGE2.

8. Méthodes optiques

8.1. LALLS

Les solutions des polysaccharides seuls (alginate, HA I , HA II ou HA II déacétylés) sont additionnées d'une solution de NaNO₃ (0,1M) à une concentration de 1 mg/mL et sont agitées

24 heures et filtrées sur filtre à 0,22 μm avant l'injection. Les masses molaires moyennes $\overline{M}_w$ sont obtenues pour des solutions de polysaccharides individuels variant de 0,5 à 1 mg/mL selon la viscosité du polymère.

8.2. *Dichroïsme circulaire*

Le principe de la mesure est basé sur l'excitation de la lumière qui permet d'observer des transitions électroniques de type : $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \sigma \rightarrow n \sigma^*$ ou $n \pi \rightarrow n \pi^*$.

Cette étude permet de connaître les structures primaires, secondaires et tertiaires ainsi que de montrer la présence d'interactions entre deux molécules, si elles existent.

Les polysaccharides (alginate, HA I, HA II et HA II déacétylés) sont dissous soit dans l'eau bidistillée, soit dans une solution de NaCl à 3 g/L pour des concentrations de polymères seuls variant de 0,33 à 2 mg/mL. Dans le cas des mélanges de polysaccharides, la concentration en alginate est fixée à 2 mg/mL et les rapports massiques de HA sur alginate sont de 1:3, 2:3 et 3:3 pour HA I et HA II et de 1:3 pour HA II déacétylés. Ces solutions mélanges sont également diluées pour obtenir une concentration en alginate variant de 0,33 à 2 mg/mL. Les solutions sont introduites dans des cuves en quartz rondes de trajectoire optique égale à 1 ou de 2 mm. Les solutions sont maintenues à 25°C ($\pm 0,1$) à l'aide d'un bain thermostaté. Les mesures sont réalisées à l'aide du dichrographe, calibré par une solution de pentolactone, en balayant les solutions sur une longueur d'onde variant de 190 à 300 nm par pas de 2 nm et pour un temps d'intégration de 0,2 s. Chaque solution est analysée trois fois afin d'établir un spectre moyen. L'analyse des résultats est réalisée par le logiciel CD max[®].

8.3. *Microscopie électronique à transmission*

Pour l'observation au microscope électronique, les billes doivent subir une phase de fixation avant l'inclusion nécessaire à la réalisation des coupes. Les études structurales sont réalisées pour les gels d'alginate, HA II 1:3 et HA I 1:3 et 2:3 formés 72 heures dans du chlorure de calcium.

Fixation :

La double fixation par le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium permet de conserver l'ultrastructure cellulaire.

Les billes sont fixées par le glutaraldéhyde à 2,5 % dans le tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,2, contenant 0,2 % de bleu alcian et 0,2 % de rouge de ruthénium, pendant 5 heures (Van Susante 1995). Après 3 lavages successifs dans le tampon cacodylate dilué de moitié par de l'eau

bidistillée, les billes sont conservées pendant 12 heures dans le dernier bain. La post-fixation des billes est réalisée par le tétr oxyde d'osmium à 2% dans le tampon cacodylate 0,1M pendant 1 heure. Elles sont ensuite lavées dans 3 bains successifs d'eau distillée pendant 15 minutes.

Imprégnation et inclusion :

L'inclusion se faisant dans une résine hydrophobe, les billes sont d'abord déshydratées par de l'acétone. La déshydratation est réalisée par passages successifs des billes dans des bains d'acétone de concentration croissante (10 %, 20 %, 40 %, 60 % pendant 30 minutes, 80 % et 95 % pendant 1 h 30 et 100 % pendant 15 minutes, 3 fois et 1 fois 1 h 30). L'acétone est progressivement remplacé par de la résine Epon en solution. L'imprégnation est réalisée par passages successifs des billes dans des mélanges résine-acétone de concentration croissante. Les billes restent en contact avec chaque bain pendant 48 heures et l'inclusion dans la résine pure s'effectue dans des moules par polymérisation à 70 °C pendant 48 heures.

Réalisation des coupes

Le bloc est, préalablement, taillé à la lame de rasoir afin d'isoler la bille au sommet d'une pyramide tétraédrique tronquée. La réalisation des coupes est effectuée sur un ultramicrotome RMC à l'aide d'un couteau diamant. L'épaisseur des coupes est d'environ 60-80 µm.

Un double marquage acétate d'uranyle-citrate de plomb est effectué sur les coupes fines afin d'augmenter le contraste de façon non spécifique et pour permettre une meilleure observation structurale. Ce marquage est réalisé selon la méthode de Valentines (1961) pour l'acétate d'uranyle et selon celle de Reynolds (1963) pour le citrate de plomb.

L'ensemble des coupes séchées sont ensuite observées au microscope électronique à transmission.

9. Interprétation des résultats

9.1. Modélisation de la diffusion

Les phénomènes de diffusion ont lieu lors de la gélification des billes et sont modélisés pour estimer un coefficient de diffusion phénoménologique pour chaque espèce considérée. A partir d'un problème classique de la conduction transitoire de la chaleur d'une surface isotherme d'une sphère (Carslaw 1959), un modèle simple pour la détermination des coefficients de diffusion a été obtenu. Bien que la formation de gel soit accompagnée de la diffusion de l'eau et du hyaluronate hors du gel et de la diffusion simultanée de l'ion calcium vers la bille, le modèle

détaillé ci-dessous ne concerne que la diffusion de chaque espèce indépendamment des autres phénomènes de diffusion.

Les billes de gel sont considérées comme un milieu continu pour la diffusion du Ca^{2+} provenant du milieu extérieur ainsi que pour la diffusion de l'eau et du hyaluronate vers le milieu calcique. Pour la diffusion transitoire, jusqu'à ce que les conditions de l'état stationnaire soient atteintes et en dépit de la perte significative du poids, la réduction de la taille de la bille est négligée et son rayon est supposé rester constant et égal à sa valeur initiale.

La concentration de l'espèce diffusante considérée est notée C_{stead} . A partir du poids moyen d'une bille, c'est-à-dire 11 mg, et de sa densité moyenne proche de 1,1, le rayon a de la bille est estimé à 1,3 mm.

Le modèle de diffusion dans une sphère continue est assimilé au problème classique de la conduction de chaleur dans une sphère (Carslaw 1959). Cette sphère est supposée avoir à une température initiale nulle et une température de surface supposée constante, T_{surf} . La température locale de la sphère est calculée par intégration de l'équation différentielle :

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \kappa \left(\frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial T}{\partial r} \right) \quad (\text{éq 23})$$

avec les conditions de liaisons suivantes :

$$\begin{aligned} 0 \leq r \leq a & \quad t = 0 \quad T = 0 \\ r = a & \quad t > 0 \quad T = T_{\text{surf}} \end{aligned}$$

où κ est la diffusion thermique du matériau sphérique. L'intégration analytique de l'équation différentielle donne le profil de la température transitoire dont la température moyenne, T_{moy} , est exprimée en fonction du temps par :

$$\frac{T_{\text{moy}}}{T_{\text{surf}}} = 6 \sqrt{\frac{\kappa t}{\pi a^2}} - \frac{3\kappa t}{a^2} + 12 \sqrt{\frac{\kappa t}{a^2}} \sum_{n=1}^{\infty} \text{ierfc} \left(\frac{na}{\sqrt{\kappa t}} \right) \quad (\text{éq 24})$$

ou $\text{ierfc}(x)$ est l'intégrale première de la fonction erreur complémentaire $\text{erfc}(x)$:

$$\text{ierfc}(x) = \int_x^{\infty} \text{erfc}(\xi) d\xi = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \cdot \exp(-x^2) - x \cdot \text{erfc}(x) \quad (\text{éq. 25})$$

avec $\operatorname{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} \exp(-\xi^2) d\xi$ (éq. 26)

Comme le montre l'équation, la température moyenne tend à atteindre une valeur asymptotique, T_{surf} . Dans le cas présent de la diffusion dans la masse de la sphère, la température T_{moy} peut être remplacée par la concentration moyenne C_{moy} et κ , par le coefficient de diffusion D de l'espèce considérée. L'analogie entre le transfert de chaleur et de masse permet de remplacer la température externe par la concentration à l'état stationnaire, C_{stead} , et l'équation (24) peut être écrite sous la forme :

$$\frac{C_{\text{moy}}}{C_{\text{stead}}} = 6\sqrt{\frac{Dt}{\pi a^2}} - \frac{3Dt}{a^2} + 12\sqrt{\frac{Dt}{a^2}} \sum_{n=1}^{\infty} \operatorname{ierfc}\left(\frac{na}{\sqrt{Dt}}\right) \quad (\text{éq. 27})$$

L'utilisation de la relation (éq. 27) est simple pour Ca^{2+} et C_{stead} est estimée par la moyenne des contenus en Ca^{2+} à 48 heures de formation. Pour le cas de l'eau et du hyaluronate, la concentration dans les billes a été exprimée par la perte relative de l'espèce considérée. En particulier, la perte en poids pour l'eau a été déterminée par pesée (cf § IV 3.3.1). La perte du hyaluronate à l'état stationnaire a été approximée à la valeur expérimentale déterminée par dosage de la dernière bille de la série (96 ou 120 heures), réalisés par CLHP (cf § IV 3.3.3).

L'ajustement des données expérimentales par le modèle simple a été fait par minimisation de la fonction objective définie par la somme de l'écart au carré entre les concentrations prédites et expérimentales.

9.2. Méthodes statistiques

Les test statistiques appropriés ont été réalisés à l'aide du logiciel Statview IV® (Abacus Concept)

Animaux :

Pour chaque groupe d'animaux et chaque dosage, on calcule la moyenne des valeurs, l'écart-type (sd) et le SEM (sd/racine(n) qui est l'écart standard par rapport à la moyenne.

Les lots d'animaux traités par différents implants ont été comparés par un test statistique ANOVA (analyse de variance à un facteur).

IV. RESULTATS

L'objectif de notre travail était d'étudier un mélange polysaccharidique pour concevoir un matériau de comblement. Nous présentons, dans un premier paragraphe, les résultats de la déacétylation réalisée sur le hyaluronate dans l'objectif de créer une liaison ionique de ce polysaccharide avec l'alginate. Des études physico-chimiques des polymères en solution diluée ou concentrée ont été réalisées afin de mettre en évidence l'éventuelle présence d'interactions entre les polysaccharides choisis : alginate et hyaluronate natif ou modifié. La troisième partie correspond à l'étude structurale et rhéologique des matériaux obtenus par gélification calcique. Les résultats de leur comportement et de leur biocompatibilité sont présentés dans une dernière partie.

1. Modification chimique du hyaluronate

La déacétylation du hyaluronate a été réalisée par hydrazinolyse selon la méthode proposée par Dahl et coll (1988). Pour des raisons évidentes de coût de produit de départ, cette étude a été réalisée uniquement avec HA II. L'influence du temps de synthèse (entre 30 et 240 minutes) a été appréciée par la mesure du taux de déacétylation des échantillons et de leur degré de polymérisation.

1.1. Cinétique de déacétylation

L'action de l'hydrazine sur le hyaluronate se traduit par l'hydrolyse des groupements N-acétyl. La réaction est suivie par le dosage colorimétrique des groupements N-acétyl du hyaluronate décomposé en unités disaccharidiques.

La progression de la réaction de déacétylation de HA II a été évaluée sur des échantillons de 10 mg pour différents temps de synthèse (tableau IV.1) :

	HA II _a	HA II _b	HA II _c	HA II _d
Temps de réaction (minutes)	30	60	120	240
Taux de déacétylation (%)	16	27	45	80

Tableau IV.1 : Evolution du taux (%) de déacétylation du hyaluronate (HA II) modifié chimiquement, à 100 °C, en présence d'hydrazine, avec la durée de réaction (minutes).

Après 15 minutes d'hydrazinolyse, le pourcentage de déacétylation est très faible et inférieur à 1 % (résultat non présenté). Le taux de déacétylation augmente ensuite rapidement avec le temps de réaction : à partir de 30 mn de réaction, 16 % des résidus N-acétylglucosamines de HA II sont sous forme amine et, après 4 heures, plus de 3/4 des résidus sont déacétylés.

L'hydrazinolyse permet donc de déacétyler partiellement le hyaluronate avec un pourcentage de groupements amines croissant avec le temps de réaction. L'augmentation rapide du taux de déacétylation en 30 minutes de réaction peut s'expliquer par la diminution des interactions présentes initialement dans la molécule repliée. L'hydrazinolyse conduite pendant 4 heures permet de déacétyler HA II à 80 %, ce qui pourrait être intéressant dans l'objectif de créer une interaction forte avec l'alginate et donc d'obtenir une matrice plus rigide. Cependant une modification chimique trop importante pourrait également altérer les propriétés viscoélastiques et rhéologiques du hyaluronate.

1.2. Variation de la masse molaire

Les masses molaires des différents hyaluronates déacétylés (HA II_a à HA II_d) sont obtenues par mesure au LALLS (tableau IV.2).

	HA II	HA II _a	HA II _b	HA II _c	HA II _d
Temps de réaction (minutes)	0	30	60	120	240
Masse moléculaire $\bar{M}_w$ (g.mol ⁻¹)	452000	59000	58000	46000	35000

Tableau IV.2. : Evolution de la masse molaire moyenne du hyaluronate modifié chimiquement en fonction du temps de réaction.

Lors de la déacétylation du hyaluronate sous l'action de l'hydrazine, nous avons observé une dépolymérisation appréciable des chaînes polysaccharidiques, principalement en début de réaction. La masse molaire moyenne de HA II diminue de $4,5.10^5$ à $5,9.10^4$ g.mol⁻¹ en 30 minutes. Cette dépolymérisation se poursuit au cours du temps, et la masse molaire mesurée après 4 heures n'est plus que de $3,5.10^4$ g.mol⁻¹ environ. L'indice de polydispersité n'a pas changé de manière significative au cours de la réaction et reste compris entre 1,3 et 1,7.

1.3. Conclusion

Les résultats expérimentaux suggèrent un processus d'action de l'hydrazine sur le hyaluronate en deux phases. La première conduit à une dépolymérisation rapide du polysaccharide ainsi

qu'à un changement possible de la conformation, permettant ainsi aux groupements amides d'être accessibles au réactif. Dans une deuxième étape, l'hydrolyse lente des liaisons amides libère des groupements amines sur les chaînes de hyaluronate.

L'hydrazinolyse présente donc l'inconvénient d'entraîner une dégradation du polymère. L'influence de la déacétylation sur le degré de dépolymérisation observé est en accord avec les résultats de la littérature (Dahl et coll. 1988, Höök et coll. 1982), même si dans ces études, la variation de la masse molaire est moins importante que celle décrite précédemment. On constate donc que, si l'augmentation de la durée de la réaction permet un meilleur rendement (ce qui est bénéfique pour améliorer les interactions avec l'alginate), elle entraîne en revanche une dépolymérisation qui pourrait diminuer la stabilité des gels. Il nous a alors semblé important d'évaluer les caractéristiques physico-chimiques des solutions et des gels pour différents taux de déacétylation et donc pour différents temps de réaction. A cet effet, des opérations de déacétylation ont été réalisées sur des masses plus importantes (200 mg de HA II) sur les durées de 0,5 h (HA II_a), 1 h (HA II_b), 2 h (HA II_c) et 4 h (HA II_d). Les taux de déacétylation de ces produits sont équivalents à ceux obtenus précédemment avec 10 mg de HA II.

2. Comportement des polysaccharides en solution

Les interactions entre nos polysaccharides ont été observées soit par l'étude de leur conformation, appréciée par dichroïsme circulaire, soit par l'étude de leur comportement rhéologique. La détermination préalable au LALLS a permis d'obtenir les masses molaires moyennes des trois principaux polysaccharides étudiés. Elles sont de l'ordre de $1,5 \cdot 10^6$; $4,5 \cdot 10^5$ et $2,7 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ respectivement pour HA I, HA II et alginate.

2.1. Dichroïsme circulaire

Les interactions entre des polymères se traduisent souvent par une modification de conformation d'au moins l'un d'entre eux. C'est pourquoi nous avons fait appel au dichroïsme circulaire pour mettre en évidence d'éventuelles interactions entre l'alginate et le hyaluronate natif (HA I et HA II) ou déacétylé (HA II_a à HA II_d), en réalisant les spectres des solutions individuelles et des mélanges.

2.1.1. Solutions individuelles

Le spectre de dichroïsme circulaire de l'alginate présente une bande négative de faible intensité à 209 nm, attribuée à la transition $n \rightarrow \pi^*$ des groupements carboxyliques (Johnson 1987). Les spectres des solutions de hyaluronate sont assez semblables mais présentent toutefois une bande négative à 209 nm plus prononcée, qui correspond à la transition $n \rightarrow \pi^*$ des groupements amides des résidus glucopyranosyles (Stone 1969) (Figure IV.1a, b).

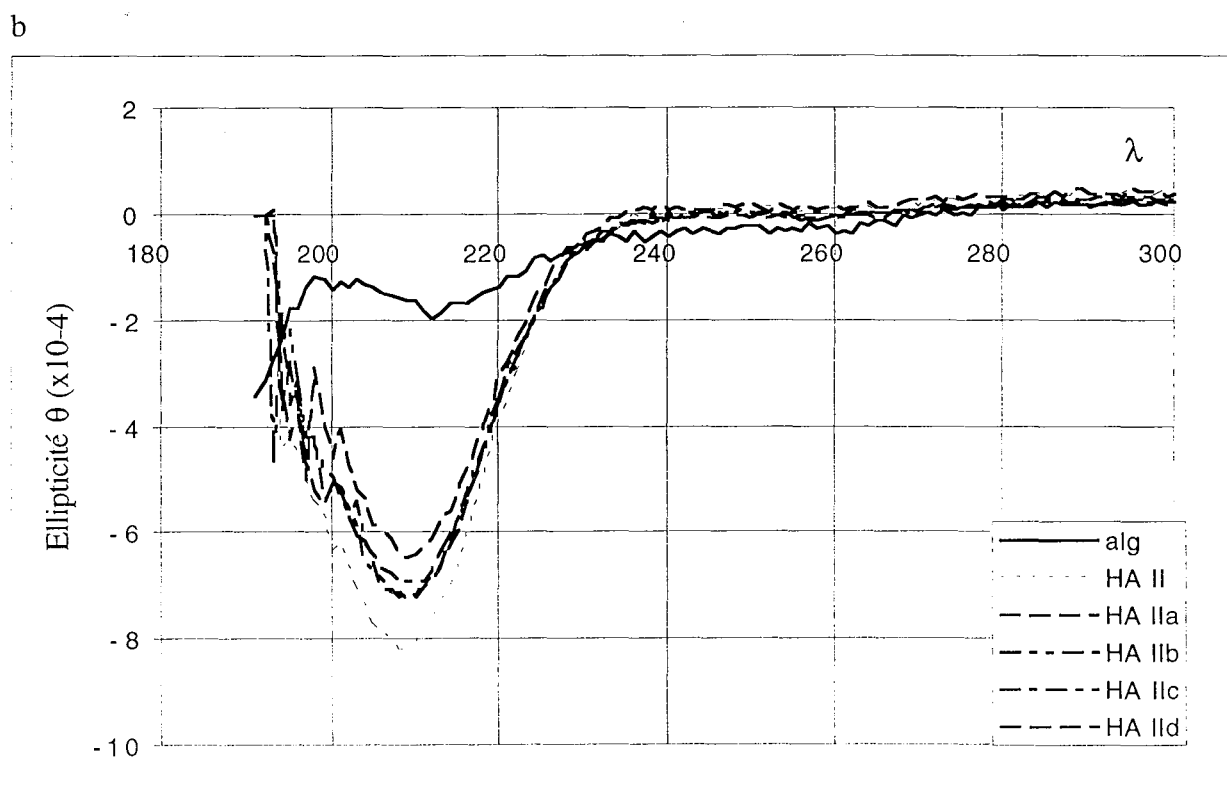
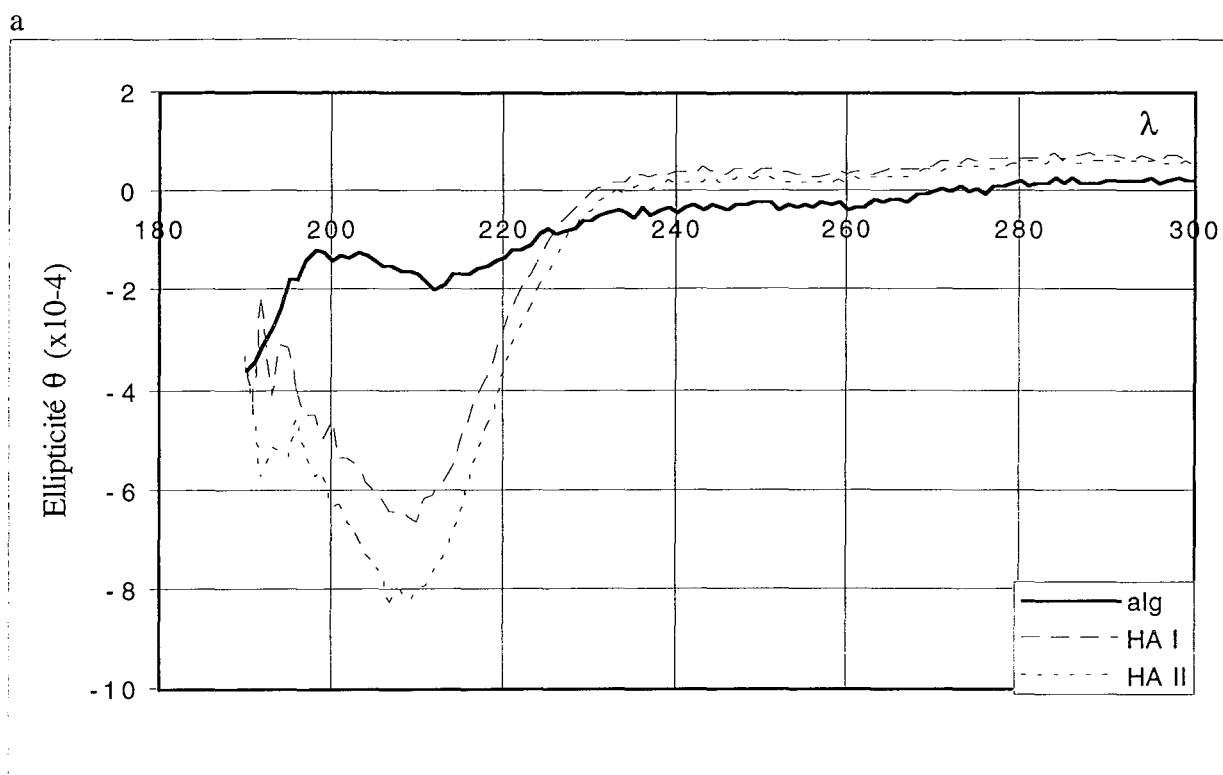


Figure IV.1a, b : Spectres de dichroïsme circulaire des solutions individuelles de polysaccharides à 1 mg/mL dans l'eau obtenus à 20°C : a) correspond à l'alginate, HA I et HA II et b) à HA II et de HA II déacétylés, pour des temps de réaction variant de 30 minutes à 4 heures.

L'amplitude du signal de HA II est légèrement supérieure à celle de HA I (Figure IV.1a). Dans le cas du hyaluronate déacétylé, nous observons le même signal négatif maximal à 209 nm pour tous les temps de réaction, mais l'importance de l'ellipticité négative à 209 nm est réduite. L'intensité de ce phénomène augmente avec la durée de l'hydrazinolyse (Figure IV.1b). La diminution du signal s'explique probablement par la disparition d'un certain nombre de groupements acétyles sur la chaîne du hyaluronate, mais la forte diminution de la taille des molécules peut également intervenir, car le hyaluronate dépolymérisé ne peut garder sa conformation de grande pelote aléatoire (Laurent 1987).

Nos polysaccharides sont fortement ionisés dans nos conditions d'étude. Leur caractère polyélectrolytique est à l'origine d'une modification de conformation. Nous avons donc comparé le signal obtenu en présence de NaCl 3g/L avec les résultats précédents.

Dans le cas de l'alginate, la présence de NaCl à 3 g/L diminue le signal. Ce phénomène est probablement lié à la faible association connue des blocs polyguluroniques en présence d'ions monovalents (Johnson 1987). Les spectres des solutions de hyaluronate, HA I et HA II, sont nettement moins affectés par la présence de NaCl : la variation est inférieure à 10 % pour la bande à 209 nm. NaCl n'a donc pas d'interaction avec les groupements amides des résidus N-acétyl-glucosamines.

2.1.2. Solutions de polysaccharides en mélange

Les solutions de polysaccharides en mélange présentent des spectres de dichroïsme d'allure comparable à ceux obtenus individuellement, en raison de l'existence d'un signal commun à 209 nm.

L'additivité des ellipticités mesurées par dichroïsme circulaire pour des substances sans interaction, nous permet de calculer le signal théorique (θ_{theo}) d'un mélange à partir du signal de chaque constituant et de sa concentration dans le mélange par l'équation :

$$\theta_{theo} = \sum \theta_i \quad (\text{éq.28})$$

où θ_i est l'ellipticité mesurée du constituant i à la concentration C_i dans le mélange.

Cette équation suppose l'absence d'interaction entre les constituants du mélange. Un écart sensible entre cette valeur théorique et la valeur mesurée expérimentalement traduit nécessairement l'existence d'une interaction entre eux.

En présence d'une faible proportion de hyaluronate, les spectres observés et théoriques sont quasiment superposés (résultat non représenté). Par contre les deux polysaccharides sont en quantités équivalentes (mélanges 3:3) et plus particulièrement pour HA I dont l'amplitude du signal observé est supérieure à la valeur théorique pour toutes les concentrations étudiées, l'écart variant de 10 à 40 % (tableau IV.3), ce qui est supérieur à l'écart-type des valeurs

obtenues en dichroïsme circulaire. Le mélange se traduit donc par une augmentation de l'asymétrie et donc par une interaction entre les polysaccharides. En raison de la très forte contribution de l'acide hyaluronique au signal du mélange, on peut supposer que l'interaction se traduit essentiellement au niveau des groupements amides des résidus glucopyranosyles.

Concentration mg/mL	HA I (eau) signal observé	HA I (eau) signal théorique	HA I (NaCl 3g/L) signal observé	HA I (NaCl 3g/L) signal théorique
0,5	- 4,87	- 3,95	- 4,99	- 3,91
1	- 9,12	- 8,19	- 9,65	- 7,46
2	- 14,5	- 10,5	- 13,6	- 12,4
Concentration mg/mL	HA II (eau) signal observé	HA II (eau) signal théorique	HA II (NaCl 3g/L) signal observé	HA II (NaCl 3g/L) signal théorique
0,5	- 4,4	- 4,56	- 4,59	- 4,70
1	- 10,0	- 9,90	- 8,74	- 8,76
2	- 14,8	- 16,1	- 18,1	- 16,8

Tableau IV.3 : Comparaison de l'ellipticité à 209 nm pour différentes concentrations des mélanges hyaluronate (HA I et/ou HA II)-alginate 3:3, et de la somme des ellipticités à 209 nm de l'alginate et du hyaluronate considéré.

En revanche, dans le cas de HA II, la différence est nettement moins importante (inférieure à 3 % sauf pour la concentration la plus forte où elle atteint 8 %). Pour tenter d'expliquer la contradiction apparente entre les résultats concernant les deux sources de hyaluronate, nous avons alors recherché si la différence de pureté pouvait jouer un rôle. Il s'est avéré que, contrairement à HA I, HA II contient du calcium en quantité importante (9,3 ppm, cf § III.7.2) ainsi que l'a montré le dosage par spectroscopie d'absorption atomique. Lorsque HA II est mélangé à l'alginate, cet apport de calcium peut complexer les groupements carboxyliques de ce polymère. Nous avons estimé, puisque chaque ion calcium peut complexer quatre fonctions carboxyliques selon le modèle de la boîte à oeuf, que le pourcentage des fonctions ainsi complexées peut atteindre 24 % (voir § III.7.2 pour le détail des calculs). Elles sont alors moins disponibles pour établir des interactions avec le hyaluronate.

Lorsque le hyaluronate (HA II) est déacétylé, la différence des valeurs d'ellipticité expérimentale et théorique du mélange avec l'alginate est d'environ 10 % et traduit l'existence d'interactions (tableau IV.4). Cependant cette différence ne varie pas avec la durée de la réaction, et donc avec le taux de fonctions amines libérées. Deux explications peuvent être avancées :

- soit les interactions entre polysaccharides ne sont pas intensifiées par des liaisons ioniques, contrairement à ce qui était souhaité ; le résultat obtenu pour HA II déacétylé, différent de ceux de HA II natif mais conforme à ceux de HA I, s'explique alors par l'élimination du calcium lors de la purification par dialyse.

- soit les liaisons ioniques créées par la déacétylation sont plus intenses mais la dépolymérisation, observée parallèlement, compense la variation du signal de dichroïsme circulaire.

	HA II	HA II _a	HA II _b	HA II _c	HA II _d
θ_{exp}	-4,59	-3,86	-3,65	-3,62	-3,48
$\theta_{\text{théo}}$	-4,70	-3,40	-3,38	-3,36	-3,12

Tableau IV. 4: Comparaison de l'ellipticité à 209 nm des mélanges hyaluronates modifiés-alginate 1:3 dans NaCl 3g/L et de la somme des ellipticités à 209 nm de l'alginate et du hyaluronate modifié considéré .

On constate cependant que l'amplitude du signal des mélanges contenant le hyaluronate déacétylé diminue peu mais régulièrement, en fonction du temps de réaction (HA II_a à HA II_d) sauf pour le taux de déacétylation le plus élevé, où le signal théorique est nettement plus diminué. Ceci est certainement lié à l'importante déacétylation (80 %) qui augmente la probabilité d'interactions de type ionique, mais aussi à la très forte dépolymérisation.

Ainsi, les mesures de dichroïsme circulaire ont permis de montrer l'existence d'interactions entre l'alginate et le hyaluronate HA I. Dans le cas de HA II, ces interactions ne sont plus mises en évidence, probablement en raison d'une complexation interférante des groupements carboxyliques de l'alginate par les ions calcium contenus dans la poudre de HA II. La déacétylation du hyaluronate n'augmente pas de manière significative les interactions entre les deux polymères, tout du moins de manière appréciable par dichroïsme circulaire.

2.2. Comportement rhéologique des polysaccharides en solution

Lors de la conception d'un biomatériau, il est nécessaire de connaître les propriétés physico-chimiques de ce matériau. Afin, également, de confirmer les interactions entre les polysaccharides mises en évidence par dichroïsme circulaire, nous avons évalué le comportement rhéologique de solutions diluées au viscosimètre capillaire et au rhéomètre de type Couette. La rhéologie de solutions plus concentrées, c'est-à-dire à des concentrations égales à celles employées pour la formation des gels, a été étudiée ensuite au rhéomètre en mode écoulement.

2.2.1. Etude des solutions diluées

Les caractéristiques rhéologiques des polysaccharides en solution diluée peuvent être utilisées pour mettre en évidence d'éventuelles interactions. Nous avons été amenée pour cela à étudier les polysaccharides seuls et en mélange.

2.2.1.1. Choix des conditions d'études

Le viscosimètre capillaire est fréquemment employé pour étudier la viscosité d'un polysaccharide en milieu dilué. Cependant cette technique nécessite de contrôler que les macromolécules contenues dans les solutions employées ne s'adsorbent pas sur la paroi des tubes capillaires et que ces solutions possèdent, de plus, un comportement newtonien. Nous avons vérifié ce point par calcul théorique (cf III § 5.3.1.3) puis par des mesures au viscosimètre de Couette.

Des mesures ont donc été effectuées au rhéomètre de Couette, pour les polysaccharides dissous en présence de NaCl en concentration variable. L'application de trois gradients de vitesse (ω_0) au rhéomètre (4,39, 0,945 et 0,512 s⁻¹) conduit aux résultats suivants (tableau IV.5) :

ω_0 (s ⁻¹)	NaCl (g/L)	0	0,3	1	3	10
	Viscosité dynamique (mPa.s)					
4,39	HA I	33,8	6,0	3,5	2,4	1,8
0,945		36,0	5,6	3,4	2,5	1,8
0,512		33,8	5,9	3,6	2,8	1,8
4,39	HA II	6,6	2,3	1,7	1,6	1,3
0,945		6,3	2,3	1,9	1,9	1,2
0,512		6,6	2,4	2,1	2,2	1,0
4,39	Alginate	3,6	1,6	1,4	1,4	1,1
0,945		3,4	1,4	1,3	1,3	1,0
0,512		3,6	1,6	1,4	1,3	0,96

Tableau IV.5: Evolution de la viscosité dynamique (mPa.s) des polysaccharidiques dissous (0,5 mg/mL) dans des solutions de concentration en NaCl variable et en fonction de la vitesse de rotation appliquée au rhéomètre de type Couette.

Il apparaît que les viscosités dynamiques mesurées à ces vitesses de rotation varient peu, ce qui indique qu'à ces vitesses et pour la concentration étudiée (0,5 mg/mL) les polymères réagissent comme des fluides newtoniens.

Les viscosités mesurées avec le viscosimètre capillaire sont proches des résultats obtenus au rhéomètre cylindrique et l'écart observé entre les deux séries de valeur est généralement

inférieur à 5%. L'erreur liée à l'adsorption du polysaccharide sur le verre capillaire est négligeable.

Pour la suite de l'étude, le viscosimètre capillaire a été préféré car il permet des mesures plus faciles et plus répétables.

2.2.1.2. Solutions de polysaccharides individuelles

Hyaluronate natif et alginate, influence de la force ionique de la solution

La viscosité, η , d'un polymère dilué est connue pour augmenter avec sa concentration et ce phénomène est exprimé par la relation de Huggins (éq. 11), relation principalement valable pour des molécules neutres. Or l'alginate et le hyaluronate sont des polyélectrolytes. Dans notre étude, pour des concentrations en polysaccharides inférieures ou égales à 0,5 mg/mL, les rapports de la viscosité spécifique sur la concentration (η_{sp}/C) obéissent à cette loi de Huggins (éq. 11). Les mesures réalisées avec le capillaire de Ubbelohde ont donc permis de déterminer la viscosité intrinsèque et le coefficient de Huggins pour l'ensemble des polymères dans des conditions de force ionique différentes.

Le comportement rhéologique des polyélectrolytes varie avec la force ionique du milieu. Smidsrod (1970) a montré en effet que la viscosité spécifique d'une solution d'alginate diminuait en présence d'un électrolyte fort, tel que NaCl, et cela jusqu'à environ une concentration en sel de 100 mM (5,85 mg/mL). Cette variation de viscosité est liée à un changement de conformation du polysaccharide. A faible concentration de NaCl, quand un polyélectrolyte est dissous dans l'eau, sa viscosité réduite augmente très rapidement avec sa dilution dans l'eau, comme cela a été observé par Fuoss (1948) (éq. 12).

Dans le cas de nos solutions de polysaccharides dissous dans l'eau pure à des concentrations inférieures à 0.3 mg/mL, la loi de Fuoss est respectée puisque les valeurs de viscosité sont très élevées : la viscosité intrinsèque est de l'ordre de 16,3; 13,8; et 7,2 mL/mg respectivement pour HA I, HA II et l'alginate. En présence d'une concentration, même faible, en chlorure de sodium, elles chutent à des valeurs inférieures à 3 mL/mg (tableau IV.6).

Concentration en NaCl (g/l)	Viscosité intrinsèque (mL/mg)		
	HA I	HA II	ALGINATE
0	16,3	13,8	7,2
0,3	3,8	2,52	1,56
1	2,76	1,73	1,25
3	2,19	1,42	1,04
10	1,96	1,16	1,03

Tableau IV.6 : Evolution des viscosités intrinsèques des solutions diluées d'alginate, HA I et HA II mesurées à l'aide d'un viscosimètre capillaire, en fonction de la concentration en NaCl du milieu (20°C).

Ainsi, en présence de NaCl, la viscosité intrinsèque de l'alginate diminue de 1,56 mL/mg dans un milieu NaCl 0,3 g/L à 1,03 mL/mg dans une solution saline à 10 g/L. Pour la même variation de concentrations en chlorure de sodium, elle passe respectivement de 3,80 à 1,96 mL/mg et 2,52 à 1,16 mL/mg pour les solutions de hyaluronates HA I et HA II.

Lorsque la concentration de NaCl est supérieure à 3 g/L, la viscosité intrinsèque des trois polysaccharides évolue peu et explique l'utilisation fréquemment rencontrée dans la littérature pour les études rhéologiques de l'alginate, d'une concentration en NaCl de 0,1 M (soit 5,85 g/L). Par exemple, Smidsrod (1970) trouve une valeur de viscosité intrinsèque de 1,30 mL/mg pour un alginate de poids moléculaire de $6,5 \cdot 10^5$ Da en solution dans NaCl à 0,1 M alors que notre valeur dans NaCl 3g/L est de 1,04 mL/mg pour une masse molaire estimée à $2,7 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹. Cette différence de valeur est très certainement liée à la différence des poids moléculaires des alginates étudiés mais également à leur origine. Pour HA I dans NaCl 3g/L, la viscosité intrinsèque a été déterminée à 2,19 mL/mg, valeur tout à fait semblable à celles de Cleland et Wang (1970) et de Morris et coll (1980), qui ont trouvé respectivement des valeurs de 2,2 mL/mg pour une solution de hyaluronate de PM= $1,3 \cdot 10^6$ Da dans NaCl 0,2 M, et de 2,6 mL/mg pour une solution de hyaluronate de PM= $1,6 \cdot 10^6$ Da dans NaCl à 0,15 M.

La viscosité intrinsèque de nos polyélectrolytes varie linéairement avec l'inverse de la racine carrée de la concentration du milieu ionique (Figure IV.2), conformément aux observations de Smidsrod (1970).

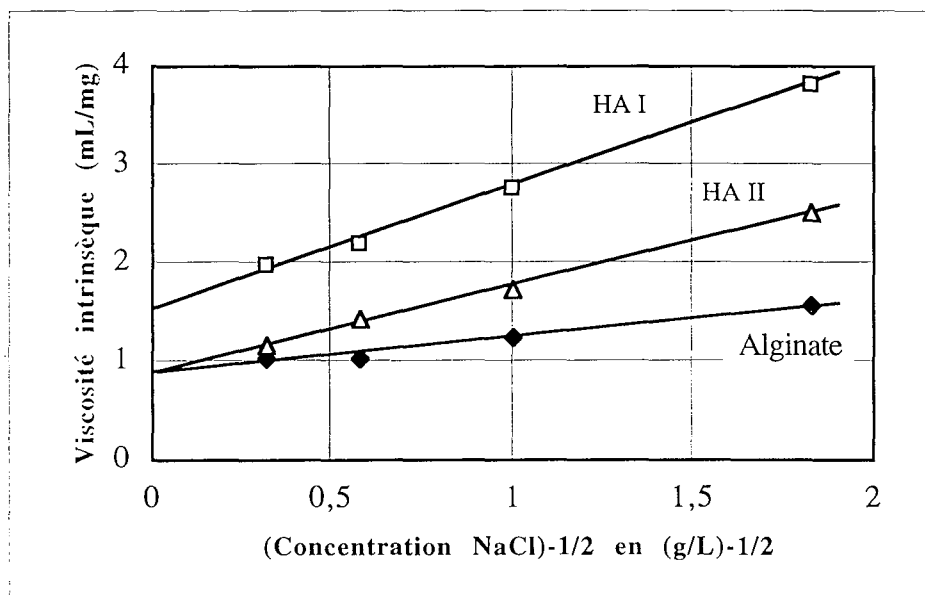


Figure IV.2 : Variation linéaire de la viscosité intrinsèque en fonction de l'inverse de la racine carrée de la concentration en chlorure de sodium (électrolyte support).

Pour toutes les concentrations en NaCl, la viscosité des polysaccharides obéit à la relation suivante :

$$[\eta]_{\text{HAI}} > [\eta]_{\text{HAII}} > [\eta]_{\text{Alginate}}$$

Cette variation est certainement liée à la différence de masse molaire puisque l'évolution des viscosités intrinsèques est en accord avec l'évolution des masses molaires des polysaccharides estimées par la méthode LALLS.

Le coefficient de Huggins (k_H) est obtenu à partir de l'éq. (11). Les valeurs de ce coefficient pour nos polysaccharides en fonction de la concentration en NaCl sont regroupées dans le tableau IV.7.

Concentration de NaCl (g/l)	Coefficients de Huggins (k_H)		
	HA I	HA II	ALGINATE
0,3	0,44	0,27	0,4
1	0,47	0,28	0,16
3	0,38	0,11	0,085
10	0,23	0,089	-0,12

Tableau IV.7 : Evolution du coefficient de Huggins pour l'alginate, HA I et HA II en fonction de la concentration en NaCl dans le milieu de dissolution.

Dans le cas de concentrations en NaCl inférieures ou égales à 3 g/L, la constante k_H relative à HA I varie peu et est de l'ordre de 0,4. Pour l'alginate et HA II, k_H présente une variation plus importante avec la concentration en NaCl et la valeur est maximale 0,27 pour NaCl à 0,3 g/L. La valeur négative de k_H pour la solution d'alginate dans NaCl 10g/L n'est pas expliquée.

Selon la théorie hydrodynamique de Riseman et Ullmann (Stickler 1989) et pour des polymères ayant une structure en serpentín dont le repliement semble être aléatoire (comme dans le cas des polysaccharides linéaires), la valeur caractéristique de k_H est proche de 0,6. Toutefois, dans le cas des polymères non chargés, ces coefficients peuvent être inférieurs à 0,52. Les valeurs de k_H obtenues pour l'alginate et pour HA II sont nettement inférieures à celles observées généralement pour les polymères. Ces résultats indiquent que nos polysaccharides ont une grande affinité envers les milieux aqueux étudiés, et confortent la forte valeur de la viscosité intrinsèque des polymères dissous dans l'eau. Les macromolécules en milieu dilué sont donc fortement hydratées et adoptent une structure de faible rigidité, ce qui est en accord avec la structure en serpentín aléatoire de l'alginate. Dans ce cas et comme l'a expliqué Smidsrod (1970), la force ionique des solutions diluées n'est pas suffisante pour contrer les interactions existantes entre l'eau et l'alginate. Le polysaccharide se présente donc en solution sous une forme étendue.

Influence de la déacétylation

Tout comme dans le cas de HA II natif, les hyaluronates modifiés par déacétylation montrent une variation linéaire de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en polymère (Figure IV.3).

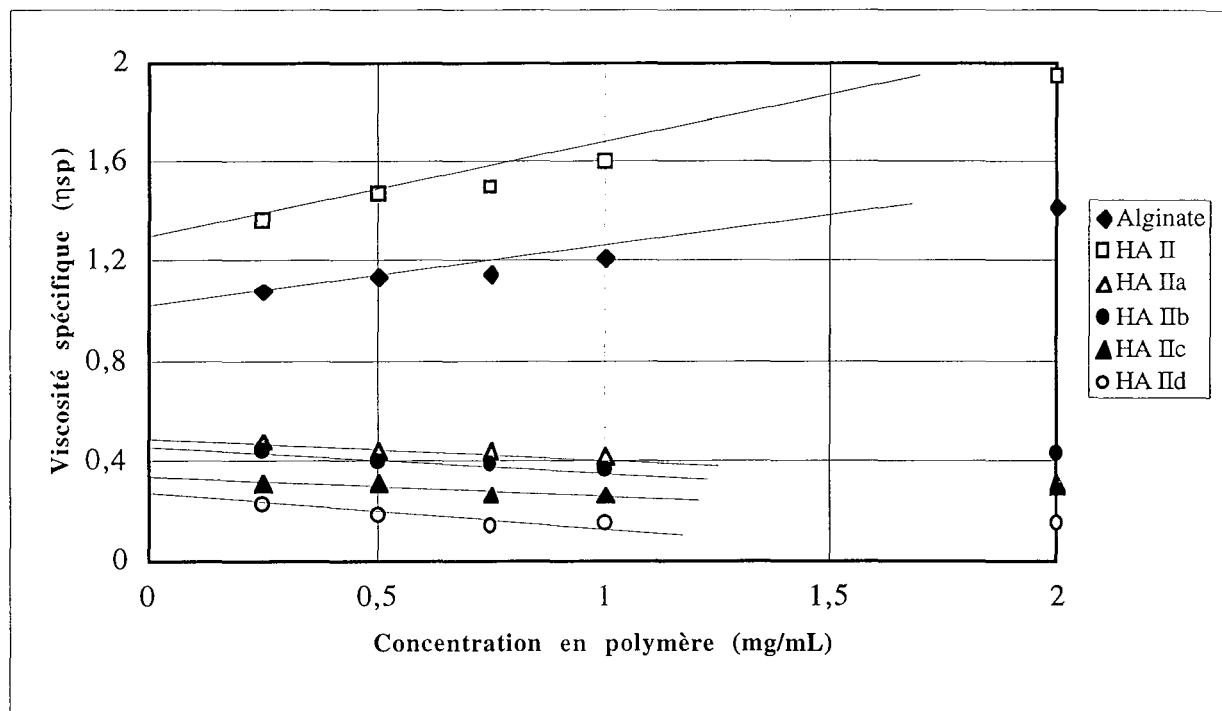


Figure IV.3 : Evolution de la viscosité spécifique (η_{sp}) en fonction de la concentration totale en polysaccharide pour les solutions de hyaluronate modifié par hydrazinolyse à 100 °C durant des temps variables.

Cette linéarité a permis de déterminer la viscosité intrinsèque de chaque solution dans NaCl 3g/L (tableau IV.8).

	HA II	HA II _a	HA II _b	HA II _c	HA II _d
$[\eta]$ (mL/mg)	1,30	0,49	0,44	0,34	0,27
k_H	0,13	-0,30	-0,37	-0,58	-0,91

Tableau IV.8 : Evolution de la viscosité intrinsèque des différentes solutions, dans NaCl 3g/L, de HA II déacétylé sur des temps variables.

La viscosité intrinsèque est de 1,30 mL/mg pour HA natif et sa valeur diminue avec le taux de déacétylation : sa valeur passe de 0,49 mL/mg après 30 minutes de réaction (HA II_a), à 0,27 mL/mg pour le polymère le plus déacétylé (HA II_d). Ces résultats sont en accord avec la diminution de la masse molaire du polysaccharide intervenant au cours de la réaction d'hydrazinolyse. Cette variation décroissante montrée sur la Figure IV.3 s'accompagne de valeurs négatives du coefficient de Huggins pour les polymères HA II_a à HA II_d, qui

proviennent certainement d'une diminution des interactions entre les chaînes modifiées. Il semble que la déacétylation augmente l'affinité des molécules envers l'eau mais accentue également le phénomène d'indépendance d'une molécule modifiée vis-à-vis des molécules voisines.

Ces études de mesures de viscosité intrinsèque ont permis de montrer une évolution des valeurs en fonction du milieu de dissolution mais également en fonction de la nature des polymères considérés. Abordons à présent l'étude du comportement des solutions de mélanges de polysaccharides au moyen de la même technique.

2.2.1.3. Solutions de polysaccharides en mélange

La détermination des propriétés rhéologiques des mélanges polysaccharidiques a été réalisée dans une solution de NaCl à 3 g/L, puisque qu'elle correspond à une concentration suffisante pour contrer l'ensemble des charges des polysaccharides ainsi que nous l'avons montré précédemment.

Solutions de hyaluronate natif et d'alginate

La Figure IV.4 montre l'évolution de la viscosité spécifique des polysaccharides en mélange, HA I-alginate, en fonction de la concentration totale en polymères.

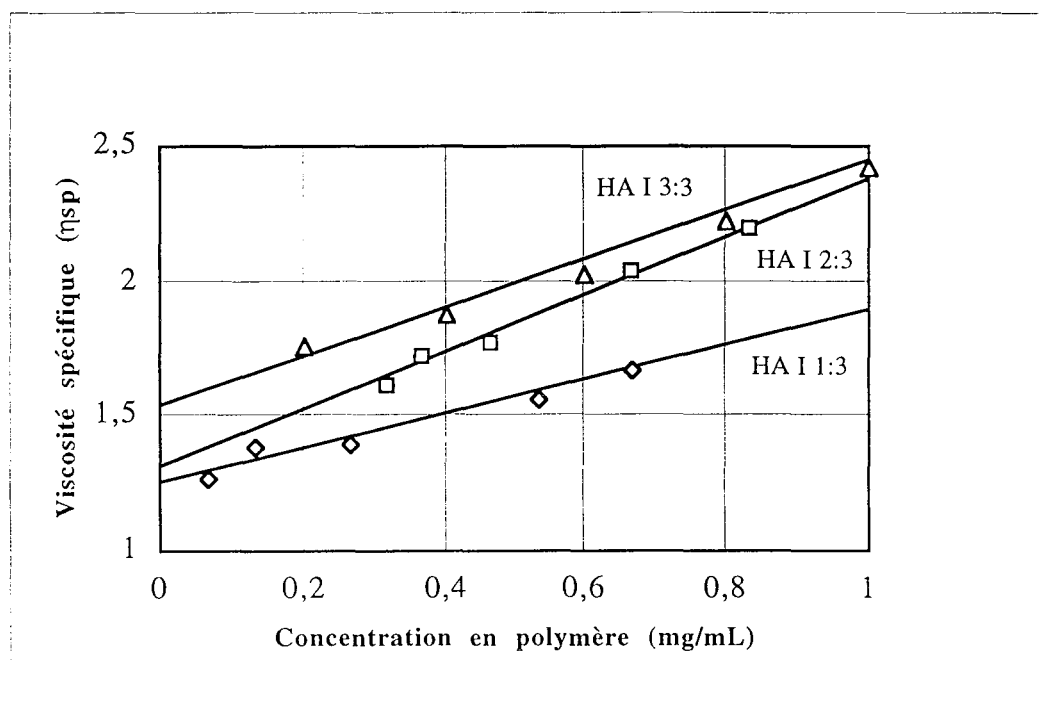


Figure IV.4 : Evolution de la viscosité spécifique (η_{sp}) à 20 °C des solutions mélanges HA I-alginate dans NaCl 3g/L en fonction de la concentration totale en polymères.

La viscosité spécifique des mélanges de polysaccharides varie linéairement en fonction de la concentration totale en polymères. Cette évolution est semblable à celle d'un polymère étudié seul en solution, ce qui permet de déterminer les paramètres classiques c'est-à-dire la viscosité intrinsèque et les coefficients de Huggins (Tableau IV.9).

La viscosité intrinsèque d'un mélange peut être calculée théoriquement ($[\eta]_{theo}$) à partir des viscosités intrinsèques individuelles $[\eta]_i$, selon la relation suivante :

$$[\eta]_{theo} = \frac{\sum_i C_i [\eta]_i}{\sum_i C_i} \quad (\text{éq. 30})$$

où C_i est la concentration d'un polysaccharide constituant du mélange et $[\eta]_i$ sa viscosité intrinsèque. Cette relation suppose que les polymères n'ont pas d'interaction entre eux, la viscosité résultante étant alors la moyenne de leurs viscosités individuelles pondérées par leurs concentrations. Une valeur expérimentale différente de cette valeur théorique traduit donc une interaction entre les deux polysaccharides (Fuongfuchat 1996).

Solutions	$[\eta]$ (mL/mg)	$[\eta]_{theo}$ (mL/mg)	k_H
HA I 1:3	1,25	1,33	0,20
2:3	1,32	1,50	0,16
3:3	1,55	1,61	0,09
HA II 1:3	1,12	1,14	0,23
2:3	1,00	1,19	0,47
3:3	1,18	1,23	0,31

Tableau IV.9: Viscosités intrinsèques expérimentales et théoriques et coefficient de Huggins des mélanges alginate- HA I ou HA II dans NaCl 3g/L déterminés à 20 °C en fonction du rapport de concentration des polysaccharides.

Dans notre cas, les viscosités intrinsèques théoriques sont toujours supérieures aux valeurs expérimentales surtout pour HA I (tableau IV.9) : l'écart entre théorie et pratique est cependant inférieur à 10 % pour l'ensemble des mélanges étudiés (sauf pour HA II 2/3). Cette faible différence montre que les interactions entre les polysaccharides sont faibles, voire peu significatives en milieu dilué.

De plus, les valeurs peu élevées des coefficients de Huggins observés pour l'association HA II-alginate confirment la faible interaction entre les chaînes polysaccharidiques et traduit en revanche la forte affinité des polymères pour l'eau. Il semble pourtant que le mélange HA I-alginate possède des valeurs du coefficient de Huggins plus fortes correspondant à de plus grandes interactions entre polysaccharides. Ce résultat est conforme aux conclusions obtenues par dichroïsme circulaire.

Influence de la déacétylation

Tout comme dans le cas de HA II natif, l'évolution de la viscosité spécifique des mélanges HA modifiés-alginate avec la concentration en polysaccharide est linéaire (Figure IV.5). De ce fait, il est également possible de déterminer le coefficient de Huggins et la viscosité intrinsèque. Les valeurs obtenues sont reportés dans le tableau IV.10.

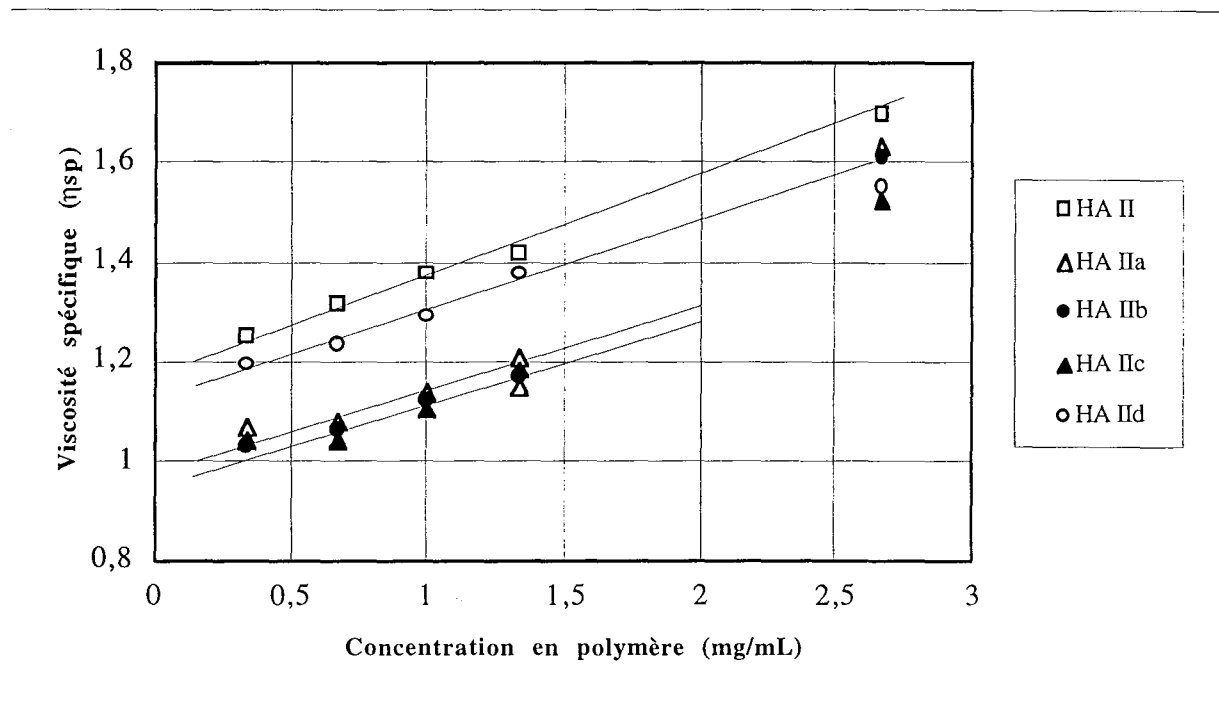


Figure IV.5 : Evolution de la viscosité spécifique (η_{sp}) à 20 °C, des solutions d'alginate et de HA modifiés pendant différentes durées de réaction (HA IIa - HA IId) en mélange dans NaCl 3g/L en fonction de la concentration totale en polymère.

Le mélange avec HA II natif présente une viscosité intrinsèque expérimentale de 1,20 mL/mg, et cette valeur diminue à 0,99 mL/mg pour le mélange contenant HA II_a. Pour un taux de déacétylation du hyaluronate compris entre 16 et 45 % (HA II_b et II_c), la valeur de la viscosité des mélanges varie peu, toutefois elle augmente pour HA II_d qui présente le plus fort taux de fonction amine (80%) (Figure IV.5).

	HA II	HA II _a	HA II _b	HA II _c	HA II _d
$[\eta]_{exp}$ (mL/mg)	1,12	0,99	0,96	0,99	1,14
$[\eta]_{théo}$ (mL/mg)	1,14	0,90	0,89	0,87	0,85
k_H	0,23	0,31	0,32	0,31	0,25

Tableau IV.10 : Evolution du coefficient de Huggins, de la viscosité intrinsèque estimée ($[\eta]_{théo}$) et expérimentale ($[\eta]_{exp}$), à 20 °C des polysaccharides (HA II modifié - alginate 1:3) en mélange dans NaCl 3g/L en fonction du temps de déacétylation du hyaluronate.

Le calcul théorique de la viscosité à partir des constituants du mélange (éq. 30) donne des résultats nettement inférieurs aux valeurs réellement observées. Le volume hydrodynamique du mélange est donc inférieur à la somme des volumes hydrodynamiques de chaque composant (Fuongfuchat et coll. 1996). La différence entre ces deux résultats augmente avec la durée de synthèse, de 10 % pour HA II_a à plus de 30 % pour HA II_d. Ceci suggère l'existence d'interactions entre les polysaccharides, dont l'importance augmente avec le taux de fonctions amines libérées sur le hyaluronate malgré la diminution parallèle de sa masse molaire. On peut raisonnablement en conclure que des liaisons supplémentaires renforcent les interactions entre les polysaccharides, et donc que des interactions ioniques sont établies.

2.2.1.4. Conclusion

Les études réalisées à la fois par dichroïsme circulaire et par mesures rhéologiques ont montré que le comportement en milieu dilué des solutions de polysaccharides dépend de la structure du hyaluronate. La conformation, tout d'abord, joue un rôle important, puisque des interactions, certes faibles, ont été mises en évidence pour HA I et non pour HA II : le taux important de calcium mesuré pour ce dernier peut être à l'origine d'une modification de conformation des deux polysaccharides, ainsi que nous l'avons discuté précédemment. La structure chimique est également un élément prépondérant, puisque la libération de fonctions amines du hyaluronate a permis de renforcer notablement les interactions, probablement par des liaisons ioniques. Il est cependant possible que ces interactions n'aient pas pu être observées lors des mesures en milieu dilué, en raison d'une concentration trop faible en polysaccharide, puisqu'alors leurs interactions avec le milieu sont trop importantes. Cette hypothèse est confortée par la valeur particulièrement faible du coefficient de Huggins mesurée pour chacun d'entre eux en solution individuelle.

2.2.2. Solutions concentrées

Les polysaccharides en solution concentrée sont très visqueux et ne sont plus newtoniens, ceci nous a amenée à appliquer une autre méthodologie, basée sur la mesure du gradient de vitesse obtenu lors de l'application d'une force de contrainte croissante et décroissante. Un rhéomètre cône-plan a ainsi été utilisé en mode écoulement pour les polysaccharides seuls et en mélange à des concentrations de 20 mg/mL.

La solution visqueuse, placée entre le cône et le plan du rhéomètre, est soumise à des forces de cisaillement donnant naissance à un gradient de vitesse. L'évolution du gradient de vitesse en fonction de la contrainte, permet de mettre en évidence un caractère épaississant ou fluidifiant d'un polymère, et aussi son éventuel comportement thixotrope lorsque l'on applique successivement des forces de contraintes croissantes et décroissantes. A partir de ces courbes et en appliquant la loi de Cross (éq. 13) ou d'Ostwald-de-Waele (éq. 14), il est possible de déterminer une valeur de viscosité à un gradient de vitesse donné.

2.2.2.1. Hyaluronate natif et alginate

L'évolution de la viscosité en fonction du gradient de vitesse est représentée dans la Figure IV.6 pour chacun des polymères seuls et dans la Figure IV.7a,b pour les mélanges HA I- et HA II- alginate en proportions 1:3, 2:3 et 3:3.

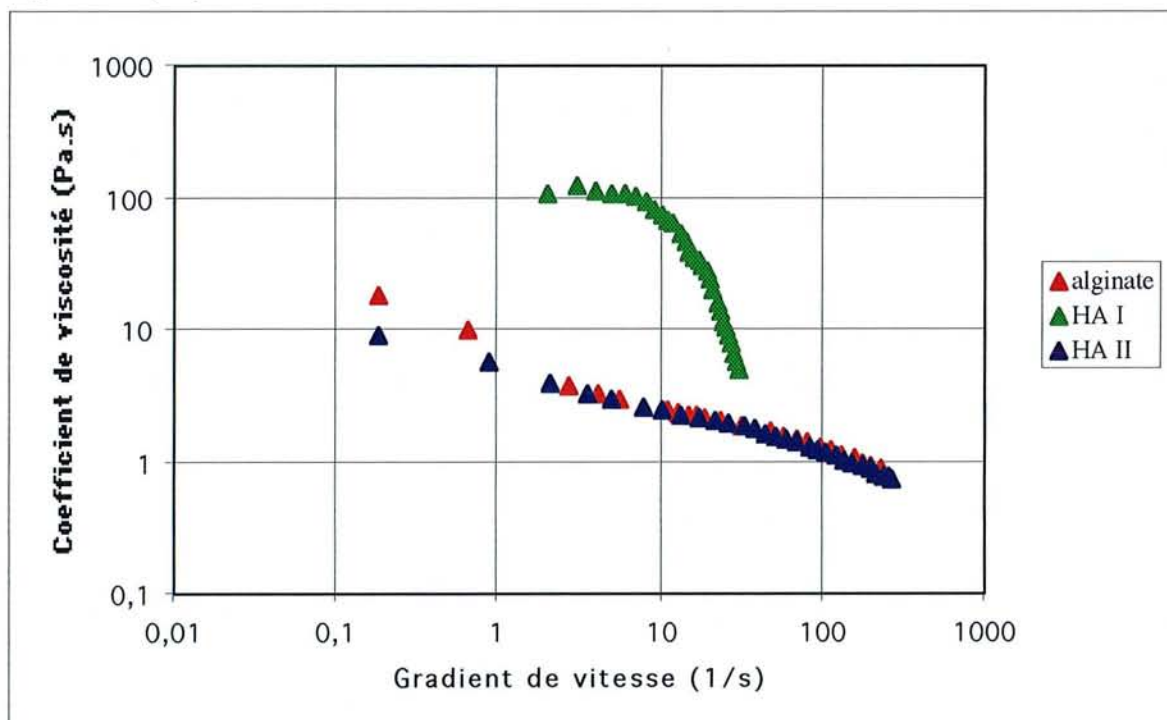


Figure IV.6 : Evolution des coefficients de viscosité, à 20 °C, des solutions de HA I, HA II et d'alginate à une concentration de 20 mg/mL, obtenue par des mesures au rhéomètre cône-plan en fonction du gradient de vitesse.

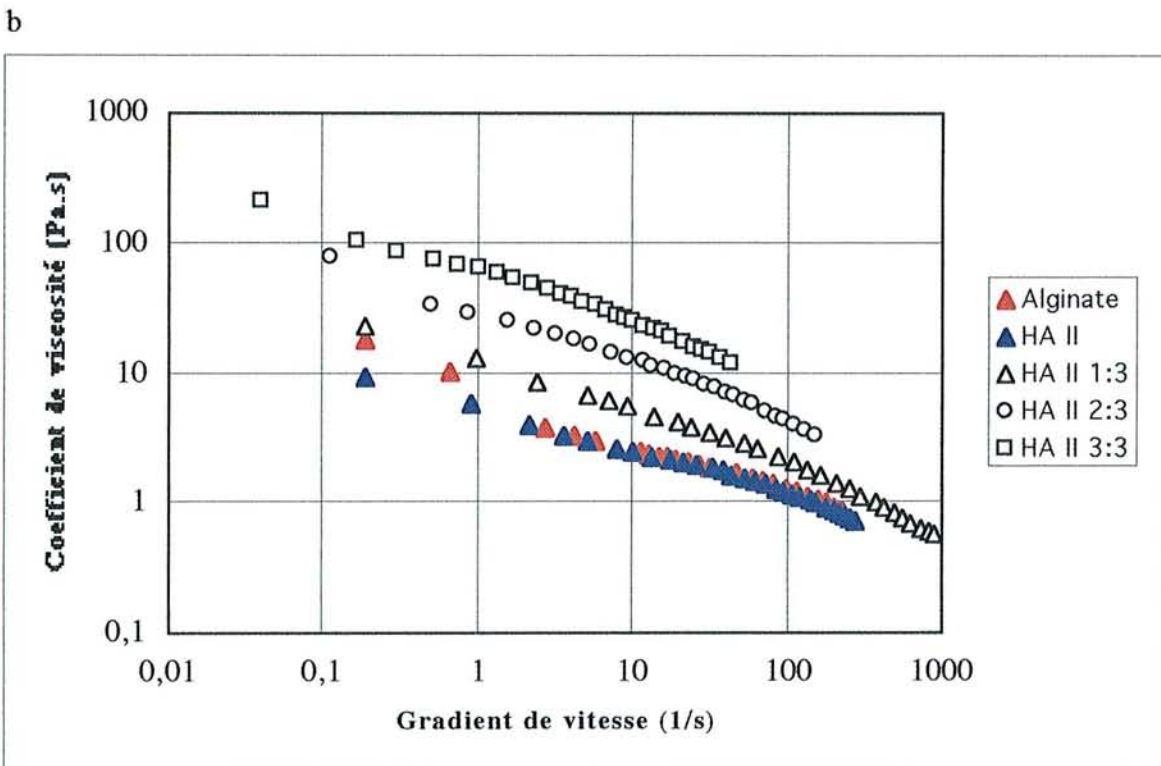
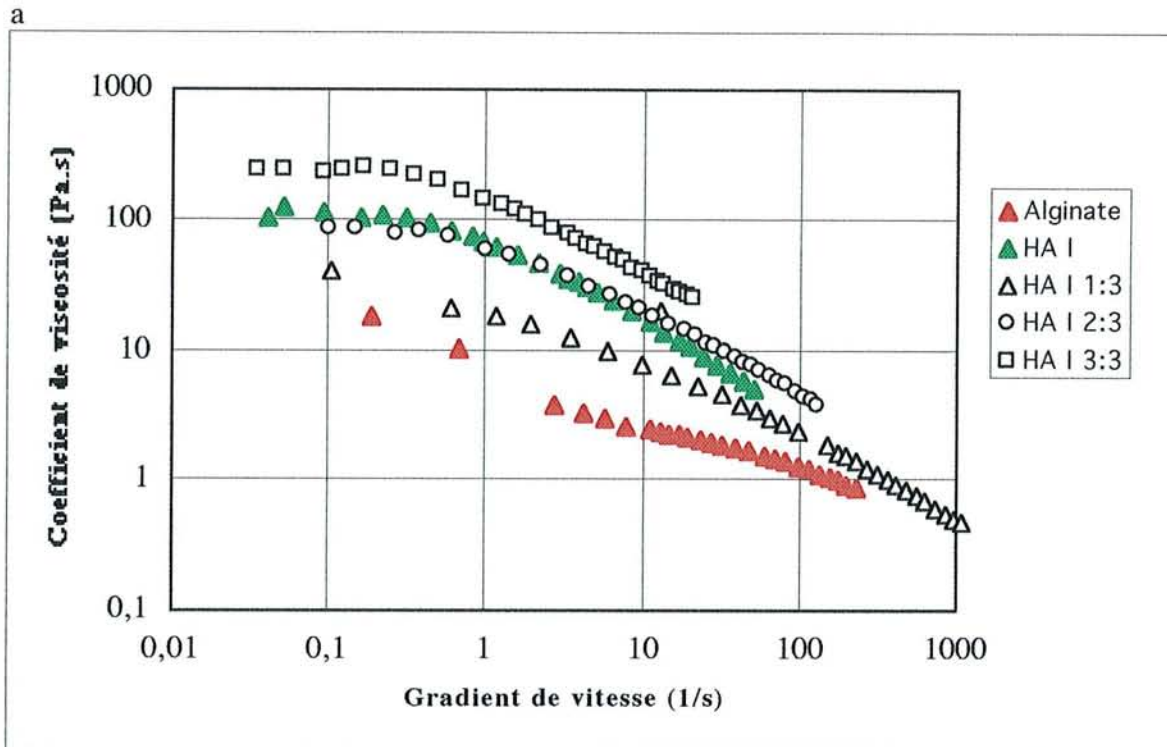


Figure IV.7 : Evolution des coefficients de viscosité des solutions de HA et des mélanges HA -alginate (1:3, 2:3, 3:3) à une concentration de 20 mg/mL, obtenue par des mesures au rhéomètre cône-plan. a : HA I; b : HA II.

Les mesures mettent en évidence le caractère rhéofluidifiant des solutions polysaccharidiques considérées. Le comportement thixotrope a été observé par la présence d'une boucle d'hystérèse

de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement. Cependant, dans l'ensemble des cas et dans le domaine de contraintes étudiées, la surface de cette boucle représente moins de 5 % de la courbe intégrale. La thixotropie est donc négligée et le comportement rhéologique a été modélisé pour les moyennes des valeurs des tracés "direct" et "retour".

La viscosité de la solution de HA I est environ cinq fois plus grande que celles des autres polysaccharides quel que soit le gradient de vitesse. Ce résultat est cohérent avec les résultats observés en solution diluée. Il est en accord avec la variation des masses molaires. La différence de structure polysaccharidique et la nature des contre-ions peuvent également être évoquées, comme il a été montré par l'effet du calcium sur le hyaluronate (Aldrich 1958; Winter 1975, Winter 1977). En effet, des études aux rayons X de films condensés ont montré que la présence de calcium, même en quantité trop faible pour neutraliser le polysaccharide, induit une conformation en triple hélice (Winter 1975) au lieu de la structure compacte en quadruple hélice (Guss 1975). On peut alors supposer qu'à l'état dissous la conformation du hyaluronate est également affectée par la présence de calcium. Cette supposition est confirmée par le comportement rhéologique observé pour les solutions diluées. Ainsi, pour les solutions d'alginate et de HA II, les valeurs faibles du coefficient de Huggins suggèrent une conformation étendue, alors que la valeur élevée de ce coefficient pour HA I correspond à une conformation en pelote.

L'évolution du coefficient de viscosité avec le gradient de vitesse montre une viscosité pour les mélanges HA I-alginate nettement supérieure à celle de l'alginate seul, quel que soit le rapport de concentrations des deux polysaccharides (Figure IV.7a et b).

Pour l'alginate, HA II ainsi que leurs mélanges et le mélange HA I-alginate 1:3, l'ajustement des variations de la viscosité avec le gradient de vitesse est correctement effectué par l'équation simplifiée d'Ostwald (Tableau IV.11).

Dans le cas de HA I 1/3, le modèle d'Ostwald est mieux adapté car dans le domaine de gradients de vitesses considéré (0,1 à 1000 s^{-1}), la viscosité diminue de façon continue avec le gradient (voir Figure IV.7a). Ceci traduit le fait que la présence de HA I en faible quantité ne modifie que peu le comportement rhéologique de l'alginate. L'ajustement des courbes relatives aux autres solutions est réalisé à l'aide du modèle de Cross (eq. 13) qui met en évidence la présence d'un plateau de viscosité pour des gradients de vitesse inférieurs à 1 s^{-1} . Le modèle de Cross permet d'obtenir une meilleure représentation pour HA I 2/3 et 3/3 où la quantité de HA semble donc déterminer les propriétés rhéologiques. Dans le cas de HA I 3/3, la viscosité de la solution est supérieure à celle des solutions individuelles. Cependant cette différence est modérée et semble surtout liée à la variation de concentration en polymère.

Solutions	Loi de Cross				Loi d'Ostwald	
	K (s)	Exposant n	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	K_2 (Pa.s ²⁻ⁿ)	Exposant n
HA I (seul)	0,786	0,947	121,4	1,81	/	/
HA I 1:3	/	/	/	/	19,87	0,527
HA I 2:3	0,574	0,814	97,3	1,33	/	/
HA I 3:3	0,835	1,088	259,2	15,75	/	/
Alg (seul)	/	/	/	/	5,93	0,658
HA II (seul)	/	/	/	/	4,99	0,687
HA II 1:3	/	/	/	/	13,52	0,575
HA II 2:3	/	/	/	/	27,39	0,615
HA II 3:3	/	/	/	/	55,28	0,628

Tableau IV.11: Modélisation des courbes représentant l'évolution du coefficient de viscosité en fonction du gradient de vitesse (rhéomètre cône-plan à 20 °C en mode écoulement) : valeurs des paramètres du modèle de Cross ou d'Ostwald le mieux adapté pour l'alginate, HA I, HA II et leurs mélanges en proportions 1:3; 2:3 et 3:3.

Les solutions concentrées d'alginate et de HA II montrent des propriétés rhéologiques voisines. Pourtant, la viscosité des solutions de mélange est supérieure à celle des solutions de deux polymères pris individuellement. L'effet épaississant des solutions de mélange augmente également lorsque la fraction massique en hyaluronate varie de 0,25 à 0,50.

Dans le cas des mélanges HA II-alginate, nous avons constaté que la constante K_2 varie avec la concentration totale en polymère dans le milieu selon la relation :

$$K_2 = 2,9.10^{-3} C^{3,3}$$

Cette relation montre clairement que la valeur de la viscosité augmente beaucoup plus vite que la concentration totale en polymère, phénomène observé pour de nombreuses macromolécules (Stickler 1989). Il faut, toutefois, tenir compte de la présence initiale des ions calcium introduit par HA II qui peuvent entraîner la complexation partielle des groupements carboxyliques des chaînes d'alginate ainsi que nous l'avons décrit précédemment (chapitre I § 3.1)

2.2.2.2. Influence de la déacétylation du hyaluronate

Les mesures d'écoulement n'ont pas été réalisées pour les solutions de hyaluronate déacétylé, car ces solutions présentaient un caractère trop fluide pour être analysées par cette méthode et la géométrie du cône de mesures n'était dans ce cas pas adaptée.

Les mesures d'écoulement ont été effectuées pour les mélanges HA II déacétylé-alginate pour les différents taux de déacétylation.

Comme précédemment pour le hyaluronate natif, ces courbes ont été tracées pour des vitesses de cisaillement croissantes, puis décroissantes, de façon à évaluer l'importance de la thixotropie (Figure IV.8). Une différence inférieure à 5% a été observée entre les tracés de montée et de descente, montrant que la déacétylation ne confère pas de caractère thixotrope très sensible aux mélanges de polysaccharides.

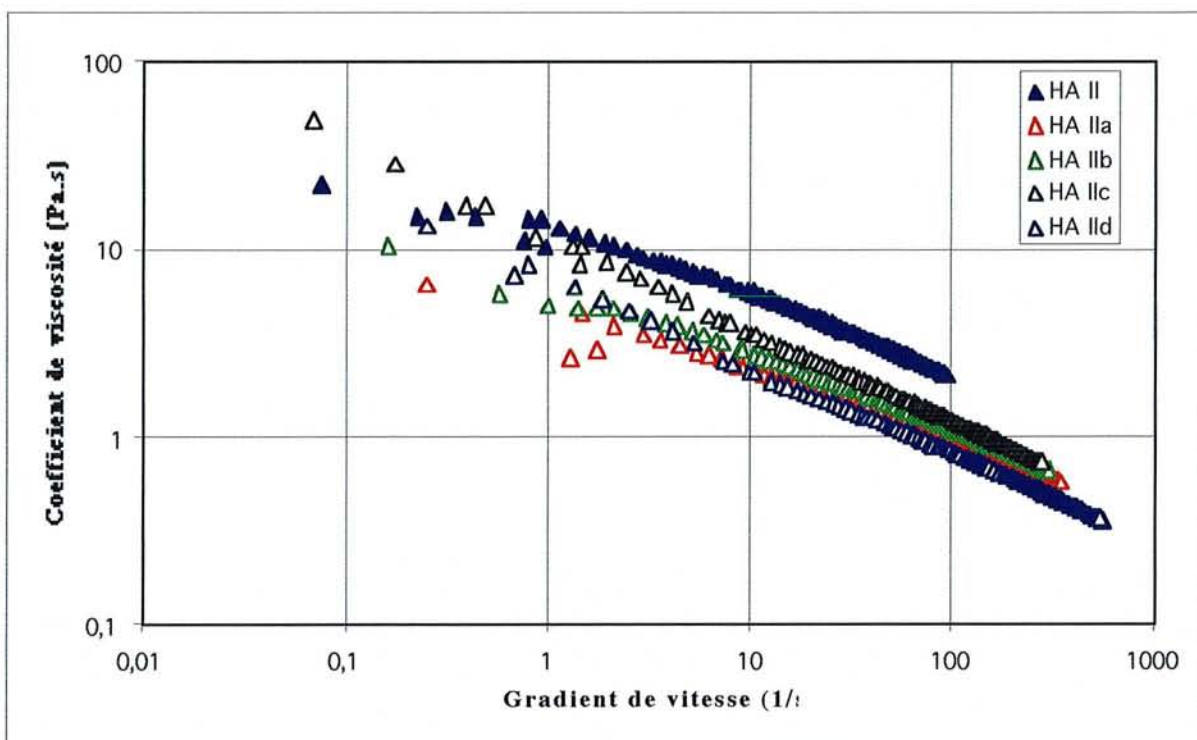


Figure IV.8 : Evolution des coefficients de viscosité des solutions de HA II natif et déacétylé à une concentration de 20 mg/mL, obtenue par des mesures au rhéomètre cône-plan en fonction du gradient de vitesse.

Les rhéogrammes obtenus sont typiques d'une solution rhéofluidifiante et pour ces polysaccharides modifiés, la loi d'Ostwald reflète correctement leur comportement. Pour une contrainte donnée, la vitesse de cisaillement observée pour les mélanges est augmentée après déacétylation, ce qui se traduit par un coefficient de viscosité (Tableau IV.12) plus important pour le mélange initial ($14,90 \text{ N.m}^{-2} \cdot \text{s}^{2-n}$) que pour les mélanges après déacétylation. Cependant, la viscosité augmente avec le taux de déacétylation : le coefficient de viscosité passe de $5,96 \text{ N.m}^{-2} \cdot \text{s}^{2-n}$ pour une hydrazinolyse de 30 mn (HA II_a) à $10,23 \text{ N.m}^{-2} \cdot \text{s}^{2-n}$ pour 4 heures (HA II_d). Ceci correspond probablement à l'intensification des interactions entre les groupements carboxyliques de l'alginate et les groupements amines du hyaluronate dont le taux augmente avec le temps de réaction. Ces résultats pourraient donc également confirmer la

création de liaisons ioniques entre les groupements amines libérés sur les chaînes de hyaluronate et les groupements carboxyliques de l'alginate.

	HA II	HA II _a	HA II _b	HA II _c	HA II _d
K_2 (Pa.s ²⁻ⁿ)	13,52	5,96	7,50	10,21	10,23
Exposant (n)	0,58	0,61	0,58	0,53	0,55

Tableau IV.12: Coefficients de viscosité et indices de gradient des mélanges hyaluronate modifié-alginate dans NaCl 3 g/L, à 25°C, déduits de l'ajustement des courbes d'écoulement

2.2.2.3. Conclusion

Les mesures rhéologiques en écoulement de solutions concentrées ont montré le caractère rhéofluidifiant des polysaccharides en solution qu'ils soient seuls ou en mélange.

Ces mesures ont également permis de montrer un comportement différent des deux hyaluronates à l'état natif. En effet HA I possède une viscosité plus importante que HA II et nécessite par ailleurs une modélisation plus complexe que celle de HA II. La déacétylation du hyaluronate entraîne une diminution de la viscosité avec la libération des groupements amines ; ce résultat est probablement dû à la dépolymérisation des chaînes de hyaluronate lors de l'hydrazinolyse, phénomène comparable à celui observé en milieu dilué.

Le mélange de deux polysaccharides entraîne une augmentation de la viscosité des solutions. Les associations de HA II-alginate ont une valeur de viscosité qui augmente avec les rapports de concentrations plus rapidement que la concentration en polymère totale, ce qui pourraient être dû à la présence indésirable de calcium dans cette sorte d'hyaluronate.

3. Etude de la formation des gels

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit le comportement des polysaccharides en solution plus ou moins concentré. Ces études ont permis de caractériser leurs propriétés physico-chimiques en milieu liquide et de mettre en évidence des interactions, certes faibles, entre les polysaccharides. Nous nous intéressons dans ce chapitre à la formation des gels d'une part sous forme de billes pour l'analyse structurale et l'étude du mécanisme de gélification, et d'autre part sous forme de plaques pour l'étude des caractéristiques physico-chimiques (compliance et dureté).

3.1. Observation structurale

L'opération de gélification a permis de former des matrices de consistance variable selon la composition en polysaccharides. Dans tous les cas, cependant, l'opération de poinçonnage a révélé, macroscopiquement, une structure hétérogène des plaques de gels. Le matériau est constitué d'une couche externe de dureté appréciable et d'une partie interne de consistance plus molle. Cette structure particulière proviendrait de la diffusion du cation divalent à l'intérieur de la solution d'alginate de sodium formant alors un gel hétérogène (Skjak-Braek 1989, Draget 1997).

Des gels, sous forme de billes, ont été observés en microscopie électronique à transmission (MET) après déshydratation progressive dans différents bains d'acétone de teneur décroissante en eau, en présence de colorant afin d'augmenter les contrastes lors de l'analyse microscopique. Les images ont montré l'existence d'un réseau entremêlé de chaînes polysaccharidiques ainsi que la présence de pores (Figure IV.9).

Pour le gel d'alginate pur, le réseau est dense et le diamètre des pores est d'environ 0,1 à 0,2 μm (Figure IV.9a) ; quelques cavités rondes de diamètre supérieur (1 μm) peuvent être observées. Klein et Vorlop (1982) ont déterminé des tailles de pores de microbilles d'alginate (diamètre < 120 μm). Cette structure dense a été également observée par van Susante et coll (1995) au MET pour des chondrocytes en culture dans des billes d'alginate et de collagène.

L'ajout de HA I en proportion 1:3 permet d'obtenir un réseau moins dense et plus lâche pour le gel de polysaccharides (Figure IV.9b). Le diamètre des pores formés est voisin de 0,5 μm . Par opposition, lorsque HA II (1:3) est mélangé à de l'alginate (Figure IV. 9c), le gel obtenu forme un réseau régulier et les pores ont un diamètre d'environ 0,3-0,4 μm , valeur intermédiaire entre celui du mélange HA I 1:3 et celui du gel d'alginate. Lorsque la concentration en HA I augmente (rapport 2:3), le réseau est encore un peu plus lâche (Figure IV.9d).

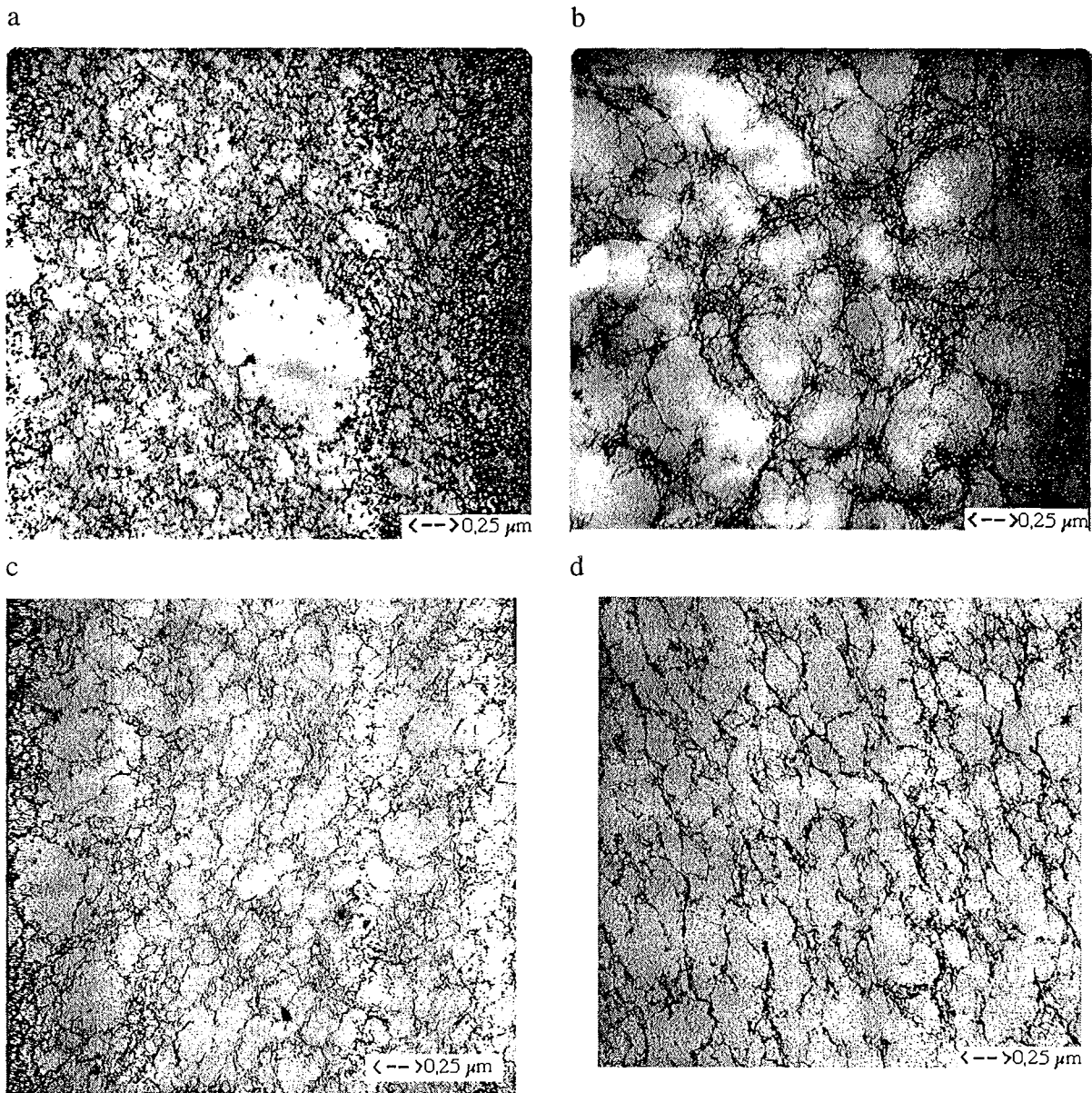


Figure IV.9 : Coupes de matrices gélifiées fixées dans une résine et observées au MET. a) alginate seul, b) mélange HA I-alginate 1:3, c) mélange HA II-alginate 1:3 et d) mélange HA I-alginate 2:3.

Il semblerait donc que l'introduction d'un autre polysaccharide tende à augmenter la taille des pores mais surtout à rendre le réseau polysaccharidique plus lâche. Il semblerait également que, le poids moléculaire du hyaluronate a une influence non négligeable sur la nature du réseau. En effet, pour les deux espèces de hyaluronate étudiées et à proportions identiques, on constate que plus le poids moléculaire du hyaluronate est grand, plus la trame du gel devient lâche. Ceci reste à confirmer par l'étude rhéologique des gels décrite dans le paragraphe suivant.

3.2. Propriétés rhéologiques des gels

Les propriétés rhéologiques ont été évaluées à l'aide d'un rhéomètre à plans parallèles striés, par l'application d'une contrainte constante, fixée à 50 N.m^{-2} , sur les gels en forme de disque de 10 mm de diamètre. La plaque inférieure est chauffée à 40°C , pour se rapprocher des conditions de température physiologique.

3.2.1. Déformation et modélisation des gels

La réponse en déformation obtenue pour un gel d'alginate formé pendant 24, 48 et 72 heures dans une solution de chlorure de calcium 100 mM est présentée dans la Figure IV.10. Lorsque la contrainte est appliquée sur le gel d'alginate, une déformation instantanée apparaît et, si la contrainte continue à être appliquée pendant une minute, la déformation du gel croît exponentiellement. A l'arrêt de la contrainte, la valeur de la déformation chute instantanément avant de continuer à décroître plus progressivement. Cette allure de courbe de déformation a été observée pour l'ensemble des gels étudiés.

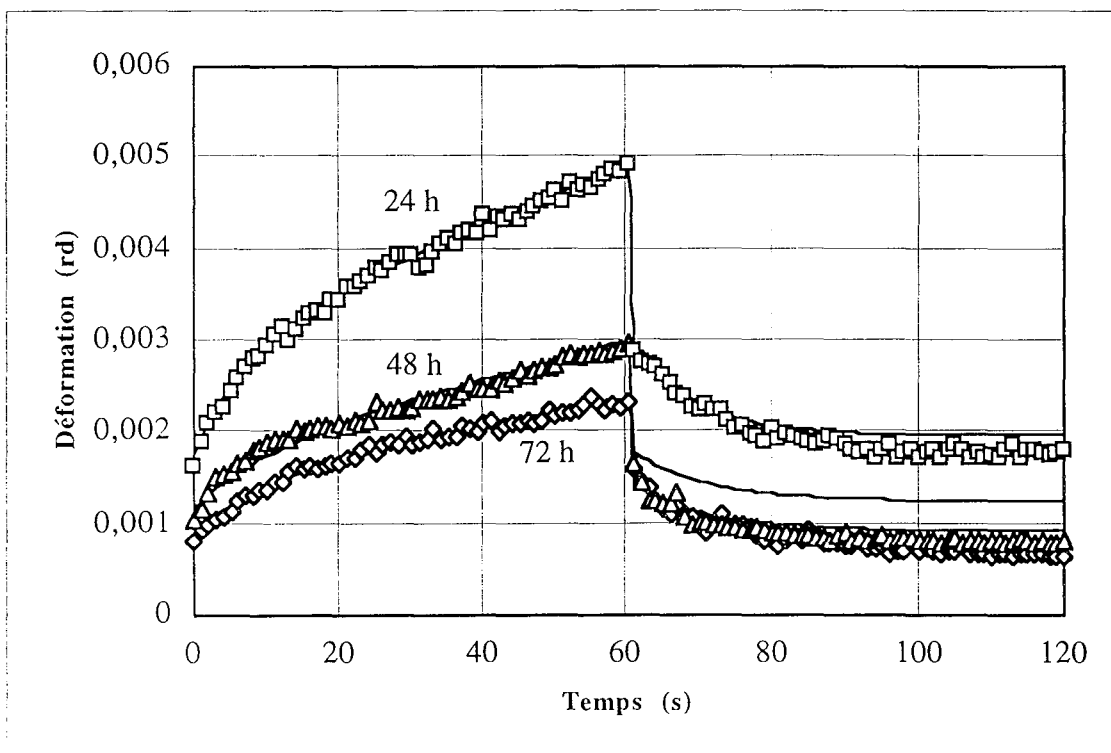


Figure IV.10 : Déformation et modélisation d'un gel d'alginate formé 24, 48 et 72 heures dans un milieu CaCl_2 100 mM pour une contrainte constante de 50 N.m^{-2} appliquée pendant 1 minute.

La réponse classique d'un gel soumis à un régime de fluage est modélisée par le modèle généralisé de Kelvin et Voigt (éq. 17a et b, voir III § 5.2.5.2.2). Dans le cas de la plaque de gel d'alginate, le modèle rend parfaitement compte des données expérimentales durant la période d'application de la force de contrainte (éq. 17a) (Figure IV.10). Pendant la période de la relaxation (éq. 17b), la déformation résultante est généralement inférieure à celle prédite, ce qui limite la validité du modèle considéré pour cette phase.

Le modèle permet, cependant, de caractériser les gels selon trois paramètres. Le premier correspond à la complaisance instantanée (J_0) qui est directement reliée à la déformation obtenue par une unité de contrainte. De cette notion de complaisance, on peut déduire un coefficient de dureté (G) du gel qui est inversement proportionnel à la complaisance. A l'aide de l'éq. 17 et des données expérimentales, il est enfin possible de déduire un coefficient de viscosité (η_0) du gel. Il s'est avéré difficile de corréler les variations de deux paramètres η_1 et J_1 aux conditions opératoires : les valeurs de ces paramètres ne varient pas de manière significative.

3.2.2. Complaisance des gels

Les valeurs de la complaisance sont déduites de l'éq. 17a et des valeurs de la pente de la droite asymptotique tracée pour la première partie de la courbe.

Après 24 heures de formation dans le milieu calcique, l'ensemble des gels présente des valeurs de complaisance proches les unes des autres (environ $4.10^{-5} \text{ m}^2.\text{N}^{-1}$) (Figure IV.11a). Lorsque la durée de formation dans CaCl_2 augmente, la complaisance des gels hybrides de HA II-alginate 3:3 augmente rapidement alors que sa valeur reste stable pour les autres gels, et décroît même dans le cas de l'alginate seul. Cette diminution régulière avec le temps de gélation de la complaisance instantanée pour l'alginate traduit une structure de plus en plus rigide pour le gel d'alginate en fonction du temps de gélation. Au bout de six jours de formation, la complaisance instantanée a varié de $3,5.10^{-5}$ à $0,7.10^{-5} \text{ m}^2.\text{N}^{-1}$.

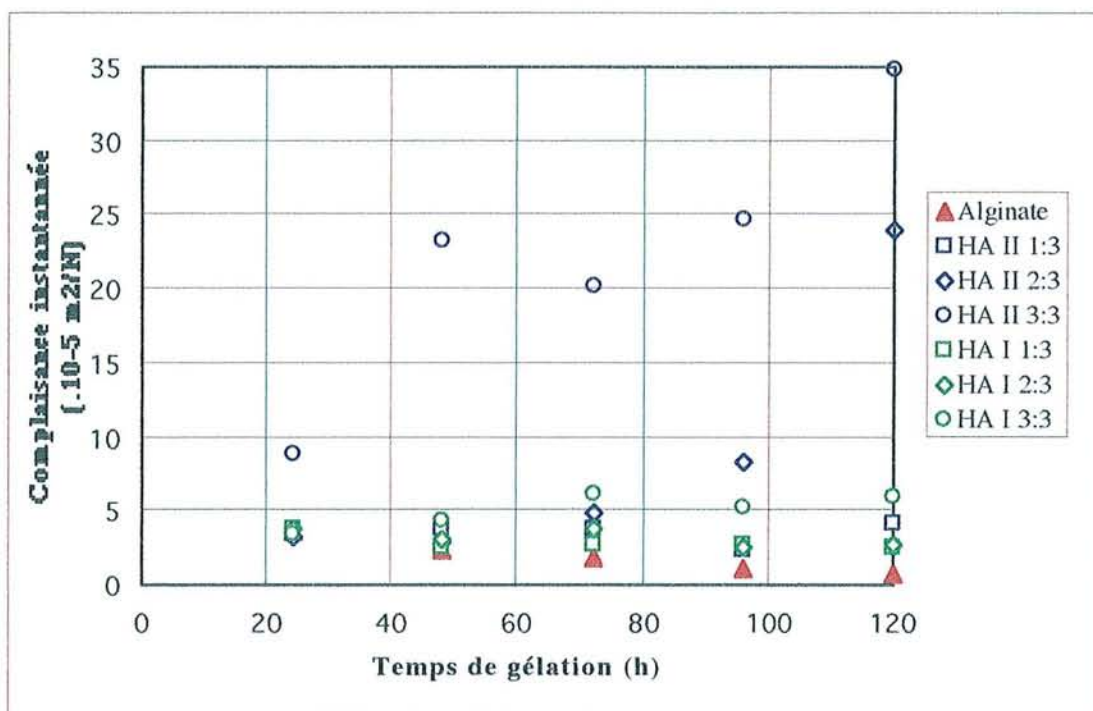
Le mélange HA II-alginate 3:3 présente une valeur de complaisance instantanée plus importante que tous les autres gels étudiés, quelle que soit la durée de gélation. Ceci implique qu'il est certainement un gel nettement plus mou que les autres mélanges gélifiés.

Ces variations de comportement montrent que certains gels réalisés à partir des polymères natifs sont fragiles et sont facilement déformés par l'application d'une force de contrainte modérée (50 N.m^{-2}).

Après déacétylation du hyaluronate, la complaisance instantanée des gels hybrides diminue avec la durée de formation (Figure IV.11b). Il semble que la présence de groupements amines sur le hyaluronate contribue à diminuer la déformation par unité de contrainte, sauf dans le cas du hyaluronate déacétylé au maximum (HA II_d). La formation d'une liaison ionique entre les deux polysaccharides limiterait donc la déformation des gels formés en milieu calcique, le

comportement différent de HA II_d à cet égard pouvant s'expliquer par sa très forte dépolymérisation.

a



b

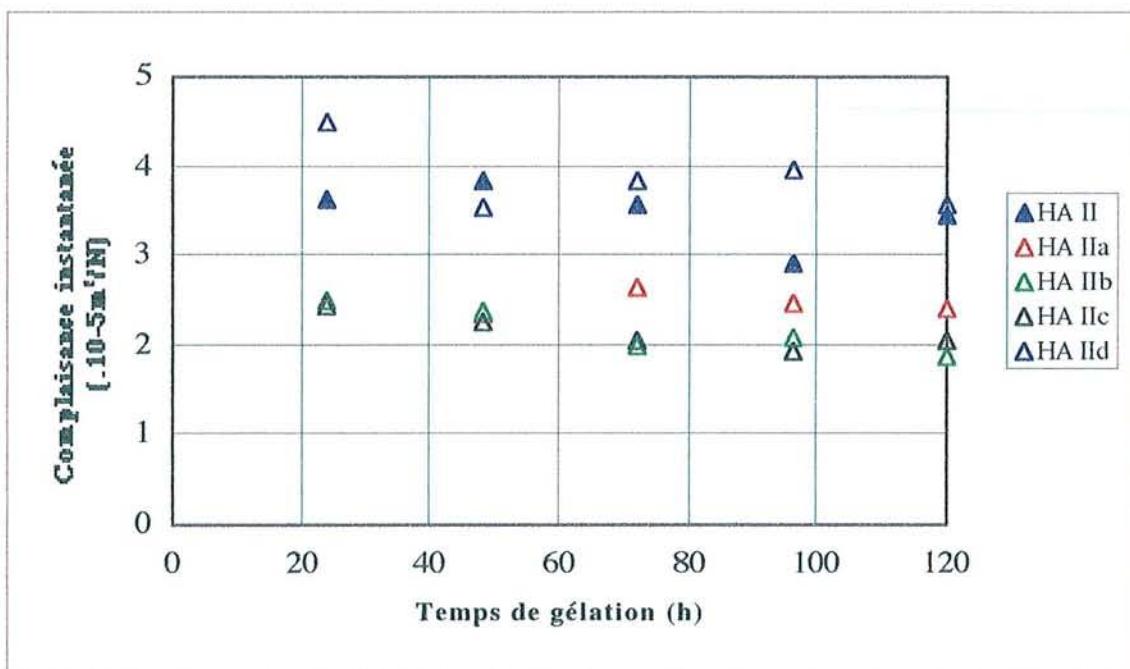


Figure IV.11 : Evolution de la complaisance instantanée des différents gels considérés avec le temps de gélation dans le milieu CaCl_2 100 mM. a) alginate, HA I- ou HA II-alginate en proportions 1:3, 2:3 et 3:3; b) HA II ou HA II déacétylé-alginate

3.2.3. Coefficient de rigidité des gels

La dureté à l'état stationnaire, G , du matériau est définie par l'inverse de la complaisance (éq. 16). La Figure IV.12 montre l'évolution du coefficient de dureté pour des mélanges d'alginate et de hyaluronates natifs. Dans le cas de l'alginate et comme on pouvait s'y attendre, la forte affinité de l'ion calcium pour l'alginate, confère au gel une dureté appréciable : sa valeur atteint ainsi 6.10^4 N.m^{-2} après 96 heures. L'introduction du hyaluronate diminue cette dureté, même si, dans le cas de HA I-alginate 1:3, elle croît légèrement pour les temps de formation supérieurs à 48 heures. Pour des gels formés avec HA I en plus grande quantité ou avec HA II, la dureté reste relativement constante durant la formation dans CaCl_2 sur plusieurs jours. On constate néanmoins que les mélanges contenant HA II en proportion 2:3 et 3:3 sont des gels très mous. Ce qui est tout à fait compatible avec la forte déformation de ces gels, appréciée par la mesure de leur complaisance instantanée.

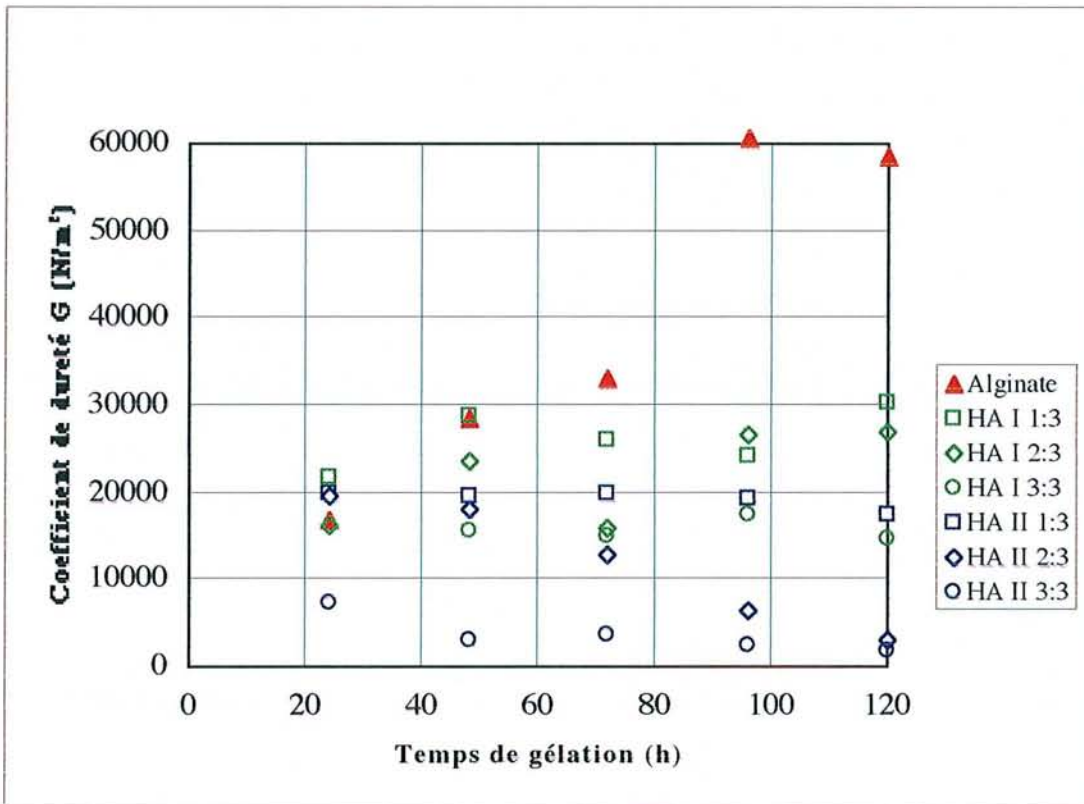


Figure IV.12 : Evolution du coefficient de dureté des gels de mélange HA I- et HA II-alginate avec le temps de gélation dans CaCl_2 100 mM.

Dans le cas de gels préparés avec le hyaluronate déacétylé, le coefficient de dureté augmente régulièrement avec le temps de gélation et des gels stables sont formés après 3 ou 4 jours (Figure IV.13). A partir de 24 heures de formation dans CaCl_2 , on note une différence des valeurs du coefficient de dureté. Seul HA II_b permet d'obtenir une valeur supérieure de G par

rapport au mélange de l'alginate avec le hyaluronate natif. A partir de 72 heures de formation dans le milieu calcique, le hyaluronate déacétylé en mélange avec l'alginate permet d'obtenir des valeurs de coefficient de dureté supérieures à celle du mélange de polysaccharides natifs, sauf dans le cas de HA II_d.

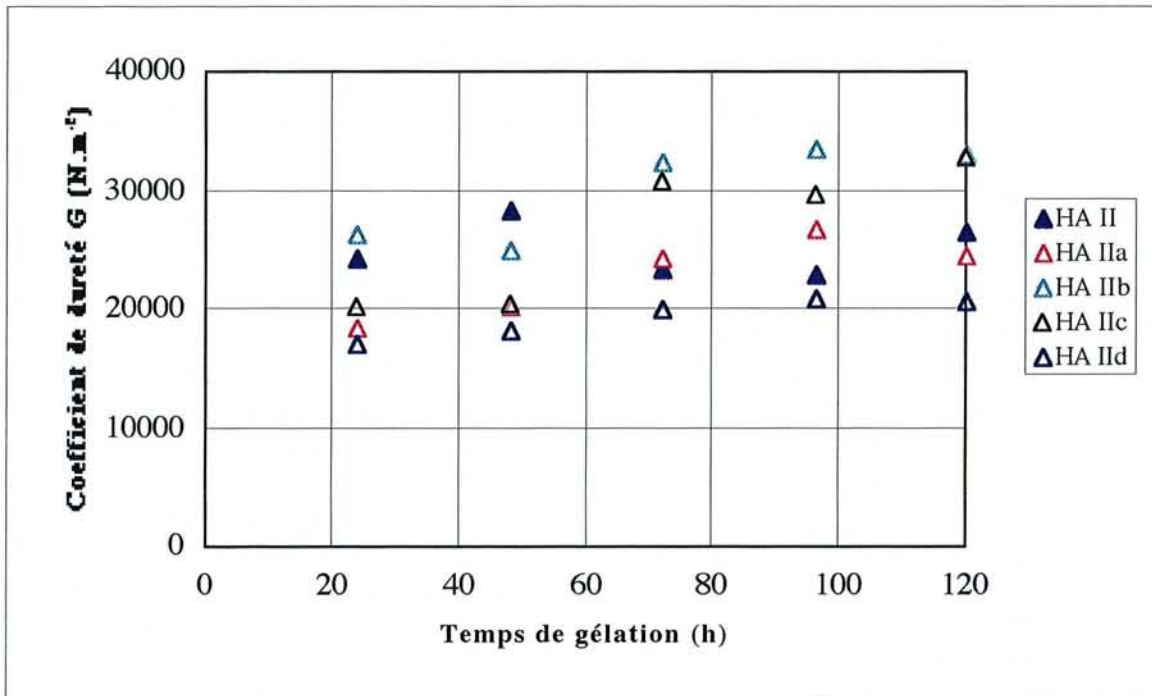


Figure IV.13 : Evolution du coefficient de dureté des gels de mélange HA II déacétylés-alginate en proportion 1:3 avec le temps de gélation dans CaCl_2 100 mM

3.2.4. Coefficients de viscosité des gels

Les coefficients de viscosité en fonction du temps de formation montrent une évolution croissante pour l'alginate (Figure IV.14a). En revanche, dans le cas de gels de mélange, il semblerait qu'un palier soit atteint après 72 heures de formation dans le milieu CaCl_2 et qu'au delà le coefficient de viscosité ne soit plus modifié par le temps de formation dans la solution calcique.

La Figure IV.14b montre l'évolution du coefficient de viscosité des mélanges d'alginate et de hyaluronate modifié en fonction du temps de formation dans CaCl_2 . Le coefficient de viscosité caractéristique des gels, varie comme la dureté. Ainsi, les gels préparés avec du hyaluronate déacétylé présentent des coefficients de viscosité supérieurs au mélange de polymères natifs, sauf comme précédemment dans le cas de HA II_d.

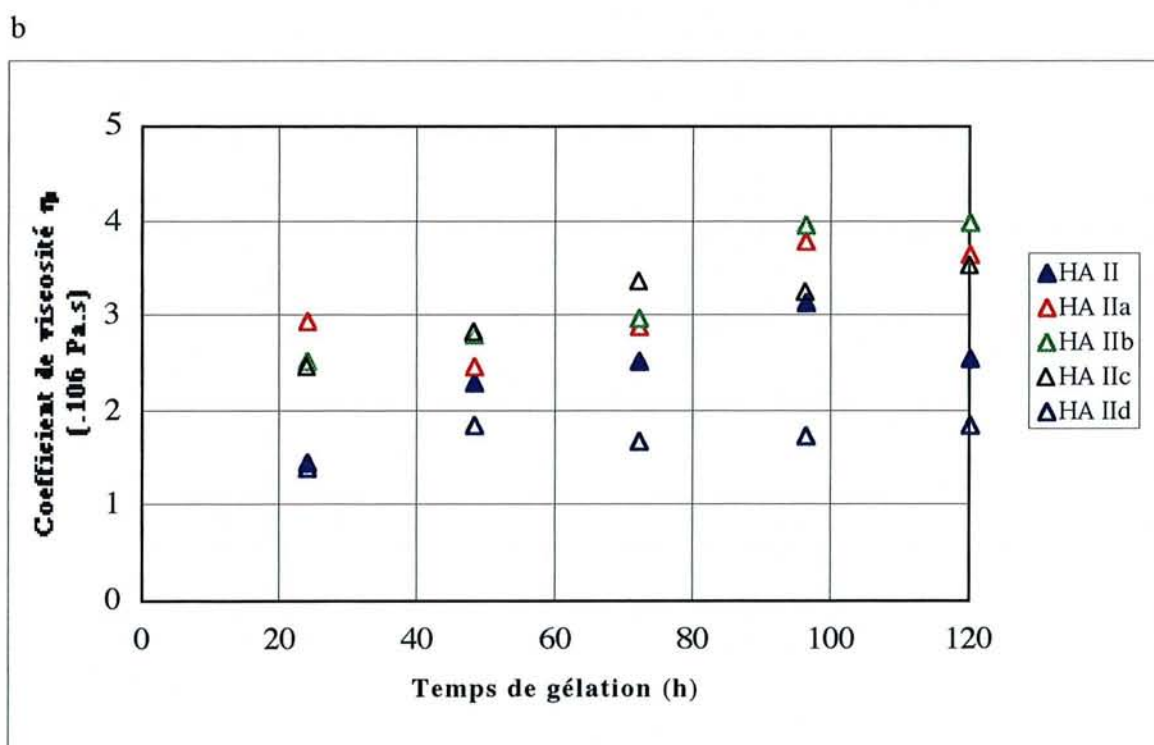
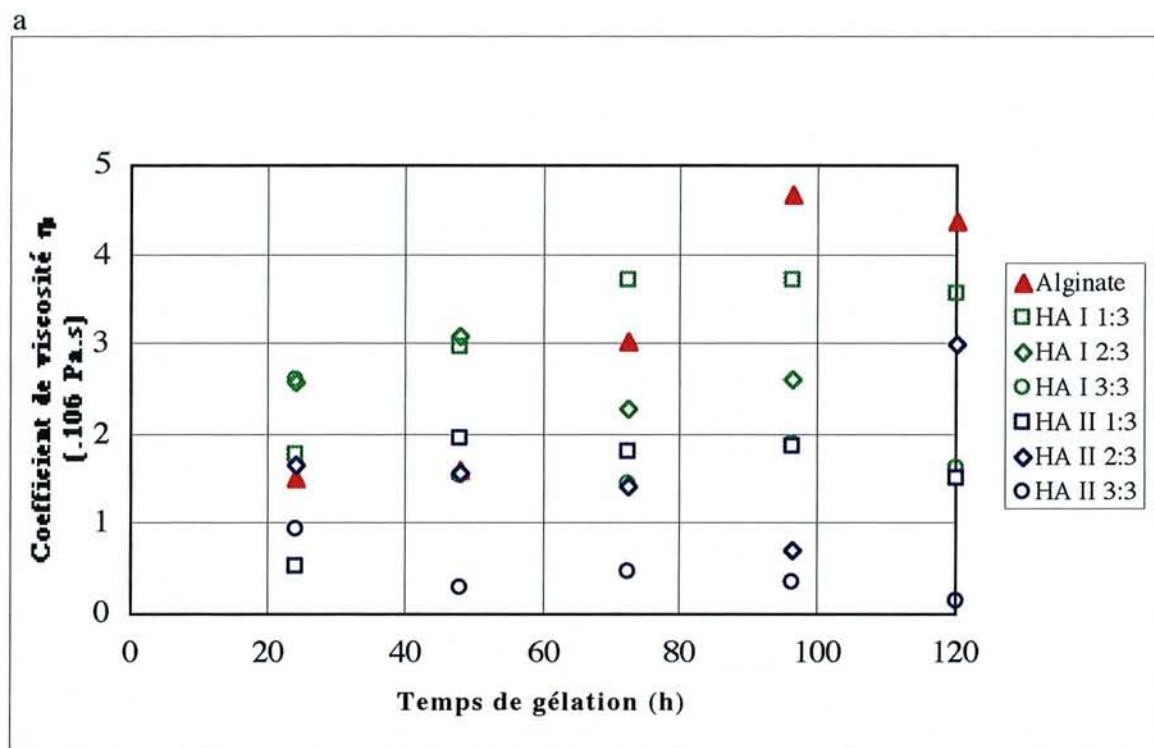


Figure IV.14 : Evolution du coefficient de viscosité des différents gels considérés avec le temps de gélification dans le milieu CaCl_2 100 mM. a) alginate, HA I- et HA II-alginate en proportions 1:3, 2:3 et 3:3; b) HA II et HA II déacétylé-alginate.

3.2.5. Conclusion

Il s'avère donc que les trois caractéristiques étudiées, complaisance instantanée, coefficient de dureté et coefficient de viscosité, mesurées sur des gels d'alginate, ou des gels hybrides HA I-, HA II- et HA II déacétylés-alginate, dépendent fortement du temps de gélification et de la présence éventuelle de groupements amines.

La présence de hyaluronate résulte en une structure plus molle du gel d'alginate, probablement due à une structure plus lâche du réseau du gel en présence du hyaluronate, ainsi que nous l'avons observé en microscopie électronique à transmission. Tandis que les gels préparés avec HA I montrent des propriétés mécaniques relativement comparables à celles de l'alginate seul, celles des gels formés avec HA II semblent moins intéressantes, surtout lorsque la teneur en HA II est forte. Cette différence de comportement entre HA I et HA II est probablement liée à la différence de masse molaire ($1,5 \cdot 10^6$ et $4,5 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ pour HA I et HA II respectivement) mais peut-être également à la modification de la conformation par la présence de calcium dans HA II.

Contrairement au HA natif, les hyaluronates déacétylés possèdent la capacité de participer à la formation du gel avec l'alginate par le biais d'interactions COOH-NH₂. Pour une durée de réaction avec l'hydrazine allant jusqu'à deux heures, la viscosité et la dureté augmentent en fonction du temps de réaction. Les résultats expérimentaux suggèrent que les groupements carboxyliques de l'alginate sont en partie "liés" aux groupements amines. La complexation avec les ions calcium, qui assure la rigidification des chaînes d'alginate, est inhibée de manière significative et le tout résulte en un matériau de dureté et de viscosité diminuée. Il semble donc qu'un taux élevé de groupements amines libérés peut concurrencer la formation du gel par complexation avec les groupements carboxyliques des molécules d'alginate.

3.3. Composition des gels

Lors de la diffusion du calcium dans la solution contenant de l'alginate, le gel se forme en expulsant de l'eau, voire même de l'acide hyaluronique dans le cas de solutions de mélange. Pour tenter d'éclaircir les différents phénomènes de diffusion se produisant durant cette formation, nous avons mesuré la concentration en hyaluronate apparaissant dans la solution de gélification. La concentration en calcium et la quantité d'eau ont été déterminées directement dans les gels. Pour l'ensemble de cette étude, les mesures ont été réalisées sur des gels en forme de bille afin de modéliser les phénomènes de diffusion à partir d'un modèle de conduction transitoire de la chaleur d'une surface isotherme d'une sphère (Carslaw 1959). Les gels de HA II 2:3 et 3:3 ne présentaient pas une structure suffisamment cohérente et n'ont donc pas été retenus pour cette étude. En raison du manque de procédure d'analyse du hyaluronate déacétylé que nous n'avons pu mettre au point faute de temps, les gels réalisés avec ce dernier ont également été exclus de cette étude fondamentale.

3.3.1. Evaluation de l'hydratation des gels

Les polysaccharides considérés mis en solution dans l'eau, présentent une importante hydratation. Ainsi, le contenu en eau au début de gélification est de 96 % (p/p) pour les mélanges HA-alginate à 3:3 et de 98 % (p/p) pour l'alginate seul. De ce fait, la perte en poids en cours de la gélification est assimilée à l'exclusion de l'eau du gel vers la solution de chlorure de calcium, comme cela a déjà été souligné par d'autres auteurs (Yotsuyanagi et coll 1987, Segi et coll 1989).

Les gels contenant uniquement de l'alginate montrent une perte importante en eau durant les premières heures de gélification (Figure IV.15). Leur contenu reste ensuite constant jusqu'à plus de 100 heures. Ce résultat est conforme à celui de Yotsuyanagi et coll (1987) qui a observé une perte en eau d'environ 60 à 70 % après quelques heures pour un alginate dont le rapport M/G était de 56,3 / 43,7.

Une perte supérieure à 60 % est observée pour des gels d'alginate formés pendant au moins trois heures. La présence de hyaluronate diminue cet effet de déshydratation et la perte de poids pour les mélanges alginate-HA I 1:3 et 3:3 atteint respectivement 40 et 28 % après quelques heures. La présence de hyaluronate au sein du gel limite donc la libération de l'eau vers le milieu extérieur.

L'évolution de la perte de poids, en fonction du temps de gélification, d'un gel mélange de HA II 1:3 est inférieure à celui du mélange HA I 1:3 et égale au mélange HA I 2:3. Or HA II présente

une masse molaire plus faible que HA I. Ceci implique que la masse molaire ou la longueur des chaînes polysaccharidiques auraient un rôle important sur la diffusion de l'eau.

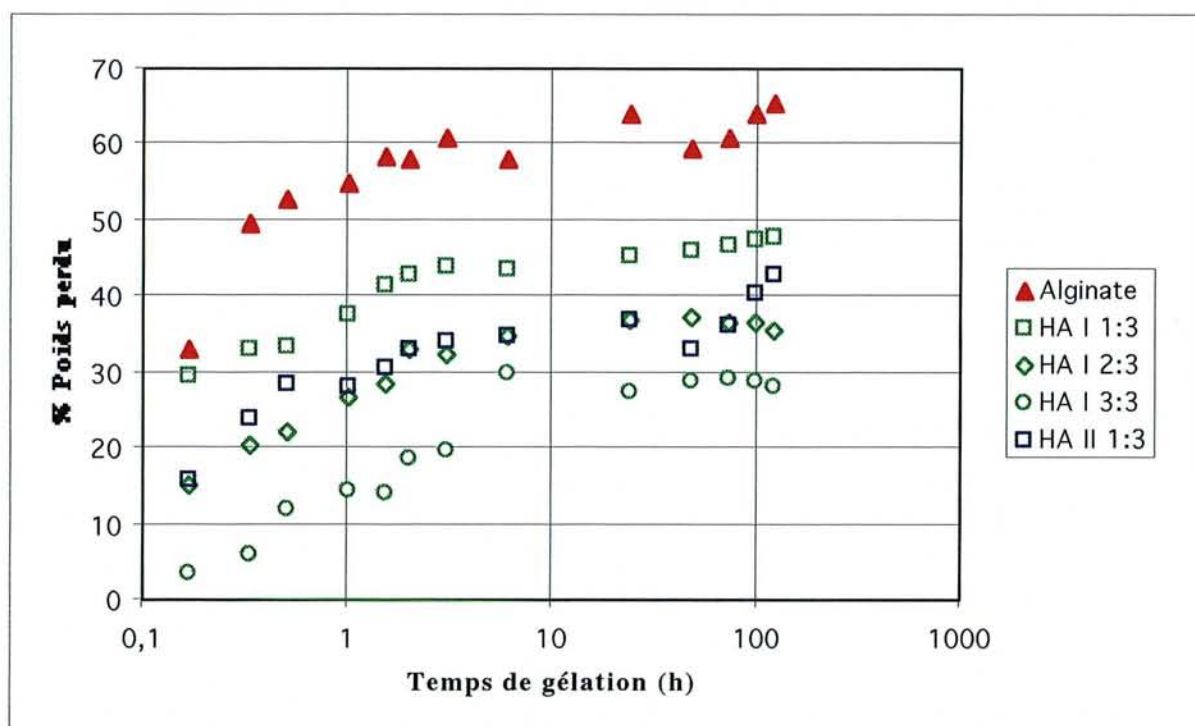


Figure IV.15 : Evolution du pourcentage de poids perdu par les gels mélanges sous forme de bille avec le temps de formation dans le milieu CaCl_2 100 mM.

3.3.2. Calcium

Pour tous les gels étudiés, la concentration en calcium dans les gels augmente rapidement durant la première heure pour se stabiliser ensuite (Figure IV.16). Le contenu en calcium dans l'alginate se stabilise ainsi autour d'une valeur de $5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de gel après 72 heures. La présence de hyaluronate entraîne une diminution de ce taux à environ $3,5\text{-}4 \mu\text{g Ca}^{2+}/\text{mg}$ de bille.

Cependant, si l'on rapporte la concentration massique de calcium dans les billes en fonction de celle de l'alginate, en tenant compte de la perte de poids mesurée précédemment, on obtient une corrélation significative (Figure III.17) ($r^2 \approx 0,815$) que l'on peut exprimer par la relation suivante :

$$[\text{Ca}^{2+}] = 0,93 + 0,88 [\text{alginate}]$$

où les deux concentrations sont exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Cette relation est indépendante de la concentration en hyaluronate et confirme donc que l'affinité du calcium pour ce polysaccharide est négligeable par rapport à celle pour l'alginate.

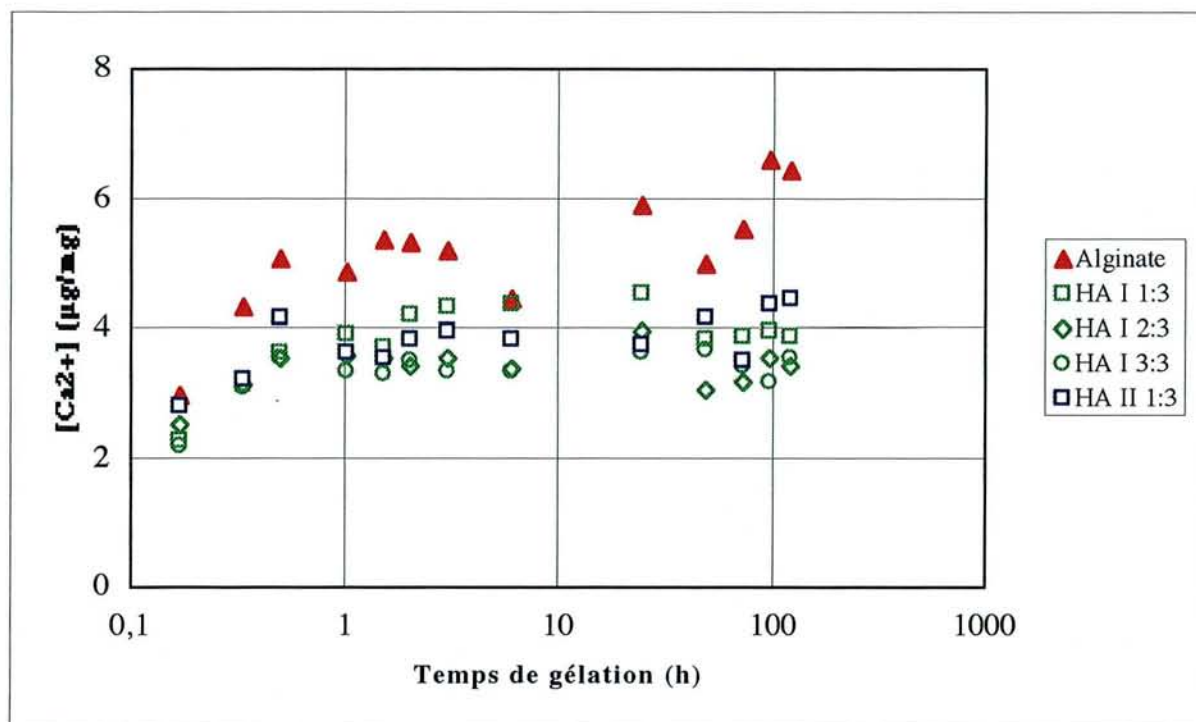


Figure IV.16 : Concentration massique en calcium contenu au sein d'une bille en fonction du temps de gélation dans le milieu CaCl_2 100 mM.

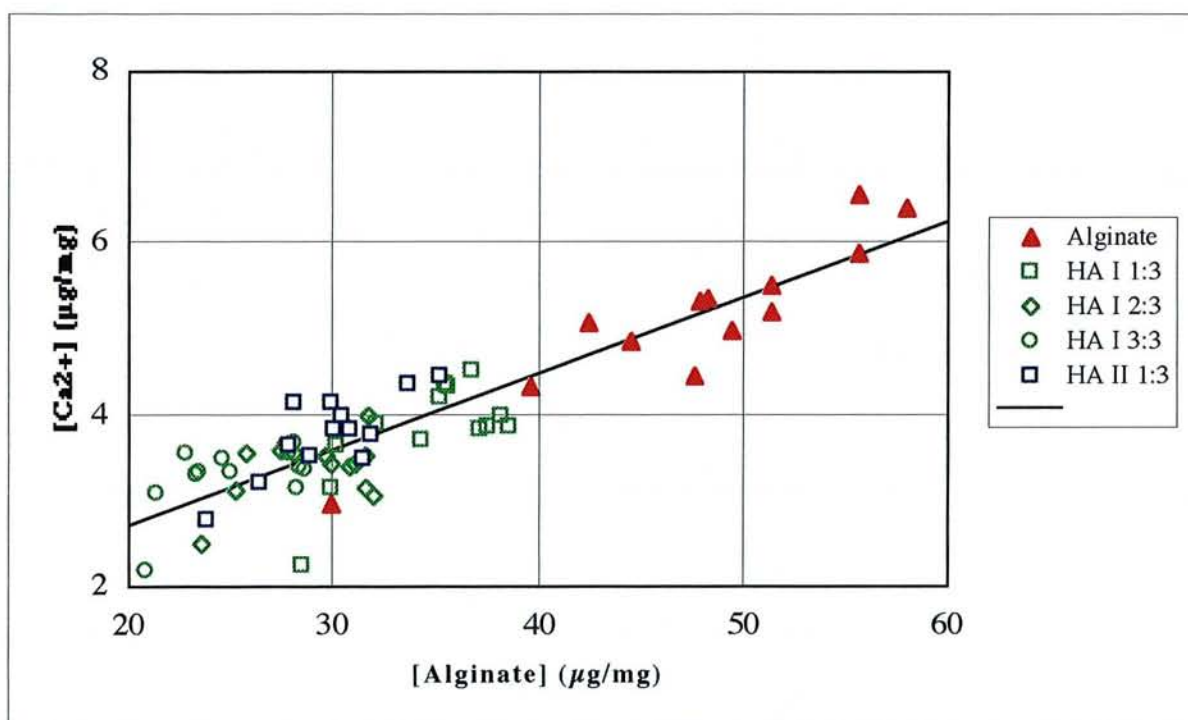


Figure IV.17 : Evolution de la concentration massique du calcium contenu dans la bille avec la quantité d'alginate présent dans la bille.

Cette relation indique un contenu appréciable en ions calcium à concentration nulle en alginate. Le terme constant égal à 0,93 correspond à une concentration de calcium proche de 23 mM et

impliquerait que le calcium soit présent sous deux formes dans le gel. Une première est complexée avec les résidus guluroniques et la seconde est sous forme libre au sein du gel et en équilibre avec le milieu calcique à l'extérieur du gel. Cette concentration de calcium libre entre les deux phases (gel solide et milieu CaCl_2) est certainement liée à l'équilibre de la concentration en calcium entre ces deux phases, phénomène similaire à celui existant lors de l'échange d'un ion avec une solution à travers une membrane.

Le facteur de proportionnalité qui apparaît dans cette relation correspond à une concentration de $2,2 \cdot 10^{-3}$ mole de calcium/g d'alginate. Cette valeur est cohérente avec le taux de calcium des gels d'alginate, déterminé par Yotsuyanagi (1990), variant de 1,89 à $2,44 \cdot 10^{-3}$ mol/g selon la proportion des résidus guluroniques.

3.3.3. Hyaluronate

Lors de l'estimation du taux d'hydratation des gels, nous avons observé que la perte en eau dépendait de la présence du hyaluronate. En effet, ce dernier inhibe la diffusion de l'eau vers le milieu calcique. Nous avons voulu savoir si la diffusion du hyaluronate était également dépendante de l'espèce et du temps de formation dans le milieu calcique (Figure IV.18).

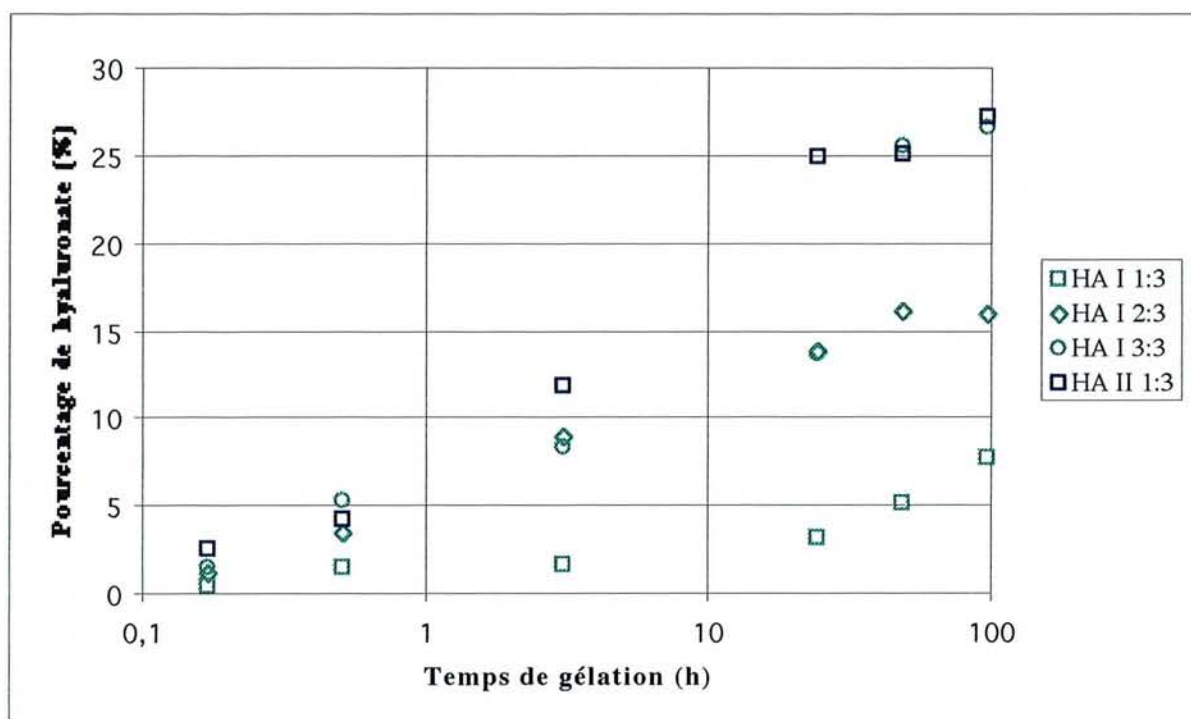


Figure IV.18 : Pourcentage de hyaluronate perdu dans le milieu de formation en fonction du temps de gélification des mélanges de polysaccharides dans le milieu CaCl_2 100 mM.

La diffusion du hyaluronate dans le gel est lente et dépend de la composition du gel en polysaccharide. Pour les gels HA I-alginate 1:3, la perte de hyaluronate atteint seulement 5 % de

la quantité initiale après 48 heures de gélation. La perte augmente avec la quantité initiale de HA I puisque le pourcentage libéré est de 16 et 26 % respectivement pour les gels HA I-alginate 2:3 et 3:3. HA II semble nettement moins stable dans le gel, puisque son expulsion par le gel HA II-alginate 1:3 est comparable à celui du mélange HA I-alginate 3:3. Les longueurs de chaînes de hyaluronate influencent certainement la diffusion du hyaluronate vers le milieu extérieur puisque, pour un temps de gélation considéré et pour le rapport 1:3, le hyaluronate de plus faible masse molaire (HA II) est davantage rejeté que celui de haute masse molaire (HA I).

Remarque : le dosage de la perte de hyaluronate lors de la formation des gels, a été également réalisé pour d'autres types de hyaluronate mais uniquement par CLHP. La Figure IV.19 montre l'évolution du HA IV perdu lors de la gélation pour différentes proportions HA IV-alginate en fonction du temps de formation de la matrice. Ainsi, aucune perte de hyaluronate n'a été détectée pour un rapport 1:3 et ceci quel que soit le temps de gélation. En revanche, pour les deux autres matrices hybrides de rapport 2:3 et 3:3, la quantité de hyaluronate perdu lors de la formation augmente en fonction du temps de gélation et atteint, après 48 heures, un palier correspondant respectivement à environ 30 et 60 % de l'AH IV introduit initialement dans les solutions mélanges de départ. L'existence d'un tel palier pourrait être liée soit à un état d'équilibre entre le hyaluronate restant dans la matrice formée et celui perdu dans le milieu calcique, soit à la stabilisation structurale de l'association des polysaccharides.

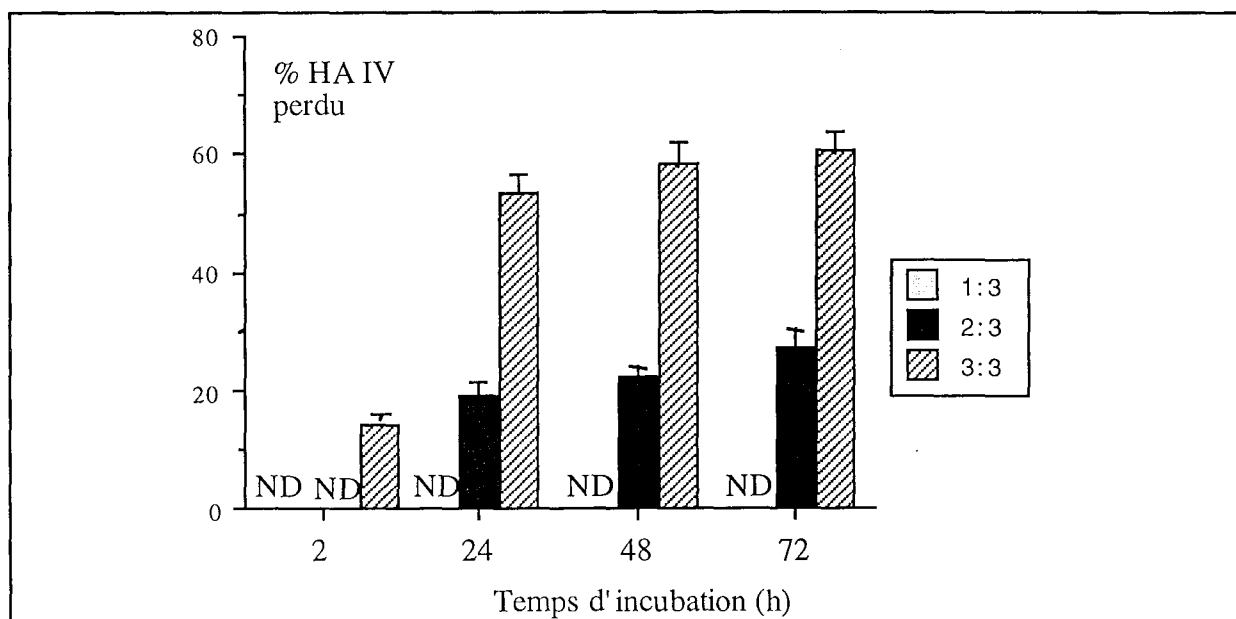


Figure IV.19 : Pourcentage (par rapport à la quantité initiale) de HA IV perdu dans le milieu de formation en fonction du temps de gélification dans le milieu CaCl_2 100 mM. * ND : Non détectable

Pour déterminer l'origine de ce palier, la matrice gélifiée au préalable pendant 48 heures est remplacée dans une nouvelle solution calcique exempte de hyaluronate. La Figure IV.20 montre que la perte en HA IV se poursuit. Après 96 heures d'incubation la perte de hyaluronate est

inférieure à 20 % (par rapport à la quantité restante dans la matrice après 48 heures de formation) pour les rapports HA IV-alginate 2:3 et 3:3, et dans ces conditions, la matrice hybride 1:3 présente une perte qui ne dépasse pas 10 %. Il est donc vraisemblable que cette perte provienne de la poursuite du réarrangement structural interne de l'alginate lors de la pénétration de l'ion calcique.

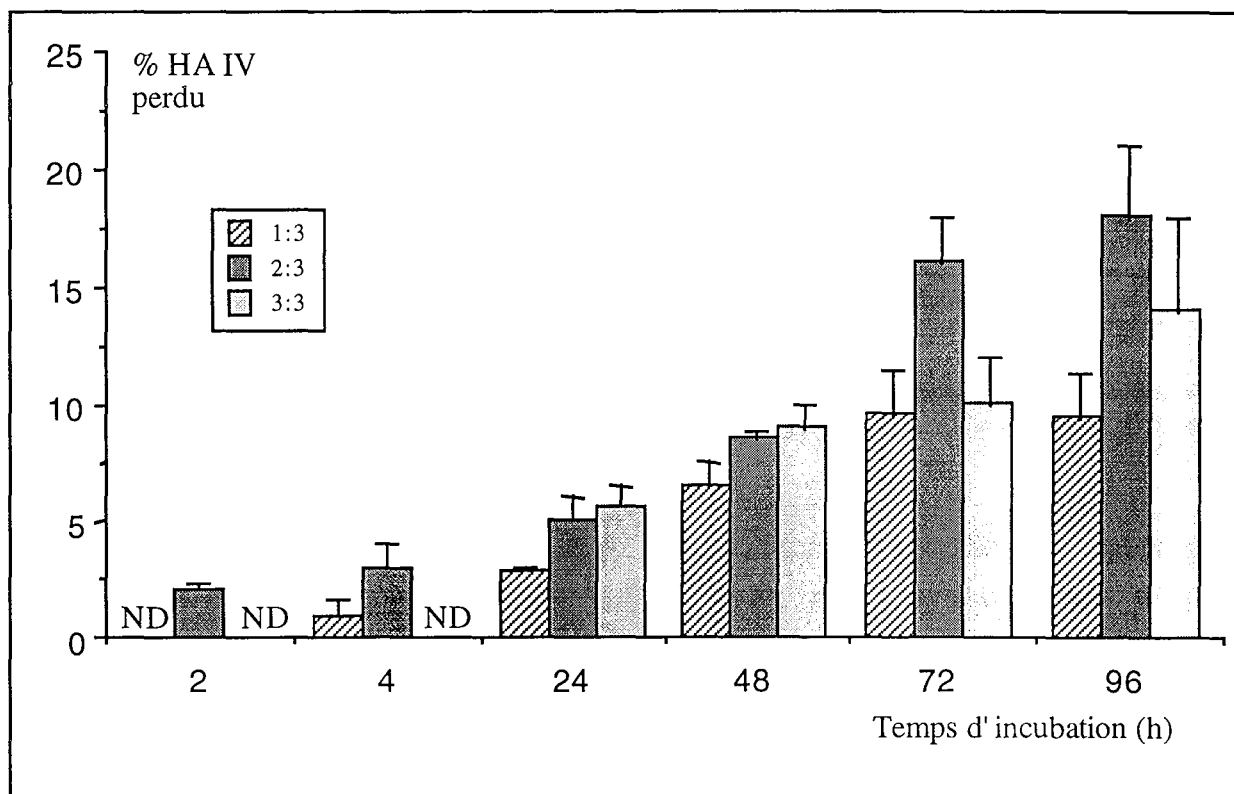


Figure IV.20 : Pourcentage de HA IV libéré (par rapport à la quantité de hyaluronate présent dans le gel après 48 heures de gélification de la matrice), en fonction du temps d'incubation dans une solution CaCl_2 100mM. ND : non détectable.

La quantité de hyaluronate incorporé dans la matrice dépend de l'origine du hyaluronate et du rapport HA-alginate (tableau IV.13). Ainsi, pour le rapport 1:3, cette perte de hyaluronate n'a pas été détectée quelle que soit l'origine du hyaluronate. Par contre pour le rapport 3:3, la quantité de hyaluronate perdu augmente avec le temps de gélification pour atteindre un palier entre 48 et 72 heures. Pour le rapport 2:3, cette quantité perdue varie selon l'origine du hyaluronate. Dans le cas du HA I aucune perte n'a été détectée alors que la perte de HA III est observable après 72 heures de formation et cette perte est visible après 24 heures pour le HA IV. Ainsi, lors de la gélification d'une matrice HA-alginate, la quantité de hyaluronate incorporé au sein de la matrice dépend de l'origine de ce dernier, de sa concentration initiale et du temps de formation dans le milieu calcique. A concentration égale, la quantité de hyaluronate incorporé dans les matrices hybrides semble directement liée à la viscosité de la solution, puisque la solution la plus visqueuse, issue de la crête de coq, permet une présence plus forte de de hyaluronate incorporé dans le gel par comparaison au HA III et au AH IV.

Les variations des résultats de la perte en HA I par rapport à ceux du début de paragraphe, proviennent de la méthode d'analyse. En effet, les pertes en hyaluronate n'ont été étudiées que par CLHP, et cela quel que soit le temps de formation dans le CaCl_2 .

temps de formation (h)	Pourcentage de AH perdu								
	HA I			HA III			HA IV		
	1:3	2:3	3:3	1:3	2:3	3:3	1:3	2:3	3:3
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14±1
24	ND	ND	5±1	ND	ND	37±2	ND	19±2	53±3
48	ND	ND	9±2	ND	ND	39±1	ND	22±2	58±4
72	ND	ND	12±1	ND	17±2	26±4	ND	27±3	60±4

Tableau IV.13: Pourcentage de perte de HA (par rapport à la quantité initiale) en fonction du temps de gélification de la matrice et de l'origine du HA. ND : Non Détectable.

Les propriétés de la matrice HA-alginate dépendent de l'origine du hyaluronate, du rapport HA-alginate et du temps de gélification dans le milieu calcique. Il semblerait que la majeure partie du réarrangement de la structure interne du gel se fasse durant les 48 voire les 72 premières heures. Un temps de 48 heures a donc été choisi pour la formation des billes servant aux différentes études de comportement de la matrice réalisée ensuite. Ces résultats sont en accord avec les résultats publiés par Yostuyanagi et coll (1987), selon lesquels la majeure partie du réarrangement a lieu pendant les 70 premières heures environ, et ce réarrangement se poursuit avec une cinétique plus lente pendant 15-20 jours. Ce qui explique également que, lors de la phase d'immersion de la bille dans le milieu calcique exempt de hyaluronate, nous avons continué à observer une perte en hyaluronate (Figure IV.20)

3.3.4. Détermination des coefficients de diffusion

Les phénomènes de diffusion lors de la gélification des billes ont été modélisés pour estimer un coefficient de diffusion phénoménologique pour chaque composé (eau, calcium et hyaluronate). A partir d'un problème classique de la conduction transitoire de la chaleur d'une surface isotherme d'une sphère (Carslaw 1959), un modèle simple a été obtenu pour la détermination des coefficients de diffusion. Bien que la formation de gel soit obtenue par diffusion de l'eau et du hyaluronate hors du gel et diffusion simultanée de l'ion calcium vers l'intérieur de la bille, le modèle utilisé concerne chaque espèce de manière indépendante des autres phénomènes de diffusion.

Les estimations pour les coefficients de diffusion des composés considérés ont été reportées dans le tableau IV.14, avec leurs intervalles de confiance. Ces valeurs ont des ordres de grandeur presque comparables aux vitesses de diffusion des composés dans l'eau pure. Dans le cas de la diffusion du calcium au travers des gels, la valeur est proche de $10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$, dans le cas de l'ion mis en solution très diluée, cette valeur est de $7,92.10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$ (Weast 1986), ce qui correspond à une diffusivité de l'ion calcium dans le gel d'environ 10 fois plus faible que dans le cas de l'eau. La diffusion de l'eau dans le gel est beaucoup plus faible que celle observée par Wang (1954) tout comme la diffusivité du hyaluronate (Brandrup et Immergut 1989).

Condition	Ca^{2+}	H_2O	Hyaluronate
Alginate	$0,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-10}$	$0,92 \pm 0,10 \cdot 10^{-10}$	-
HA I 1:3	$1,2 \pm 0,4 \cdot 10^{-10}$	$0,64 \pm 0,10 \cdot 10^{-10}$	$0,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-12}$
HA I 2:3	$1,9 \pm 0,5 \cdot 10^{-10}$	$0,32 \pm 0,05 \cdot 10^{-10}$	$2,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-12}$
HA I 3:3	$1,6 \pm 0,5 \cdot 10^{-10}$	$0,11 \pm 0,02 \cdot 10^{-10}$	$1,2 \pm 0,4 \cdot 10^{-12}$
HA II 1:3	$1,8 \pm 0,5 \cdot 10^{-10}$	$0,30 \pm 0,05 \cdot 10^{-10}$	$2,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-12}$
Dilution à l'infini 25°C	$7,92 \cdot 10^{-10}$ (Weast, 1986)	$2,57 \cdot 10^{-9}$ (Wang, 1954)	$1,97 \cdot 10^{-12}$ (Brandrup et Immergut, 1989 *)

Tableau IV.14 : Valeurs du coefficient de diffusion du calcium vers le gel, de l'eau et du hyaluronate vers le milieu extérieur.

La diffusion de l'eau est parfaitement bien représentée par ce modèle, ainsi que l'illustre la Figure IV.21. La précision modérée permise par les analyses du hyaluronate et du calcium, sont la source de la dispersion notable des données expérimentales. La diffusivité de ces deux composés est donc donnée avec un large intervalle de confiance et doit donc n'être considérée que comme indicative.

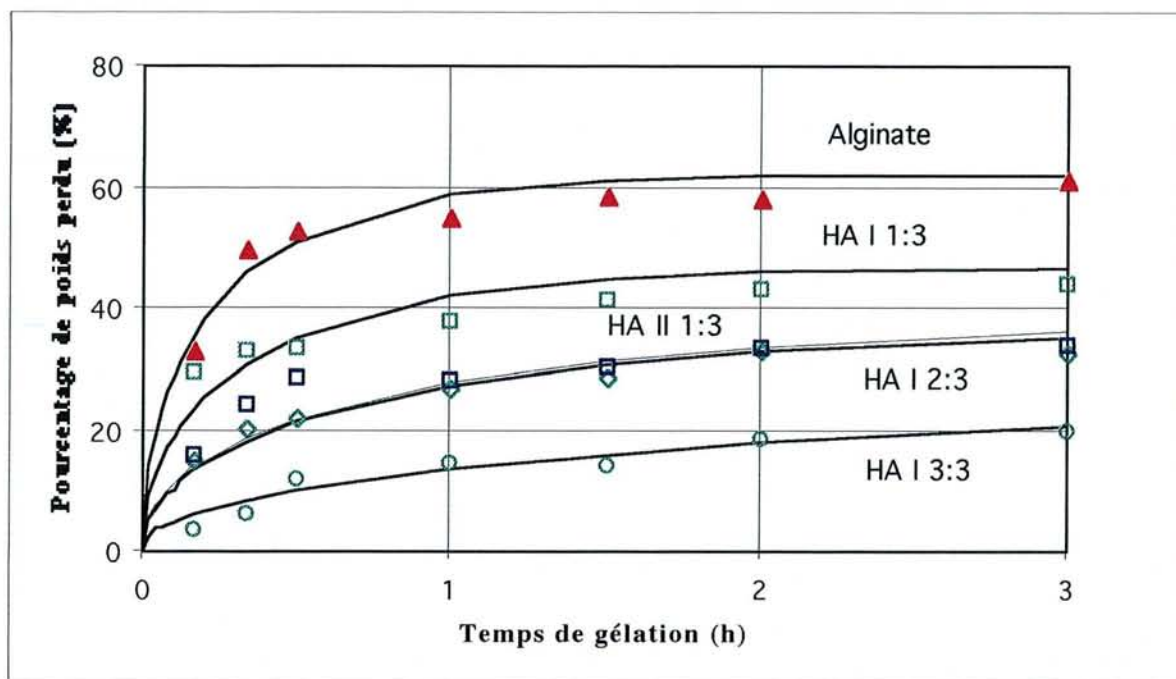


Figure IV.21 : Variations des pertes de poids expérimentales et théoriques en fonction du temps de gélification dans le milieu CaCl_2 100 mM. Les traits continus correspondent au modèle théorique.

De façon générale, le coefficient de diffusion des composés dans le gel est inférieur à celui dans l'eau, mais de même ordre de grandeur : la diffusivité dans le gel est de 2 à 200 fois plus faible que dans l'eau (tableau III.14). Le coefficient de diffusion d'un soluté est généralement variable avec la viscosité du milieu. En tenant compte de l'ordre de grandeur de la viscosité des gels, entre 10^5 et 10^7 Pa.s, une diffusivité des petits solutés pourrait être estimée à environ $10^{-16} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à partir de la loi de Stokes Einstein. En fait cette loi, valable pour des solutions ou des milieux parfaitement homogènes et dilués n'est guère applicable dans le cas présent. Le transport des différentes espèces se fait donc probablement au travers des pores du gel et non au travers de sa masse.

La diffusion du calcium et de l'eau dépend en partie de la composition du mélange de polymères considérés ; ainsi le calcium diffuse plus lentement en présence de hyaluronate, alors que l'inverse est observé pour la diffusion de l'eau. Elle est également influencée par la masse molaire du hyaluronate.

La diffusion du calcium, de l'eau, ou du hyaluronate, est influencée par le contenu en hyaluronate dans le gel, ceci peut être dû aux interactions spécifiques entre l'eau et les polysaccharides. En respectant la concentration à l'état stationnaire mais également la vitesse de transport, nous avons montré que le hyaluronate accroît le caractère hydrophile du gel, ce qui limite le transport de l'eau du solide vers le milieu calcique.

4. Etude du comportement des gels et de leur biocompatibilité

Cette partie concerne d'une part l'étude de la stabilité des gels envers différents milieux simulant les conditions physiologiques. Un premier travail a été réalisé sur des mélanges en forme de bille pour des sources de hyaluronate de masse molaire variable (HA I, HA III et HA IV). Nous avons étudié d'autre part la cytocompatibilité des matrices vis-à-vis des cellules cartilagineuses, les chondrocytes. Deux paramètres ont été évalués : la viabilité et la prolifération cellulaires au sein de gels natifs et en mélange.

L'utilisation d'un modèle expérimental de poche à air chez le rat a permis d'évaluer le caractère inflammatoire de ces matrices.

4.1. Stabilité des matrices

Le comportement des matrices hybrides, dans des milieux simulant les conditions physiologiques, a été étudié pour des gels formés durant 48 heures dans le milieu calcique. Nous avons suivi l'évolution de la libération du hyaluronate en fonction du temps d'incubation. Dans un premier temps, nous avons analysé la libération du hyaluronate dans un milieu tampon phosphate pH 7,4. Ce tampon, en effet, est un milieu largement utilisé lors des études de libération de molécules biologiquement actives ou d'autres molécules (Yotsuyanagi et coll 1987, Segi et coll 1989). Dans nos conditions, le hyaluronate est libéré rapidement quelle que soit la nature de la matrice. En effet, en moins de 4 heures, 100 % de hyaluronate présent initialement dans la matrice est libéré dans le milieu. Cette libération rapide du hyaluronate s'explique par la présence des ions phosphates qui tendent à déstabiliser les gels d'alginate (Skjak-Braek et Smidsrod 1990).

Nous avons ensuite voulu connaître le comportement de ces matrices dans un milieu plus complexe contenant une protéine, telle que l'albumine et également le hyaluronate (HA III) pour observer le comportement du gel en présence des macromolécules majeures du liquide synovial. La Figure IV.22 représente les cinétiques de libération du HA III dans un milieu DMEM enrichi en albumine et éventuellement en hyaluronate jusqu'à 96 heures après formation des billes. Le HA III et l'albumine ont été ajoutés aux concentrations retrouvées dans un liquide synovial sain afin de mimer les conditions physiologiques.

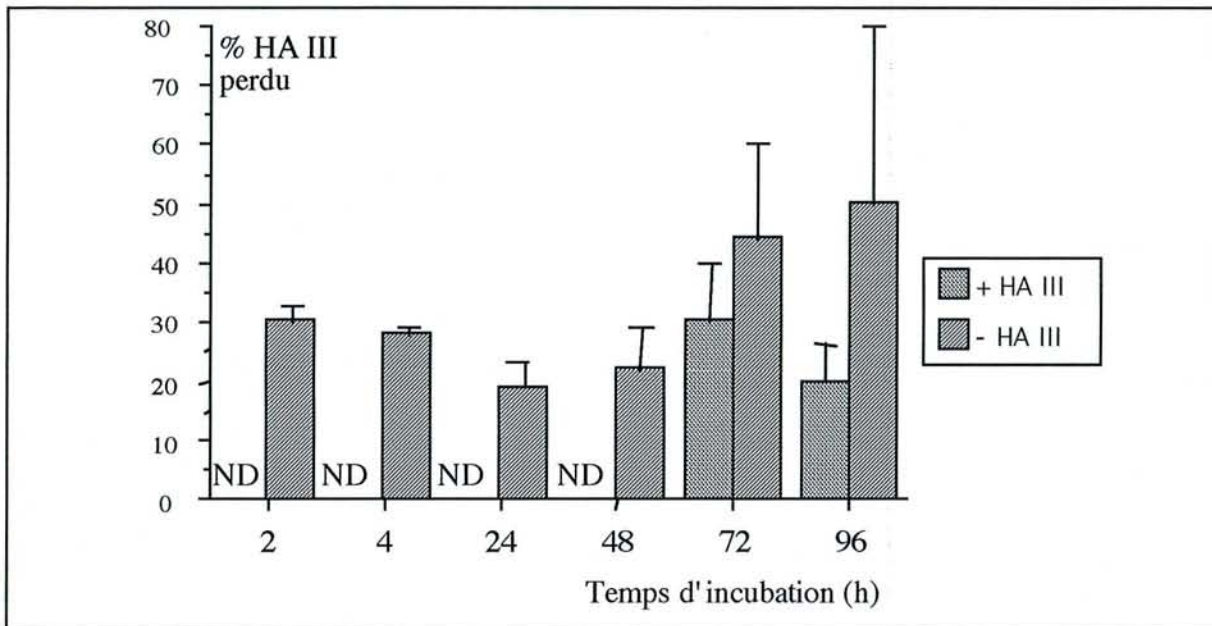


Figure IV.22 : Pourcentage (par rapport à la quantité initiale) de hyaluronate libéré à partir d'une matrice HA III-alginate de rapport 1/3 gélifiée pendant 48 heures, dans un milieu DMEM contenant de l'albumine et enrichi ou non avec du HA III. (*) ND = non détectable

Dans le milieu DMEM enrichi en albumine, la libération du hyaluronate initial est de 30 % après 48 heures et se stabilise à 50 % au bout de 96 heures. La présence de hyaluronate dans le milieu retarde la libération du hyaluronate contenu dans la matrice, et ce polysaccharide n'est détectable qu'après 72 heures.

Une étude macroscopique a ensuite été réalisée sur un gel de HA III-alginate de rapport 1:3 placé dans du liquide synovial à 37°C (Figure IV.23). Après 96 heures d'incubation, il a été observé que ce gel reste intact, contrairement à ce qui avait été observé dans le tampon phosphate.

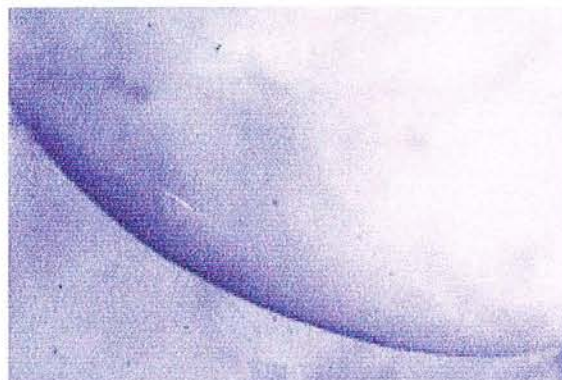


Figure IV.23 : Allure d'une bille de HA III-alginate formé durant 48 heures dans du CaCl_2 100 mM et placée dans du liquide synovial à 37 °C pendant 96 heures.

Conclusion

Ces études ont montré que la présence d'ions phosphate dans le milieu d'incubation déstabilise le gel d'alginate. Dans les milieux utilisés pour la culture de chondrocytes, les matrices sont plus résistantes et la stabilité est améliorée par l'introduction d'éléments supplémentaires tels que l'albumine ou le hyaluronate. De plus, la matrice placée dans du liquide synovial semble rester intacte, ce qui permettrait de supposer que cette matrice peut être employée dans le domaine articulaire sans être trop endommagée.

Ces premiers résultats montrent que la matrice est suffisamment stable, notamment au contact du liquide synovial, pour être implantée dans la cavité articulaire. Cette étude de stabilité a ensuite été complétée par l'évaluation de la biocompatibilité des matrices *in vitro* et *in vivo*.

4.2. Cytocompatibilité et activité cellulaire *in vitro*

Dans notre étude, nous avons étudié le comportement de différents types de chondrocytes (languettes sternales, têtes fémorales de rat et de bovin) encapsulés dans des billes, de mélange et dans des billes d'alginate servant de référence.

Dans le milieu de culture, la présence de certains composés provenant des sels inorganiques, comme par exemple les ions phosphates, et qui ont une grande affinité pour les ions calcium, pourraient détruire le gel d'alginate. Ainsi, certains auteurs préconisent d'ajouter une concentration minimale en ions calcium (mais inférieure à 3 mM) qui permettrait de stabiliser le gel pendant la durée de l'étude.

Les études *in vitro* sont réalisées pour l'alginate seul et les mélanges 1:3 et ceci quelle que soit la nature du hyaluronate, HA I, HA II natif ou HA II modifié. Pour ce dernier le hyaluronate a été déacétylé sur un temps de réaction de 2 heures, de façon à obtenir un taux de groupement amine suffisamment important sans que la masse molaire n'en soit trop affectée.

4.2.1. Observation macroscopique

L'observation macroscopique des gels contenant des chondrocytes a montré l'apparition d'une sphère blanchâtre centrale au sein de la bille après environ 15 jours d'incubation et cette sphère semble être plus importante quand les gels comportent du hyaluronate. En effet, lorsque l'on observe au microscope (grossissement x 10) les cellules au sein des billes, les chondrocytes dans les gels contenant du hyaluronate sont à confluence et provoquent une opacité très importante du gel par rapport au gel d'alginate seul où les cellules sont encore visibles (Figure IV.24). La présence de cette matrice blanche semble augmenter le temps de lyse des billes dans l'EDTA-citrate. Ainsi, plus le temps d'incubation dans le milieu de culture augmente, plus le temps de lyse dans le milieu EDTA-citrate augmente. Ainsi, au bout de 20 jours d'incubation, un temps de lyse de 2 heures est nécessaire au lieu de 15 minutes environ.

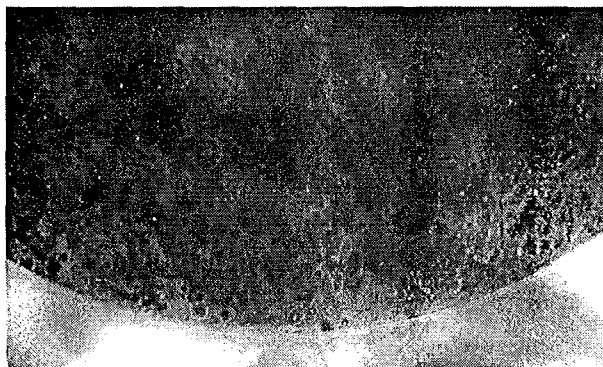


Figure IV.24 : Evolution des chondrocytes au sein d'une bille d'alginate incubée 13 jours dans le milieu de culture complet.

4.2.2. Mortalité cellulaire

Les colorations vitales d'exclusion au bleu Trypan effectuées entre J0 et J27, montrent une évolution de la viabilité cellulaire identique dans les différents types de matrice (Figure IV.25). La viabilité cellulaire à J0 est comprise entre 85 et 90 %. Pourtant, ces valeurs sont inférieures à celles de cellules cultivées habituellement en monocouche. Ces résultats pourraient être expliqués par le stress mécanique non négligeable subi par les cellules lors de la formation des billes car aucune donnée de cytotoxicité de l'alginate lui-même n'a été rapportée.

Après J 7, dans tous les cas et quelle que soit la matrice étudiée, la mortalité cellulaire augmente avec le temps d'incubation. Cette hausse de mortalité proviendrait certainement du temps d'éclatement du gel dans le tampon EDTA-citrate.

De plus ni la modification chimique du hyaluronate, ni la viscosité de l'alginate étudié, ni le type de chondrocyte étudié n'entraînent de variation des valeurs de mortalité cellulaire (Figure IV.25).

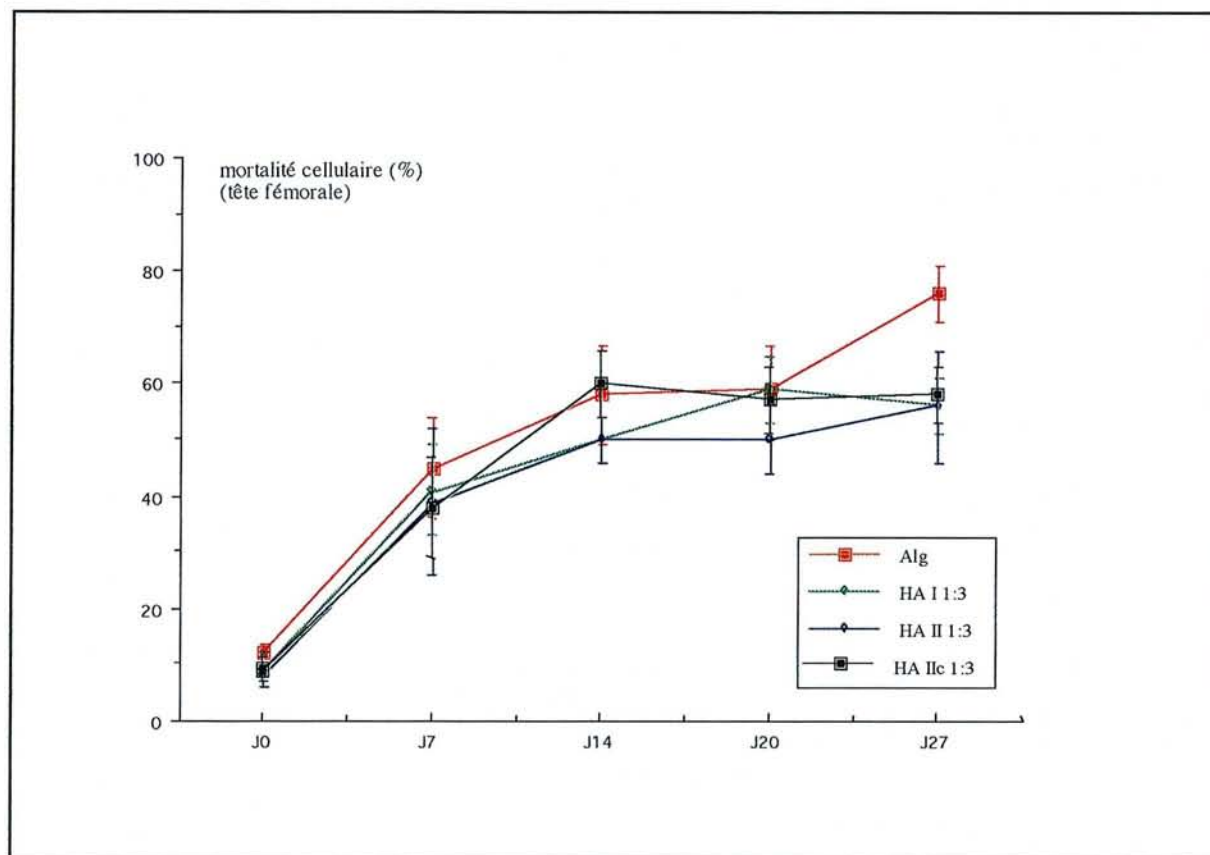


Figure IV. 25 : Evolution de la mortalité des chondrocytes issus de têtes fémorales de rat en fonction du temps d'incubation dans le milieu de culture. Résultats obtenus pour l'alginate moyenne viscosité (Alg) et pour les mélanges 1:3 avec HA I, HA II et HA IIc.

4.2.3. Prolifération cellulaire

L'alginate de masse molaire faible (donc ayant une viscosité faible) (Alg FV) est généralement employé lors des études en culture tridimensionnelle de chondrocytes (Guo et coll 1989). Nous avons donc voulu observer l'influence de la masse molaire de l'alginate sur la prolifération cellulaire et également l'influence de l'adjonction du hyaluronate.

La prolifération cellulaire des chondrocytes au sein d'un gel d'alginate en présence ou non de hyaluronate est étudiée pendant une durée d'incubation comprise entre 0 à 17-18 jours. Elle est évaluée par le nombre de cellules présentes dans la bille en fonction du temps. Les comptages cellulaires réalisés à l'aide d'un hémodécomètre indiquent qu'à J0 la quantité de chondrocytes par bille varie selon le type de matrice (Figure IV.26).

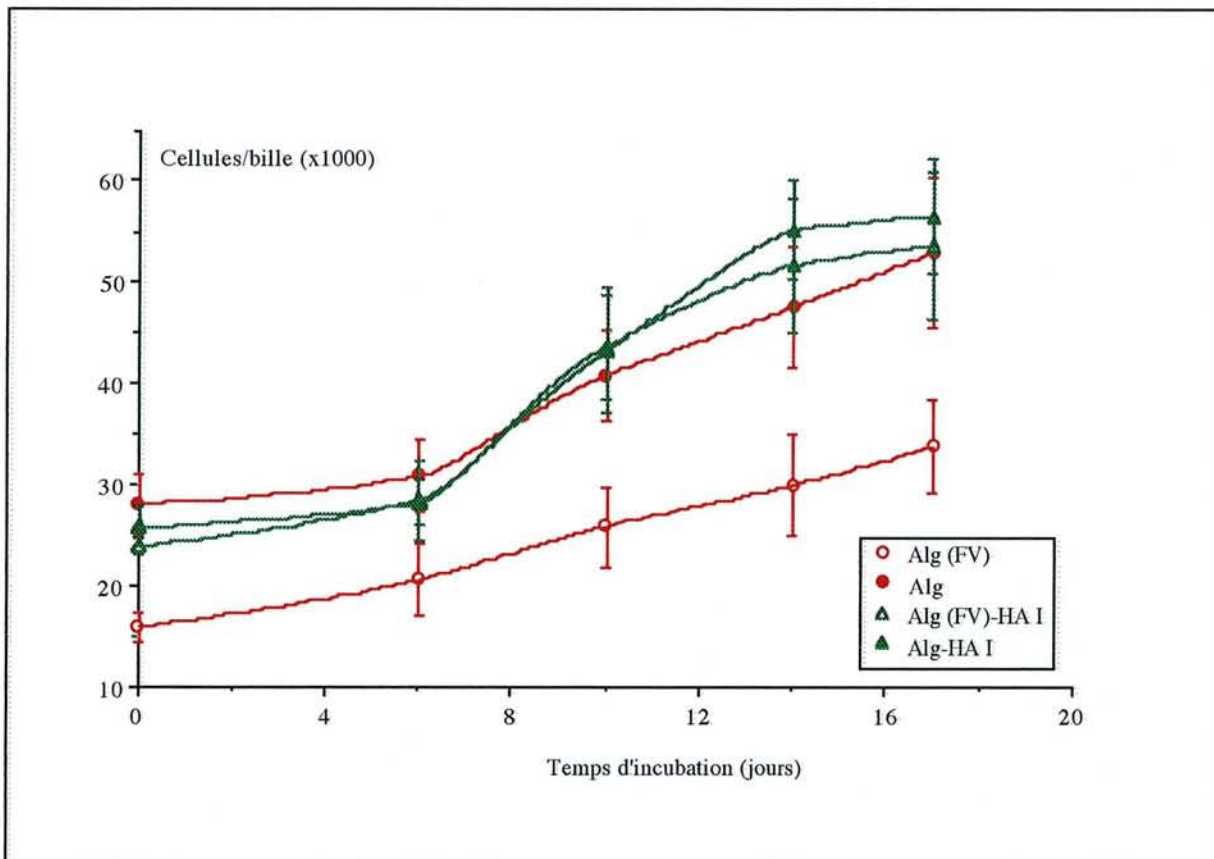


Figure IV. 26 : Cinétique de prolifération cellulaire (chondrocytes extraits de la tête fémorale) dans les matrices d'alginate de moyenne viscosité (Alg), de faible viscosité (Alg (FV)) et de leur mélange respectif avec HA I en rapport 1:3.

Cette variation du nombre de cellules à J0 est due à la taille différente des billes obtenues qui dépend de la viscosité de l'alginate mais également de la présence ou non de HA. Ainsi, les billes faites à partir d'alginate de faible viscosité sans HA sont plus petites que les trois autres types. Les résultats montrent que, quelle que soit la matrice, la prolifération cellulaire reste faible par rapport à ce que l'on obtiendrait pour des chondrocytes cultivés en monocouche pendant la même période (Guo et coll 1989). En effet, nous constatons qu'après 17 jours de culture, le nombre de cellules a environ été multiplié par 2. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui font état généralement d'une activité de prolifération réduite. Cependant, dans le cas de l'alginate de faible viscosité, nous observons que l'ajout du hyaluronate accroît la taille des billes formées mais également la prolifération cellulaire.

Le tableau IV.15 montre l'évolution de la prolifération cellulaire selon les types de chondrocytes étudiés mais également en fonction de la nature des gels.

Espèces de chondrocytes		J0	J6	J18
têtes fémorales (rat)	Alg (FV) 1,5%	16 ± 1	21 ± 4	34 ± 5
	Alg 1,5 %	28 ± 3	31 ± 4	53 ± 7
	Alg 2%	20 ± 4	24 ± 6	33 ± 8
	Alg (FV) 1,5% + HA II 1:3	24 ± 1	29 ± 4	54 ± 7
	Alg 1,5 % + HA II 1:3	26 ± 2	28 ± 2	57 ± 6
	Alg 2% + HA II 1:3	20 ± 2	24 ± 6	33 ± 6
	Alg 2% + HA I 1:3	21 ± 4	34 ± 9	36 ± 5
languettes sternales (rat)	Alg 2 %	24 ± 2	21 ± 5	26 ± 1
	Alg 2% + HA II 1:3	22 ± 5	25 ± 3	24 ± 4
	Alg 2% + HA I 1:3	26 ± 12	29 ± 3	29 ± 8
têtes fémorales (bovin)	Alg (FV) 2 %	40 ± 4	43 ± 7	39 ± 1
	Alg (FV) 2% + HA II 1:3	52 ± 2	62 ± 9	
	Alg (FV) 2% + HA I 1:3	46 ± 2	44 ± 1	

Tableau IV. 15 : Evolution de la prolifération cellulaire en fonction du type de chondrocytes et de la nature du gel étudié pour trois temps d'incubation (J0, J6 et J18).

Les comptages cellulaires réalisés à J0 montrent que la quantité de chondrocytes par bille est identique quelle que soit la nature du gel (alginate seul ou en mélange avec HA I, HA II) à l'exception des chondrocytes extraits des têtes fémorales de bovins.

Les résultats montrent une prolifération cellulaire faible par rapport à ce que l'on obtiendrait pour les chondrocytes cultivés en monocouche pour la même période (Guo et coll 1989).

De plus dans certains cas, nous notons une stabilisation de la prolifération cellulaire après 6 jours d'incubation. L'apparition de la matrice blanchâtre au coeur du gel apparaît après J15 d'incubation, ce qui nécessite une augmentation du temps de lyse avec le tampon citrate-EDTA des gels.

Les gels semblent influencer de la même manière le comportement des cellules d'origine variée (Bordji et coll 1996). Mais il apparaît clairement qu'en présence de hyaluronate HA I ou HA II, quelles que soit la viscosité et la concentration en alginate, la prolifération des chondrocytes soit majorée par rapport aux témoins sans hyaluronate.

4.2.4. Anabolisme et catabolisme des protéoglycanes

L'effet des différentes matrices d'alginate de moyenne et de faible viscosité contenant ou non HA I, sur l'anabolisme des protéoglycanes a été étudié, par l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$, pour deux périodes de temps d'incubation c'est-à-dire entre J6 et J10 et entre J14 et J17 (Tableau IV 16).

	Incorporation du $^{35}\text{SO}_4$ (cpm/ 10^4 cellules)	
	J6 à J10	J14 à J17
Alg	527 ± 65	658 ± 95
Alg-HA I 1:3	358 ± 47	573 ± 50
Alg (FV)	519 ± 90	504 ± 94
Alg (FV)-HA I 1:3	325 ± 24	465 ± 75

Tableau IV.16 : Evolution de l'activité de $^{35}\text{SO}_4$ par des chondrocytes issus de têtes fémorales de rat cultivés dans des billes d'alginate de moyenne ou de faible viscosité en présence ou non de HA I.

A J10, l'activité d'incorporation des chondrocytes cultivés dans les billes avec HA I est significativement plus faible que celle observée dans les billes sans HA I, quelle que soit la viscosité de l'alginate. Par contre, à J17, aucune différence d'incorporation n'a été relevée dans les quatre matrices. Il semble en fait que l'anabolisme des protéoglycanes est diminué lorsque les chondrocytes ont une activité de prolifération plus importante. C'est le cas à J10 dans les matrices d'alginate-HA I où le nombre de cellules a augmenté de 53% pour l'alginate de faible viscosité et de 54% pour l'alginate de moyenne viscosité pour une incorporation respective de 325 ± 24 et 358 ± 47 cpm/ 10^4 cellules. Par contre, à J17, l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ dans les billes d'alginate comportant HA I devient analogue à celle mesurée dans les billes d'alginate, ce qui coïncide avec une baisse de la prolifération cellulaire.

En conclusion, ce travail montre qu'il est possible d'associer un polysaccharide de haut poids moléculaire à une matrice d'alginate en conservant les propriétés de celle-ci comme support de culture tridimensionnelle. Il apparaît nécessaire de compléter cette étude par des analyses histologiques de la matrice néosynthétisée mais d'également d'en évaluer la biocompatibilité *in vivo*. Ce dernier point sera abordé dans le paragraphe suivant.

4.3. Biocompatibilité

Le modèle expérimental de poche à air chez le rat a été utilisé pour apprécier *in vivo* la biocompatibilité. Les implants sont placés dans une poche à air placée dans le dos de l'animal. Edwards et coll (1981) ont montré que cette poche entraîne une modification histologique de la membrane qui mimerait alors la membrane synoviale. Cette étude a été réalisée sur deux types d'implant : l'alginate et le mélange HA I-alginate 1:3. En effet, d'après le comportement cellulaire (peu différents entre les gels étudiés) et la rhéologie des gels, seul ce mélange est retenu. Un mélange alginate - chondrocytes articulaires hétérologues (HA ICh) a été employé également afin d'obtenir un témoin positif de réaction inflammatoire et/ou immunologique. Différents paramètres biologiques ont été analysés dans le liquide de lavage de la poche à air :

numération des globules blancs, dosage des prostaglandines E2, des protéines, des glycosaminoglycanes totaux sulfatés et du hyaluronate de sodium.

4.3.1. Observations générales

Etat général des animaux

A l'exception d'une inflammation post-opératoire observée pendant environ 72 heures, l'implantation n'a induit aucune modification de poids des rats, traduisant leur bon état général.

Etat des implants

Nous avons noté la présence d'une matrice blanchâtre à partir de J8 (selon la nature du gel) au centre des implants semblable à celle observée (Figure IV.27) *in vitro*.

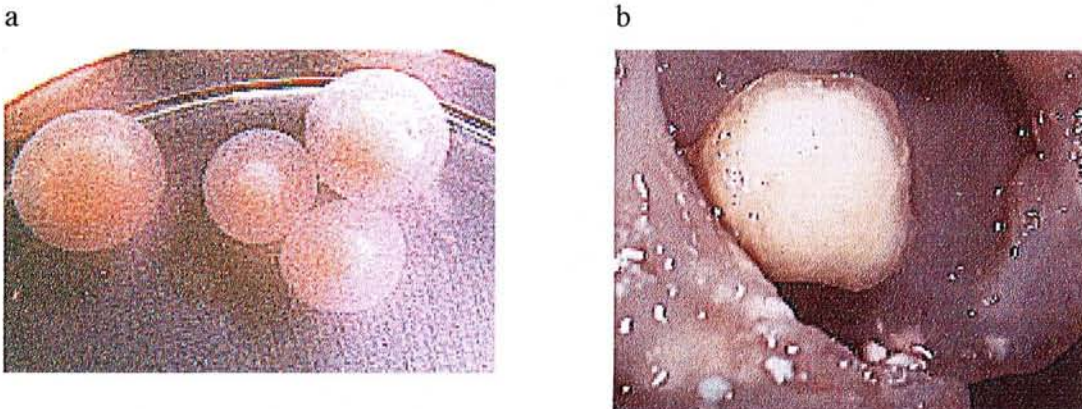


Figure IV.27 : Aspect macroscopique de la matrice blanchâtre formée in vivo : a) J8 au sein d'un gel d'alginate et b) J15 au sein d'un gel HA-alginate-chondrocytes.

Lavage ou exsudat

Quand nous avons rincé les poches avec du sérum physiologique, nous avons obtenu des exsudats de couleur brune. Dans le cas des rats implantés avec la matrice HA ICh, cet exsudat était sanguinolant confirmant une réaction positive à ce type d'implant.

4.3.2. Dosages biochimiques

Des analyses biochimiques notamment la numération des globules blancs, le dosage des PGE2 et des protéines ont été effectuées afin d'évaluer les éventuelles propriétés inflammatoires des différents implants.

Numération des globules blancs

Cette numération a été réalisée en cytométrie de flux aux temps J 15 et J 21, après implantation. Les valeurs données dans ce tableau (IV.17) sont exprimées en nombre de globules blancs présents dans le volume d'exsudat retiré de la poche à air.

Quelle que soit la durée de l'implantation, la numération de globules blancs semble peu significative pour les deux implants étudiés contrairement au témoin (HA ICh). Ce résultat suggère que l'alginate et le mélange HA I-alginate en gel n'induisent pas d'afflux cellulaire dans la poche.

		Témoin (x10 ⁶)	alginate (x10 ⁶)	HA I 1:3 (x10 ⁶)	HA ICh (x10 ⁶)
J15	moyenne	0,33	3,38	3,27	28,02
	SEM	0,11	0,96	1,40	9,99
J21	moyenne	0,30	1,41	0,62	52,32
	SEM	0,06	0,31	0,20	19,69

Tableau IV.17 : Evolution du nombre de globules blancs en fonction des implants étudiés (alginate, HA I-alginate 1:3 et HA ICh). Les résultats représentent la moyenne de la numération obtenue pour n=5 animaux $\pm$ SEM (écart-type divisé par la racine carrée de n).

Dosage des prostaglandines E2

La très faible quantité de PGE2 mesurée dans l'exsudat des rats ayant reçu les gels d'alginate et de HA I-alginate 1:3 confirme l'absence des propriétés inflammatoires pour ces deux matrices (Figure IV.28). Le groupe HA ICh est très différent des autres groupes, puisqu'une concentration importante en PGE2 est observée dès le huitième jour d'implantation et ce nombre croît avec la durée de l'implantation.

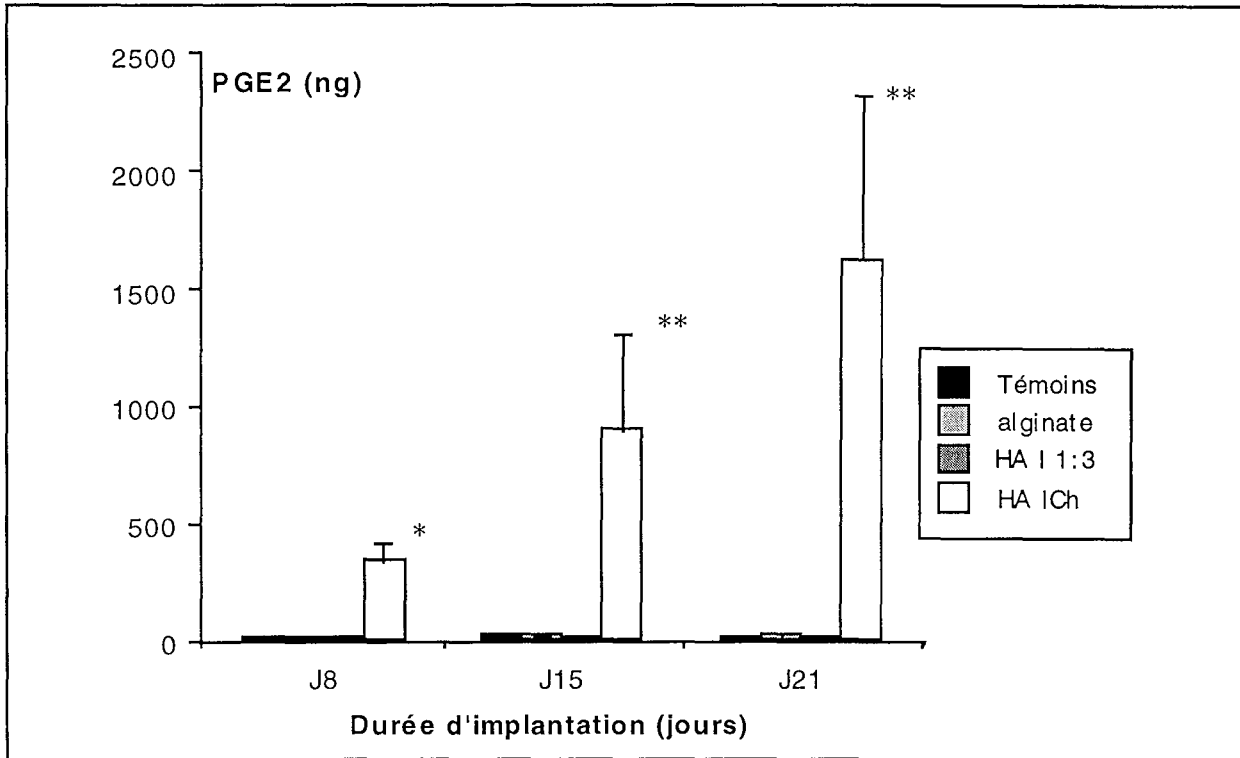


Figure IV.28 : Quantité de prostaglandines E2, dosée par un kit Elisa, présente dans l'exsudat de la poche en fonction des implants étudiés (alginate, HA I-alginate 1:3 et HA ICh). Les résultats représentent la moyenne de la quantité de PGE2 obtenue pour $n=5$ animaux $\pm$ SEM (écart-type divisé par la racine carrée de n) ($p<0,02$).

Dosage des protéines

Une inflammation est caractérisée par une augmentation de la perméabilité vasculaire conduisant à la formation d'un oedème et à l'extravasation des protéines. Ainsi, la présence d'une forte quantité de protéines dans le liquide de lavage confirme l'existence d'une éventuelle réaction inflammatoire liée aux implants.

Conformément à ce qui a été observé lors de la numération des globules blancs et le dosage des PGE2, les poches sans implant présentent une faible teneur en protéines (Figure IV.29). En présence d'implant d'alginate ou de mélange HA I-alginate, la teneur en protéines augmente faiblement par rapport aux rats témoins. Nous remarquons également que le groupe HA ICh est le seul groupe qui présente une augmentation significative de la teneur en protéines.

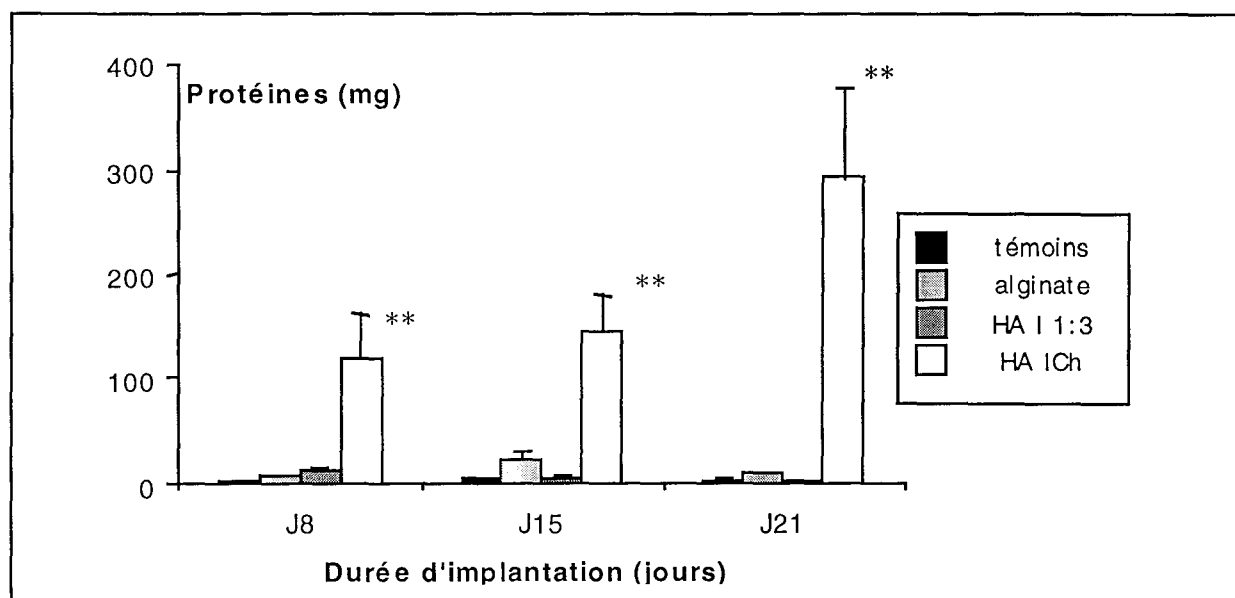


Figure IV.29 : Quantité de protéines en mg retrouvée dans l'exsudat de la poche en fonction des implants étudiés (alginate, HA I-alginate 1:3 et HA ICh). Les résultats représentent la moyenne de la quantité de protéines obtenue pour $n=5$ animaux $\pm$ SEM (écart-type divisé par la racine carrée de n) ($p<0,003$).

Conclusion

Les implants étudiés (alginate et HA I 1:3) dans la poche placée dans le dos des rats sont biocompatibles et n'induisent quasiment aucune réaction inflammatoire.

4.3.3. Biofonctionnalité

D'après Edwards et coll (1981), le modèle de la poche à air semble simuler la cavité articulaire. L'épithélium de la poche est capable, tout comme la membrane synoviale dans l'articulation, de synthétiser l'acide hyaluronique et des glycosaminoglycanes (GAGs). Bien que de nature et de teneur différentes, dans ces 2 systèmes (les GAGs présents au niveau de l'articulation sont essentiellement des kératanes sulfates et des chondroïtines sulfates alors que dans la poche à air il s'agit de dermatanes sulfates), ces deux critères (GAGs et HA) peuvent être considérés comme des paramètres biologiques caractérisant la biofonctionnalité des implants.

Dosage des glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs)

La Figure IV.30 montre l'évolution de ces GAGs en fonction du temps d'implantation.

La teneur en GAGs des rats témoins est inférieure à celle des autres rats et varie peu en fonction du temps. La présence d'implants d'alginate et HA I-alginate, n'induit pas une production importante en GAGs. Dans le cas, du groupe HA ICh, cette teneur augmente en fonction du temps et est statistiquement différente du groupe témoin probablement en raison de la présence des chondrocytes dans le gel d'alginate.

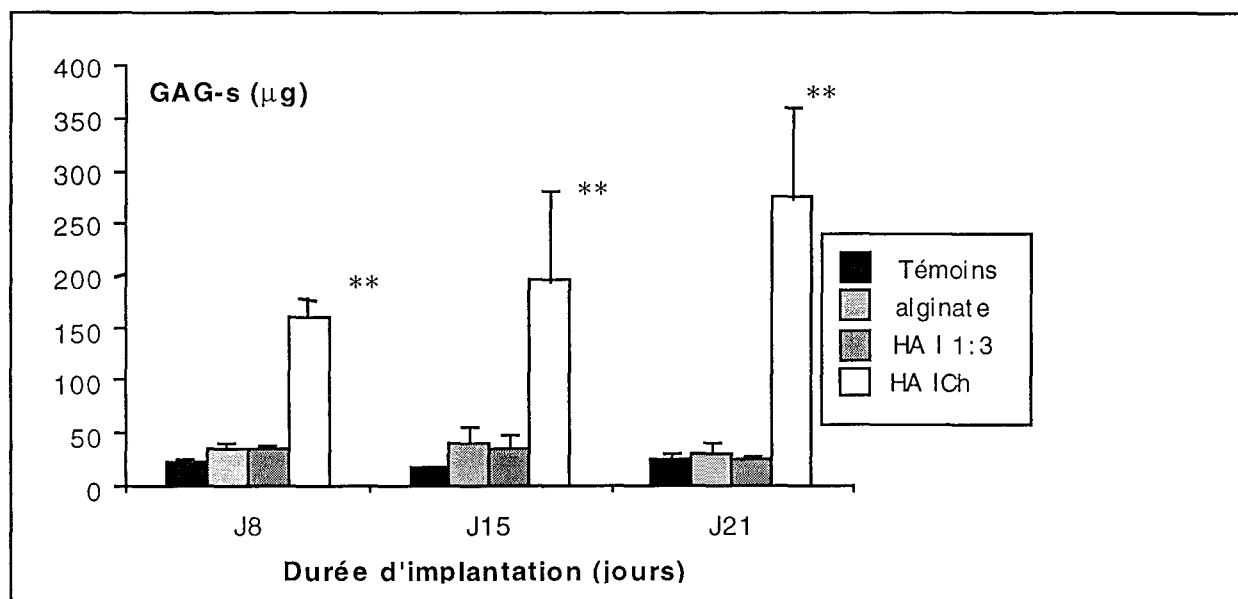


Figure IV.30 : Quantité (µg) de GAGs totaux retrouvée dans l'exsudat de la poche en fonction des implants étudiés (alginate, HA I-alginate 1:3 et HA ICh). Les résultats représentent la moyenne de la quantité de GAGs totaux obtenue pour $n=5$ animaux $\pm$ SEM (écart-type divisé par la racine carrée de n) ($p<0,006$).

Dosage de l'acide hyaluronique

Le groupe des rats non implantés ne montre pas de variation de la teneur en hyaluronate et ceci quel que soit le temps considéré. Une forte quantité de hyaluronate est retrouvée dans l'exsudat de la poche des rats ayant reçu le gel HA I-alginate 1:3 et le gel d'HA ICh-alginate 8 jours après l'implantation (Figure IV.31). Pour des durées d'implantation de 15 ou 21 jours, ce taux de hyaluronate diminue pour les deux lots d'animaux. Le pic de hyaluronate obtenu à 8 jours pourrait parvenir de l'apport de hyaluronate par les matrices implantées puisque dans le même temps une matrice d'alginate non enrichie en hyaluronate ne présente pas ce phénomène. Au temps J15, seule la matrice d'alginate entraîne une augmentation du taux de hyaluronate dans l'exsudat qui se stabilise à J21.

Pour les implants contenant du hyaluronate avec ou sans chondrocytes, ce taux reste faible suggérant une dégradation plus importante du hyaluronate soit par des systèmes enzymatiques soit par la présence de radicaux libres dans l'exsudat.

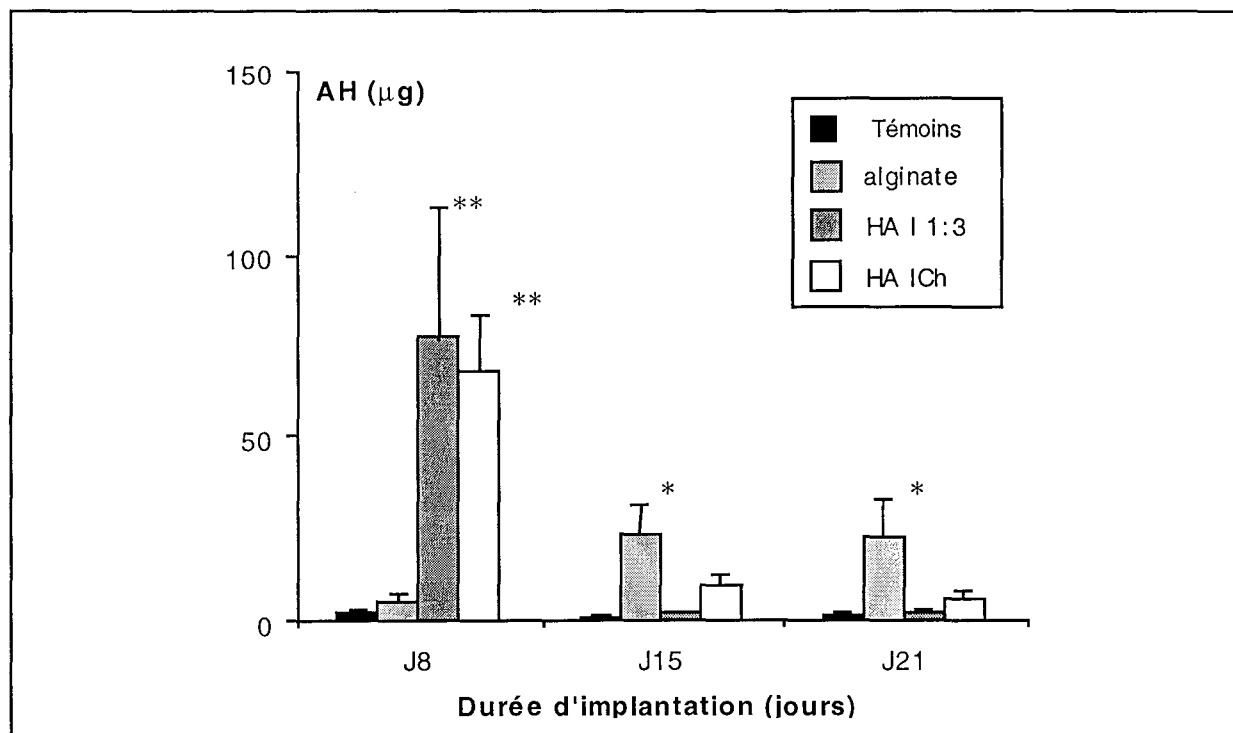


Figure IV.31 : Quantité d'acide hyaluronique, retrouvée dans l'exsudat de la poche en fonction des implants étudiés (alginate, HA I-alginate 1:3 et HA ICh). Les résultats représentent la moyenne de la quantité d'acide hyaluronique obtenue pour $n=5$ animaux $\pm$ SEM (écart-type divisé par la racine carrée de n) ($p<0,135$).

En conclusion, cette étude préliminaire *in vivo* réalisée sur un petit nombre d'animaux a montré que les implants d'alginate enrichi en HA I et les implants d'alginate seul ne présentaient pas un caractère inflammatoire significatif par rapport aux animaux témoins.

Par ailleurs, le choix des paramètres biochimiques que nous avons fait s'est avéré justifié pour mettre en évidence l'éventuelle incompatibilité des implants. En effet, le lot témoin positif ayant reçu des chondrocytes hétérologues a toujours répondu significativement par rapport au lot témoin quelle que soit la durée de l'implantation.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Les lésions ostéochondrales apparaissent lors de chocs traumatiques et leur réparation spontanée évolue généralement vers un cartilage fibreux. Dans ce travail, nous avons cherché à élaborer un biomatériau capable de servir de tuteur à la réparation cartilagineuse, possédant les propriétés chondro-inductrices nécessaires à l'obtention d'un tissu proche du cartilage. Pour cela deux polysaccharides ont été associés : l'alginate, pour ses propriétés structurantes, et le hyaluronate, pour ses propriétés visco-élastiques et biologiques.

Lors d'une première étude, nous avons mis en évidence, par dichroïsme circulaire et par des mesures rhéologiques, l'existence d'interactions, certes faibles, entre les deux polysaccharides en solution diluée et concentrée. La déacétylation du hyaluronate, visant initialement à renforcer cette association par la création de liaisons ioniques entre ses fonctions amines ainsi libérées et les groupes carboxyliques de l'alginate a conduit à une dépolymérisation empêchant ainsi de renforcer de façon significative les interactions.

Les mélanges de polysaccharides à différents rapports de concentration ont permis la formation de gels hybrides par gélification calcique. Les mesures rhéologiques des gels solides ont montré une diminution de la dureté des gels d'alginate lors de l'introduction de hyaluronate. En effet, un réseau polysaccharidique plus lâche et une augmentation de la taille des pores sont observés dans ces conditions lors des mesures en microscopie électronique à transmission ; ces caractéristiques sont d'autant plus marquées que le poids moléculaire du hyaluronate est élevé.

Les gels hybrides obtenus ont une stabilité compatible avec une utilisation dans une cavité articulaire, ainsi que nous l'avons évaluée par la libération du hyaluronate hors de la matrice formée. L'étude de cytocompatibilité, réalisée sur des chondrocytes de rat, a montré un effet bénéfique du hyaluronate sur la prolifération et la viabilité cellulaires. L'ensemble des résultats obtenus a permis de choisir les polysaccharides en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, et leurs proportions massiques au sein d'un gel hybride. Ils nous ont permis de proposer l'utilisation d'alginate de moyenne viscosité et de hyaluronate de plus haut poids moléculaire disponible, en proportion 1:3, pour réaliser une étude de biocompatibilité dans un modèle expérimental de poche à air chez le rat. Celle-ci a confirmé l'absence de réaction inflammatoire induite par les gels hybrides. Il est donc tout à fait possible de prévoir alors une utilisation future en implantation dans un modèle de lésion ostéochondrale chez l'animal.

Un résultat particulier a été observé, tant *in vitro* qu'*in vivo*, dans l'apparition, dans des conditions physiologiques, d'une rigidification du biomatériau (matrice blanchâtre insoluble), que nous supposons provenir d'une réaction complexe entre les constituants mis en présence (polysaccharides, protéines et calcium), dont l'origine exacte méritera d'être approfondie.

Néanmoins, cette rigidification du matériau est un élément important pour un bon comblement de la lésion sur une durée compatible avec sa réparation.

Cependant, les matrices hybrides que nous avons ainsi préparées ne présentent pas toutes les caractéristiques physico-chimiques escomptées pour permettre une réhabilitation cellulaire. La taille des pores, en particulier, si elle permet aux cellules déjà présentes de survivre en conservant leur phénotype, interdit malgré tout une invasion de cellules depuis le milieu environnant. Ces travaux doivent donc être poursuivis par le développement d'une technique de gélification qui augmenterait la taille de pores par la formation d'"éponges" de porosité modulable comme proposé par Shapiro et Cohen (1997) pour l'alginate. Une deuxième perspective intéressante consisterait à introduire des cellules autologues dans la matrice afin de reconstituer *in vitro* une structure cartilagineuse proche de celle rencontrée *in vivo*.





REFERENCES

- Adeylotte M.B., Michal L.E., Reid D.R., Schumacher B.L.
Chondrocytes from the articular surface and deep zone express different, but stable, phenotypes in alginate gel culture.
Trans. Orthop. Res. Soc. 1996, 21 : 317
- Afoke N.Y., Byers P.D., Hutton W.C.
Contact pressures in the human hip joint
J. Bone Joint Surg., 1987 69: 536-541.
- Aiedeh K., Gianasi E., Orienti I., Zecchi V.
Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin.
J. Microcapsul. 1997, 14 (5) : 567-576.
- Aldrich B.I.
The effects of the hyaluronic acid complex on the distribution of ions.
Biochem. J. 1958, 70 : 236-244.
- Athanasίου K.A., Rosenwasser M.P., Busckwalter J.A., Malinin T.I., Mow V.C.
Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage.
J. Orthop. Res. 1991, 9 : 330-340.
- Athanasίου K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M.
Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers.
Biomaterials 1996, 17 : 93-102.
- Atkins E.D.T., Mackie W., Smolko E.E.
Crystalline structures of alginic acids.
Nature 1970, 225 : 626-628.
- Atkins E.D.T., Phelps C.F., Sheehan J.K.
The conformation of the mucopolysaccharides.
Biochem. J. 1972, 128 : 1255-1263.
- Atkins E.D.T., Niedusynski I.A., Mackie W., Parker K.D., Smolko E.E.
Structural components of alginic acid. I. The crystalline structure of poly- β -D-mannuronic acid results of X-Ray diffraction and polarized Infrared studies.
Biopolymers 1973, 12 : 1865-1878.
- Atkins E.D.T., Niedusynski I.A., Mackie W., Parker K.D., Smolko E.E.
Structural components of alginic acid. II. The crystalline structure of poly- α -L-guluronic acid results of X-Ray diffraction and polarized Infrared studies.
Biopolymers 1973, 12 : 1879-1887.
- Baker B., Becker R.O., Spadaro J.
A study of electrochemical enhancement of articular repair.
Clin. Orthop. 1974, 102 : 251-267.
- Balazs E.A.
Physical chemistry of hyaluronic acid.
Fed. Proc. 1958, 17 : 1086-1092.
- Balazs E.A., Denlinger J.L.
The role of hyaluronic acid in arthritis and its therapeutic use.
In : Peyron J.G. ed. Osteoarthritis. Current clinical fundamental problems. Geigy. Paris. 1985; 165-174.
- Balazs E.A., Denlinger J.L.
Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis.
J. Rheum. 1993, 20 : 3-9.
- Balazs E.A., Leshchiner E., Larsen N.E., Band P.

Applications of hyaluronan and its derivatives.

In : Gebelein C.G. Ed. Biotechnological Polymers. 1993 : 41-65.

Bernatchez S.F., Merkali A., Tabatabay C., Gurny R., Zhao QH, Anderson J.M., Heller J.

Biotolerance of semi-solid hydrophobic biodegradable poly(ortho)ester for controlled drug delivery.

J. Biomed. Mater Res. 1993, 27 (5) : 677-681.

Blair S.D., Jarvis P., Salmon M., NeCollum C.

Clinical trial of calcium alginate haemostatic swabs.

Br. J. Surg. 1990, 77 : 568-570.

Bodmeier R., Paeratakul O.

A novel multiple-unit sustained release indomethacin-hydroxypropyl methylcellulose delivery system prepared by ionotropic gelation of sodium alginate at elevated temperature.

Carbohydr. Polym. 1991, 16 : 399-408.

Boisson-Vidal C., Haroun F., Ellouali M., Blondin C., Fischer A.M., De Agostini A., Jozefonvicz J.

Biological activities of polysaccharides from marine algae.

Drugs Fut. 1995, 20 (12) : 1237-1249.

Bordji K., Payan E., Oerther S., Baptiste D., Cipolletta C., Jouzeau J.Y., Mainard D., Netter P.

Un nouveau matériau de comblement obtenu par culture tridimensionnelle de chondrocytes dans différentes matrices alginiques : intérêt d'associer l'alginate de calcium au hyaluronane.

in Actualité en Biomatériaux, Rommilat, Paris. 1998.

Boury F., Marchais H., Proust J.E., Benoit J.P.

Bovine serum albumin release from poly(α -hydroxy acid) microspheres: Effects of polymer molecular weight and surface properties.

J. Contr. Rel. 1997; 45 : 75-86.

Bothner H., Wik O.

Rheology of hyaluronate.

Acta Otolaryngol. 1987, 442 : 25-30.

Boyd J., Turvey J.R.

Isolation of poly-a-L-gulonate lyase from klebsiella aerogenes.

Carbohydr. Res. 1978, 57 : 163-171.

Brandrup J., Immergut E.H.

Polymer Handbook, 3rd Edition, J. Wiley and Sons, New-York. 1989.

Bruckner P., Van der Rest M.

Structure and function of cartilage collagens

Microsc. Res. Technique 1994, 28 : 378-384.

Buckwalter J.A., Lohmander S.

Current concepts review. Operative treatment of osteoarthrosis. Current practice and future development.

J. Bone and Joint Surg. 1994, 76-A : 1405-1418.

Buckwalter J.A., Mankin H.J.

Articular Cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions.

J. Bone Joint Surg. 1998, 79-A (4) : 600-611.

Bueche, F.

Influence of rate of shear on the apparent viscosity of A-Dilute polymer solutions, and B - bulk polymers.

J. Chem. Phys. 1954, 22 : 1570- 1576.

Burd D.A.R., Greco R.M., Regauer S., Longaker M.T., Siebert J.W., Garg H.G.

Hyaluronan and wound healing: a new perspective.

Br. J. Plast. Surg. 1991, 44 : 579-584.

- Carslaw H.S., Jaeger J.C.
 "Conduction of Heat in Solids", 2nd Edition, Clarendon Press, Oxford. 1959.
- Chakrabarti B.
 Effect of counterions on the conformation of hyaluronique acid.
 Arch. Biochem. Biophys. 1977, 180 : 146-150.
- Chakrabarti B., Balazs E.A.
 Optical properties of hyaluronic acid: UV circular dichroism and optical rotatory dispersion.
 J. Mol. Biol. 1973, 78, 135-141.
- Chun L.E., Koob M.T.J., Eyre D.R.
 Quantative of hyaluronic acid in tissues by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography of oligosaccharide cleavage products.
 Anal. Biochem. 1988, 171 : 197-206.
- Chung L.Y., Schmidt R.J., Hamlyn P.F., Sagar B.F., Andrews A.M., Turner T.D.
 Biocompatibility of potential wound management products: Fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture.
 J. Biomed. Mater. Res. 1994, 28 : 463-469.
- Cleland R.L., Wang J.L.
 Ionic polysaccharides . 3 : dilute solution of hyaluronic acid fractions
 Biopolymers 1970, 9 (7) : 799-810.
- Couarraze G., Grossiord J.L.
 Initiation à la rhéologie, Lavoisier, Paris. 1991.
- Crousier J.P
 Corrosion aqueuse des matériaux métalliques
 In : Biomécaniques orthopédique. Ed.Masson. France. 1987.
- Dahl, L.B., Laurent, T.C., Smidsrod, B.
 Preparation of biologically intact radioiodinated hyalutonan of high specific radioactivity: coupling of ¹²⁵I-Tyranine-cellobiose to amino groups after partial N-deacetylation.
 Anal. Biochem. 1988, 175 : 397-407.
- Della Valle F., Romeo A., Hirsch M.R.
 Eur.Patent Applied , 87401464.0.
- Den Dunnen W.F.A., Robinson P.H., Van Wessel R., Pennings A.J., Van Leeuwen M.B.M., Schakenraad J.M.
 Long-term evaluation of degradation and foreign-body reaction of subcutaneously implanted poly(DL-Lactide- ε -caprolactone).
 J. Biomed. Mater. Res. 1997; 36 : 337-346.
- De Palma A.F., Mac Keever C.D., Sudin D.K.
 Process of repair articular cartilage demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine.
 Clin. Orthop. 1962, 22 : 217-233.
- Downes S., Archer R.S., Kayser M.V., Patel M.P., Braden M.
 The regeneration of articular cartilage using a new polymer system.
 J. Mater. Sci. Mater. Med. 1994, 5 : 88-95.
- Dragnet K.I., Skjak-Braek G., Smidsrod O.
 Alginate based new materials.
 Int. J. Biol. Macromol. 1997, 21 : 47-55.
- Edwards JCW, Sedgwick A.D., Willoughby D.A.
 The formation of a structure with features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture
 J. Pathol. 1981, 134 : 147-156

- Fischer F.G., Dörfel H.
Polyuronic acids of brown algae
Z. Physiol. Chem. 1955, 30 : 186-205.
- Freed L.E. Marquis J.C., Nohria A., Emmanuel J., Mikos A.G., Langer R.
Neocartilage formation in vitro and in vivo using cell culture on synthetic biodegradable polymers.
J. Biomed. Mat. Res. 1993, 27 : 11-23.
- Freeman M.A.
Adult articular cartilage.
Pitman Medical. Tunbridge Wells. 1979
- Fuonfuchat A., Jamieson A.M., Blackwel J., Gerken T.A.
Rheological studies of the interaction of mucins with alginate and polyacrylate.
Carbohydr. Res. 1996, 284 : 85-99
- Fuoss R.M.
Viscosity function for polyelectrolytes.
J. Polym. Sci. 1948, 3 : 603-604.
- Furakawa T, Eyre D.R., Koide S., Glimcher M.J.
Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee.
J. Bone Joint Surg. 1980, 62A : 79-89
- Gacesa P.
Alginates.
Carbohydr. Polym. 1988, 8 : 161-162.
- Goa K.L., Benfield P.
Hyaluronic acid: A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophtalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing.
Drugs 1994, 47 (3) : 536-566.
- Golub M.A.
Viscosity of natural rubber solutions at very low rates of shear.
Can. J. Chem. 1957, 35 : 381-387.
- Graham D.Y., Lanza F., Dorsch E.R.
Symptomatic reflux esophagitis: a double-blind controlled comparison of antacids and alginate.
Curr. Therap.Res. 1997, 22 (5) 653-658.
- Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A., Smith P.J.C., Thom D.
Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model.
FEBS Lett. 1973, 32 (1) : 195-198.
- Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O.
Carbone -13 NMR studies of alginate.
Carbohydr. Res. 1977, 56 : C11-C15.
- Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O.
A proton magnetic resonance study of the composition and sequence of uronate residues in alginates.
Carbohydr. Res. 1979, 68 : 23-31.
- Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O.
Carbone -13 NMR studies of monomeric composition and sequences in alginate.
Carbohydr. Res. 1981, 89 : 179-191.
- Grasdalen H.
High-field, proton NMR spectroscopy of alginate : sequential structure and linkage conformations.
Carbohydr. Res. 1983, 118 : 255.
- Guss J.M., Hukins D.W., Smith P.J., Winter W.T., Arnott S.

- Hyaluronic acid: molecular conformations and interaction in two sodium salts.
J. Mol. Biol. 1975, 95: 359-384.
- Guo J, Jourdian G.W., MacCallum D.K.
Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads.
Connect. Tis. Res. 1989, 19 : 277-297.
- Gutowska A., Bark J.S., Kwon I.C., Bae Y.H., Cha Y., Kim S.W.
Squeezing hydrogels for controlled oral drug delivery.
J. Contr. Rel. 1997; 48 : 141-148.
- Hadler N.M., Napier M.A.
Structure of hyaluronic acid in synovial fluid and its influence on the movement of solutes.
Semin. Arthrit. Rheum. 1977, 7 (2) : 141-152.
- Hardingham T., Venn G.
Réparation du tissu articulaire après exposition à l'interleukine 1.
La revue du Praticien. 1996, 46 : S 37-41.
- Haug A., Smidsrod O.
Determination of intrinsic viscosity of alginates.
Acta Chem. Scand. 1962, 16 : 1569-1578.
- Haug A., Larsen B., Smidsrod O.
Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid.
Acta Chem. Scand. 1967, 21 : 691-704.
- Heinegard D.K., Pimentel E.R.
Cartilage matrix proteins.
In Kuettner K.E., Schleyerbach R., Peyron J.G. and Hascall V.C. eds. In Articular Cartilage Osteoarthritis. New York. 1992, 95-111.
- Hildebrand A., Romaris M., Ramussen L.M., Heinegard D., Twardzik D.R., Border W.A., Ruoslahti E.
Interaction of the small interstitial proteoglycan biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta.
Biochem. J. 1994, 302 : 527-534.
- Höök M., Riesenfeld J., Lindahl U.
N-(3H)acetyl-labelling, a convenient method for radiolabelling of glycosaminoglycans.
Anal. Biochem. 1982, 119 : 239-245.
- Huang-Lee L.L.H., Nimni M.E.
Fibroblast contraction of collagen matrices with and without covalently bound hyaluronan.
J. Biomater. Sci. Polym. Edn. 1993, 5 (1-2) : 99-109.
- Indergaard M. Skjak-Braek G.
Hydrobiologia 1987, 151-152 : 541-549.
- Jay G.D. Hong B.S.
Characterization of bovine synovial fluid lubricating factor. I. Chemical surface activity, and lubricating properties.
Connect. Tiss. Res. 1992; 28 : 71-88.
- Johnson, W.C
The circular dichroism of carbohydrates.
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1987, 45 : 73-124.
- Johnson S.A.
Joint anatomy, physiology and pathobiology.
Osteoarthritis 1997, 27 (4) : 699-723.
- Jouzeau J.Y., Payan E., Gillet P., Pere P., Netter P., Gaucher A.
Clinical significance of hyaluronan in rheumatic diseases
Arthritis and Rheumatism, 1992, 35, 1253-1254

- Juhlin L.
Hyaluronan in skin
J. Inter. Medicine 1997, 242 : 61-66.
- Kaufman M., Boelle A., Pécile I.
Brevet 1992, FR 2 699 545.
- Kessler F.B., Honsy C.A., Berkeley M.E., Anderson M.S., Prewitt J.M.
Obliteration of traumatically induced articular surface defects using a porous implant.
J. Hand. Surg. 1980, 4 : 328-337.
- Klein J., Stock J., Vorlop K.D.
Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts
Eur. J. Appl. Microbiol. 1983, 18 : 86-91
- Klompmaier J., Jansen H.W., Veth R.P., Nielsen H.K., De Groot J.H., Pennings M.J.
Porous polymer implant for repair of full-thickness defects of articular cartilage : an experimental study in rabbit and dog.
Biomaterials 1992, 13 (9) : 625-634.
- Kon M., De Visser A.C.
A poly(HEMA) sponge for restoration of articular cartilage defects.
Plast. Reconstr. Surg. 1981, 3 : 289-294.
- Kovach I.S.
A molecular theory of cartilage viscoelasticity
Biophys. Chem. 1996, 59 : 61-73.
- Kuettner K.E.
Cartilage integrity and homeostasis.
In : Klippel J.H., Dieppe P.A. eds. Rheumatology. London. 1994, 6.1-6.16.
- Kuettner K.E., Aydelotte M.B., Thonar E.J.
Articular cartilage matrix and structure : a minireview
J. Rheumatol. Suppl. 1991, 27 : 46-48.
- Larsen N.E., Balazs E.A.
Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives.
Adv. Drug Deliv. rev. 1991, 7 : 279-293.
- Laurent, T.C.
Biochemistry of hyaluronan.
Acta Otolaryngol. 1987, 442 : 7-24.
- Laurent T.C., Fraser J.R.E.
Hyaluronan.
FASEB J. 1992, 6 : 2397-2404.
- Lawrence J.E., Blake G.B.
A comparison of calcium alginate and scarlet red dressings in the healing of split thickness skin graft donor sites.
Br. J. Plast. Surg. 1991, 44 : 247-249.
- Linn F.C., Radin E.L.
Lubrication of animal joints. III. The effect of certain chemical alterations of the cartilage and lubricant.
Arthritis Rheum. 1968, 11 : 674-682.
- Lohmander L.S., Larck M.W., Sandy S.D.
Mécanismes de la dégradation des agrécannes dans le cartilage arthrosique.
La revue du praticien 1996, 46 S11-14.
- Lotz M., Blanco F.J., von Kempis J., Dudler J., Maier R., Villiger P.M., Geng Y.
Cytokine regulation of chondrocyte functions.
J. Rheumatol. 1995, supplement 43 : 104-108.

- Mackie W.
Semi-quantitative estimation of the composition of alginates by infra-red spectroscopy.
carbohydr. res. 1971, 20 : 413-415.
- Macro M.
Physiopathologie de l'arthrose
Synoviale 1993 22 : 16-28.
- Maheu E.
Hyaluronan in knee osteoarthritis : a review of the clinical trials with hyalgan®.
Eur. J. Rheumatol. Infl. 1995; 15 (1) 17-24.
- Mainard D., Netter P.
Possibilité de réparation des lésions ostéochondrales par les biomatériaux.
Cahiers d'enseignement de la Sofcot, 1997, 76-94.
- Mainard D., Delagoutte J.P., Lochon P., Benichoux R., Cuny J.
Réparation d'une lésion ostéochondrale par un biomatériau poreux (Porimid). Etude expérimentale et premiers résultats cliniques.
Rev. Chir. Orthop. 1991, 77 (1) : 159-160.
- Mankin H.J.
The response of articular cartilage to mechanical injury
J. Bone Joint Surg. 1982, 64, 113 (3) : 460-466.
- Mankin H.J., Brandts K.D.
Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis.
In : Moskowich R.W., Howell DS, Golberg V.M., Mankin H.J. eds. Osteoarthritis. Diagnosis and management. saunders. Philadelphia. 1992.
- Maroudas A.
Determination of the rate of glycosaminoglycan synthesis in vivo using radioactive sulfate as tracer : comparison with in vitro results.
In : Maroudas A. Kuettner K. eds. Methods in cartilage research. Academic Press. New York. 1990; 143-148.
- Martini A, Cimino A., Drusian A., Ferretti R.G., Magnolfi G. et al.
Combined use of hyaluronic acid in tympanic membrane repair. A multicenter clinical trial vs placebo.
Abstract. Presented at the fifth International symposium on recent advances in otitis media. Fort Lauderdale. 1991.
- Martinsen A., Skjak-Braek G. Smidsrod O.
Alginate as immobilization material: I. Correlation between Chemical and physical properties of alginate gel beads.
Biotechnol. Bioeng. 1989, 33 : 79-89.
- Martinsen A., Skjak-Braek G., Smidsrod O. Zanetti F., Paoletti S.
Comparison of different methods for the determination of molecular weight distribution of alginates.
Carbohydr. Polym. 1991, 15 : 171-193.
- Matsumoto T., Kawai M., Masuda T.
Rheological properties and fractal structure of concentrated polyion complexes of chitosan and alginate.
Biorheol. 1993, 30 : 435-441.
- Matthews M.B., Decker L.
Conformation of hyaluronate in neutral and alkaline solutions.
Biochim. Biophys. Acta 1977, 498 : 259-263.
- Maynes R.
Structure and function of collagen.

In Arthritis and allied Conditions. Koopmann W.J. Ed 13, Williams et Wilkins Eds, Baltimore 1997, 1969.

Mc Govern J.G., Garvin C.P., Jones D.S., Woolfson A.D., Gorman S.P.
Modification of biomaterial surface characteristics by body fluids in vitro.
Int. J. Pharm. 1997; 149 : 251-254.

Messner K., Gillquist J.
Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle : a biomedical and histological evaluation in the rabbit knee.
Biomaterials, 1993 14 (7) : 513-521.

Meyer K., Palmer J.W. .
The polysaccharide of the vitreous humor.
J. Biol. Chem. 1934, 237 : 629-634.

Midoux N.
Mécanique et rhéologie des fluide en génie chimique.
Tec. Doc. Lavoisier, Paris 1993.

Miki T. Imai Y.
Osteoinductive potential of freeze dried biodegradable poly(glycolic-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphologic protein in skull defects of rats.
Int J. Oral Maxillofac. Surg. 1996, 25 (5) : 402-406.

Min K.H., Sasaki S.F., Kashiwabara Y., Umekawa M., Nisikawa K.
Fine structure of SMG alginate fragmentation in light of its regeneration by alginate lyases of pseudomonas sp.
Carbohydr. Res. 1977, 81 : 555-562.

Miyazaki S., Nakayama A., Oda M., Takada M., Attwood D.
Chitosan and sodium alginate based bioadhesive tablets for intraoral drug delivery.
Biol. Pharm. Bull. 1994, 17 (5) 745-747.

Morales T.I.
The role of signaling factors in articular cartilage homeostasis and osteoarthritis.
In : Kuettner K.E. and Golberg V.M. eds. Osteoarthritis Disorders The American Academy of Orthopaedic Surgeons. Illinois. 1995; 261-270.

Morris E.R., Rees D.A., Thom D.
Characterization of polysaccharide structure and interactions by circular dichroism: order-disorder transition in the calcium alginate system.
J. Chem. Soc. 1973, 63 : 245-247.

Morris E.R., Rees D.A., Welsh E.J.
Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions.
J. Mol. Biol 1980, 138 : 383-400.

Muir H.
The chondrocytes, architect of cartilage.
BioEssays 1995, 17 (12) : 1039-48.

Murata, Y., Miyamoto, E. Kawashima, S.
Additive effect of chondroitin sulfate and chitosan on drug release from calcium-induced alginate gel beads.
J. Control. Release. 1996, 38 : 101-108.

Oegema T.R., Thompson R.C. Jr.
Histopathology and pathobiochemistry of the cartilage-bone interface in Osteoarthritis.
In : Kuettner K.E. and Golberg V.M. eds. Osteoarthritis Disorders The American Academy of Orthopaedic Surgeons. Illinois. 1995; 205-217.

Oloyede A., Broom N.
Stress-sharing between the fluid and solid components of articular cartilage under varying rates of compression.

Conn. Tiss. Res. 1993, 30 : 127-141.

Onsoyen E.

Commercial applications of alginates.

Carbohydr. Eur. 1996, 14 : 26-31.

Pachence J.M.

Collagen-based devices for soft tissue repair.

J. Biomed. Mater. Res. 1996, 33 : 35-40.

Paige K.T., Cima L.G., Yaremchuk M.J., Scloo B.J., Vacanti J.P., Vacanti C.A.

De novo cartilage generation using calcium alginate chondrocytes constructs.

Plast. Surg. Reconstr. 1996, 97 (1) : 168-178.

Panduranga Rao K.

Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems.

J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 1995, 7 (7) : 623-645.

Park J.W., Chakrabarti B.

Acid-base and optical properties of heparin.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 1977, 78 (2) : 604-608.

Park J.W., Chakrabarti B.

Conformational transition of hyaluronic acid carboxylic group participation and thermal effect.

Biochim. biophys. Acta 1978, 541 : 263-269.

Payan E., Jouzeau J.Y., Lapique F., Muller N., Payan J.P., Gegout P., Bertin P., Netter P.

Assay of synovial fluid hyaluronic acid using high performance liquid chromatography of hyaluronidase digests.

J. Chrom. 1991, 566 : 9-18.

Payan E.

Acide hyaluronique et physiopathologie articulaire.

These Nancy I, 1993.

Penman A., Sanderson G.R.

A method for the determination of uronic acid sequence in alginates.

Carbohydr. Res. 1972, 25 : 273-282

Perrier J.J.

Rebâtir les tissus.

Biofutur 1997, 171, 18-20.

Peyron J., Stanescu V.

Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement.

Encyclopédie Médico-Chirurgicale 1994; 14-003-A-10.

Piskin E.

Biodegradable polymers as biomaterials.

J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 1994; 6 (9) : 775-795.

Poole A.R.

Imbalances of anabolism and catabolism of cartilage matrix components in osteoarthritis.

In : Kuettner K.E. and Golberg V.M. eds. Osteoarthritis Disorders The American Academy of Orthopaedic Surgeons. Illinois. 1995; 247-260.

Poole A.R

Articular cartilage chondrons: form, function and failure.

J. Anat. 1997, 191 : 1-13.

Puelacher W.C., Mooney D., Langer R., Upton J., Vacanti J.P., Vacanti C.A.

design of nasoptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes.

Biomaterials 1994, 15 (10) : 774-778.

- Radin E.L., Eurlach M.G., Cher Nack R., Abernethy P., Paul L., Rose M.L.
Effect of repetitive impulsive loading on the knee joint of rabbits
Clin. Orthop. 1978, 131, 288-293.
- Rajaonarivony M., Vauthier C., Couarraze G., Puisieux F., Couvreur P.
Development of a new drug carrier made from alginate
J. Pharm. Sci. 1993, 82 : 912-917
- Ranshaw J.A.M., Werkmeister J.A., Glattauer V.
Collagen-based biomaterials.
Biotechnol. Gen. Eng. Rev. 1995; 13 : 335-382.
- Rees D.A.
Shapely Polysaccharides.
Biochem. J. 1972, 126 : 257-273
- Rees D.A., Welsch E.J.
Secondary and tertiary structure of polysaccharides in solutions and gels.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1977, 16 : 214-224.
- Rehm B.H., Valla S.
Bacterial alginates: Biosynthesis and applications.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997, 48 : 281-288.
- Reynolds E.S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol. 1963, 17 : 208-212.
- Robinson D., Halperin N., Nevo Z.
Regenerating hyaline cartilage in articular defects of old chickens using implants of embryonal chick chondrocytes embedded in a new natural delivery substance.
Calcif. Tissue Int. 1990, 46 : 246-253.
- Rubin J.P., Yaremchuk M.J.
Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: A comprehensive review of the literature.
Plast. Reconstr. Surg. 1997, 100 (5) : 1336-1353.
- Sakurai K., Ueno Y., Okuyama T.
Crosslinked hyaluronic acid and its use
US Patent 1987, Nr 4.716.224
- Salter R.B., Simmonds D.F., Malcom B.W., Rumble E.J., Mac Michael D.
The effects of continuous passive motion on the healing of articular cartilage defects : an experimental investigation in the rabbits.
J. Bone Joint Surg. 1975, 57A : 570-571
- Saito, H., Yamagata, T., Suzuki, S.
Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates.
J. Biol. Chem. 1968, 243 : 1536-1542.
- Schultz R.J., Krishnamurthy S., Thelmo W., Rodriguez J.E., Harvey G.
Effect of varying intensities of laser energy on articular.
Laser Surg. Med. 1985, 5 : 577-588.
- Sedel L.
Prothèses ostéo-articulaires et biomatériaux.
Grandes thérapies rhumatologiques, Flammarion, 1995.
- Segi N., Yotsuyanagi T., Ikeda K.
Interaction of calcium-induced alginate gel beads with propranolol.
Chem. Pharm. Bull. 1989, 37 : 3092-3095.
- Shapiro F., Koide S., Guincher M.J.
Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage.

J. Bone Joint Surg. 1993, 75A (4) : 532-553.

Shapiro L., Cohen S.

Novel alginate sponges for cell culture and transplantation
Biomaterials 1997, 18 : 583-590.

Shigemasa Y., Minami S.

Application of chitin and chitosan for biomaterials.
Biotechnol. Gen. Engineer. Rev. 1995, 13 : 383-420.

Sinquin Anne

Alginates associatifs : synthèse et étude physicochimique en milieux aqueux.
These INPL 1995.

Skjak-Braek G., Larsen B.

Biosynthesis of alginates: purification and characterization of mannuronan C-5 epimerase from
azotobacter vinelandii
Carbohydr. Res. 1985, 139 : 273-83

Skjak-Braek G., Grasdalen H., Smidsrod O.

Inhomogeneous polysaccharide ionic gels.
Carbohydr. Polym. 1989, 10 : 31-54.

Smidsrod O., Larsen B., Painter T.

Monte-Carlo investigation of nearest-neighbor autoinhibitory effects in the oxidation of amylose
by periodate ion.
Acta Chem.Scand. 1970, 24 : 3201-3212.

Smidsrod O.

Solution properties of alginate.
Carbohydr. Res. 1970, 13 : 359-372.

Smidsrod O., Draget K.I.

Chemistry and physical properties of alginates.
Carbohydr. Eur. 1996, 14 : 6-13.

Smidsrod O., Skjak-Braek G.

Alginate as immobilization matrix for cells.
Trends Biotechnol. 1990, 8 : 71-78.

Soon-Shoing P., Desai N., Sandford P., Heintz R.
PCT US 927/0364.

Speer D.P., Chvapil M., Volz R.G., Holmes M.D.

Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants
Clin. Orthop. 1979, 144 : 326-335.

Stanford E.C.C.

British patent 142. 1881.

Stickler M., Sütterlin N.

Concentration dependence of the viscosity of dilute polymer solutions: Huggins and Schutz-
Blaschke coefficients, pp 183-203.
J. Brandrup and E.H. Immergut (eds.) Polymer Handbook, 3rd edition, J. Wiley & Sons,
New-York 1989.

Stone A.L.

Optical rotatory dispersion of mucopolysaccharides and mucopolysaccharide-dye complexes.
II. Ultra violet cotton effects in the amide transition bands
Biopolymers 1969, 7 : 173-187.

Stone A.L.

Optical rotatory dispersion of mucopolysaccharides. 3. Ultra violet circular dichroism and
conformational specificity in amide groups.
Biopolymers 1971, 10 : 739-751.

- Sugawara S., Imai T., Otagari M.
The controlled release of prednisolone using alginate gel.
Pharm. Res. 1994, 11 (2). 272-277.
- Tabata Y., Ikada Y.
Synthesis of gelatin microspheres containing interferon.
Pharm. Res. 1989 6 (5) : 422-427.
- Thomas P.A., Padmaja T., Kulkarni M.G.
Polyanhydride blend microspheres: novel carriers for the controlled release of macromolecular drugs.
J. Contr. Rel. 1997, 43 : 273-281.
- Thompson R.C.
An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme response within the joint.
Clin. Orthop. 1975, 107 : 239
- Thu B., Bruheim P., Espevik T., Smidsrod O., Soon-Shiong P., Skjak-Braek G.
Alginate polycation microcapsule : I. Interactions between alginate and polycation.
Biomaterials 1996, 17 (10) : 1031-1040.
- Trippel S.B.
Growth factor actions on articular cartilage.
J. Rheumatol. Suppl. 1995, 43 : 129-132.
- Vacanti C.A., Langer R., Scloo B., Vacanti J.P.
Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation.
Plast. Reconstr. Surg. 1991, 88 (5), 753-759.
- Valentines R.C.
Contrast enhancement in the electron microscopy of virus.
Adv. Vir. Res. 1961, 8 : 287.
- Vandenbossche G.M.R., Remon J.P.
Influence of the sterilization process on alginate dispersions
J. Pharm. Pharmacol. 1993, 45 : 484-486.
- Van Susante J.L.C., Buma P., van Osch G.J.V.M., Versleyen D., van der Kraan P.M., van der Berg W.B., Homminga G.N.
Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels.
Acta. Orthop. Scand. 1995, 66 : 549-556.
- Vertel B.M.
The ins and outs of aggrecan.
Trends Cell Biol. 1995, 5 : 458-464.
- Wang J.H.
Effects of ions on the self-diffusion and structure of water in aqueous solutions.
J. Phys. Chem. 1954, 58 : 686-692.
- Winter W.T., Arnott S.
Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing.
J. Mol. Biol. 1977, 117 : 761-784
- Winter W.T., Smith P.J.C., Arnott S.
Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing.
J. Mol. Biol. 1975, 99 : 219-235
- Yotsuyanagi T., Ohkubo T., Ohhashi T., Ikeda K.
Calcium induced gelation of alginic acid and pH-sensitive reswelling of dried gels.
Chem. Pharm. Bull. 1987, 35: (4) 1555-1563.
- Yotsuyanagi T., Yoshioka I., Segi N., Ikeda K.

Effects of monovalent metal ions and propranolol on the calcium association in calcium induced alginate gel beads.

Chem. Pharm. Bull. 1990, 38: 3124-3126.

Young R.J.

Introduction to Polymers

Chapman and Hall, London. 1981.

Zignani M., Merkali A., Sintzel M.B., Bernatchez S.F., Kloeti W., Heller J., Tabatabay C., Gurny R.

New generation of poly(ortho esters): synthesis, characterization, kinetics, sterilization and biocompatibility.

J. Contr. Rel. 1997, 48, 115-129.



Nom : OERTHER

Prénom : Sandra

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

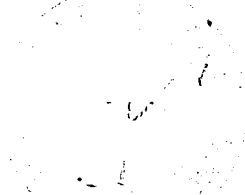
en BIOLOGIE ET SANTÉ

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 23 novembre 1998 n° 144

Le Président de l'Université


J.P. FINANCE

RESUME en français

Les lésions ostéocondrales apparaissent lors de chocs traumatiques et leur réparation spontanée évolue vers un cartilage fibreux. Dans ce travail, nous avons cherché à élaborer un biomatériau capable de servir de tuteur à la réparation cartilagineuse. Pour cela deux polysaccharides ont été associés : l'alginate, pour ses propriétés structurantes, et le hyaluronate, pour ses propriétés visco-élastiques et biologiques.

Lors d'une première étude, nous avons mis en évidence l'existence d'interactions, certes faibles, entre les deux polysaccharides en solution diluée et concentrée. Les mélanges de polysaccharides en différentes proportions ont permis la formation de gels hybrides par gélation calcique. Les mesures rhéologiques des gels solides ont montré une diminution de la dureté des gels d'alginate lors de l'introduction de hyaluronate. La déacétylation du hyaluronate, visant initialement à renforcer cette association, a conduit à une dépolymérisation, limitant de façon significative les interactions. L'étude de cytocompatibilité, réalisée sur des chondrocytes de rat, a montré un effet bénéfique du hyaluronate sur la prolifération et la viabilité cellulaires. L'ensemble des résultats obtenus a permis de proposer l'utilisation d'alginate de moyenne viscosité et de hyaluronate de haut poids moléculaire, en proportion 1:3, pour réaliser une étude de biocompatibilité dans un modèle expérimental de poche à air chez le rat. Celle-ci a confirmé l'absence de réaction inflammatoire induite par les gels hybrides. Il est donc tout à fait possible de prévoir alors une utilisation future en implantation dans un modèle de lésion ostéocondrale chez l'animal.

TITRE en anglais

Conception and evaluation of polysaccharidic biomaterials for filling of cartilage defect: Interest of alginate and hyaluronate association.

RESUME en anglais

During traumatic chocs, cartilage defect become visible and its spontaneous repair evolved a fibrous cartilage. In this work, we have search to built a scaffold biomaterial to favoured the cartilage repair. For this, we have associated two polysaccharides: alginate for its structural properties and hyaluronate for its viscoelastic and biology properties. During the first study, we have observed small interactions between the two polysaccharides in dilute and in concentrated solutions. The mixture of them in different proportions have permit to form hybrides matrices after ionic gelation. Rheologique measurement of the solide gel have schown a diminution of the hardness of the alginate gel when hyaluronate are introduced. The deacetylation of hyaluronate, to reinforced the initial association, conducted in a depolymerization of the polysaccharide wich limited the interactions between the two polymers. The cytocompatibility study, make with rats chondrocytes, have shown a benefique effect of hyaluronate on the proliferation and the viability of the cells. All of the results permit us to purpose the use of middle viscosity alginate and high molecular weight hyaluronate, in proportion 1:3, for the study of biocompatibility in rat experimental model of air pouch. This have confirmed a lack of inflammation reaction coming from the hybrides matrices. It is then, possible to think that the gel can be used for an implantation in a model of animal cartilage defect.

DISCIPLINE : Génie biologique et Médicale

MOTS CLES : Alginate, Hyaluronate, Mélanges de polysaccharides, Rhéologie, Dichroïsme circulaire, Microscopie électronique à transmission, Déacétylation, Chondrocytes, Inflammation.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR 7561 CNRS-UHP Physiopathologie et pharmacologie articulaire
Faculté de Médecine
Av. de la Forêt de Haye, BP 184
54505 Vandoeuvre les Nancy