



# Hydrogels physiques de chitosane sous forme de macro-fibres creuses et multi-membranaires : mise en oeuvre et étude microstructurale

Rocio Nohemi Rivas Araiza

► **To cite this version:**

Rocio Nohemi Rivas Araiza. Hydrogels physiques de chitosane sous forme de macro-fibres creuses et multi-membranaires : mise en oeuvre et étude microstructurale. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. <NNT : 2010LYO10049>. <tel-00880397>

**HAL Id: tel-00880397**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00880397>**

Submitted on 6 Nov 2013

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité " Matériaux polymères et composites "

Présentée et soutenue publiquement le 8 avril 2010

par

Rocio Nohemi RIVAS ARAIZA

**Hydrogels physiques de chitosane sous forme de macro-fibres creuses et multi-membranaires : Mise en œuvre et étude microstructurale**

Directeur de thèse : M. Laurent David

JURY :	M. Cyrille Rochas	Président
	Mme. Catherine Faur	Rapporteur
	Mme. Françoise Quignard	Rapporteur
	M. Éric Guibal	Examineur
	M. Laurent Vachoud	Examineur



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD — LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Études et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

## **M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Institut Universitaire de Technologie A

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut Universitaire de Technologie B

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M R. Bernard



# Remerciements

Ce travail s'est déroulé dans le Laboratoire des Matériaux Polymères et Biomatériaux (CNRS UMR 5223), dirigé par M. Philippe CASSAGNAU.

J'exprime toute ma reconnaissance au *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia* du Mexique (CONACYT) pour la bourse doctorale (No. Bourse : 171545) qu'il m'a accordé. Je remercie également le LMPB pour l'aide financière reçue à la fin de ma thèse.

Je tiens à remercier les encadrants de cette thèse, M. Laurent DAVID et M. Alain DOMARD, pour m'avoir guidé et encouragé pendant toute la durée de ma thèse, pour leur disponibilité et leur enthousiasme, et surtout pour m'avoir appris que les choses simples sont les plus intéressantes et que la réussite passe par la rigueur scientifique.

Un grand merci à Mme. Françoise QUIGNARD et à Mme. Catherine FAURE pour avoir accepté la responsabilité de rapporteur, ainsi que pour leur esprit critique.

Je remercie M. Cyrille ROCHAS pour ses précieuses remarques et explications, pour son énergie et implication dans cette étude ainsi que pour son sens du partage de connaissances scientifiques.

Je tiens à remercier M. Laurent VACHOUD et M. Éric GUIBAL d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'ajoute un remerciement particulier à ce dernier pour avoir apporté des corrections détaillées au manuscrit de ma thèse.

Pour leur grande disponibilité et leur implication dans la réalisation de ce travail, je remercie M. Pierre ALCOUFFE, M. Jean Michel LUCAS, M. Flavien MELIS et Mme. Agnès CREPET.

Pour tous les bons moments passés ensemble lors des longues journées de travail, je remercie Agnès, Jean-Mi, Thierry, Olivier, Sylvie, Mylène, Cé Guinto, Laurence, Flo, Simina, Pascale, Aurélie, Perrine, Guillaume, Frank, Elise, Mouldi, Vincent, Sébastien, Fabrice, Neith, Marcelo, Maribel et Rafael.

Enfin, je remercie particulièrement Stéphane VIDALIE, mes parents (J. RIVAS et M. ARAIZA) et mes trois frères pour m'avoir soutenu dans la réalisation de ce grand projet.



# **-Sommaire-**





<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>7</b>
<b>Section 1. Contexte biologique.....</b>	<b>9</b>
Introduction .....	9
Organisation hiérarchique des tissus vivants.....	9
1.1 La matrice extracellulaire ( <i>MEC</i> ) : Composition, structure et fonctions .....	9
1.2 Tissus complexes et son organisation tissulaire en multicouches.....	10
1.2.1 Organisation multicouches: Cas des vaisseaux sanguins.....	11
2. Régénération/réparation tissulaire .....	12
3. Lésions des vaisseaux sanguins .....	14
4. L'ingénierie tissulaire appliquée à la régénération ou réparation des vaisseaux sanguins .....	15
4.1 Ingénierie tissulaire/médecine régénérative .....	15
4.2 La transplantation cellulaire .....	15
4.3 La régénération <i>in vivo</i> .....	15
4.4 L'implantation d'un tissu formé <i>in vitro</i> .....	16
5. Leurres des milieux biologiques : Une nouvelle approche pour l'ingénierie tissulaire .....	18
1) Critère de la structure chimique leurre.....	19
2) Critère de la structure physique leurre .....	19
6. Propriété biologiques du chitosane. ....	20
<b>Section 2. Structure macromoléculaire du chitosane : de l'extraction aux propriétés physico-chimiques en solution.....</b>	<b>24</b>
Introduction .....	24
1. Définition et structure du chitosane .....	24
2. Le chitosane en quelques chiffres .....	26
2.1 Production mondiale du chitosane.....	26
3. Méthodes de production de la chitine et du chitosane .....	27
3.1 Purification de la chitine .....	27
3.2 Méthodes d'élaboration du chitosane.....	28
3.2.1 Traitement enzymatique .....	28
3.2.2 Traitement chimique .....	28
3.3 Intérêt de la sonication pour le contrôle de la masse molaire .....	31
4. Caractérisation des paramètres structuraux du chitosane.....	32
4.1 Détermination du <i>DA</i> .....	32
4.2 Distribution des unités acétylées et non acétylées dans la molécule de chitosane .....	34
4.3 Détermination de la masse molaire moyenne ( $M_w$ ).....	34
4.3.1 Viscosimétrie capillaire .....	35
4.3.2 Diffusion de la lumière (LS).....	36
4.3.3 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	38
5. Propriétés physico-chimiques du chitosane en liaison avec ses paramètres structuraux .....	39
5.1. Solubilité .....	40
5.2 Phénomènes d'agrégation .....	42
<b>Section 3. Hydrogels physiques: Stratégies d'élaboration.....</b>	<b>45</b>
Introduction .....	45
3.1 Définition d'un hydrogel.....	45

3.2 Classification des hydrogels.....	46
3.3 Hydrogels chimiques et physiques de chitosane.....	46
3.4 Formation des hydrogels physiques à base de chitosane.....	48
3.4.1 Réticulation ionique de chitosane.....	48
3.4.2 Formation des complexes polyélectrolytes ( <i>PEC</i> ).....	49
3.4.3 Formation des hydrogels physiques hydrophobes (sans agent réticulant).....	50
1) Gélification du chitosane à partir d'une solution hydroalcoolique.....	51
2) Gélification à partir d'une solution aqueuse.....	52
3.5 Biomatériaux dérivés d'hydrogels physiques.....	54
3.5.1 Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage.....	54
3.5.2 Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération de la peau.....	55
3.5.3 Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération de tissus à architecture multicouches complexe.....	56
3.5.4 Filage et hydrogels physiques de chitosane: applications aux implants pariétaux.....	57
<b>Section 4. Diffusion des rayons X et de la lumière aux petits angles pour une étude morphologique des hydrogels.....</b>	<b>61</b>
Introduction.....	61
4.1 Principe d'une expérience de diffusion.....	61
4.2 Diffusion par systèmes « non corrélés » et « corrélés ».....	63
4.2.1. Diffusion par les systèmes « non corrélés ».....	63
a) Loi de Guinier.....	64
b) Loi de Porod.....	65
4.2.2 Diffusion par les systèmes «corrélés ».....	66
<b>ÉTUDE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>71</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>73</b>
<b>1. Procédé d'élaboration des fibres creuses par le filage du chitosane par voie humide dans des conditions de coagulation interrompue.....</b>	<b>76</b>
1.1 Contexte expérimental.....	76
1.2 Étude expérimentale.....	77
1.2.1 Caractéristiques du collodion de chitosane.....	78
1.3 Publication: Chitosan hollow fiber elaboration by interrupted wet-spinning process.....	78
Conclusion.....	108
<b>2. Organisation à l'échelle micrométrique des hydrogels physiques de chitosane.....</b>	<b>110</b>
2.1 Contexte expérimental.....	110
2.2 Publication : Micron range morphology of chitosan physical hydrogels.....	111
Conclusion.....	138
<b>3. Procédé de filage du chitosane par voie humide pour l'élaboration des fibres creuses multi-membranaires.....</b>	<b>140</b>
3.1 Contexte expérimentale.....	140
3.2 Conditions expérimentales.....	143
3.3 Résultats et discussions.....	148
3.3.1 Caractérisation structurale par diffusion des rayons X aux grands angles....	155
3.3.2 Formation des fibres multi-membranaires par filage par voie humide.....	158
Stratégie pour la formation des systèmes multi-membranaires.....	158
Mécanisme physico-chimie pour la formation de fibres multi-membranaires..	160
Conclusion.....	164

<b>4. Étude des propriétés mécaniques des fibres sous contrainte d'élongation uniaxiale</b> .....	<b>166</b>
4.1 Contexte expérimental .....	166
4.2 Conditions expérimentales.....	166
4.3 Résultats et discussions.....	168
4.3.1 Essai traction uniaxiale.....	169
4.3.2 Étude de l'influence des conditions expérimentales d'élaboration sur les propriétés mécaniques des fibres de chitosane .....	170
4.3.3 Traction d'éprouvettes d'hydrogels de chitosane <i>in situ</i> sous faisceau synchrotron (SAXS).....	173
4.3.4 Étude propriétés mécaniques des différentes fibres de chitosane .....	178
Conclusion.....	181
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>183</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>189</b>
<b>GLOSSAIRE</b> .....	<b>213</b>



## LISTE DE FIGURES

<b>Étude bibliographique</b> .....	7
<b>Figure 1.1</b> Organisation structurale d'une artère .....	12
<b>Figure 2.1</b> Structure chimique de la chitine et du chitosane.....	25
<b>Figure 2.2</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du chitosane à 400 MHz.....	33
<b>Figure 2.3</b> Variation des paramètres (1) Log <i>K</i> et (2) <i>a</i> de l'équation de MHKS en fonction du <i>DA</i> .....	36
<b>Figure 2.4</b> Variation de <i>dn/dc</i> , en fonction du <i>DA</i> .....	38
<b>Figure 2.5</b> Loi de variation des propriétés physico-chimiques, biologiques et de la conformation en solution du chitosane statistique de faible polymolécularité en fonction du <i>DA</i> .....	41
<b>Figure 3.1</b> Aspect physique de : <i>a</i> ) gel alcoolique de chitosane (1,2-propanediol) et <i>b</i> ) hydrogel neutralisé à l'ammoniac. ....	52
<b>Figure 3.2</b> Représentation schématique du mécanisme de formation des hydrogels physiques de chitosane à partir d'une solution aqueuse ( <i>DA</i> = 36,7 %) par neutralisation avec des vapeurs d'ammoniac (NH <sub>4</sub> OH).....	53
<b>Figure 3.3</b> Procédure expérimentale pour la formation d'un biomatériau en bicouche <sup>210</sup> par assemblage de deux hydrogels physiques de chitosane.....	55
<b>Figure 3.4</b> Représentation schématique du procédé de neutralisation en multi-étapes	57
<b>Figure 3.5</b> Dispositif de mise en œuvre pour le filage à sec du chitosane .....	58
<b>Étude expérimentale</b> .....	71
<b>Figure 2.1</b> Gelation process in a quartz cell of a chitosan aqueous solution by the <i>solution neutralization route</i> with gaseous ammonia .....	120

<b>Figure 2.2</b> 2D SALS patterns of isotropic and anisotropic aqueous chitosan gels obtained by the <i>solution neutralization route</i> with gaseous ammonia .....	121
<b>Figure 2.3</b> Optical microscopy (Olympus BX41, 200X) observation of a chitosan gel with capillary tubes morphology.....	122
<b>Figure 2.4.</b> a) Log-log plots of radially averaged data for physical hydrogels prepared from chitosan samples of two molecular weights .....	123
<b>Figure 2.5</b> 2D SALS images of chitosan hydroalcoholic gels obtained by the <i>solution neutralization route</i> with gaseous ammonia (horizontal neutralization front, vertical ammonia flux). .....	124
<b>Figure 2.6</b> Log-log plots of scattered intensity $I$ as a function of the scattering vector $q$ for chitosan physical hydrogels with polymer concentrations ( $c_p$ ) ranging from 0.01 to 1% (w/w).....	125
<b>Figure 2.7</b> Log-log plots of scattered intensity $I$ as a function of the scattering vector $q$ for chitosan aqueous solutions during the <i>in situ</i> gelation process by the <i>solution neutralization route</i> with gaseous ammonia.....	126
<b>Figure 2.8</b> Examples of aggregate morphology of chitosan hydrogels. ....	128
<b>Figure 2.9</b> Log-log plots of scattered intensity $I$ as a function of the scattering vector $q$ for chitosan aqueous solutions during the <i>in situ</i> gelation process by solution neutralization with gaseous ammonia. ....	129
<b>Figure 2.10</b> Correlation length ( $\xi$ ) as function of the polymer concentration ( $c_p$ ) for chitosan physical hydrogels prepared by the <i>solution neutralization route</i> with gaseous ammonia. ....	130
<b>Figure 2.11</b> Scanning electron micrograph of a chitosan physical hydrogel with $c_p = 2.5\%$ (w/w). ....	131
<b>Figure 2.12</b> 2D SALS images of chitosan gels ( $c_p = 0.5\%$ (w/w), $M_w = 515\ 000$ g/mol, $I_p = 1.6$ and $DA = 1.5\%$ ) obtained from the different processing routes.....	133

<b>Figure 2.13</b> <i>a)</i> Normalized SALS scattered intensities showing the kinetics of gelation of chitosan hydrogels at $c_p = 0.3\%$ (w/w).....	134
<b>Figure 2.14</b> 2D SALS images of slightly anisotropic and periodic anisotropic chitosan aqueous gels obtained by neutralization with: <i>a)</i> NaOH 0.1 M and <i>b)</i> NaOH 4 M.....	135
<b>Figure 3.1</b> Dispositif expérimental de filage par voie humide par la méthode de coagulation interrompue.....	145
<b>Figure 3.2</b> Schéma de montage de diffusion synchrotron aux petits angles. Les clichés ont été pris avec le faisceau parallèle à l'axe du cylindre.....	147
<b>Figure 3.3</b> 2D diagrammes de diffusion SAXS pour des tranches de fibres de : <i>a)</i> au centre et <i>b)</i> dans la périphérie d'une fibre .....	150
<b>Figure 3.4</b> Représentation double logarithmique de l'intensité diffusée $I$ en fonction du vecteur de diffusion $q$ lors d'un scan le long du rayon des tranches d'hydrogel de chitosane.....	152
<b>Figure 3.5</b> Intensité maximale ( $I_{max}$ ) à $q = 0,01044 \text{ \AA}^{-1}$ en fonction de la distance $r$ à partir du centre de la section transversale de fibres de chitosane .....	153
<b>Figure 3.6</b> Polymère concentration, déterminé par ATG, en fonction de la racine carré du temps dans une coagulation interrompue pour l'élaboration des fibres creuses de chitosane.....	154
<b>Figure 3.7</b> Exemple d'image 2D de diffraction WAXS pour des fibres de chitosane.....	156
<b>Figure 3.8</b> Diagrammes de diffraction WAXS normalisés pour des fibres de chitosane .....	156
<b>Figure 3.9</b> <i>a)</i> Aspect macroscopique de fibre multimembranaire faisant apparaitre plusieurs membranes coaxiales et <i>b)</i> images de microscopie optique de la section transversale d'une tranche de fibre .....	160
<b>Figure 3.10</b> Mécanisme de coagulation interrompue en deux étapes pour la formation des systèmes multi-membranaires.....	162



<b>Figure 3.11</b> Cliché de microscopie électronique à balayage à froid (Cryo-MEB) d'une fibre creuse de chitosane sèche.....	163
<b>Figure 4.1</b> Schéma de montage de traction <i>in situ</i> pour la diffusion synchrotron aux petits angles .....	168
<b>Figure 4.2</b> Courbe de contrainte ( $\sigma$ ) en fonction de la déformation ( $\varepsilon$ ) d'une fibre pleine de chitosane.....	170
<b>Figure 4.3 a)</b> Essais de traction uniaxiale d'une fibre pleine de chitosane .....	170
<b>Figure 4.4</b> Représentation du module d'Young ( $E$ ), en fonction de la vitesse de cisaillement réelle dans la paroi de la filière ( $\dot{\gamma}$ ) pour des fibres pleines de chitosane	172
<b>Figure 4.5</b> Courbe de contrainte ( $\sigma$ ) en fonction de la déformation ( $\varepsilon$ ) avec cycles consécutives de charge/décharge .....	174
<b>Figure 4.6</b> Images de diffusion SAXS 2D en fonction de la déformation ( $\varepsilon$ ) avec cycles consécutives de charge/décharge .....	176
<b>Figure 4.7</b> Représentation double logarithmique de l'intensité diffusée $I$ en fonction du vecteur de diffusion $q$ pour fibres de chitosane .....	177
<b>Figure 4.8</b> Représentation double logarithmique de l'intensité diffusée $I$ en fonction du vecteur de diffusion $q$ pour fibres de chitosane .....	178
<b>Figure 4.9</b> Exemple de fibre creuse déshydratée par traitement thermique.....	179

## LISTE DE TABLEAUX

<b>Étude bibliographique</b> .....	7
<b>Tableau 2.1</b> Incréments d'indice de réfraction ( $dn/dc$ ) pour le chitosane en différentes conditions expérimentales.....	37
<b>Tableau 4.1</b> Rayon de giration ( $R_g$ ) pour quelques géométries de particules.....	65
<b>Étude expérimentale</b> .....	71
<b>Table 1.</b> Characteristics of the chitosan samples used in this work: weight-average molecular weight ( $M_w$ ), polydispersity index ( $I_p$ ) and degree of acetylation ( $DA$ )......	116
<b>Tableau 3.1</b> Conditions expérimentales adéquates pour la mise en œuvre de la méthode de filage par voie humide à coagulation interrompue.....	145
<b>Tableau 3.2</b> Évaluation de $M_w$ dans la membrane et cœur d'une macrofibre de chitosane .....	155
<b>Tableau 3.3</b> Exemple de conditions opératoires pour la formation des fibres creuses avec quatre membranes.....	159
<b>Tableau 4.1.</b> Propriétés mécaniques des fibres de chitosane ( $c_p = 2\%$ (m/m), $M_w = 515\,000$ g/mol, $DA = 1,5\%$ ). .....	179



## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ATG	Analyse thermogravimétrique
Balance H/H	Balance entre les interactions hydrophiles et hydrophobes
$C_c$	Concentration critique de coagulant à l'interface solution-hydrogel
$c_p$	Concentration en polymère
CCD	Charge coupling device
Cryo-MEB	Microscopie électronique de balayage à froid
Cryo-SEM	Cryogenic Scanning Electron Microscopy
D	Coefficient of diffusion
DA	Degré d'acétylation
$d_{ext}$	Diamètre externe fibre creuse
$d_{int}$	Diamètre interne fibre creuse
$dn/dc$	Dérivée de l'indice de réfraction avec la concentration en polymère
$DP_w$	Degré de polymérisation moyen en poids
$d_s$	Diamètre de la sortie filière
E	Module de Young
EMEB	Microscopie Électronique de Balayage Environnemental
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
GAG's	Glycosaminoglycans; Glycosaminoglycanes
GlcN	D-glucosamine ou 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine ou 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose
HP-SEC	High Performance Size Exclusion Chromatography
$I_p$	Indice de polymolécularité
LS	Light Scattering
MALLS	Multi-angle laser light scattering
MEB	Microscopie Électronique de Balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MHKS	Équation de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada
$M_v$	Masse molaire moyenne viscosimétrique
$M_w$	Masse molaire moyenne en poids
	Weight-average molecular weight

$N_1$	Normal stress difference
PEC	Complexes polyélectrolytes
PVC	Polyvinyl chloride
$q$	Vecteur de diffusion
$Q$	Débit d'extrusion
$R_g$	Rayon de giration
RMN $^1\text{H}$	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
$^1\text{H}$ NMR	Nuclear Magnetic Resonance
SLS	Static light scattering
SALS	Small Angle Light Scattering
SEM	Scanning Electron Microscope
SAXS	Diffusion des rayons X aux petits angles
$t_c$	Time of coagulation
$T$	Température
SEC	Size Exclusion Chromatography ou Chromatographie d'exclusion stérique
WAXS	Diffusion des rayons X aux grands angles
Å	Angström
$\xi$	Distance de corrélation
$\mu\text{m}$	micromètre
$\dot{\gamma}$	Shear rate ou vitesse de cisaillement
$\tau_R$	Relaxation time for chain disentanglement
$c^*$	Concentration critique d'enchevêtrements Critical concentration for chain entanglement
$c^{**}$	Second critical concentration for chain entanglement
$\sigma$	Contrainte nominale
$\eta_0$	Viscosité newtonienne

---

# **- Introduction générale -**



## Introduction générale

«... *The circulation continued in a normal manner and at the end of several months the transplanted segment usually presented the same appearance as the normal vessel* » est la conclusion à laquelle arrive Alexis Carrel (lauréat prix Nobel de physiologie et de médecine) après sa première expérience de pontage coronarien chez l'animal (France, 1910).

Les veines autologues, particulièrement la veine grande saphène, restent le matériau de remplacement de choix pour les pontages des artères coronariens ou périphériques. En effet, cette chirurgie vasculaire est actuellement effectuée dans plus d'un million de cas annuellement aux États-Unis et en Europe. Cependant, certains patients ne possèdent pas de veines appropriées pour la reconstruction vasculaire, en raison d'opérations précédentes où elle a été déjà utilisée, ou parce que le calibre du vaisseau est incompatible, ou simplement parce que le vaisseau restant est de mauvaise qualité (ex : à cause de maladies variqueuses). De plus, cette méthode exige une première intervention de prélèvement, et une deuxième procédure chirurgicale afin de poser le vaisseau en place. L'implantation d'une prothèse synthétique reste donc comme l'alternative la plus courante. Les formes tubulaires de polytétrafluoroéthylène (PTFE) expansé et le poly(téréphtalate d'éthylène) (Dacron) sont les prothèses synthétiques le plus largement utilisées pour le pontage coronarien et périphérique dans la chirurgie vasculaire. Ces matériaux permettent d'obtenir des résultats excellents à long terme dans le traitement de la pathologie d'artères de grands diamètres (>5 mm, ex : l'aorte thoracique et abdominale ou l'artère iliaque entre autres) où l'écoulement sanguin est élevé et la résistance est faible. Par contre, ces prothèses synthétiques ne fonctionnent pas bien à plus long terme dans les vaisseaux de petit diamètre (3 — 5 mm) où l'écoulement sanguin est faible, ils sont sujets à l'occlusion en raison de leur caractère thrombogène et du manque de compatibilité (compliance) entre la prothèse synthétique rigide et l'artère élastique. Ceci entraîne, dans la plupart de cas, une hyperplasie intimale, et enfin le rétrécissement de l'artère (sténoses).

Afin de mieux répondre à cette problématique, le présent projet se situe dans un contexte d'innovation dans l'ingénierie tissulaire puisqu'il concerne la régénération de



tissus complexes comme les vaisseaux sanguins à l'aide de biomatériaux leurres<sup>A</sup> (ou bioinspirés) dont la structure est adaptée à la régénération de tissus ciblés. Pour la régénération réparatrice des vaisseaux sanguins de petit calibre, notre démarche est donc orientée vers la production de structures tubulaires compartimentées, c'est-à-dire avec une ou plusieurs membranes biorésorbables et perméables séparées par des espaces inter-membranaires. Cette structure possède donc la potentialité d'incuber séparément plusieurs types de cellules ce qui permettrait de tirer partie de la communication intercellulaire à travers les diverses membranes, et favoriser la production d'un vaisseau sanguin artificiel, vivant et autologue qui peut être produit *in vitro*. En se basant sur le concept de biomatériaux leurres, nous avons décidé d'utiliser un biopolymère, biocompatible, biorésorbable et bioactif, possédant ainsi toutes les propriétés biologiques souhaitées pour cette application : le chitosane. Ainsi, notre projet a pour principal but l'élaboration d'hydrogels physiques de chitosane sous forme tubulaire avec mono- ou multi-membranes à travers le procédé de « wet-spinning » (filage par voie humide).

Nous débutons ce manuscrit avec une analyse détaillée du contexte biologique motivant le sujet de ce travail de thèse. Ensuite, nous présentons l'idée directrice utilisée pour la conception de ces nouveaux matériaux bioinspirés pour l'ingénierie tissulaire des vaisseaux sanguins. Nous abordons, dans la dernière section de ce chapitre, une étude bibliographique dédiée au chitosane, à l'état de l'art de l'élaboration des hydrogels physiques de chitosane ainsi que les techniques de diffusion de rayonnement pour l'étude de la morphologie de ces hydrogels.

La mise en œuvre du procédé de filage a impliqué la fabrication d'un dispositif de filage en continu du chitosane par voie humide. Pour cela, nous avons globalement divisé l'étude expérimentale en quatre étapes :

–La première étape a consisté à maîtriser les paramètres de mise en œuvre du procédé pour la formation d'un macrofilament liquide homogène de chitosane au cours d'un procédé de filage en continu (concentration initiale du collodion, concentration de

---

<sup>A</sup> Un biomatériau leurre est défini comme un matériau dont la structure chimique et physique est absente dans l'espèce vivante considérée mais dont les unités constitutives sont partiellement présentes et produites par la biomasse.

la base, débit d'extrusion du collodion, vitesse d'étirage). Puisque la coagulation est l'étape critique pour l'élaboration des fibres creuses, nous avons étudié les phénomènes physico-chimiques accompagnant la neutralisation d'un filament liquide de chitosane au cours du filage par voie humide (wet-spinning). Ces études ont débouché sur la conception d'une nouvelle méthode de filage dans des conditions de coagulation interrompue permettant ainsi la fabrication des systèmes de fibres creuses simples. Par ailleurs, cette partie expérimentale a fait l'objet d'une publication jointe dans le manuscrit.

-La deuxième étape a consisté à déterminer la microstructure de ces matériaux en fonction des variables de mise en œuvre à l'aide de techniques spécifiques comme la diffusion de rayonnement (SALS). De cette façon, nous proposons finalement un mécanisme physico-chimique de coagulation qui prend en compte plusieurs paramètres d'élaboration (ex : la concentration de l'agent coagulant et la concentration du collodion) et qui nous a permis d'élaborer une diversité de biomatériaux à architecture complexe pour l'ingénierie tissulaire (ex : gels de chitosane avec micro canaux). Enfin, cette partie expérimentale a aussi fait l'objet d'une publication présentée dans le manuscrit.

- Dans la troisième étape de cette étude, nous avons généralisé la stratégie d'élaboration des fibres creuses pour la fabrication de fibres multi-membranaires en mettant au point un procédé de neutralisation à plusieurs étapes à partir de bains successifs conduisant à une neutralisation séquencée. La mise en œuvre de cette stratégie a aussi fait appel à une maîtrise des propriétés physico-chimiques lors de la neutralisation du chitosane dans un système de filage en continu. Le filage en continu dans ces conditions de coagulation interrompue a fait l'objet d'un brevet.

- Finalement, les propriétés physiques des fibres creuses ont été étudiées à travers leur caractérisation mécanique, un aspect de grande importance pour son application dans l'ingénierie tissulaire des vaisseaux sanguins de petits calibres, où le besoin des propriétés mécaniques similaires à celle d'un vaisseau sanguin natif est bien reconnu.



---

**- Étude bibliographique -**



# Section 1. Contexte biologique

## Introduction

Une démarche cohérente pour l'élaboration de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire des vaisseaux sanguins doit prendre en compte la fonctionnalité et l'organisation structurale des tissus vivants à l'état natif. Comme beaucoup de systèmes naturels, cet arrangement est caractérisé par une hiérarchie structurale qui commence au niveau macromoléculaire, nanométrique, cellulaire et puis tissulaire et il continue jusqu'à l'organisation des organes. Quelques éléments concernant la hiérarchie structurale des tissus vivants seront donnés dans les paragraphes suivants. Ensuite, nous abordons la problématique liée à leur régénération ainsi que les différentes stratégies proposées par l'ingénierie tissulaire. Finalement, nous présentons l'approche des « matériaux leurres des milieux biologiques » dans le contexte de la régénération des vaisseaux sanguins.

## 1. Organisation hiérarchique des tissus vivants

Un tissu est un ensemble de cellules différenciées, organisées selon une architecture caractéristique, en association avec un réseau de macromolécules naturelles ou matrice extracellulaire (*MEC*) et concourant à exercer une même fonction.<sup>1</sup>

### 1.1 La matrice extracellulaire (*MEC*) : Composition, structure et fonctions

La *MEC* est un matériau fortement hydraté (~70 % eau pour les tissus "mous") comportant divers polymères naturels, organisés généralement sous forme d'assemblages pour constituer des hydrogels physiques. Les principaux constituants de la *MEC* peuvent être regroupés dans quatre catégories : **1) les protéines**<sup>2</sup>, principalement le collagène et l'élastine, forment des structures fibreuses qui confèrent la résistance à la tension et l'élasticité aux tissus ; **2) les glycosaminoglycanes**<sup>3</sup>, <sup>4</sup> (*GAGs*) s'associent avec un grand nombre de protéines pour participer à l'organisation matricielle, l'adhésion cellulaire, la différenciation, la croissance et l'apoptose; **3) les proteoglycanes**<sup>5</sup> sont des protéines sur lesquelles sont greffées de manière covalente

de nombreuses chaînes de *GAGs*. La diversité structurale des protéoglycanes leur permet de participer à l'assemblage de la *MEC* tout en leur conférant de nombreuses propriétés physico-chimiques (hydratation, résistance mécanique en compression, capacité de filtration, etc.). De plus, ces molécules interviennent également dans de nombreuses activités cellulaires (prolifération, différenciation, adhérence, migration); **4) les glycoprotéines**<sup>2</sup>, principalement la fibrine et la laminine, stabilisent les structures fibreuses ou peuvent agir comme sites de fixation cellulaire.

La nature et la proportion de macromolécules constituant de la *MEC*, leur organisation structurale produisent une diversité considérable de *MECs* et chacune est adaptée à un tissu spécifique afin de répondre aux différentes exigences biologiques, structurales, mécaniques et fonctionnelles.<sup>2</sup> En effet, la *MEC* favorise un environnement cellulaire dynamique qui ne comprend pas simplement les cellules, mais qui dirige également leur comportement.

## 1.2 Tissus complexes et son organisation tissulaire en multicouches

Le type de cellules et les relations cellules-*MEC* diffèrent bien sûr suivant les types de tissus.<sup>1</sup> Ainsi, chez les humains, on distingue quatre groupes de tissus primaires: **1) les épithéliums**<sup>1</sup> composés par des cellules étroitement jointives. Ils ont des fonctions de revêtement, d'absorption, d'excrétion et de sécrétion ; **2) les tissus conjonctifs**<sup>1</sup>, ayant un rôle de soutien, relient entre eux les tissus d'un même organe ou d'organes voisins. Ils sont caractérisés par une *MEC* abondante et des cellules distribuées de manière éparse<sup>6</sup> ; **3) le tissu musculaire**<sup>1</sup> est un tissu contractile se caractérisant par la présence de cellules allongées suivant l'axe de contraction du tissu et **4) le tissu nerveux**<sup>1</sup> constitué par des cellules nerveuses ou des neurones associés à des cellules jouant notamment un rôle de soutien.

Les organes sont presque toujours des assemblages de différents types de tissus; ils jouent chacun un rôle précis et ont habituellement une forme reconnaissable. On observe souvent une organisation multicouche des tissus comme la peau, l'estomac, le cœur et les vaisseaux sanguins, le foie, les poumons et le cerveau, les disques intervertébraux.<sup>7</sup>

L'importance de cette organisation en multicouches est qu'elle permet aux tissus de bénéficier des propriétés physiologiques de chacune d'entre elles et en particulier de conférer de bonnes propriétés mécaniques aux tissus vivants. Dans le cas des vaisseaux sanguins, la multifonctionnalité des vaisseaux sanguins est attribuée à cette organisation en multicouches. Par la suite, nous allons décrire la composition de chaque couche ainsi que leur rôle fonctionnel.

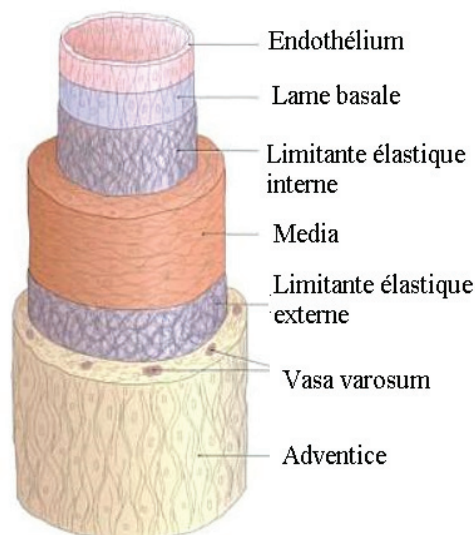
### 1.2.1 Organisation multicouches: Cas des vaisseaux sanguins<sup>7</sup>

Les principaux types de vaisseaux sanguins sont les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines. Les parois des vaisseaux sanguins sont constituées de trois types de tissus concentriques (voir Figure 1.1):

**a) l'intima**, composée d'une couche de cellules endothéliales plates et qui reposent sur la lame basale et une fine couche de tissu conjonctif. La surface luminale des cellules endothéliales est recouverte d'une mince couche de mucopolysaccharides chargés négativement, formant le glycocalyx dont le rôle essentiel est d'empêcher la constitution de thromboses sur la surface endothéliale<sup>8</sup>;

**b) la media**, délimitée de chaque côté par une couche de tissu élastique (la limitante élastique interne et la limitante élastique externe) et composée (dans le cas des artères) d'une couche circulaire de muscles lisses contenant de l'élastine et du collagène. La media est responsable du comportement mécanique caractéristique des artères ;

**c) l'adventice**, formée de tissu conjonctif, composé principalement de fibres de collagène et de fibroblastes permettant de protéger et de fixer les vaisseaux sanguins en place.





**Figure 1.1** Organisation structurelle d'une artère.<sup>9</sup>

Les parois d'artères et des veines doivent résister aux forces de pression, fournir une membrane sélective (endothélium) pour contrôler le passage des macromolécules et des solutés. Il est également nécessaire que les parois des artères présentent une élasticité adéquate pour supporter les pressions hémodynamiques associées au flux sanguin du cœur vers les organes. Pour accomplir ces différentes fonctions, il est essentiel de rassembler et d'organiser les divers types de tissus.

Nous avons donc mis en évidence l'importance de la structure de la *MEC* et de l'organisation en multicouches qui sont deux facteurs primordiaux à considérer pour définir le contexte biologique associé à de nouveaux dispositifs à base de matériaux bioinspirés.

Une fonctionnalité primordiale des tissus et des organes pour la réparation des tissus après lésion est leur aptitude naturelle à se régénérer. Le mot régénération est un terme vaste qui ne fait pas spécialement référence aux mécanismes impliqués. Par la suite, nous allons définir plus précisément les principaux types de régénération tissulaire qui peuvent se présenter dans le cas des mammifères (en particulier dans le corps humain).

## **2. Régénération/réparation tissulaire**

**La régénération physiologique** est un processus de renouvellement qui se produit en permanence. En effet, elle implique le remplacement naturel des vieilles cellules et des cellules endommagées au cours de la vie de l'individu. Des exemples bien connus de la régénération physiologique chez les mammifères sont les cycles de renouvellement de l'épiderme de la peau (21 jours), la régénération des cellules épithéliales qui tapissent les intestins, le remplacement de l'endomètre et le renouvellement des cellules du sang, qui ont une durée de vie limitée (120 jours). Tous ces exemples présentent des processus cellulaires et des mécanismes de contrôle tout à fait différents, mais ils possèdent une caractéristique commune qui est le maintien cellulaire ou l'équilibre des tissus dans le corps.

Contrairement à la régénération physiologique, **la régénération réparatrice** se déclenche lorsqu'une lésion survient. Ce terme est utilisé pour la plupart des mécanismes de régénération post-traumatique.<sup>10</sup> La régénération des tissus peut être initiée par une grande diversité d'événements : le trauma mécanique qui est la cause de blessure tissulaire la plus courante, les conditions de chaleur ou de froid extrêmes, ainsi que la grande quantité d'agressions chimiques, incluant les toxines.<sup>4</sup> Lorsque la lésion survient, différents mécanismes se déclenchent automatiquement de manière séquentielle pour la restauration de l'anatomie et de la fonctionnalité du tissu endommagé. Compte tenu de l'organisation hiérarchique des tissus, cette régénération se produit depuis l'échelle moléculaire, cellulaire jusqu'à l'échelle tissulaire. Au niveau moléculaire, la régénération est omniprésente car toutes les cellules peuvent adapter la balance synthèse/dégradation de protéines. Par contre, au niveau tissulaire, il est nécessaire que les tissus endommagés contiennent les cellules mitotiques<sup>B</sup> compétentes pour le maintien et la régénération de ces tissus.

Quand la régénération réparatrice n'a pas lieu, la fibrose entraîne la prolifération d'un tissu conjonctif dense pour la formation de tissu cicatriciel. En fait, **la cicatrisation fibreuse** est considérée comme un mécanisme biologique par défaut car la lésion est restaurée rapidement mais le tissu final diffère considérablement du tissu natif, ceci permet la survie des tissus mais parfois au détriment de leur pleine fonction.<sup>11</sup> Le type de tissu atteint et la gravité de la lésion<sup>12</sup> sont les deux facteurs qui déterminent lequel de ces deux processus se produira : soit la régénération réparatrice, soit la cicatrisation fibreuse. Par exemple, l'absence de vascularisation du cartilage explique que les phénomènes de cicatrisation se produisant en son sein sont très longs. Lors de la lésion, les chondrocytes fabriquent un nouveau tissu, intermédiaire entre un fibrocartilage et un cartilage hyalin; ce tissu est généralement plus perméable qu'un cartilage natif, et possède de moins bonnes propriétés mécaniques.

Finalement, l'hypertrophie est un mécanisme de régénération associé aux organes internes endommagés ou perdus.<sup>10, 11</sup> Parmi les différentes hypertrophies, l'hypertrophie compensatrice implique la croissance d'un membre d'organes jumeaux après la perte ou une grave lésion de l'autre membre (ex : l'élargissement d'un rein

---

<sup>B</sup>Des exemples de tissus mammifères contenant les cellules mitotiques compétentes sont : le sang, l'épithélium, l'os, le muscle squelettique, le foie, le pancréas, les vaisseaux sanguins de petit calibre et l'épithélium du rein.

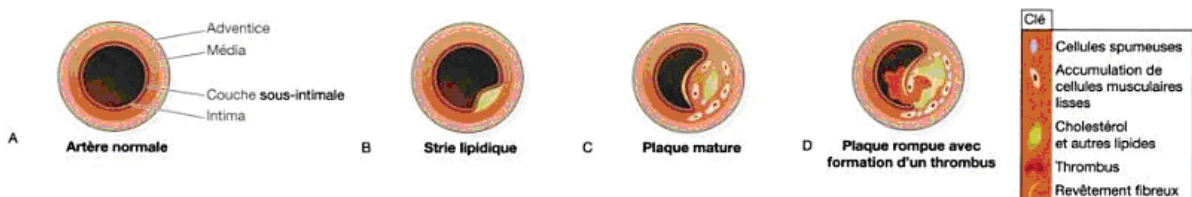
après l'ablation de l'autre). Un autre exemple est la cicatrisation hypertrophique de la peau qui est une cicatrice anormale caractérisée par la production excessive de collagène, formant ensuite un bourrelet qui dépasse la surface de la peau.

Comme on le voit, la plupart des tissus et des organes possèdent une capacité naturelle pour se régénérer. Néanmoins, ils n'ont pas tous la même capacité de régénération réparatrice. Par exemple, les tissus épithéliaux, comme l'épiderme et les muqueuses, se régénèrent facilement, tout comme les tissus osseux et les tissus conjonctifs qui sont bien vascularisés.<sup>10</sup> En contrepartie, les tissus peu vascularisés disposent d'une faible capacité de régénération, tel est le cas du cartilage articulaire. De plus, le tissu musculaire cardiaque, le tissu nerveux de l'encéphale et de la moelle épinière ne sont réparés que par du tissu cicatriciel.<sup>10</sup> Ce tissu cicatriciel est très solide mais il ne possède pas la souplesse de la plupart des tissus natifs et surtout, il ne peut pas accomplir les fonctions du tissu qu'il remplace.

Par la suite, nous nous intéresserons à la problématique de la régénération réparatrice ciblée des vaisseaux sanguins.

### 3. Lésions des vaisseaux sanguins<sup>6, 13</sup>

Le bon fonctionnement des vaisseaux sanguins peut s'altérer pour diverses raisons. Lésions, maladies, ou inflammations risquent d'affaiblir la paroi vasculaire, qui peut à la fois conduire à des anévrysmes ainsi que des dissections. La raison la plus commune pour le dysfonctionnement de vaisseaux est leur occlusion par athérosclérose (voir Figure 1.2), maladie inflammatoire de l'intima caractérisée par une plaque de dépôts lipidiques et dans laquelle s'accumulent de différents types cellulaires et des éléments de fibrose. Progressivement, les plaques s'étendent le long de la paroi artérielle, formant des gonflements faisant saillie dans la lumière du vaisseau. Cette lumière peut être fermée sur une partie du vaisseau, ce qui est la cause d'infarctus des tissus en aval. La rupture de la plaque et la formation de caillots de sang sont des complications graves.



**Figure 1.2** Stades de développement d'une plaque d'athérome.<sup>6</sup>

Le processus naturel pour régénérer les systèmes vasculaires n'est pas assez efficace pour sauver les tissus compromis dans cette maladie vasculaire. De plus, la formation de tissu cicatriciel dans la paroi du vaisseau peut entraver le fonctionnement de cet organe.

## **4. L'ingénierie tissulaire appliquée à la régénération ou réparation des vaisseaux sanguins**

### **4.1 Ingénierie tissulaire/médecine régénérative**

Langer et Vacanti<sup>14</sup> ont défini *l'ingénierie tissulaire* comme « un domaine interdisciplinaire qui applique les principes des sciences de l'ingénierie et de la vie pour le développement de produits de remplacement biologiques qui reconstituent, maintiennent, ou améliorent la fonction de tissus ou d'organes entiers ». L'ingénierie tissulaire est caractérisée principalement par l'élaboration des tissus *in vitro* souvent à l'aide d'une matrice de soutien. Par contre, les techniques utilisées par *la médecine régénérative* reposent principalement sur la thérapie cellulaire en combinaison avec des biomatériaux et des technologies de l'ingénierie tissulaire.<sup>15</sup>

Il existe donc différentes approches dont l'objectif est de remplacer les zones endommagées des vaisseaux sanguins, ou mieux encore d'en stimuler la régénération.

### **4.2 La transplantation cellulaire**

Cette stratégie propose la transplantation de cellules sans le support de biomatériaux. Ceci ne permet pas d'envisager la régénération de tissus aux organisations complexes, et même si les bio-fonctionnalités originelles du tissu sont retrouvées par l'injection de cellules, les effets sont parfois temporaires.

### **4.3 La régénération *in vivo***

Une autre méthode est basée sur la régénération *in situ* par implantation d'une matrice de soutien. Cette stratégie cherche à stimuler la régénération tissulaire par les cellules nativement présentes dans le corps humain. La plupart de ces méthodes sont basées sur l'utilisation de matrices de support (en anglais scaffolds). Ces matériaux

correspondent à une matrice poreuse tridimensionnelle potentiellement biodégradable. Ceux-ci peuvent être préparés à partir de polymères naturels (collagène) ou synthétiques. Des cellules peuvent aussi préalablement être disposées à l'intérieur du matériau, elles sont libres d'adhérer à la surface interne, mais également de circuler dans la matrice poreuse. Ce système permet une grande surface d'échange entre le matériau et les cellules et une diffusion aisée des molécules impliquées dans les communications intercellulaires, nutriments, etc. Les interactions entre les cellules et le matériau, les effets induits par les composants de ce dernier sur le devenir cellulaire sont des éléments essentiels pour développer une matrice de support.

Une autre méthode est basée sur l'utilisation de matrices acellulaires naturelles (scaffold naturels). Celles-ci sont des produits naturels biocompatibles essentiellement composés de collagène, d'élastine et de GAGs. Elles sont préparées par la décellularisation mécanique et/ou chimique (détergents, inhibiteurs d'enzymes et solutions tampons) des tissus d'origine humaine ou animale. L'avantage évident de ces matrices naturelles est qu'elles sont composées de protéines matricielles extracellulaires trouvées spécifiquement dans les systèmes vivants. De plus, quand elles proviennent de structures tubulaires comme les artères (aorte, carotide) ou les veines (jugulaire) des porcines et des canines, elles présentent une architecture tridimensionnelle semblable à celle du vaisseau à remplacer. Cette similitude leur confère des propriétés mécaniques et physiques appropriées pour la régénération. Malgré ces propriétés encourageantes leur efficacité clinique est souvent limitée par la thrombose, le rejet et l'inflammation chronique.<sup>16</sup>

#### **4.4 L'implantation d'un tissu formé *in vitro***

La méthode de l'ingénierie tissulaire qui est de plus en plus employée actuellement et qui semble la plus prometteuse est celle de la croissance *in vitro* de cellules sur une structure de support biodégradable ayant une structure et une géométrie spécifiques. Elle comporte deux étapes principales. Premièrement, cette structure estensemencée avec des cellules et des facteurs de croissance ou les deux à la fois. Deuxièmement, elle est placée dans un milieu de culture,ensemencé ou non, pendant une période de culture dans un bioréacteur de perfusion. Par la suite, le tissu résultant peut être implanté.

Les biomatériaux de support peuvent être classés selon leur nature (protéique, polysaccharidique, synthétique ou naturelle) ou selon leur forme (massique poreuse, mousse, liquide visqueux et hydrogel).

La première méthode proposée par Weinberg et Bell<sup>17</sup> est fondée sur l'inclusion de fibroblastes et de cellules musculaires lisses bovines dans des gels de collagène tubulaires, à l'intérieur desquels sontensemencées des cellules endothéliales. Des équivalents vasculaires humains ont également été produits par cette méthode.<sup>18</sup> Les trois tuniques vasculaires sont reconstituées et présentent un aspect macroscopique et histologique semblable à celui des vaisseaux natifs. Cependant, leur résistance mécanique à l'éclatement est trop faible pour les utiliser dans des études fonctionnelles en pharmacologie ou pour la transplantation. D'autres équipes ont également cherché à améliorer leurs propriétés mécaniques par des structures matricielles également à base de collagène.<sup>19, 20</sup>

Plus récemment, une autre méthode a été adaptée pour la production de vaisseaux sanguins. Il s'agit d'ensemencer des cellules musculaires lisses (bovines) dans un support biosynthétique tubulaire ajouré fabriqué à partir d'acide polyglycolique (PGA). Les cellules remplissent les treillis en se multipliant et en produisant de la matrice extracellulaire. Des cellules endothéliales sont ensuiteensemencées à l'intérieur.<sup>21, 22</sup> Ces prothèses comprennent seulement deux des trois tuniques vasculaires ce qui représente déjà un substitut vasculaire intéressant.

L'Heureux *et al.*<sup>23-25</sup> ont développé une nouvelle technique de production de vaisseaux sanguins artificiels, basés exclusivement sur la culture de cellules humaines, sans l'utilisation de matériaux exogènes. Des feuillets tissulaires produits à partir des cellules musculaires lisses (cultivées dans un milieu contenant du sérum et de l'acide ascorbique pour favoriser la production de collagène type I) et des fibroblastes sont enroulés autour d'une matrice déposée sur un mandrin pour reconstituer la média et l'adventice. Après plusieurs semaines de maturation, ces deux couches se fusionnent dans une seule couche cohésive. Dès lors, le mandrin est enlevé et des cellules endothéliales provenant des veines du cordon ombilical sontensemencées à l'intérieur du conduit biologique tubulaire et laissées pousser pendant une semaine. La structure résultante est histologiquement correcte, les trois tuniques vasculaires (l'adventice, la

média et l'intima) ressemblent à une artère humaine. Ces greffes reconstitués par ingénierie tissulaire présentent une résistance mécanique à l'éclatement de 2 594 mmHg, et sont faciles à manipuler. Même si ces travaux se révèlent prometteurs et constituent une réelle prouesse technique autant d'un point de vue de l'ingénierie tissulaire que chirurgicale, il faut tout de même considérer le temps nécessaire à la réalisation de cette reconstruction qui excède les 20 semaines.

En complément à la démarche inspirée par l'idée du scaffold, notre équipe de recherche propose une démarche alternative fondée sur le concept de « leurre de milieux biologiques »<sup>26</sup>. Elle est bien adaptée à la régénération fonctionnelle des tissus induisant par ailleurs une réparation spontanée par cicatrisation fibreuse comme le cartilage articulaire<sup>26,27</sup> ou la réparation d'autres tissus à architecture complexe comme la peau<sup>28</sup>, ou encore les vaisseaux sanguins.

## **5. Leurres des milieux biologiques : Une nouvelle approche pour l'ingénierie tissulaire**

Montembault *et al.*<sup>26,28-30</sup> ont initialement proposé le concept « leurre des milieux biologiques » pour l'ingénierie tissulaire. Celui-ci est d'abord basé sur le choix d'une structure chimique bio-inspirée par opposition à une démarche purement biomimétique. En effet, le biomimétisme consiste à copier le plus exactement possible des structures vivantes. C'est un défi compte tenu de la complexité des tissus vivants. Il s'agit bien sûr de réaliser des matériaux à partir de substances naturelles dont la mise en œuvre et la stérilisation sont délicates (ex : le collagène et l'acide hyaluronique). La principale caractéristique de ces biopolymères est leur biorésorbabilité rapide, ce qui en exclut l'utilisation en régénération tissulaire de longue durée. Nous avons donc fait le choix d'élaborer des matériaux bio-inspirés dont la structure imitent partiellement celle les tissus vivants, c'est-à-dire en gardant « une certaine distance » par rapport à la structure idéale de la *MEC*.

Le fondement du concept de matériaux « bio-inspirés leurres » repose initialement sur deux principaux critères<sup>17</sup>: (*i*) la structure chimique leurre du polymère et (*ii*) l'organisation physique leurre du matériau.

## 1) Critère de la structure chimique leurre

Pour remplir le critère lié à la structure chimique, il faut concevoir un polymère dont les briques élémentaires sont présentes dans la biomasse, afin d'apporter les propriétés de biocompatibilité et de biorésorbabilité spécifiques aux matériaux naturels. La structure chimique idéale doit consister en une structure hybride, avec des éléments structuraux ou des briques élémentaires présentes dans le milieu vivant à leurrer et une autre partie totalement absente du milieu vivant. Parmi les différents polymères naturels, le chitosane est un bon exemple de structure chimique leurre des milieux biologiques. En effet, la chitine et le chitosane comportent des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1→4) ainsi que des résidus N-acetyl-glucosamine, lesquels sont largement présents dans la structure des *GAGs* et naturellement présents dans les *MECs* des mammifères, tandis que les résidus D-glucosamines sont totalement absents.

De cette manière, ces matériaux bio-inspirés leurres n'induisent pas de réaction défavorable (*effet leurre*), mais par contre sont partiellement reconnus par le milieu vivant en induisant une réponse biologique dont on tire parti pour la régénération tissulaire. Idéalement, le matériau leurre doit permettre la reconstruction du tissu puis disparaître complètement. La biorésorbabilité est un des intérêts des polymères naturels ou bioartificiels dont les briques élémentaires sont présentes dans la biomasse.

## 2) Critère de la structure physique leurre

Pour satisfaire au critère physique de leurre des milieux biologiques, la structure physique du matériau doit correspondre à une structure partiellement bio-inspirée de la structure physique des tissus. Nous proposons ainsi une structure d'*hydrogels physiques*. En effet, les tissus vivants des mammifères sont eux-mêmes des hydrogels physiques multi-composants, constitués principalement d'eau (par exemple 80 % en poids dans le cartilage articulaire), de cellules et d'un réseau complexe de polymères naturels (*MEC*). Ces tissus peuvent former des systèmes en multicouche, multi-membranaires, fibreux, et parmi ces tissus certains sont minéralisés comme les os.

Les hydrogels physiques de chitosane sont composés environ de 95 % d'eau et d'un réseau physique de polysaccharides partiellement biomimétique (*GAGs*). Il s'agit de



matériaux à porosité ouverte, dont la taille des « pores » peut être contrôlée entre 200 – 2 500 nm<sup>26</sup>. Cette taille caractéristique est proche de la maille du réseau constituant la matrice extracellulaire des tissus mammifères, et empêche tout transfert physique des cellules dans ou vers le biomatériau. Le choix de cette organisation nous amène donc à développer des matériaux ne répondant pas directement à la notion de « scaffolds » puisqu'ils ne sont pas conçus pour être directement colonisables.

À un niveau d'échelle supérieur, une stratégie importante conduisant à la reconstruction de tissus multicouches complexes consiste à confiner des différents types cellulaires dans des compartiments séparés par des membranes biorésorbables et perméables aux communications intercellulaires, mais n'autorisant pas directement la migration cellulaire à travers les membranes (critère de structure physique leurre). Enfin, la forme macroscopique de l'hydrogel détermine la forme macroscopique des tissus (ou des organes) reconstruits. Pour les applications comme le vaisseau sanguin artificiel, notre démarche s'oriente donc vers l'élaboration de structures tubulaires complexes. Cet objectif est un prolongement du développement d'hydrogels multi-membranaires (cf. Section bibliographique paragraphe 3.5.3). Une partie de notre travail consistera à développer des hydrogels tubulaires compartimentés, c'est-à-dire avec une ou plusieurs membranes séparées, avec une méthodologie physico-chimique alternative aux travaux de Ladet<sup>27</sup>.

On voit donc que le concept de « leurre » guide la conception de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire aux différents niveaux de structure hiérarchique. C'est cette approche que nous développerons dans ce travail.

## **6. Propriétés biologiques du chitosane**

En plus de correspondre au critère de structure leurre des milieux biologiques mammifères, le chitosane possède un large éventail de propriétés biologiques qui font de lui un polymère intéressant pour son utilisation dans l'ingénierie tissulaire. Parmi ces propriétés biologiques, nous pouvons citer sa biocompatibilité<sup>31-34</sup>, sa biodégradabilité<sup>35, 36</sup>, sa bioactivité<sup>37, 38</sup>, sa non toxicité et son activité hémostatique<sup>34, 39, 40</sup>. D'ailleurs, ses propriétés bactériostatiques et fongistatiques ont été également démontrées.

### **6.1 Biodégradabilité**

La capacité de biodégradation est un facteur essentiel pour un biomatériau visant à servir de support provisoire à la régénération tissulaire *in vitro* ou *in vivo*. Chez les mammifères, la biodégradation du chitosane se fait essentiellement par l'action d'une enzyme protéolytique non spécifique: le lysozyme<sup>35</sup>. Son action porte sur la liaison glycosidique  $\beta$ -(1→4) des unités N-acétyl-D-glucosamine. Le chitosane doit posséder au moins trois unités acétylées successives pour pouvoir être hydrolysé<sup>41</sup>. La dégradation du chitosane est fortement liée à son *DA*, un chitosane de *DA* = 50 % est plus rapidement dégradé que ceux de *DA* < 30 %<sup>42</sup>. De plus, un chitosane de *DA* < 15 % montre une plus faible vitesse de dégradation et peut subsister plusieurs mois *in vivo*<sup>43</sup>. Les produits de dégradation sont des oligomères acétylés ou non, de longueur variable, métabolisables dans l'organisme<sup>44</sup>. On pense que ces oligomères jouent un rôle dans la réponse biologique (pseudo-facteurs de croissance stimulant la régénération tissulaire).

## 6.2 Bioactivité

Le chitosane induit la prolifération cellulaire et constitue ainsi un excellent cicatrisant des tissus. Le *DA* a aussi une influence sur la réponse cellulaire. En effet, de hautes fractions ou de longues séquences de D-glucosamine réduisent la réponse inflammatoire et la bioactivité, alors que les séquences riches en N-acétyl-D-glucosamine semblent promouvoir l'intensité de la réponse inflammatoire et la reconstruction tissulaire<sup>45</sup>. Cependant, beaucoup de résultats contradictoires ont été décrits dans la littérature sur l'influence du *DA* sur l'activation cellulaire<sup>32, 46, 47</sup>.

## 6.3 Non-toxicité

Plusieurs études montrent que le chitosane n'est pas toxique pour les mammifères lorsqu'il est administré dans des quantités raisonnables<sup>34</sup>. Hirano *et al.*<sup>40</sup> ont montré que l'injection intraveineuse de 4.5 mg/kg d'oligomères de chitosane à des lapins pendant 11 jours ne provoquait aucune anomalie, alors qu'une dose de 50 mg/kg entraînait la mort en trois jours. Par voie orale, la dose létale LD50 est de l'ordre de 16 g/kg/j chez le lapin (contre 12 g/kg/j pour le saccharose) et 10 g/kg/j chez la souris.

De façon générale, aucune réaction allergique n'a été décelée lors d'essais cliniques après injection, ingestion ou implantation de matériaux à base de chitosane pur

(débarrassé des protéines présentes dans la carapace des crustacés par exemple). En outre, la non toxicité du chitosane a permis la mise sur le marché de produits diététiques à base de ce polymère (fat blocker).

## 6.4 Cytocompabilité

La cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes, des kératinocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes a été démontrée *in-vitro* <sup>26, 32, 48, 49</sup>. Aucune substance cytotoxique n'est relarguée dans le milieu. Lors de l'étude de cultures cellulaires sur un film de chitosane, il a été démontré que la croissance des cellules dépend des caractéristiques du polymère, notamment du *DA*<sup>32, 50</sup> et de la source du chitosane<sup>50</sup>. Chatelet *et al.*<sup>32</sup> ont étudié le devenir et le comportement de fibroblastes et de kératinocytes lors de leur mise en contact avec des films de chitosane de différents *DAs* compris entre 2 et 50 %. Aucune destruction ni croissance anarchique des cellules n'est observée. Plus le *DA* est élevé, plus l'adhésion cellulaire sur les films est faible, en corrélation avec la diminution des fonctions amines protonées. Les fibroblastes adhèrent deux fois plus que les kératinocytes sur les films de chitosane. L'adhésion cellulaire dépend de l'affinité du matériau avec chaque type de cellule. Les auteurs ont également remarqué que la prolifération des kératinocytes est plus importante pour les faibles *DAs*.

## 6.5 Propriétés bactériostatiques et fongistatiques

Le chitosane inhibe la croissance de nombreux champignons et bactéries<sup>51</sup>. En effet, des résultats significatifs ont été obtenus. Quelques exemples peuvent être cités, concernant les bactéries : *Escherichia* <sup>52-56</sup>, *Pseudomonas* <sup>52-55</sup>, *Staphylococcus*<sup>53, 54</sup> et *Lactobacillus plantarum*<sup>53</sup>; et dans le cas des champignons : *Candida*<sup>57</sup>, *Fusarium* ou *Saccharomyces*, etc. L'activité anti-microbienne du chitosane provient de sa capacité à agglutiner les cellules microbiennes. Dans le cas d'*Escherichia Coli*, Strand *et al.*<sup>58</sup> ont montré que plus le *DA* du chitosane est élevé, plus l'activité de floculation sur la suspension de cellules est importante. De plus, le chitosane semble posséder la capacité

de rompre la barrière de perméabilité de la membrane externe des bactéries Gram Négatif comme celle d'Escherichia Coli<sup>52, 54</sup>.

## Section 2. Structure macromoléculaire du chitosane : De l'extraction aux propriétés physico-chimiques en solution

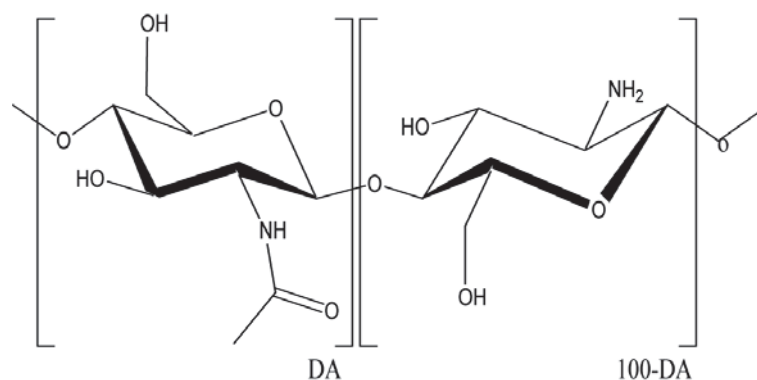
### Introduction

Un effort particulier est porté dans ce travail sur l'élaboration d'hydrogels physiques de chitosane sous forme tubulaire avec mono- ou multi-membranes. La mise en œuvre de ces matériaux leurres implique un procédé de filage par la voie humide (wet-spinning). L'objectif de cette partie est de comprendre la relation « structure chimique–propriétés physiques » du chitosane afin de maîtriser les phénomènes physico-chimiques qui accompagnent la neutralisation d'un filament de chitosane au cours d'un filage en continu. Nous commençons donc par une présentation des méthodes de préparation et caractérisation du chitosane. Le comportement en solution ainsi que la formation d'hétérogénéités nanométriques : les agrégats sont détaillés à la fin de cette section.

### 1. Définition et structure du chitosane

La chitine est un polysaccharide largement répandu dans la nature. Il est considéré comme le second plus abondant polysaccharide après la cellulose. Initialement, la chitine a été isolée à partir des champignons et a été nommée « *fungine* » en 1811 par Braconnot, un botaniste français.<sup>59</sup> D'autre part, un matériel similaire a été isolé par Odier à partir de l'exosquelette d'insectes qu'il a nommé « *chitine* ». <sup>59</sup> Ce nom est dérivé du mot grec « *khiton* » qui veut dire tunique, cote de mailles, en référence à la carapace des insectes.<sup>60</sup>

La chitine et le chitosane sont des polysaccharides constitués d'unités 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (*GlcNAc*) et 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (*GlcN*) unies par une liaison glycosidique  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (voir Figure 2.1).



**Figure 2.1** Structure chimique de la chitine et du chitosane. Pour une distribution aléatoire de résidus *GlcN* et *GlcNAc*. Le chitosane représente la famille de polymères à *DA* < 60 %, et la chitine représente la famille de polymères pour laquelle *DA* > 60%.

La chitine se présente souvent dans la nature comme des microfibrilles avec différentes modes d'assemblage. L'arrangement le plus courant des microfibrilles est organisé en couches parallèles. Par ailleurs, la chitine se retrouve dans les parois cellulaires et la matrice extracellulaire de certains champignons et levures. Ce polymère naturel est aussi le principal composant de l'exosquelette des insectes, des arthropodes (spécialement la carapace de crabes et de crevettes) et des mollusques.<sup>59</sup> Une autre source intéressante de chitine est l'endosquelette des céphalopodes tels que les calamars. Contrairement à la chitine, le chitosane est rarement présent dans la nature. Pourtant, il est possible de le trouver en petites quantités dans les champignons dimorphes comme *Mucor rouxii* où il est formé par l'action de l'enzyme désacétylase sur la chitine.<sup>59</sup> Cependant, la principale source pour la commercialisation de chitosane reste la modification chimique de la chitine.

Le chitosane peut être considéré comme la forme N-désacétylée de la chitine, même si la conversion par N-désacétylation est rarement complète.<sup>61</sup> Un paramètre structural fondamental pour la chitine et le chitosane est le degré d'acétylation (*DA*) qui représente la fraction molaire d'unités *GlcNAc*.

La différence entre la chitine et le chitosane est essentiellement d'origine physico-chimique, et elle est associée à la possibilité de solubiliser le polymère en milieu acide dilué. Dans ces conditions, la chitine est insoluble, alors que le chitosane est soluble. La frontière entre la chitine/chitosane peut ainsi être associée à un *DA* de 60 %.<sup>62</sup> Cependant, il faut signaler que ce *DA* limite dépend de nombreux paramètres<sup>63-65</sup> comme

le degré de polymérisation, le procédé d'obtention du copolymère<sup>66-68</sup>, et donc la distribution intramoléculaire des groupements acétylés<sup>41</sup>, le pH et la force ionique de la solution<sup>69</sup>. Bien que le terme chitosane soit généralement limité à toute chitine suffisamment N-désacétylée pour être soluble en milieu acide dilué, il n'existe pas une nomenclature officielle proposant une limite précise entre les deux termes.<sup>70</sup> En pratique, le chitosane fait usuellement référence à une famille de polymères dérivés de la chitine, obtenu par désacétylation, plutôt qu'à un composé bien défini.<sup>71</sup>

## **2. Le chitosane en quelques chiffres**

La chitine comme produit commercial représente une production encore faible comparée à la cellulose dont les produits commerciaux sont manufacturés à l'échelle de 100 - 200 millions de tonnes par an comparés à moins de 10 000 tonnes pour la chitine.<sup>72</sup> Cependant, il est estimé que la demande de chitine et chitosane a augmenté remarquablement dans ces dernières années. Le chitosane a visiblement un grand potentiel dans le secteur biomédical. Toutefois, la consommation la plus importante concerne les compléments alimentaires, le chitosane est en effet utilisé comme « fat blocker ».

### **2.1 Production mondiale du chitosane**

L'Inde est le premier producteur mondial de chitine et de chitosane. Certains auteurs estiment que la production annuelle globale de chitosane varie actuellement entre 3 000 – 10 000 tonnes.<sup>72, 73</sup> En effet, il est évalué qu'environ 1 % des déchets de crustacés produits dans les pays asiatiques sont actuellement utilisés pour la fabrication de la chitine et du chitosane.<sup>73</sup>

L'aspect commercial de la chitine et du chitosane a été détaillé en divers rapports comme « Chitin and Chitosan — An Expanding Range of Markets Await Exploitation » publié dans le journal de « Reports Group, Technical Insights »<sup>74</sup>. Plus récemment, la société américaine Global Industry Analysts Inc. a publié le rapport intitulé « Chitin and Chitosan — Global Strategic Business Report »<sup>75</sup>. Ce dernier document analyse, entre autres, le marché mondial de la chitine et du chitosane, et il présente également une brève description de 53 compagnies en incluant les secteurs de production les plus

importantes dans le monde. Il fournit d'ailleurs une prévision annuelle de chaque région et type de produit dérivé de la chitine pour la période de 2001 – 2010.

### 3. Méthodes de production de la chitine et du chitosane

#### 3.1 Purification de la chitine

Les principales sources commerciales de la chitine sont les carapaces de crustacés comme les crabes et les crevettes où la chitine se trouve associée à des protéines, à des pigments ainsi qu'à une phase minérale composée de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) et de phosphate de calcium ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).<sup>76</sup> L'élimination de ces substances est une étape nécessaire pour obtenir un produit pur, et permettre ainsi l'accessibilité au polymère pour la N-désacétylation de la chitine.

La méthode d'extraction de la chitine la plus utilisée est basée sur un procédé chimique acido-basique en trois étapes :<sup>62, 76</sup>

**1) Déminéralisation** en milieu acide, le plus souvent l'acide chlorhydrique (HCl) dilué à température ambiante pour minimiser l'hydrolyse (acide) des liaisons glycosidiques de la chitine. Il existe différentes conditions expérimentales selon la concentration d'acide, elle peut varier de 0,28 M HCl avec 16 h de réaction à température ambiante jusqu'à 2 M HCl avec 48 h à température ambiante. La réaction peut se mener également dans des conditions plus sévères comme 11 M HCl à -20 °C pendant 4 h.<sup>76</sup>

**2) Déprotéinisation** en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH 1 M) à une température  $T = 100$  °C, pendant 0,5 – 72 heures.<sup>76</sup>

**3) Décoloration** en présence d'agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'hypochlorite de sodium (NaOCl) ou le permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ), afin d'éliminer les pigments résiduels tels que les caroténoïdes.

Si ces étapes ne sont pas parfaitement contrôlées, elles peuvent conduire à une dégradation de la chitine. De plus, les conditions d'extraction ainsi que l'ordre des étapes jouent un rôle important sur les performances du produit final.<sup>77</sup> Plusieurs procédés enzymatiques pouvant assurer l'intégrité de la structure de la chitine native ont aussi été proposés pour la déprotéinisation<sup>78</sup>, mais du fait de l'élimination incomplète des



protéines les plus fortement liées<sup>79</sup>, ces traitements ne représentent pas encore une alternative par rapport aux traitements chimiques.

## 3.2 Méthodes d'élaboration du chitosane

Le chitosane est obtenu par traitement enzymatique ou chimique de la chitine. Il est bien reconnu que la méthode d'élaboration et de désacétylation déterminent les propriétés physiques, physico-chimiques et biologiques du polymère.

### 3.2.1 Traitement enzymatique

La désacétylation de la chitine peut être réalisée à l'aide d'enzymes appelés *chitine-désacétylases*, avec de bons rendements. Cependant, cette méthode est limitée à l'échelle du laboratoire en raison du coût élevé des enzymes. De ce fait, la transformation de la chitine en chitosane par désacétylation chimique s'est imposée jusqu'à aujourd'hui dans l'industrie, grâce à son coût plus réduit et à sa mise en œuvre plus simple.<sup>80</sup> Néanmoins, les méthodes enzymatiques, plus respectueuses de l'environnement, peuvent être vues comme les méthodes de production du chitosane de demain.

### 3.2.2 Traitement chimique

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le chitosane est produit par N-désacétylation de la chitine. La liaison amide peut s'hydrolyser en milieu acide ou basique, néanmoins les conditions d'hydrolyse en milieu basique sont plus intéressantes car elles préservent mieux la structure du polymère en limitant l'hydrolyse.<sup>76</sup> Le groupe acétamide de la chitine est en effet relativement résistant à l'hydrolyse alcaline, et sa cinétique d'hydrolyse est bien plus rapide que celle de la liaison glycosidique. Il se produit donc une dégradation (dépolymérisation) limitée, qui dépend du traitement alcalin nécessaire pour la désacétylation.<sup>72</sup>

Les masses macromoléculaires du chitosane disponible sur le marché dépendent donc généralement de son *DA*. Pour un *DA* faible (1,5 %), les masses les plus élevées disponibles sont de l'ordre de 500 000 g/mol, et sont produites par Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. (Inde).

Il n'existe pas un procédé de désacétylation « standard ». Les études du procédé de désacétylation ont été majoritairement amenées avec l'utilisation des solutions alcalines d'hydroxyde de sodium à différentes concentrations (35 – 50 %) à températures entre 80 et 140 °C pour temps de réaction dès 0,5 à 10 heures avec des rapports de 10:1 (v/m).<sup>76</sup>

Globalement, il existe différentes stratégies pour la préparation du chitosane à *DA* contrôlé à partir de la chitine :

- 1) **Désacétylation homogène** de la chitine dissoute dans une solution chaude d'hydroxyde de sodium.
- 2) **Désacétylation hétérogène** où la chitine est mise en suspension dans la soude.
- 3) Production d'un chitosane de haut poids moléculaire fortement désacétylé par des cycles de congélation-dégazage-congélation.
- 4) **Ré-N-acétylation hétérogène** d'un chitosane de *DA* faible.
- 5) **Ré-N-acétylation homogène** d'un chitosane de *DA* faible.

**1) Désacétylation homogène.** La désacétylation homogène implique que la chitine soit solubilisée. Ceci peut être obtenu soit après maintien à température ambiante pendant un temps relativement long dans une solution alcaline (ex. NaOH à 40 %) <sup>67,81</sup>, soit à l'aide d'une étape de congélation/décongélation dans une solution alcaline moins concentrée (ex: NaOH à 8 %) <sup>82</sup>. Après solubilisation, la désacétylation peut être effectuée soit à haute température (~100–140 °C), soit à température ambiante. Le temps de réaction dépend bien sûr de la température, de la concentration en soude, de la proportion NaOH/chitine (v/m); mais on peut estimer qu'il varie entre quelques heures et quelques jours. <sup>63, 76</sup> Avec cette méthode, il est possible d'obtenir facilement un chitosane avec une large gamme de *DA* entre 10 à 70 %. De plus, il a été montré que ce chitosane obtenu est soluble à pH neutre lorsque le *DA* est compris entre 45 et 55 %. <sup>83</sup> Ce phénomène est relié à une distribution parfaitement statistique des unités acétylées (*GlcNAc*) le long de la chaîne. <sup>71,84</sup>

**2) Désacétylation hétérogène.** Dans la réaction de désacétylation hétérogène, la chitine est dispersée dans une solution alcaline chaude, généralement hydroxyde de sodium (NaOH). Le traitement habituel s'effectue en présence de solutions de soude très concentrées de l'ordre de 40 à 50 %, pour des températures supérieures à 90 °C et pour

un temps de réaction de plus d'une heure.<sup>62</sup> Dans le premier cycle de désacétylation, le chitosane atteint un *DA* voisin de 15 %.<sup>62, 81</sup> Pour l'obtention d'un chitosane avec un *DA* plus faible, il est donc nécessaire de répéter la réaction de désacétylation au cours d'un deuxième cycle<sup>85</sup>, ce qui permet d'atteindre un chitosane totalement désacétylé.<sup>76</sup> Les lavages entre les cycles de désacétylation permettent d'éliminer les complexes peu réactifs de chitine/hydrate de sodium ainsi que diminuer la concentration de la soude ce qui augmente l'accessibilité aux groupes N-acétyl restants.<sup>76, 86</sup>

Chaque étape réalisée sous ses conditions de réaction relativement agressives contribue à une diminution importante de la masse molaire ( $M_w$ ) du polymère. Afin de limiter ce problème, la réaction de désacétylation est réalisée sous atmosphère inerte ( $N_2$  or Ar) ou par l'addition de thiophenolate de sodium ( $C_6H_5SNa$ ) considéré comme capteur d'oxygène, ou l'utilisation des agents réducteurs comme le borohydrure de sodium ( $NaBH_4$ ) ou dans des solvants tel que le 2-méthyl-2-propanol ( $C_4H_{10}O$ ).<sup>76</sup>

La *phase amorphe* de la chitine est plus accessible que la *phase cristalline* ( $\alpha$ -chitine), ce qui conduit à un chitosane dont le *DA* peut varier le long de la chaîne : les motifs emprisonnés dans la phase cristalline de la chitine ont une probabilité de désacétylation inférieure. Cependant, il a été montré que les endosquelettes de calamar représentent une source de base très intéressante pour l'élaboration du chitosane. La réaction de désacétylation est plus facile car les zones cristallines (allomorphe  $\beta$ ) sont plus accessibles aux réactifs.<sup>62, 64, 65</sup> Les autres avantages de cette source de chitine sont : (i) qu'elle est faiblement minéralisée, (ii) dépourvue de pigments et (iii) à teneur limitée en contaminants (ex : des métaux lourds).<sup>87</sup> De ce fait, le chitosane produit est de très bonne qualité, avec une structure copolymère plus proche du polymère parfaitement statistique, une masse molaire élevée et un indice de polymolécularité ( $I_p$ ) assez bas.<sup>62, 87</sup> Dans une étude récente, Lamarque *et al.* 2007<sup>86</sup> ont étudié les aspects thermodynamiques de la désacétylation de la  $\beta$ -chitine en conditions hétérogènes.

**3) Production d'un chitosane de haut poids moléculaire totalement désacétylé par des cycles de congélation-dégazage-congélation.** Lamarque *et al.*<sup>64, 65</sup> ont étudié les paramètres physico-chimiques de la désacétylation en milieu hétérogène, dans le but d'optimiser le procédé d'élaboration pour préserver la structure macromoléculaire. Les auteurs décrivent un nouveau procédé permettant d'obtenir des chitosanes de faibles

DA tout en gardant de très hautes masses moléculaires. L'utilisation d'étapes de congélation/décongélation sous vide entre les désacétylations successives favorise l'élimination de l'oxygène du réacteur et de cette façon prévient la dégradation des chaînes. Ce procédé permet d'obtenir des chitosanes totalement désacétylés pour des masses molaires ( $M_w$ ) de l'ordre de 500 000 g/mol.

**4) et 5) Ré-N-acétylation d'un chitosane de DA faible dans des conditions homogènes ou hétérogènes.** Un chitosane de bas DA peut être ré-N-acétylé afin d'obtenir des échantillons de polymère de différentes DA, avec le même degré de polymérisation ( $DP_w$ ) et un indice de polymolécularité ( $I_p$ ) contrôlé. La ré-N-acétylation peut être donc effectuée de manière hétérogène ou homogène. Dans des conditions hétérogènes, le polymère est dispersé dans du méthanol<sup>88</sup>; alors que dans des conditions homogènes, le polymère est d'abord dissous dans l'eau légèrement acide. Dans les deux cas, un co-solvant est ajouté.

La réaction de ré-N-acétylation est le plus souvent réalisée dans des conditions homogènes pour obtenir un polymère parfaitement statistique.<sup>89, 90</sup> Vachoud<sup>91</sup> et Sorlier<sup>92</sup>, proposent une méthode consistant à acétyler le chitosane par réaction de la fonction amine avec l'anhydride acétique en milieu hydroalcoolique. L'alcool utilisé est du 1,2-propanediol; cet alcool possède une viscosité élevée, ce qui permet de bien contrôler la réaction car la constante diélectrique du milieu diminue favorisant ainsi la formation de liaisons de faible énergie (des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène)/

Cette réaction de réacétylation ne provoque pas de dépolymérisation puisqu'elle se déroule à température ambiante sans réactif oxydant susceptible de couper les liaisons glycosidiques. La distribution des groupes acétyle est statistiquement aléatoire, on obtient ainsi un produit final homogène, ayant une bonne solubilité.<sup>93</sup>

### 3.3 Intérêt de la sonication pour le contrôle de la masse molaire

Plus récemment, Popa-Nita *et al.*<sup>94, 95</sup> ont développé une méthode basée sur un traitement d'ultrasons pour l'obtention de "séries homologues" de chitosane avec une structure contrôlée et un faible  $I_p$ . Avec un chitosane de départ de faible DA et de haut

degré de polymérisation, les techniques ré-N-acétylation précédentes et le traitement de sonication permettent d'obtenir : (i) une série de polymères homogènes en  $DP_w$ , avec une distribution statistique des résidus, pour une large gamme de  $DA$ s (de 1,5 à 70 %), et (ii) une série de polymères homogènes en  $DA$ , de structure chimique primaire non modifiée, dans un domaine de  $DP_w$  très étendu (de 3 100 à 50). De plus, cette méthode permet d'éviter ou d'écourter les étapes longues et fastidieuses de lavage et de purification des polymères en fin de réaction, impérativement rencontrées avec les autres méthodes (chimique ou enzymatique).

#### 4. Caractérisation des paramètres structuraux du chitosane

Le chitosane se caractérise par plusieurs paramètres structuraux importants: la masse molaire ( $M_w$ ) et son indice de polymolécularité ( $I_p$ ), le degré d'acétylation ( $DA$ ) et la distribution des deux résidus le long de la chaîne polymère. Nous présenterons ci-après les techniques analytiques utilisées durant ce travail permettant la détermination de ces caractéristiques.

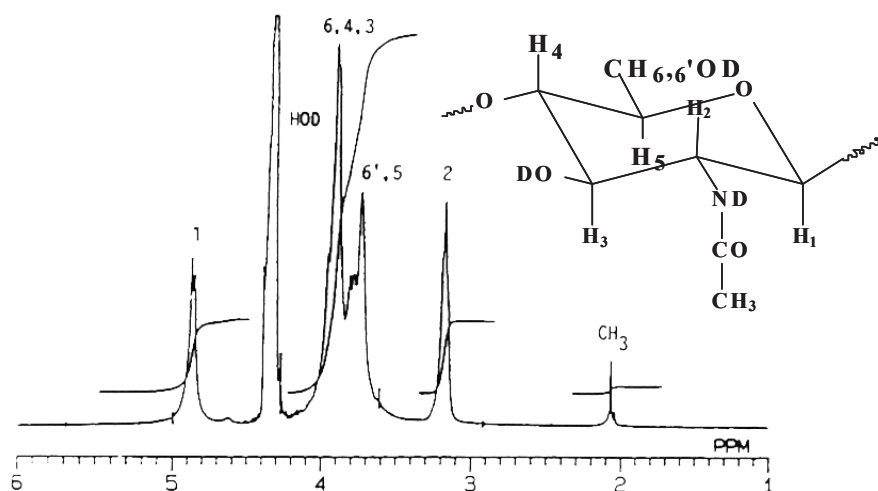
##### 4.1 Détermination du $DA$

Plusieurs techniques analytiques permettent de caractériser le  $DA$  du chitosane.<sup>96-110</sup> Néanmoins, aujourd'hui, la RMN du proton est la plus couramment utilisée car elle est facile à mettre en œuvre, ne nécessite aucun étalonnage et permet l'obtention de résultats précis en utilisant de faibles quantités de produit (environ 5 mg).<sup>111</sup>

Parmi les méthodes utilisées pour calculer le  $DA$  du chitosane par RMN du proton, nous avons utilisé celle de Hirai *et al.*<sup>106</sup>. La méthode consiste à comparer l'intensité du signal de résonance des trois protons des groupes méthyle du groupe N-acétyle dont le déplacement chimique est de l'ordre de 2 ppm à celle des six protons du cycle ( $H_2$ ;  $H_3$ ;  $H_4$ ;  $H_5$ ;  $H_6$ ;  $H_6'$ ), situés entre 3 et 4 ppm (Figure 2.2). Le  $DA$  est alors déterminé par la relation suivante :

$$DA (\%) = \left[ \frac{\frac{1}{3} Aire_{CH_3}}{\frac{1}{6} Aire_{H_2-H_6'}} \right] \times 100 \quad \text{eq (0.1)}$$

Dans la présente étude, l'analyse a été effectuée à température ambiante, mais elle peut-être faite à 70 °C afin de diminuer la viscosité de la solution, et favoriser ainsi une meilleure résolution spectrale. Le polymère (10 mg) est dissous dans une solution D<sub>2</sub>O (1 mL) et d'acide chlorhydrique (5 µL) pour former une solution d'acide chlorhydrique deutériée de 0.061 mM.



**Figure 2.2** Spectre RMN <sup>1</sup>H du chitosane à 400 MHz.<sup>106</sup>

À partir des *DAs* > 60 %, il est difficile d'analyser le chitosane car il est compliqué d'obtenir de vraies solutions homogènes, d'autre part les solutions obtenues sont systématiquement très visqueuses. Afin d'obtenir des spectres de meilleure définition, Vårum *et al.*<sup>112</sup> proposent de dégrader les chitosanes par des nitrites pour réduire la viscosité. Les spectres sont réalisés dans D<sub>2</sub>O, à pD compris entre 3 et 4. Pour calculer le *DA*, ils utilisent alors la résonance des protons anomères H<sub>1</sub>.<sup>112</sup> Le principal inconvénient de cette méthode est lié à l'incertitude sur le résultat final. Elle peut être significative car l'aire du pic est extrêmement faible. De plus, la méthode de préparation de l'échantillon est plus longue. Par contre, elle représente une méthode intéressante pour la détermination de la distribution des unités acétylées le long de la chaîne (à bloc ou statistique), en calculant la fréquence d'apparition des diades.<sup>112</sup> Ceci est possible car la résonance des H<sub>1</sub> des unités acétylées est sensible à la nature de l'unité voisine (acétylée ou non)<sup>112</sup>, ce qui entraîne le déplacement de son pic.

## 4.2 Distribution des unités acétylées et non acétylées dans la molécule de chitosane

Le *DA* et la distribution des groupements acétylés le long de la chaîne sont des paramètres structuraux qui influencent les propriétés physico-chimiques<sup>113-115</sup> et biologiques du chitosane<sup>116</sup>. Dans la section bibliographique précédente, nous avons rappelé qu'il existe plusieurs méthodes pour l'élaboration de chitosanes avec un *DA* donné. La distribution des résidus acétylés varie selon la méthode de désacétylation ainsi que la source de chitine utilisée.<sup>117</sup> Il peut y avoir des chitosanes avec le même *DA* mais élaborés par différentes méthodes et qui présentent des différences en cristallinité, solubilité et gonflement.<sup>76</sup> Par exemple, la désacétylation homogène de la chitine conduit à un dérivé soluble dans l'eau pour des *DAs* proches de 50 %.<sup>68</sup> En revanche, leurs homologues à même *DA* obtenus par désacétylation hétérogène sont insolubles.<sup>112, 118-120</sup> Ces différences en solubilité modifient les propriétés physiques, physico-chimiques et donc biologiques du chitosane, comme la biodégradabilité, en liaison avec l'accessibilité enzymatique<sup>121</sup> et la production de chitooligosaccharides<sup>71, 122, 123</sup> de différents *DAs*. Par conséquent, il est important de comprendre la distribution des résidus en relation avec les conditions de désacétylation afin de pouvoir obtenir des chitosanes avec une structure contrôlée, reproductible, voire adaptée à une application spécifique dans un contexte biologique donné.

Il est généralement bien accepté que les échantillons de chitosane préparés par la désacétylation homogène de la chitine présentent une distribution statistique des groupements acétylés et désacétylés le long de la chaîne polymère, expliquant la solubilité des chitosanes à *DAs* relativement élevés (50 %). En revanche, il semble plus difficile de dégager de la littérature une tendance claire quant à la distribution de groupes acétylés des échantillons de chitosane obtenus par la voie de désacétylation hétérogène de la chitine. En réalité, les méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats diffèrent d'un auteur à l'autre.<sup>63-65, 71, 84, 118-120, 124, 125</sup>

## 4.3 Détermination de la masse molaire moyenne ( $M_w$ )

La masse molaire du chitosane est un paramètre difficile à déterminer avec précision. Ceci est dû aux interactions de diverses natures qui se présentent lorsque ce

polysaccharide polyélectrolyte est en solution.<sup>126</sup> Les masses molaires des polymères naturels en solution, y compris le chitosane, sont généralement déterminées par trois méthodes : viscosimétrie capillaire, par diffusion de la lumière couplée ou non à une chromatographie d'exclusion stérique.

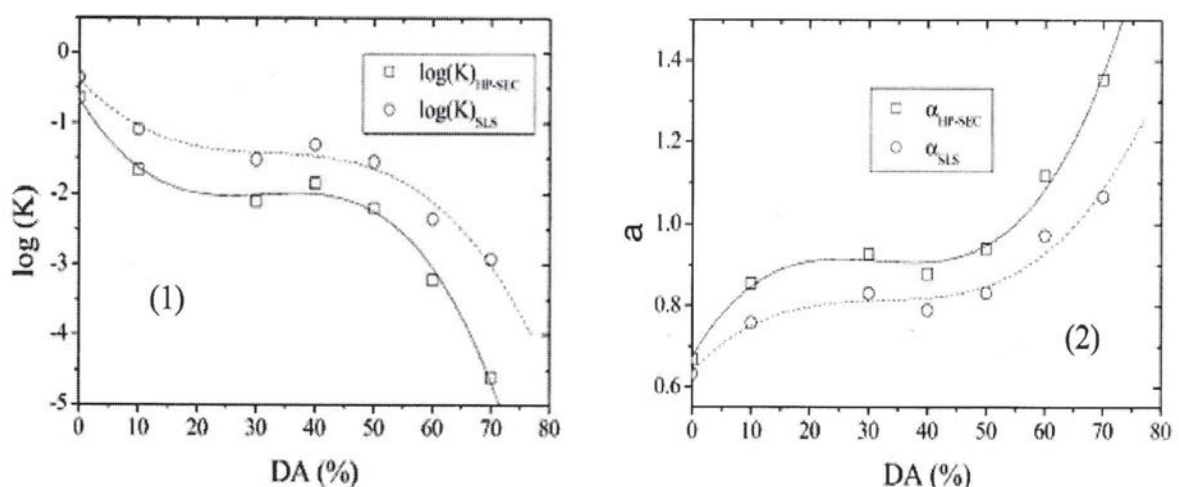
### 4.3.1 Viscosimétrie capillaire

La viscosimétrie est une méthode très couramment utilisée pour détermination de la masse molaire, laquelle est déduite à partir de la mesure de la viscosité intrinsèque ( $\eta_0$ ) du polymère. Pour obtenir une valeur correcte, il est nécessaire de travailler dans le régime dilué avec un bon solvant.<sup>126</sup>

La masse molaire du polymère et la viscosité intrinsèque sont reliées par l'équation de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) (eq 2.2).

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad \text{eq (0.2)}$$

En effet, la masse obtenue par cette relation correspond à une masse molaire moyenne viscosimétrique ( $\overline{M}_v$ ). Les constantes empiriques  $K$  et  $a$  varient principalement avec le  $DA$  (voir Figure 2.3)<sup>127</sup>, la nature et les conditions du solvant utilisé pour sa solubilisation ainsi que la température. L'exposant  $a$  est indicatif de la conformation de la chaîne en solution. Ainsi,  $a$  est égal à 0,5 pour des pelotes statistiques dans des conditions non perturbées, à 0,8 pour des chaînes dans un bon solvant et à 1,8 pour des bâtonnets rigides.<sup>128</sup>



**Figure 2.3** Variation des paramètres (1) Log  $K$  et (2)  $a$  de l'équation de MHKS en fonction du  $DA$ .<sup>127</sup> Ces paramètres ont été obtenus par la mesure de  $M_w$  déterminée par



HP-SEC (High Performance-Size Exclusion Chromatography, [2]), ou SLS (Static Light Scattering, 0).

En général, les différentes solutions tampons proposées pour la viscosimétrie impliquent un acide à une concentration donnée pour la protonation du chitosane, et un sel pour l'écrantage des interactions électrostatiques. Dans la bibliographie, certains auteurs<sup>128-132</sup> ont proposé plusieurs solvants avec diverses valeurs de  $K$  et  $a$ . Pour expliquer ces différences de valeurs, il faut rappeler que la viscosimétrie est une méthode considérée comme *relative* car elle est affectée par la structure chimique et l'état physico-chimique du polymère, et par les interactions avec le solvant.<sup>133</sup> En conséquence, les différences dans les valeurs de  $K$  et  $a$  peuvent être fonction du mode de préparation du chitosane et à la polymolécularité du polymère analysé. On doit donc considérer avec précaution les masses molaires du chitosane calculées par cette technique.

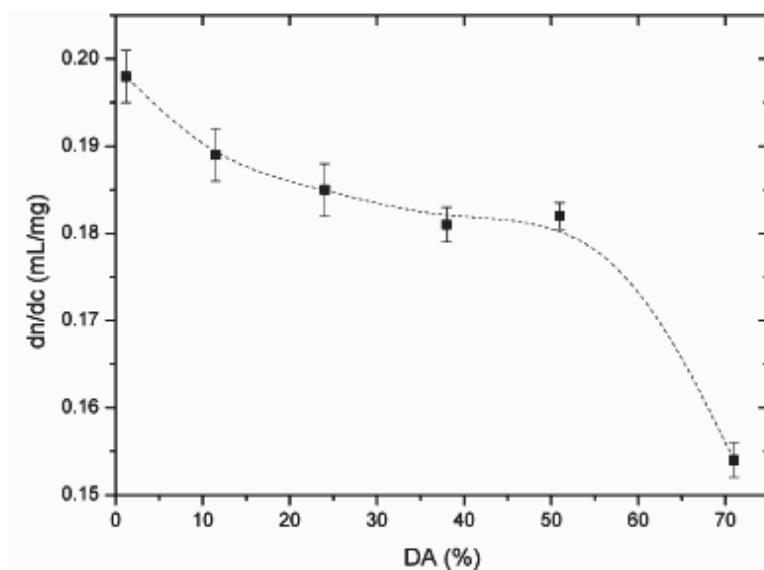
Pour la caractérisation du chitosane, nous avons utilisé une solution tampon de 0,2 M acide acétique/0,15 M acétate d'ammonium (pH = 4,5). Ce tampon présente l'avantage de stabiliser le pH dans un large intervalle de concentration du chitosane, et le pH est suffisamment bas pour considérer que tous les résidus *GlcN* se trouvent sous la forme protonée, mais dans une situation où les interactions électrostatiques sont écrantées.<sup>126</sup> Les valeurs expérimentales pour  $K$  et  $a$  utilisées au cours de cette étude sont donc : 0,051 et 1,25 respectivement.

### 4.3.2 Diffusion de la lumière (LS)

La diffusion statique de la lumière représente un groupe de techniques expérimentales qui permet de déterminer des masses molaires sans hypothèse forte concernant la structure chimique et physique du polymère.<sup>133</sup> Par conséquent, elle reste la technique de préférence pour déterminer la masse molaire des polymères en solution. Elle peut être effectuée seule (par la méthode de Zimm) ou couplée à la chromatographie d'exclusion stérique (couplage SEC/ MALLS). La masse molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) est calculée à partir de la valeur de l'incrément d'indice de réfraction ( $dn/dc$ ). Ce paramètre dépend en particulier du solvant utilisé, de la force ionique de la solution et du  $DA$ , comme le montre sur le Tableau 2.1 et la Figure 2.4.

**Tableau 2.1** Incréments d'indice de réfraction ( $dn/dc$ ) pour le chitosane en différentes conditions expérimentales.

Solvant	$\lambda$ (nm)	DA (%)	$dn/dc$ (mL/g)
AcOH 0,2 M/AcONa 0,1 M <sup>(130)</sup>	436	0	0,208
		9	0,194
		26	0,189
		31	0,175
AcOH 0,1 M/NaCl 0,2 M <sup>(134, 135)</sup>	632,8	5	0,201
		15	0,191
		28	0,183
		42	0,180
AcOH 0,3 M/AcONa 0,2 M <sup>(129, 136)</sup>	632,8	2 – 21	0,163
		13 – 61	0,190
AcOH 0,3 M/AcONa 0,1 M <sup>(137)</sup>	632,8	0 – 24	0,181
AcOH 0,2 M/AcONa 0,15 M <sup>(113)</sup>	632,8	1 – 71	Loi de comportement universelle du chitosane en fonction du DA



**Figure 2.4** Variation de  $dn/dc$ , en fonction du  $DA$ . Solution tampon d'acide acétique (0,2 M)/acétate d'ammonium (0,15 M) à 632,8 nm.<sup>113</sup>

La clarification (élimination des particules insolubles) des solutions de chitosane représente la principale difficulté de cette technique de diffusion de la lumière. Le chitosane forme facilement des associations intermoléculaires en solution, qui conduisent à une forte augmentation de l'intensité diffusée aux petits angles et donc à une erreur sur la détermination de la  $M_w$ . Il est donc nécessaire de réaliser des centrifugations et/ou filtrations des échantillons avant la mesure, tout en restant attentif à la concentration en polymère.

### 4.3.3 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC), méthode séparative, est l'une des techniques le plus utilisées pour déterminer la masse molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) ainsi que la distribution de la masse moléculaire d'un polysaccharide en solution.<sup>72</sup> La SEC peut être utilisée seule, mais le plus souvent elle est couplée à la diffusion de la lumière. L'utilisation d'un détecteur MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering) en plus du réfractomètre de la SEC permet alors de calculer, en plus de  $M_w$ , l'indice de polymolécularité, la concentration réelle en polymère et le rayon de giration ( $R_g$ ).

Pour l'analyse du chitosane, les phases stationnaires sont généralement formées de gels de polyacrylamide<sup>138</sup> ou de silice cationique<sup>139</sup> qui contient un réseau de pores uniformes dans lesquels les molécules de chitosane et de solvant tampon peuvent diffuser. Le temps moyen de séjour des molécules du chitosane dans la colonne dépend de leur taille relative. Les molécules qui sont nettement plus grandes que la taille moyenne des pores du support en sont exclues, et elles progressent dans la colonne pratiquement à la vitesse de la phase mobile. Les molécules qui sont nettement plus petites que les pores peuvent pénétrer dans leur labyrinthe et y rester piégées très longtemps ; elles seront les dernières à être éluées. En ces deux extrêmes se situent les molécules de taille intermédiaire dont le taux de pénétration dans les pores du support dépend de leur diamètre. Le fractionnement de ce groupe dépend directement de la diversité des tailles et, dans une certaine mesure, de la forme.

La chromatographie d'exclusion ne fait intervenir aucune interaction physique ou chimique entre l'échantillon de chitosane et la phase stationnaire. Dans le cas d'un polyélectrolyte, les nombreux effets de charge entre le polyion, l'éluant et la phase stationnaire rendent l'analyse délicate. En fait, il faut que les éventuelles interactions soient très faibles afin d'assurer que la séparation s'effectue uniquement en fonction des dimensions de la chaîne. Dans cette étude, nous avons employé comme éluant une solution buffer 0,2 M acide acétique/0,15 M acétate d'ammonium (pH = 4,5) parce qu'il permet de limiter les possibilités de liaisons hydrogène entre le chitosane et la phase stationnaire.<sup>92, 113, 127, 139, 140</sup> En plus, sa force ionique de 0,15 M permet d'écranter les charges du polymère.

Au sein du laboratoire, nous disposons d'une SEC (Waters) couplée avec une diffusion de lumière laser multi-angle (MALLS) de Wyatt Cy. (Dawn DSP-F). Deux détecteurs sont en fait utilisés dans le système: un refractomètre différentiel (Waters 410) pour calculer la concentration, et un détecteur de diffusion de lumière multi-angle pour estimer la distribution. Deux colonnes (Protein Pack Glass 200 SW et TSK gel G6000-PW) avec différentes porosités sont connectées en série.

## 5. Propriétés physico-chimiques du chitosane en liaison avec ses paramètres structuraux

Par la présence de groupes *GlcNAc* et *GlcN*, le chitosane doit être considéré comme un polyélectrolyte amphiphile (hydrophobe) cationique.<sup>141</sup> Plus précisément, le comportement<sup>113, 114</sup> et l'organisation<sup>142</sup> du chitosane en solution reposent sur la balance entre les interactions hydrophiles et hydrophobes (balance *H/H*). Ces interactions apparaissent soit entre des segments d'une même ou de différentes chaînes, soit entre des portions de chaînes et des molécules du solvant ou de soluté. Elles sont contrôlées par deux groupes représentatives de facteurs : (i) les paramètres structuraux du chitosane (le *DA*, la distribution de résidus le long de la chaîne, le *DP<sub>w</sub>*), et (ii) les paramètres environnementaux (le pH, la force ionique, la température, le temps, la constante diélectrique et la qualité du solvant). La concentration en polymère (*c<sub>p</sub>*) est un troisième paramètre plus particulier à prendre en compte. Les propriétés physiques, physico-chimiques et biologiques du chitosane dépendent étroitement, mais de manière complexe des ses paramètres structuraux.

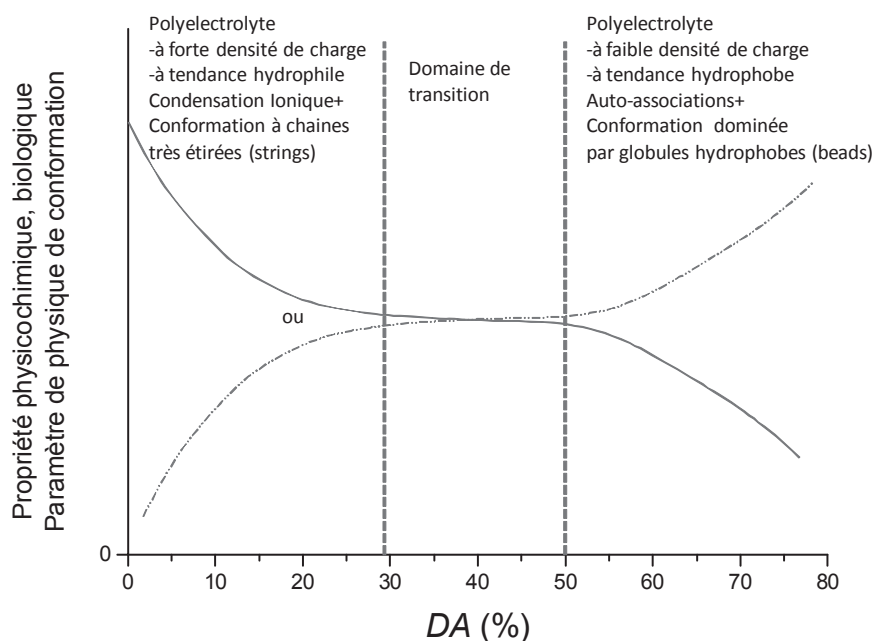
## 5.1 Solubilité

Le chitosane sous sa forme amine libre est insoluble dans l'eau. En milieu aqueux acide, la protonation de la fonction amine crée des répulsions électrostatiques plus importantes que les interactions attractives interchaînes (hydrophobes) dues aux nombreuses liaisons précédemment citées. Le chitosane forme alors un polyélectrolyte cationique dans des solutions d'acides dilués.

De par ses propriétés acido-basiques, le chitosane est considéré comme soluble pour des pH compris entre 1 et 6. Cette gamme de pH s'élargit lorsque le *DA* augmente. A partir d'un *DA* proche de 60 %, et pour une distribution statistique des résidus, le chitosane devient soluble dans l'eau à tout pH.<sup>143</sup>

De façon générale, le comportement du chitosane est en fonction de son *DA*, et il peut être décrit et interprété par une loi générale ou "universelle" montrant trois domaines (Figure 2.5) :

- ***DA* < 28 % à ionisation totale**, la chaîne est fortement chargée et son comportement polyélectrolyte est décrit par la théorie de la condensation ionique de Manning<sup>144</sup>. La chaîne est dans une conformation très étendue à cause d'un effet de volume exclu électrostatique important, le polyélectrolyte est plutôt hydrophile.
- ***DA* > 50 %** : la chaîne est plutôt hydrophobe et faiblement chargée. Les interactions polymère/polymère sont favorisées par rapport aux interactions polymère/solvant.
- **28 % < *DA* < 50 %** : domaine de transition.



**Figure 2.5** Loi de variation des propriétés physico-chimiques, biologiques et de la conformation en solution du chitosane statistique de faible polymolécularité en fonction du  $DA$ .<sup>145</sup>

En plus du  $DA$ , la force ionique est un autre paramètre externe affectant la solubilité par son influence sur le potentiel électrostatique. Cet effet est illustré par la précipitation du chitosane sous forme saline, pour des pH's inférieurs à 2.<sup>146</sup> En effet, une force ionique trop élevée produit l'écrantage de charges, ce qui favorise les interactions polymère/polymère. De cette façon est expliqué l'insolubilité du chitosane (sous la forme amine libre) dans des acides forts à température ambiante tels (ex : HCl et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Néanmoins, Yamaguchi *et al.*<sup>147</sup> ont démontré la possibilité de solubiliser le chitosane dans une solution aqueuse de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à température relativement élevées ( $T \sim 80 - 85$  °C) ainsi que la possibilité de former de gels ioniques à faible pH en refroidissant cette solution.

Les travaux de Boucard *et al.*<sup>141</sup> et Popa-Nita *et al.*<sup>94</sup> sur la microstructure du chitosane en solution ont étudié l'influence de la nature du contre-ion sur la solubilité du polymère. Ces auteurs n'observent aucune différence entre le cas du contre-ion acétate et butyrate. Par contre, ils ont déduit que le chlorhydrate de chitosane correspond à un polymère plus hydrophobe que l'acétate et le butyrate pour des faibles degrés d'acétylation. Cette différence d'hydrophobie peut être expliquée par la formation d'un complexe entre les ions acétate et les résidus *GlcN*. En effet, des modélisations et

simulations moléculaires<sup>148</sup> ont montré que les ions acétate (et suivant le même raisonnement, les ions butyrate aussi) peuvent interagir simultanément par des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène respectivement avec les groupements amine et hydroxyle du carbone 3 des unités glucosamine.

Par ailleurs, pour des *DA*'s supérieurs à 40 %, domaine pour lequel le polymère est faiblement chargé et plus riche en résidus acétylés (pas de condensation ionique), la solubilité du chitosane ne semble pas être influencée par la nature du contre-ion.

## 5.2 Phénomènes d'agrégation

Des associations intermoléculaires peuvent se former par liaisons hydrogène et/ou interactions hydrophobes dans les solutions de polyélectrolytes, en particulier les polyélectrolytes hydrophobes. Différents types d'agrégats sont possibles. Si les agrégats ne sont pas dépendants de la concentration en polymère, il est alors possible de les éliminer assez facilement par centrifugation et/ou filtration.

Ces phénomènes d'agrégation ont été observés par plusieurs auteurs. Anthonsen *et al.*<sup>69</sup> ont mis en évidence la présence des agrégats par diffusion de la lumière sur des chitosanes de *DA* = 0 et 60 %. Même en clarifiant au préalable les solutions par ultracentrifugation et filtration, une courbure de l'intensité diffusée en fonction de la concentration en polymère est détectée. De plus, cette courbure est accentuée lorsque le *DA* est élevé. Ainsi, ces agrégats sont d'une part dépendants de la concentration en polymère et, d'autre part, ils sont favorisés par l'hydrophobie de la chaîne. Les auteurs expliquent ces phénomènes par la présence de blocs de résidus acétylés (liée à la source des échantillons).

Les travaux de Amiji<sup>149</sup> et Wang *et al.*<sup>150</sup> ont montré que les chaînes de chitosane s'auto-associent en solution aqueuse par des interactions hydrophobes qui apparaissent principalement entre les résidus acétylés. Ainsi, pour les *DA*'s élevés, la présence de ces résidus favorise la formation des associations. Sorlier *et al.*<sup>114</sup> confirment la présence d'agrégats dans les solutions semi-diluées de chitosane, provenant plutôt des liaisons hydrogène pour les faibles *DAs* (0 à 20 %) et des interactions hydrophobes pour les *DA*'s élevés. De plus, des analyses par diffusion quasi-élastique de la lumière des solutions

diluées de chitosane<sup>142</sup> ont montré la présence des structures supramoléculaires dépendant du *DA* et du degré de neutralisation.

Schatz *et al.*<sup>113</sup> ont étudié les valeurs du rayon de giration pour des solutions de chitosane dans une solution tampon 0,2 M acide acétique/0,15 M acétate d'ammonium (pH = 4,5), après avoir filtré les solutions successivement sur des membranes de porosités 0,45 et 0,22  $\mu\text{m}$  sans perte de matière significative. Une augmentation importante du rayon de giration pour un *DA* de 71 % révèle la présence d'agrégats, probablement dus à la forte proportion de résidus acétylés à l'origine d'associations par interactions hydrophobes. Cependant, ces agrégats ne paraissent pas dépendants de la concentration : en effet, une filtration supplémentaire sur une membrane de 0,22  $\mu\text{m}$  permet de les éliminer et la perte de matière n'est estimée qu'à 11 %.





## Section 3. Hydrogels physiques : Stratégies d'élaboration

### Introduction

Compte tenu du contexte de l'élaboration d'hydrogels physiques de chitosane sous forme tubulaire avec mono- ou multi-membranes par le filage par la voie humide, nous consacrons cette section à l'état de l'art sur les hydrogels de chitosane. Ainsi, nous examinons d'abord les principes fondamentaux de divers types d'hydrogels physiques afin de confirmer nos choix dans l'utilisation du chitosane comme polymère leurre et de sa mise en forme comme hydrogel physique. Par la suite, nous présentons les principales techniques de mise en œuvre pour l'élaboration des hydrogels physiques de chitosane. Enfin, nous discutons le potentiel biologique des hydrogels physiques de chitosane comme leurre de milieux biologiques par leurs applications en l'ingénierie tissulaire.

### 3.1 Définition d'un hydrogel

En 1960, Wichterie et Lim ont développé avec succès le premier hydrogel synthétique à base de poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA) pour son utilisation comme lentilles souples<sup>151</sup>. Par la suite, de nouveaux hydrogels ont été développés pour de très larges applications, en particulier dans le secteur biomédical.

Il n'existe pas une définition officielle d'hydrogel car il existe une très grande variété de procédés d'élaboration de ces matériaux, la structure résultante de ces gels est donc très variable. Peppas<sup>152</sup> propose une définition très générale : « Un gel est un réseau constitué de polymères hydrophiles capables de gonfler dans l'eau ou dans une solution aqueuse ». D'autre part, Guenet<sup>153</sup> suggère une définition très similaire « Un gel est un réseau constitué de chaînes polymères interconnectées et gonflées par un solvant dont la concentration est supérieure à 90 % ». Almdal *et al.*<sup>154</sup> considèrent que le terme gel s'applique à un matériau à la fois déformable et élastique, et possédant des caractéristiques de l'état solide : contrairement aux liquides, il doit pouvoir garder sa forme sous son propre poids, le gel ne s'écoule pas. Dans la littérature, certaines

communautés scientifiques utilisent le terme de gel pour désigner des solutions très visqueuses (ex : solutions d'acide hyaluronique). Ce n'est pas le choix qui sera fait par la suite dans ce travail, puisque nous adopterons les définitions du gel et de l'hydrogel données par les physiciens.

### 3.2 Classification des hydrogels

En raison de la grande diversité des matériaux hydrogels, différents critères peuvent être considérés pour leur classement. La classification la plus simple est fondée sur la nature du polymère ; les hydrogels sont formés soit à partir de polymères naturels, soit de polymères synthétiques. D'autres critères de classification peuvent également être considérés, comme les hydrogels neutres ou chargés (formés à partir de polyélectrolytes cationiques, anioniques ou ampholytiques), les classifications liées à la structure macromoléculaire (homopolymères, copolymères, multipolymères et hydrogels de type réseau interpénétré), les caractéristiques microstructurales (amorphes, semi-cristallin, ou liaison d'hydrogène), etc.<sup>151</sup> Parmi ces critères de classement, la classification fonctionnelle des hydrogels peut être utile. En effet, une grande variété d'hydrogels fonctionnels a été proposée, par exemple : les hydrogels biodégradables, les hydrogels « intelligents » (stimulables), les hydrogels superporeux, et ainsi de suite.<sup>151</sup> Néanmoins, la classification la plus appropriée pour les hydrogels à applications biomédicales est basée sur le type de nœuds de réticulation. Deux types d'hydrogels, en particulier ceux qui sont à base de chitosane, sont alors distingués : des hydrogels chimiques (covalents) et des hydrogels physiques.

### 3.3 Hydrogels chimiques et physiques de chitosane

Les *hydrogels chimiques* sont formés par des liaisons covalentes, les unités de répétition ont des groupements fonctionnels pour former les nœuds ou points de réticulation en réagissant avec un agent réticulant.<sup>155</sup> De par le caractère irréversible de la liaison covalente, ces hydrogels ne sont ni thermoréversibles, ni solvoréversibles.<sup>155</sup> Les agents de réticulation les plus étudiés et utilisés pour la réticulation entre les chaînes du chitosane sont : le glutaraldéhyde<sup>156-158</sup>, le glyoxal<sup>159, 160</sup>, le diethyl squarate<sup>161</sup>, l'acide oxalique<sup>162</sup> et la genipine<sup>163</sup> Les polymères fonctionnalisés sont aussi utilisés pour la formation des hydrogels chimiques hybrides (synthétiques/naturels) avec le chitosane, par exemple le poly (éthylène glycol) (PEG) diacrylate<sup>164</sup>, les

polymères téléchélique-PVA<sup>165</sup> ou les dialdéhydes dérivés du PEG<sup>166</sup>, du scléroglycane<sup>167</sup>, la  $\beta$ -cyclodextrine oxydé<sup>165</sup> ou encore l'amidon oxydé<sup>168</sup>.

Par contre, les *hydrogels physiques* sont créés par des liaisons faibles et partiellement réversibles. La microstructure de l'hydrogel peut être stabilisée par plusieurs types d'interactions réversibles qui sont localisées sur des « zones de jonction », éventuellement multifonctionnelles, qui peuvent s'étendre sur une distance de 0.1 à 1  $\mu\text{m}$ .<sup>155</sup> Dans certains cas, les interactions réversibles sont de relativement haute énergie telles que les liaisons ioniques ou la chélation de métaux. Dans autres cas, les interactions sont de faible énergie comme les liaisons d'hydrogène ou Van de Waals, les interactions hydrophobes et de transfert de charge.<sup>169</sup> Contrairement aux liaisons covalentes, ces liaisons ne sont pas stables car elles possèdent un temps de vie déterminé. Leur nombre et leur répartition spatiale fluctuent avec le temps et la température.<sup>155</sup> A température ambiante, ces liaisons possèdent une énergie de liaison comparable à  $kT$ <sup>170</sup>, et c'est pour cette raison que l'on peut observer une transition réversible entre un liquide et un gel en fonction de la température, du solvant ou du pH.

Parmi les gels physiques de polymères naturels, on peut citer les gels de protéines (ex : la gélatine et le collagène) et les gels de polysaccharides (l'agarose, les carraghénanes, les pectines et les alginates, ou les gels de dérivés de cellulose, la chitine et le chitosane).<sup>171</sup> D'ailleurs, la grande capacité d'absorption d'eau est due à la présence de différents groupes hydrophiles comme -OH, -CONH-,  $\text{COO}^-$  et  $-\text{SO}_3\text{H}^-$ , selon le type de polymère.<sup>172</sup>

Les premiers gels physiques dérivés de chitosane obtenus par acylation et sans agent réticulant ont été décrits par Hirano *et al.*<sup>173, 174</sup>. Ensuite, Moore et Roberts<sup>175, 176</sup> étudient aussi l'acylation des fonctions amines du chitosane avec des anhydrides en milieu hydroalcoolique. Ces gels sont en fait des gels de chitine car la gélification s'effectue lorsque la réaction a atteint un degré de N-acylation critique d'environ 75-80 %<sup>175</sup>, il y a alors formation de liaisons hydrophobes et hydrogène utilisant notamment les séquences N-acylées. Plus récemment, Vachoud et Domard<sup>177</sup> ont étudié la formation de gels de chitine obtenus à partir de la N-acétylation du chitosane avec de l'anhydride acétique dans un mélange hydroalcoolique d'eau et 1,2-propanediol (1:1). Dans ces conditions expérimentales, il a été démontré que le degré d'acétylation minimum pour la gélification est autour de 80%, indépendamment du degré

d'acétylation initial du chitosane utilisé. La gélification résulte d'une valeur critique de la balance entre les interactions hydrophiles et hydrophobes. Le mécanisme de gélification a été attribué à la formation de jonctions physiques provenant à la fois d'interactions hydrophobes impliquant les résidus N-acétylés et de liaisons hydrogène, avec participation temporaire de l'alcool.

Avec l'objectif de préserver la structure physique et donc les propriétés biologiques du chitosane, la voie chimique pour l'élaboration d'hydrogels n'est pas considérée comme une bonne option parce qu'elle implique une dénaturation de la structure leurre. Par ailleurs, les agents réticulant sont souvent toxiques. Par conséquent, dans ce travail, nous avons choisi la formation d'hydrogels physiques à partir du chitosane sans agent de réticulation (monomère, macromonomère ou polymère).

### 3.4 Formation des hydrogels physiques à base de chitosane

Comme il a été mentionné précédemment, les hydrogels physiques résultent des interactions plus ou moins réversibles qui peuvent provenir : (i) d'interactions ioniques telles que la réticulation ionique et la formation de complexes polyélectrolytes (*PEC*), ou encore (ii) des liaisons faibles de type interactions hydrophobes et liaisons hydrogène. Selon le type d'interactions, il existe différentes méthodes de préparation des hydrogels physiques. Dans cette partie, nous analysons les principes fondamentaux de ces différentes techniques de mise en œuvre.

#### 3.4.1 Réticulation ionique de chitosane

La réticulation ionique du chitosane implique l'interaction de groupements aminés protonés ( $-NH_3^+$ ) avec des anions ou des molécules anioniques. La nature de ces interactions est la même que dans le cas des *PEC's*, il est donc difficile de classifier séparément ces deux types d'hydrogels. Toutefois, on peut considérer que les entités qui réagissent avec le chitosane dans la gélification ionique sont généralement des ions ou des molécules ioniques dont la masse molaire est bien définie, tandis que dans un *PEC*, ces entités sont des polymères dont la distribution de masse est large. Peuvent être cités les ions polyvalents (ex : le sulfate<sup>178, 179</sup> ou le citrate<sup>179</sup>), les anions métalliques (ex : Mo(VI)<sup>180</sup> or Pt(II)<sup>181</sup>) ou les molécules anioniques contenant des groupes phosphate

(ex: le  $\beta$ -glycerophosphate<sup>182, 183</sup>, le tripolyphosphate (TPP)<sup>184-187</sup> et le polyphosphate<sup>184</sup>).

La réaction de réticulation ionique est principalement déterminée par la taille de l'agent réticulant ainsi que par la densité de charge globale du chitosane et de l'agent réticulant, pendant la réaction. Par conséquent, le pH pendant la réaction est compris entre  $pK_a$  du chitosane et de l'agent réticulant.<sup>188</sup>

L'application la plus courante de cette technique de réticulation est la formation de nanoparticules qui est très utile pour la vectorisation ou le relargage des principes actifs (drug delivery)<sup>178, 179, 184, 186, 189</sup>. En effet, la mise en œuvre est simple car elle comporte l'ajout goutte-à-goutte de l'agent réticulant à l'aide d'une seringue dans une solution aqueuse de chitosane.

Contrairement aux hydrogels covalents, la gélification ionique du chitosane est effectuée dans une solution aqueuse, ce qui permet son utilisation directe sans aucune étape préalable de purification. Par contre, la contrainte de cette méthode est la difficulté de suivre exactement la réaction de réticulation, ce qui rend le contrôle des propriétés structurales des nanoparticules plus difficile.<sup>188</sup>

### 3.4.2 Formation des complexes polyélectrolytes (PEC)

Les complexes polyélectrolytes (PEC) résultent de la réaction de deux polyélectrolytes de charge opposée dans un milieu aqueux. L'attraction électrostatique entre les groupes cationiques, par exemple les groupes ammonium ( $NH_3^+$ ) du chitosane et les groupes anioniques de l'autre polyélectrolyte constitue donc la principale famille d'interactions qui conduit à la formation du PEC.<sup>190</sup> La réaction de complexation est essentiellement contrôlée par le gain entropique lié à la libération des contre-ions initialement associés aux polyélectrolytes. Tsuchida et Abe<sup>191</sup> soulignent qu'il existe une compétition entre la condensation ionique des contre-ions avec celle des polyélectrolytes, mais que ces derniers l'emportent grâce aux interactions coopératives. Cela signifie que des interactions telles que les liaisons hydrogène ou les interactions hydrophobes participent également à la formation de PEC's.

Les polyanions plus couramment utilisés avec le chitosane sont les polysaccharides qui comprennent un groupe carboxylique ( $\text{COO}^-$ ) tels que les alginates<sup>192</sup>, la pectine<sup>193</sup>, la xanthane<sup>194</sup>, l'acide hyaluronique<sup>195</sup>, et tous les polysaccharides possédant un groupe sulfate (ex : chitosane-dextrane sulfate<sup>196, 197</sup>). D'autres systèmes ont également été étudiés : les protéines (ex : chitosane-collagène<sup>198-200</sup>) ; les polymères synthétiques comme le chitosane-Miglyol/Span 80<sup>201</sup>, l'acide polyacrylique (PPA)<sup>202</sup> et l'acide polylactique (PLA) ou même l'ADN.<sup>203</sup>

Pour la préparation d'un *PEC*, il n'est pas nécessaire d'utiliser des catalyseurs ou des initiateurs car la réaction est réalisée dans une solution aqueuse ; ceci représente un avantage important par rapport aux réseaux covalents.<sup>190</sup> De cette façon la biocompatibilité et la bioactivité du matériau sont préservées. De plus, cela évite certaines étapes de purification avant utilisation.

Pour la formation de *PEC*, le facteur physico-chimique le plus important à contrôler est le pH de la solution qui est en forte relation avec les  $\text{pK}_a$  des deux polyélectrolytes, mais la température, la force ionique<sup>204</sup> et l'ordre du mélange (ex : l'addition de dextran sulfate de sodium dans une solution de chitosane forme un *PEC* plus stable que le mélange dans l'ordre inverse<sup>205</sup>) sont également importants. De plus, d'autres facteurs doivent souvent être optimisés, comme la masse moléculaire ( $M_w$ ), la densité de charge des polyélectrolytes, c'est-à-dire le degré d'acétylation dans le cas du chitosane.<sup>190</sup> En effet, tous ces paramètres relatifs à la structure des polyélectrolytes et aux conditions physico-chimiques influencent la complexation et donc la structure et la microstructure du matériau résultant de la formation du complexe.<sup>206</sup> La formation de *PEC* est un événement physico-chimique déterminé par un grand nombre de paramètres, ce qui représente le principal inconvénient pour une production reproductible au niveau industriel.

### 3.4.3 Formation des hydrogels physiques hydrophobes (sans agent réticulant)

La formation des hydrogels physiques à base de chitosane est possible pour une valeur critique de la balance entre les interactions hydrophiles et hydrophobes.<sup>116</sup> Ce point critique peut être atteint en jouant sur de nombreux paramètres physico-chimiques, ou éventuellement par la conjonction de plusieurs d'entre eux. Le principal

paramètre fondamental permettant de jouer sur la balance hydrophile/hydrophobe ( $H/H$ ) est le potentiel électrostatique du polyélectrolyte. Ce dernier paramètre est fortement influencé par le  $DA$ , le degré de neutralisation, la force ionique et la constante diélectrique du milieu de réaction.<sup>29</sup>

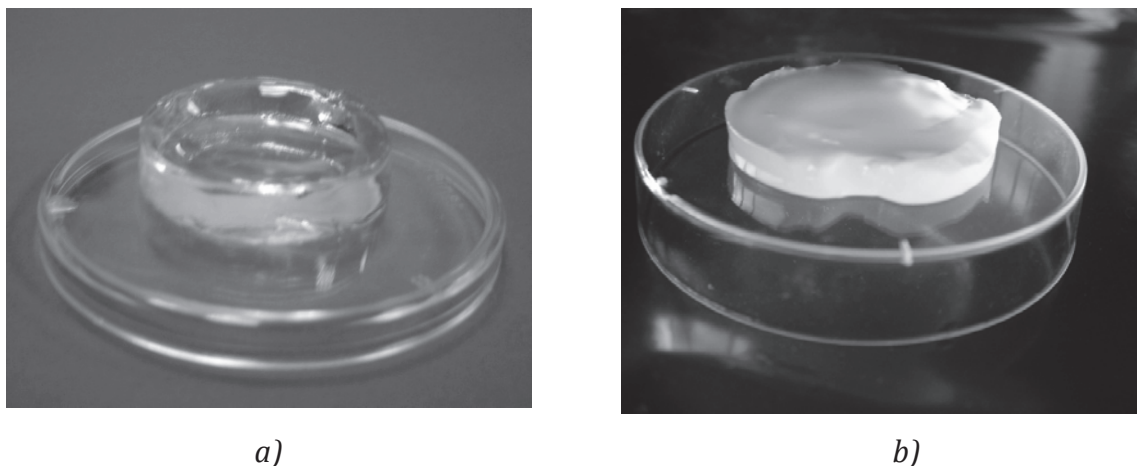
En plus de la balance  $H/H$ , la concentration en polymère ( $c_p$ ) doit être au-dessus de la concentration critique d'enchevêtrement ( $c^*$ ), puisque les enchevêtrements déjà existants dans la solution constituent des jonctions physiques potentielles pour former le réseau tridimensionnel de chaînes de polymère. Afin de générer un système percolant pendant la gélification de chitosane, l'interface de transition sol/gel doit être homogène et uniforme.

Basés sur ces trois conditions expérimentales, Montembault *et al.*<sup>29</sup> ont décrit la formation des hydrogels hydrophobes de chitosane, sans aucun agent réticulant et sans modification chimique. Ces auteurs proposent alors deux méthodes pour l'élaboration d'hydrogels : 1) la gélification à partir d'un gel alcoolique<sup>29</sup> et 2) la gélification à partir d'une solution aqueuse de chitosane<sup>30</sup>.

### **1) Gélification du chitosane à partir d'une solution hydroalcoolique<sup>29</sup>**

La gélification de chitosane est obtenue à partir de l'évaporation d'une solution hydroalcoolique contenant une solution aqueuse de chitosane et de 1,2-propanediol initialement en quantités équivalentes (50:50). La constante diélectrique du milieu diminue, par l'ajout de l'alcool puis par l'élimination de l'eau par évaporation, qui permet de modifier la constante de dissociation de l'acide (acétique ou chlorhydrique) et ainsi la balance hydrophile/hydrophobe de la solution. La perturbation de l'environnement des chaînes favorise la formation de liaisons de faible énergie (des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène) qui conduit finalement à la gélification du chitosane, par formation d'un alco-gel. Après évaporation, ces alco-gels possèdent une charge positive de groupement  $NH_3^+$  qui est neutralisée avec un agent alcalin (NaOH ou gaz ammoniac) afin de former un hydrogel neutre et stable en milieu hydraté. Les hydrogels physiques obtenus après lavage contiennent uniquement de l'eau et du chitosane. Les gels préparés par cette voie hydroalcoolique sont rigides et translucides (voir Figure 3.1a).





**Figure 3.1** Aspect physique de : a) gel alcoolique de chitosane (1,2-propanediol) et b) hydrogel neutralisé à l'ammoniac.

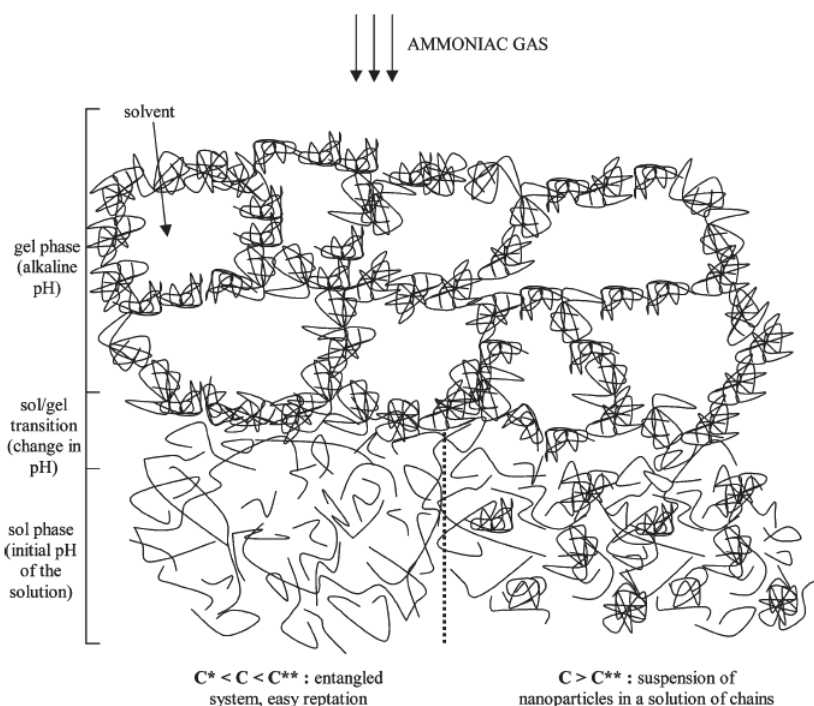
Les travaux de Boucard *et al.*<sup>207</sup> sur le procédé de gélification en milieu hydroalcoolique ont permis d'approfondir l'étude du mécanisme de formation des hydrogels de chitosane. Les auteurs ont montré que l'alcool est directement impliqué dans la formation des nœuds physiques de réticulation, par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes/liaisons hydrogène. Par ailleurs, la loi de variation des propriétés physico-chimiques du chitosane en solution en fonction du  $DA$ <sup>92, 113, 145</sup> (voir Figure 2.5 de l'Étude bibliographique - Section 2) semble également influencer les paramètres de gélification comme le montrent Montembault *et al.*<sup>29</sup>

## 2) Gélification à partir d'une solution aqueuse<sup>30</sup>

La gélification de chitosane à partir d'une solution aqueuse consiste à mettre en contact une solution aqueuse en polymère assez concentrée ( $c^* \ll c_p$ ) de chitosane avec des vapeurs de gaz ammoniac ( $NH_4OH$ ), par exemple. La gélification a lieu alors grâce à la modification de l'état d'ionisation du polymère : lorsque le gaz ammoniac se dissout dans la solution de chitosane, il contribue à la neutralisation des groupements  $NH_3^+$ , et donc à la diminution de la densité de charge apparente de chaînes chitosane. Les gels obtenus sont souples et opaques (voir Figure 3.1b).

En outre, les auteurs<sup>30</sup> mettent en avant le rôle important de la présence des groupements acétylés ( $GlcNAc$ ) impliqués dans la formation de liaisons

hydrophobes/hydrogène. Cette étude a mis également en évidence l'existence d'une concentration critique  $c^{**}$ , correspondant à une réorganisation moléculaire de la solution. Comme représenté sur la Figure 3.2, lorsque  $c^* < c_p < c^{**}$ , la solution est composée de chaînes enchevêtrées, alors qu'à partir de  $c^{**}$  les chaînes s'assemblent pour former des nano-agrégats. Ceux-ci favoriseraient une construction plus rapide du réseau tridimensionnel du gel. Les auteurs décrivent toutefois une morphologie finale du gel similaire lors de l'utilisation d'une solution initiale de concentration en polymère inférieure à  $c^{**}$ . Les nano-objets décrits précédemment sont vraisemblablement des objets formés à partir d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogène. En réalité, la concentration  $c^{**}$  n'est pas une constante absolue mais correspond à un état critique reflétant la balance  $H/H$ , et dépendant en pratique de nombreux paramètres physico-chimiques ( $DA$ ,  $pH$ ,  $\varepsilon$ ,  $T$ , etc.).



**Figure 3.2** Représentation schématique du mécanisme de formation des hydrogels physiques de chitosane à partir d'une solution aqueuse ( $DA = 36,7\%$ ) par neutralisation avec des vapeurs d'ammoniac ( $NH_4OH$ ).<sup>30</sup>

Dans des travaux ultérieurs<sup>141</sup>, une transition structurale, dans les solutions polyélectrolytes hydrophobes, entre le « régime corde » et le « régime perle » a été mise en évidence par diffusion des rayons X, ceci en assez bon accord avec la détermination de la concentration  $c^{**}$ . Par ailleurs, pour  $c_p > c^{**}$ , la gélification est décrite comme une

coalescence et une percolation de nano-agrégats. Ces objets sont les précurseurs de la gélification. Au contraire, lorsque  $c^* < c_p < c^{**}$ , les nano-agrégats sont présents dans la solution mais leur taille et leur nombre sont insuffisants pour induire à eux seuls le processus de gélification. Le processus de gélification suit donc une cinétique différente, puisque la gélification ne s'opère qu'après enrichissement de la solution en nano-agrégats. Enfin les auteurs ont démontré que la nature du contre ion avait une influence sur la cinétique de gélification mais également sur les propriétés mécaniques finales des hydrogels de chitosane.

Les hydrogels physiques obtenus à partir d'une solution de chitosane en milieu aqueux sont intéressants car ils ne contiennent pas d'additif qu'il faudrait éliminer par la suite. De plus, ils ont la particularité d'être beaucoup plus simples à élaborer que les gels formés en milieu hydroalcoolique.

### 3.5 Biomatériaux dérivés d'hydrogels physiques

Diverses revues discutent les différentes applications des hydrogels chimiques et physiques pour des applications biomédicales et pharmaceutiques.<sup>151, 208-211</sup> La liste des biomatériaux élaborés à partir d'hydrogels physiques à base de chitosane pour des applications dans l'ingénierie tissulaire est assez large ; néanmoins, plusieurs systèmes possèdent un véritable potentiel, avec des propriétés bioactives particulières. L'étude de ces propriétés bioactives, telle qu'elle est abordée dans l'équipe, correspond bien à une vision de ces matériaux comme des « leurre des milieux biologiques ». Dans les paragraphes suivants, nous allons détailler les différentes stratégies utilisées pour l'élaboration de gels physiques à base de chitosane pour diverses applications dans l'ingénierie tissulaire.

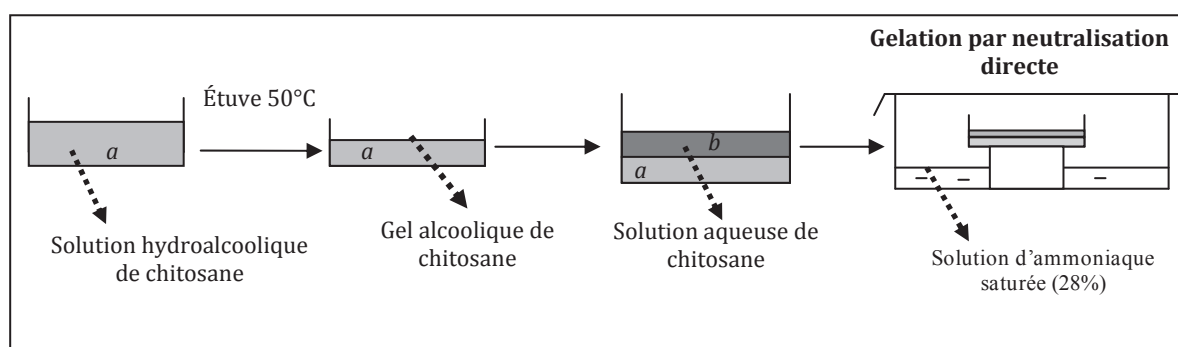
#### 3.5.1 Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage<sup>212</sup>

Montembault *et al.*<sup>26, 212</sup> ont validé le potentiel biologique d'hydrogels physiques à base de chitosane. Pour cela, les interactions gel/cellules ont été abordées en mettant en contact *in vitro* les hydrogels et les broyats d'hydrogels de chitosane avec des chondrocytes de lapin et d'humains, respectivement. L'observation de « l'effet de leurre » et l'influence de différents paramètres liés à l'hydrogel sur le comportement cellulaire, comme le *DA* du chitosane, la méthode de gélification<sup>29, 30</sup> et la concentration

en polymère ( $c_p$ ) ont été décrits. De plus, ce comportement cellulaire a été étudié à différents niveaux : la production de la matrice extracellulaire (*MEC*), la composition de cette néo-matrice, l'expression des gènes des cellules en culture, etc.

### 3.5.2 Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération de la peau<sup>213</sup>

Les propriétés biologiques exceptionnelles de ces gels ont motivé la formation de systèmes plus complexes comme ceux présentés dans les travaux de Boucard *et al.*<sup>213</sup> qui ont élaboré un biomatériau en bicouche ou tricouches pour la cicatrisation thérapeutique des brûlures du troisième degré. Ce biomatériau comprend deux gels assemblés, avec différentes propriétés mécaniques : le premier est un gel de chitosane rigide préparé à partir d'une solution hydroalcoolique de chitosane<sup>30</sup> (Figure 3.3a) et le deuxième est un gel de chitosane souple formé à partir d'une solution aqueuse<sup>29</sup> (Figure 3.3b). Ces deux gels sont ensuite collés par une solution visqueuse de chitosane qui forme un joint de gel interfacial. La procédure pour l'élaboration de ce système multicouche est résumée dans la Figure 3.3.



**Figure 3.3** Procédure expérimentale pour la formation d'un biomatériau en bicouche<sup>214</sup> par assemblage de deux hydrogels physiques de chitosane. La première couche (*a*) est obtenue par l'évaporation d'une solution hydroalcoolique de chitosane-1,2-propanediol et la deuxième couche (*b*) est formée à partir d'une solution aqueuse de chitosane.

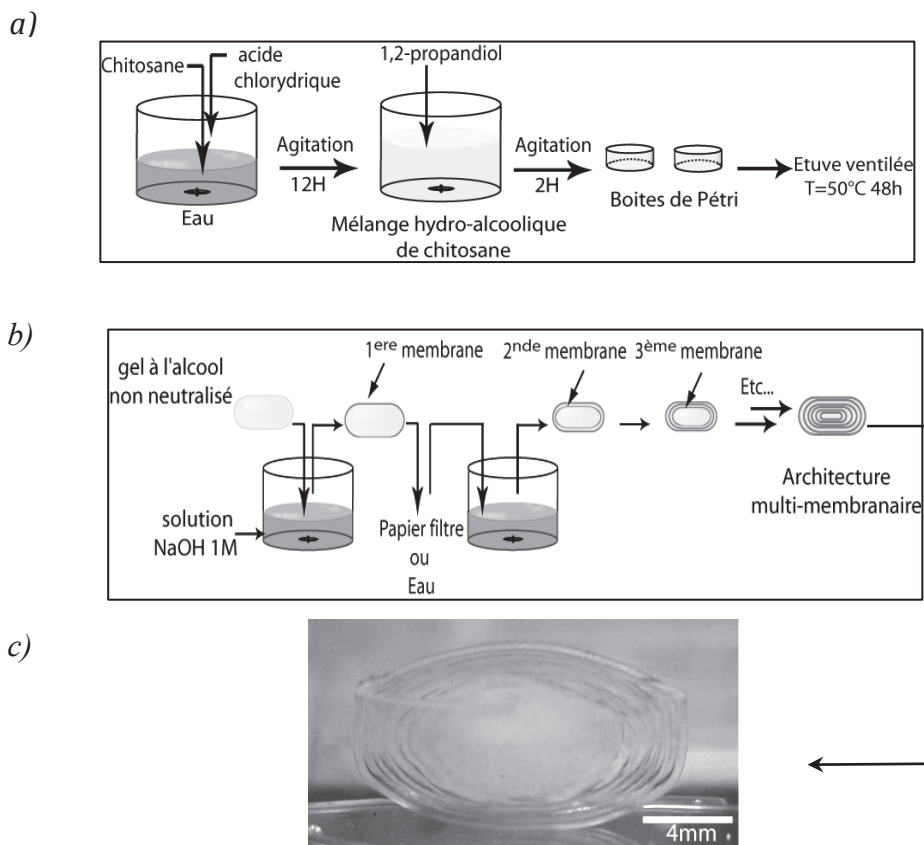
La forme hydrogel physique bicouche est particulièrement intéressante pour induire une réponse biologique favorable pour la cicatrisation de la peau. Elle permet une bonne hydratation de la plaie, la couche rigide apporte une protection vis-à-vis du milieu extérieur pendant la phase de cicatrisation par ses propriétés mécaniques mais aussi bactériostatiques et fongistatiques et sa porosité limitée. Le rôle du gel souple consiste à

s'adapter à la géométrie de la plaie, absorbe et relargage les exsudats, libère des oligomères de chitosane, etc.

### **3.5.3 Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération de tissus à architecture multicouches complexe**

Des hydrogels de forme plus complexe ont été développés par Ladet *et al.*<sup>27</sup>, sous forme de matériaux bio-inspirés ayant une architecture multi-membranaire d'hydrogels physiques de chitosane. L'objectif de l'architecture multi-membranaire a été d'envisager la régénération de tissus multicouches complexes, voir d'organes entiers comme la peau ou les vaisseaux sanguins.

Le procédé d'élaboration de ce biomatériau est fondé sur une neutralisation multi-étapes (Figure 3.4). Dans un premier temps, la méthode consiste à former un alco-gel physique de chitosane à partir d'une solution hydroalcoolique (Figure 3.4a), dans un moule de la forme adaptée à la forme souhaitée. En suite, l'alco-gel est immergé dans un bain de neutralisation d'hydroxyde de sodium (NaOH 1 M) de façon cyclique en arrêtant plusieurs fois la neutralisation (Figure 3.4b) afin d'obtenir un gel composé d'une alternance de membranes d'hydrogels physiques de chitosane et d'espaces inter-membranaires remplis d'eau (Figure 3.4c). Les membranes sont indépendantes les unes des autres et non adhérentes. Cette structure possède la potentialité d'incuber séparément plusieurs types de cellules ce qui permettrait de tirer partie de la communication intercellulaire à travers les diverses membranes pour régénérer des tissus complexes.<sup>215</sup>

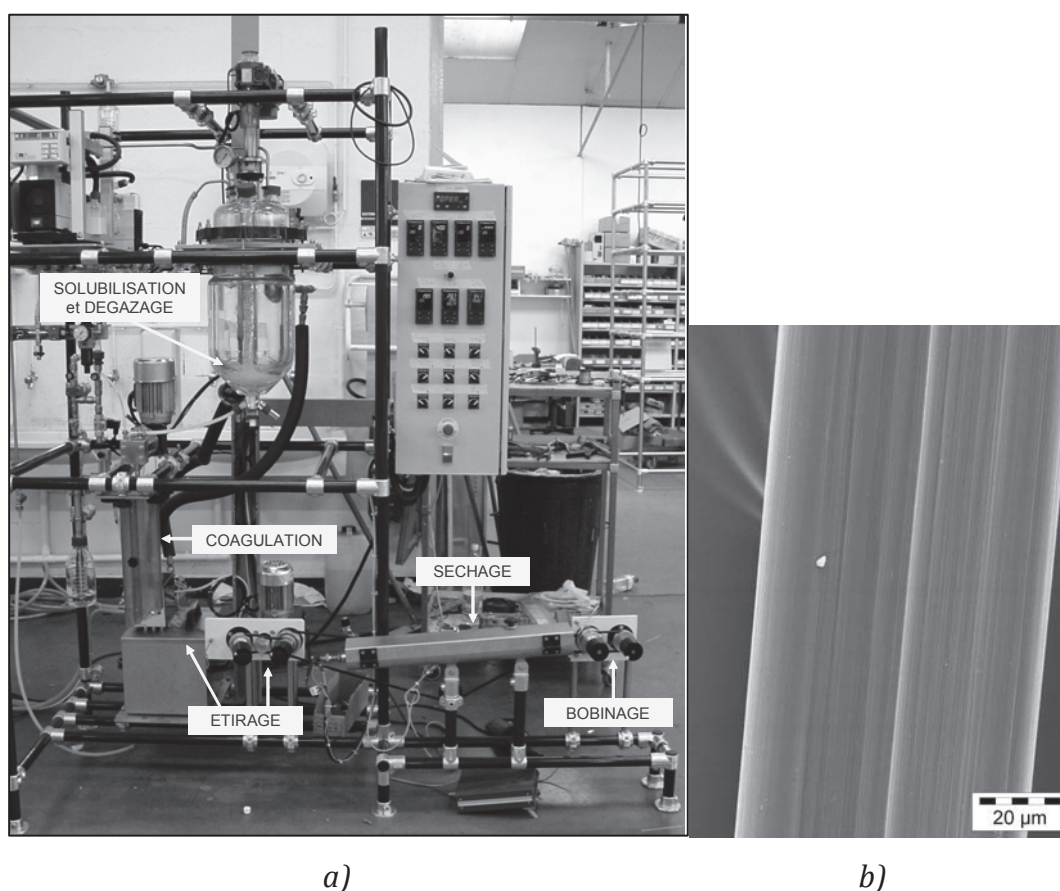


**Figure 3.4** Représentation schématique du procédé de neutralisation en multi-étapes<sup>27, 216</sup> pour : a) la formation d'un alco-gel non-neutralisé (étape 1), b) la formation d'un gel à architecture multi-membranaire (étape 2) et c) exemple de structure sphéroïde multi membranes d'un hydrogel physique de chitosane<sup>27</sup>.

### 3.5.4 Filage et hydrogels physiques de chitosane: applications aux implants pariétaux

L'élaboration de gels physiques sous des formes plus fines comme des fils/filaments a également été possible. Notin *et al.*<sup>217, 218</sup> ont mis au point une méthode de filage à sec du chitosane (Figure 3.5a). Cette méthode a consisté à coaguler le polymère en sortie de filière à l'aide du gaz ammoniac ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) permettant de former une fibre (Figure 3.5b), sous forme d'hydrogel physique, contenant à la fois le polymère et le sel d'acétate d'ammonium ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ). La fibre est ensuite séchée soit telle quelle, sous flux d'air: (i) sec et chaud pour conserve alors la quasi totalité de son sel, ou (ii) humide et chaud pour hydrolyser le  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  sous forme de gaz ammoniac et d'acide acétique, qui sont facilement éliminés sous leur forme gazeuse.

Les fibres de chitosane qui présentent les sels de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  dans leur structure ont des propriétés de gonflement contrôlables, en milieu aqueux. Elles peuvent reprendre environ seize fois leur volume initial, ouvrant ainsi diverses possibilités d'applications chirurgicales (ex: matériaux de suture ou comblement des rides). A l'inverse, les fibres en absence de sels dans leur structure voient leur augmentation de volume limitée à un facteur quatre après hydratation.



**Figure 3.5** a) Dispositif de mise en œuvre pour le filage à sec du chitosane<sup>217,218</sup> et b) aspect microscopique des fibres préparées à base de chitosane ( $DA = 2,7 \%$ ,  $M_w = 540000 \text{ mol/g}$ ,  $c_p = 2,4 \%$ ) par la méthode de filage à sec<sup>217</sup>.

L'élaboration d'une plaque non-tissée à partir de ces fibres de chitosane, possédant des propriétés mécaniques adaptées au renfort pariétal, a été également proposée par ces auteurs. Des fils constitués de plusieurs monofilaments de chitosane ont été implantés sur trois chez les lapins : sous-cutané, intramusculaire et viscéral.<sup>219</sup> Une néo-vascularisation sur le trajet des fibres a été rapidement observée, et aucune réponse inflammatoire importante n'a été relevée. Autour des fibres, l'infiltration de

macrophages et de cellules géantes a contribué à la formation d'une matrice conjonctive lâche.<sup>219</sup> Avec l'implantation des plaques intra-péritonéales non-tissées, un phénomène de recouvrement de la plaque par un tapis unicellulaire de cellules épithéliales aplaties rappelant le péritoine a été observé.





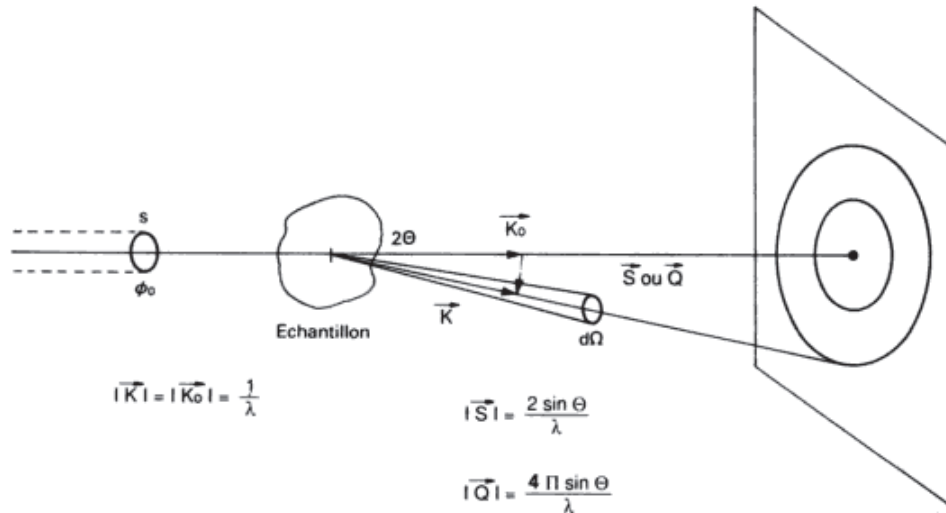
## **Section 4. Diffusion des rayons X et de la lumière aux petits angles pour une étude morphologique des hydrogels<sup>220-222</sup>**

### **Introduction**

L'étude de la morphologie des hydrogels physiques nécessite des techniques d'analyses adaptées, permettant de ne pas modifier la structure fortement hydratée de nos matériaux. La diffusion et la diffraction aux petits angles sont des techniques de choix permettant d'analyser les structures à différentes échelles dans une gamme allant de 10 à 2000 Å. La formation des hydrogels physiques de chitosane a été étudiée par ces techniques de diffusion.

### **4.1 Principe d'une expérience de diffusion**

Le phénomène de diffusion de rayonnement électromagnétique résulte de l'interaction d'une onde incidente avec les nuages électroniques des atomes. Lorsqu'un rayonnement lumineux ou des rayons X frappe un atome, le champ électrique associé à ce rayonnement provoque une oscillation de la distribution des charges conduisant à la formation d'un dipôle qui, en vibrant, devient une source secondaire de radiation. Ce sont ces dipôles oscillants qui sont à l'origine de l'onde sphérique et élastique diffusée. Le terme « élastique » signifie que le rayonnement diffusé possède la même longueur d'onde que le rayonnement incident. Si le milieu est parfaitement homogène, les ondes diffusées interfèrent de façon destructive dans toutes les directions sauf dans la direction de propagation de l'onde incidente. Si le milieu n'est pas homogène comme dans le cas d'une solution de macromolécules, on observe une onde ré-émise par l'échantillon (onde diffusée) dans toutes les directions de l'espace.<sup>206</sup> Le principe d'une expérience de diffusion consiste donc à envoyer sur l'échantillon un rayonnement lumineux, de rayons X (ou de neutrons), et de mesurer la répartition angulaire de la diffusion produite par l'échantillon (Figure 4.1).



**Figure 4.1** Principe d'une expérience de diffusion,  $\vec{k}_0$  est le vecteur d'onde incident,  $\vec{k}$  le vecteur d'onde du rayonnement diffusé.  $\vec{S}$  et  $\vec{q} = \vec{Q}$  sont les vecteurs de diffusion (ou transfert de moment).<sup>220</sup>

La direction incidente du rayonnement est repérée par un vecteur d'onde  $\vec{k}_0$ ; le module de ce vecteur est égal à  $\lambda^{-1}$  où  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayonnement utilisé. La direction du rayonnement diffusé est repérée par le vecteur  $\vec{k}$ . Si l'interaction du rayonnement avec la matière est de nature élastique, sans transfert d'énergie, le vecteur  $\vec{k}$  aura le même module que le vecteur d'onde incident ( $\vec{k}_0$ ). L'angle défini par les vecteurs  $\vec{k}_0$  et  $\vec{k}$  est appelé angle de diffusion et dénommé  $\theta$  ou  $2\theta$ . Le vecteur de diffusion  $\vec{S}$  égal à la différence des deux vecteurs d'onde ( $\vec{k} - \vec{k}_0$ ). Ainsi, la norme du vecteur  $\vec{S}$  est donnée par :

$$|\vec{S}| = \frac{2 \cdot \sin(\theta)}{\lambda} \quad \text{eq (0.3)}$$

Il est défini souvent un autre vecteur  $\vec{q}$  obtenu à partir de  $\vec{S}$  et dont le module est donné par la relation :

$$|\vec{q}| = 2\pi \cdot |\vec{S}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad \text{eq (0.4)}$$

Quel que soit le type de rayonnement incident, une expérience de diffusion élastique permet de mesurer l'intensité diffusée  $I$  en fonction du vecteur de diffusion  $\vec{q}$  ou  $\vec{S}$ . L'amplitude diffusée est proportionnelle à la transformée de Fourier du pouvoir diffusant. Cependant, il n'est pas possible de déterminer le module et la phase de ce complexe en fonction de  $\vec{q}$  et une mesure ne donnera que le carré de son module, c'est-à-dire l'intensité diffusée. Cette intensité est, à son tour, proportionnelle à la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation du pouvoir diffusant  $f(\vec{r})$  :

$$I(\vec{q}) = \iint_{\text{volume éch}} f(\vec{r}) \cdot f(\vec{r} + \vec{u}) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{u}) d^3\vec{r} d^3\vec{u} \quad \text{eq (0.5)}$$

En définissant la fonction d'autocorrélation  $P(\vec{u})$  comme :

$$P(\vec{u}) = \int_{\text{volume éch}} f(\vec{r}) \cdot f(\vec{r} + \vec{u}) d^3\vec{r} \quad \text{eq (0.6)}$$

L'intensité diffusée s'écrit alors de manière condensée :

$$\begin{aligned} I(\vec{q}) &= F(P(\vec{u})) \\ P(\vec{u}) &= F(I(\vec{q})) \end{aligned} \quad \text{eq (0.7)}$$

Par conséquent, la fonction d'autocorrélation  $P(\vec{u})$  représente l'information la plus complète que l'on puisse extraire d'une expérience de diffusion de rayonnement.

## 4.2 Diffusion par systèmes « non corrélés » et « corrélés »

La diffusion SAXS d'une particule isolée a été décrite par Guinier en 1938. De manière générale, l'analyse SAXS repose sur la classification des systèmes diffusants en deux catégories:

1. les systèmes non corrélés (formés de « particules » éloignées les unes des autres, dans une matrice par ailleurs homogène) ;
2. les systèmes denses ou corrélés (formés de « particules » en contact ou proches les unes des autres).

### 4.2.1. Diffusion par les systèmes « non corrélés »

Dans le premier cas, des systèmes « dilués », on fait l'hypothèse que chaque particule diffuse une onde globale qui n'interfère pas avec les ondes ré-émises par les autres particules. L'intensité totale s'écrit donc :

$$I(\vec{q}) = N \cdot I_p(\vec{q}) \quad \text{eq (0.8)}$$

où  $N$  est le nombre de particules éclairées par le rayonnement incident et  $I_p$  est l'intensité moyenne diffusée par une particule. Si on connaît la géométrie de la particule, la diffusion résultante peut se calculer en utilisant la fonction d'autocorrélation d'une particule (voir eq 4.5).

L'objectif de l'étude de diffusion aux petits angles est de déduire la taille, la forme, et éventuellement la distribution de densité électronique à l'intérieur des particules à partir du diagramme de diffusion. Pour cela, il est nécessaire d'interpréter les courbes de diffusion par comparaison, dans tout le domaine angulaire, de la courbe de diffusion expérimentale avec la courbe de diffusion simulée pour le modèle choisi. La fonction définie par la relation eq 4.6 aura une forme différente suivant la taille la forme de la particule. Il existe de diagrammes de diffusion modèles pour de nombreux systèmes pour différentes géométries telles que des sphères<sup>223</sup>, ellipsoïdes<sup>224-228</sup>, parallélépipèdes<sup>226, 229</sup>, cylindres<sup>226, 230, 231</sup>, cylindres creux, sphères creuses, etc.

Dans le diagramme de diffusion, il est intéressant de traiter la *partie centrale* ( $q \rightarrow 0$ ) (régime de Guinier) et le *comportement asymptotique* (régime de Porod) à valeurs relativement élevées de  $q$  séparément.

**a) Loi de Guinier.** Cette loi s'applique parfaitement à une collection diluée de particules isométriques, distribuées de manière aléatoire à l'intérieur desquelles le pouvoir diffusant est constant, l'intensité diffusée peut s'écrire (loi de Guinier<sup>232</sup>, Figure 4.2) :

$$I(q) = I_0 \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad \text{eq (0.9)}$$

Où  $I_0$  est l'intensité à vecteur de diffusion nul et  $R_g$  rayon de giration de la particule. Cette relation est justifiée mathématiquement lorsque  $qR_g \ll 1$  mais elle peut s'appliquer phénoménologiquement sur un plus grand domaine de vecteurs de diffusion.

Le tracé de la courbe  $\ln(I(q))$  en fonction de  $q^2$  permettra d'estimer le rayon de giration, sans hypothèse sur la composition des particules. Le rayon de giration, de par

sa définition, renferme une information sur la taille et la géométrie de l'entité. Il est relié, comme le montre le Tableau 4.1, de façon plus ou moins complexe aux paramètres géométriques définissant la forme de la particule.

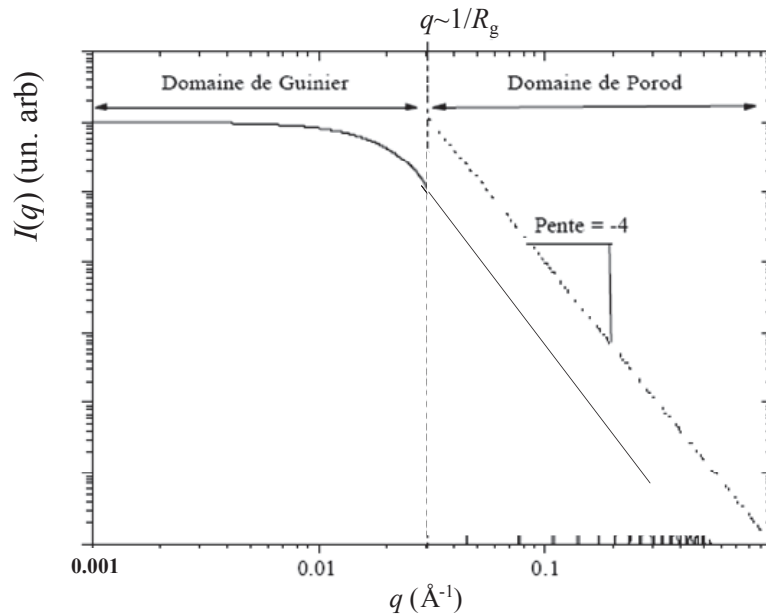
**Tableau 4.1** Rayon de giration ( $R_g$ ) pour quelques géométries de particules.<sup>220</sup>

Sphère de rayon $R$	$R_g^2 = \frac{3}{5} R^2$
Sphère trouée (rayon mini $R_1$ , rayon maxi $R_2$ )	$R_g^2 = \frac{3}{5} \frac{R_2^2 - R_1^2}{R_2^2 - R_1^2}$
Ellipse d'axes $a$ et $b$	$R_g^2 = \frac{a^2 + b^2}{4}$
Ellipsoïde d'axes $a, b, c$	$R_g^2 = \frac{a^2 + b^2 + c^2}{5}$
Prisme de cotés $a, b, c$	$R_g^2 = \frac{a^2 + b^2 + c^2}{12}$
Cylindre à base elliptique d'axes $a, b$ et de hauteur $h$	$R_g^2 = \frac{a^2 + b^2}{4} + \frac{h^2}{12}$
Cylindre troué (rayon mini $R_1$ , rayon maxi $R_2$ )	$R_g^2 = \frac{R_1^2 + R_2^2}{2} + \frac{h^2}{12}$

**b) Loi de Porod.** Lorsque  $qR_g > 1$ , la loi de Guinier n'est plus valable et la courbe de diffusion peut dans certains cas (interface particulières nettes ou franches) être ajustée par une loi de type Porod<sup>233</sup> (voir Figure 4.2) :

$$I(q) = \frac{C}{q^4} \quad \text{eq (0.10)}$$

Où  $C$  est la constante de Porod.



**Figure 4.2.** Représentation schématique des domaines asymptotiques de Guinier et de Porod sur un graphique de diffusion  $I=f(q)$  pour une particule à interface nette.

Expérimentalement, dans le cas de particules à surface nette avec une variation brutale de pouvoir diffusant entre l'intérieur et l'extérieur des particules, la courbe  $\log(I)=f[\log(q)]$  est linéaire de pente  $-4$  aux grande valeurs de  $q$  (Figure 4.2). Lorsque la surface de ces particules présente des rugosités (fractale de surface), la pente de cette droite diminue.

#### 4.2.2 Diffusion par les systèmes «corrélés »

Lorsque les distances interparticulaires sont du même ordre de grandeur que les distances intraparticulaires, des interférences peuvent se manifester dans le diagramme de diffusion sous la forme d'un maximum dans la courbe de diffusion. L'intensité diffusée pour des systèmes isotropes à particules isométriques s'écrit :

$$I(q) \propto NI_p(q)S(q) \quad \text{eq (0.11)}$$

$N$  est le nombre de domaines éclairés par le rayon incident et  $S(q)$  contient l'information des positions respectives des particules et s'appelle le facteur de structure. Les études les plus précises consistent à déterminer  $I_p(q)$  dans les conditions de l'état non corrélé ou dilué, et ensuite évaluer  $S(q)$  dans les conditions de diffusion d'un système dense. Dans un bon nombre de cas, il n'est pas possible de faire varier la fraction de particules sans jouer sur leur forme et/ou leur taille, et l'analyse des résultats est alors fondée sur

un modèle. Par exemple, le modèle semi-phénoménologique de Beaucage (eq 4.10) est équivalent à la loi de Guinier aux petits angles ( $qR_g < 1$ ) et à la loi de Porod aux plus grands angles ( $qR_g > 1$ ).<sup>234</sup>

$$I(q) = I_0 \exp\left(-\frac{R_g^2}{3} q^2\right) + B \left(\frac{p(qR_g)}{q}\right)^4 \quad \text{eq (0.12)}$$

$$p(qR_g) = \left[ \text{erf}\left(\frac{qR_g}{\sqrt{6}}\right) \right] \quad \text{eq (0.13)}$$

avec :

$$S(q) = \frac{1}{1 + k\phi(qd_c)} \quad \text{eq (0.14)}$$

où  $p(qR_g)$  est une fonction qui est très proche de 0 lorsque  $qR_g < 1$ , et très proche de 1 lorsque  $qR_g > 1$ . Dans le cas d'une collection dense de particules, le comportement de Guinier n'est plus observable directement ; car il est en partie masqué par l'évolution du facteur de structure  $S(q)$ .

Le facteur de structure est lui-même défini par la fonction  $\phi(qd_c)$  donnée par :

$$\phi(qd_c) = 3 \frac{\sin(qd_c) - qd_c \cdot \cos(qd_c)}{(qd_c)^3} \quad \text{eq (0.15)}$$

$d_c$  est la distance de corrélation entre particules.  $k$  est un paramètre d'ordre, ou d'intensité de corrélation ou encore de régularité de structure, il est compris entre 0 et 6. Lorsque  $qd_c \gg 1$ ,  $S(q)$  est proche de 1, si bien que le modèle coïncide avec le comportement de Porod.

Lorsque les données sont assez précises, le modèle de Beaucage permet en plus d'estimer le rayon de giration des particules ( $R_g$ ) et la distance interparticulaire ( $d_c$ ), ainsi que le degré d'ordre ( $k$ ), paramètres qui décrivent de manière assez complète la microstructure.

Dans le cas spécial de la diffusion par des solutions semi-diluées de polyélectrolytes en absence de sel, l'ordre pseudo-périodique dû aux répulsions électrostatiques se traduit par la présence d'un pic de corrélation appelé aussi « pic polyélectrolyte » dans



le diagramme de diffusion. En fonction de la concentration de la solution analysée, mais toujours dans la limite du régime semi-dilué, ce pic a été observé par diffusion de la lumière, des rayons X ou des neutrons. Le vecteur de diffusion au maximum du pic polyélectrolyte est relié à la longueur de corrélation  $\zeta$  suivant la relation<sup>235</sup> :

$$q_{\max} \approx \frac{2\pi}{\zeta} \quad \text{eq (0.16)}$$

Dans le cas des systèmes corrélés (solutions semi-diluées ou gels), le facteur de structure peut être évalué par une équation du type Ornstein-Zernike<sup>236, 237</sup>:

$$S(q) = \frac{1}{1 + q^2 \zeta^2} \quad \text{eq (0.17)}$$

De par la longueur d'onde incidente et les angles de diffusion étudiés, la diffusion des rayons X aux petits angles permet l'étude de la nanostructure des matériaux (hétérogénéité de pouvoir diffusant) dans une gamme typique de 10 à 500 Å. La diffusion de la lumière aux petits et grands angles permet, quand à elle, d'avoir accès à une gamme de tailles caractéristiques de l'ordre de quelques centaines de nanomètres jusqu'au micromètre. Les deux techniques fournissent donc des informations complémentaires, la différence étant « l'agrandissement » ou « l'échelle spatiale » de l'expérience de diffusion. Les gels à base de polyélectrolytes sont des systèmes organisés à plusieurs échelles et une étude utilisant ces techniques est alors nécessaire pour déterminer leur distances et tailles caractéristiques sur une large gamme de longueurs.

La formation des gels a été étudiée également par des techniques de diffusion aux petits angles des rayons X et de la lumière. Le but a été de connaître plus précisément les caractéristiques morphologiques du gel. Ces techniques détaillées précédemment ont pu être mises en œuvre à Grenoble, au laboratoire de Spectrométrie Physique de l'Université Joseph Fourier et à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) sur la ligne D2AM. Le rayonnement synchrotron est le résultat de l'émission tangentielle des rayons X produite lors de l'accélération d'un faisceau d'électrons à des vitesses proches de la vitesse de la lumière, par exemple au niveau des aimants de courbure d'un anneau de stockage (ce qui est le cas pour cette ligne de mesure). Ses principales propriétés (gamme d'énergie incidente très large : 6-26 keV et très brillant) en font un outil parfaitement adapté à nos échantillons. En effet, pour des sources de rayons X

conventionnelles, l'intensité diffusée par ceux-ci est trop faible pour pouvoir être mesurée, en particulier parce que la quantité de chitosane est inférieure à 5 % en poids. En résumé, ces différentes techniques nous ont donc permis de connaître des distances et des tailles caractéristiques à différents niveaux d'échelles au sein des hydrogels physiques de chitosane.



---

## **- Étude expérimentale -**



## Étude expérimentale

### Introduction

Comme annoncé au début de ce travail, nous nous intéressons à la conception d'un biomatériau leurre de forme tubulaire compartimentée afin d'envisager son application à l'ingénierie tissulaire des vaisseaux sanguins. La présente étude expérimentale a donc pour objectif de comprendre et de maîtriser les différents paramètres physico-chimiques associés à la coagulation du chitosane pour l'élaboration des fibres creuses mono- et multi-membranaires avec une morphologie microstructurale contrôlée.

Dans un premier temps, notre stratégie de recherche a consisté à former des fibres creuses à partir des solutions aqueuses de chitosane concentrées (collodions). Pour cela, nous présentons dans une première section l'étude expérimentale réalisée pour mettre en place un procédé innovant de filage du chitosane par voie humide dans des conditions de coagulation interrompue. Le rôle de différents paramètres de filage et coagulation dans le procédé de filage par voie humide est abordé en détail dans cette première partie.

Ensuite, notre recherche s'est focalisée sur l'étude de l'influence des principaux paramètres de coagulation sur la morphologie des hydrogels physiques de chitosane à l'échelle du micron. La deuxième partie de cette étude expérimentale concerne donc l'analyse de la microstructure des différents hydrogels de chitosane à l'aide de techniques spécifiques comme la diffusion de rayonnement (SALS) et la microscopie optique et électronique (SEM, ESEM et cryo-SEM).

La troisième section de ce projet s'est concentrée sur l'étude du mécanisme de coagulation du chitosane dans une neutralisation à plusieurs étapes afin de prolonger le concept de coagulation interrompue dans la méthode filage par voie humide pour l'élaboration des fibres creuses multi-membranaires.

Finalement, les propriétés physiques des fibres de chitosane ont été étudiées à travers leur caractérisation mécanique, un aspect de grande importance pour son application dans

l'ingénierie tissulaire des vaisseaux sanguins, où il est bien établi le besoin des propriétés mécaniques similaires à celle d'un vaisseau sanguin natif.





# 1. Procédé d'élaboration des fibres creuses par le filage du chitosane par voie humide dans des conditions de coagulation interrompue

## 1.1 Contexte expérimental

La présente étude a pour objectif d'élaborer des fibres creuses à base de chitosane. Parmi les différents procédés décrits dans la littérature, l'élaboration de matériaux de formes tubulaires par voie fondue (ex : le moulage par injection ou le filage à partir l'état fondu) sont limitées pour le chitosane due à sa température de fusion qui est largement supérieure à sa température de dégradation, c'est-à-dire le polymère se dégrade avant d'arriver à l'état fondu. Par contre, le procédé de filage par voie humide<sup>238</sup> (wet-spinning) est la méthode plus adaptée pour l'élaboration de fibres et tubes à base de chitosane.

Le procédé de filage par voie humide pour l'élaboration des fibres creuses consiste à extruder à travers une filière annulaire une solution concentrée (ou collodion) de chitosane tandis qu'un agent coagulant est libéré à l'intérieur de l'orifice de la filière pour former la paroi interne de la fibre, et puis immergée dans un bain de coagulation externe, dans lequel la macrofibre creuse de chitosane est totalement neutralisée et régénérée comme hydrogel physique. Le filament est enfin lavé à l'eau distillée de manière à éliminer l'excès de coagulant. Cependant, une limitation de cette technique est que la géométrie de la fibre creuse est prédéterminée par la taille de la filière annulaire.

Dans la plupart des systèmes de filage par voie humide, le bain de coagulation est constitué exclusivement d'un seul agent alcalin. Les bains de coagulation plus couramment utilisés sont des solutions aqueuses à base hydroxydes alcalins, par exemple de NaOH<sup>239-243</sup> ou KOH<sup>240, 243, 244</sup>, LiOH<sup>240, 243</sup>, NH<sub>4</sub>OH<sup>217, 240</sup>. Selon certains auteurs, ces solutions basiques peuvent être mélangées avec des solutions aqueuses d'éthanol<sup>240, 245</sup> ou de méthanol<sup>246</sup>. Cependant, l'intérêt de l'ajout d'alcool dans la solution du bain de coagulation n'est ni prouvé, ni expliqué. On peut également citer

quelques systèmes de coagulation différents, comme l'ammoniac cuprique<sup>247</sup>, une solution aqueuse de NaOH – Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>248</sup> ou NaOH – AcONA<sup>248</sup>, etc. La majorité de ces travaux cherchent à montrer l'influence de la nature du bain de coagulation sur l'amélioration des propriétés mécaniques des fibres. Néanmoins, les différents systèmes de coagulation mènent à des propriétés mécaniques plus ou moins similaires

Dans cette première partie, nous présentons un nouveau procédé de *filage par voie humide par la méthode de coagulation interrompue* (interrupted wet-spinning) dans un bain coagulant de NaOH. Ce procédé innovant n'implique ni l'utilisation d'une filière annulaire ni d'un agent coagulant interne, permettant ainsi d'élaborer des fibres creuses avec une taille de diamètre interne variable. Dans ce qui suit, nous abordons la mise au point de ce nouveau procédé de filage.

## 1.2 Étude expérimentale

### 1.2.1 Purification du chitosane

Pour obtenir des collodions de viscosité élevée, et assurer ainsi la formation d'un macrofilament stable et continu lors de l'extrusion, nous avons choisi un échantillon de chitosane de haute masse moléculaire ( $M_w = 515\,000 \pm 51\,000$  g/mol) et d'indice de polymolécularité assez faible ( $I_p = 1,6 \pm 0,3$ ). Cet échantillon de chitosane, provenant du lot No. 113, a été fourni par la société Mahtani Chitosan (Veraval, Inde). Il est issu de plumes de calamars par désacétylation hétérogène en multi-étapes ayant ainsi une distribution statistique des résidus et un faible degré d'acétylation ( $DA = 1,5 \pm 0,2$  %).

L'échantillon de chitosane de couleur légèrement jaune et contenant des impuretés a été purifié avant utilisation. D'abord, le chitosane est solubilisé à 0,5 % (w/v) dans une solution aqueuse d'acide acétique avec une quantité stœchiométrique par rapport aux fonctions amine du chitosane. Pour éliminer les impuretés, la solution est filtrée sur des membranes (Millipore) de taille de porosité décroissante : 3 ; 1,2 ; 0,8 et enfin 0,45 µm puis neutralisé avec le gaz ammoniac, lavé à l'eau permutée et enfin lyophilisé. Après purification, on obtient un chitosane blanc parfaitement soluble dans des solutions d'acides diluées. Ce chitosane purifié est finalement utilisé pour la préparation des collodions.

### **1.2.2 Préparation du collodion de chitosane**

Le collodion utilisé est une solution aqueuse concentrée de chitosane de 3 et 5 % (m/m) préparée à partir du chitosane purifié dissout dans des conditions stœchiométriques dans une solution aqueuse d'acide acétique. La solution est finalement dégazée sous vide.

### **1.2.3 Préparation du bain de coagulation**

Parmi les différents agents coagulants, nous avons choisi de l'utiliser le NaOH pour l'étude du mécanisme de neutralisation d'un collodion de chitosane lors l'extrusion d'un filage en continu car celui-ci est l'agent coagulant de référence dans de nombreux travaux de recherche du chitosane. Le bain de coagulation est donc une solution aqueuse de NaOH à différentes concentrations : 0,1 ; 4 et 7 M.

## **1.3 Publication: Chitosan hollow fiber elaboration by interrupted wet-spinning process**

La stratégie expérimentale que nous avons développé pour la conception et mise au point de ce nouveau procédé de filage sera détaillé ci-dessous à travers une publication. Dans cet étude, un intérêt spécial est porte sur l'étude des phénomènes physico-chimiques associés à la neutralisation d'un collodion de chitosane lors l'extrusion d'un filage en continu.



# Chitosan hollow fiber elaboration by interrupted wet-spinning process

Rocio Rivas-Araiza, Agnès Crépet, Laurent David\*, Alain Domard

Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire des Matériaux Polymères et des Biomatériaux (LMPB), UMR CNRS 5223 IMP, 15, Bd. A. Latarjet, Bât. ISTIL, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

\*Corresponding author e-mail: [laurent.david@univ-lyon1.fr](mailto:laurent.david@univ-lyon1.fr)

## Abstract

Chitosan hollow fibers in the solid or hydrogel forms are of considerable interest for biomedical applications, especially for tissue engineering. Chitosan hollow fibers with a variable internal diameter were obtained from the wet-spinning method in interrupted coagulation conditions by water washings baths. For the determination of the processability window, we studied the influence of the dope concentration ( $c_p$ ) on the rheological properties of concentrated chitosan solutions. The wet-spinning process was investigated in different physicochemical conditions: variable polymer and coagulant concentrations. The classical theory (Carreau-Wagner and Tanner equations) for the prediction of the swelling effect ( $d_{ext}/d_s$ ) from the normal stress difference ( $N_1$ ) cannot explain the evolution of the external diameter of the fibers. The inner diameter is controlled by the coagulation time in the interrupted coagulation method. The chitosan coagulation kinetics was mainly influenced by the base concentration (NaOH), but  $c_p$  also played a significant role, in particular at high coagulant concentrations.

## Introduction

Chitin and chitosan are co-polysaccharides consisting of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) linked D-glucosamine and N-acetyl-glucosamine residues. In particular, chitosan exhibits a unique set of biological properties, including biocompatibility<sup>31-34</sup>, bioactivity<sup>37, 38</sup>,

biodegradability<sup>35, 36</sup>, together with fungistatic and bacteriostatic properties<sup>249</sup>. The degree of acetylation (DA) represents the molar fraction of N-acetyl-glucosamine units and strongly influences the physicochemical<sup>113-115</sup> and biological properties<sup>116</sup> of chitosan.

There has been a considerable interest in developing chitosan hollow fibers due to several biomedical applications, particularly for tissue engineering, i.e., for the regeneration of tissues with substrates of tubular shape (e.g., blood vessels substitutes and nerve guide tubes). Chitin and chitosan hollow fibers cannot be elaborated by conventional melt-processing methods like injection molding or melt-spinning. However, chitosan is soluble in acidic aqueous solutions (e.g., hydrochloric or acetic acid solutions), and can be coagulated (regenerated) in presence of a base in solution. As the pH increases close to the apparent pKa of the amine groups, the apparent charge density of the chitosan chains decreases and the chains become more flexible (the electrostatic part of the persistence length vanishes); favoring the formation of hydrophobic interactions and hydrogen bonding yielding chitosan hydrogels.<sup>30</sup> This property makes chitosan a versatile natural polymer for the processing of materials in various physical forms, e.g., from macroscopic gels<sup>30</sup> or nanogels particles<sup>196, 201</sup> to solid states as films<sup>250</sup> and fibers<sup>217, 241, 251</sup>. Chitosan hydrogels have been considered for biomedical applications in skin regeneration<sup>213</sup> and cartilage repair<sup>26, 27</sup>, blood vessels substitutes<sup>252</sup> and nerve tissue engineering<sup>253, 254</sup>. More complex hydrogels with multi-membrane architectures were recently developed<sup>27</sup> in our group. Such structures consist in multi-membranes chitosan hydrogels of varied external shapes and with free 'inter-membrane' spaces for cell and drug introduction. These innovative structured systems have opened interesting perspectives as bioreactors for the regeneration of tissues of complex shapes eventually with a multilayer organization, such as skin, blood vessels, and bone/cartilage junctions.

Turning back to the processing of chitosan, there exist numerous equipments for chitosan fiber and hollow fiber formation that are based on the wet-spinning technique. The traditional method of wet-spinning for chitosan fiber formation implies dissolving chitosan in an acid solution, and then extruding it through a spinneret that is immersed in an external coagulation bath. The polymer is regenerated by neutralization, and finally dried. Several research groups have studied the best coagulation conditions for fiber elaboration to improve the mechanical properties, thermal stability as well as biodegradability and biocompatibility properties.<sup>241, 243, 244</sup> Notin et al.<sup>217</sup> developed the pseudo-dry-spinning method as an alternative method to the traditional wet-spinning

process. It consists in subjecting the extruded chitosan filament to gaseous ammonia, and subsequently a drying process in absence of washing bath. On the other hand, there have also been many attempts to develop a versatile system for hollow chitosan fiber formation by the wet spinning method. In 1986, Pittalis et al.<sup>242</sup> reported the first studies for chitosan hollow fibers formation by using an alkali solution as external fiber coagulant and a gaseous phase containing a base as internal fiber coagulant. The main drawback of this method is that it requires complex setups because of the use of gaseous agents. In 1995, Kaminski et al.<sup>255</sup> and later, in 2003, Modrzejewska and Eckstein<sup>239</sup> proposed a different setup based on an annular spinneret with two liquid flows: an internal alkali fluid for internal wall formation and an external coagulation bath for fiber formation. Additionally, Vincent and Guibal<sup>256</sup> proposed a different technique that was inspired by the studies of Agboh and Qin<sup>251</sup> and Kaminski et al.<sup>255</sup> They extruded a chitosan solution through an annular spinneret into an alkaline coagulation bath for the coagulation of the external part, and the non-coagulated internal part was withdrawn by an air flow followed by water washing. These hollow fibers were designed for various applications such as sorption and desorption of chromate ions<sup>257</sup>, catalytic applications<sup>258, 259</sup>, delivery of vitamins and pharmaceutical molecules<sup>258</sup>. More recently, Ladet et al.<sup>27</sup> proposed a different strategy, based on the multi-step interrupted gelation of an alcoholic chitosan gel for the formation of chitosan multi-membrane hydrogels with an external tubular form. The limitation of this method is that the procedure must be carried out in discontinuous conditions because of the necessary step to obtain a chitosan alco-gel, which cannot be extruded due to its high viscosity. As a conclusion, the methods proposed until now are not adapted for hollow fiber formation in a continuous mode, the equipments are often complex and in the case of annular spinneret geometries, the internal diameter of the produced hollow fibers is pre-determined by the fixed geometry of the annular spinneret.

In recent works, we have proposed a new wet-spinning process for hollow fibers from an aqueous chitosan solution, based on an interrupted coagulation process<sup>260-262</sup>. This method offers the advantageous possibility of being processed in a continuous mode. In this way, hollow fiber elaboration by the wet spinning method was controlled by the combination of physicochemical, rheological and processing parameters. The mechanism of fiber formation is a relatively complex phenomenon owing to the large number of variables involved in the wet spinning process: the coagulation event is one of the determining steps of fiber formation, and should be carefully tuned as a function

of the dope solvent nature, dope concentration, nature and concentration of coagulant agent and coagulation bath temperature. In the present work, we aimed to provide an experimental knowledge of chitosan macrofiber hydrogel elaboration in a continuous process by implying a partial coagulation of the extruded chitosan macrofiber by the wet-spinning method. For this purpose, we showed the impact of the dope concentration and base concentration on the coagulation step. This resulted in a simple method based on the interrupted coagulation of an aqueous filament for the elaboration of hollow tubular chitosan fibers with variable internal diameters. We will show how this processing principle can be used to obtain hollow fibers in different ways.

## Experimental section

**Chitosan purification.** The initial chitosan produced from squid pens was supplied by from Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. (India). To obtain a high-purity material, chitosan was dissolved at 0.5% (w/v) in an acetic acid aqueous solution with the necessary amount of acid to achieve the stoichiometric protonation of the  $-NH_2$  sites. After complete dissolution, the chitosan solution was consecutively filtered through Millipore membranes with a pore size of 3, 1.2, 0.8 and 0.45  $\mu m$ . Then, dilute ammonia was added to the filtered chitosan solution in order to fully precipitate the polymer. Finally, the precipitate was repeatedly rinsed with distilled deionised water until a neutral pH was achieved, then centrifuged and lyophilized.

**$^1H$  nuclear magnetic resonance spectroscopy.** The degree of acetylation (DA) of chitosan was calculated from  $^1H$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and it was found to be close to 1.5%. 10 mg of purified chitosan were dissolved in 1 mL of  $D_2O$  containing 0.061 mM of HCl. Spectra were recorded on a Bruker ALS 300 spectrometer (300 MHz) at 25 °C. The DA was deduced from the ratio of the area of the methyl protons of the N-acetylglucosamine residues to that of all of the  $H_2$  to  $H_6$  protons of both glucosamine and N-acetylglucosamine residues<sup>111</sup>.

**Size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering.** The weight-average molecular weight of chitosan ( $M_w = 515\ 000$  g/mol) and polydispersity index ( $I_p = 1.6$ ) were determined by size exclusion chromatography (SEC) coupled on line with a differential refractometer (Waters R410, from Waters-Millipore) and a multi-angle laser-light scattering detector operating at 632.8 nm (Wyatt Dawn DSP). The refraction index increment  $dn/dc$  depends on the DA as determined in

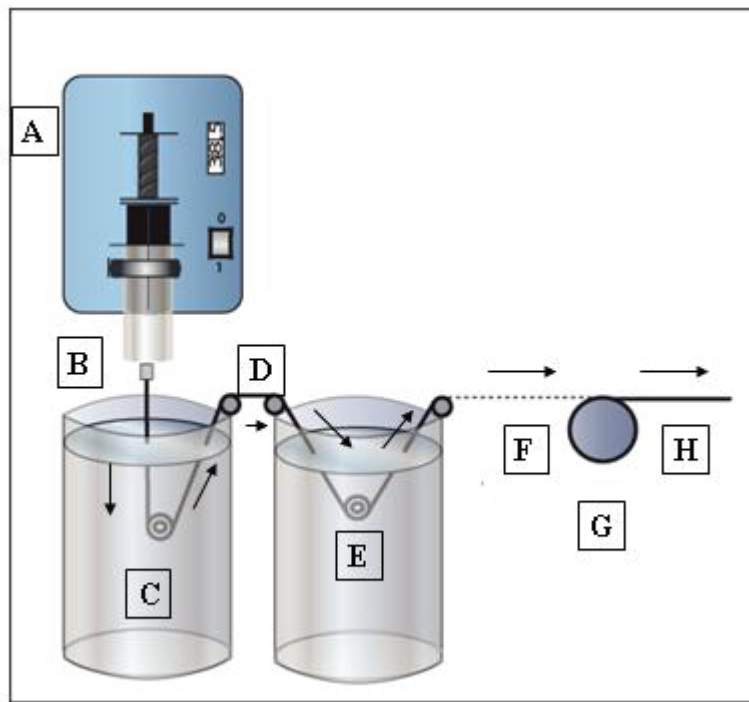


previous studies<sup>113</sup>. For the chitosan samples used in this study, this corresponds to  $dn/dc = 0.198 \text{ mL/mg}$ . A 0.15 M ammonium acetate/0.2 M acetic acid buffer (pH = 4.5) was used as the eluent at a flow rate was 0.5 mL/min. The polymer solutions were prepared by dissolving 1 mg of polymer in 1 mL of buffer, and then filtered through a Millipore membrane with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  before injection of 100  $\mu\text{L}$ .

**Rheology of chitosan acetate solutions.** The rheological properties of chitosan solutions were studied by means of a TA Instruments (AR 2000) rheometer in continuous mode at a constant deformation rate. A cone and plate geometry with a cone angle of 0.0698 radians and radius of 25 mm with a gap size of 114 microns was used for the measurements. The shear rates ranged from 0.001 to 10  $\text{s}^{-1}$  sampled with five data points per decade. The experiments were carried out at 25 °C by increasing the shear rate. Desorption of water from the solution was neglected during the experimental time needed for a shear rate scanning (about 20 - 30 min).

**Preparation of chitosan dopes and coagulant solutions.** Various chitosan dopes with concentrations ranging from 0.5 to 5% (w/w) were prepared by dissolving the purified chitosan in an aqueous acetic acid solution still with the stoichiometric amount to achieve  $-\text{NH}_2$  protonation. In all cases, the coagulant agent was an aqueous solution of sodium hydroxide of various concentrations ranging from 0.1 up to 4 M.

**Chitosan fiber elaboration by the interrupted wet spinning method.** Figure 1 displays the diagram representing the setup used for the elaboration of fibers<sup>260</sup>. The different chitosan dopes were firstly degassed under vacuum and placed into a polypropylene syringe with an inside spout diameter of 1.9 mm and a length of 12 mm. Dopes were extruded through the syringe-spinneret by means of a metering pump. The syringe spinneret exit was placed at the surface of the NaOH coagulation bath, avoiding an air gap to ensure a rapid coagulation of the macrofiber, so that the extruded solution was directly and continuously poured into the aqueous sodium hydroxide coagulation bath. The fiber was pulled out from the coagulation bath (before the complete neutralisation of the macrofiber) and transported to a water washing bath by means of several rollers. No stretching was applied during the extrusion process, but the obtained gels can indeed be drawn up to a stretching ratio close to 3.



**Figure 1.** Interrupted wet-spinning system for hollow fiber formation: A. Metering pump, B. Spinneret, C. Coagulation bath, D. Rotating rolls, E. Water washing bath, F. Successive water baths, G. Collecting Roll and H. Chitosan fiber.

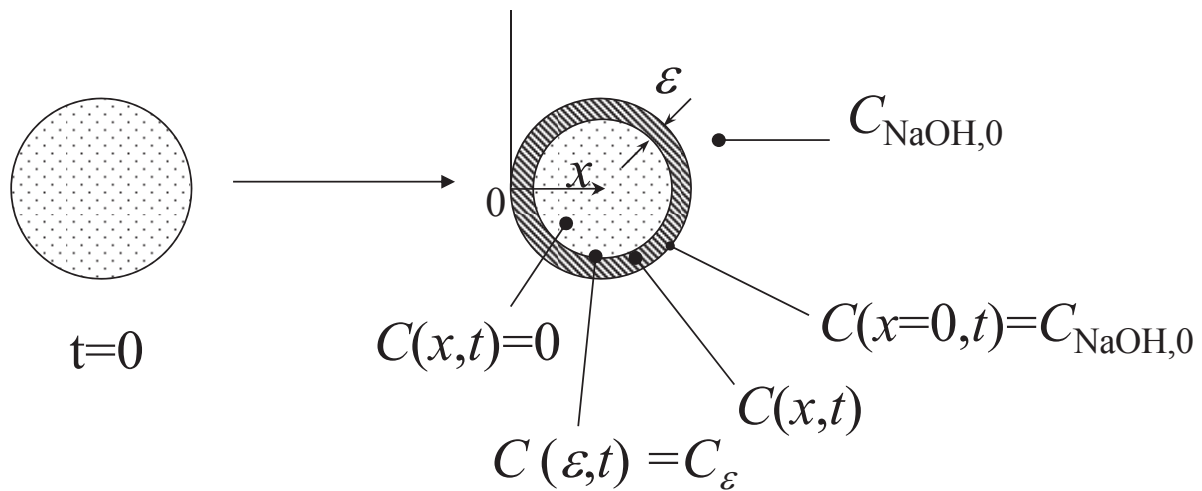
**Measurement of membrane thickness ( $\epsilon$ ).** Fibers were cross-sectioned with a razor blade to measure the thickness of the outer membrane gel formed at the periphery of the fibers. The membrane thickness was measured at different coagulation times by optical microscopy (Olympus BX41, 200X).

**Diffusion model for fiber coagulation.**<sup>263,264</sup> The chitosan coagulation kinetics can be analyzed in the simplified framework of a semi-infinite model containing a chitosan dope into which diffuses the  $\text{OH}^-$  and  $\text{Na}^+$  ions from the coagulation bath. This model neglects the diffusion of acetate ions and chitosan polyelectrolyte from the inside of chitosan macrofiber to the outside (coagulation bath). A neutralization reaction occurs between the protonated primary amine groups ( $\text{NH}_3^+$ ) and the hydroxyl ions ( $\text{OH}^-$ ) of the coagulant agent to induce the chitosan chains condensation and consequently the dope coagulation. To determine the global kinetics of chitosan fiber formation, the neutralization kinetics and chain condensation are considered to be immediate. As a result, the global kinetics of chitosan fiber formation is supposed to be mainly controlled by the diffusion kinetics of the coagulant agent into the extruded chitosan macrofiber. In the following, the main features of the diffusion model used to estimate the fiber

formation kinetics are described. The membrane formation in fibers could be modelled by considering a one-dimensional semi-infinite diffusion model based on the second Fick's law. This theory of diffusion was firstly proposed in 1947 by Hermans<sup>265</sup> for the diffusion of sodium thiosulphate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) into gelatin gels with iodine. Two decades later, Paul<sup>263, 266</sup> evaluated different approximate mathematical models to explain the fiber formation mechanism of acrylonitrile-vinyl acetate copolymer with various mixtures of dimethylacetamide-water as coagulation bath. Finally, the mathematical model for one-dimensional linear diffusion process was formally presented by Crank<sup>267</sup> and Ziabicki<sup>264</sup>. In our coagulation system, this model was applied to calculate the diffusion of sodium hydroxide into the chitosan solution, as expressed in eq 1:

$$\frac{\partial C_{\text{NaOH}}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{\text{NaOH}}}{\partial x^2} \quad (18)$$

where  $C_{\text{NaOH}}$  is the sodium hydroxide concentration in the coagulated filament at a given diffusion time  $t$  and  $D$  is the diffusion coefficient of sodium hydroxide into the aqueous chitosan dope. The solution proposed for eq 1 hypothesizes diffusion conditions into a semi-infinite medium with a constant coagulant concentration  $C_{\text{NaOH},0}(0,t)$  at the surface limit between the coagulation bath and the chitosan macrofiber, and a zero initial coagulant concentration at inner of the chitosan macrofiber at  $C(x,0)$ .<sup>264, 267</sup> Figure 2 illustrates these boundary conditions, and the obtained solution of the eq 1 is given by eq 2.<sup>267</sup>



**Figure 2.** Geometry of the diffusion model with semi-infinite approximation and corresponding boundary conditions.

$$\frac{C_{\text{NaOH},0} - C_\epsilon}{C_{\text{NaOH},0}} = \text{erf}\left(\frac{\epsilon}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (19)$$

where  $erf()$  is the error function,  $\varepsilon$  is the membrane thickness,  $c_{NaOH,0}$  is the initial concentration of the external coagulation bath (supposed to be constant),  $c(\varepsilon,t) = c_\varepsilon$  is the concentration of coagulant at the membrane limit, and  $t$  is the coagulation time.

From the eq 2, it could be noted that the ratio  $\frac{\varepsilon}{2\sqrt{Dt}}$  is a dimensionless constant parameter, suggesting that term  $\varepsilon/\sqrt{t}$  is also a constant.<sup>265, 268</sup> This behavior holds as long as: (i) the value of  $\varepsilon$  stays small enough, (ii) the initial bath concentration is uniform and remains constant.<sup>267</sup> The term  $\varepsilon/\sqrt{t}$  is referred to as the apparent coagulation rate, and it is a useful practical parameter for predicting the membrane formation kinetics.<sup>240, 268, 269</sup> In the present work, the chitosan coagulation kinetics was characterized by this parameter.

## Results and discussion

### 1. Determination of the processing window for the chitosan macrofiber formation.

**1.1 Chitosan spinnability.** A first approach to determine the extrusion conditions for chitosan macrofiber elaboration was to identify the spinnability of chitosan solutions, i.e., the ability to form a continuous and stable filament after the spinneret. The chitosan spinnability of the dope is obtained above a critical viscosity; and consequently, the major determining factors are the polymer concentration and molecular weight of the polymer. Additional parameters such as temperature, shear rate, solvent nature and composition for polymer dissolution (including ionic strength and pH) also play a significant role.<sup>270</sup> For our purpose, the spinnability was evaluated as a function of the polymer concentration; thus, all the experiments were carried out at constant room temperature and with chitosan of high molecular weight and low DA (see experimental section). The spinnability property of the different chitosan dopes (0.5 – 5 % w/w) was estimated in air from the extrusion of the dopes through a syringe-spinneret of standard geometry (inner diameter = 1.9 mm, spinneret length = 12 mm) at an extrusion rate of 35.4 mL/h. From these observations, it was found that the lowest concentration for spinnability corresponded to a polymer solution of 1.5% (w/w); the extrusion below this limit was not possible due to the discontinuities in the flow line. The highest concentration limit was about 5% (w/w); above this maximum value, although the formation of a stable filament is in principle possible, the extrusion was

difficult because of the long degassing time and difficulties in extruding the dope through the spinneret. As a conclusion, satisfactory spinning conditions could be obtained from chitosan solutions ranging from 1.5 up to 5% (w/w); the corresponding zero-shear chitosan viscosities ( $\eta_0$ ) of these solutions were ranging between 60 and 23 000 Pa.s (see Table 1).

**Table 1.** Parameters of the Carreau and Cross equations (see eqs 3 and 4) for chitosan acetate solutions with DA = 1.5%  $\pm$  0.2,  $M_w$  = 515 000  $\pm$  51000 g/mol and 1.6  $\pm$  0.3.

$c_p$ (% w/w)	Carreau model			Cross model		
	$\eta_0$ (Pa.s)	$\tau_R$ (s)	$p$	$\eta_0$ (Pa.s)	$\tau_R$ (s)	$p$
2	63	4.9	0.17	66	0.6	0.63
3	890	18	0.26	980	6	0.68
4	10800	29	0.386	14200	28	0.82
5	22700	33.6	0.43	29700	34	0.90
6	45520	35.7	0.47	58200	58	0.99

A broad range of concentrations for chitosan spinning has been reported in literature. The most common chitosan concentrations are ranging from 3 to 7% (w/w).<sup>239, 240, 243, 257</sup> Our viscosity range for spinnability is in good agreement to that reported by Notin et al.<sup>217</sup> since a similar chitosan material was used.

**1.2 Rheological properties of chitosan dopes.** The rheological behavior of chitosan acetate solutions was measured as function of the steady shear rate ( $\dot{\gamma}$ ), as shown on Figure 3. The well known shear thinning behavior of chitosan solutions is well apparent, with a clear viscosity decrease for increasing shear rates. This phenomenon is a typical behavior of natural polymers (hyaluronic acid<sup>271</sup>, guar gum<sup>272</sup>, alginates<sup>273, 274</sup>, xanthan<sup>275</sup> and chitosan<sup>276-279</sup>), but it is also observed in synthetic polymers in solution<sup>280</sup> or in the molten state<sup>281</sup>.

Figure 3 shows that at low shear rates the viscosity is shear-independent (Newtonian plateau); and a zero-shear viscosity ( $\eta_0$ ) could be calculated in the low shear rate limit. At low-shear conditions the chitosan solution mainly behaves like a Newtonian fluid. For higher values than the critical shear rate ( $\dot{\gamma}_c$ ), the fluid becomes

non-Newtonian with a viscosity decreasing as a power law of the shear-rate, i.e., the shear thinning effect. The decrease in viscosity with the increasing shear rate corresponds to the disruption of chain junctions of various natures; the rate of chain disruption exceeding the rate of chain interaction formation.<sup>281</sup> Figure 3 also shows that at high polymer concentrations ( $c_p$ ) the solutions behave more as a non-Newtonian fluid, whereas at low values the polymer solutions tend towards a Newtonian behavior. This phenomenon is attributed to the increasing of entanglements and inter-chain associations.

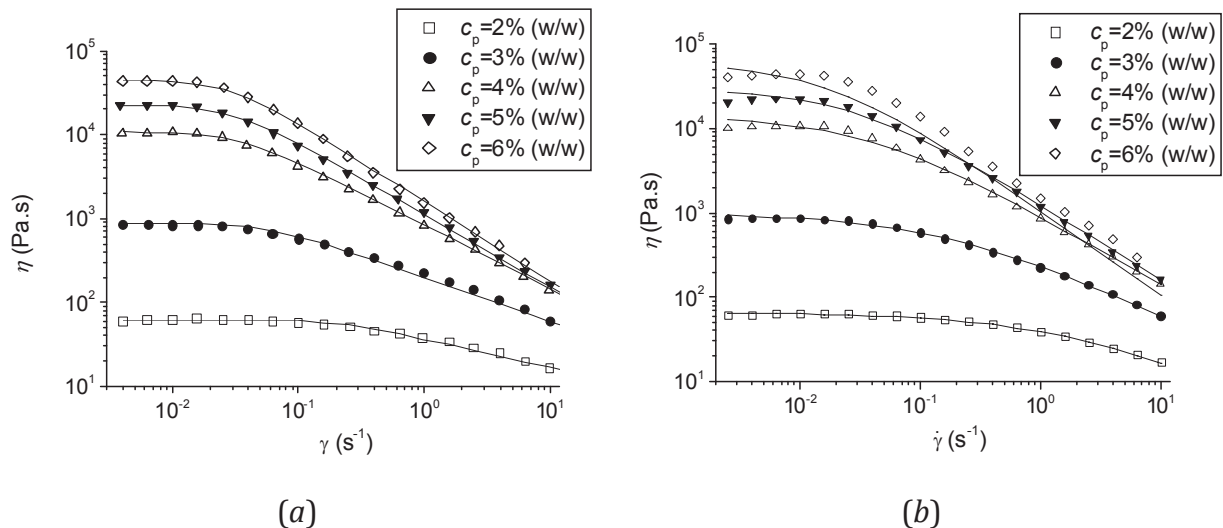
The rheological data were further analyzed through the Carreau model<sup>278</sup> (eq 3) in order to deduce the zero-shear viscosity ( $\eta_0$ ) and the relaxation time for chain disentanglement ( $\tau_R \approx \dot{\gamma}_c^{-1}$ ):

$$\eta = \frac{\eta_0}{(1 + (\tau_R \dot{\gamma})^2)^p} \quad (20)$$

An alternative approach for modelling the apparent viscosity could be performed according to the Cross equation<sup>282</sup>:

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + (\tau_R \dot{\gamma})^{p'}} \quad (21)$$

However, at high  $c_p$  values, the Carreau equation yielded a better agreement with experimental data in comparison with the Cross model (see Figure 3).



**Figure 3.** Variation of the viscosity as a function of steady shear rate ( $\dot{\gamma}$ ) of chitosan acetate solutions ( $M_w = 515\,000$  g/mol and DA = 1.5%) for different polymer concentrations at room temperature. The solid lines are the fits from: *a*) the Carreau equation and *b*) the Cross equation.

The increase of viscosity with concentration has already been reported for different chitosan solutions.<sup>279, 283</sup> In good solvents, the transition, from the diluted (below  $c^*$ ) to the semi-diluted regime, has never been experimentally demonstrated since  $c^*$  is usually too low, but depending on the chitosan sample studied this value has been estimated as  $c^* \sim 0.01 - 0.04\%$  (w/w).<sup>141, 284</sup> Additionally, in concentrated chitosan solutions, a second critical concentration<sup>30</sup>  $c^{**} \sim 1.8\%$  (w/w) was evidenced above  $c^*$ , and it corresponded to: (i) a change in the hydrophilic/hydrophobic balance governing chain conformation<sup>30, 141</sup>, (ii) a change in the physico-chemical properties<sup>284</sup>, and (iii) the presence of chain aggregates in solution<sup>207</sup>. In this work, the polymer concentration is far above the critical concentration for chain entanglement ( $c^*$ ), and also higher to the second critical concentration ( $c^{**}$ ). In addition, the ionic force due to the polyelectrolyte and the acetate counterions are high, and the electrostatic interactions are already largely screened, so the addition of salt could not be used to adjust the viscosity of high concentrated chitosan solutions.

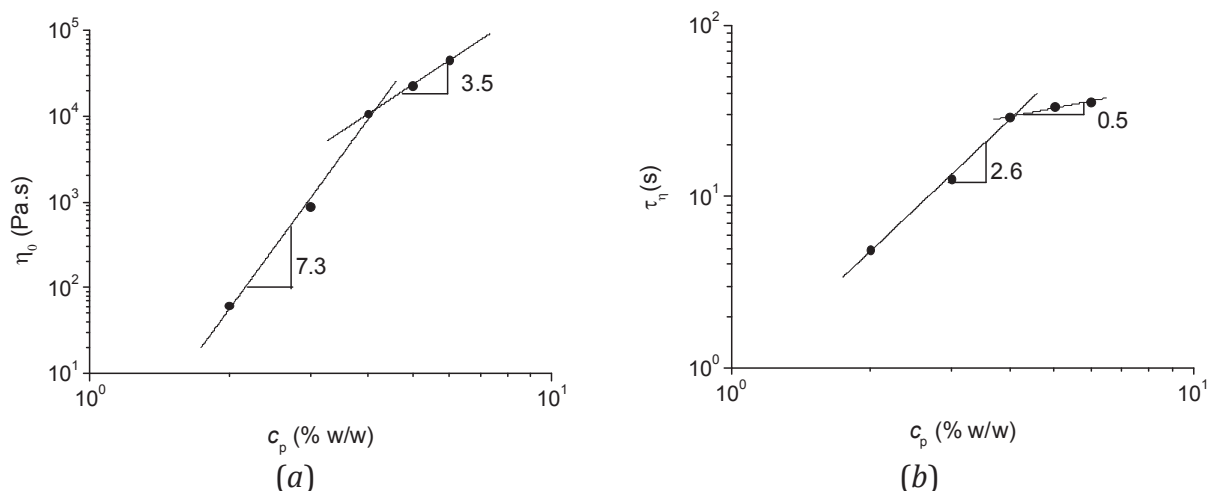
The Carreau model (eq 3) was the relationship used for predicting the zero-shear rate viscosity ( $\eta_0$ ). Figure 4a shows the concentration dependence of the zero-shear viscosity, and two distinct regions were observed depending on the polymer concentration. For solutions over  $c_p < 4\%$  (w/w), the zero-shear viscosity varied as  $\eta_0 \approx (c_p)^{7.3}$ , while for solutions with  $c_p > 4\%$  (w/w) a relationship of  $\eta_0 \approx (c_p)^{3.5}$  was found. The exponent of the first power law (7.3) is higher than those reported in the literature. The scaling theory<sup>285</sup> predicts the specific viscosity ( $\eta_{sp}$ ) for a semi-dilute entangled polyelectrolyte solution in a good solvent as  $\eta_{sp} \approx (c_p)^{3.75}$ . Desbrières<sup>277</sup> also observed a higher exponent,  $\eta_{sp} \approx (c_p)^{5.2}$  in the semi-dilute entangled regime ( $c_p > 1.34\%$  w/w) for chitosan with a viscosity-average molar mass of  $M_v = 1.93 \times 10^5$  g/mol and DA = 12% with 0.3 M acetic acid/0.05 M sodium acetate as solvent. Cho et al.<sup>278</sup> reported a relationship of  $\eta \approx (c_p)^{4.1}$  for concentrated chitosan solutions (1 – 4% w/w) with a  $M_w = 8.93 \times 10^5$  g/mol and DA = 7% dissolved in 0.25 M acetic acid/0.25 M sodium acetate. Additionally, Hwang and Shin<sup>276</sup> measured the specific viscosity as function of the dimensionless coil overlap parameter ( $c_p[\eta]$ ) and they also found a higher exponent (3.94) in the concentrated region for a chitosan sample of  $M_v = 1.71 \times 10^6$  and DA = 9% in

0.1 M sodium chloride/0.1 M acetic acid. This last value was found slightly larger than the expected exponent of random coil polysaccharides, i.e., 3.4.<sup>276</sup>

The change in behavior observed in Figure 4a at high polymer concentrations ( $c_p > 4\%$  w/w) could be considered as a gelation concentration. An induced gel state could be expected as the number of hydrophobic/H-bonding junctions increases with the polymer concentration. Nevertheless, this mechanism of conformation is reversible in the sense that these associations are disrupted by dilution in water. Iversen et al.<sup>286</sup> also observed a gelation concentration for polymer concentrations larger than 3.9% (w/w) for chitosan  $M_w = 4 \times 10^5$  g/mol and DA = 16%. Desbrières<sup>277, 283</sup> reported a chitosan gelation concentration at 4.5% (w/w).

As the polymer concentration increases the shear thinning behavior is more pronounced (Figure 3). The Newtonian plateau region is more limited and the shear thinning effect occurs at lower shear rates, implying an increasing relaxation time ( $\tau_R \approx \dot{\gamma}_c^{-1}$ ) with the polymer concentration, as shown in Figure 4b. As for the zero-shear viscosity experiments, two distinct behaviors were observed, i.e.,  $\tau_R \approx (c_p)^{2.5}$  and  $\tau_R \approx (c_p)^{0.5}$  below and above  $c_p \sim 4\%$  (w/w) respectively. Again, the exponent of 2.5 is larger than the value proposed by the scaling theory<sup>285</sup> for a semi-dilute entangled polyelectrolyte solution in a good solvent ( $\tau_R \approx (c_p)^{1.5}$ ), but it was lower in comparison with different experimental works, where the corresponding exponent was reported around 3.7.<sup>277, 287</sup> As a conclusion, the evolution of the scaling exponents for  $\eta_0$  and  $\tau_R$  at high polymer concentration are far from theoretical predictions, and mainly related to the increase of interchain interactions through H-bonding and hydrophobic interactions, in addition to chain entanglements. Such interactions are in turn related to the DA and deacetylation pattern of chitosan (repartition of the acetylated and deacetylated units along the chain), which explains the scattering in the results reported in literature. Our results are thus characteristic of a high  $M_w$ , low DA with true intra-chain statistical distribution of the residues.



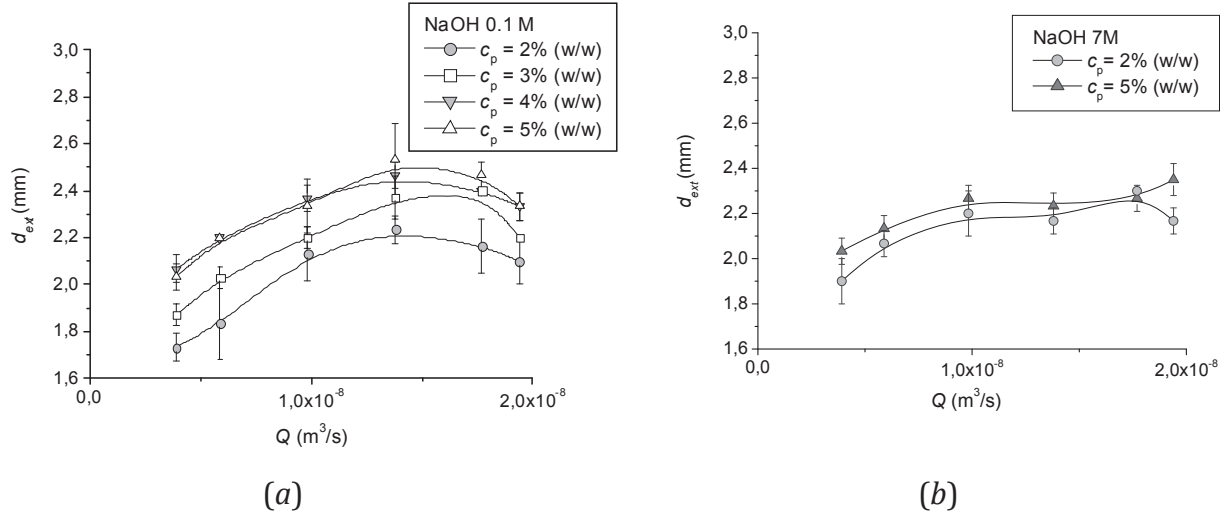


**Figure 4.** (a): Effect of the chitosan dope concentration on: (a) the zero shear viscosity ( $\eta_0$ ) and (b) on the characteristic time ( $\tau_R$ ) deduced from the Carreau equation.

### 1.3 Effect of extrusion rate on the external diameter of chitosan macrofibers.

During the wet-spinning process, the effect of extrusion rate was evaluated by measuring the external diameter ( $d_{\text{ext}}$ ) of the coagulated macrofiber as a function of the chitosan dope and coagulant concentration bath. Figure 5 displays a swelling effect of the chitosan macrofiber up to a diameter  $d_{\text{ext}}$ , which is significantly larger than the spinneret diameter ( $d_s = 1.9$  mm). In the fiber spinning from molten polymers, this phenomenon classically corresponds to the effect of the entanglement network that permits to store the elasticity energy from the shear in the spinneret, which is later released on emerging from the hole.

Figure 5 shows the evolution of the  $d_{\text{ext}}$  of coagulated chitosan macrofilaments as a function of extrusion rate ( $Q$ , mL/h). Whatever the extrusion rate and the coagulation conditions, a systematic increase in the swelling effect is observed with the polymer concentration increase. Quantitatively, this effect depends both on the neutralisation bath concentration and the polymer concentration. A maximum of the outer diameter of the fiber can be observed in the case of dilute coagulant concentrations (Figure 5a) at the highest polymer concentration, when the neutralisation kinetics is slower. The swelling effect is particularly limited and reaches a plateau at concentrated coagulant solutions (e.g., NaOH 7 M) and at high shear rates (see Figure 5b). This is an indication that the gel could be formed before chain relaxation by a fast coagulation process.



**Figure 5.** Effect of the extrusion rate on the external diameter ( $d_{ext}$ ) of extruded chitosan macrofibers at different coagulation rates: a) NaOH 0.1 M and b) NaOH 7 M. (Spinneret diameter,  $d_s = 1.9$  mm).

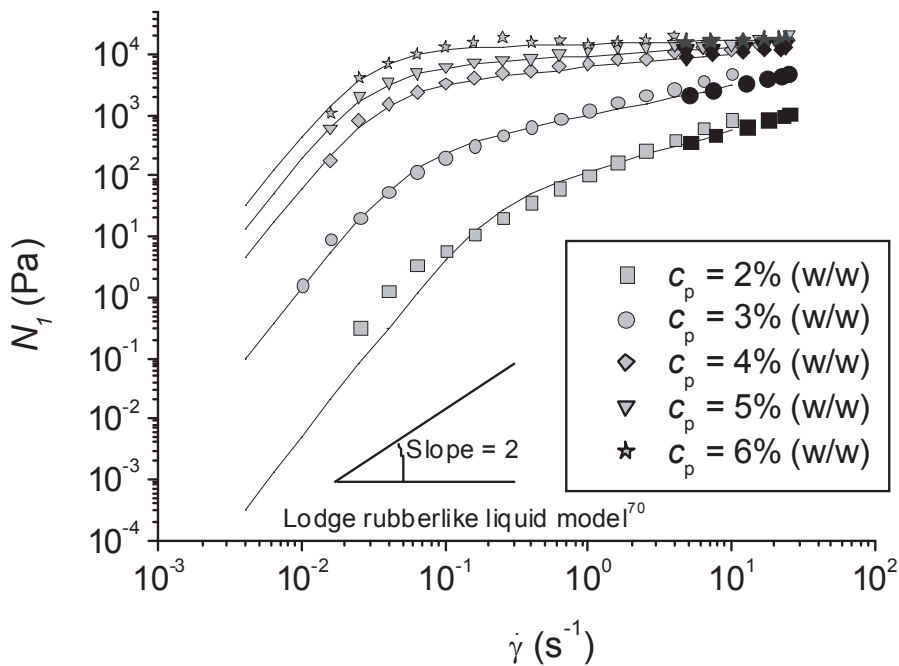
In order to better analyze the die swelling effect ( $d_{ext}/d_s$ ), the elasticity of the chitosan spinning solutions was evaluated through the determination of first normal stress difference ( $N_1$ ). This parameter can be obtained from (i) the measurement on the normal stress applied on the cone-plate shear cell, however it is difficult to obtain an reliable experimental data; or (ii) it can be estimated through the viscosity data by the semi-empirical Wagner equation<sup>288</sup> (eq 5). The calculation of the derivative  $\frac{\partial \eta(\dot{\gamma})}{\partial \dot{\gamma}}$  can in turn be performed on the basis of measured viscosity data or by using the modelling of the  $\eta - \dot{\gamma}$  data (see eqs 3 and 4). The use of the Carreau model will yield the Carreau-Wagner relationship<sup>289</sup> (eq 6); and alternatively, the Cross model will result in the Cross-Wagner relationship (eq 7). Due to the good agreement of the experimental viscosity data, we chose to use the Carreau-Wagner equation for the estimation of  $N_1$ . The damping parameter  $m$  is associated with the strain dependence of the memory function and it was considered as 0.2 in the present work.<sup>289</sup>

$$N_1(\dot{\gamma}) = -\frac{\dot{\gamma}^2}{m} \frac{\partial \eta(\dot{\gamma})}{\partial \dot{\gamma}} \quad (22)$$

$$N_1(\dot{\gamma}) = \frac{\eta_0 P (\tau_R)^2 \dot{\gamma}^3}{m [1 + (\tau_R \dot{\gamma})^2]^{p+1}} \quad (23)$$

$$N_1(\dot{\gamma}) = \frac{\eta_0 P' \tau_R \dot{\gamma}^2}{m (\tau_R \dot{\gamma})^{(1-p)} [1 + (\tau_R \dot{\gamma})^{p'}]^2} \quad (24)$$

Figure 6 shows the  $N_1$  values calculated from the experimental viscosity data and from the Carreau-Wagner relationship. Both estimations were in good accordance with the results previously reported for chitosan<sup>289</sup>. For melt polymers, the Lodge rubberlike liquid model<sup>290</sup> predicts that the limit behavior of  $N_1$  at low shear rates corresponds to a quadratic function of the shear rate ( $\dot{\gamma}$ ); thus, a maximum exponent of 2 is attended in the logarithmic representation. The predicted  $N_1$  values, at low shear rates, presented an exponent that varied from 3 up to 2.7, these values were slightly larger in comparison to rubberlike liquid model. At relatively high shear rates, the dependence of  $N_1$  on the shear rate follows a power-law function; it could be inferred that this behavior resulted from the drop in viscosity and hence, in the framework of the entanglement model, to a decrease in the concentration of entanglements. Therefore,  $N_1$  increases with  $c_p$ , as observed in Figure 6. Additionally, it has been reported<sup>291</sup> that the increase in  $c_p$  reduced the dependence of  $N_1$  on the shear rate, this behavior was confirmed in the present system.



**Figure 6.** First normal stress difference ( $N_1$ ) for chitosan solutions ( $M_w = 515\,000$  g/mol and DA = 1.5%) at different concentrations evaluated from the cone-plate viscosity data and equation 5 (gray closed symbols), and the modelling of the experimental data with the Carreau-Wagner relationship according to equation 6 (solid line). The values at the different shear rate at the wall spinneret are labelled as black closed symbols.

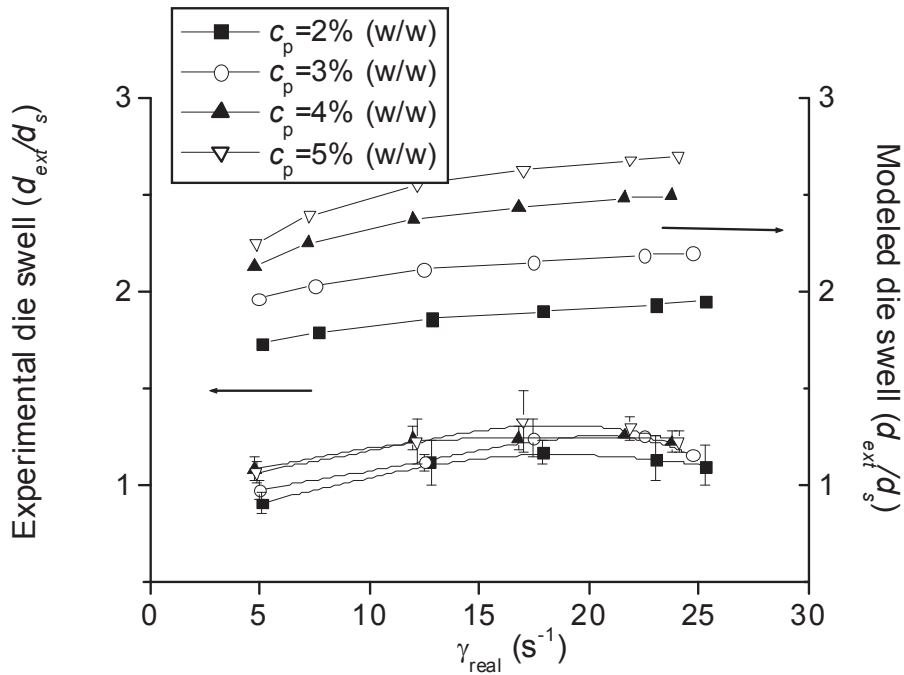
The  $N_1$  values at different shear rates corresponding to Fig. 5a and 5b were also located in Figure 6; this was possible from the classical estimation of the shear-rate ( $\dot{\gamma}_{real}$ ) at the spinneret (eq 8):

$$\dot{\gamma}_{real} = \frac{3n+1}{4n} \left( \frac{4Q}{\pi R^3} \right) \quad (25)$$

where  $n$  is the power law index,  $R$  is the radius of the spinneret and  $Q$  the extrusion rate.

The die swell effect was then estimated through the semi-empirical model of Tanner<sup>292</sup> (eq 9). The calculation of the swelling ratio from rheology overestimates the swelling effects as observed in Figure 7. The swelling phenomenon could not be easily predicted by these models since a more complex mechanism occurs during the wet-spinning of chitosan solutions, through the establishment of new interchain interactions that induce the gel state (hydrophobic interactions, H-bonding and crystallite formation). The exact value of  $d_{ext}$  will result in the respective kinetics of chain relaxation (by disentanglements) and the formation of the gel physical cross-links. The observed increase of  $d_{ext}$  with the shear rate corresponds mainly to the increasing degree of recoverable deformation at the spinneret exit through chain alignment and stored elastic energy. At high shear rates, it could be suggested that chain alignment and disentanglement favours the crystallite chitosan formation and thus results in a lower swelling ratio. In the following, the extrusion rate was fixed close to 35.4 mL/h because a maximum  $d_{ext}$  is attained at this point in a wide range of concentration. Higher extrusion rates could be operated in principle, but we preferred to work at optimal rates to assured the maximum  $d_{ext}$ .

$$\frac{D_{ext}}{d_s} = \left[ 1 + \frac{1}{2} \left( \frac{N_1}{2\tau_w} \right)^2 \right]^{\frac{1}{6}} \quad (26)$$

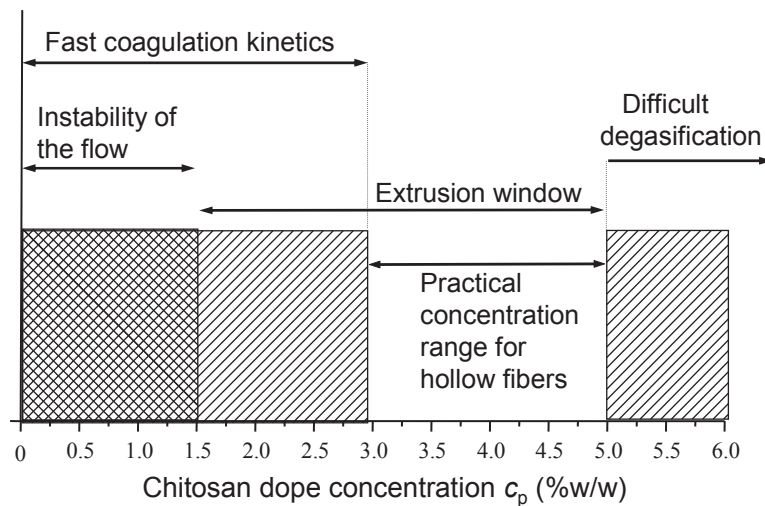


**Figure 7.** Experimental die-swell effect (left axe) and calculated die-swell by Tanners model (right axe) for different extruded chitosan dopes through a syringe spinneret.

**2. Formation of the internal wall of chitosan fibers by the interrupted wet-spinning.** The formation of the internal wall of the chitosan macrofibers was achieved by stopping the coagulation process by water washings baths. To apply correctly the interrupted coagulation method, it was determined the optimal dope concentration range and coagulant concentration.

**Dope concentration range.** In order to form hollow fibers by the interrupted neutralization method, it is necessary to allow the interruption of the coagulation process into a manageable period of time. Different experiments were then performed to identify the time needed for total coagulation of the macrofibers as a function of the chitosan dope concentration. To this end, the different spinnable chitosan dopes ranging from 1.5 up to 5% (w/w) were extruded at an extrusion rate of 35.4 mL/h into a coagulation bath of NaOH 1 M; and the coagulation process was followed at different periods of coagulation by optical microscopy observations of the fiber cross-section. From these observations, it was found that the total coagulation time was only measurable for chitosan dopes over 2.9% (w/w); below this limit the macrofibers were completely coagulated in small periods (< 18 s in NaOH 1 M) making difficult the interruption of the coagulation process.

On the basis of our preliminary investigations, we determined the most suitable extrusion conditions for the elaboration of chitosan hollow fibers: the concentration of the dope ranges from 2.9 to 5% (w/w) for an extrusion rate of 35.4 mL/h. The overall procedure followed to deduce these experimental conditions is shown in Figure 6.

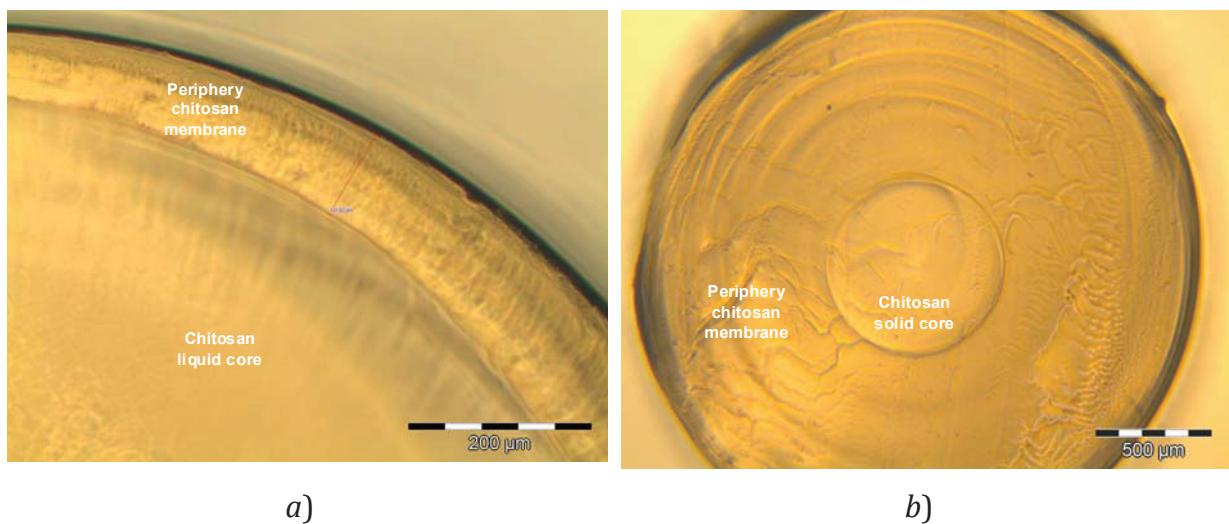


**Figure 8.** Process scheme for the practical determination of the dope concentration for chitosan hollow fiber processing ( $M_w = 515\,000$  g/mol and DA = 1.5%). The optimal range for the dope concentration is limited by the instability of the flow line and the kinetics of coagulation in the low concentration range, and by the ability of degassing the dope at high concentration.

**Coagulant concentration.** In addition to the dope concentration, the coagulant concentration is a critical factor for the good performance of the interrupted coagulation process. To correctly define this parameter, a kinetic study of the chitosan coagulation process was carried out based upon the theoretical framework presented above.<sup>239, 263, 264</sup> In the case of chitosan fiber fabrication, Knaul et al.<sup>240</sup> and El-Tahlawy and Hudson<sup>243</sup> used this method for the study of the effect of different coagulation parameters (e.g., the coagulant agent nature and temperature) on the chitosan coagulation rate. Nevertheless, in these studies, an excess of acetic acid was used for the preparation of the chitosan solutions, yielding a different evaluation of the coagulation process. An excess of acid could delay chitosan coagulation, and possibly modify the solution properties because of acid hydrolysis. In this study, we used a stoichiometric acid amount for the preparation

of the chitosan solution, and we determined the apparent coagulation rate ( $\varepsilon/\sqrt{t}$ ) to show the effect of coagulant concentration and dope concentration on the chitosan coagulation kinetics. In this way, we established the most adequate coagulant conditions to interrupt the coagulation process by water washing baths, and then to form the internal wall of the chitosan macrofibers.

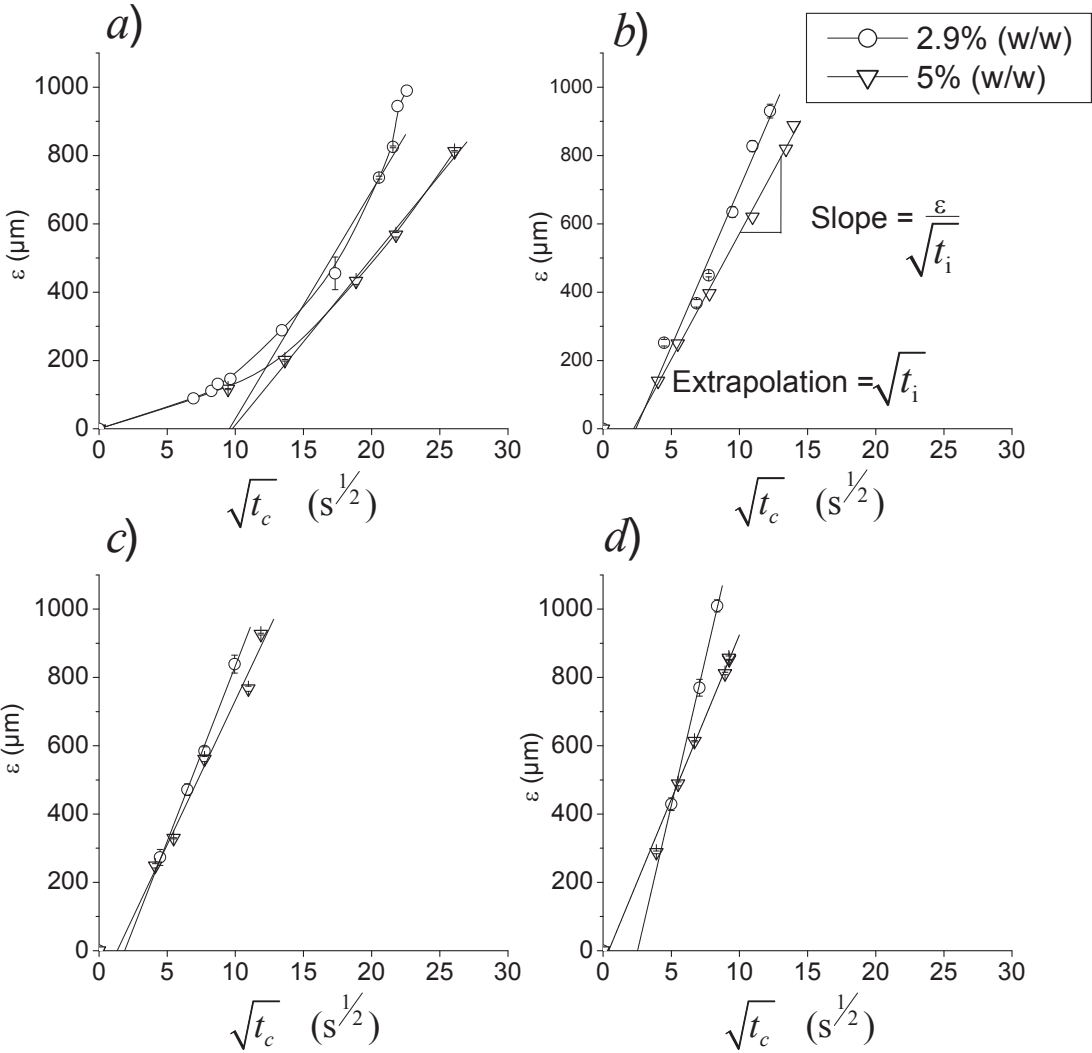
The first approach to determine  $\varepsilon/\sqrt{t}$  was to measure the membrane thickness ( $\varepsilon$ ) at different periods of coagulation by optical microscopy. The  $\varepsilon$  measure is the radial distance between the fiber periphery and the membrane limit, and it was obtained after the interruption of the coagulation process by water washing baths. As shown in Figure 2, the "membrane" formation begins at the solution surface and moves inward with time until it reaches the center of the solution. The interruption of this coagulation process at the initial stages yielded a periphery membrane physical hydrogel surrounding a liquid core solution (or non-neutralized chitosan solution). Such structure is shown in Figure 9a. When the membrane limit approaches the fiber centre, the interruption of the coagulation is difficult by water washing, and a gel core is obtained in mild neutralization conditions. Nevertheless, the evaluation of  $\varepsilon$  was still possible due to the persistence of the membrane limit between the two gels (see Figure 9b).



**Figure 9.** Slides of chitosan fibers with two distinguishable parts: *a*) periphery chitosan membrane and a chitosan liquid core (Olympus BX41, magnification 10X) and *b*) periphery chitosan membrane and a core gel (Olympus BX41, magnification 10X).

The kinetics of the membrane formation was evaluated for the lower and upper concentration limits (2.9 and 5% w/w) in the different coagulant solutions (from 0.1 to

4 NaOH M), and the kinetic plots of  $\varepsilon$  vs.  $\sqrt{t}$  are shown in Figure 10. It was observed that the “membrane” formation process at initial stages followed a square-root time behavior, and as soon as the membrane limit approaches the center of the macrofiber, a deviation from linearity also occurred. This behavior is comparable with different experimental studies of fiber formation: chitosan fibers<sup>240,243</sup>, silk fibers<sup>269</sup>, and acrylic fibers<sup>266</sup>. Additionally, Paul<sup>263</sup> explained that the square-root time behavior at the early stages of the process is characteristic of systems of finite size, because during this period the sample really appears infinite; and the later deviation from linearity could be attributed to the escape of the geometrical conditions of the semi-infinite model<sup>240,263</sup>. A semi-infinite cylindrical rod model could be more appropriate for the prediction of the coagulant diffusion into the extruded macrofiber. In spite of its limitations, the semi-infinite model yields acceptable results in a large coagulation time range.

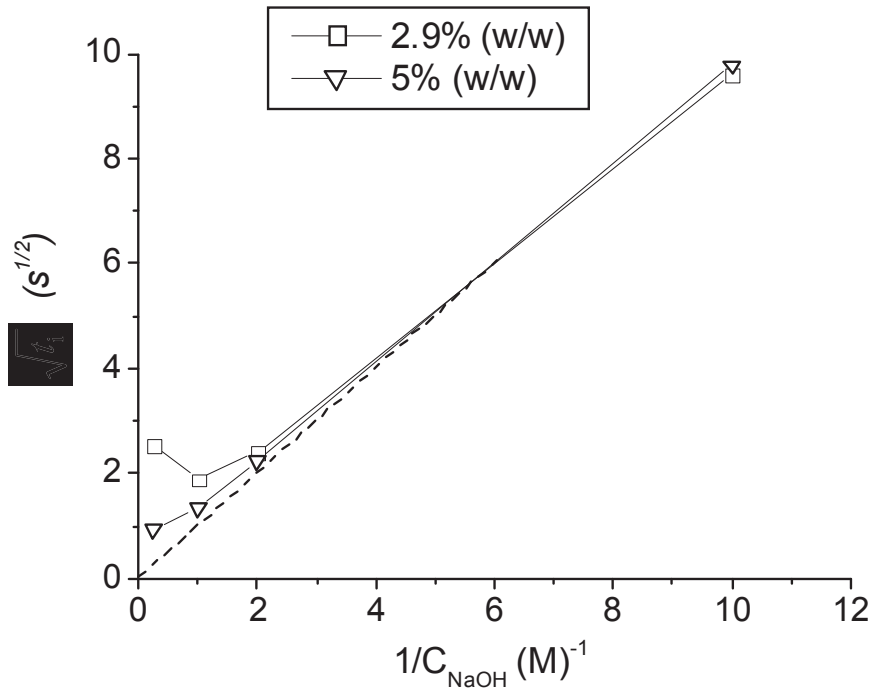




**Figure 10.** Membrane thickness ( $\epsilon$ ) as a function of the square root of coagulation time ( $\sqrt{t_c}$ ) of chitosan dopes of 2.9 and 5% (w/w) different coagulation systems: *a*) NaOH 0.1 M, *b*) NaOH 0.5 M, *c*) NaOH 1 M and *d*) NaOH 4 M. (Spinneret diameter,  $d_s = 1.9$  mm).

Figure 10 shows that a change in the coagulation regime also occurs in the short coagulation range. This short time regime is well apparent in the case of coagulation in dilute aqueous solutions of sodium hydroxide (0.1 M NaOH, see Figure 10*a*), but also results in an apparent induction time in more concentrated coagulant solutions (10*b*-10*d*): due to the faster kinetics of coagulation it is difficult to measure the thickness of the short coagulated region. Thus, an apparent induction time ( $\sqrt{t_i}$ ) for coagulation could be estimated from the extrapolation of the experimental curves in the linear regime as shown on Figure 10*a-d*.

The apparent induction time ( $\sqrt{t_i}$ ) was further analyzed as a function of coagulant and dope concentration, as illustrated in Figure 11. Depending on the coagulant concentration, two different situations could be observed. For the lower coagulant concentrations, the induction time ( $\sqrt{t_i}$ ) varies proportionally with the reciprocal coagulant concentration, whatever the concentration of the dope. At high coagulant concentration, the evolution of the induction time deviates from the proportionality relationship ( $\sqrt{t_i} \sim 1/C_{\text{NaOH}}$ ), the increase of  $t_i$  being related to the dope concentration. Such induction phenomena could be related to the diffusion of water from the dope to the coagulation bath, the water flux being the source of a dragging force onto the coagulant ionic species. Indeed, at high coagulant concentration, the mobility of water molecules is higher than the ionic species ( $\text{Na}^+$  and  $\text{OH}^-$ ).<sup>293</sup> Such complex diffusion effect is then more apparent in the case of concentrated coagulant baths, and is also limited when the polymer concentration is high, as observed in Figure 11. The coagulation process thus could start by water equilibration bearing similarities with the salting out phenomenon.<sup>27, 294</sup>

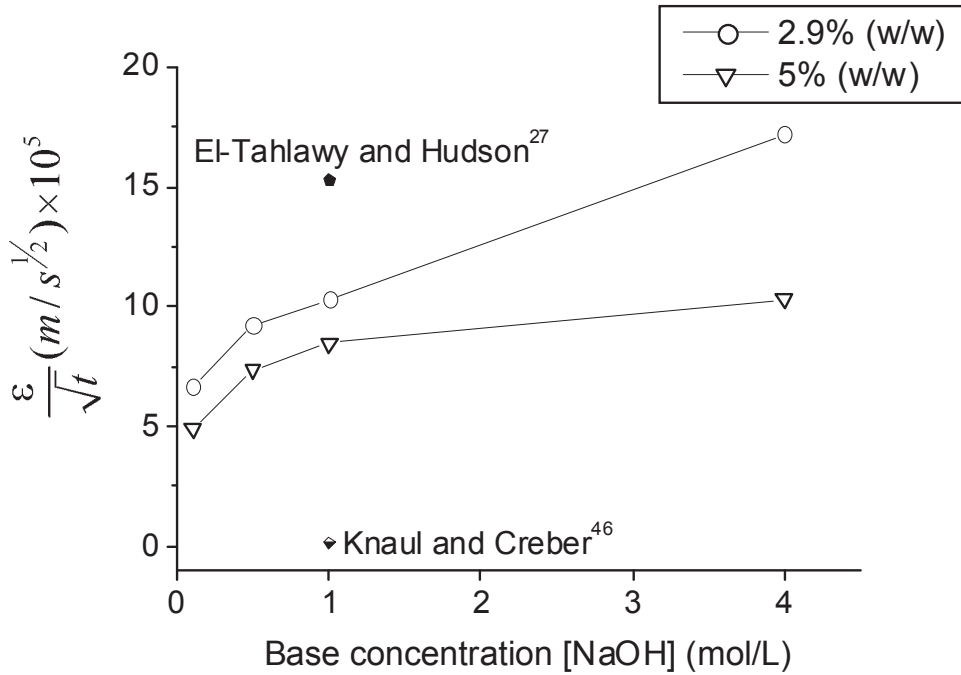


**Figure 11.** Square root of apparent induction time ( $\sqrt{t_i}$ ) of chitosan coagulation kinetics measured at two dope concentrations (2.9 and 5% w/w), at different coagulant concentrations.

The experimental values of the apparent coagulation rate ( $\varepsilon/\sqrt{t}$ ) were calculated from the slope of the linear domain of the  $\varepsilon$  vs.  $\sqrt{t}$  plots, and then presented in Figure 12. The obtained  $\varepsilon/\sqrt{t}$  values fall into the same order of magnitude as those reported for the coagulation system of cellulose/ $\text{NH}_3$ / $\text{NH}_4\text{SCN}$  in different monoalcohols:  $\varepsilon/\sqrt{t} = 1.5 - 3 \times 10^{-5} \text{ m/s}^{1/2}$ .<sup>268</sup> For chitosan coagulation systems, the parameter  $\varepsilon/\sqrt{t}$  varied in solutions with the same polymer concentration ( $c_p = 5\% \text{ w/w}$ ) and neutralized in a coagulation bath of NaOH 1M: Knaul and Creber<sup>240</sup> measured a value of  $1.41 \times 10^{-6} \text{ m/s}^{1/2}$  for a chitosan of  $M_w = 1.14 \times 10^5 \text{ g/mol}$  and  $\text{DA} = 15.1\%$ , whereas El-Tahlawy and Hudson<sup>243</sup> reported a value close to  $1.53 \times 10^{-4} \text{ m/s}^{1/2}$  for a chitosan of  $M_v = 7.6 \times 10^5 \text{ g/mol}$  and  $\text{DA} = 2.3\%$ .

Figure 12 also displays that the polymer concentration ( $c_p$ ) impacts on the  $\varepsilon/\sqrt{t}$  parameter value. According to the literature, the effect of  $c_p$  on the  $\varepsilon/\sqrt{t}$  does not always follows a predictable pattern.<sup>264</sup> For instance, it has been reported<sup>268</sup> that an increase in  $c_p$  yields an increase in  $\varepsilon/\sqrt{t}$  because the polymer solution at high  $c_p$  is close to the gel in terms of entanglements and hydrophobic context. In such case, the effect of viscosity

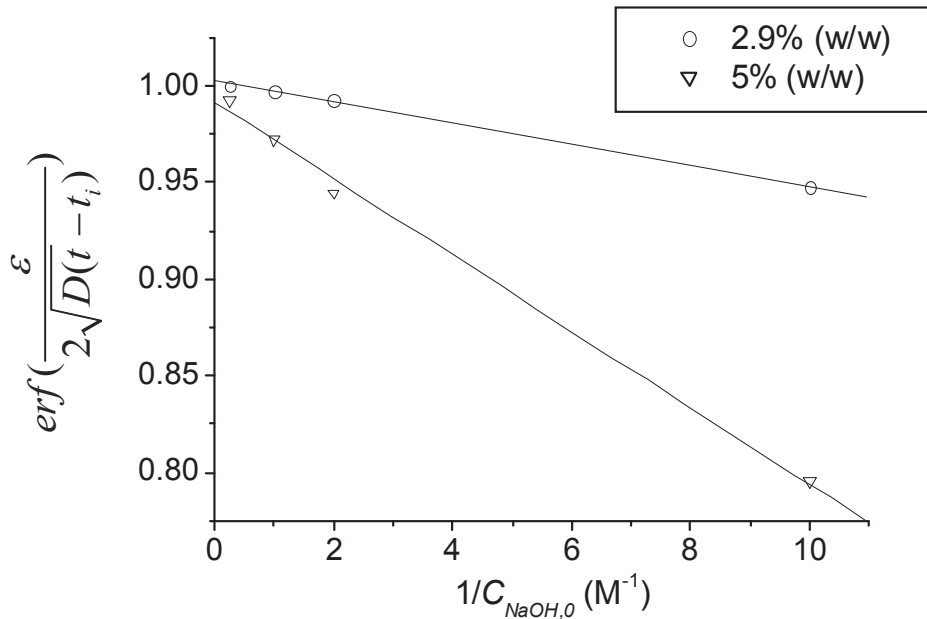
show no significant influence on the  $\varepsilon/\sqrt{t}$  values.<sup>268</sup> In this work, from the results presented on Figure 12,  $\varepsilon/\sqrt{t}$  decreased with the  $c_p$  increase. This behavior can be attributed to the higher number of protonated amine groups ( $\text{NH}_3^+$ ) of chitosan that require to be neutralized.<sup>207</sup> A higher amount of base is thus necessary to trigger coagulation in the dope.



**Figure 12.** Apparent coagulation rate ( $\varepsilon/\sqrt{t}$ ) as a function of coagulation bath concentration for two chitosan dope concentrations (2.9 and 5% w/w). Experimental data are compared with results reported in the literature.<sup>240, 243</sup>

Additionally, all the experimental results were subsequently modelled. The values of diffusion coefficient ( $D$ ) and critical coagulation concentration ( $C_\varepsilon$ ) were estimated for the each chitosan dope from eq 2 by adjusting the values of  $D$  until the better linear dependence of  $\text{erf}(\varepsilon/\sqrt{2D(t-t_i)})$  vs.  $1/C_{NaOH}$  is obtained, using the least square criterion. The value of  $C_\varepsilon$  was calculated from the slope of the linear plot, as shown in Figure 13. The resulting values for parameter  $D$  and  $C_\varepsilon$  are presented in Table 1. As expected, we observed that  $D$  decreases with the dope concentration increase. In addition, the diffusion of NaOH solution into the chitosan dopes was lower in comparison with the individual ions of  $\text{OH}^-$  and  $\text{Na}^+$  diffusing into water at 25 °C:  $5.29 \times$

$10^{-9}$  and  $1.33 \times 10^{-9}$   $\text{m}^2/\text{s}$ , respectively.<sup>295</sup> Nevertheless, our results fall into the order of magnitude of diffusion coefficient usually observed for polymeric solutions, i.e.,  $10^{-10} \sim 10^{-11}$   $\text{m}^2/\text{s}$ . For instance, a comparable  $D$  value ( $5.1 \times 10^{-10}$   $\text{m}^2/\text{s}$ ) was observed for caffeine diffusing into chitosan gels cross-linked with glyoxal,<sup>296</sup> but lower  $D$  values for diffusing dextran macromolecules of variable molecular weight into the non-cross-linked chitosan solutions and glyoxal cross-linked chitosan gels (from  $3.3 \times 10^{-14}$  up to  $1 \times 10^{-10}$   $\text{m}^2/\text{s}$ ).<sup>296</sup> On the other hand, as shown in Table 1, the critical concentration ( $C_\epsilon$ ) to chitosan coagulation also decreased with the polymer concentration. By expressing the polymer concentration dope in moles of glucosamine residues per litre (M/L), we observed at the gelation point that the neutralization of the formed chitosan gel is not totally accomplished because of the concentration of protonated amino residues at the initial dope solution is higher in comparison with the estimated concentration of neutralized amino groups, determined by  $c_\epsilon$ . The complete neutralization of the chitosan polyelectrolyte gel is certainly achieved during the water washings by the remaining coagulant agent at fiber surface after the removal from the coagulant bath.



**Figure 13.** Regression plot for predicting the diffusion coefficient ( $D$ ) and critical concentration ( $c_\epsilon$ ) by adjusting the eq 2.

**Table 1.** Approximate values of diffusion coefficient ( $D$ ) and the critical coagulant concentration ( $c_\epsilon$ ).

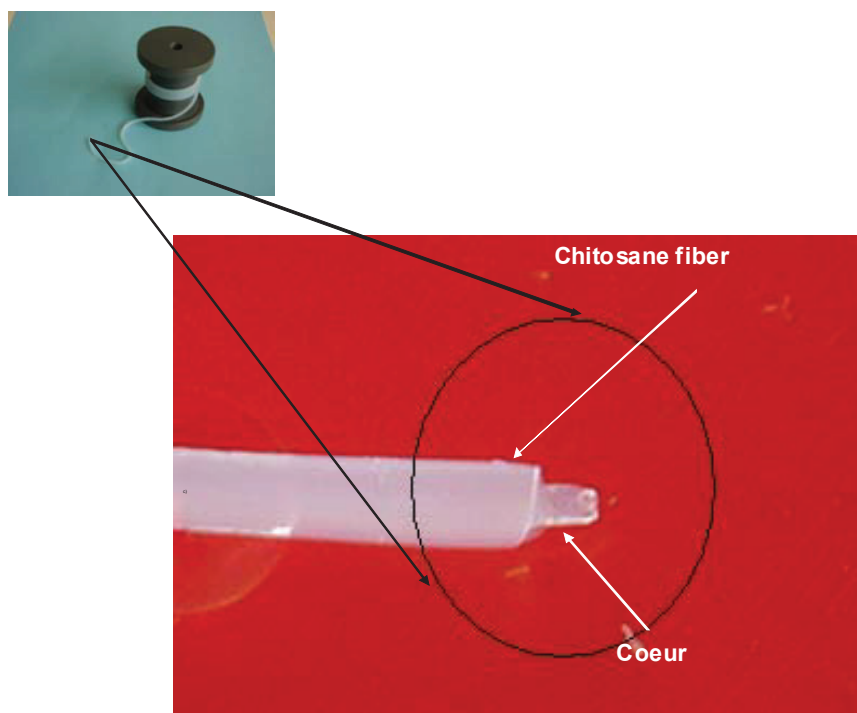
$c_p$ (% w/w)	$c_p$ (M/L)	$D$ ( $\text{m}^2/\text{s}$ )	$c_\epsilon$ (M)
---------------	-------------	-------------------------------	------------------

2.9	0.16	$5.9 \times 10^{-10}$	$8 \times 10^{-3}$
5	0.3	$7.4 \times 10^{-10}$	$1.4 \times 10^{-2}$

In summary, the polymer ( $c_p$ ) and coagulant concentration showed to have a complex influence on the kinetics of coagulation process. The coagulant concentration plays the most predominant role in the coagulation rate ( $\varepsilon/\sqrt{t}$ ) and the induction time. The role of the  $c_p$  is also significant on the kinetics of coagulation; as the kinetics of coagulation is reduced at high  $c_p$  values. Coming back to the hollow fiber processing, it was observed that at low  $\varepsilon/\sqrt{t}$  values, the kinetics of coagulation could be easily interrupted by water washings; whereas at high  $\varepsilon/\sqrt{t}$  values, the kinetics of membrane formation is so high that the interruption of the coagulation process is difficult or impossible. Therefore, the most suitable coagulant conditions for internal wall formation by the interrupted wet-spinning resulted from the combination of rather dilute coagulant baths and concentrated polymer solutions. In the present work, a solution of NaOH 0.1 M and chitosan dope of  $c_p = 5\%$  (w/w) with a viscosity of 23000 Pa.s could be easily used for the elaboration of chitosan hollow fibers by the interrupted wet-spinning route.

**3. Strategies for formation of chitosan hollow fibers in the interrupted wet-spinning.** The interrupted wet-spinning method consists in interrupting the coagulation process in a continuous mode, as schematized in Figure 1. A degassed chitosan dope of high polymer concentration ( $c_p = 5\%$  w/w) was extruded ( $Q = 35.4$  mL/h) to form macrofiber that was firstly poured into the coagulation bath (NaOH 0.1 M). In the coagulation reactor, the extruded macrofiber passes through a mobile roller that could be positioned at different distances in the reactor to provided baths of different length, and then baths of different times of coagulation ( $t_c$ ). According to the kinetics plots shown in Figure 7, the membrane thickness was determined by the time spent in the coagulation bath ( $t_c$ ). After  $t_c$ , the coagulation process was interrupted by drawing out the macrofiber from the coagulation bath to the water bath through several rollers. As discussed in the previous section, hollow fiber could be obtained directly when the coagulation process could be stopped, i.e., only at low coagulation rates. The internal diameter size ( $d_{int}$ ) of the macrofibers could be varied by adjusting the membrane thickness since the value of external diameter  $d_{ext}$  of the macrofiber is kept constant (Figure 5). Nevertheless, the  $d_{int}$  the chitosan macrofibers is limited to about 200  $\mu\text{m}$ . As

the periphery membrane approaches the center, the interruption of coagulation could not be achieved at the last stages of the fiber formation process due to the fast coagulation rate and the NaOH that is present in the outer membrane acting as a base reservoir, in spite of the washing effect. Thus, as a general trend, the interruption at high coagulation rates could not be achieved because the kinetics of coagulation is too high: after interruption of coagulation in the wet-spinning in such conditions, an internal membrane was formed together with a gel core (see Figure 9). The formation of chitosan hollow fibers thus implied the elimination of the coagulated or uncoagulated core. Two strategies could be applied for this purpose: (i) the liquid core draining<sup>242, 297</sup> or (ii) mechanical core extraction. The draining process consists in evacuating the liquid core by different fluids, like compressed air or high pressure water. Nevertheless, these methods require the use of an annular spinneret thus, the core draining method remains as a relatively complex technological solution. In the present work, we propose the solidification of the remaining uncoagulated solution at fiber core. This was possible by transporting, always in a continuous mode, the partial coagulated macrofiber into a second coagulation bath to solidify the liquid core. Higher coagulant concentrations were used (e.g., NaOH 1 M) in order to contract the core gel, and the consequently induce a separation from the outer membrane gel. When the gel core is formed after the interrupted neutralization process at high coagulation rates, the separation between the two gels of the microfiber can also be achieved. Supplementary water washing baths were applied to eliminate the coagulant excess. Finally, the solid core was removed manually from the fiber to obtain hollow fibers up to about 30cm length. Figure 12 shows the physical aspect of a chitosan fiber obtained by the wet spinning method. In the present experimental conditions, the hollow fibers present a  $d_{\text{ext}}$  of around 2 mm and a variable internal diameter ( $d_{\text{int}}$ ) ranging from 1.5mm to 200  $\mu\text{m}$ .



**Figure 14.** Physical aspect of chitosan fibers with a periphery membrane gel and a gel core obtained by the interrupted wet-spinning process. The elimination of the solid core leads the formation of a hollow chitosan fiber.

## Conclusion

The development of the innovative method for the hollow chitosan formation was based on the control of the processing and coagulation parameters for fiber formation process by the wet-spinning technique. By the study of the influence of some processing parameters on the chitosan fiber dimensions, we found that the fiber formation strongly depends on the rheological behavior of the chitosan dope, but also on the coagulation conditions, determined in this case by the dope and coagulant concentration. As consequence, the die-swell phenomenon observed at the spinneret exit during the chitosan dope extrusion could not be modelled by the classical rheological equations (Tanner's model). On the other hand, we demonstrated that the dope and coagulant concentration are the major physico-chemical parameters determining the kinetics of chitosan coagulation. Based on this kinetic study, we determined that the optimal conditions for a controlled coagulation are higher dopes concentrations and lower coagulant solutions. Thus, under controlled coagulation conditions, the interrupted wet-spinning method implies a partial neutralization of a liquid chitosan macrofiber by stopping the coagulation step by water washings to finally form an outer membrane gel

and liquid core. Hollow chitosan fibers were finally obtained by removing the core. The versatility of this new wet-spinning method yields on the fact that the internal diameter of hollow fibers is not pre-determined by an annular spinneret of fixed geometry. Furthermore, this method could be applied to different natural polymers, as alginates, xanthans, carboximethyl cellulose. In a future publication, we will demonstrate how the concept of interrupted coagulation in the wet-spinning method could be extended for the elaboration of hollow multi-membrane chitosan fibers by alternating coagulation and water washings baths.

**Acknowledgements.** The authors gratefully acknowledge financial support of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia of Mexico (CONACyT) and Laboratoire des Matériaux Polymères et Biomatériaux (IMP/LMPB). It is a pleasure to thank Dr. HDR René Fulchiron (IMP/LMPB UCB Lyon France) for useful comments concerning the rheological modelling of the swelling effect in polymer solutions.





## Conclusion

L'étude présentée ci-dessus a permis de mettre en évidence le rôle des différents paramètres de mise en œuvre (concentration du collodion, débit d'extrusion et concentration du bain coagulant) dans le procédé de filage du chitosane par voie humide. Parmi les différents paramètres étudiés, l'influence du débit d'extrusion en relation avec la concentration du collodion et celle de la concentration du bain coagulant ont été particulièrement intéressantes à analyser.

En réalisant une étude rhéologique, nous avons pu constater que le diamètre externe de la fibre ne peut pas être prédit à partir du comportement rhéologique typique des solutions Newtoniennes, c'est-à-dire le gonflement du collodion en sortie filière. En réalité, le contrôle de la géométrie des fibres à partir de l'extrusion d'un collodion est déterminé par l'intervention de plusieurs paramètres physico-chimiques et de mise en œuvre, tels que la concentration en polymère du collodion, la concentration du bain coagulant, les interactions entre chaînes, etc. Par exemple, à concentrations élevées en polymère, on peut obtenir une fibre de plus gros calibre que le diamètre de la filière (par gonflement en sortie de filière); tandis qu'à hautes concentrations d'agent coagulant (ex : 4 ou 7 M), le calibre de la fibre est comparable au diamètre de la filière et dans certains cas inférieur.

D'autre part, ce travail a permis de comprendre l'influence des paramètres de coagulation sur le plan plus fondamental du procédé de filage du chitosane par voie humide. Pour cela, nous avons réalisé une étude de la cinétique de neutralisation basée sur le modèle de diffusion linéaire semi-infini<sup>263, 264</sup> de l'agent coagulant dans le collodion de chitosane au cours d'un filage en continu. Les résultats de l'étude montrent que la concentration de la base et la concentration du collodion sont les facteurs déterminants de la cinétique de coagulation.

Basées sur cette analyse physico-chimique, nous avons pu développer la stratégie pour la formation des fibres creuses mono-membranaires qui a consisté à se placer dans des conditions de cinétique de coagulation faible pour ensuite interrompre le procédé de coagulation par bains de lavage à l'eau, et enfin former une membrane extérieure et un

cœur liquide qui est finalement éliminé soit par lavages à l'eau soit par gélification du cœur et puis élimination.

Bien que nous ayons obtenu dans cette étude des résultats satisfaisants avec le modèle de diffusion linéaire semi-infini<sup>263, 264</sup> pour l'analyse de la cinétique de coagulation, il nous semblerait intéressant, dans l'avenir, d'explorer ce phénomène physico-chimique avec une expression mathématique plus adaptée mais plus complexe, comme le modèle de diffusion cylindrique semi-infini. L'information obtenue avec cette approche permettrait d'estimer de façon plus réaliste la cinétique de coagulation, surtout dans les dernières étapes (au centre de la fibre), et ainsi de mieux maîtriser la formation des fibres creuses de petit diamètre interne.

Le procédé de filage par voie humide par coagulation interrompue constituera sans doute l'outil principal pour l'élaboration de fibres creuses multi-membranaires. Les stratégies et les expériences réalisées à ce sujet seront présentées dans la « Section expérimentale 3 » de ce manuscrit.

Cependant, cette étude d'élaboration des fibres creuses peut ne pas être considérée comme une simple étape intermédiaire pour la formation des fibres creuses multi-membranaires. Il peut être envisagé d'utiliser les fibres creuses de chitosane pour la reconstruction de connexions nerveuses ou comme membranes de séparation des molécules d'intérêt biologiques (ex : protéines).

Même si le concept de coagulation interrompue a été mis au point dans le cas du chitosane, celui-ci pourrait être adapté à d'autres polysaccharides qui forment des gels physiques à partir des solutions aqueuses (ex : alginates, pectines, CMC).

Dans la section suivante, nous verrons que la concentration en polymère, la nature et la concentration de la base sont des paramètres de coagulation importants permettant de contrôler la morphologie des gels physiques de chitosane.

## 2. Organisation à l'échelle micrométrique des hydrogels physiques de chitosane

### 2.1 Contexte expérimental

La relation structure – propriété fonctionnelle des tissus vivants est un aspect essentiel à considérer lors de l'élaboration d'un biomatériau pour l'ingénierie tissulaire. Nous rappelons que notre finalité n'est pas de former un matériau bio-mimétique, mais de former un matériau bio-inspiré dont la structure imite partiellement celle des tissus vivants pour induire une réponse favorable. A ce sujet, des études relativement récentes<sup>26, 27, 213</sup> ont démontré que la structure du matériau leurre permet de régir les interactions avec le milieu vivant à différentes échelles. Il s'avère donc nécessaire d'étudier la relation « procédé d'élaboration – structure » du biomatériau leurre afin de mieux contrôler leurs propriétés physiques et biologiques des matériaux bio-inspirés leurres comme les macrofibres de chitosane.

Dans cette partie expérimentale, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de différents paramètres physico-chimiques de mise en œuvre sur la morphologie des hydrogels physiques de chitosane à l'échelle du micron. Pour cela, des mesures de diffusion de lumière aux petits angles ont été effectuées sur des hydrogels préparés sur une large gamme de conditions expérimentales de neutralisation. Les paramètres de coagulation considérés pour cette étude ont été la viscosité et la composition du collodion, la nature et la concentration du bain coagulant et la méthodologie de gélification. Les résultats de morphologie sont corroborés par des observations en microscopie optique et électronique.

La méthodologie générale suivie pour l'étude morphologique a consisté à analyser le phénomène de neutralisation *in situ* directement dans la cellule de diffusion de lumière (en quartz) contenant soit une solution de chitosane (méthode de gélification directe d'une solution ou gel<sup>30</sup>) soit un gel de chitosane non-neutralisé (méthode de gélification hydroalcoolique<sup>28, 29</sup>). La neutralisation est effectuée par l'arrivée de l'agent coagulant (NaOH ou gaz ammoniac) par le haut de la cellule. Pour les expérimentations, nous

avons utilisé une cellule de trajet optique court (ex : 2 mm) afin d'éviter la saturation du signal.

En partant de l'analyse morphologique *in situ*, nous avons cherché à proposer l'influence de la structure initiale de la solution sur la microstructure des hydrogels physiques issus de ces solutions.

## **2.2 Publication : Micron range morphology of chitosan physical hydrogels**

Les expériences réalisées ainsi que les résultats obtenus de ce deuxième volet de notre recherche a fait l'objet d'une publication que nous présentons ci-dessous avec une mise en page similaire au reste du manuscrit.

# Micron range morphology of chitosan physical hydrogels

Rocio Rivas-Araiza<sup>1</sup>, Pierre Alcouffe<sup>1</sup>, Cyrille Rochas<sup>2,\*</sup>, Alexandra Montembault<sup>1</sup>,  
Laurent David<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lyon, F-69361, Lyon, France; CNRS, UMR 5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, F-69622, Villeurbanne, France; Université Claude Bernard Lyon 1, F-69622, Villeurbanne, France.

<sup>2</sup>Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS, UPR 5301), Université Joseph Fourier, Boîte Postale 53, F-38041 Grenoble cedex, France.

\*Corresponding authors:

Laurent DAVID

CNRS UMR 5223-Université Lyon 1; Ingénierie des Matériaux Polymères - Site Université Claude Bernard Lyon 1, bât. ISTIL, Domaine scientifique de la Doua, 15 Boulevard A. Latarjet, 69622 Villeurbanne Cedex.

E-mail : [laurent.david@univ-lyon1.fr](mailto:laurent.david@univ-lyon1.fr) and [cyrille.rochas@cermav.cnrs.fr](mailto:cyrille.rochas@cermav.cnrs.fr)

## Abstract

Chitosan physical hydrogels are potential biomaterials for several biomedical applications, such as wound healing, tissue repair, and drug delivery. Controlling the microstructural organization of chitosan gels is one of the keys for monitoring the physical, mechanical and biological properties. As a result, the main objective of the present work was to explore the microstructural organization of chitosan hydrogels in relation with the processing conditions of gelation. For this purpose, different processing routes for gelation were studied, i.e., chitosan solution neutralization of an aqueous or hydroalcoholic solution, and neutralization of an alco-gel. Overall, the resulting morphology after processing was determined by the viscosity of the medium during neutralization, and the nature and concentration of the base. The effect of these processing parameters on the morphology was evaluated mainly through Small Angle Light Scattering (SALS) measurements including *in situ* measurements during chitosan gelation. As a result, we

report different bulk microstructures consisting in 200 – 400 nm aggregates (primary particles) agglomerated into micron range clusters or arranged into more organized structures, i.e., forming micro-channels (4 – 6  $\mu\text{m}$ ). We thus established a qualitative and quantitative relation between supramolecular morphology and gelation conditions of chitosan hydrogels.

## Introduction

Chitosan belongs to the family of glycosaminoglycans (GAGs), and exhibits notable biological properties (e.g., biocompatibility<sup>31-34</sup>, bioactivity<sup>37, 38</sup> and biodegradability<sup>35, 36</sup>) that promotes the use of this polymer for different biomedical applications in tissue engineering<sup>26,213</sup>. Chitosan is obtained from the N-deacetylation of chitin. Both polymers present a common chemical structure, i.e., they are linear copolymers of  $\beta(1\rightarrow4)$  linked D-glucosamine (GlcN) and N-acetyl-glucosamine (GlcNAc). The molar fraction of the GlcNAc residues is referred to as degree of acetylation (DA), and it is one of the major parameters in determining the physicochemical<sup>113-115</sup> and biological<sup>116</sup> properties of chitosan.

Chitosan is soluble in acidic aqueous solutions thanks to the protonation of the amine groups of GlcN residues that prevents the establishment of inter-chain interactions (hydrophobic junctions and H-bonding). In solution, the behavior<sup>113, 114</sup> and the organization<sup>142</sup> of chitosan chains are influenced by the combination of two representative groups of factors: (i) structural parameters of the polymer (DA, distribution of the repeating units along the chain, weight-average degree of polymerization and polydispersity index) and (ii) environmental parameters (pH, ionic strength, dielectric constant of the solvent and temperature). Several works<sup>69, 142, 149, 298</sup> studying the behavior of chitosan chains in dilute and semi-dilute regime evidenced the presence of supramolecular structures which vary from aggregates to nanoparticles, depending on the polymer concentration and DA. It has been additionally reported<sup>143, 207, 299</sup> that the morphologies of chitosan in the solid and gel states are inherited by the structural organization of the initial chitosan solution. On other hand, at the macroscopic scale, the main processing parameters governing the kinetics of aqueous chitosan hydrogels formation are: the polymer concentration ( $c_p$ )<sup>30, 300</sup> and the nature and concentration of the coagulation bath. In turn, it is suspected that the kinetics of gelation should impact on the structural organization of chitosan physical

hydrogels.

Chitosan physical hydrogels can be obtained by acting on the balance between hydrophobic and hydrophilic interactions, without addition of any cross-linking agent.<sup>29</sup> During neutralization, as the pH increases close to the apparent pKa of the amine groups, the apparent charge density of the chitosan chains decreases and the chains become more flexible (the electrostatic part of the persistence length vanishes); the balance of hydrophobic and hydrophilic interactions is changed up to a critical point that induces chitosan gelation.<sup>30</sup> This relative easy gelation process makes of chitosan a versatile natural polymer for the processing of materials in various macroscopic shapes, e.g., tubes, films, fibres and so on. Nevertheless, the control of the supramolecular organization of chitosan gels is more subtle.

In the elaboration of chitosan physical hydrogels, Clayer-Montembault et al.<sup>212</sup> observed, through a light scattering study, the formation of a periodic organization after gelation of chitosan aqueous solutions by gaseous ammonia into a quartz cell. The authors suggested that this phenomenon corresponded to the effect of heterogeneous diffusion of ammonia into the highly viscous solution; however, further detailed explanations have not been provided yet. Other authors reported and modelled the formation of capillary structures in alginate gels<sup>301-304</sup>. Gelation was obtained by diffusion of copper ions ( $\text{Cu}^{+2}$ ) within an aqueous solution of sodium alginate. The periodic capillary organization with a characteristic repeat distance of the order of 15  $\mu\text{m}$  resulted from the formation of an interphase between the gel and the solution, in which a periodic flow regime occurred. The main physical parameters governing the formation and size of capillary tubes within the gels were the viscosity of the initial alginate solution and the diffusion coefficient of the coagulation agent. A similar behavior was also observed in Na-cellulose xanthate gels<sup>305</sup> by the diffusion of counter ions (Ti, Ni, Cd or Zn). Several applications of these capillary gels have been reported in the case of alginate systems<sup>306-308</sup>. Nevertheless, the use of copper ions could be a constraint condition for biological applications.

In this work, we aimed to study the effect of different processing parameters on the gelation process in order to vary the microstructural organization of chitosan gels. For this purpose, different experimental conditions were studied. We investigated the effect of the polymer concentration ( $c_p$ ) and the composition of the chitosan solution. These results could be analyzed through the effect of the viscosity of the solution impacting the morphology obtained after neutralization. As expected, the nature and concentration of

the coagulation agent were also shown to impact the morphology of the hydrogels. The evolution of the structure was studied through Small Angle Light Scattering (SALS) in combination with SEM, Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) and Cryogenic Scanning Electron Microscopy (cryo-SEM).

## Experimental section

**Chitosan purification.** The initial chitosan produced from squid pens was supplied by from Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. (India). To obtain a high-purity material, chitosan was dissolved at 0.5% (w/v) in an acetic acid aqueous solution with the necessary amount of acid to achieve the stoichiometric protonation of the  $-NH_2$  sites. After complete dissolution, the chitosan solution was consecutively filtered through Millipore membranes with a pore size of 3, 1.2, 0.8 and 0.45  $\mu m$ . Then, dilute ammonia was added to the filtered chitosan solution in order to fully precipitate the polymer. Finally, the precipitate was repeatedly rinsed with distilled deionised water until a neutral pH was achieved, then centrifuged and lyophilized.

**$^1H$  nuclear magnetic resonance spectroscopy.** The degree of acetylation (DA) of chitosan was calculated from  $^1H$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and it was found to be close to 1.5%. 10 mg of purified chitosan were dissolved in 1 mL of  $D_2O$  containing 0.061 mM of HCl. Spectra were recorded on a Bruker ALS 300 spectrometer (300 MHz) at 25  $^{\circ}C$ . The DA was deduced from the ratio of the area of the methyl protons of the N-acetylglucosamine residues to that of all of the  $H_2$  to  $H_6$  protons of both glucosamine and N-acetylglucosamine residues.<sup>111</sup>

**Size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering.** The weight-average molecular weight of chitosan and polydispersity index were determined by size exclusion chromatography (SEC) coupled on line with a differential refractometer (Waters R410, from Waters-Millipore) and a multi-angle laser-light scattering detector operating at 632.8 nm (Wyatt Dawn DSP). The refraction index increment  $dn/dc$  depends on the DA as determined in previous studies<sup>113</sup>. For the chitosan samples used in this study,  $dn/dc$  is close to 0.198 mL/mg. A 0.15 M ammonium acetate/0.2 M acetic acid buffer (pH = 4.5) was used as eluent at a flow rate of 0.5 mL/min. The polymer solutions were prepared by dissolving 1 mg of polymer in 1 mL of buffer, and then filtered through a Millipore membrane with a pore size of 0.45  $\mu m$  before injection of 100  $\mu L$ .



**Preparation of chitosan samples of low  $M_w$ .** Depolymerisation of chitosan was performed by a nitrous acid deamination<sup>309</sup>. 1 mg of purified chitosan ( $M_w = 515\ 000$  g/mol,  $I_p = 1.6$ ) were dissolved in 1 mL of buffer (0.15 M ammonium acetate/0.2 M acetic acid, pH = 4.5). Then, 2 mL of freshly prepared aqueous solution of  $\text{NaNO}_2$  (1 mg/mL) was added to 38 mL of the chitosan aqueous solution. The reaction mixture was stirred during 2 h at room temperature. After addition of aqueous ammonia, the resulting precipitate was washed repeatedly with distilled deionised water until a neutral pH was reached, then centrifuged and lyophilized. The  $M_w$  of the final chitosan sample was 200 000 g/mol with an  $I_p$  of 1.7. Characteristics of the different chitosan samples used in this work are given in Table 1.

**Table 1.** Characteristics of the chitosan samples used in this work: weight-average molecular weight ( $M_w$ ), polydispersity index ( $I_p$ ) and degree of acetylation (DA).

<b><math>M_w</math> (g/mol)</b>	<b><math>I_p</math></b>	<b>DA (%)</b>
515000 ± 51000	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2
200000 ± 20000	1.7 ± 0.3	1.4 ± 0.2
540000 ± 54000	1.6 ± 0.3	2.6 ± 0.3
465000 ± 47000	1.8 ± 0.4	36.5 ± 1.8

**Preparation of chitosan hydrogels.** Chitosan aqueous solutions with concentrations ranging from 0.01 to 1% (w/w) were prepared by dissolving the purified chitosan in an acetic acid aqueous solution with a stoichiometric amount to achieve  $\text{NH}_2$  protonation. The different coagulation agents for chitosan gelation were gaseous ammonia and aqueous solutions of sodium hydroxide (NaOH) of 0.1 and 4 M. In this study, different gels were prepared depending on the gelation route: (i) '*solution neutralization*'<sup>30</sup> of aqueous or hydroalcoholic chitosan solutions, and (ii) neutralization of alco-gels prepared by the '*alcoholic gelation route*'<sup>29</sup>.

In the *solution neutralization route*, the chitosan solutions were poured into an optical quartz cell (Hellma ref. 220-QS.2, height = 40 mm, width = 9.5 mm and light path = 2 mm), and without any prior treatment, the solutions were neutralized by direct contact with the alkaline agent (gaseous ammonia or sodium hydroxide). In the case of

the sodium hydroxide agent, the alkaline solution was initially dropped slowly into the quartz cell. And by means of a peristaltic pump, this solution at cell surface was constantly renewed to keep constant NaOH concentration. In turn, for gaseous ammonia neutralization, the cell was hermetically connected to a bottle containing a stirred aqueous ammonia solution. The ammonia flow is determined by several experimental conditions (temperature, stirring speed, volume and initial concentration of liquid ammonia, tube size, etc). In this work, gaseous ammonia was produced at room temperature by strong stirring 125 mL of concentrated aqueous ammonia solution (28 – 30% (w/w), Acros Organique), and then conducted to the cell through a tube of 50 cm of length and 5 mm of diameter. The resulting gaseous ammonia flow was initially  $1.4 \times 10^{-3}$  M/h, determined by titration of an aqueous solution in the same experimental conditions.

In the *alcoholic gelation route*, a homogeneous mixture of a chitosan aqueous solution and a viscous alcohol (50/50 (w/w)), 1,2–propanediol or glycerol, was poured into the optical quartz cell (Hellma 220-QS.5, height = 40 mm, width = 9.5 mm and light path = 5 mm), and then let in an oven at 50 °C until total water evaporation (ca. 2 weeks) in order to form an alco-gel.<sup>141</sup> After the gel formation, the alco-gel was neutralized by one of the two alkaline agents mentioned above.

**Rheological measurements.** The steady viscosity of chitosan solutions was measured thanks to a stress-controlled rheometer AR 2000 (TA Instruments), with a coaxial “cylinder-cylinder” geometry. The measurements were carried out at 22 °C with shear rates ranging from 0.001 to 1000 s<sup>-1</sup>. The value of the viscosity  $\eta_0$  was evaluated at low shear rates from the extrapolated Newtonian plateau.

**Small Angle Laser Light scattering.** SALS measurements were performed by using an experimental set-up equipped with a helium-neon laser (Spectra-Physic, USA) working at a wavelength of 633 nm with a beam cross-section close to 1 mm<sup>2</sup>. The set-up included a Fresnel lens with 13 cm focal length and a beam stop fixed on the Fresnel length. The resulting signal scattered by the sample was captured with a two-dimensional detector (CDD camera Micam VHR 1000). 1D profiles are obtained after radial averaging with a home made software. The gelation process was followed *in situ* by capturing images at different periods at a fixed point in the optical cell. For these measurements, the cell was positioned in order to locate the laser beam at c.a. 10 mm below the surface solution to ensure a homogeneous structural zone by avoiding the

concave meniscus influence together with the kinetics of gelation occurring within a few minutes.

**Scanning Electron Microscopy (SEM).** The morphology of chitosan gels were examined using a Scanning Electron Microscope (SEM) from Hitachi (S800) at 15 kV. Small pieces of hydrogels of about 4 mm<sup>2</sup> were placed between two copper foils of approximately the same size than the sample, and directly immersed in slush nitrogen. Before the microscopy observations, the frozen gel samples were dried in the microscope vacuum chamber by sublimation of the residual ice formed on the gel surface.

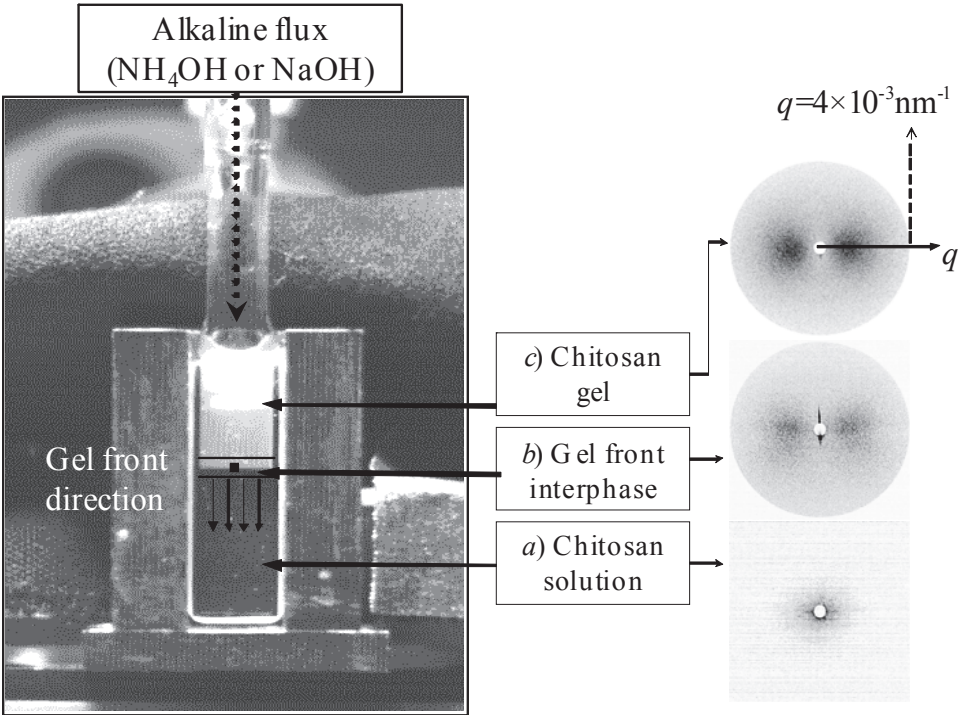
**Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM).** Observations were performed with an Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM XL 30 FEG, FEI Company, USA) in a secondary electron emission mode. The samples were observed using an incident electron beam at 15 kV, using wet mode at 2 °C and 6 Torr.

**Cryo-Scanning Electron Microscopy (Cryo-SEM).** Small pieces of hydrogels of about 4 mm<sup>2</sup> were placed between two copper foils of approximately the same size than the sample, and directly immersed in slush nitrogen that was previously prepared under vacuum at a low temperature ( $T = -210$  °C). In these experimental quenching conditions, calefaction and formation of crystalline ice was avoided or limited. This method of sample preparation is the most suitable for hydrogels because water crystallization would induce a large alteration of the gel microstructure. The frozen samples were introduced into the microscope chamber and the residual ice formed on their surface was eliminated by sublimation, i.e., the sample temperature was increased from  $-160$  to  $-80$  °C, followed by a 10 minutes isotherm at  $-80$  °C, under reduced pressure. Finally, hydrogels were cooled again at  $-160$  °C then gold-coated in order to increase their surface conductivity. The samples were observed on a Hitachi S800 Scanning Electron Microscope with a voltage between 5 and 10 kV.

## Results and discussion

***In situ* study of chitosan gelation.** Chitosan physical hydrogels were formed by neutralization of a polyelectrolyte solution or a polyelectrolyte alco-gel. The process of gelation is generated by a sol–gel transition layer, denoted as “gel front” (see Figure 2.1). The gel formation starts at the upper solution surface and the gel front moves downward with time until it reaches the bottom of the cell. By means of Small Angle

Light Scattering (SALS), we studied the structural organization development of chitosan solutions and gels through the sol-gel transition by acquisition of scattering images at different times at a fixed point of the optical cell. Due to the progressive displacement of the gel front from the upper surface down to the bottom of the optical cell, this experiment provided a structural characterization of gel formation in dynamic conditions. We first observed the low scattering response of the solution (Figure 2.1a), the passage of the gel front through the laser beam (Figure 2.1b) and then the evolution of the structure of the gel (Figure 2.1c). When the transition layer between the gel and the solution crossed the incident laser beam, a sharp intense signal was present mainly above the beam stop and then disappeared progressively as the gel front left the laser beam cross-section. In specific neutralization conditions, the deviation of the incident beam at the gel front interface was mainly attributed to a change of refractive index in the interphase between the gel and the chitosan solution with a local variation of polymer concentration from the solution to the gel, as expected from the simulations on alginate systems<sup>302-304</sup>. The driving force for the formation of the transition layer is thus the collapse of the chains from the solution onto the gel that lead to a decrease of polymer concentration in the vicinity of the gel front.



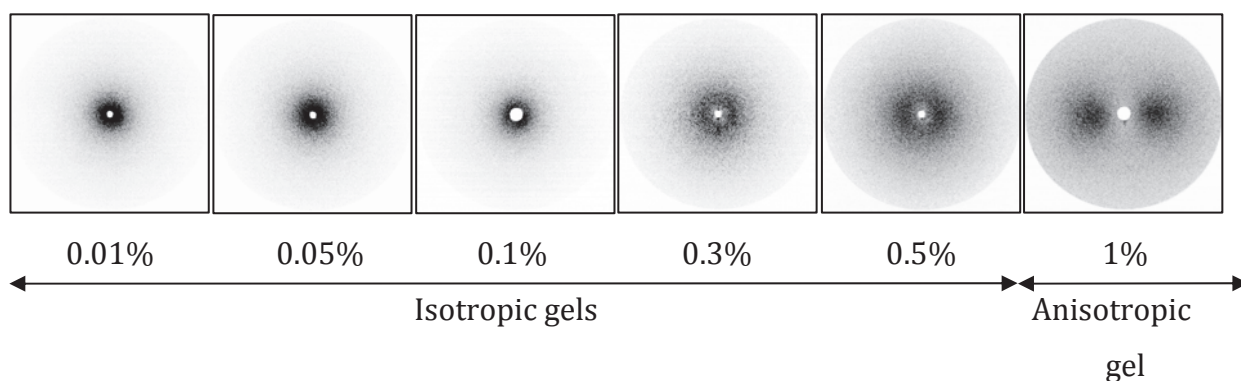
**Figure 2.1** Gelation process in a quartz cell of a chitosan aqueous solution ( $M_w = 515$  000 g/mol,  $I_p = 1.6$ , DA = 1.5% and  $c_p = 1\%$  (w/w)), by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia. The ammonia flux is coming to the cell thanks to a tube

connected to an aqueous ammonia reservoir. Resulting 2D SALS images of: a) a non-neutralized chitosan aqueous solution, b) sol-gel transition at the gel front interphase and c) an anisotropic chitosan aqueous gel.

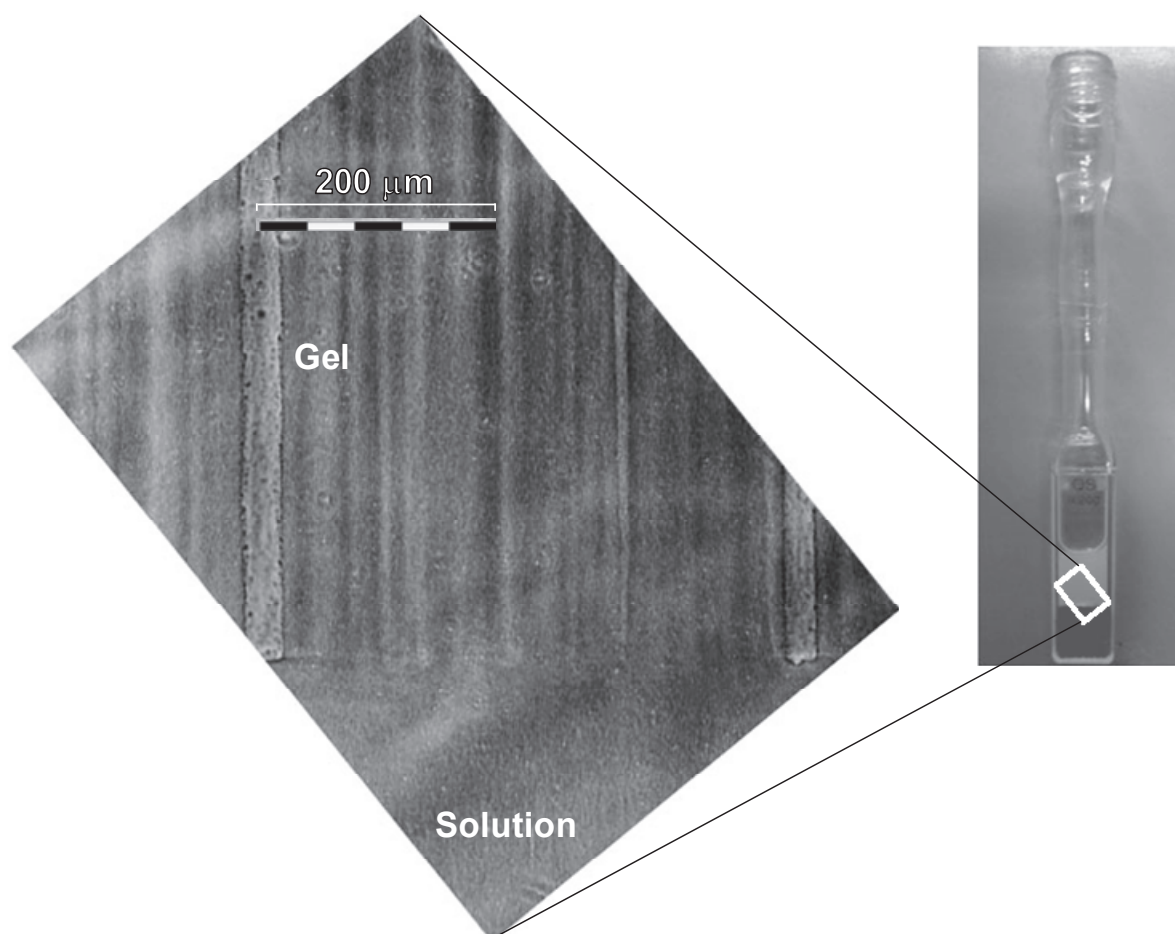
Depending on the gelation conditions, two types of scattering patterns could be obtained in the gels. An example is given by Figure 2.2: isotropic scattering can be evidenced at low polymer concentrations, whereas anisotropic patterns with butterfly wings can be observed at higher polymer concentrations. This of course reveals two structural regimes with isotropic or anisotropic morphology. In the case of anisotropic gels, a well apparent deviation of the incident laser beam occurred transiently when the interface region crossed the beam stop. In the case of isotropic gels, this phenomenon was much reduced. This is in agreement with previous observations on alginates<sup>301-304</sup>, since the formation of the periodic organization of capillary tubes in anisotropic systems is due to streamlines of hydrodynamic convection rolls within the transition layer (contraction layer).

#### **Effect of solution viscosity on the morphology of chitosan physical hydrogels.**

The effect of solution viscosity on the structural organization of the gels was first studied in chitosan aqueous solutions prepared at polymer concentration ( $c_p$ ) ranging from 0.01 to 3% (w/w). The gels were obtained by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia; we observed a structural evolution from isotropic to anisotropic systems as  $c_p$  increases (see Figure 2.2). Hydrogels with an isotropic structural organization were formed from chitosan solutions ranging from 0.01 up to 0.5% (w/w). At higher polymer concentrations, an anisotropic organization with a characteristic butterfly pattern reveals a morphology with a periodicity direction that is perpendicular to the neutralizing flux. A linear morphology is revealed by an optical microscopy observation, as observed in Figure 2.3. This is in agreement with a capillary tube morphology with an orientation of the tubes perpendicular to the gel front, or parallel to the alkaline flux. The crossover polymer concentration of  $c_p = 0.5\%$  (w/w) thus limits the two morphology regimes and could be related to the critical concentration phenomenologically described by Montembault<sup>30</sup> for physicochemical properties of chitosan solutions close to the gel point.



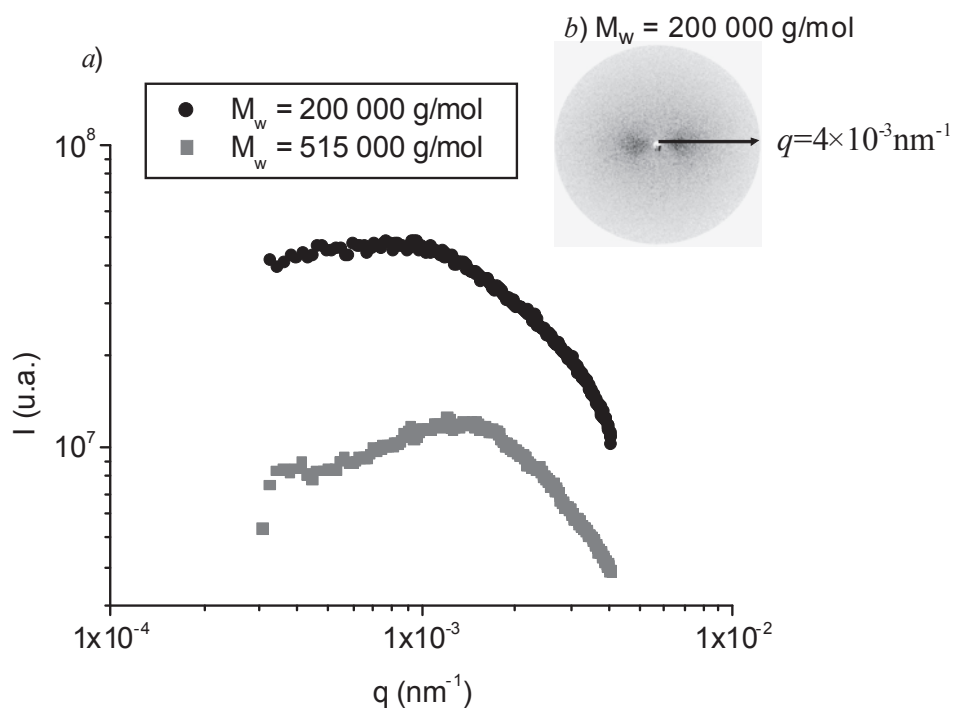
**Figure 2.2** 2D SALS patterns of isotropic and anisotropic aqueous chitosan gels obtained by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia. Gels were prepared from chitosan aqueous solutions ( $M_w = 515\,000$  g/mol,  $I_p = 1.6$  and DA = 1.5%) with concentrations ranging from 0.01 to 1% (w/w).



**Figure 2.3** Optical microscopy (Olympus BX41, 200X) observation of a chitosan gel with capillary tubes morphology. These tubes show an orientation parallel to the alkaline flux. The gel was prepared from a chitosan aqueous solution ( $M_w = 515\,000$

g/mol,  $I_p = 1.6$ , DA = 1.5% and  $c_p = 1.5$  % (w/w)) neutralized with gaseous ammonia. The full graduation bar is 200  $\mu\text{m}$ .

The effect of the viscosity  $\eta_0$  of chitosan aqueous solutions was further studied using two samples of different average molecular weight, at  $c_p = 1\%$  (w/w) and with the same degree of acetylation. The solution viscosity was  $0.7 \pm 0.1$  Pa.s and  $4.1 \pm 0.8$  Pa.s for a molecular weight of 200 000 g/mol and 515 000 g/mol respectively. Chitosan physical hydrogels were prepared from these aqueous solutions by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia. Through SALS measurements, we recognized a similar scattering pattern (see Figures 1 and 4b); however, the morphology of the low molecular weight sample was less anisotropic. To provide a finer comparison, the radially averaged data of both images were compared in Figure 2.4a. We found that the correlation peak of the gel prepared from the sample of lower  $M_w$  was broader and shifted to smaller scattering vector values, implying an increase in the Bragg correlation length ( $\xi \sim 2\pi/q_{\text{max}}$ ) from 4.3 to 6.9  $\mu\text{m}$ . As a conclusion, we deduced that the viscosity is the main parameter acting on the morphology in the investigated experimental conditions. Isotropic morphology (assembly of aggregates) is shown to develop at low solution viscosity; whereas above the critical viscosity around 4 Pa.s, SALS displays anisotropic scattering patterns revealing the capillary morphology. In addition, all gels display a correlation distance  $\xi$ , that is also affected by the solution viscosity, low viscosity yielding larger correlation lengths in both the isotropic and in the anisotropic scattering regimes.

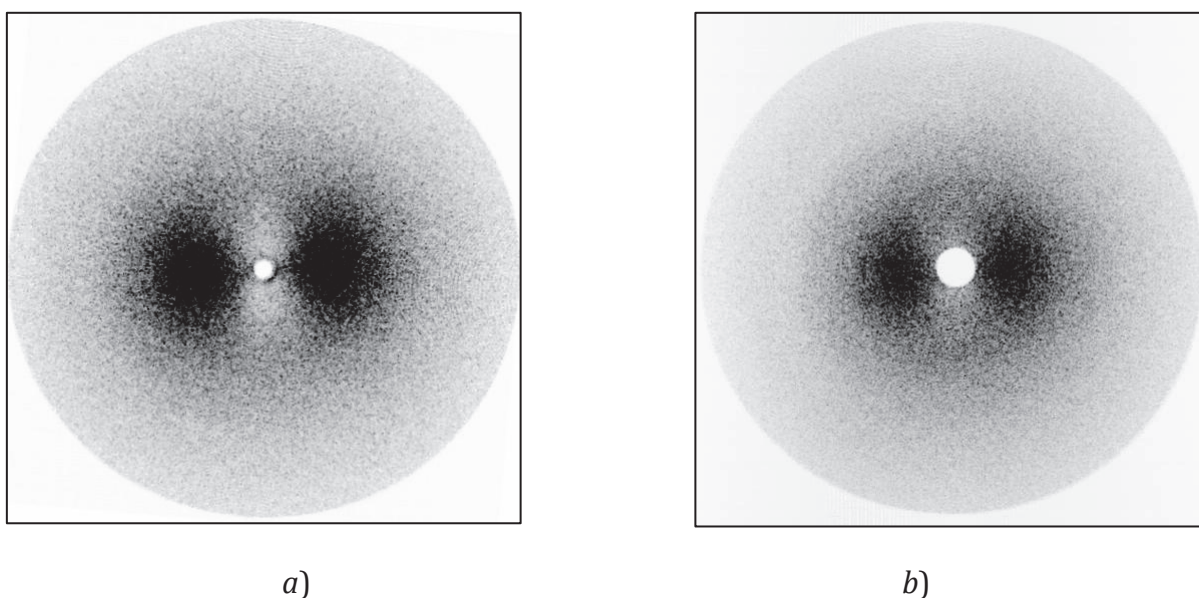


**Figure 2.4** a) Log-log plots of radially averaged data for physical hydrogels prepared from chitosan samples of two molecular weights ( $M_w = 200\,000\text{ g/mol}$ ,  $I_p = 1.7$ ;  $M_w = 515\,000\text{ g/mol}$ ,  $I_p = 1.6$ ), with the same DA (1.5%) and  $c_p$  (1% (w/w)). The gelation of chitosan aqueous solutions was obtained by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia. b) SALS image of a physical hydrogel prepared from a chitosan sample of  $M_w = 200\,000\text{ g/mol}$ .

The viscosity  $\eta_0$  of the chitosan solution at  $c_p = 0.5\%$  (w/w) was also studied by modifying the dope composition. Chitosan hydroalcoholic solutions were then prepared by mixing a 1% (w/w) chitosan aqueous solution and a viscous alcohol, as glycerol or 1,2-propanediol. The viscosity of the hydroalcoholic solution (chitosan–water/1,2–propanediol:  $\eta_0 = 0.9 \pm 0.2\text{ Pa}\cdot\text{s}$ ; chitosan–water/glycerol:  $\eta_0 = 1.1 \pm 0.2\text{ Pa}\cdot\text{s}$ ) was significantly higher than the viscosity of the aqueous solution ( $\eta_0 = 0.31 \pm 0.06\text{ Pa}\cdot\text{s}$ ) by acting on the viscosity of the solvents. In addition, the role of the alcohol is to act on the hydrophilic/hydrophobic balance and favors the formation of hydrophobic interactions between polymer chains and the protonated form of acetic acid.<sup>28</sup> Hydroalcoholic gels from the mixtures chitosan–water–glycerol and chitosan–water–1,2–propanediol were finally obtained by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia. Figure 2.5 displays the SALS images corresponding to these hydroalcoholic gels obtained at  $c_p = 0.5\%$  (w/w). In both 1,2–propanediol and



glycerol hydroalcoholic gels, we found a well defined anisotropic scattering which differed from the rather isotropic pattern observed in chitosan aqueous gels (see Figure 2.2). This result clearly shows that  $c_p$  is not the only factor for the control of the gel morphology. Under the present experimental conditions, the periodic microstructure of anisotropic gels can be obtained from chitosan solutions with high solution viscosity, e.g. above 4 Pa.s. Finally, the effect of the DA on the hydrogels morphology can also be captured from the evolution of the viscosity of the chitosan aqueous solutions, which was shown to decrease with increasing the DA<sup>113</sup>. And consistently, higher DA gels can be characterized with higher correlation lengths<sup>299</sup>.

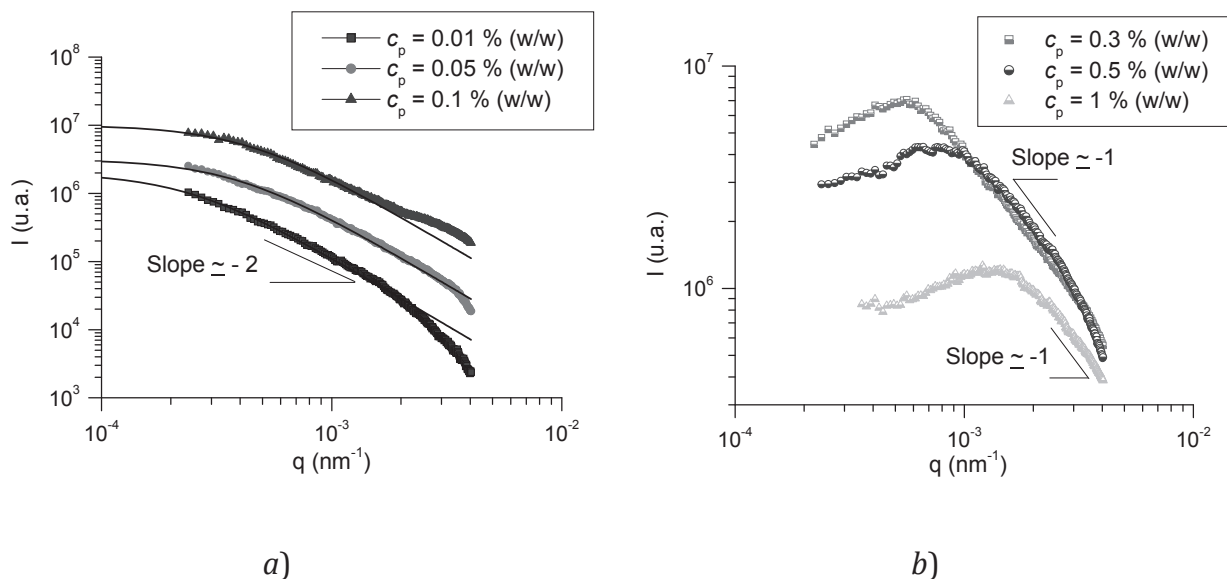


**Figure 2.5** 2D SALS images of chitosan hydroalcoholic gels ( $M_w = 515\,000$  g/mol,  $I_p = 1.6$ , DA = 1.5% and  $c_p = 0.5\%$  (w/w)) obtained by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia (horizontal neutralization front, vertical ammonia flux). The scattering vector  $q$  ranges from 0 up to  $4 \times 10^{-3}$  nm<sup>-1</sup>. The chitosan hydroalcoholic gels were prepared: *a)* from chitosan–water/glycerol solution and *b)* from chitosan–water/1,2-propanediol solution.

**Quantitative study of the microstructural organization.** The microstructure of hydrogels at different  $c_p$  and neutralized with gaseous ammonia was further studied by quantitatively analyzing the radially averaged intensity curves over an azimuthal angle from 0° to 360°. The corresponding scattering images of these gels were presented in Figure 2.2.

Figures 6a and 6b show the averaged intensity curves of the different 1D scattering patterns of the chitosan hydrogels. Intensities deduced from only thin rectangular horizontal selections centred on the beam stop give very similar results (data not shown). In the  $c_p$  - range from 0.01 to 0.1% (w/w), isotropic gels were obtained, even at low concentrations (see Figure 2.6a). In contrast, for concentrations larger than 0.3% (w/w), periodic systems with a correlation peak were observed: in isotropic gels (0.3% (w/w)  $< c_p < 0.5%$  (w/w), see Figure 2.6b) and in anisotropic gels ( $c_p > 0.5%$  (w/w), see Figure 2.6b).

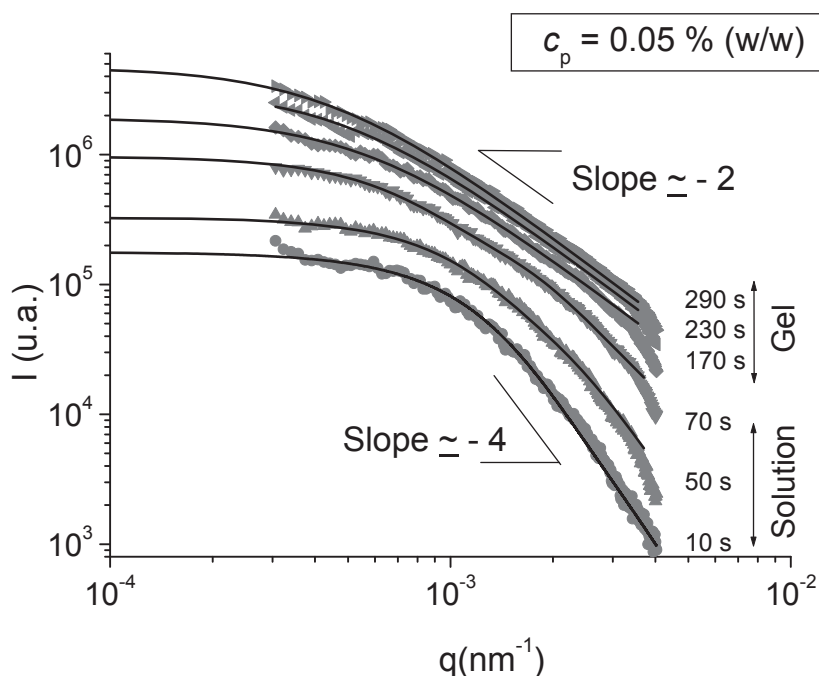
Based on these observations, a first microstructural transition occurs between  $c_p = 0.1%$  (w/w) and  $c_p = 0.3%$  (w/w), i.e., from weakly correlated systems (at low polymer concentrations) to correlated or periodic systems (at higher polymer concentrations) associated with a well defined correlation peak (see Figure 2.6b). A second transition occurs between 0.5 and 1% (w/w), between isotropic and anisotropic correlated morphologies.



**Figure 2.6** Log-log plots of scattered intensity  $I$  as a function of the scattering vector  $q$  for chitosan physical hydrogels with polymer concentrations ( $c_p$ ) ranging from 0.01 to 1% (w/w). Gels were processed from chitosan aqueous solutions ( $M_w = 515\,000$  g/mol,  $I_p = 1.6$  and  $DA = 1.5\%$ ), and neutralized by gaseous ammonia. The solid lines in (a) corresponded to the curve fitting by the Ornstein-Zernike model (see eq 2).

Since several morphologies were deduced from different concentration ranges, we investigated quantitatively the scattering data for the corresponding polymer

concentrations. Gels with lower  $c_p$  values, were first considered for the modelling of the *in situ* experimental scattering data during the gelation process. We chose to discuss a representative case from this group of gels as shown on Figure 2.7 displaying the scattering patterns of chitosan hydrogels at  $c_p = 0.05\%$  (w/w) during solution neutralization with gaseous ammonia. The scattering diffusion of the chitosan solution before the reaction of neutralization ( $t = 0$  s) was not plotted because of the very low scattered signal. In the early stages before gelation ( $\sim 70$  s), we found that the scattered intensity,  $I(q)$ , corresponded to the typical scattering behavior of isolated particles. In addition, asymptotic behaviour in the high  $q$  range is well accounted by the Porod's law  $I(q) \sim C/q^\alpha$  with an exponent  $\alpha$  close to  $-4$ , indicative of a sharp contrast variation between the solvent and particles.



**Figure 2.7** Log-log plots of scattered intensity  $I$  as a function of the scattering vector  $q$  for chitosan aqueous solutions during the *in situ* gelation process by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia. A partially neutralized solution was observed at around  $t \sim 70$  s, and a partially neutralized polyelectrolyte gel as the reaction proceeded ( $t > 70$  s). Gels were processed from aqueous chitosan solutions with  $c_p = 0.05\%$  (w/w),  $M_w = 515\,000$  g/mol,  $I_p = 1.6$  and  $DA = 1.5\%$ .

Thus, the experimental scattering curves in the solution regime (see Figure 2.7) were analyzed through the unified equation of Beaucage<sup>310</sup> (eq 1).

$$I(q) = I_0 \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) + B \frac{\operatorname{erf}\left(\frac{qR_g}{\sqrt{6}}\right)^{12}}{q^4} \quad (1)$$

Where  $R_g$  is the mean gyration radius of the particles,  $I_0$  is the intensity at  $q = 0$  and  $B$  is a scaling factor.  $\operatorname{erf}$  is the error function defined as:

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (2)$$

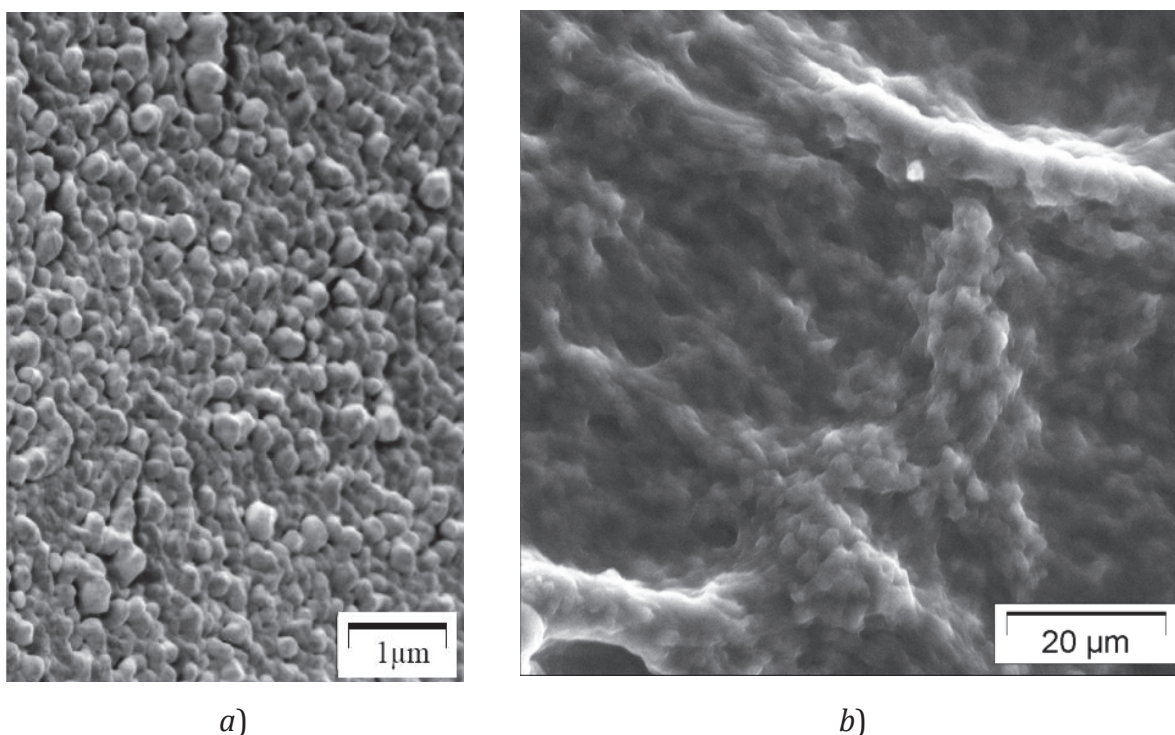
As the gelation proceeded ( $t > 70$  s), the Ornstein-Zernike equation<sup>236</sup> (eq 3) was more adapted for the modelling of the scattering diagrams of the gels.

$$I(q) = \frac{I_0}{1 + q^2 \xi^2} \quad (3)$$

Where  $I_0$  is the intensity at  $q = 0$  and  $\xi$  the correlation length of the polymer density fluctuations.  $I_0$  and  $\xi$  were calculated from the y-intercept and the slope of the Zimm plot ( $1/I(q)$  vs.  $q^2$ ) respectively.

The modelled data from eqs 1 and 3 are plotted as solid lines in Figure 2.7. In the present example, during the solution neutralization,  $R_g$  increased with time from 1.5  $\mu\text{m}$  up to about 2.2  $\mu\text{m}$  and the average correlation distance  $\xi$  was around 2.6  $\mu\text{m}$  in the resulting gel.

From these scattering results, a schematic view of the hierarchical microstructure of chitosan hydrogels obtained from the solution neutralization of aqueous solutions with  $c_p$  between 0.01 and 0.1% (w/w) can be described. As previous studies has already reported<sup>30, 143, 299</sup>, sub-micrometric aggregates (200-500 nm) are initially present in dilute chitosan aqueous solutions, and act as precursors of gelation. Such aggregates are also present in the neutralized hydrogels (see Figure 2.8). When the pH increases in the solution, the condensation of isolated chitosan chains onto the surface of aggregates and the subsequent association of aggregates contribute to form micron-range clusters. Such cluster morphology can be observed through SALS measurements before gelation in a regime where the clusters form and grow (see Figure 2.7). As the gelation proceeds, the micrometric clusters percolate to yield an isotropic gel but maintaining the aggregate microstructure. The parameter  $\xi$  obtained by eq 3 can be assigned to the average correlation distance between nearest-neighbouring clusters.

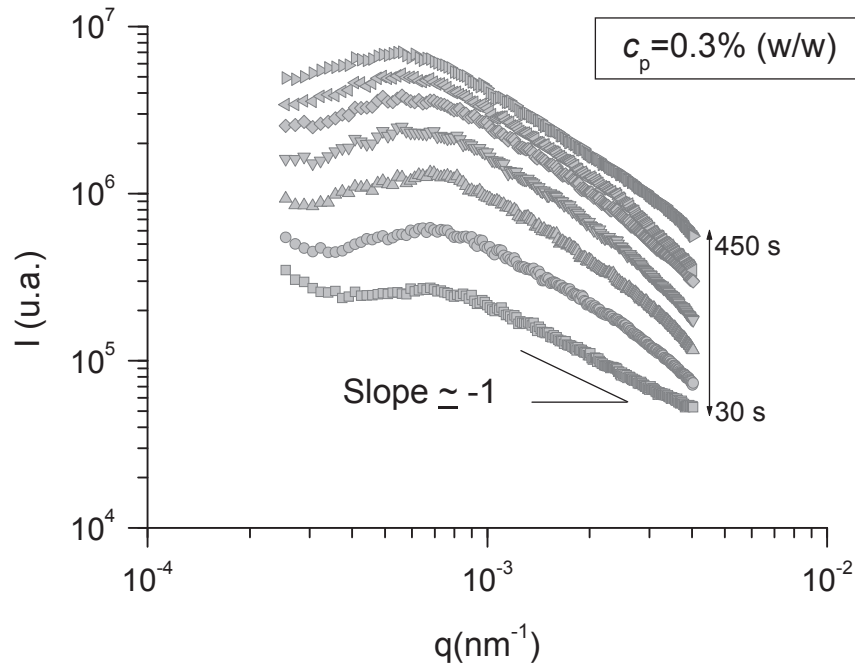


**Figure 2.8** Examples of aggregate morphology of chitosan hydrogels. *a)* Cryo-SEM micrograph of a chitosan physical hydrogel from the *alcoholic gelation route* ( $M_w = 540\,000$  g/mol,  $I_p = 1.6$  and  $DA = 2.6\%$ , use of 1,2-propanediol). The gel at  $c_p = 3\%$  (w/w) was then neutralized with gaseous ammonia. The resulting material is constituted of associated aggregates/particles. *b)* ESEM observation of a chitosan physical hydrogel obtained from the neutralization of an aqueous solution with gaseous ammonia ( $DA = 36.5\%$ ,  $M_w = 465\,000$  g/mol,  $I_p = 1.8$  and  $c_p = 1.5\%$ ).

To go a step further, SALS patterns of chitosan physical hydrogels with  $c_p \geq 0.3\%$  (w/w) were also analyzed. A specific feature of the scattering patterns of gels obtained at  $c_p = 0.3\%$  (w/w) was the power-law decay with a slope around  $-1$  (see Figure 2.6*b* and Figure 2.9), indicative of rod-like scattering particles, with intra-particle sizes much smaller than inter-particle distances. As observed from the scattering images of Figure 2.2, the rod-like particles (capillaries or alternatively necklaces of aggregates) should be more or less randomly oriented in the concentration range from  $c_p = 0.3\%$  and  $0.5\%$  (w/w). At higher concentration ( $c_p = 1\%$  w/w), the rods particles (capillaries) are mainly oriented vertically (parallel to the alkaline flux) with lateral periodic order.

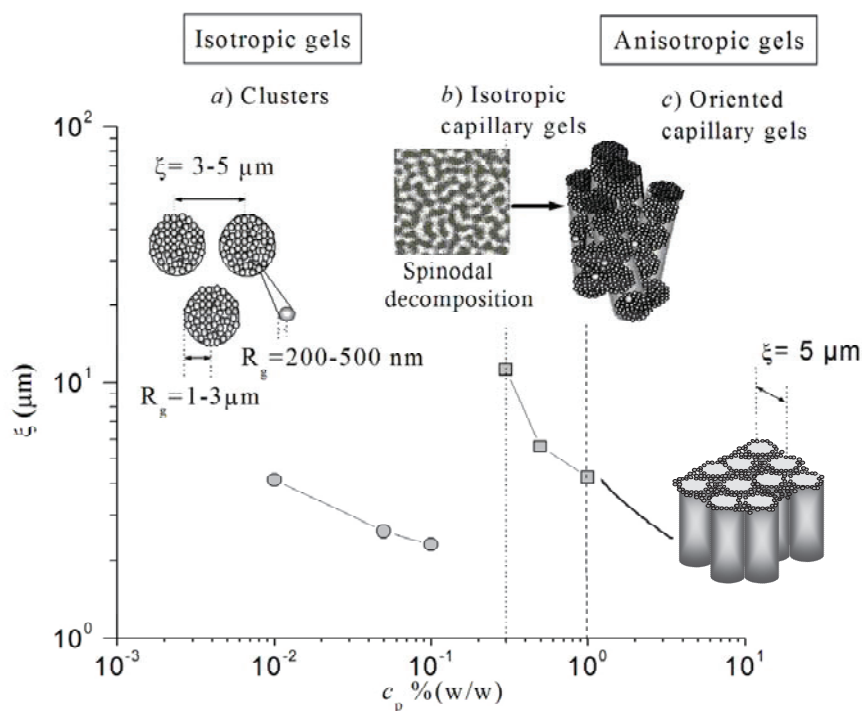
In addition, we investigated in more detail the scattering patterns of chitosan hydrogels at  $c_p = 0.3\%$  (w/w) during the *in situ* gelation process induced by gaseous ammonia (see Figure 2.9). The position of the maximum scattered intensity was

monitored during gelation by the Bragg expression  $\xi \sim 2\pi/q_{\max}$ . The evolution of  $\xi$  as a function of the gelation time was calculated from 9.3 up to 11.2  $\mu\text{m}$ . As a result, the phase separation mechanism yielding to the gel depends on the concentration of the dope: a nucleation and growth mechanism is involved at low concentration, whereas a spinodal decomposition with Oswald ripening<sup>214, 311</sup> is occurring at polymer concentration close to 0.3% (w/w).



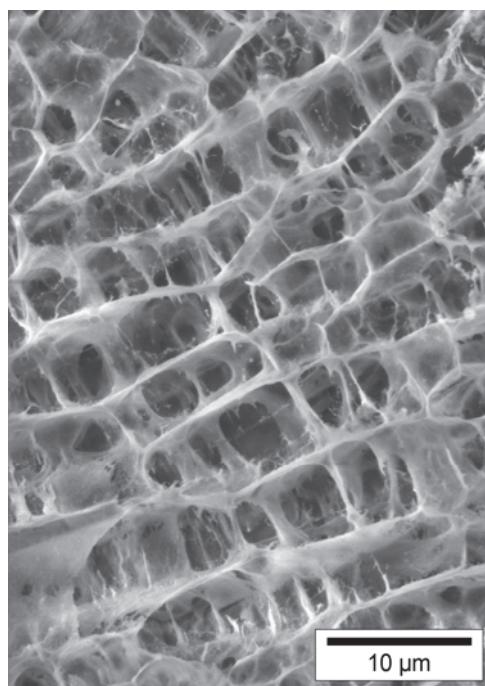
**Figure 2.9** Log-log plots of scattered intensity  $I$  as a function of the scattering vector  $q$  for chitosan aqueous solutions during the *in situ* gelation process by solution neutralization with gaseous ammonia. Gels were processed from aqueous chitosan solutions with  $c_p = 0.3\%$  (w/w),  $M_w = 515\,000$  g/mol,  $I_p = 1.6$  and DA = 1.5%.

Anisotropic chitosan hydrogels at  $c_p = 1\%$  (w/w) (see Figure 2.2) were well characterized by considering the  $q$  value of the maximum of the scattering peak which reflects the value of the inter-capillary correlation distance ( $\xi \sim 2\pi/q_{\max}$ ). Figure 2.10 summarizes the morphologies of the hydrogels in the different structural regimes, and shows the overall decreases of characteristic distance  $\xi$  when  $c_p$  increases.



**Figure 2.10** Correlation length ( $\xi$ ) as function of the polymer concentration ( $c_p$ ) for chitosan physical hydrogels prepared by the *solution neutralization route* with gaseous ammonia. At lower  $c_p$  values,  $\xi$  experimental data were obtained by the Ornstein-Zernike equation (eq 3), and at higher  $c_p$  from the  $q$  value of the maximum of the scattering peak ( $\xi \sim 2\pi/q_{\max}$ ). Microstructural transition as  $c_p$  increases: *a*) Isotropic gels co-formed of clusters and aggregates particles; *b*) isotropic gels formed by rod-like particles (capillaries or aggregate necklaces) to *c*) anisotropic gels with periodic rod particles (capillaries). The boundary limit between the isotropic-anisotropic regimes is triggered by a spinodal decomposition with an Oswald ripening phenomenon at the last stages.

Additional details of the structural organization of hydrogels were obtained by conventional Scanning Electron Microscopy (SEM). From Figure 2.11, we confirm that the periodical organization of the anisotropic gels induced the formation of an oriented cylindrical porous structure with a characteristic inter-distance of about 5  $\mu\text{m}$ .



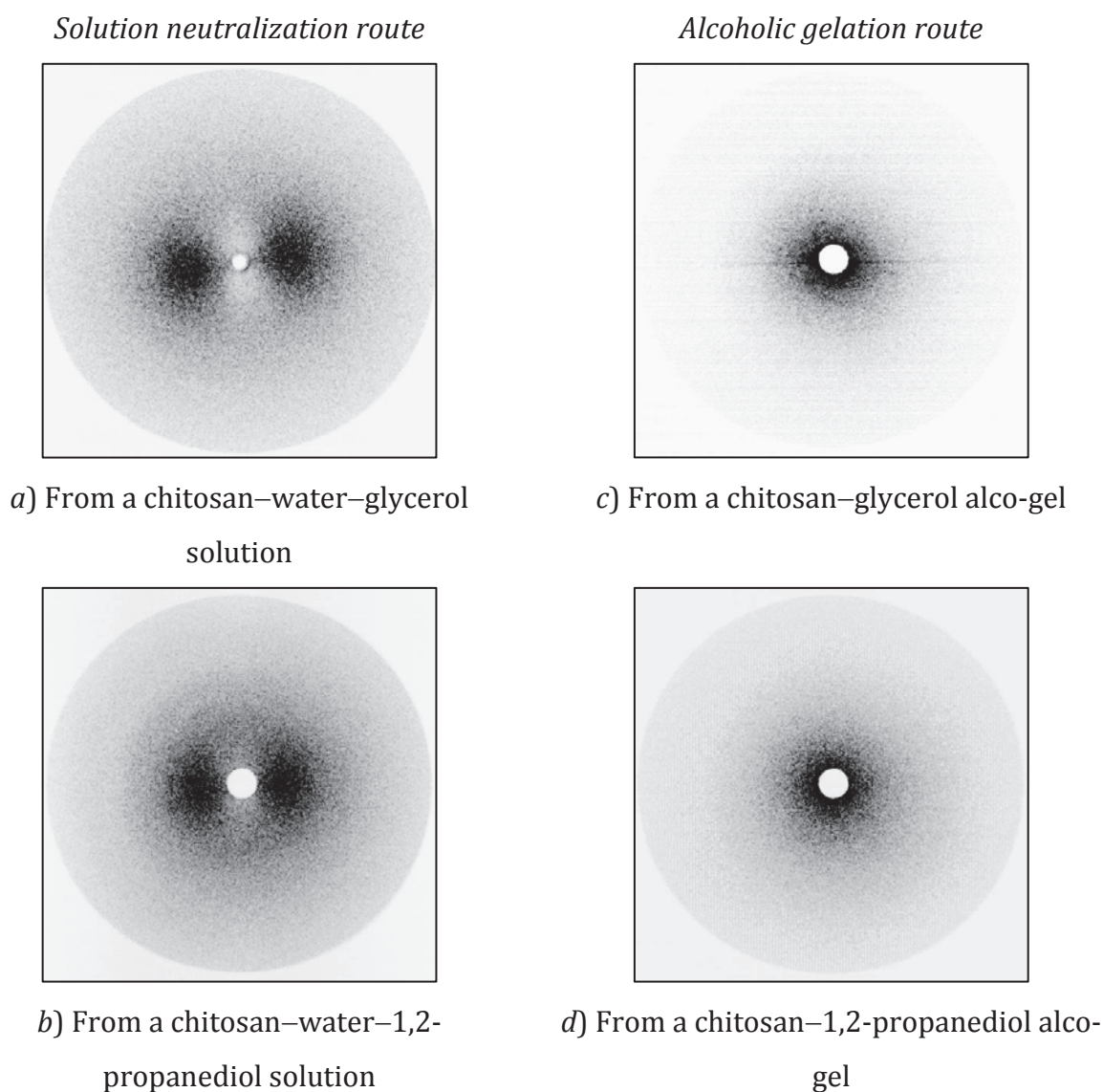
**Figure 2.11** Scanning electron micrograph of a chitosan physical hydrogel with  $c_p = 2.5\%$  (w/w). Gels were processed from chitosan aqueous solutions ( $M_w = 515\ 000$  g/mol,  $I_p = 1.6$  and  $DA = 1.5\%$ ), and directly neutralized by gaseous ammonia.

**Effect of the processing route.** The processing route of gelation is expected to impact here again the morphology of chitosan hydrogels through the effect of the solution viscosity. Indeed, in this work, two main processing routes were explored. In the *solution neutralization route*<sup>30</sup>, hydroalcoholic solutions (chitosan–water–glycerol and chitosan–water–1,2-propanediol solutions) were directly neutralized by contacting the solution with a neutralization agent, like gaseous ammonia. In the *alcoholic gelation route*<sup>29</sup>, the chitosan hydroalcoholic solutions were first heated at 50 °C, allowing the progressive evaporation of water until the gel point to form alco-gels. At this evaporation temperature, the partial vapour pressure of alcohol is low and its evaporation is negligible<sup>29</sup>. Such alco-gels do not exhibit flow and thus can be considered as infinite zero shear viscosity media. They were finally neutralized with gaseous ammonia.

Figure 2.12 displays the 2D SALS images of gels obtained from the gelation of hydroalcoholic solutions with gaseous ammonia ( $c_p = 0.5\%$  (w/w)), and the images of gels obtained from the neutralization of alco-gels ( $c_p = 1\%$  (w/w)). Depending on the processing route, a different microstructural organization could be found. Gelation by neutralization of hydroalcoholic solutions with gaseous ammonia produced a capillary



anisotropic organization, while gelation by the *alcoholic gelation route* yielded a quasi-isotropic organization. These differences in structural organization are again in good agreement with the prediction that the periodic anisotropy in hydrogels was induced during the gelation process by the formation of periodic streamlines in the sol-gel interphase (condensation layer). Such periodic streamlines do not occur at the interface between the alco-gel and the neutralized alco-gel because in that case the transition layer could be highly viscous. Nevertheless, Ladet et al. reported that at the nanometer size range, the semi-crystalline morphology of gels obtained from the *alcoholic gelation route* could also be anisotropic after neutralization with NaOH at high concentrations, e.g., 7M. Obviously, the isotropic SALS patterns shown in this work do not imply isotropy at all length scales.

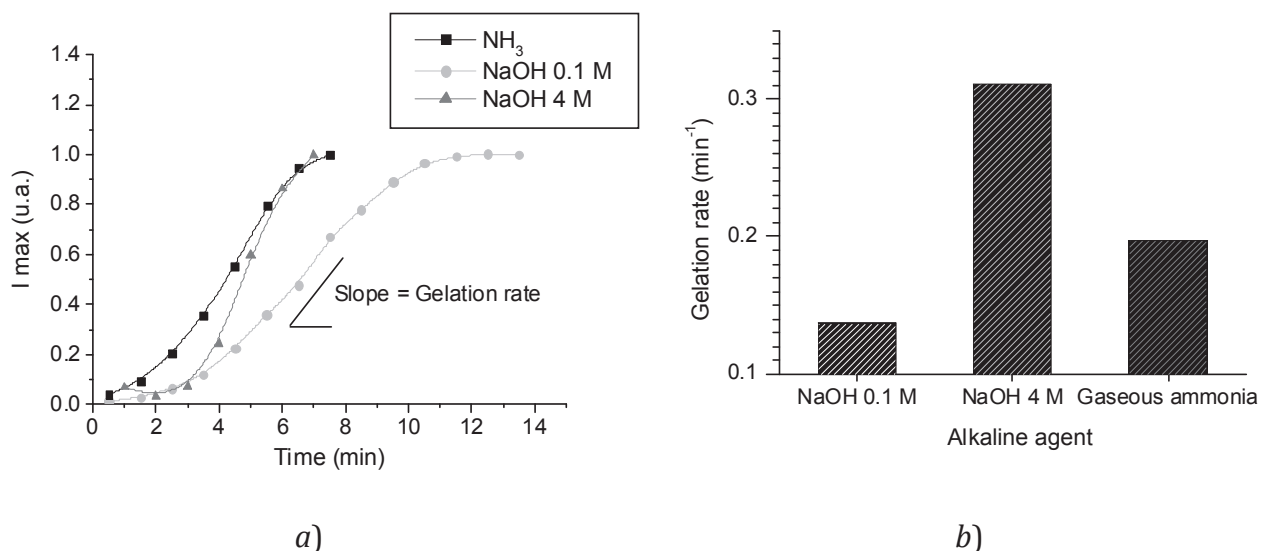


**Figure 2.12** 2D SALS images of chitosan gels ( $c_p = 0.5\%$  (w/w),  $M_w = 515\,000$  g/mol,  $I_p = 1.6$  and  $DA = 1.5\%$ ) obtained from the different processing routes. Hydroalcoholic

solutions prepared from the *solution neutralization route* with gaseous ammonia: *a)* chitosan-water/glycerol and *b)* chitosan-water/1,2-propanediol. Alco-gels prepared by the *alcoholic gelation route* and neutralized with gaseous ammonia: *c)* chitosan/glycerol and *d)* chitosan/1,2-propanediol.

**Effect of the nature of the base.** The nature of the alkaline agent is a third processing parameter to consider in the elaboration of chitosan physical gels. In the preceding sections, chitosan gelation has been obtained with gaseous ammonia. To evaluate the effect of a different alkaline agent on the morphology, two different aqueous sodium hydroxide solutions, at 0.1 M and 4 M, were additionally studied. For solution neutralization, the alkaline NaOH solution was dropped onto the chitosan aqueous solutions (see experimental section). In chitosan solutions at a polymer concentration below 0.3% (w/w), it was not possible to obtain a well defined gel front in the optical cell; the NaOH solution falling drops prevented the gelation process due to the dilution of the chitosan solution and induced the formation of a precipitate. These limiting experimental conditions were not observed during gelation with gaseous ammonia since no dilution effect could be induced by neutralization with a gaseous base.

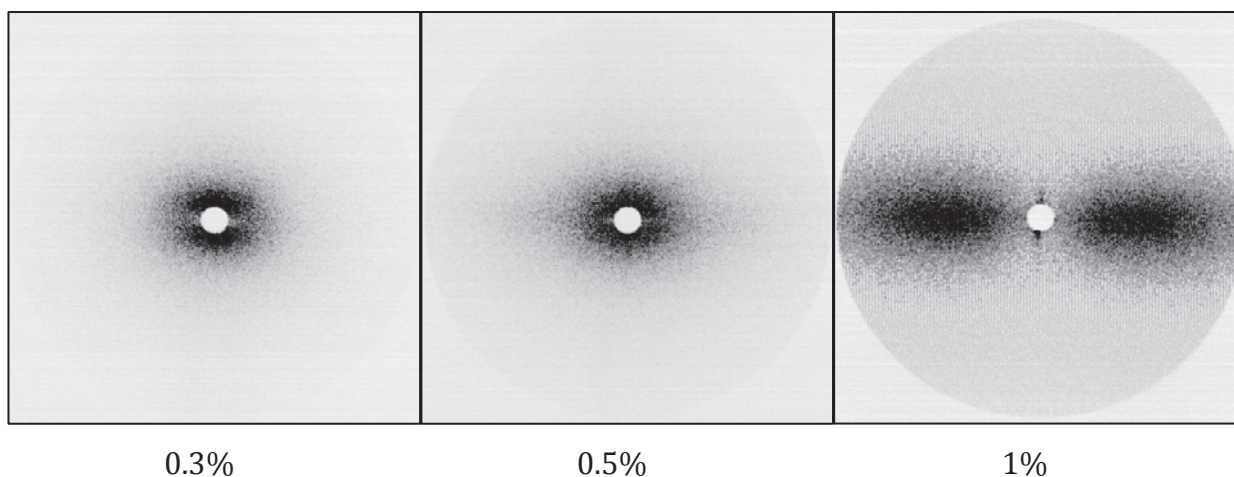
Figure 2.13*a* displays the evolution with time of the intensity at the maximum of the SALS scattering pattern for chitosan solutions and hydrogels at  $c_p = 0.3\%$  (w/w). The gelation rate was estimated from the slope of the linear domain of the normalized curves of Figure 2.13*a*. We observed that NaOH 4 M neutralization bath yielded the highest overall gelation rate, followed by the gaseous ammonia and NaOH 0.1 M (see Figure 2.13*b*). The faster gelation rate of NaOH 4 M was attributed to the higher alkaline concentration, in spite of the increase of the viscosity of coagulant solution. A high base concentration gradient was generated as the alkaline bath concentration increased<sup>215, 300</sup>, resulting in a high diffusion flux of the coagulant agent into the chitosan dope. The effect of gaseous ammonia and NaOH solutions on the gelation rate could not be directly compared. Several experimental conditions must be considered in the case of gaseous ammonia to have an equivalent alkaline concentration of NaOH penetrating into the chitosan solution.



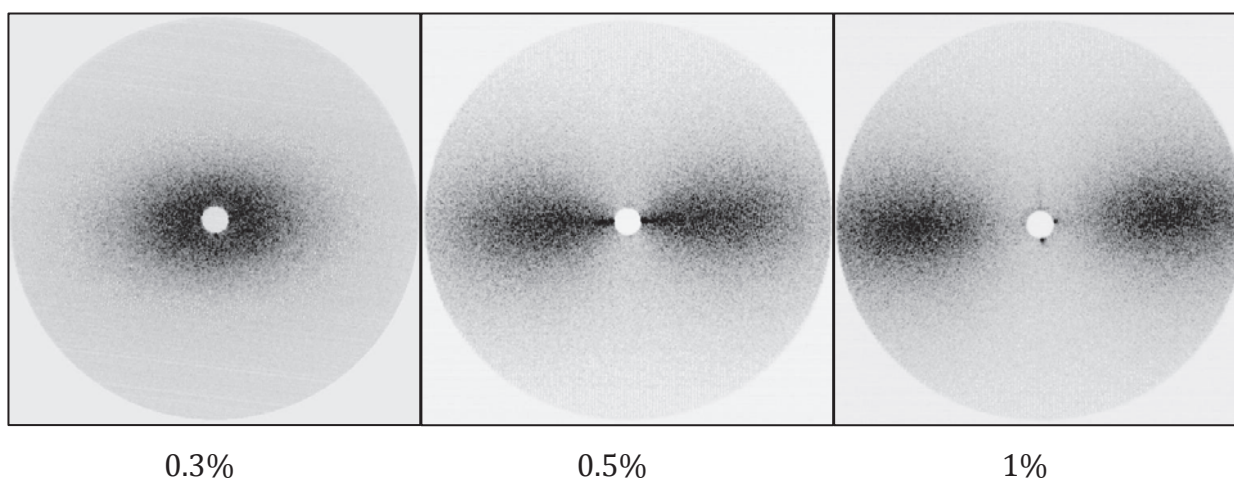
**Figure 2.13** a) Normalized SALS scattered intensities showing the kinetics of gelation of chitosan hydrogels at  $c_p = 0.3\%$  (w/w). The value of the intensity at the maximum of the scattering pattern was plotted as function of gelation time. Chitosan hydrogels were processed from aqueous chitosan solutions ( $M_w = 515\,000$  g/mol,  $I_p = 1.6$ , DA = 1.5%) and directly neutralized in different conditions: contact with gaseous ammonia, NaOH solutions at 0.1 M and 4 M. b) Gelation rate in the three different conditions.

Figure 2.14 displays the different morphologies of gels neutralized by aqueous NaOH solutions. In the *solution neutralization route* with NaOH, we observed again the transition from slightly anisotropic gels microstructure to periodic anisotropy (capillary morphology) as  $c_p$  increases. For a coagulation with an aqueous solution of NaOH at low concentration 0.1 M, the structural transition occurred at a polymer concentration located between 0.5 and 1% (w/w), similarly to the gels neutralized by gaseous ammonia (see Figure 2.2). Nevertheless, the structure of the gels obtained at lower concentration with NaOH 0.1 M neutralization exhibited a slight anisotropy with minimum intensity perpendicular to the alkaline flux. For an aqueous solution of NaOH at 4 M, the transition was found between  $c_p = 0.3$  and 0.5% (w/w), i.e., in a lower polymer concentration range. Thus, the nature and concentration of the alkaline treatment does play a role in the morphology of chitosan gels. This is in agreement with previous theoretical works<sup>302-304</sup> where the diffusion coefficient and concentration of the gelation agent ( $\text{Cu}^{2+}$  ions into alginate solutions) is shown to act on the morphology in capillary structured hydrogels.

a) NaOH 0.1 M



b) NaOH 4 M



**Figure 2.14** 2D SALS images of slightly anisotropic and periodic anisotropic chitosan aqueous gels obtained by neutralization with: a) NaOH 0.1 M and b) NaOH 4 M. Hydrogels were prepared from chitosan aqueous solutions ( $M_w = 515\ 000\ \text{g/mol}$ ,  $I_p = 1.6$  and  $DA = 1.5\%$ ) with concentrations ranging from 0.3% to 1% (w/w).

## Conclusion

In this work, the effect of the gelation conditions on the microstructural morphology of chitosan physical gels was studied. We show that chitosan hydrogels can be structured similarly to the case of alginate/ $\text{Cu}^{2+}$  systems with capillary morphology. More precisely, the variation of the physico-chemical context of the gelation process could yield chitosan physical hydrogels consisting of aggregates assembled into micrometric clusters or capillary gels with more organized structures of periodic parallel micro-channels. The polymer solution viscosity is shown to be a key factor for

the control of morphology in the micron range since the transition between the capillary to isotropic structural regime occurs for a critical viscosity. In addition, the nature and concentration of the coagulating agent also determine the kinetics of gelation, influencing the resulting gel microstructure. The processing route determines if gelation occurs before neutralization as in the case of the *alcoholic gelation route*, or during neutralization as in the *solution neutralization route*. We also found that the formation of chitosan gels with gaseous ammonia is possible in a larger concentration range with a low-concentration limit at 0.01% (w/w); while formation of chitosan gels from NaOH solutions at such  $c_p$  values is restricted due to the chitosan precipitation. In fact, the low-concentration limit with NaOH is around 0.3% (w/w). The knowledge of the processing effect on the chitosan gel microstructure morphology contributes not only on the elaboration of materials with a controlled microstructure but also helps to elucidate the mechanism of chitosan gelation into a hierarchical organization. Nevertheless, we suggest a further analysis to establish a systematic and quantitative relation between supra-aggregate morphology and more varied experimental conditions of gelation, i.e., temperature, pH, ionic strength and so on.

Chitosan capillary hydrogels seem promising materials for tissue engineering applications thanks to the biological properties of this polymer. They could support and guide the cellular growth. One of their applications could be in the field of nerve regeneration: in combination with neural cells or Schwann cells, they could elicit axon regrowth and allow their physical guidance. Biological experiments will be necessary to evaluate the interest of the microstructural morphology of our materials.

**Acknowledgements.** The authors gratefully acknowledge financial support of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia of Mexico (CONACyT) and Laboratoire des Matériaux Polymères et Biomatériaux (IMP/LMPB). We thank Mahtani Chitosan for supplying the chitosan samples. We also thank F. Quignard and F. Di Renzo (Institut Charles Gerhardt de Montpellier, UMR 5253) for helpful discussions on the capillary morphology of hydrogels and on alginate systems.

□ □ □



## Conclusion

Cette étude structurale a mis en évidence l'influence spécifique des différents paramètres de coagulation sur la morphologie structurale des hydrogels physiques de chitosane. En ajustant la viscosité de la solution de départ, il peut être induit une organisation structurale très variée commençant par des structures isotropes de l'ordre de micron, clusters, composées des agrégats submicrométriques jusqu'à des structures très orientées organisées sous forme de capillaires périodiques ou micro-canaux. La concentration de transition entre le régime isotrope et anisotrope de différentes structures a été observée autour d'une concentration en polymère de 0,3 % (m/m). Basées sur une étude qualitative de la microstructure de gels, nous avons pu expliquer ces phénomènes d'organisation en leur associant plusieurs mécanismes : nucléation/croissance, décomposition spinodale et mûrissement d'Oswald, formation de capillaires par formation de vortex dans la zone de transition sol-gel.

Par ailleurs, nous avons identifié que l'agent coagulant et la méthode de gélification sont d'autres paramètres physico-chimiques importants permettant de contrôler la morphologie structurale de l'hydrogel. Dans le cas de la soude, les solutions plus concentrées favorisent la formation des objets anisotropes. Ceci indique clairement que la morphologie d'un hydrogel est déterminée par la cinétique de coagulation. Concernant la méthode de coagulation, la neutralisation directe des solutions permet facilement la formation de diverses morphologies puisque la gélification se produit lors de la neutralisation. Par contre, la neutralisation d'un alco-gel ne permet que la formation d'une structure isotrope car la neutralisation a lieu lorsque le gel est déjà formé, ce qui n'autorise pas les mouvements de fluide et la formation de capillaires. En effet, la gélification se produit lors de la formation de l'alco-gel, c'est-à-dire pendant l'étape d'évaporation de l'eau.

Finalement, ce travail ouvre plusieurs perspectives dans le domaine biomédical. Il serait donc intéressant de tester ces différentes structures dans des systèmes biologiques. Par exemple, les clusters pourraient être utilisés pour la libération contrôlée de médicaments ou pour la vectorisation de gènes ; les hydrogels avec des micro-canaux pour son application à la régénération des connexions nerveuses, etc. Certains systèmes avec des canaux capillaires doivent être facilement envahis par les

cellules, alors que les systèmes isotropes plus denses issus des alco-gels ne le seraient pas avant dégradation avancée du gel.



## 3. Procédé de filage du chitosane par voie humide pour l'élaboration des fibres creuses multi-membranaires

### 3.1 Contexte expérimental

Plusieurs stratégies de mise en œuvre pour l'élaboration des fibres creuses sont basées sur le principe de la gélification par neutralisation d'une solution aqueuse ; néanmoins, seuls les systèmes mono- et multicouches sont décrits.

Une stratégie existante pour la formation des fibres creuses ou multi-membranaires consiste à préparer un film par la méthode de « coulée-évaporation » (solvent casting<sup>C</sup>), et de l'enrouler afin de former un tube mono- ou multi-parois. Il s'avère qu'avec cette technique, il est difficile de contrôler systématiquement l'épaisseur de la membrane ainsi que les dimensions de la fibre, c'est-à-dire le canal central et/ou l'espace entre parois. De plus, le système final n'est pas réellement « fermé » comme une vraie fibre creuse.

Dans un contexte d'ingénierie tissulaire, il a été aussi reporté l'élaboration des systèmes tubulaires multicouches<sup>18, 23, 25</sup> par la superposition successive des différentes strates (auto-assemblage). Des feuillets tissulaires produits à partir des cellules musculaires lisses et des fibroblastes sont enroulés autour d'une matrice cylindrique déposée sur un mandrin. La limitation de ces dispositifs est liée à la difficulté de leur réalisation d'auto-assemblage et au temps nécessaire à la culture cellulaire qui est assez long (au moins 20 semaines).

D'autres stratégies relativement faciles à mettre en œuvre sont les procédés de moulage (mold casting/lyophilizing technique).<sup>253, 312, 313</sup> La méthode consiste tout d'abord à verser la solution de chitosane dans un moule cylindrique puis à solidifier la solution par congélation rapide à l'azote (quenching) pour enfin la lyophiliser, et obtenir

---

<sup>C</sup> Un volume déterminé de solution est coulée dans un "moule" (ex : boîte pétri) puis chauffé à l'étuve pour évaporer les solvants, et enfin le film formé est décollé du support.

ainsi des scaffolds sous forme tubulaire. Néanmoins, il reste à comprendre comment le scaffold peut garder des bonnes propriétés mécaniques tout en étant colonisé par les cellules, et en particulier comment on peut réaliser un système cellulaire multicouche.

Une technique plus sophistiquée repose sur le principe de réaliser des scaffolds tubulaires à partir d'un mat de microfibres élaborées par électro-filage (electrospinning<sup>D</sup>).<sup>314-316</sup> En principe, les propriétés mécaniques de ces biomatériaux peuvent être améliorées par la disposition orientée des nano- ou microfibres ; néanmoins, une taille de pore uniforme est un facteur difficile à contrôler. L'élaboration de ces systèmes « poreux » pose les mêmes problèmes que les systèmes lyophilisés pour la réalisation de tissus multicouches.

La méthode de trempage (dip coating)<sup>252, 317</sup> comporte la formation de différentes couches consécutives par immersion d'un support tubulaire dans différentes solutions polymériques (ex : le chitosane et la gélatine). Une fois atteint l'épaisseur de couche souhaitée, le tube est suivi d'une étape de lyophilisation entre chaque couche. L'interaction entre les différentes couches est faite par complexation, comme le cas de chitosane et gélatine. Ce procédé d'élaboration est long, et surtout ne permet pas la formation d'espaces inter-membranaires et d'un tissu régénéré multicouche.

Le filage par voie humide<sup>238</sup> (wet-spinning<sup>E</sup>) est la stratégie la plus simple pour la production des fibres creuses de chitosane. La méthode consiste en une filière d'extrusion annulaire avec deux (voir trois) cylindres concentriques qui sont séparés par un espace permettant de former des fibres creuses au cours de l'extrusion (Figure 3.1). Le collodion est extrudé à travers l'espace annulaire de la filière tandis qu'un flux sous la forme liquide<sup>239, 318-320</sup>, gazeuse<sup>242, 255</sup> ou de l'air comprimé<sup>256, 257, 259, 297</sup> est libéré au cœur de la fibre extrudé pour former la paroi interne de la fibre, et plongé ensuite dans un bain de coagulation alcalin, dans lequel la coagulation de la fibre s'accomplit ainsi que la formation de la paroi externe de la fibre par l'action de l'agent coagulant.

---

<sup>D</sup> Electro-filage implique le filage de polymère sous champ électrique.

<sup>E</sup> Le filage par voie humide (or wet-spinning) consiste à immerger un macrofilament initialement liquide de solution de chitosane (collodion) dans un bain de coagulation alcalin, dans lequel le chitosane est neutralisé et régénéré à l'état solide comme hydrogel.

La limitation de cette technique est que le diamètre de la voie central de la fibre creuse ( $d_i$ ) est prédéterminé par la taille de la filière annulaire, il n'est possible de le faire varier qu'en changeant le diamètre du cylindre interne de la filière. De plus, les fibres préparées par cette méthode présentent des diamètres internes très élevés (350-700  $\mu\text{m}$ ) pour certaines applications, on peut citer l'exemple de la régénération de connexions nerveuses pour lequel il est intéressant de concevoir des fibres creuses avec un diamètre interne de 100  $\mu\text{m}$ .

Pour l'élaboration de fibres creuses avec plus d'une membrane, la mise en œuvre des dispositifs de filage par voie humide est complexe du fait de l'utilisation de la filière annulaire, qui nécessite l'introduction d'un agent coagulant à l'intérieur du tube extrudé ainsi que de différents bains de coagulation externe.<sup>318</sup> De plus, l'épaisseur et le nombre de membranes des fibres creuses sont également limités.

Globalement, les stratégies décrites ci-dessus ne correspondent pas à notre objectif orienté vers l'élaboration de fibres creuses multi-membranaires à base d'hydrogels physiques de chitosane, c'est-à-dire des membranes séparées par un espace libre (chambre inter-membranaire). L'intérêt principal de ces hydrogels tubulaires compartimentés consiste à confiner différentes cultures cellulaires dans les espaces inter-membranaires, ce qui permettra la communication intercellulaire en empêchant la migration et ainsi le mélange des cellules dans les différents compartiments dont les tailles de pore sont contrôlées. Ce système compartimenté favorise donc la régénération des tissus complexes, voir d'organes entiers comme la peau ou les vaisseaux sanguins.

Ladet *et al.*<sup>27, 215</sup> ont décrit l'élaboration des hydrogels de chitosane de formes complexes ayant une architecture multi-membranaire. Le procédé d'élaboration de ce biomatériau est fondé sur une neutralisation multi-étapes ou interrompue. Ces systèmes multi-membranaires sont élaborés à partir de gels physiques à l'alcool préparés dans un moule de la forme adaptée à la forme. Ensuite, l'alco-gel est immergé dans un bain de neutralisation de façon cyclique en arrêtant plusieurs fois la neutralisation afin d'obtenir un gel multi-membranaire sous forme de type « oignon », en partant en particulier d'un alco-gel cylindrique plein mais de longueur définie (quelques centimètres). Les

limitations de cette méthode sont associées à l'étape d'évaporation pour la formation de l'alco-gel et le caractère discontinu de ce procédé de mise en œuvre.

Dans des travaux précédents<sup>260-262, 321</sup>, nous avons développé la méthode de filage par voie humide par coagulation interrompue pour l'élaboration des fibres creuses. Ce procédé a impliqué la fabrication d'un dispositif de filage en continu d'un collodion de chitosane (ex :  $c_p = 5\%$  w/w). Cette méthode repose sur le principe d'immerger un macrofilament initialement liquide de solution de chitosane (collodion) dans un bain de coagulation alcalin (ex : NaOH 0,1 M), dans lequel le chitosane est neutralisé et régénéré à l'état solide comme hydrogel. Ensuite, le processus de coagulation du macrofilament est arrêté par des bains de lavage à l'eau afin de former une couronne tubulaire (une membrane externe de chitosane) et un cœur liquide de chitosane non-coagulé qui peut être postérieurement évacué par lavage à l'eau ou gélifié et enlevé manuellement.

L'objectif principal de ce travail est de généraliser l'approche de filage par voie humide par coagulation interrompue (interrupted wet-spinning) pour la fabrication de fibres multi-membranaires de chitosane en mettant au point un procédé de neutralisation à plusieurs étapes au moyen de bains successifs conduisant à une neutralisation séquencée. Pour cela, nous allons caractériser, en premier temps, la nanostructure des fibres pleines préparées par la méthode de filage par voie humide à travers les techniques de diffusion de rayonnement synchrotron aux petits angles (SAXS) et la diffraction synchrotron aux grands angles (WAXS). En effet, cette étude est un prolongement du développement d'hydrogels multi-membranaires avec une physico-chimie alternative de Ladet *et al.*<sup>27</sup>, développée pour la voie de gélification alcoolique. Il s'avère donc important d'étudier à nouveau le processus de formation multi-membranaire, puisque le mécanisme décrit par Ladet ne peut pas s'appliquer au cas de la formation de tubes multi-membranaires à partir de solutions aqueuses, dans la mesure où il fait appel à la dissolution du gel alcoolique en présence de soude.

### 3.2 Conditions expérimentales

**Matière première.** Comme dans les études précédentes, le chitosane que nous avons utilisé au cours de cette étude a été fourni par Mahtani Chitosan (Lot No. 113). Il

est issu de plumes de calamars par désacétylation hétérogène en multi-étapes (cf. Étude Bibliographique 3.2.2) ayant une distribution statistique des résidus ainsi qu'un faible degré d'acétylation ( $DA = 1,5 \%$ ) (cf. Étude Bibliographique 4.1). La masse molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) et l'indice de polymolécularité mesuré par chromatographie d'exclusion stérique (cf. Étude bibliographique Section 4.3.3) est de  $515\,000 \pm 51\,000$  g/mol et  $I_p = 1,6 \pm 0,3$ .

**Purification du chitosane.** L'échantillon de chitosane a été purifié avant son utilisation pour la préparation du collodion. D'abord, le chitosane est solubilisé à 0,5 % (w/v) dans une solution aqueuse d'acide acétique avec une quantité stœchiométrique par rapport aux fonctions amine du chitosane. Pour éliminer les impuretés, la solution est filtrée sur des membranes (Millipore) de taille de porosité décroissante : 3 ; 1,2 ; 0,8 et enfin 0,45  $\mu\text{m}$  puis neutralisé avec le gaz ammoniac, lavé à l'eau permutée et enfin lyophilisé.

**Préparation du collodion et bain de coagulation.** Le collodion utilisé est une solution aqueuse concentrée de chitosane de 3 et 5 % (m/m) préparée à partir du chitosane purifié dissout dans des conditions stœchiométriques dans une solution aqueuse d'acide acétique. La solution est finalement dégazée sous vide. Le bain de coagulation est une solution aqueuse de NaOH à différentes concentrations : 0,1 ; 4 et 7 M.

**Préparation des fibres de chitosane.** La mise en œuvre du procédé a impliqué la fabrication d'un dispositif expérimental de filage en continu dont les principaux éléments sont :

- a) Pousse seringue (Bioblock Scientific Model A-99).
- b) Seringue de plastique (20 ml, diamètre de la filière = 1,9 mm).
- c) Bain coagulant alcalin (soude).
- d) Bain de lavage à l'eau (les récipients des bains sont constitués d'un béccher contenant deux règles internes percées en verre destinées à recevoir les axes des rouleaux).
- e) Rouleaux en nylon (tubes contenant un ressort central et deux tétons en téflon).

- f) Moteur d'enroulement (à courant continu, Portescap R32.0301).
- g) Bobine d'enroulement en PVC.
- h) Système de renouvellement des solutions dans chaque bain (avec des pompes péristaltiques avec double canal Minipuls 3, Gilson).



**Figure 3.1** Dispositif expérimental de filage par voie humide par la méthode de coagulation interrompue. Le montage le plus simple comporte une bobine motorisée (*g*), capable d'entraîner une macrofibre de chitosane dans un bain coagulant de NaOH (*c*) puis un bain de lavage (*d*) après extrusion par le pousse-seringue (*a*). Le procédé de coagulation interrompue par le passage dans un bain de coagulation et puis de lavage permet à chaque fois la formation d'une membrane. Ainsi, pour la formation d'une fibre multi-membranaire, le montage doit être composé d'une série consécutive de bains de coagulation et de lavage afin de former une membrane par chaque étape de coagulation/lavage.

Une partie des paramètres de la mise en œuvre a été optimisée précédemment (cf. Section expérimentale 1, Publication 1), et elles sont résumées dans le Tableau 3.1.

**Tableau 3.1** Conditions expérimentales adéquates pour la mise en œuvre de la méthode de filage par voie humide à coagulation interrompue.<sup>262</sup>

Paramètre	Valeur optimale
Concentration collodion	$c_p = 5 \%$ (m/m)
Concentration bain coagulant alcalin	NaOH 0,1 M
Vitesse d'extrusion	35,8 mL/h

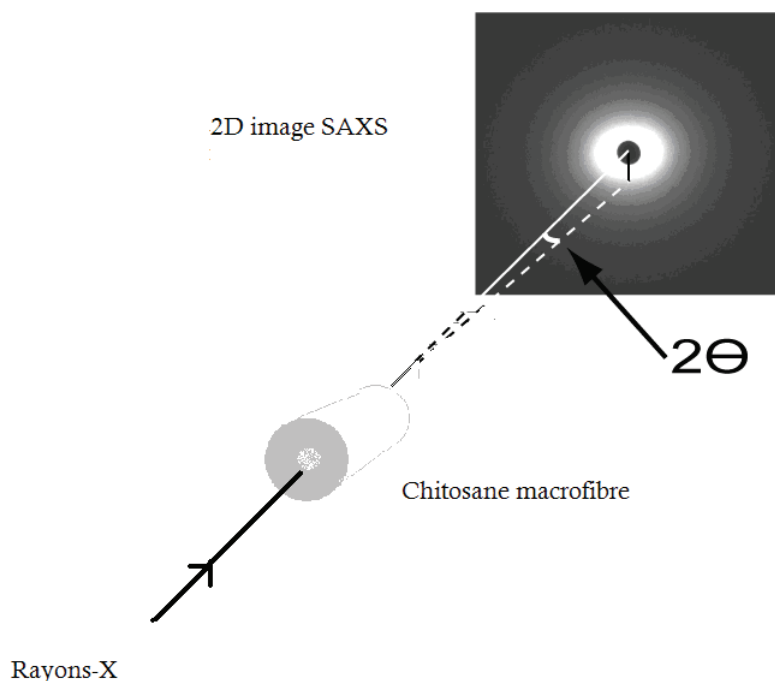
L'extrusion du collodion de chitosane avec le pousse-seringue est faite juste à la surface du bain coagulant, sans immerger la seringue dans le bain et sans laisser d'espace d'air entre la seringue et le bain afin d'assurer la coagulation rapide du collodion. De plus, la vitesse d'extrusion doit être réglée par le pousse-seringue de façon à assurer la formation d'une macrofibre stable d'un diamètre suffisant (1,9 – 2,5 mm) qui permet la fabrication de plusieurs membranes.

Le temps de coagulation dépend de la vitesse d'enroulement des fibres et du parcours de la macrofibre dans le réacteur de coagulation. Pour simplifier, nous avons fixé le volume du bain coagulant (2,5 l) et la vitesse d'enroulement (ex : 0,19 cm/s) afin d'éviter l'étirage des fibres. Par contre, nous avons modifié le parcours de la macrofibre dans le réacteur avec des rouleaux à différentes positions (cf. Figure 3.1). De cette façon, nous avons été capables de faire varier facilement le temps de séjour dans le bain de coagulation.

**Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).** Cette analyse a été réalisée à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble, sur la ligne CRG française BM2-D2AM. Les mesures ont été faites avec un faisceau de  $100 \times 300 \mu\text{m}^2$  et l'énergie du photon incident de 16 keV. Le détecteur bidimensionnel (caméra CCD de Ropper Scientific) a été placé à 1,6 m de distance de l'échantillon, et des clichés ont été pris avec le faisceau parallèle à l'axe du cylindre (Figure 3.2).

Les données expérimentales ont été corrigées de la sensibilité de chaque pixel et de la réponse du détecteur sans faisceau incident avec le logiciel *bm2img* développé au sein de la ligne. La distorsion introduite par la caméra a été également corrigée. De plus, nous avons soustrait le signal de fond correspondant au porte-échantillon vide. Le porte-échantillon est constitué par une rondelle avec deux fenêtres d'adhésif Kapton qui

diffusent peu. Le montage permet la mesure de l'intensité diffusée typiquement entre  $q = 0,01$  et  $0,23 \text{ \AA}^{-1}$ .



**Figure 3.2** Schéma de montage de diffusion synchrotron aux petits angles. Les clichés ont été pris avec le faisceau parallèle à l'axe du cylindre.

Enfin, la moyenne radiale autour du centre de l'image (position du centre du faisceau incident) est effectuée pour le standard de calibration de béménate d'argent ( $\text{AgC}_{22}\text{H}_{43}\text{O}_2$ ) pour obtenir la relation entre le nombre de pixels et la valeur du vecteur de diffusion  $q$ . Le calcul de la moyenne radiale (ou azimutale) est ensuite effectué en ligne avec le logiciel *bm2img* pour les échantillons de gels analysés.

**Diffusion des rayons X aux grands angles (SAXS).** La diffraction aux grands angles des rayons X synchrotron (WAXS) a été également réalisée à l'ESRF, Grenoble (BM2-D2AM). Un faisceau d'énergie 16 keV ( $\lambda = 0,775 \text{ \AA}$ ) a été utilisé. La mesure a été effectuée en un point fixe dans l'échantillon, pour une distance échantillon-détecteur beaucoup plus courte, c'est-à-dire de quelques centimètres.

**Microscopie électronique de balayage à froid (Cryo-MEB).** Un échantillon d'une fibre creuse a été séché dans l'étuve à  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  puis immergé dans l'azote liquide pour



effectuer une cryofracture. Avant analyse, l'échantillon est métallisé avec une pastille d'or-palladium. Le microscope électronique utilisé est un Hitachi (S800) avec un faisceau de 15 keV.

**Analyse thermogravimétrique (ATG).** Les essais ATG sont réalisés sur un appareil TA Instruments Q 500. Les échantillons de gel, de masse variant entre 5 mg et 10 mg, sont placés dans une nacelle en aluminium avec une rampe en température de 2 °C/min partant de 25 °C jusqu'au 200 °C et avec un palier isotherme final de 5 minutes. La purge du système est réalisée en utilisant un flux d'hélium sec à un débit de 90 ml/min.

### 3.3 Résultats et discussions

#### 1. Caractérisation structurale par diffusion des rayons X aux petits angles

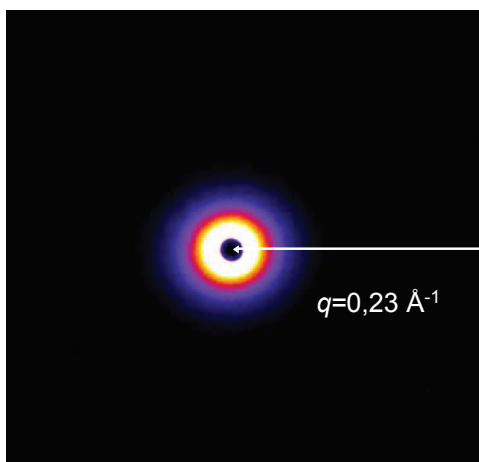
L'effet de la concentration en polymère et de la concentration de l'agent coagulant sur la nanostructure des fibres de chitosane a été étudié par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). L'analyse a été réalisée sur des macrofibres pleines de chitosane préparées par filage par voie humide à partir de collodions de concentrations  $c_p = 3$  et 5 % (m/m) neutralisés dans un bain de  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  à différentes concentrations : 0,1 ; 4 et 7 M. Comme nous l'avons vu<sup>321</sup>, ces concentrations de collodions correspondent aux concentrations limites pour le filage de chitosane : au-dessous de 1,5 %, la solution n'est pas filable, ne permettant pas d'extruder un macrofilament de chitosane en continu ; au-dessus de 5 %, la viscosité de la solution est trop élevée pour dégazer facilement. Les viscosités newtoniennes ( $\eta_0$ ) déduites de la relation de Carreau de ces solutions sont 890 et 22 700 Pa. s, respectivement.<sup>321</sup>

Pour cette étude, les fibres ont été découpées en fines tranches de ~1 mm d'épaisseur, et placées directement dans le porte-échantillon afin d'éviter la déshydratation du gel. Des clichés de diffusion des rayons X aux petits angles ont été effectués le long du diamètre avec un intervalle de 200  $\mu\text{m}$  entre chaque point de mesure. Le diamètre externe des fibres varie entre 1,7 et 2 mm, selon la concentration du bain coagulant.

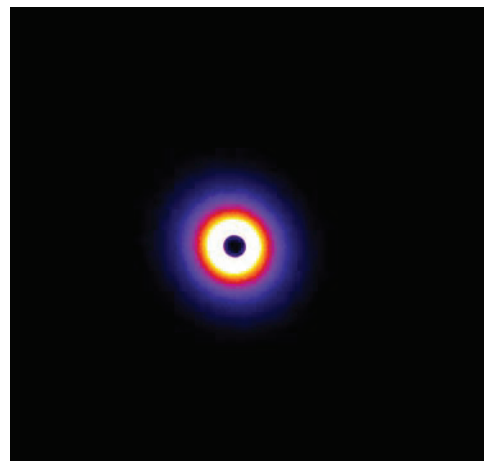
L'organisation nanostructurale des gels obtenus à partir des fibres de chitosane sont conditionnées par la concentration en polymère du collodion et bain coagulant. À partir des images SAXS 2D, nous avons identifié, dans certains cas, une structure « cœur/peau » de la macrofibre. À basses concentrations en polymère (ex :  $c_p = 2\%$  (m/m)), une organisation quasi-isotrope se conserve tout le long de la section transversale (Figure 3.3a et 3.3b). En revanche, à hautes concentrations en polymère (ex :  $c_p = 5\%$  (w/w)), un balayage dans le plan vertical de la fibre montre une organisation légèrement anisotrope dans la périphérie de la fibre (structure peau, estimé  $\sim 200\ \mu\text{m}$  dans ce cas) ; et à l'intérieur de la fibre (cœur), on retrouve une organisation quasi-isotrope (ex : Figure 3.3c et 3.3d). D'autre part, en augmentant la concentration du bain coagulant (ex : 7 M), on a observé aussi une structure fibrillaire très orientée (Figure 3.3f) avec un degré d'anisotropie plus élevé dans la structure peau de la fibre (structure peau  $\sim 400\ \mu\text{m}$ ). Ladet *et al.*<sup>27, 215</sup> ont décrit la formation d'hydrogels avec structures fibrillaires parallèles au flux de la base de neutralisation. On peut ainsi suggérer que cette modification structurale, partant d'une morphologie anisotrope vers une morphologie isotrope, est associée à une variation de cristallites de chitosane le long du diamètre de la fibre.

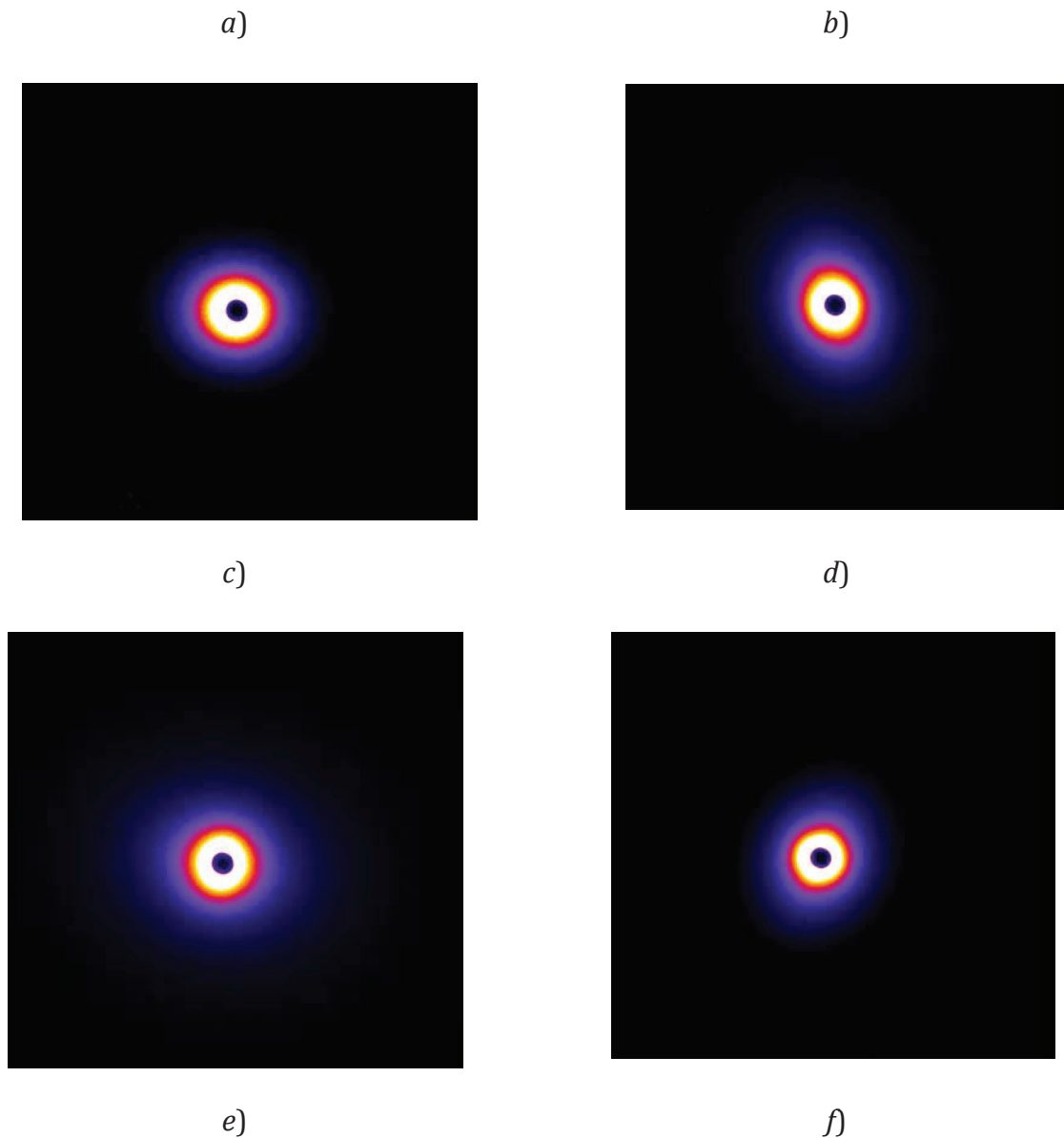
En résumé, nous avons déduit une orientation préférentielle à la surface de la fibre, ce qui pourrait apporter une bonne résistance mécanique à l'éclatement (burst strength) dans le cas d'une application comme substitut vasculaire.

**Cliché au cœur de la fibre**



**Cliché de la peau**



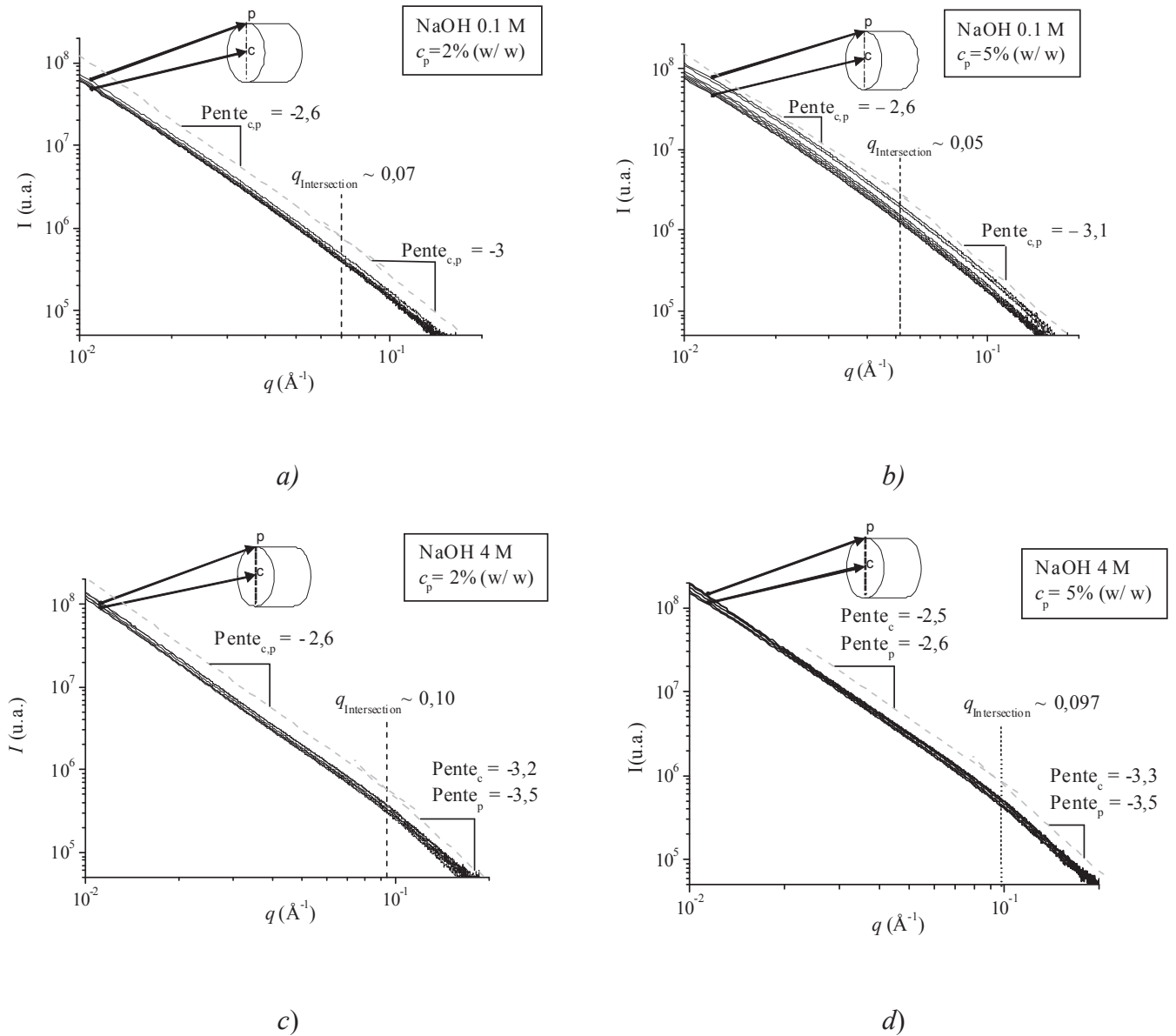


**Figure 3.3** 2D diagrammes de diffusion SAXS pour des tranches de fibres de : a) au centre et b) dans la périphérie d'une fibre préparée avec un collodion de  $c_p = 2\%$  (m/m)/NaOH 0,1 M ; c) au centre et d) dans la périphérie d'une fibre préparé avec un collodion de  $c_p = 5\%$  (m/m)/NaOH 0,1 M ; e) au centre et f) dans la périphérie d'une fibre préparé avec un collodion de  $c_p = 5\%$  (m/m)/NaOH 7 M.

Les images 2D ont été converties en moyennes azimutales autour du centre de l'image afin d'obtenir une intensité moyenne diffusée  $I$  vs. le vecteur de diffusion  $q$ . La Figure 3.4 présente des exemples de diagrammes de diffusion d'hydrogels en fonction de la distance  $r$  du faisceau à la position centrale de la fibre. Les différents gels présentent un comportement semblable. Aux petits angles, le comportement

asymptotique du régime de Guinier ( $I = I_0 \exp(-q^2 R_g^2/3)$ ) n'est pas visible dans la gamme de  $q$  étudiée (0,01 et 0,2 Å<sup>-1</sup>); il doit être observable aux plus petits angles, puisqu'il a été reporté des hétérogénéités de l'ordre de quelques centaines de nanomètres dans des hydrogels aqueux de chitosane<sup>212</sup>. Par contre, nous avons observé que l'intensité diffusée suit une loi de puissance ( $I(q) = I_0 q^{-\alpha}$ ) sur un domaine de  $q$  assez étendu (voir Figure 3.4). L'exposant  $\alpha$  de ce domaine a été estimé à partir la pente du diagramme log-log et il est de  $-2,6$ ; ce qui pourrait refléter la superposition de la contribution des fluctuations locale de concentration en polymère du gel (Ornstein-Zernike,  $I(q) \sim q^{-2}$ ) et le comportement de Guinier des cristallites, ou encore une rugosité fractale de la surface des hétérogénéités du gel (agrégats). Aux plus grands angles ( $q > 0,09$  Å<sup>-1</sup>), on peut distinguer une évolution de la pente du diagramme log-log, ce qui peut s'expliquer par la contribution de Porod des cristallites. Ce comportement est plus important dans les gels coagulés dans un bain de coagulation concentré (NaOH 4 et 7 M), ce qui conduirait à la formation des fibrilles, comme nous avons déjà vu dans les images 2D (Figure 3.3d).

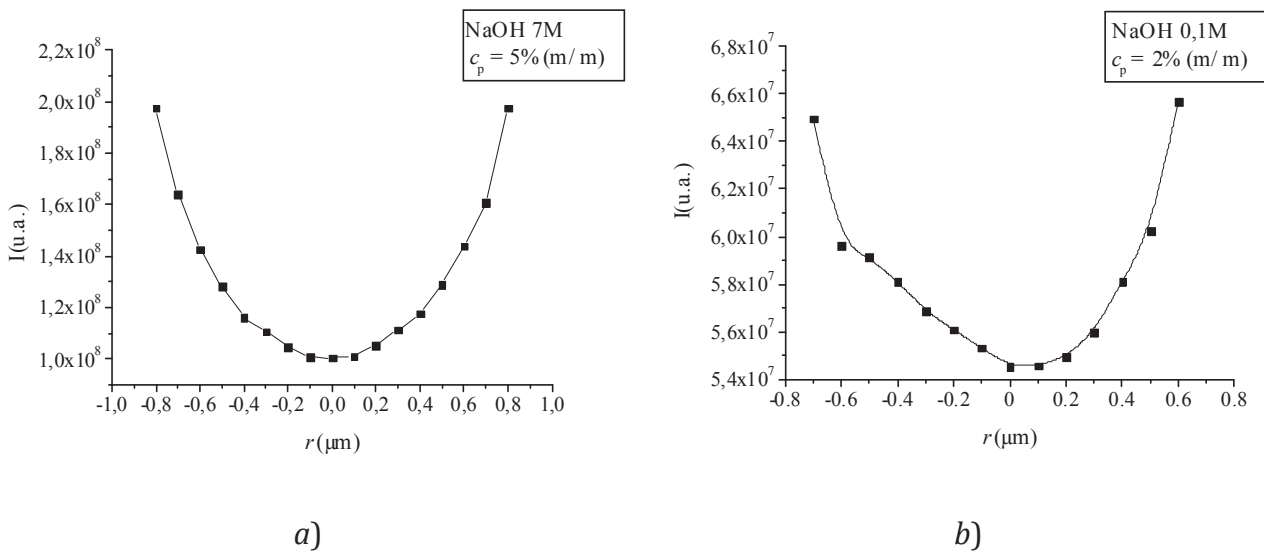
La modélisation de la taille et la morphologie des gels ne sont pas possibles car l'intervalle de  $q$  est restreint aux petits angles. Cependant, la taille des hétérogénéités constituant les gels peut être estimée l'ordre de 200 à 500 nm dans le cas de gels obtenus à partir de solutions aqueuses de chitosane neutralisées par gaz ammoniac<sup>212</sup><sup>207</sup>. Le détail de cette morphologie des gels de chitosane à l'échelle nanométrique est prédéterminé par l'organisation structurale initiale de la solution de chitosane<sup>299</sup>, et donc du contexte physico-chimique (concentration, nature et concentration de l'agent coagulant,  $DA$ , composition du solvant). Cependant, il est raisonnable d'invoquer les ressemblances structurales entre différents systèmes à l'échelle nanométrique, puisqu'il existe de même « continuum de morphologie » des solutions aux gels jusqu'aux formes solides.<sup>299</sup>



**Figure 3.4** Représentation double logarithmique de l'intensité diffusée  $I$  en fonction du vecteur de diffusion  $q$  lors d'un scan le long du rayon des tranches d'hydrogel de chitosane ( $M_w = 515\,000$  g/mol et  $DA = 1,5\%$ ) préparés à partir de deux collodions de  $c_p = 2$  et  $5\%$  (m/m) dans différents bains coagulants (NaOH 0,1 et 4 M). La taille apparente des cristaux ( $R_g \sim 1/q_{\text{intersection}}$ ) pour les différents systèmes varie entre 20 et  $10\text{ \AA}$ .

À partir de la Figure 3.4, nous avons observé que l'intensité diffusée varie le long de la section transversale du gel selon la position relativement au centre. Pour mieux visualiser ces différences en intensité, l'intensité maximale ( $I_{\text{max}}$ ) à  $q = 0,01044\text{ \AA}^{-1}$  est tracée en fonction de  $r$  puis présenté sur la Figure 3.5. Nous avons constaté que l'intensité diffusée est plus intense dans la périphérie, et qu'elle diminue

progressivement jusqu'au centre de la fibre. Parmi les gels analysés, le gradient plus important s'est produit dans les gels de  $c_p = 5\%$  (m/m) neutralisés dans un bain de coagulation NaOH 7 M (Figure 3.5a), alors que dans les gels formés avec  $c_p = 2\%$  (m/m) et NaOH 0,1 M le gradient de structure est moins intense (Figure 3.5b). De cette façon, nous retrouvons une structure cœur-peau des macrofibres, telle que nous l'avons mis en évidence par l'examen de l'anisotropie des images de diffusion.



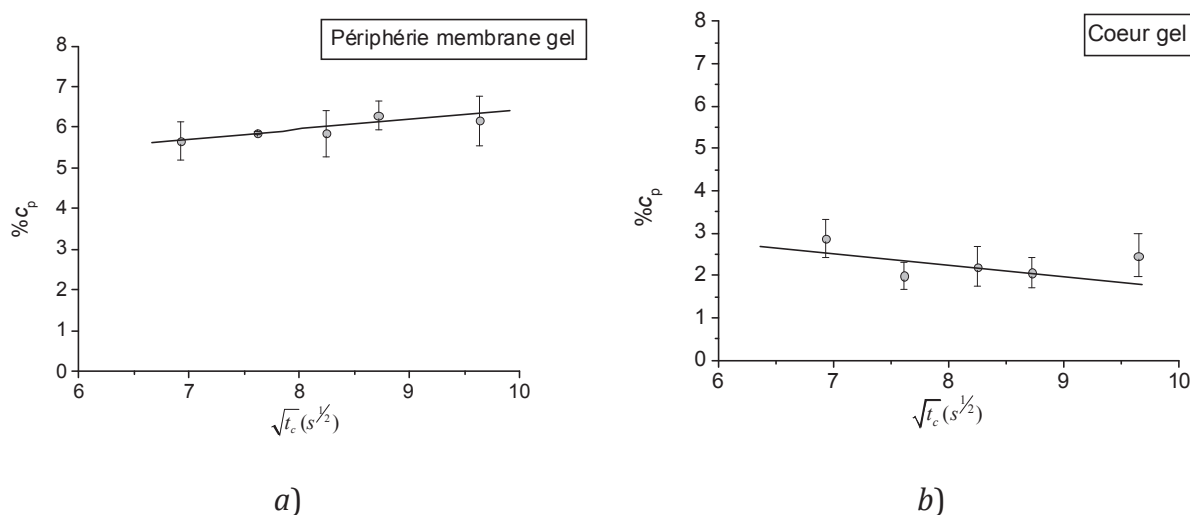
**Figure 3.5** Intensité maximale ( $I_{\max}$ ) à  $q = 0,01044 \text{ \AA}^{-1}$  en fonction de la distance  $r$  à partir du centre de la section transversale de fibres de chitosane ( $M_w = 515\,000 \text{ g/mol}$  et  $DA = 1,5\%$ ) préparées à partir de deux collodions de : a)  $c_p = 5\%$  (m/m) dans un bain coagulant NaOH 7 M et b)  $c_p = 2\%$  (m/m) dans un bain coagulant NaOH 0,1 M. La variation en  $I_{\max}$  entre la peau et le cœur est de 49,16 et 25 % pour le cas a) et b), respectivement.

L'intensité diffusée peut être considérée, en première approximation, comme une mesure indirecte de la quantité d'interfaces des agrégats. Ceci peut être relié à une différence de morphologie à l'échelle de l'agrégat (taille des agrégats par exemple), ou à une différence de pouvoir diffusant, c'est-à-dire à un gradient de concentration en polymère.

Lorsque la soude pénètre le collodion, une interphase de transition sol-gel se forme entre le gel et le collodion, ce qui induit la condensation des chaînes de chitosane de la

solution en position centrale vers la périphérie de la fibre. De cette façon, la solution liquide de chitosane à l'intérieur de la fibre pourrait progressivement s'appauvrir en chitosane, par un effet de « pompage » des chaînes.

Une analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée pour déterminer la concentration en polymère dans la membrane et le cœur des fibres creuses préparées par l'interruption de la coagulation à différents intervalles de temps (voir Figure 3.6). Les résultats obtenus semblent montrer que la concentration en polymère dans la membrane augmente progressivement avec le temps de coagulation (Figure 3.6a), tandis que la concentration de polymère au cœur de la fibre diminue pendant la formation de la fibre (Figure 3.6b). Malgré l'important écart des mesures, l'étude permet d'apporter un nouvel argument de l'effet de pompage de chaînes lors de la formation de fibres par la méthode de filage par voie humide.



**Figure 3.6** Concentration en polymère, déterminé par ATG, en fonction de la racine carrée du temps dans une coagulation interrompue pour l'élaboration des fibres creuses de chitosane ( $M_w = 515\,000$  g/mol et  $DA = 1,5$  %). Les fibres ont été préparées à partir d'un collodion de  $c_p = 3$  % (m/m) dans un bain coagulant NaOH 0,1 M. a) Concentration en polymère à la membrane périphérique et b) le gel au cœur de la fibre.

Une expérience supplémentaire a consisté à mesurer la masse molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) de la membrane et de la solution liquide au cœur de la fibre de chitosane. Les résultats de chromatographie obtenus apparaissent dans le Tableau 3.2. La masse

molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) dans la macrofibre est proche des caractéristiques initiales de la matière initiale ( $M_w = 515\,000$  g/mol et  $I_p = 1,6$ ). De plus, nous avons retrouvé à peu près la même valeur de  $M_w$  dans les deux composants de la fibre. Ce résultat nous permet de conclure que la formation de la macrofibre ne se fait pas en fonction de la masse macromoléculaire, ce n'est pas un procédé sélectif qui impliquerait d'abord les chaînes les plus mobiles (à plus faible masse).

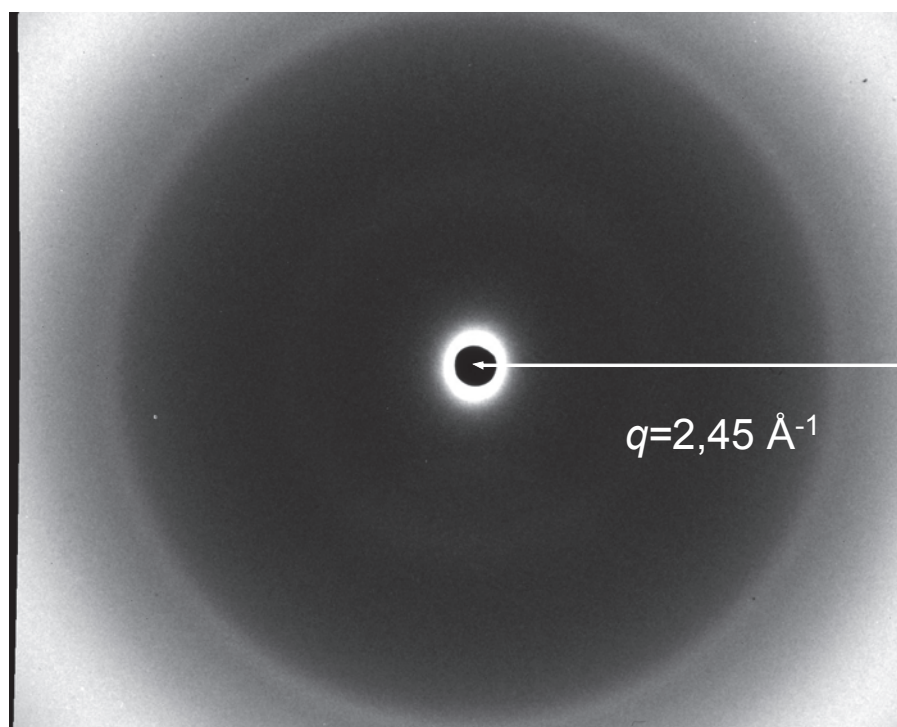
**Tableau 3.2** Évaluation de  $M_w$  dans la membrane et cœur d'une fibre de chitosane La fibre a été préparée à partir du collodion de  $c_p = 2,9$  % (m/m) et neutralisée dans un bain de NaOH 1 M pendant  $t_{\text{coag}} = 18$  s. Le collodion a été extrudé à une vitesse de 35,4 ml/h.

	$M_n$ (g/mol)	$M_w$ (g/mol)	$I_p$
Membrane	354 366 ± 13013	497 766 ± 1554	1,40±0.05
Cœur	331 266 ± 6400	482 366 ± 1080	1,45±0.02

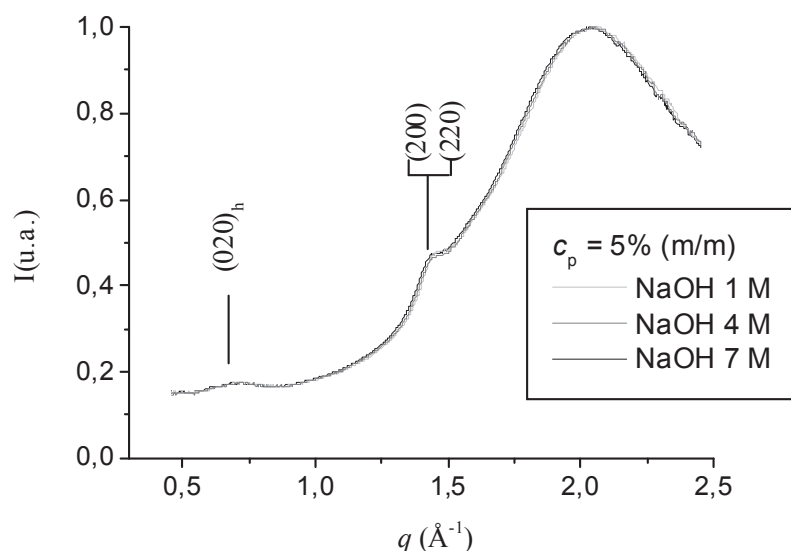
### 3.3.1 Caractérisation structurale par diffusion des rayons X aux grands angles

La Figure 3.7 est un exemple d'une image 2D de diffraction synchrotron, ce qui permet de montrer la nature cristalline de l'hydrogel en mettant en évidence des anneaux de diffraction de faible intensité. Les diagrammes de diffraction normalisés des fibres de chitosane neutralisées dans différents bains de coagulation sont illustrés sur la Figure 3.8. Ils montrent un signal assez important autour de  $2 \text{ \AA}^{-1}$  qui est dû à la présence d'eau dans l'hydrogel (halo amorphe). En effet, les fibres sont composées principalement d'eau (95 %) et de chitosane (5 %). Malgré la faiblesse des raies, nous pouvons déduire la formation de l'allomorphe hydraté du chitosane<sup>322</sup> par la présence des deux pics caractéristiques de cette forme cristalline. Un premier pic est observé à  $0,726 \text{ \AA}^{-1}$  correspondant au plan de réflexion (020), et le deuxième est localisé à  $1,45 \text{ \AA}^{-1}$  correspondant au plan de réflexion (200). En revanche, l'allomorphe anhydre du chitosane n'est pas observé dans les fibres coagulées à partir de solutions aqueuses.





**Figure 3.7** Exemple d'image 2D de diffraction WAXS pour des fibres de chitosane. La fibre est préparée à partir d'un collodion de  $c_p = 5\%$  (m/m),  $M_w = 515\,000$  g/mol et  $DA = 1,5\%$  et neutralisés dans un bain coagulant NaOH 7 M. Cliché de diffraction prise perpendiculairement à la direction du flux de la base dans le centre d'un morceau d'hydrogel.



**Figure 3.8** Diagrammes de diffraction WAXS normalisés pour des fibres de chitosane ( $c_p = 5\%$  (m/m),  $M_w = 515\,000$  g/mol et  $DA = 1,5\%$ ) préparés à partir des solutions aqueuses et neutralisés dans différents bains coagulants : NaOH 1, 4 et 7 M.

À partir de la raie  $(020)_h$ , la taille ( $L_{020}$ ) des cristaux du réseau a été estimée par l'équation de Debye-Scherrer (eq 3.1) :

$$L_{020} = \frac{K\lambda}{\Delta(2\theta)\cos\theta} = \frac{2\pi K}{\Delta q} \quad \text{eq (0.27)}$$

Où  $K$  est la constante de Scherrer voisine de 0,9 ;  $\lambda$  correspond à la longueur d'onde du rayons X,  $\Delta(2\theta)$  ou  $\Delta q$  est la largeur à mi-hauteur du pic, et  $\theta$  est le demi-angle de diffraction. Pour les différents gels analysés, la taille des cristaux estimée pour le pic à  $0,726 \text{ \AA}^{-1}$  est autour de  $L_{020} \sim 26 \text{ \AA}$ . Comme une première approche, la quantité de cristaux présents dans chaque différent système peut être estimée par la hauteur du pic du diagramme de diffraction. Pour le premier pic à  $0,726 \text{ \AA}^{-1}$ , on n'est pas observé de différences significatives dans les gels liés à la concentration du bain coagulant. Par contre, pour le pic localisé à  $1,45 \text{ \AA}^{-1}$ , une quantité légèrement plus importante de cristaux est observé dans gels neutralisés avec 7 M (hauteur pic  $\sim 0,23$  u.a.). Ce dernier résultat peut s'expliquer par la coagulation rapide qui induit l'étirement à l'échelle nanométrique des chaînes de chitosane permettant ainsi la formation structures fibrillaire au sein du gel aqueux. Par sa nature cristalline, on peut dire que les solutions aqueuses neutralisées dans un bain coagulant à forte concentration se comportent comme des gels hydroalcooliques décrits dans les travaux de Ladet *et al.*<sup>27, 215</sup>.

Par ailleurs, on peut suggérer qu'il puisse exister une fluctuation en cristallinité le long de la section transversale car la cinétique de neutralisation et donc de cristallisation est différente entre le cœur et la peau.

En résumé, à l'échelle de l'angström ( $\text{Å}$ ) jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres, la diffusion et la diffraction des rayons X ont mis en évidence une structure semi-cristalline du gel impliquant uniquement l'allomorphe hydraté. Cependant, les gels sont constitués de nano-objets (agrégats) dont l'organisation est plus ou moins isotrope à l'intérieur de la fibre et plus anisotrope dans la périphérie de la fibre dans certaines conditions physico-chimiques de neutralisation. De plus, il existe une structure cœur-peau dans les

macrofibres, cette morphologie pourrait être due à une variation de concentration de polymère dans la section transversale.

Ces résultats seront complétés avec des balayages en position de tranches de fibres en géométrie de diffraction du rayonnement synchrotron pour établir s'il existe un gradient de cristallinité entre cœur et peau. Cette analyse morphologique en diffraction doit permettre de mieux expliquer le mécanisme de coagulation, en particulier le processus de l'élaboration de fibres creuses multi-membranaires à base de chitosane par la méthode de coagulation interrompue.

### **3.3.2 Formation des fibres multi-membranaires par filage par voie humide**

#### **Stratégie pour la formation des systèmes multi-membranaires**

La stratégie utilisée pour l'élaboration des fibres multi-membranaires est basée sur la méthode de coagulation interrompue (interrupted wet-spinning)<sup>321</sup>. Dans ce procédé d'élaboration, la coagulation du collodion (ex :  $c_p = 5\%$  (m/m)) de chitosane est interrompue de façon contrôlée par une simple étape de lavage permettant d'éliminer l'agent coagulant (ex : solution aqueuse de NaOH 0,1 M) ou tout au moins de diminuer le plus possible sa concentration, en arrêtant ou limitant de ce fait le processus de coagulation du chitosane. Dans ces conditions, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la coagulation du collodion est partielle car la réaction de coagulation est interrompue dans les premières étapes constituant de cette façon une membrane hydrogel externe et un cœur constitué d'une solution liquide de chitosane.

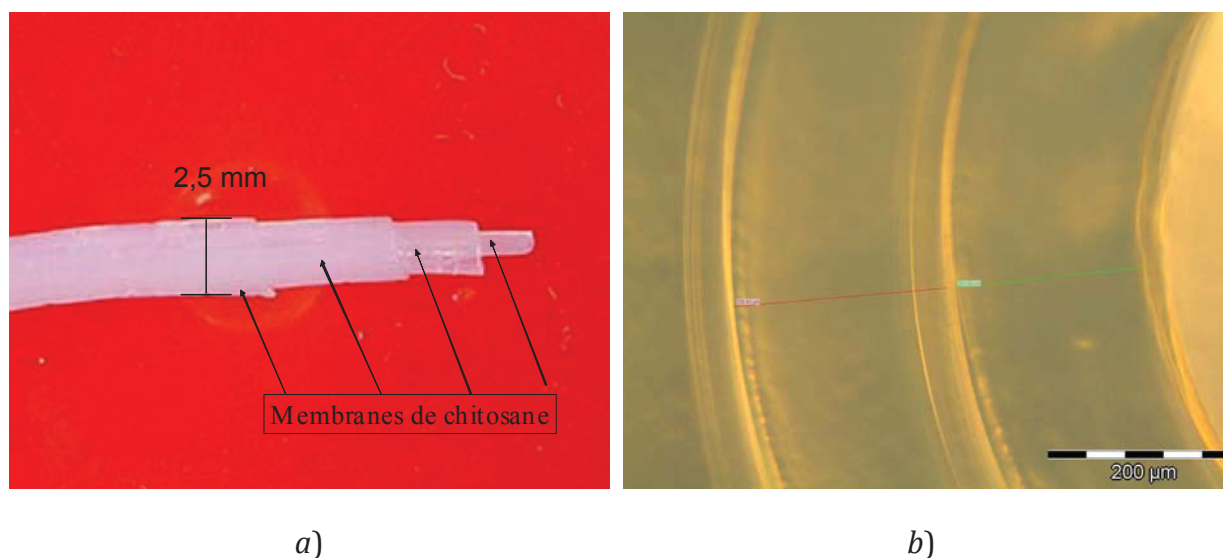
La stratégie que nous avons développée pour l'élaboration des systèmes multi-membranaires est un peu plus élaborée que celle utilisée pour les fibres creuses. La méthode de mise en œuvre comporte plusieurs cycles successifs organisés dans un montage de filage en continu, chacun étant constitué d'une étape de coagulation partielle dans un bain coagulant de NaOH 0,1 M et d'une étape d'interruption de la coagulation permettant à chaque cycle de « coagulation-lavage » la formation d'une membrane au sein de la fibre. Après la formation des membranes par la succession des bains de

coagulation-lavage, la fibre doit passer dans un dernier bain alcalin pour faire apparaître la structure multimembranaire. Cette dernière étape doit s'effectuer dans un bain coagulant plus concentré (ex : NaOH 1 M) afin de favoriser le décollement des membranes par contraction de chaque membrane. Ceci suggère que l'interruption (ou le ralentissement de la cinétique de neutralisation) conduit à un hydrogel moins enchevêtré, ou moins dense en polymère ou encore moins cristallin, comme cela a été déjà évoqué lors de l'examen de la structure cœur/peau d'une macrofibre (la cinétique de neutralisation doit être plus rapide en peau qu'à cœur). C'est la contraction finale dans un bain coagulant plus concentré qui induit le décollement des membranes aux endroits de plus faible cohésion.

Ainsi ce procédé permet de varier le nombre de membranes et l'épaisseur de membrane en fonction de l'application souhaitée, en adaptant le nombre de cycles et aussi le diamètre de la filière. Un exemple de conditions opératoires pour la mise en œuvre des fibres multi-membranaires est résumé dans le Tableau 3. L'aspect physique de la fibre obtenue est présenté dans la Figure 3.9.

**Tableau 3.3** Exemple de conditions opératoires pour la formation des fibres creuses avec quatre membranes.

Cycle	Bain coagulant de NaOH 0,1 M	Bain de lavage à l'eau
1 <sup>ère</sup> cycle	114 s	60 s
2 <sup>ème</sup> cycle	60 s	60 s
3 <sup>ème</sup> cycle	90 s	60 s
4 <sup>ème</sup> cycle	120 s	60 s
Formation espace inter-membranaire	NaOH 1 M/15 s	Jusqu'à pH neutre de l'eau de lavage



**Figure 3.9** a) Aspect macroscopique de fibre multimembraire faisant apparaître plusieurs membranes coaxiales et b) images de microscopie optique de la section transversale d'une tranche de fibre (Microscope Olympus, Magnification 20 X). La fibre est préparée à partir un collodion de 5 % (m/m) neutralisée dans un bain NaOH 0,1 M. Les dimensions de la fibre obtenue sont : 2,5 mm de diamètre externe ; 1,1 mm de diamètre interne et  $\sim 200 - 220 \mu\text{m}$  l'épaisseur de membrane.

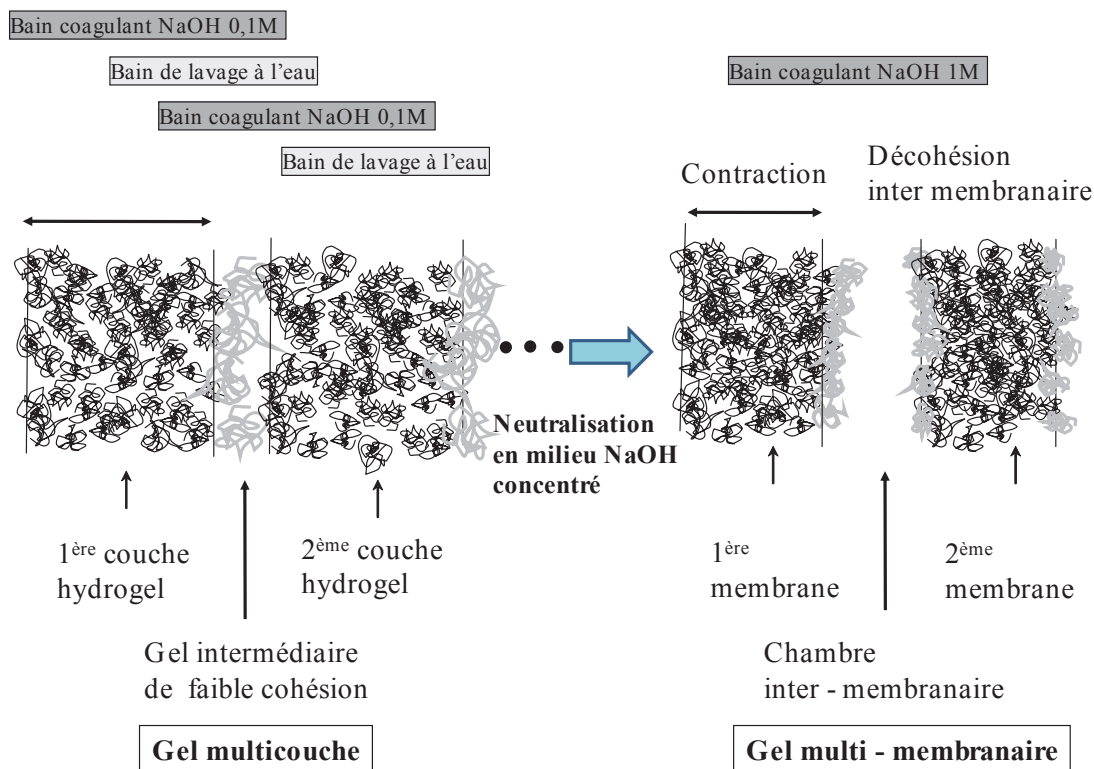
Par le réglage des paramètres de mise en œuvre, il est donc possible de contrôler les dimensions de la fibre. Le diamètre externe des fibres peut être ajusté entre 1,4 – 2,5 mm par la variation de la vitesse d'enroulement à la sortie de filière (et donc l'étirage du collodion en sortie de filière). Avec l'objectif d'assurer la formation des systèmes multi-membranes, nous avons donc fixé la vitesse d'enroulement afin d'éviter l'étirage des fibres. Le diamètre interne de la fibre peut être également contrôlé car il dépend du temps de coagulation final, du nombre et de l'épaisseur des membranes intermédiaires formées. Le diamètre interne pour des fibres creuses peut varier entre 1,5 mm -200 µm.

### **Mécanisme physico-chimie pour la formation de fibres multi-membranaires**

Le procédé de coagulation interrompue nécessite un contrôle des conditions physico-chimiques de mise en œuvre ; en particulier, la cinétique de coagulation du chitosane est le paramètre le plus déterminant. Le ralentissement de la cinétique de coagulation induit une perturbation du phénomène de coagulation, et ainsi une variation

de l'état structural du gel. Après une étude cinétique détaillée<sup>321</sup>, nous avons déterminé qu'une concentration de la solution coagulante assez basse (ex : NaOH 0,1 M) et une concentration en polymère élevée (ex :  $c_p = 5\%$  (m/m)) sont les conditions plus adéquates pour obtenir une cinétique de coagulation assez lente et donc contrôlée.

Le mécanisme physico-chimie de formation des membranes et des espaces inter-membranaires est illustré par la Figure 3.10. La formation des hydrogels physiques de chitosane est induite par neutralisation. Cependant, comme nous l'avons identifié par diffusion de lumière aux petits angles (cf. Publication de la Section Expérimentale 2), une interphase de transition sol-gel se forme entre le gel et le collodion par la diffusion des chaînes de chitosane et leur agrégation à la surface du gel. Ceci induit une interphase avec gradient d'indice, et donc gradient de concentration en polymère. Lors de l'interruption de la neutralisation par lavages à l'eau, la zone de transition, moins concentrée en polymère, se neutralise avec une cinétique plus lente. Cette étape pourrait aboutir à la formation d'un gel moins concentré, donc moins cristallin, et éventuellement partiellement désenchevêtré. Ceci conduit à la formation d'un gel bicouche (Figure 3.10a), avec 1) un gel de chitosane plus riche en polymère dans la périphérie de la fibre, 2) un gel de plus faible cohésion et 3) une solution de chitosane non-neutralisé. Dans un deuxième cycle de coagulation, l'agent coagulant contribue à la formation d'une autre couche dense de chitosane, et l'arrêt suivant de la neutralisation conduit à nouveau à un gel de faible cohésion.



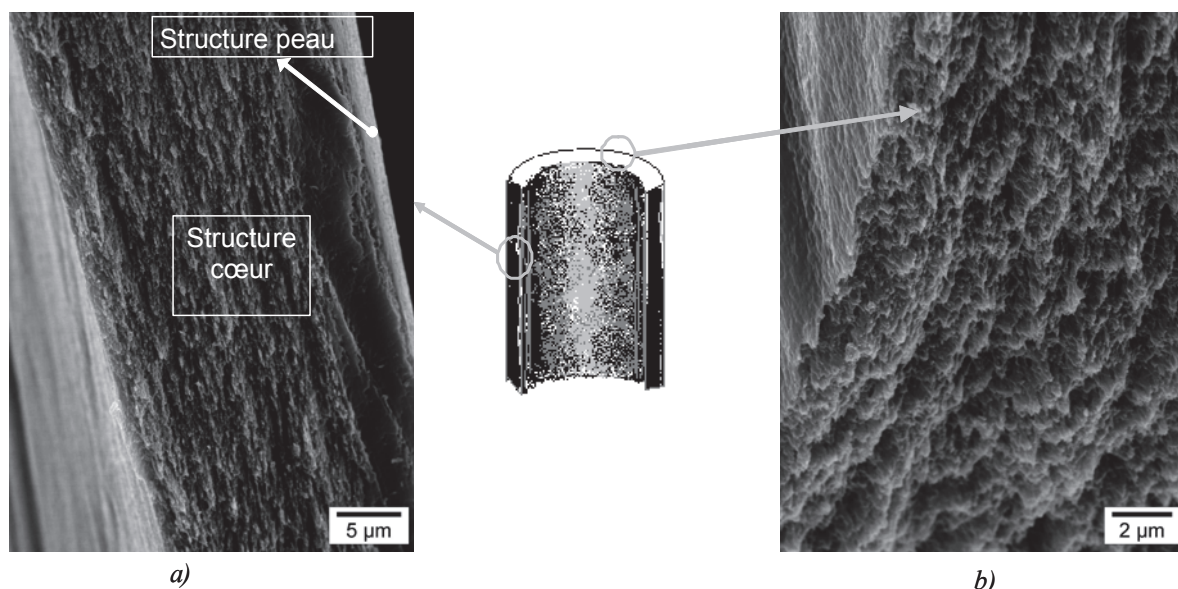
**Figure 3.10** Mécanisme de coagulation interrompue en deux étapes pour la formation des systèmes multi-membranaires. *a)* Neutralisation interrompue et séquencée conduisant à un gel multicouche, et *b)* neutralisation dans une solution aqueuse de soude plus concentrée et formation du système multi-membraire.

Il est aussi probable que les différentes couches ainsi formées n'aient pas toutes les mêmes propriétés physico-mécaniques, puisque la cinétique globale de neutralisation est plus lente à cœur qu'à la périphérie. De plus, la solution de chitosane de cœur pourrait s'appauvrir progressivement par condensation des chaînes sur la surface interne des tubes formées à chaque étape. Dans ce mécanisme, les membranes formées après plusieurs cycles de coagulation-lavage seraient donc un peu moins concentrées en polymère conduisant ainsi à un gradient de morphologie le long de la section de la fibre, comme nous avons observé qualitativement par SAXS.

Dans une dernière étape, la formation des espaces inter-membranaires par le décollement des membranes s'est effectuée dans un bain coagulant concentré (ex : NaOH 1 M) pendant une période de contact assez courte (15 secondes) durant laquelle

les chaînes de la zone de transition se sont condensées dans la surface des membranes et celles-ci se sont contractées légèrement par « salting-out »<sup>27, 294</sup> (voir Figure 3.10b). Par contre, dans une période longue, la contraction des membranes est plus importante car la fibre est fortement déshydratée par l'effet du salting out, éliminant ainsi les espaces inter-membranaires. De plus, ce phénomène de condensation favoriserait également la formation ou l'épaississement des cristallites.

La Figure 3.11 montre les images obtenues par Microscopie Électronique à Balayage (CryoMEB) après séchage d'une macrofibre creuse. Les images révèlent bien une organisation cœur/peau à l'extérieur de la fibre (Figure 3.11a). De plus, la surface de fracture dans la section de la macrofibre montre un relief relativement concentrique (Figure 3.11b), ce qui est cohérent avec la formation successive de couches de propriétés un peu différentes au cours du processus de neutralisation de la macrofibre. Sur la surface de rupture sagittale (Figure 3.11a), l'observation à l'échelle du micron montre que la structure la fibre est anisotrope, en liaison avec l'orientation pendant l'extrusion du collodion.



**Figure 3.11** Cliché de microscopie électronique à balayage à froid (Cryo-MEB) d'une fibre creuse de chitosane sèche (après traitement à l'étude à 50 °C pendant 2 jours) préparée à partir un collodion de  $c_p = 2 \%$  (m/m). *a*) Image du bord de la fibre (coupe sagittale ou longitudinale de la fibre) et *b*) image de la surface de facture dans la section de la macrofibre.



## **Conclusion**

L'analyse de la nanostructure par SAXS et WAXS offre des nouveaux éléments pour approfondir l'étude physico-chimique de formation des membranes et des espaces inter-membranaires dans le procédé de coagulation interrompue par le filage par voie humide. De cette manière, nous avons pu proposer un mécanisme et affiner une stratégie pour l'élaboration des fibres creuses multi-membranaire.

Contrairement aux procédés existants, la méthodologie présentée ici ne concerne pas l'utilisation ni d'une filière annulaire ni d'un agent coagulant interne car les membranes sont formées par le contrôle du phénomène physico-chimie de coagulation interrompue qui consiste à alterner des périodes de coagulation et de lavage. Chaque étape de coagulation/lavage induit la formation d'un assemblage de gels multicouches, alternant des couches de fortes et faibles cohésion. La neutralisation finale dans un bain coagulant plus concentré conduit à la formation des membranes et des espaces inter-membranaires.

L'étude microstructurale que nous avons débutée pourrait être complétée par des expériences complémentaires par diffraction du rayonnement synchrotron avec résolution spatiale dans la fibre, en particulier pour établir si une neutralisation simple ou interrompue conduit à des gradients de cristallinité.

De plus, ce procédé pourrait être étendu à une large gamme de polysaccharides incluant les polysaccharides naturels aptes à former un hydrogel physique comme les chitosanes de *DA* variables, les alginates, les pectines ainsi que les polysaccharides naturels modifiés chimiquement.

Les applications potentielles des fibres creuses multi-membranaires sont multiples. Elles peuvent être utilisées comme bioréacteurs implantables en ingénierie tissulaire,ensemencés par divers types cellulaires, capables d'un relargage contrôlé de principes actifs ou macromolécules d'intérêt biologique. Les tubes que nous avons élaborés peuvent également avoir des applications en tant que membranes de séparation et filtration pour des applications qui requièrent une compatibilité biologique.

.....

---

## 4. Étude des propriétés mécaniques des fibres de chitosane sous contrainte d'élongation uniaxiale

### 4.1 Contexte expérimental

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux propriétés mécaniques en liaison avec l'organisation structurale des hydrogels physiques de chitosane, lors d'un test mécanique de traction. L'objectif est d'étudier, d'un point de vue fondamental, le comportement mécanique et l'évolution de microstructure de nos biomatériaux afin de mieux contrôler les propriétés macroscopiques en relation avec une application biologique.

### 4.2 Conditions expérimentales

**Matière première.** Comme dans les sections précédentes, le chitosane que nous avons utilisé au cours de cette étude a été fourni par Mahtani Chitosan (Lot No. 113). Il est issu de plumes de calamars par désacétylation hétérogène en multi-étapes (cf. Étude Bibliographique 3.2.2) ayant une distribution statistique des résidus ainsi qu'un faible degré d'acétylation ( $DA = 1,5\%$ ) (cf. Étude Bibliographique 4.1). La masse molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) et l'indice de polymolécularité mesuré par chromatographie d'exclusion stérique (cf. Étude bibliographique Section 4.3.3) est de  $515\,000 \pm 51\,000$  g/mol et  $I_p = 1,6 \pm 0,3$ .

**Fibres de chitosane.** Les fibres de chitosane sont préparées par le procédé décrit dans la Section Expérimentale 1. Pour cette étude, nous avons élaboré des fibres pleines avec une concentration en polymère variable (ex : 2 –3 % (m/m)). Le débit d'extrusion des collodions pour la préparation de ces fibres a été ajusté pour des valeurs de 14,5 jusqu'à 70 m<sup>3</sup>/s.

**Essais de traction uniaxiale.** Les tests de traction ont été réalisés sur une machine de traction modèle Adamel-Lhomargy DY22 avec un capteur de force de capacité maximale de 5 N. Pour cette étude, les cinq fibres de diamètre  $\sim 2$  mm ont été découpées en morceaux de  $\sim 1,2$  cm de longueur, et placées rapidement (en une

---

minute) dans le dispositif de traction afin de prévenir la déshydratation du gel. La surface de la fibre étant très lisse, deux bouts de scotch double face (scotch 3M 12 mm de large, Ref. 34-8501-8644-5) ont été collés aux extrémités de la fibre pour ainsi éviter le glissement au cours du test de traction. Les fibres ont été placées entre des mors constitués de petites pinces à ressort ajustable, et bien adaptées pour ces échantillons de faible rigidité. Les essais ont consisté en un chargement simple à une vitesse de déplacement de traverse constante de 2 mm/min jusqu'à rupture. Il est également possible de réaliser des cycles de chargement/déchargement pour apprécier la composante anélastique et plastique de la déformation. Tous les essais ont été réalisés à température et à l'air ambiant. La loi de comportement mécanique est obtenue en traçant la courbe de la contrainte ( $\sigma = F/S_0$ ) en fonction de la déformation ( $\varepsilon = \Delta L/L_0$ ). D'autre part, le module d'Young (E) est déterminé par régression linéaire dans la gamme des faibles déformations, c'est-à-dire dans le domaine de déformation élastique.

**Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).** L'évolution de la nanostructure des fibres a été étudiée *in situ* pendant un essai de traction sous rayonnement synchrotron, en traction à une vitesse d'allongement de 5 mm/min. L'échantillon utilisé pour cette expérience était une fibre préparée à partir d'un collodion de  $c_p = 5\%$  (m/m) et neutralisée avec une solution aqueuse de NaOH 0,1 M.

L'analyse de synchrotron a été réalisée à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble, sur la ligne CRG française BM2-D2AM. Les mesures ont été faites avec un faisceau de  $100 \times 300 \mu\text{m}^2$  et l'énergie du photon incident de 16 keV. Le détecteur bi-dimensionnel (caméra CCD de Ropper Scientific) a été placé à 1,6 m de distance de l'échantillon, et des clichés ont été pris avec le faisceau perpendiculaire à l'axe du cylindre. L'essai mécanique a été réalisé grâce à une micromachine développée pour les essais *in situ* sous faisceau rayons X, avec la collaboration de Serge Etienne (EEIGM/Institut National Polytechnique de Lorraine, École des Mines de Nancy, Nancy — France). La vitesse de déplacement traverse est de 5mm/min, la longueur utile initiale ( $L_0$ ) est de 7,05 mm (voir Figure 4.1).

Les données expérimentales ont été corrigées de la sensibilité de chaque pixel et de la réponse du détecteur sans faisceau incident avec le logiciel *bm2img* développé au sein de la ligne. La distorsion introduite par la caméra a été également corrigée. De plus, nous avons soustrait le signal de fond correspondant au porte-échantillon vide. Enfin, la moyenne radiale autour du centre de l'image (position du centre du faisceau incident) est effectuée pour le standard de calibration de bécénate d'argent ( $\text{AgC}_{22}\text{H}_{43}\text{O}_2$ ) pour obtenir la relation entre le nombre de pixels et la valeur du vecteur de diffusion  $q$ . Les calculs de la moyenne radiale et le regroupement radial en 48 secteurs sont ensuite effectués en ligne avec le logiciel *bm2img* pour les échantillons de gels analysés, de façon à quantifier l'évolution structurale anisotrope.



**Figure 4.1** Schéma de montage de traction *in situ* pour la diffusion synchrotron aux petits angles. Les clichés ont été pris avec le faisceau perpendiculaire à l'axe de la fibre. Au premier plan : la micromachine de traction avec deux mors, avec des plaquettes avec lesquelles sont collées les fibres. On distingue le capteur de force à droite et la traverse mobile à gauche. L'ensemble est monté sur une platine de translation qui suit les mouvements de la machine pour rester au centre de l'échantillon. Au deuxième plan : le tube aval évacué (sous vide). Le faisceau de rayons X traverse l'échantillon. Les faisceaux transmis et diffusés pénètrent à travers la fenêtre de Kapton (film ambré en aval). On distingue au dessus une ouverture pour le photomultiplicateur aval. Le détecteur (Caméra RX 2D) est situé à 1,60 m de l'échantillon.

### 4.3 Résultats et discussions

Nous commencerons cette étude par une analyse préliminaire du comportement mécanique des fibres de chitosane lors d'un essai de traction uniaxiale.

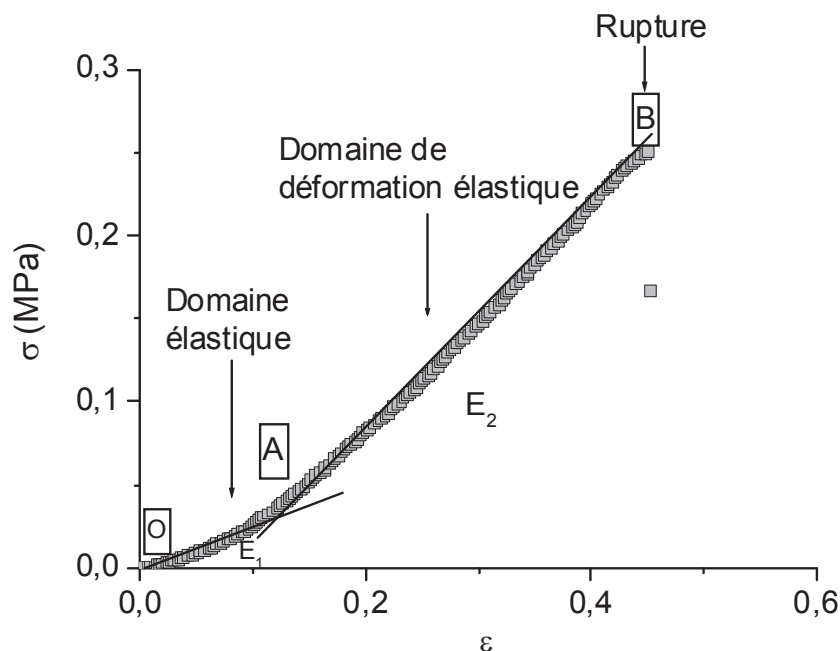
### 4.3.1 Essai traction uniaxiale

L'étude des propriétés mécaniques des fibres de chitosane a été réalisée par des tests mécaniques en traction uniaxiale. La Figure 4.2 montre les lois de comportement mécanique identifiées dans des fibres de chitosane, en traçant la contrainte nominale ( $\sigma = F/S_0$ ) en fonction de la déformation nominale ( $\varepsilon = \Delta L / L_0$ ). Cette courbe peut être divisée en différentes régions :

**OA** : domaine élastique à déformation réversible  $\sigma = E \cdot \varepsilon$  dont le coefficient de proportionnalité,  $E$ , correspond au module d'Young. Le module d'Young ( $E$ ) a été déterminé par régression linéaire dans le domaine de déformation élastique. Le point **A** marque la limite du domaine élastique ;

**AB** : domaine de déformation non réversible homogène

**B** : point de rupture de la fibre.

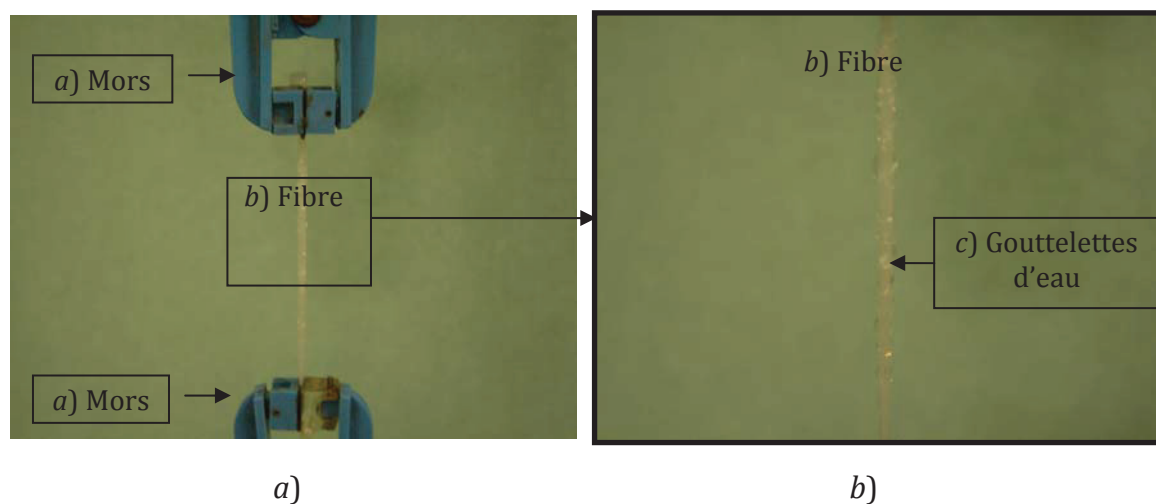


**Figure 4.2** Courbe de contrainte ( $\sigma$ ) en fonction de la déformation ( $\varepsilon$ ) d'une fibre pleine de chitosane ( $M_w = 515\,000$  g/mol et  $DA = 1,5\%$ ) préparée à partir d'un collodion de  $c_p = 2\%$  (m/m) et neutralisée avec une solution aqueuse de NaOH 1 M.

Lors de l'essai de traction différents régimes sont identifiés : le régime élastique ( $OA$ ), le régime pseudo-plastique ( $AB$ ) et le point de rupture ( $B$ ).

Il est intéressant de souligner que le passage du premier au deuxième régime s'est manifesté de façon macroscopique par l'expulsion d'eau de l'hydrogel vers la surface de ce dernier (voir Figure 4.3*b*). La limite entre ces deux régimes peut être estimée par le croisement des deux pentes (Figure 4.2). Ce paramètre varie selon les conditions d'élaboration des fibres mais il peut être estimé autour de  $\sigma_{\chi} = 0,15$  MPa. En ce point, la pression hydrostatique est donc de  $P = -(\sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_3)/3 \sim 50$  kPa qui peut être interprété comme la pression de gonflement du gel.

Les lois de comportement mécanique de membranes observées dans ce travail sont similaires à celles obtenues par d'autres études<sup>214, 215</sup> ayant permis d'identifier les deux régimes de la déformation.

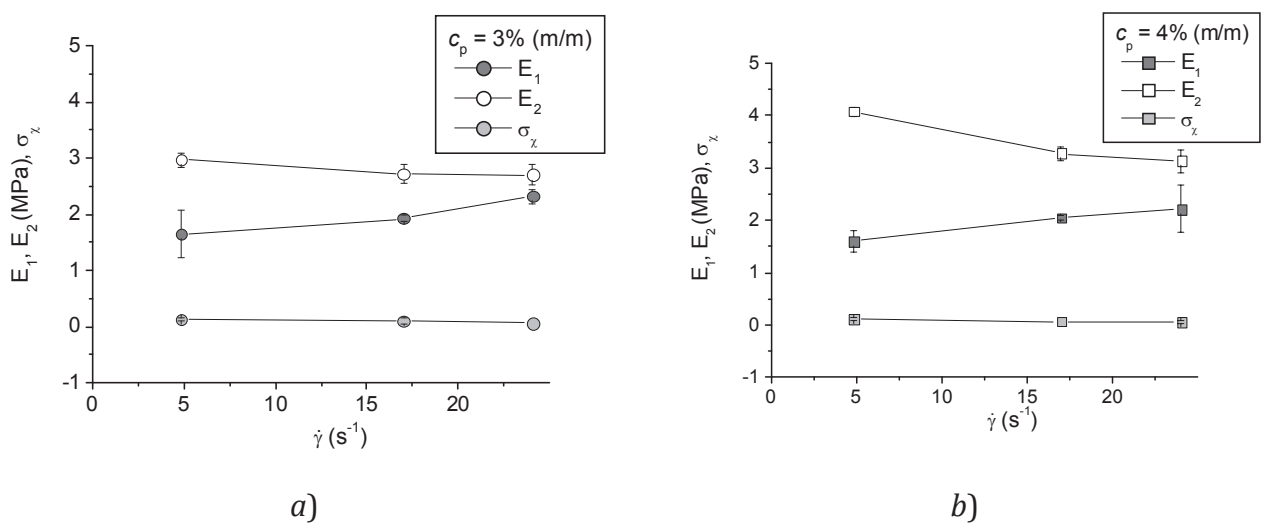


**Figure 4.3** a) Essais de traction uniaxiale d'une fibre pleine de chitosane. b) L'apparition de gouttelettes d'eau à la surface de la fibre de chitosane signale la transition entre le régime élastique et pseudo-plastique.

#### 4.3.2 Étude de l'influence des conditions expérimentales d'élaboration sur les propriétés mécaniques des fibres de chitosane

Dans cette partie, nous cherchons à analyser l'effet de différents paramètres de mise en œuvre sur les propriétés mécaniques des fibres cylindriques en hydrogel physique de chitosane.

Nous avons d'abord étudié les caractéristiques mécaniques des fibres obtenues à partir du filage de collodions avec différentes concentrations en polymère ( $c_p = 3$  et  $4\%$  (m/m)) et neutralisées dans un bain de NaOH 7 M. Le module d'Young a été calculé par régression linéaire des courbes de contrainte à la déformation pour le domaine de déformation linéaire ( $\varepsilon \approx 0,15$ ) et le domaine de déformation non linéaire ( $\varepsilon > 0,15$ ). Les résultats présentés sur la Figure 4.4 montrent que les valeurs du module d'Young ( $E_1$ ) calculées sur le domaine linéaire sont peu dépendantes de la concentration en polymère. Ce comportement peut s'expliquer par des contributions compensées au module élastique (contribution des cristallites, des interactions hydrophobes/hydrogène, et nœuds d'enchevêtrements) pour les différentes concentrations en polymère, ce qui se traduit par des modules d'élasticité comparables dans le régime de faibles déformations. Par contre, dans le domaine de déformation non linéaire ( $\varepsilon > 0,15$ ), le module d'Young ( $E_2$ ) augmente significativement en fonction de la fraction massique des fibres. Dans le domaine de déformation plastique, les propriétés de traction des fibres dépendent donc plus fortement de la morphologie, elle-même reliée à la taille des agrégats, cristallinité, la densité des enchevêtrements, la densité de nœuds physiques et des interactions du type H/H. En résumé, les propriétés mécaniques des fibres de chitosane dans le domaine non réversible peuvent être considérablement améliorées en augmentant la concentration en polymère du collodion.



**Figure 4.4** Représentation du module d'Young ( $E$ ), en fonction de la vitesse de cisaillement réelle dans la paroi de la filière ( $\dot{\gamma}$ ) pour des fibres pleines de chitosane ( $M_w$



= 515 000 g/mol et  $DA = 1,5 \%$ ) préparées à partir d'un collodion de a)  $c_p = 3 \%$  et b)  $4 \%$  (m/m) et neutralisées dans une solution aqueuse de NaOH 7 M. Le module d'Young est calculé à partir du domaine de déformation linéaire ( $E_1$ ,  $\blacksquare$ – et  $\bullet$ –) et non linéaire ( $E_2$ ,  $\blacksquare$ – et  $\circ$ –) des courbes de contrainte à la déformation. Les symboles  $\blacksquare$ – et  $\bullet$ – représentent le point de croisement ( $\sigma_x$ ) entre le domaine linéaire et non linéaire.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence l'importance des paramètres de filage, tel que le débit d'extrusion exprimé en termes de la vitesse de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ ). Pour cela, la vitesse de cisaillement générée dans la paroi interne de la filière a été calculée à partir de l'équation 1 :

$$\dot{\gamma}_{real} = \frac{3n+1}{4n} \left( \frac{4Q}{\pi R^3} \right) \quad \text{eq (0.28)}$$

où  $n$  est déduit de la relation de Carreau (cf. Section Expérimentale 1, Publication 1),  $R$  correspond au rayon de la filière et  $Q$  est le débit d'extrusion.

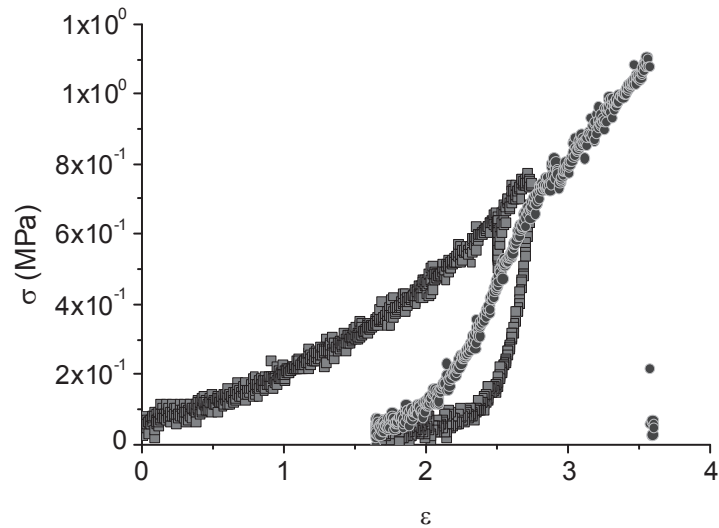
La Figure 4.4a-b montre que la valeur calculée du module d'Young  $E_1$  est fonction croissante de la vitesse de cisaillement dans la gamme  $0,010 - 0,05 \text{ s}^{-1}$ . Comme nous avons montré précédemment (Section Expérimentale 1), l'extrusion d'un collodion de chitosane à une vitesse d'extrusion élevée induit une orientation des chaînes et des cristallites, ce qui pourrait permettre d'expliquer les différences d'élasticité. Dans le domaine de déformation plastique, on observe par contre que les fibres préparées avec un débit d'extrusion faible présentent un module d'Young  $E_2$  élevé. Il a été constaté dans plusieurs études antérieures<sup>214, 323</sup> que le comportement non linéaire à fortes valeurs de déformation est lié à la redistribution de l'eau dans le matériau. Dans le cas de la fibre préparée à fort débit d'extrusion, l'évolution de morphologie qui accompagne la redistribution de l'eau est plus facile, peut-être à cause d'un degré d'interpénétration moindre des agrégats les uns avec les autres, puisque le gel s'est formé dans un contexte mécanique plus favorable au désenchevêtrement (vitesse de cisaillement élevée). Cependant, il nous semblait nécessaire d'approfondir, dans l'avenir, l'étude du régime de déformation plastique pour une large gamme de vitesse d'extrusion et concentration en polymère des fibres, en liaison avec la morphologie multi-échelle.

---

### 4.3.3 Traction d'éprouvettes d'hydrogels de chitosane *in situ* sous faisceau synchrotron (SAXS)

L'objectif de cette expérience est d'observer l'évolution de la morphologie des fibres sous contrainte mécanique. Pour cela, nous avons analysé en traction uniaxiale une fibre cylindrique d'hydrogel physique de chitosane préparée à partir d'un collodion de  $c_p = 5\%$  (m/m) et neutralisée avec une solution aqueuse NaOH 0,1 M. L'axe de traction est horizontal (voir Figure 4.1) avec une vitesse de déformation de 5 mm/min.

L'essai de traction a consisté à appliquer des cycles de charge/décharge. Dans le cas présenté sur la Figure 4.5, deux cycles ont été effectués. La décharge progressive à faibles déformations a permis de mettre en évidence le caractère recouvrable d'une partie de la déformation des hydrogels de chitosane. Il s'agit du comportement mécanique dissipatif qui permet la recouvrance d'une déformation en fonction du temps à la décharge. La superposition des deux courbes de charge/décharge montre un cycle dissipatif, qui pourrait être relié aux forces visqueuses du solvant dans le gel (effet viscoélastique), et à un caractère réversible des évolutions morphologiques induites par la déformation. A plus hautes déformations, la courbe de traction rejoint la courbe de premier chargement, là encore avec un caractère similaire à d'autres élastomères (élastomères chargés) présentant l'effet dissipatif de type Mullins<sup>4</sup>. Ces effets sont liés aux interactions entre charges et à la rupture des chaînes de liaison entre charges. Par analogie, dans notre cas, l'effet Mullins observé pourrait être aussi dû aux interactions inter-agrégats et à la rupture des chaînes pontantes inter-agrégats.

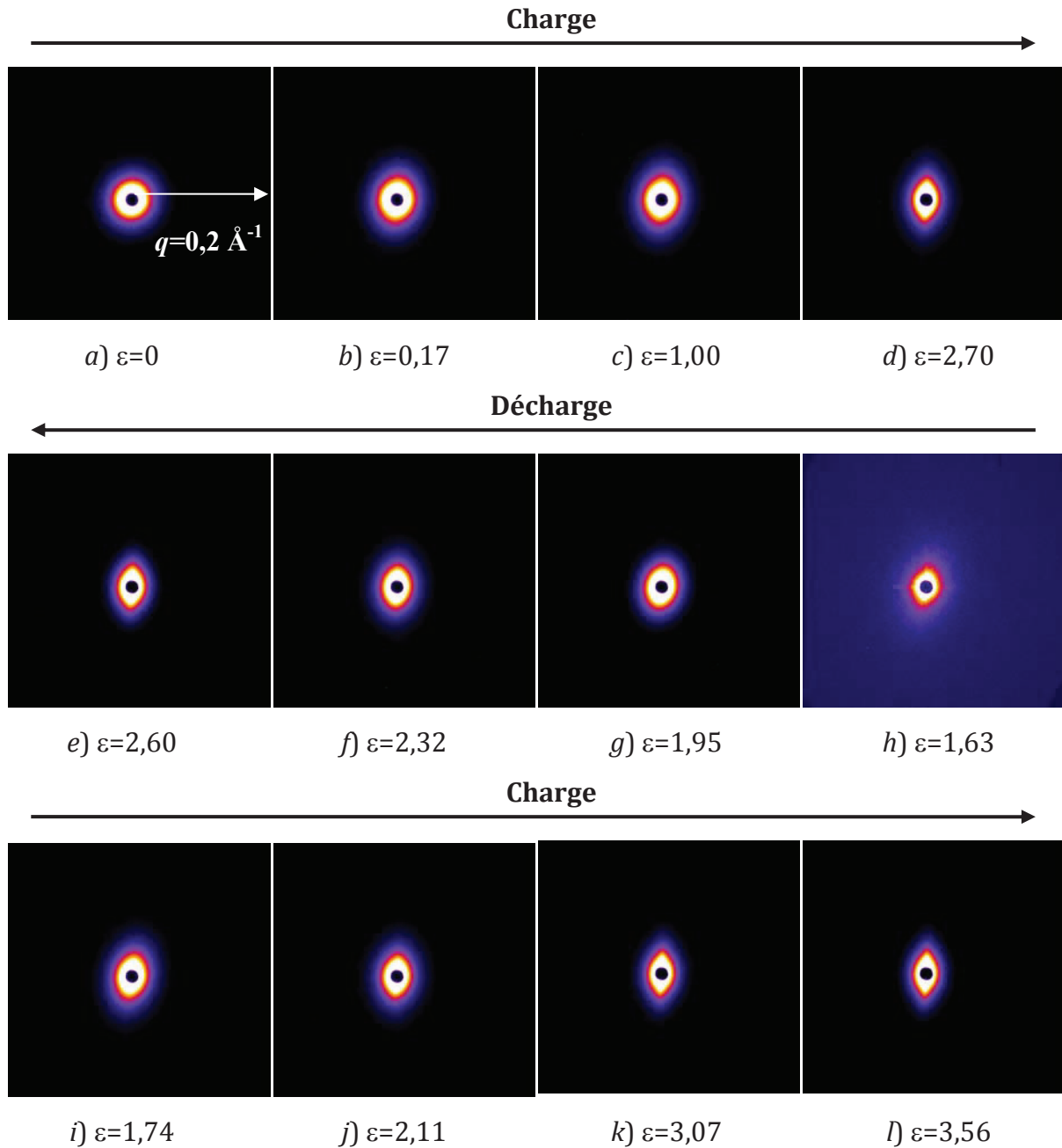


**Figure 4.5** Courbe de contrainte ( $\sigma$ ) en fonction de la déformation ( $\varepsilon$ ) avec cycles consécutifs de charge/décharge à une vitesse d'allongement de 5 mm/s. La fibre de chitosane ( $M_w = 515\,000$  g/mol et  $DA = 1,5\%$ ) a été préparée à partir d'un collodion de  $c_p = 5\%$  (m/m) et neutralisée avec une solution aqueuse de NaOH 0,1 M.

La Figure 4.6 présente les images SAXS 2D obtenues lors de l'essai de traction (temps de pose 1s). Au point de départ ( $\varepsilon = 0$ ), la fibre présente une structure isotrope (Figure 4.6a). Pendant le procédé de déformation du premier cycle ( $0 < \varepsilon < 1$ ), on observe l'allongement progressif des nanodomains présents dans la fibre dans l'axe de la traction et leur rétrécissement dans la direction perpendiculaire à la traction (Figure 4.6b-c). A fortes déformations ( $\varepsilon > 1$ ), les images de diffusion montrent une structure anisotrope (ou fibrillaire) qui est attribuée à une déformation ou réorientation des nanogels/agrégats dans l'axe d'étirement (Figure 4.6d). À une autre échelle, il est probable que cette transition structurale induit la formation de cristallites au sein de la fibre de chitosane : différentes études<sup>214, 215, 219</sup> réalisées sur le comportement mécanique en traction des hydrogels de chitosane décrivent la formation de cristallites aux fortes valeurs de déformation. Dans ce cas, l'étirement des chaînes sous contrainte mécanique induit la formation de l'allomorphe hydraté du chitosane, puisque la recristallisation sous étirage se produit dans un contexte fortement hydraté. Lors de la décharge, on observe une diminution de l'anisotropie, et donc un retour partiel de la morphologie vers un état plus ou moins isotrope (Figure 4.6e-h).

---

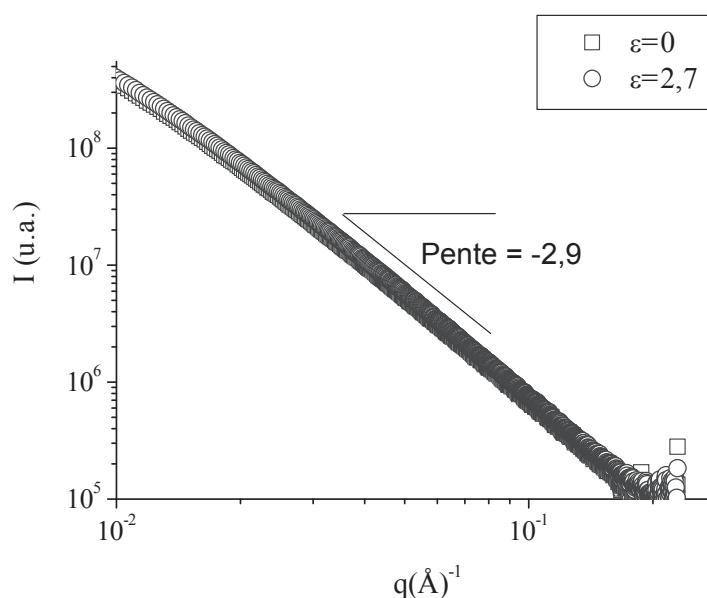
Dans le deuxième cycle de déformation, la morphologie structurale de la fibre est anisotrope depuis le début jusqu'au point de rupture (Figure 4.6*i-l*). La morphologie finale ressemble à celle d'un polyéthylène déformé dans la zone de striction<sup>324</sup>, lorsque la diffusion est dominée par la cavitation, ce qui peut s'expliquer là encore dans le cas des hydrogels par la structure de nano-agrégats enchevêtrés, et dont la sollicitation mécanique conduit à un allongement des cavités inter-agrégats et des agrégats en fibrilles. Cependant, on ne distingue pas de structure périodique dans les fibrilles, classiquement associées à l'alternance amorphe/cristal, puisque la concentration de l'agent coagulant est très faible.



**Figure 4.6** Images de diffusion SAXS 2D en fonction de la déformation ( $\varepsilon$ ) avec cycles consécutifs de charge/décharge à une vitesse d'allongement de 5 mm/s. La fibre de chitosane ( $M_w = 515\,000$  g/mol et  $DA = 1,5\%$ ) a été préparée à partir d'un collodion de  $c_p = 5\%$  (m/m) et neutralisée avec une solution aqueuse de NaOH 0,1 M.

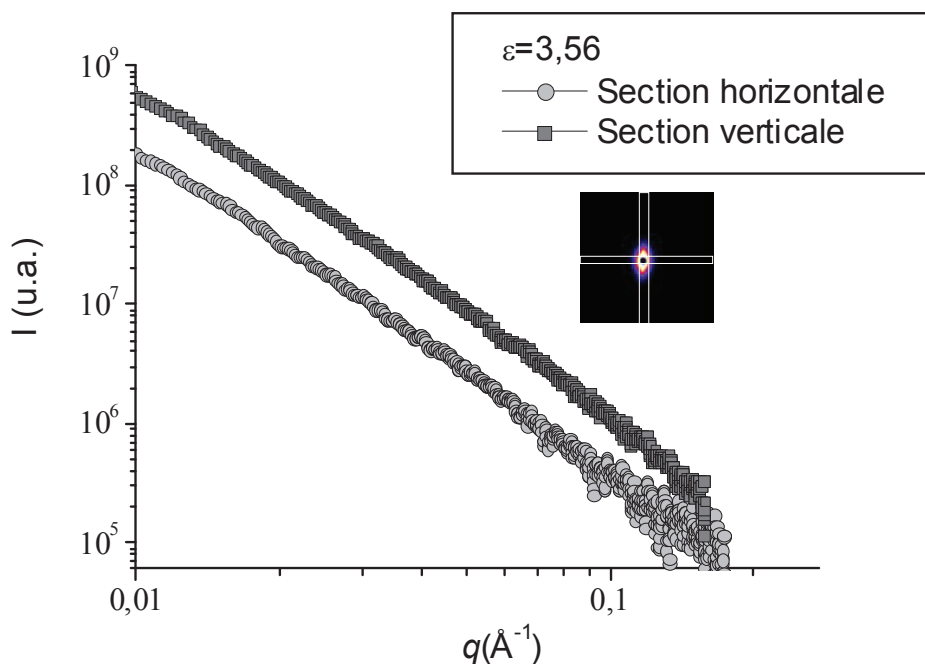
Ces images 2D peuvent être converties en diagramme de diffusion représentant l'intensité diffusée ( $I$ ) vs. le vecteur de diffusion ( $q$ ) (voir Figure 4.7 et 4.8). Globalement, les différents gels présentent une morphologie semblable entre eux. Aux petits angles, le comportement asymptotique du régime de Guinier ( $I = I_0 \exp(-$

$q^2 R_g^2/3$ ) pour les agrégats n'est pas visible dans la gamme de  $q$  étudiée ( $0,01$  et  $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ ), il doit être observable aux plus petits angles. L'ordre de grandeur de ces hétérogénéités des hydrogels aqueux doit être de quelques centaines de nanomètres, comme nous l'avons observé dans la Section Expérimentale 3. On n'observe pas non plus de contribution claire des cristaux, puisque les conditions de neutralisation que nous avons choisies conduisent à des gels faiblement cristallins.



**Figure 4.7** Représentation double logarithmique de l'intensité diffusée  $I$  en fonction du vecteur de diffusion  $q$  pour des fibres de chitosane ( $M_w = 515\,000 \text{ g/mol}$  et  $DA = 1,5 \%$ ) à différentes valeurs de déformation ( $\varepsilon$ ). La fibre analysée a été préparée à partir d'un collodion de  $c_p = 5 \%$  (m/m) dans un bain coagulant de NaOH  $0,1 \text{ M}$ .

L'analyse quantitative de l'évolution de la morphologie par la modélisation de la taille et des morphologies des gels n'a pas été étudiée davantage, puisque l'intervalle de  $q$  étudié est restreint par cette technique. Cependant, des différences dans les courbes de diffusion suggèrent un changement discret dans la nature structurale des nanoparticules de la fibre pendant l'essai de traction (Figure 4.8). Manifestement, le rayon de giration ( $R_g$ ) (des agrégats ou des cavités inter-agrégats) doit augmenter dans l'axe de la traction et diminuer dans la direction perpendiculaire à la traction justifiant la forme allongée des images de diffusion dans la direction perpendiculaire à l'axe de traction.



**Figure 4.8** Représentation double logarithmique de l'intensité diffusée  $I$  en fonction du vecteur de diffusion  $q$  pour des fibres de chitosane ( $M_w = 515\,000$  g/mol et  $DA = 1,5\%$ ) à  $\varepsilon = 3,56$ . Les diagrammes ont été obtenus en moyennant l'intensité sur un rectangle horizontal et vertical. La fibre analysée a été préparée à partir d'un collodion de  $c_p = 5\%$  (m/m) dans un bain coagulant de NaOH 0,1 M.

#### 4.3.4 Étude propriétés mécaniques des différentes fibres de chitosane

Les propriétés mécaniques ont été évaluées pour les différentes fibres préparées avec  $c_p = 2\%$  (m/m) et neutralisées dans un bain de soude (NaOH 1M) : 1) fibres pleines de chitosane, 2) fibres creuses, 3) fibres creuses déshydratées (voir Figure 4.9) et 4) fibres creuses déshydratées et réhydratées dans l'eau distillée pendant 24 h. Dans le Tableau 4.1 sont regroupées les valeurs du module d'Young, de la contrainte et de la déformation à la rupture. L'état d'hydratation permet une variation importante des propriétés mécaniques des matériaux.

**Tableau 4.1.** Propriétés mécaniques des fibres de chitosane ( $c_p = 2 \%$  (m/m),  $M_w = 515\,000$  g/mol,  $DA = 1,5 \%$ ).

Échantillon	Diamètre externe (mm)	Diamètre interne (mm)	E (MPa)	$\sigma$ rupture (MPa)	$\epsilon$ rupture (%)
Fibres pleines	1,9	-----	$0,6 \pm 0,08$	$0,2 \pm 0,01$	$45,8 \pm 0,08$
Fibres creuses	1,9	1,6	$1,8 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,08$	$56,4 \pm 8,5$
Fibres creuses déshydratées	1,4	1,3	$13,4 \pm 1,8$	$2,5 \pm 0,41$	$26,1 \pm 2,4$
Fibres creuses déshydratées et réhydratées	1,4	1,3	$6,2 \pm 2,5$	$1,0 \pm 0,05$	$26,2 \pm 9,7$



**Figure 4.9** Exemple de fibre creuse déshydratée par traitement thermique ( $50^\circ \text{C}$ ) avec l'utilisation d'un moule tubulaire pendant le séchage.

Les fibres creuses déshydratées sont plus rigides en raison de l'absence d'eau qui sert comme plastifiant. Les résultats préliminaires présentés ci-dessus sont prometteurs et laissent entrevoir des applications variées dans le développement des matériaux à base des hydrogels de chitosane.



.....

---

## Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence le rôle spécifique de la concentration en polymère et de la vitesse d'extrusion sur les propriétés mécaniques et la morphologie des fibres pleines de chitosane. En ajustant la concentration en polymère, les fibres de chitosane préparées par la méthode de filage par voie humide présentent des propriétés de viscoélasticité intéressantes pour leur application comme tubes pour l'ingénierie tissulaire (ex : guide pour la régénération nerveuse ou supports pour des vaisseaux sanguins artificiels). De plus, la vitesse d'extrusion du collodion peut être un autre paramètre « procédé » pour l'amélioration du comportement en traction des fibres.

Sur le plan plus fondamental, nous avons montré que la déformation des fibres de chitosane sous sollicitation de traction uniaxiale résulte de la somme des différents événements : la déformation doit être discutée à l'échelle des cristallites, mais aussi et surtout à l'échelle des nanogels agrégats, mais aussi par la redistribution de l'eau au sein du matériau et probablement la formation de nano-cavités inter-agrégats riches en eau.

Cependant, dû à la complexité du système, il serait intéressant de compléter ces travaux de traction par une étude plus systématique (diffusion/diffraction RX et diffusion de lumière) en tenant compte de la nature et la concentration du bain coagulant sur les propriétés mécaniques de fibres. L'objectif final serait de proposer une stratégie générale pour l'optimisation les caractéristiques structurales des fibres de chitosane par la méthode de filage par voie humide.



# - Conclusion générale -



## Conclusion générale

Nous avons proposé dans ce travail la conception d'un procédé en continu pour la mise en œuvre d'un hydrogel physique de chitosane sous forme tubulaire avec une ou plusieurs membranes séparées. Notre approche est guidée par le concept de matériau « bio-inspiré leurre des milieux biologiques ». Comme nous avons évoqué dans l'étude bibliographique, la finalité de cette approche est d'obtenir un dispositif constitué d'un biomatériau bioactif et biorésorbable pour son application comme vaisseau sanguin artificiel. Idéalement, ce dispositif tubulaire multi-membranaire vise à favoriser la reconstruction des tissus multicouches aux différentes échelles commençant au niveau moléculaire jusqu'à l'échelle macroscopique ; finalement, ce matériau bioactif se dégradera en résidus métabolisables par l'action du système vivant, par exemple le lysozyme.

La stratégie expérimentale que nous avons adoptée au cours de ce travail a consisté en premier lieu à mettre au point un nouveau procédé de filage du chitosane par voie humide dans des conditions de coagulation interrompue permettant l'élaboration des fibres creuses. Dans une première étape, nous avons d'abord établi les conditions expérimentales « optimales » des différents paramètres de filage (concentration en polymère du collodion, débit d'extrusion, concentration du bain coagulant, vitesse d'étirage) pour la formation d'une macrofibre homogène. Puis, nous avons ajusté les paramètres de coagulation permettant la réalisation d'objets creux à partir d'un macrofilament liquide homogène de chitosane, en se basant sur l'étude physico-chimique de la cinétique de coagulation du chitosane au cours d'un procédé de filage par voie humide.

Sur le plan technique, les études menées dans cette première partie expérimentale ont permis de proposer un nouveau procédé de formation des fibres creuses, en supprimant l'utilisation de deux éléments primordiaux de la plupart des procédés décrits dans la littérature : une sortie filière annulaire et un agent coagulant interne. En effet, ce procédé ne concerne qu'un seul bain de coagulation externe permettant de régler le diamètre interne de la fibre en fonction du degré de neutralisation du collodion.

Sur le plan théorique, cette étude nous a permis d'apporter des nouveaux éléments clés sur le procédé de filage par voie humide et sur le mécanisme de coagulation du chitosane. Nous avons d'abord trouvé que l'influence du débit d'extrusion sur le phénomène de gonflement du collodion (die swell) en sortie filière ne peut pas être prédite facilement par des modèles rhéologiques de relaxation en sortie de filière (modèle de Tanner). Il s'avère que le gonflement en sortie filière résulte d'un mécanisme complexe qui implique le comportement rhéologique du collodion en sortie filière et les interactions physico-chimiques entre chaînes associées à la coagulation du collodion dans le bain coagulant. D'autre part, cette étude nous a permis de démontrer que la concentration en polymère du collodion et la concentration du bain coagulant sont deux paramètres de coagulation importants qui conditionnent le comportement de divers événements physico-chimiques liés au phénomène de la coagulation, c'est-à-dire la cinétique de coagulation du chitosane dans un procédé de filage, le temps d'induction avant coagulation, la constante de diffusion, la concentration critique de coagulation, etc. Par l'étude et puis le contrôle de la cinétique de coagulation, nous avons pu parvenir à notre objectif de mettre au point le procédé de filage dans des conditions de coagulation interrompue.

Le deuxième volet de notre étude a eu pour but l'étude de l'influence de différents paramètres de coagulation sur la morphologie des hydrogels physiques à l'échelle du micron : la nature et la concentration du bain coagulant, la viscosité et la composition du collodion, la méthodologie de gélification. Dans une certaine mesure, cette étude montre la versatilité du chitosane pour former une grande variété des structures morphologiques en ajustant une série de paramètres physico-chimiques de coagulation. Cette partie est particulièrement importante puisque les hydrogels de morphologies différentes sont susceptibles de présenter des comportements biologiques différents.

En se basant sur les résultats physico-chimiques de la première partie, nous avons pu généraliser l'approche de filage par voie humide par coagulation interrompue (interrupted wet-spinning) pour la fabrication de fibres multi-membranaires de chitosane en mettant au point un procédé de neutralisation à plusieurs étapes au moyen de bains successifs conduisant à une neutralisation séquencée.

Les perspectives proposées par ce travail sont très larges, on peut envisager la régénération de vaisseaux sanguins, de la peau et des connexions nerveuses en cultivant les différents types cellulaires adaptés à la régénération de chaque tissu. Cette architecture multi-membranaire ouvre également des portes pour des domaines d'applications annexes, comme son utilisation comme bioréacteur ou membrane de séparation.





---

## **- Références -**



- (1) Lender, T.; Delavault, R.; Le Moigne, A. *Dictionnaire de biologie*; 3 ed.; Presses Universitaires de France-PUF: 1994; p 655.
- (2) Mwenifumbo, S.; Stevens, M. M. Part II. Bio-nano interfaces. In *Biomedical Nanostructures*; Gonsalves, K. E. H., Craig R.; Laurencin, Cato T.; Nair, Lakshmi S, Ed.; John Wiley & Sons: 2007; pp 225-260.
- (3) Cooper, G. M. *La cellule: Une approche moléculaire*; De Boeck Université: 1999; p 706.
- (4) Davies, J. A.; Fisher, C. E.; Barnett, M. W. *Biochemical society* **2001**, 29 (Pt 2), 166-171.
- (5) Praillet, C.; Grimaud, J.-A.; Lortat-Jacob, H. *Médecine/Sciences* **1998**, 4 (14).
- (6) Grant, A.; Waugh, A. *Ross et Wilson - Anatomie et physiologie normales et pathologiques*; Elsevier Masson: 2007; p 550.
- (7) Pocock, G.; Richards, C. D. *Physiologie humaine : les fondements de la médecine*; Elsevier Masson: 2004; p 638.
- (8) Lévy, B. Circulation. In *Physiologie humaine*; 3ème édition ed.; Guénard, H., Ed.; Editions Pradel: 2001; p 225.
- (9) Schünke, M.; Schulte, E.; Ross, L. M.; Schumacher, U.; Lamperti, E. D. *Thieme atlas of Anatomy : General Anatomy and musculoskeletal system*; Thieme: 2006; p 541.
- (10) Carlson, B. *Principles of regenerative biology*; Academic Press: 2007; p 379.
- (11) Carlson, B. M. *Wound repair and regeneration* **1998**, 6 (5), 425-433.
- (12) Marieb, E. N.; Lachaine, R. *Biologie humaine: Anatomie et physiologie*; De Boeck Université: 2000; p 560.
- (13) Stegemann, J. P.; Kaszuba, S. N.; Rowe, S. L. *Tissue Eng.* **2007**, 13 (11).
- (14) Langer, R.; Vacanti, J. P. *Science* **1993**, 260 (5110), 920.
- (15) Hacker, M. C.; Mikos, A. G. Synthetic polymers. In *Principles of regenerative medicine*; Atala, A.; Lanza, R.; Thomson, J.; Nerem, R., Eds.; 2008; pp 605-635.

- (16) Rashid, S. T.; Salacinski, H. J.; Fuller, B. J.; Hamilton, G.; Seifalian, A. M. *Cell Prolif.* **2004**, *37* (5), 351-366.
- (17) Weinberg, C.; Bell, E. *Science* **1986**, *231*, 397-400.
- (18) L'Heureux, N.; Germain, L.; Labbe, R.; Auger, F. *J. Vasc. Surg.* **1993**, *17*, 499-509.
- (19) Neidert, M.; Lee, E.; Oegema, T.; Tranquillo, R. *Biomaterials* **2002**, *23* (3717-3731).
- (20) Seliktar, D.; Black, R.; Vito, R.; Nerem, R. *Ann Biomed Eng* **2000**, *28*, 351-362.
- (21) Nikalson, L.; Abbott, W.; J, G. *J. Vasc. Surg.* **2001**, *33*, 628-638.
- (22) Nikalson, L.; Gao, J.; Abbott, W. *Science* **1999**, *284*, 489-493.
- (23) L'Heureux, N.; Paquet, S.; Labbe, R.; Germain, L.; Auger, F. *FASEB J.* **1998**, *12*, 47-56.
- (24) Rémi-Zolghadri, M.; Laganière, J.; Oligny, J.-F.; Germain, L.; Auger, F. *A. J. Vasc. Surg.* **2004**, *39* (3), 613-620.
- (25) L'Heureux, N.; Dusserre, N.; Konig, G.; Victor, B.; Keire, P.; Wight, T. N.; Chronos, N. A. F.; Kyles, A. E.; Gregory, C. R.; Hoyt, G.; Robbins, R. C. *Nature medicine* **2006**, *12* (3), 361-365.
- (26) Montembault, A.; Tahiri, K.; Korwin-Zmijowska, C.; Chevalier, X.; Corvol, M. T.; Domard, A. *Biochimie* **2006**, *88* (5), 551-564.
- (27) Ladet, S.; David, L.; Domard, A. *Nature* **2008**, *452* (7183), 76-79.
- (28) Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. *Biomaterials* **2005**, *26* (14), 1633-1643.
- (29) Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. *Biomaterials* **2005**, *26* (8), 933-943.
- (30) Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 653-662.
- (31) Yuan, Y.; Zhang, P.; Yang, Y.; Wang, X.; Gu, X. *Biomaterials* **2004**, *25* (18), 4273-4278.
- (32) Chatelet, C.; Damour, O.; Domard, A. *Biomaterials* **2001**, *22* (3), 261-268.

- (33) Chupa, J. M.; Foster, A. M.; Sumner, S. R.; Madihally, S. V.; Matthew, H. W. T. *Biomaterials* **2000**, *21* (22), 2315-2322.
- (34) Rao, S. B.; Sharma, C. P. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **1997**, *34* (1), 21-28.
- (35) Vårum, K. M.; Myhr, M. M.; Hjerde, R. J. N.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Res.* **1997**, *299* (1-2), 99-101.
- (36) Tomihata, K.; Ikada, Y. *Biomaterials* **1997**, *18* (7), 567-575.
- (37) Gorzelanny, C.; Pöppelmann, B.; Strozyk, E.; Moerschbacher, B. M.; Schneider, S. W. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (10), 3035-3040.
- (38) Vander, P.; Vårum, K. M.; Domard, A.; El Gueddari, N. E.; Moerschbacher, B. M. *Plant. Physiol.* **1998**, *118* (4), 1353-1359.
- (39) Malette, W. G.; Quingley, H. J.; Gaines, R. D.; Johnson, N. D.; Rainer, W. G. *Ann. Thorac. Surg.* **1983**, *36*, 55-58.
- (40) Hirano, S.; Seino, H.; Akiyama, Y.; Nonaka, I. *Polym. Mater. Sci. Eng.* **1988**, *59*, 897-901.
- (41) Aiba, S. *Int. J. Biol. Macromol* **1992**, *14* (4), 225-228.
- (42) Hirano, S.; Tsuchida, H.; Nagao, N. *Biomaterials* **1989**, *10*, 574-576.
- (43) Suh, J.-K. F.; Matthew, H. W. T. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2589-2598.
- (44) Hon, D. N. S. Chitin and chitosan: Medical applications. In *Polysaccharides in medical applications*; Dimitriu, S., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: 1996; p 637.
- (45) Okamoto, Y.; Watanabe, M.; Miyatake, K.; Morimoto, M.; Shigemasa, Y.; Minami, S. *Biomaterials* **2002**, *23* (9), 1975-1979.
- (46) Denuziere, A.; Ferrier, D.; Damour, O.; Domard, A. *Biomaterials* **1998**, *19*, 1275-1285.
- (47) Mori, T.; Irie, Y.; Nishimura, S.-I.; Tokura, S.; Matsuura, M.; Okumura, M.; Kadosawa, T.; Fujinaga, T. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *43* (4), 469-472.

- (48) Denuziere, A.; Ferrier, D.; Damour, O.; Domard, A. *Biomaterials* **1998**, *19*, 1275-1285.
- (49) Lahiji, A.; Sohrabi, A.; Hungerford, D. S.; Frondoza, C. G. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2000**, *51*, 586-595.
- (50) Prasitsilp, M.; Jenwithisuk, R.; Kongsuwan, K.; Damrongchai, N.; Watt, P. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2000**, *11*, 773-778.
- (51) Rabea, E. I.; Badawy, M. E.-T.; Stevens, C. V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1457-1465.
- (52) Helander, I. M.; Nurmiäho-Lassila, E. L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71*, 235-244.
- (53) No, H. K.; Park, N. Y.; Lee, S. H.; Meyers, S. P. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *74*, 65-72.
- (54) Chung, Y.-c.; Su, Y.-p.; Chen, C.-c.; Jia, G.; Wang, H.-l.; Wu, J. C. G.; Lin, J.-g. *Acta Pharmacol Sin* **2004**, *25*, 932-936.
- (55) Zheng, L.-Y.; Zhu, J.-F. *Carbohydr Polym* **2003**, *54*, 527-530.
- (56) Strand, S. P.; Vårum, K. M.; Østgaard, K. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, *27* (1), 71-81.
- (57) Jung, B.-O.; Kim, C.-H.; Choi, K.-S.; Lee, Y. M.; Kim, J.-J. *J. Polym. Appl. Sci.* **1999**, *72*, 1713-1719.
- (58) Strand, S. P.; Vandvik, M. S.; Vårum, K. M.; Østgaard, K. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 126-133.
- (59) Hudson, S. M.; Jenkins, D. W., Chitin and chitosan. In *Encyclopedia of polymer science and technology*, John Wiley & Sons Inc: 2002.
- (60) Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; Jeon, Y.-J. *Trends in Food Science & Technology* **1999**, *10* (2), 37-51.
- (61) Ravi Kumar, M. N. V. *Reactive and Functional Polymers* **2000**, *46* (1), 1-27.

- (62) Domard, A.; Domard, M. Chitosan: Structure–Properties Relationship and Biomedical Applications. In *Biomaterials*; Dimitriu, S., Ed.; M. Dekker Press: New York, 2001; p 187.
- (63) Lamarque, G.; Cretenet, M.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (3), 1380-1388.
- (64) Lamarque, G.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (3), 992-1001.
- (65) Lamarque, G.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (5), 1899-1907.
- (66) Ottoy, M. H.; Vårum, K. M.; Smidsrød, O. *Carbohydrate Polymers* **1996**, *29* (1), 17-24.
- (67) Sannan, T.; Kurita, K.; Iwakura, Y. *Die Makromolekulare Chemie* **1975**, *176* (4), 1191-1195.
- (68) Sannan, T.; Kurita, K.; Iwakura, Y., Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. In 1976; Vol. 177, pp 3589-3600.
- (69) Anthonsen, M. W.; Vårum, K. M.; Hermansson, A. M.; Smidsrød, O.; Brant, D. A. *Carbohydr. Polym.* **1994**, *25* (1), 13-23.
- (70) Vachoud, L. Étude de la relation structure-propriétés des gels de chitine. Université Lyon 1, Villeurbanne, 1999.
- (71) Aiba, S. *Int. J. Biol. Macromol* **1991**, *13*, 40-44.
- (72) Vårum, K. M.; Smidsrød, O. Structure-Property Relationship in Chitosan In *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versality*; Dumitriu, S., Ed.; Marcel Dekker, Inc: University of Sherbrooke, Canada, 2004.
- (73) Peter, M. G. Chitin and Chitosan from Animal Sources. In *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production, and Patents*; Steinbüchel, A.; Rhee, S. K., Eds.; WILEY-VCH: 2005; Vol. 1, p 115.
- (74) Kordestani, S. S.; Kennedy, J. F. *Carbohydr. Polym.* **1999**, *39* (4), 383-383.
- (75) <http://www.researchandmarkerts.com/reports/c53042>



- (76) Roberts, G. A. F. In *Chitosan production routes and their role in determining the structure and properties of the product*, 7th ICCC, Lyon, France, 1997; Domard, A., Roberts, G.A.F., Vårum, K.M. , Ed. Lyon, France, 1997; pp 22-31.
- (77) No, H. K.; Meyers, S. P. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **1995**, 4 (2).
- (78) Teng, W. L.; Khor, E.; Tan, T. K.; Lim, L. Y.; Tan, S. C. *Carbohyd. Res.* **2001**, 332, 305-316.
- (79) Svergun, D. I.; Becirevic, A.; Schrempf, H.; Koch, M. H. J.; Grüber, G. *Biochemistry* **2000**, 39, 10677-10683.
- (80) Lamarque, G. F.; Crenet, M. F.; Viton, C. F.; Domard, A. F. Method of producing totally-desacetylated chitosan with a high molecular weight. PCT/FR2006/050191, 2005.
- (81) Klaveness, J. N.; Brudeli, B. N.; Smidsrod, O. N.; Varum, K., Morten; (NO); Mustaparta, E. N. Pharmaceutical compositions comprising an active agent and chitosan for sustained drug release of mucoadhesion. 2004.
- (82) Nemtsev, S. V.; Gamzazade, A. I.; Rogozhin, S. V.; Bykova, V. M.; Bykov, V. P. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2002**, 38 (6), 521-526.
- (83) Sannan, T.; Kurita, K.; Iwakura, Y. *Die Makromolekulare Chemie* **1976**, 177 (12), 3589-3600.
- (84) Kurita, K.; Sannan, T.; Iwakura, Y. *Die Makromolekulare Chemie* **1977**, 178 (12), 3197-3202.
- (85) Tsigos, I.; Martinou, A.; Kafetzopoulos, D.; Bouriotis, V. *Trends in Biotechnology* **2000**, 18 (7), 305-312.
- (86) Lamarque, G.; Chaussard, G.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2007**, 8 (6), 1942-1950.
- (87) Domard, A.; Chaussard, G. In *New approach in the study of the production of chitosan from squid pens: kinetics, thermodynamic and structural aspects*, Advances in Chitin Science. 5 ( 5th. Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium), Bangkok, 2003; Suchiva, K.; Chandrkranchang, S.; Methacanon, P.; Peter, M. G., Eds. Bangkok, 2003.

- (88) Hirano, S.; Zhang, M.; Chung, B. G.; Kim, S. K. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *41* (2), 175-179.
- (89) Kubota, N.; Eguchi, Y. *Polym J* **1997**, *29* (2), 123-127.
- (90) Kubota, N.; Tatsumoto, N.; Sano, T.; Toya, K. *Carbohydr. Res.* **2000**, *324* (4), 268-274.
- (91) Vachoud, L.; Zydowicz, N.; Domard, A. *Carbohydr. Res.* **2000**, *326* (4), 295-304.
- (92) Sorlier, P. Etude physico-chimique de solutions de chitosane et relation avec ses propriétés antigéniques. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, 2002.
- (93) Hirano, S.; Ohe, Y. *Carbohydr. Res.* **1975**, *41* (1), C1-C2.
- (94) Popa-Nita, S. Continuum d'organisation structurale de la solution à l'hydrogel physique de polysaccharides. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, 2008.
- (95) Popa-Nita, S.; Lucas, J.-M.; Ladavière, C.; David, L.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (5), 1203-1211.
- (96) Nanjo, F.; Katsumi, R.; Sakai, K. *Analytical Biochemistry* **1991**, *193* (2), 164-167.
- (97) Terayama, H. *J. of Polym. Sci.* **1952**, *8*, 243-253.
- (98) Muzzarelli, R. A. A. *Chitin*; Pergamon Press: New York: 1977.
- (99) Domard, A.; Vasseur, V. *Int J of Biol Macromol* **1991**, *13*, 366-368.
- (100) Prochazkova, S.; Vårum, K. M.; Ostgaard, K. *Carbohydrate Polymers* **1999**, *38* (2), 115-122.
- (101) Aiba, S. *Int J of Biol Macromol* **1986**, *8*, 173-176.
- (102) Pedroni, V. I.; Gshaidar, M. E.; Schulz, P. C. *Macromol. Biosci.* **2003**, *3*, 531-534.
- (103) Miya, M.; Iwamoto, R.; Yoshikawa, S.; Mima, S. *Int J of Biol Macromol* **1980**, *2*, 323-324.

- (104) Baxter, A.; Dillon, M.; Taylor, K. D. A.; Roberts, G. A. F. *Int J of Biol Macromol* **1992**, *14*, 166-169.
- (105) Domard, A.; Cartier, N. *Int J of Biol Macromol* **1987**, *9*, 333-336.
- (106) Hirai, A.; Odani, H.; Nakajima, A. *Polymer Bulletin* **1991**, *26* (1), 87-94.
- (107) Bosso, C.; Domard, A. *Org Mass Spectr* **1992**, *27*, 799-806.
- (108) Bahrke, S.; Einarsson, J. M.; Gislason, J.; Haebel, S.; Letzel, M.; Peter-Katalinic, J.; Peter, M. G. *Biomacromol* **2002**, *3*, 696-704.
- (109) Niola, F.; Basora, N.; Chornet, E.; Vidal, P.-F. *Carbohydr Res* **1993**, *238*, 1-9.
- (110) Kasaai, M. R.; Arul, J.; Charlet, G. *J of Appl Polym Sci Part B* **2000**, *38*, 2591-2598.
- (111) Hirai, A.; Odani, H.; Nakajima, A. *Polym. Bull.* **1991**, *26* (1), 87-94.
- (112) Vårum, K. M.; Antohonsen, M. W.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211* (1), 17-23.
- (113) Schatz, C.; Viton, C.; Delair, T.; Pichot, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (3), 641-648.
- (114) Sorlier, P.; Denuziere, A.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (3), 765-772.
- (115) Sorlier, P.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (6), 1336-1342.
- (116) Domard, A.; Domard, M. Chitosan: Structure-Properties Relationship and Biomedical Applications. In *Polymeric Biomaterials*; 2nd ed.; Dumitriu, S., Ed.; Marcel Dekker: New York, 2002; pp 187-212.
- (117) Chang, K. L. B.; Tsai, G.; Lee, J.; Fu, W. R. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 327-332.
- (118) Sashiwa, H.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y.; Ogawa, R.; Tokura, S. *Carbohydr. Polym.* **1991**, *16* (3), 291-296.
- (119) Vårum, K. M.; Anthonsen, M. W.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Res.* **1991**, *217*, 19-27.

- (120) Vårum, K. M.; Ottøy, M. H.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Polym.* **1994**, *25* (2), 65-70.
- (121) Aiba, S. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 241-245.
- (122) Aiba, S.-i. *Int. J. Biol. Macromol.* **1989**, *11* (4), 249-252.
- (123) Shigemasa, Y.; Saito, K.; Sashiwa, H.; Saimoto, H. *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, *16*, 43-48.
- (124) Ottoy, M. H.; Vårum, K. M.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Polym.* **1996**, *29* (1), 17-24.
- (125) Sashiwa, H.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y.; Tokura, S. *Carbohydr. Res.* **1993**, *242*, 167-172.
- (126) Rinaudo, M.; Domard, A. Solution properties of chitosan. In *G. Skjåk-Bræk; Sandford, T. A. a. P., Ed.; Elsevier Applied Science: London 1989; pp 71-86.*
- (127) Lamarque, G.; Lucas, J. M.; Viton, C.; Domard, A. **2005**, *6* (1), 131-142.
- (128) Anthonsen, M. W.; Varum, K. M.; Smidsrod, O. *Carbohydr. Polym.* **1993**, *22* (3), 193-201.
- (129) Rinaudo, M.; Milas, M.; Dung, P. L. *International Journal of Biological Macromolecules* **1993**, *15* (5), 281-285.
- (130) Wang, W.; Bo, S.; Li, S.; Qin, W. *International Journal of Biological Macromolecules* **1991**, *13* (5), 281-285.
- (131) Berth, G.; Dautzenberg, H. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *47* (1), 39-51.
- (132) Ghobad G. Maghami, G. A. F. R. *Die Makromolekulare Chemie* **1988**, *189* (1), 195-200.
- (133) Elias, H. G. *Macromolecules: Volume 3: Physical Structures and Properties*; Wiley-VCH: 2008; p 699.
- (134) Terbojevich M.; Cosani A.; Focher B.; Naggi A.; Torri G. *Carbohydrate Polymers* **1992**, *18*, 35.
- (135) Terbojevich M.; Cosani A.; Conio G.; Marsano E.; Bianchi E. *Carbohydrate Research* **1991**, *209* (251).

- (136) Brugnerotto J. ; Desbrières J. ; Roberts G. ; Rinaudo M. *Polymer* **2001**, *42*, 9921-9927.
- (137) Beri R.J.; Walker J.; Reese E.T.; Rollings J.E. *Carbohydrate Research* **1996**, *238*, 11.
- (138) Domard, A.; Cartier, N. *Polym.Comm.* **1991**, *32*, 116-119.
- (139) Domard, A.; Rinaudo, M. *Polym Comm* **1984**, *25*, 55-58.
- (140) Ottøy, M. H.; Vårum, K. M.; Christensen, B. E.; Anthonsen, M. W.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Polym.* **1996**, *31* (4), 253-261.
- (141) Boucard, N.; David, L.; Rochas, C.; Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (4), 1209-1217.
- (142) Sorlier, P.; Rochas, C.; Morfin, I.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (4), 1034-1040.
- (143) Schatz, S.; Pichot, C.; Delair, T.; Viton, C.; Domard, A. *Langmuir* **2003**, *19* (23), 9896-9903.
- (144) Manning, G. S. *The journal of chemical Physics* **1969**, *51* (3), 924-933.
- (145) Lamarque, G. Elaboration et caractérisation de nouveaux éliciteurs à base de chitosane pour la protection des espèces végétales. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, 2004.
- (146) Domard, A. In *Chitosan interactions*, Advances in chitin science II, Lyon, 1997; Domard, A.; Robert, G. A.; Varum, K. M., Eds. Jaque André: Lyon, 1997.
- (147) Yamaguchi, R.; Hirano, S.; Arai, Y.; Ito, T. *Agricultural and Biological Chemistry* **1978**, *42* (10), 1981-1982.
- (148) Terreux, R.; Domard, M.; Domard, A. In *Dynamic Study of the Interaction Between Ions and a 30 Monomer Chitosan Chain.*, Advances in Chitin Science, Montpellier, 2006; Domard, A.; Guibal, E.; Varum, K. M., Eds. Montpellier, 2006; pp 219-226.
- (149) Amiji, M. M. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *26* (3), 211-213.

- (150) Wang, P. F.; Wu, S. H. K.; Shi, X. Y.; Deng, B. M.; suc, C. *J. Mater. Sci.* **1998**, *33*, 1753-1757.
- (151) Kishida, A.; Ikada, Y. Hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. In *Polymeric biomaterials*; 2nd ed.; Dumitriu, S., Ed.; CRC Press: 2002; pp 133-145.
- (152) Peppas, N. A. Preface. In *Hydrogels in Medicine and Pharmacy: Fundamentals* Peppas, N. A., Ed.; CRC Press: 1986; Vol. Vol. 1.
- (153) Guenet, J. M. *Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers*; 2 ed.; Academic Press: London, 1992; p 280.
- (154) Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S.; Kramer, O. *Polymer Gels and Networks* **1993**, *1* (1), 5-17.
- (155) Ross-Murphy, S. B. Physical gelation of synthetic and biological macromolecules. In *Polymer Gels; Fundamentals and Biomedical Applications*; D.DeRossi, K. K., Y. Osada and A. Yamauchi, Ed.; Plenum Press: New York, 1991; pp 21-40
- (156) Aly, A. S. *Angew. Makromol. Chem.* **1998**, *259*, 13-18.
- (157) Yamada, K.; Chen, T. H.; Kumar, G.; Vesnovsky, O.; Topoleski, L. D. T.; Payne, G. F. *Biomacromol* **2000**, *1*, 252-258.
- (158) Denkbař, E. B.; Seyyal, M.; Piřkin, E. *J. Membr. Sci.* **2000**, *172* 33-38.
- (159) Khalid, M. N.; L. Ho; Agnely, J. L.; Grossiord, J. L.; G. Couarraze. *STP Pharm. Sci.* **1999**, *9*, 359-364.
- (160) Patel, V. R.; Amiji, M. M. *Pharm. Res.* **1996**, *13* (4), 588-593.
- (161) De Angelis, A. A.; Capitani, D.; Crescenzi, V. *Macromolecules* **1998**, *31*, 1595-1601.
- (162) Hirano, S.; Yamaguchi, M.; Fukui, N.; Iwata, M. *Carbohydr. Res.* **1990**, *201*, 145-149.
- (163) Mi, F.-L.; Sung, H. W.; Shyu, S.-S. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2000**, *38*, 2804-2814.
- (164) Kim, S. S.; Y.M., L.; Cho, C. S. *Polymer* **1995**, *36*, 4497-4501.

- (165) Crescenzi, V.; Paradossi, G.; Desideri, P.; Dentini, M.; Cavalieri, F.; Amici, E.; Lisi, R. *Polym. Gels Netw.* **1997**, *5*, 225–239.
- (166) Dal Pozzo, A.; Vanini, L.; Fagnoni, M.; Guerrini, M.; De Benedittis, A.; Muzzarelli, R. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42*, 201–206.
- (167) Crescenzi, V.; Imbriaco, D.; Velasquez, C. L.; Dentini, M.; Ciferri, A. *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196*, 2873–2880.
- (168) Serrero, A.; Bayon, Y.; David, L.; Domard, A.; Gravagna, P.; Montanari, S.; Trombotto, S. In *Polysaccharides-based adhesives for biological applications*, 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of The Adhesion Society, Savannah, GA, 2009; Savannah, GA, 2009.
- (169) Domard, A.; Vachoud, L. *Chitin and Chitosan in Life Science*; Kodansha Sci. Ltd: Tokyo, 2001; p 12-19.
- (170) Joanny, J. F. *Physica B: Condensed Matter* **1989**, *156-157*, 381-385.
- (171) Kavanagh, G. M.; Ross-Murphy, S. B. *Progress in Polymer Science* **1998**, *23* (3), 533-562.
- (172) Satish, C. S.; Satish, K. P.; Shivakumar, H. G. *Indian J Pharm Sci* **2006**, *68*, 133-140.
- (173) Hirano, S.; Ohe, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 1337-1338.
- (174) Hirano, S.; Yamaguchi, R. *Biopolymers* **1976**, *15* (9), 1685-1691.
- (175) Moore, G. K.; Roberts, G. A. F. *International Journal of Biological Macromolecules* **1980**, *2* (2), 73-77.
- (176) Moore, G. K.; Roberts, G. A. F. *International Journal of Biological Macromolecules* **1980**, *2* (2), 78-80.
- (177) Vachoud, L.; Zydowicz, N.; Domard, A. *Carbohydr. Res.* **1997**, *302* (3-4), 169-177.
- (178) Berthold, A.; Cremer, K.; Kreuter, J. *Journal of Controlled Release* **1996**, *39* (1), 17-25.
- (179) Shu, X. Z.; Zhu, K. J. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, *233* (1-2), 217-225.

- (180) Draget, K. I.; Värnum, K. M.; Moen, E.; Gynnild, H.; Smidsrød, O. *Biomaterials* **1992**, *13* (9), 635-638.
- (181) Brack, H. P.; Tirmizi, S. A.; Risen, W. M. *Polymer* **1997**, *38* (10), 2351-2362.
- (182) Chenite, A.; Chaput, C.; Combes, C.; Jalal, F.; Selmani, A. Temperature-controlled pH-dependant formation of ionic polysaccharide gels. WO 99/07416, 1999.
- (183) Cho, J.; Heuzey, M.-C.; Begin, A.; Carreau, P. J. *Food Hydrocolloids* **2006**, *20*, 936-945.
- (184) Mi, F.-L.; Shyu, S.-S.; Wong, T.-B.; Jang, S.-F.; Lee, S.-T.; Lu, K.-T. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *74* (5), 1093-1107.
- (185) Mi, F.-L.; Shyu, S.-S.; Lee, S.-T.; Wong, T.-B. *J. Polym. Sci.* **1999**, *37* (14), 1551-1564.
- (186) Shu, X. Z.; Zhu, K. J. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *201* (1), 51-58.
- (187) Calvo, P.; Remuñán-López, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63* (1), 125-132.
- (188) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57* (1), 19-34.
- (189) Bodmeier, R.; Chen, H.; Paeratakul, O. *Pharmaceutical Research* **1989**, *6* (5), 413-417.
- (190) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57* (1), 35-52.
- (191) Tsuchida, E.; Abe, K. Developments in ionic polymers 2. In *Applied Science*; 1996; p 191.
- (192) Kim, H. J.; Lee, H. C.; Oh, J. S.; Shin, B. A.; Oh, C. S.; Park, R. D.; Yang, K. S.; Cho, C. S. *J. Biomater. Sci. Polym.* **1999**, *10*, 543-556.
- (193) Yao, K. D.; Tu, H.; Cheng, F.; Zhang, J. W. u.; Liu, J. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1997**, *245* (1), 63-72.
- (194) Dumitriu, S.; Chornet, E. *Chitin Enzymol.* **2000**, *2* 527-542.



- (195) Rusu-Balaita, L.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. *Polymer bulletin* **2003**, *50* (1-2), 91-98
- (196) Drogoz, A.; David, L.; Rochas, C.; Domard, A.; Delair, T. *Langmuir* **2007**, *23* (22), 10950-10958.
- (197) Schatz, C.; Lucas, J.-M.; Viton, C.; Domard, A.; Pichot, C.; Delair, T. *Langmuir* **2004**, *20*, 7766-7778.
- (198) Taravel, M. N.; Domard, A. *Biomaterials* **1993**, *14*, 930-939.
- (199) Taravel, M. N.; Domard, A. *Biomaterials* **1995**, *16* (11), 865-871.
- (200) Taravel, M. N.; Domard, A. *Biomaterials* **1996**, *17* (4), 451-455.
- (201) Brunel, F.; Véron, L.; David, L.; Domard, A.; Delair, T. *Langmuir* **2008**, *24* (20), 11370-11377.
- (202) Wang, H.; Li, W.; Lu, Y.; Wang, Z. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *65* (8), 1445-1450.
- (203) Borchard, G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52* (2), 145-150.
- (204) Lee, K. Y.; Park, W. H.; Ha, W. S. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63* (4), 425-432.
- (205) Hiroshi, F.; Yasuo, K. *J. Biomed. Mater. Res.* **1978**, *12* (4), 531-539.
- (206) Schatz, C. Chitosane: Comportement en solution et formation de particules. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, 2003.
- (207) Boucard, N.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (6), 3227-3237.
- (208) Drury, J. L.; Mooney, D. J. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4337-4351.
- (209) Langer, R.; Peppas, N. A. *AIChE Journal* **2003**, *49* (12), 2990-3006.
- (210) Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50* (1), 27-46.
- (211) Hoffman, A. S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (1), 3-12.

- (212) Clayer-Montembault, A. Elaboration d'hydrogels physiques de chitosane: Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage. Ph.D. thesis, University of Lyon 1, Villeurbanne, France, 2004.
- (213) Boucard, N.; Viton, C.; Agay, D.; Mari, E.; Roger, T.; Chancerelle, Y.; Domard, A. *Biomaterials* **2007**, *28* (24), 3478-3488.
- (214) Vizio-Boucard, N. Elaboration et caractérisation d'hydrogels physiques de chitosane pour la cicatrisation thérapeutique des brûlures. Ph.D. thesis, University of Lyon 1, Villeurbanne, France, 2005.
- (215) Ladet, S. Elaboration et étude des propriétés d'un bioréacteur multi-membranaire. Ph.D. thesis, University of Lyon 1, Villeurbanne, France, 2007.
- (216) Domard, A.; Viton, C.; Ladet, S. Capsules plurimembranaires de polysaccharides et en particulier de chitosane et leur procédé de préparation. WO/2006/092540 2006.
- (217) Notin, L.; Viton, C.; Lucas, J.-M.; Domard, A. *Acta Biomaterialia* **2006**, *2* (3), 297-311.
- (218) Notin, L.; Domard, A.; Viton, C.; Cancel, R.; Wallace, R.; Sassi, G. Chitosan spinning method, device therefore, and resulting chitosan yarn, and uses thereof. WO/2005/025520, 2005.
- (219) Notin, L. Etude fondamentale de l'élaboration et des propriétés de fibres de chitosane dans le cadre d'une problématique biologique. Université Lyon 1, Villeurbanne, 2006.
- (220) Espinat, D. *Application des techniques de diffusion de la lumière, des rayons X et des neutrons à l'étude des systèmes colloïdaux*; Technip: Paris, 1991.
- (221) Serge, E.; DAvid, L. *Introduction à la physique des polymères*; Dunod: Paris, 2002.
- (222) Williams, C. E.; May, R. P.; Guinier, A. Small-Angle Scattering of X-Rays and Neutrons. In *X-Ray Characterization of Materials*; Lifshin, E., Ed.; Wiley-VCH: 1999; p 261.
- (223) Rayleigh, L. *Proc. Roy. Soc. (London)* **1911**, *A-84*, 25.

- (224) Guinier, A. *Ann. Phys.* **1939**, *12*, 161.
- (225) Mittelbach, P.; Porod, G. *Acta Physica Austriaca* **1962**, *15*, 122.
- (226) Porod, G. *Acta Physica Austriaca* **1948**, *2*, 133.
- (227) Schmidt, P. W.; Hight, J. R. *J. Appl. Phys.* **1959**, *30* (6), 866-871.
- (228) Shull, C. G.; Roess, L. C. *J. Appl. Phys.* **1947**, *18* (3), 295-307.
- (229) Mittelbach, P.; Porod, G. *Acta Physica Austriaca* **1951**, *14*, 405.
- (230) Fournet, G. *Bull. soc. franc. mineral. crist.* **1951**, *74*, 39.
- (231) Mittelbach, P.; Porod, G. *Acta Physica Austriaca* **1951**, *74*, 39.
- (232) Guinier, A.; Fournet, G. *Small Angle Scattering of X-Rays*; John Wiley & Sons: New York, 1955.
- (233) Glatter, O.; Kratky, O. *Small Angle X-Ray Scattering*; Academic Press Inc: London, 1982.
- (234) Beaucage, G.; Schaefer, D. W. *Journal of Non-crystalline Solids* **1994**, *172-174*, 797-805.
- (235) Baigl, D.; Ober, R.; Qu, D.; Fery, A.; Williams, C. E. *Europhysics Letters* **2003**, *62* (4), 588-594.
- (236) Kanaya, T.; Ohkura, M.; Kaji, K.; Furusaka, M.; Misawa, M. *Macromolecules* **1994**, *27* (20), 5609-5615.
- (237) Horkay, F.; Bassler, P. J.; Hecht, A. M.; Geissler, E. *Polymer* **2005**, *46*, 4242-4247.
- (238) Hoxie, H. M. Wet spinning process. 2 577 763, 1951.
- (239) Modrzejewska, Z.; Eckstein, W. *Biopolymers* **2004**, *73* (1), 61-68.
- (240) Knaul, J. Z.; Creber, K. A. M. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *66* (1), 117-127.
- (241) East, G. C.; Qin, Y. *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, *50* (10), 1773-1779.

- (242) Pittalis, F.; Bartoli, F.; Giovannoni, G. Process for the preparation of chitosan fibers. US Patent 4464321, 1984.
- (243) El-Tahlawy, K.; Hudson, S. M. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *100* (2), 1162-1168.
- (244) Knaul, J. Z.; Hudson, S. M.; Creber, K. A. M. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *72* (13), 1721-1732.
- (245) Molloy, R.; Yoriya, S. *Advances in chitin sciences* **2002**, *5*, 207-211.
- (246) Urbanczyk, G. W. Fine Structure and Properties of Filaments Prepared from Chitin Derivatives. . In *Applications of Chitin and Chitosan*; Goosen, M. F. A., Ed.; CRC Press LLC: 1997; p 281.
- (247) Kulpinski, P.; Nishimura, S.-I. Preparation and characterization of functionalized chitosan fibers. In *Advances in chitin sciences*; Domard, A.; Roberts, G. A. F.; Varum, K. M., Eds.; Jacques André: Lyon, 1997; Vol. II, pp 334-338.
- (248) Hirano, S.; Nagamura, K.; Zhang, M.; Kim, S. K.; Chung, B. G.; Yoshikawa, M. *Carbohydr Polymers* **1999**, *38*, 293-298.
- (249) Strand, S. P.; Vandvik, M. S.; Varum, K. M.; Ostgaard, K. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (1), 126-133.
- (250) Nunthanid, J.; Puttipipatkachorn, S.; Yamamoto, K.; Peck, G. E. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **2001**, *27* (2), 143 - 157.
- (251) Agboh, O. C.; Qin, Y. *Polym. Adv. Technol.* **1997**, *8* (6), 355-365.
- (252) Zhang, L.; Ao, Q.; Wang, A.; Lu, G.; Kong, L.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. *J. Biomed. Mater. Res.* **2006**, *77A* (2), 277-284.
- (253) Freier, T.; Montenegro, R.; Shan Koh, H.; Shoichet, M. S. *Biomaterials* **2005**, *26* (22), 4624-4632.
- (254) Cheng, M.; Deng, J.; Yang, F.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. *Biomaterials* **2003**, *24* (17), 2871-2880.

- (255) Kaminski, W. E., W.; Modrzejewska, Z.; Sroda, Z. Chitosan Flat and Hollow-Fiber Membranes. . In *Chitin World*; Karnicki, Z. S., Wojtasz-Pajak, A., Brzeski, M. M., Bykowski, P. J., Ed.; Wirtschafstverlag NW: Bremerhaven, Germany, 1995.
- (256) Vincent, T.; Guibal, E. *Solvent Extr Ion Exch* **2000**, *18* (6), 1241 - 1260.
- (257) Vincent, T.; Guibal, E. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2001**, *40* (5), 1406-1411.
- (258) Peirano, F.; Vincent, T.; Guibal, E. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *107* (6), 3568-3578.
- (259) Vincent, T.; Guibal, E. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38* (15), 4233-4240.
- (260) Rivas Araiza, R.; David, L.; Domard, A. Fibres creuses, notamment multi membranaires, leur procédé de préparation par filage et dispositif pour la mise en oeuvre dudit procédé. 0757436, 2007.
- (261) Rivas, R. N.; David, L.; Domard, A., Chitosan hollow fibers for tissue engineering. In *Advances in Chitin Science*, Domard, A.; Guibal, E.; Varum, K. M., Eds. Montpellier, 2006; Vol. IX, pp 616-618.
- (262) Araiza, R. N. R.; Rochas, C.; David, L.; Domard, A. *Macromol. Symp.* **2008**, *266* (1), 1-5.
- (263) Paul, D. R. *J. Appl. Polym. Sci.* **1968**, *12* (3), 383-402.
- (264) Ziabicki, A. *Fundamentals of fiber formation*; Wiley-Interscience Publication: 1976.
- (265) Hermans, J. J. *J. Colloid Sci.* **1947**, *2* (4), 387-398.
- (266) Paul, D. R. *J. Appl. Polym. Sci.* **1968**, *12* (10), 2273-2298.
- (267) Crank, J. *The mathematics of diffusion*; 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford, 1976; p 414.
- (268) Liu, C.-K.; Cuculo, J. A.; Smith, B. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer physics* **1989**, *27*, 2493-2511.
- (269) Um, I. C.; Kweon, H.; Lee, K. G.; Ihm, D. W.; Lee, J.-H.; Park, Y. H. *International Journal of Biological Macromolecules* **2004**, *34* (1-2), 89-105.

- (270) Rinaudo, M. Advances in characterization of polysaccharides in aqueous solution and gel state. In *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*; Dumitriu, S., Ed.; Marcel Dekker, Inc: University of Sherbrooke, Canada, 2004.
- (271) Pisárcik, M.; Bakos, D.; Ceppan, M. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1995**, *97* (3), 197-202.
- (272) Cheng, Y.; Prud'homme, R. K. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (4), 782-788.
- (273) Mancini, M.; Moresi, M.; Sappino, F. *Journal of Food Engineering* **1996**, *28* (3-4), 283-295.
- (274) Matsumoto, T.; Kawai, M.; Masuda, T. *Biorheology* **1992**, *29* (4), 411-417.
- (275) Milas, M.; Rinaudo, M.; Tinland, B.; . *Polymer Bulletin* **1985**, *Volume 14* (2), 157-164.
- (276) Hwang, J. K.; Shin, H. H. *Korea-Australia Rheology Journal* **2000**, *12* (3/4), 175-179.
- (277) Desbrieres, J. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (2), 342-349.
- (278) Cho, J.; Heuzey, M.-C.; Bégin, A.; Carreau, P. J. *Journal of Food Engineering* **2006**, *74* (4), 500-515.
- (279) Mucha, M. *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198* (2), 471-484.
- (280) Boris, D. C.; Colby, R. H. *Macromolecules* **1998**, *31* (17), 5746-5755.
- (281) Graessley, W. W. *Adv. Polym. Sci.* **1974**, *16* (1).
- (282) Dealy, J. M.; Wissbrun, K. F. *Melt Rheology and Its Role in Plastics, Processing: Theory and Applications*; Kluwer Academic Publishers: Boston, 1999.
- (283) Desbrieres, J. *Polymer* **2004**, *45* (10), 3285-3295.
- (284) Popa-Nita, S.; Rochas, C.; David, L.; Domard, A. *Langmuir* **2009**, *25* (11), 6460-6468.
- (285) Dobrynin, A. V.; Colby, R. H.; Rubinstein, M. *Macromolecules* **1995**, *28*, 1859-1871.

- (286) Iversen, C.; Kjøniksen, A.-L.; Nyström, B.; Nakken, T.; Palmgren, O.; Tande, T. *Polymer Bulletin* **1997**, *39*, 747-754.
- (287) Burchard, W. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (2), 342-353.
- (288) Wagner, M. H. *Rheol. Acta* **1977**, *16*, 43-50.
- (289) Martinez, A.; Chornet, E.; Rodrigue, D. *Journal of Texture studies* **2004**, *35* (1), 53-74.
- (290) Lodge, A. S. *Elastic Liquids*; Academic Press: London, 1964.
- (291) Lapasin, R.; Prich, S. *Rheology of industrial polysaccharides: Theory and Applications*; Chapman and Hall: London, 1995.
- (292) Tanner, R. I. *J. Polym. Sci.* **1970**, *A-2* (8), 2067-2078.
- (293) Zapalowski, M.; Bartczak, W. M. *Computers and Chemistry* **2000**, *24* 459-468.
- (294) Porath, J.; Sundberg, L.; Fornstedt, N.; Olsson, I. *Nature* **1973**, *245*, 465-466.
- (295) Cussler, E. L. *Diffusion. Mass transfer in fluid systems*; 2nd ed.; Cambridge University Press: 1986; p 525.
- (296) Payet, L.; Ponton, A.; Léger, L.; Hervet, H.; Grossiord, J. L.; Agnely, F. *Macromolecules* **2008**, *41*, 9376-9381.
- (297) Guibal, E.; Roussy, J. *Reactive and Functional Polymers* **2007**, *67* (1), 33-42.
- (298) Esquenet, C.; Buhler, E. *Macromolecules* **2002**, *35* (9), 3708-3716.
- (299) Popa-Nita, S.; Alcouffe, P.; Rochas, C.; David, L.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (1), 6-12.
- (300) Rivas Araiza, R. N. Hydrogels physiques de chitosane sous forme de macro-fibres creuses et multi-membranaires : Mise en oeuvre et étude microstructurale. Ph.D. thesis, University of Lyon 1, Villeurbanne, France, 2010.
- (301) Thiele, H. *Histolyse und Histogenese: Gewebe und ionotrope Gele; Prinzip einer Strukturbildung*; Akademische Verlagsgesellschaft: Frankfurt am Main, Germany, 1967; p 156.

- (302) Thumbs, J.; Kohler, H. H. *Chem. Phys.* **1996**, *208* (1), 9-24.
- (303) Treml, H.; Kohler, H. H. *Chem. Phys.* **2000**, *252* (1-2), 199-208.
- (304) Treml, H.; Woelki, S.; Kohler, H. H. *Chem. Phys.* **2003**, *293*, 341-353.
- (305) Purz, H. J. *J. Polym. Sci., Polym. Symp.* **1972**, *38* (1), 405-417.
- (306) Prang, P.; Müller, R.; Eljaouhari, A.; Heckmann, K.; Kunz, W.; Weber, T.; Faber, C.; Vroemen, M.; Bogdahn, U.; Weidner, N. *Biomaterials* **2006**, *27* (19), 3560-3569.
- (307) Willenberg, B. J.; Hamazaki, T.; Meng, F. W.; Terada, N.; Batich, C. J. *Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**, *79* (2), 440-450.
- (308) Di Renzo, F.; Valentin, R.; Boissière, M.; Tournette, A.; Sparapano, G.; Molvinger, K.; Devoisselle, J. M.; Gérardin, C.; Quignard, F. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (18), 4693-4699.
- (309) Allan, G. G.; Peyron, M. *Carbohydr. Res.* **1995**, *277* (2), 257-272.
- (310) Beaucage, G. J. *Appl. Crystallogr.* **1995**, *28* (6), 717-728.
- (311) de Gennes, P. G. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72* (9), 4756-4763.
- (312) Madihally, S. V.; Matthew, H. W. T. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1133-1142.
- (313) Wang, A.; Ao, Q.; He, Q.; Gong, X.; Gong, K.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. *Tsinghua Science and Technology* **2006**, *11* (4), 415-420.
- (314) Teo, W.-E.; He, W.; Ramakrishna, S. *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 918-929.
- (315) Sell, S.; Barnes, C.; Smith, M.; McClure, M.; Madurantakam, P.; Grant, J.; MaManus, M.; Bowlin, G. *Polym. Int.* **2007**, *56*, 1349-1360.
- (316) Vaz, C. M.; Tuijl, S. v.; Bouten, C. V. C.; Baaijens, F. P. T. *Acta Biomaterialia* **2005**, *1*, 575-582.
- (317) Wang, A.; Ao, Q.; Cao, W.; Zhao, C.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. *Tsinghua Science and Technology* **2005**, *10* (4), 449-453.
- (318) Wang, D.; Li, K.; Teo, W. K. *J. Membr. Sci.* **2000**, *166*, 31-39.



- (319) Liu, C.; Bai, R. *Journal of Membrane Science* **2006**, 279 (1-2), 336-346.
- (320) Yamashita, S.; Tanaka, T.; Tanii, H.; Kubotsu, A.; Kawai, S. Ethylene-vynil alcohol copolymer hollow fiber membranes and method of producing same. 4 317 729, 1980.
- (321) Rivas-Araiza, R.; Crépet, A.; Laurent, D.; Domard, A. **To be published.**
- (322) Okuyama, K.; Noguchi, K.; Miyazawa, T.; Yui, T.; Ogawa, K. *Macromolecules* **1997**, 30, 5849-5855.
- (323) Flory, P. J. Cornell University Press, Ithaca: New York, 1953.
- (324) Hubert, L.; David, L.; Germain, Y.; Seguelar, R.; Vigier, G. *Matériaux et techniques* **2000**, 88 (7-8), 29-33.
- (325) Quevauvilliers, J.; Somogyi, A.; Fingerhut, A., In *Dictionnaire médical*, 5 ed.; Elsevier-Masson: Issy-les-Moulineaux, 2007; p 1516.
- (326) Maniez, F., In *Dorland Dictionnaire médical bilingue*, Elsevier-Mazzon: Issy-les-Moilineaux, 2009; p 2044.

## Glossaire

**Anévrisme** : Cavité formée par la dilatation des parois d'un artères contenant du sang.

**Aorte** : Artère principale du corps partant du ventricule gauche, donnant naissance à toutes les artères.<sup>325</sup>

**Apoptose** : Mort cellulaire génétiquement programmée (suicide cellulaire).<sup>325</sup>

Artère iliaque

**Artères** : Chacun des vaisseaux qui conduisent le sang lancé par les ventricules du cœur, vers toutes les parties de l'organisme.<sup>325</sup>

**Athérome** : Masse ou plaque d'intima artérielle épaisse dégénérée, survenant dans l'athérosclérose.<sup>326</sup>

**Artériosclérose** : Terme générique regroupant les maladies caractérisées par l'épaississement et la perte d'élasticité des parois artérielles.<sup>326</sup>

**Autologues** : Qui appartient au sujet lui-même.<sup>325</sup>

**Cartilage articulaire** : Cartilage recouvrant la surface articulaire des articulations synoviales.<sup>326</sup>

**Cartilage hyalin** : Substance souple et semi-transparente ayant teinte opalescente, composée d'une substance basophile contenant des fibrilles et comportant des cavités ou se trouvent les chondrocytes.<sup>326</sup>

**Chondrocytes** : Cellule cartilagineuse<sup>325</sup>

Encéphale : Partie du système nerveux central contenue dans la boîte crânienne.

**Endomètre** : Muqueuse de la cavité utérine.<sup>325</sup>

**Fibroblastes** : Jeune cellule du tissu conjonctif produisant des fibres, capable de se différencier en chondroblaste, collagénoblaste ou ostéoblaste.<sup>326</sup>

**Fibrocartilage** : Cartilage formé de faisceaux collagènes parallèles, épais et compacts, séparés par des fentes minces contenant les chondrocytes.<sup>326</sup>

**Glycocalyx** : Enveloppe de glycoprotéines et de polysaccharides qui entoure plusieurs cellules.

**Glycosaminoglycanes** : Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des répétitions d'éléments disaccharidiques, où l'un des sucres est soit la N-acétyl-D-glucosamine, soit la N-acétyl-D-galactosamine et l'autre est souvent un sucre-acide comme le glucuronate ou iduronate. A l'exception de l'hyaluronane, ces sucres sont substitués par des groupes sulfates.

**Hyperplasie intinale** : Augmentation anormale du nombre de cellules normales, disposées normalement dans un organe ou de tissu.<sup>326</sup>

Infarctus des tissus en aval

**Pontages coronariens** : Portion de veine ou de tout autre conduit greffée entre l'aorte et une artère coronaire, en position distale par rapport à une obstruction de cette dernière.<sup>326</sup>

**Sténose** : Rétrécissement ou contraction anormale d'un conduit ou d'un canal. <sup>326</sup>

**Thrombose** : Formation ou présence d'un thrombus <sup>326</sup>

**Thrombus** : Caillot de sang stationnaire le long de la paroi d'un vaisseau sanguin, provoquant fréquemment une obstruction vasculaire.<sup>326</sup>

**Veine grande saphène** : Veine la plus longue du corps, s'étendant du dos du pied jusqu'au-dessous du ligament inguinal, ou elle s'ouvre dans la veine fémorale. Elle draine le pied et la jambe par plusieurs affluents.<sup>326</sup>

**Veine** : Vaisseau sanguin qui conduit le sang depuis les capillaires jusqu'au cœur. Les veines sont plus nombreuses que les artères.<sup>325</sup>

## RESUME en français

Ce travail a eu pour objectif la mise au point d'un nouveau procédé de filage par voie humide dans des conditions de coagulation interrompue pour la formation des fibres creuses mono- et multi-membranaire à base d'hydrogels de chitosane. Pour cela, l'étude du rôle des paramètres de filage (vitesse d'extrusion et d'étirage) et des paramètres physico-chimiques de coagulation (concentration du collodion, nature et concentration de l'agent coagulant) a d'abord permis d'élaborer des fibres creuses à partir d'un macrofilament liquide. Cette approche a été généralisée pour la fabrication de fibres creuses multi-membranaires en mettant au point un procédé de neutralisation à plusieurs étapes au moyen de bains successifs de coagulation/lavage conduisant ainsi à la formation d'un assemblage de membranes et d'espaces membranaires. En modifiant la viscosité du collodion et la nature et concentration de la base neutralisante, la microstructure des hydrogels de chitosane a été analysée par diffusion/diffraction de rayonnement (X et lumière) et microscopie électronique. Selon les conditions de coagulation, il est possible de former des hydrogels par assemblages d'agrégats ou encore des structures bien organisées comme les gels de chitosane avec micro-canaux. En résumé, ce travail a permis d'apporter de nouveaux éléments sur le phénomène de coagulation du chitosane pour la formation d'une large gamme de matériaux bio-inspirés "leurres des milieux biologiques" à propriétés biologiques contrôlées pour l'ingénierie tissulaire: tube creux ou multi-membranaires comme substituts vasculaires, ou comme guides pour régénération nerveuse, etc.

---

## TITRE en anglais

Hollow and multi-membrane chitosan physical hydrogels: Process of elaboration and microstructural study

---

## RESUME en anglais

The main objective of this work was to develop an *interrupted wet-spinning* process for the elaboration of hollow and multi-membrane chitosane fibers. The knowledge of the specific role of the processing parameters (extrusion rate and coagulation time) and physico-chemical parameters of coagulation (chitosane dope concentration, nature and concentration of the coagulant agent) allow us to elaborate hollow fibers from a liquid macrofiber of chitosane by interrupting the coagulation step through water washing. This approach was generalized for the elaboration of multi-membrane hollow fibers by alternating coagulation baths and water washing baths in a sequenced coagulation process. By modifying the dope viscosity and the nature and concentration of the coagulant agent, the microstructure of chitosan hydrogels was studied by specific scattering and microscopy techniques. Depending on the coagulation conditions, it was possible to process hydrogels with different microstructure consisting of aggregates assembled into micrometric clusters or capillary gels with more organized structures of periodic parallel micro-channels. This work opens the way to the elaboration of a wide range of chitosan physical hydrogels based on the concept of "decoy of biological media" with tuneable biological properties for tissue engineering: hollow tubes and multi-membrane tubes as blood vessel substitutes or nerve guides.

---

## DISCIPLINE

Matériaux polymères et composites

---

## MOTS-CLES

Chitosane, fibres creuses et multi-membranaires, filage voie humide, hydrogels physiques, microstructure

Chitosan, hollow and multi-membrane fibers, wet-spinning, physical hydrogels microstructure

---

## INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire des Matériaux Polymères et des Biomatériaux, Ingénierie des Matériaux Polymères/Site UCBL (UMR CNRS 5223), Bât. ISTIL, Université Claude Bernard Lyon 1, 15, boulevard Latarjet 69622 Villeurbanne Cedex.