



HAL
open science

Élaboration d'assemblages colloïdaux à partir de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane

Rémi Roux

► **To cite this version:**

Rémi Roux. Élaboration d'assemblages colloïdaux à partir de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane. Matériaux. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10088 . tel-01174097

HAL Id: tel-01174097

<https://theses.hal.science/tel-01174097>

Submitted on 8 Jul 2015

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 MATERIAUX DE LYON

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 4 juin 2013
par

Rémi ROUX

Élaboration d'assemblages colloïdaux à partir de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane

JURY : M. Laurent DAVID	Président
M ^{me} Angeles HERAS CABALLERO	Rapporteur
M. Jean-Luc SIX	Rapporteur
M. Emmanuel BELAMIE	Examineur
M. Thierry DELAIR	Directeur de thèse
M ^{me} Catherine LADAVIERE	Co-encadrante
M ^{me} Alexandra MONTEBAULT	Co-encadrante

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

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

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

SECTEUR SANTE

Composantes

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEURS SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Composantes

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

“Believe you can and you’re halfway there”

T. Roosevelt

Remerciements

Ce travail s'est déroulé dans le Laboratoire de l'Ingénierie des Matériaux Polymère (site Lyon1, UMR5223) dirigé par le Professeur Philippe Cassagnau. Ce projet de recherche a été entièrement financé par une bourse du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

Tout d'abord je souhaite remercier très chaleureusement les personnes qui ont encadré cette thèse : Thierry Delair, pour sa patience, sa très grande disponibilité et sa bonne humeur, et ce en toutes circonstances ; Catherine Ladavière et Alexandra Montembault, toutes deux pour leur bonne humeur, leur disponibilité et le « peps » qu'elle apporte dans l'équipe. Même si ce travail n'a pas toujours été facile d'un point de vue expérimental, j'ai toujours eu un grand plaisir à travailler avec vous trois. J'ai beaucoup appris à vos côtés, scientifiquement et humainement, et je voulais vous remercier vivement pour votre soutien, en particulier pendant ma période de rédaction ! Cela a été une grande chance pour moi de vous avoir tous les trois comme encadrants.

Je tenais également à remercier le Professeur Laurent David, Directeur de l'équipe Matériaux à l'Interface avec les Sciences de la Vie, pour sa collaboration fructueuse dans ce projet et pour tous ses conseils précieux scientifiques.

Un grand merci à toute l'équipe de l'IMP@LYON1, permanents, anciens et nouveaux doctorants, post-docs et stagiaires. J'ai appris beaucoup de choses au contact de toute l'équipe, dont certains sont aujourd'hui devenus des amis. Je pense à vous, Brice, Jojo, Benoît, Edwin, Ramona et Nico. Merci aussi à mes nouveaux et anciens co-bureaux, à l'équipe « chito », Seb, Marie, Loic et José notamment, ainsi qu'à tous ceux qui contribuent à la vie et la bonne ambiance de ce labo.

Enfin, je tenais tout particulièrement à remercier l'ensemble de mes proches, à commencer par ma famille, mes parents et mon frère, qui ont été d'un grand soutien pendant ces trois ans. Et, le « meilleur » pour la fin, merci à toi Olivia, qui m'aura supporté jusqu'au bout de cette aventure. Merci d'avoir cru en moi, même dans les moments difficiles.

Table des matières

Glossaire	v
Introduction générale	1
Chapitre I - Etude bibliographique	5
I - Le chitosane, un matériau naturel pluri-formes au très fort potentiel d'applications ..	6
1. Introduction	6
2. Généralités sur le chitosane.....	7
2.1. Introduction : chitine et chitosane	7
2.2. Modifications chimiques	9
2.3. Caractérisation des paramètres structuraux du chitosane.....	11
2.4. Propriétés biologiques	17
3. Solubilité du chitosane	19
3.1. Influence du pH du milieu sur la solubilité.	19
3.2. Influence du DA sur la solubilité.....	20
3.3. Influence de la masse molaire sur la solubilité.....	22
3.4. Influence de la force ionique du milieu sur la solubilité	22
4. Les matériaux à base de chitosane	23
4.1. Hydrogels de chitosane.....	23
4.2. Le chitosane sous forme solide.....	28
4.3. Le chitosane sous forme particulière.....	29
II - Les assemblages de nanoparticules.....	33
1. Introduction.....	33
2. Publication 1 : Particle assemblies: toward new tools for regenerative medicine .	34

III - Conclusion	57
Chapitre II - Elaboration de nanogels de chitosane	59
I - Introduction	60
II - Résultats et discussions	61
1. Préparation du chitosane	61
1.1. Purification	61
1.2. Préparation d'échantillons de chitosane de faible masse molaire	62
1.3. Acétylation du chitosane dépolymérisé	64
2. Synthèse des nanogels de chitosane	66
2.1. Déroulement du procédé	66
2.2. Pureté des nanogels de chitosane	69
3. Etude des caractéristiques physico-chimiques et morphologiques des nanogels de chitosane	71
3.1. Viscosité de la dispersion de nanogels de chitosane	71
3.2. Taille des nanogels par diffusion quasi élastique de la lumière	73
3.3. Stabilité colloïdale des nanogels de chitosane	76
3.4. Problématique de la concentration en chitosane dans les nano-hydrogels	79
3.5. Etude en imagerie microscopique des nanogels de chitosane	85
4. Optimisation de la cohésion des nanogels de chitosane	91
4.1. Influence du DA du chitosane	91
4.2. Influence de la concentration en chitosane	94
4.3. Influence de la réticulation par la génipine	97
III - Matériel et protocoles expérimentaux	104
1. Préparation du chitosane	104
1.1. Purification	104
1.2. Dépolymérisation du chitosane	105
1.3. Acétylation du chitosane	106
1.4. Synthèse d'hydrogels macroscopiques de chitosane	106

1.5. Techniques de caractérisation du chitosane et des nanogels	108
2. Synthèse et caractérisation des nanogels de chitosane.....	110
2.1. Protocole de synthèse des nanogels de chitosane.....	110
2.2. Réticulation chimique des nanogels de chitosane	110
2.3. Caractérisation des nanogels de chitosane	111
IV - Conclusions et perspectives	114
Chapitre III - Assemblages colloïdaux.....	117
I - Introduction	118
II - Formation de « gels composites » à base de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane en solution.	119
1. Publication 2 : Shear thinning three-dimensional colloidal assemblies of chitosan and poly(lactic acid) nanoparticles.....	119
2. Préparation des échantillons et contexte expérimental	141
2.1. Préparation des nanoparticules de poly(acide lactique)	141
2.2. Mise en place d'un protocole de synthèse des gels en vue de leur caractérisation rhéologique.....	143
III - Formation de « gels colloïdaux » à base de nanoparticules de poly(acide lactique) et de nanogels de chitosane.	146
1. Introduction	146
2. Résultats et discussions	148
2.1. Comportement général des gels colloïdaux.....	148
2.2. Influence de la force ionique	150
2.3. Influence du taux de solide des gels colloïdaux	152
2.4. Influence du rapport massique entre particules	156
2.5. Influence de la réticulation des nanogels de chitosane sur les propriétés des gels colloïdaux.....	162
3. Préparation des échantillons et contexte expérimental	164

3.1. Préparation des nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane.....	164
3.2. Préparation des gels colloïdaux	165
3.3. Mesures rhéologiques des gels colloïdaux	166
IV - Conclusions et perspectives	167
Conclusion générale.....	169
Annexes.....	173
Annexe A – Diffusion quasi élastique de la lumière	174
Annexe B – Supporting Information (Publication 2).....	179
Annexe C – Détails des calculs employés dans la partie sur les gels colloïdaux	181
Références bibliographiques.....	185
Résumé.....	215

GLOSSAIRE

$\%^f$: extrait sec final des gels colloïdaux

$\%_{CS}$: extrait sec de chitosane

$\%_{PLA}$: extrait sec de PLA

$\%^f_{CS}$: extrait sec final en chitosane d'un gel colloïdal

$\%^f_{PLA}$: extrait sec final en PLA d'un gel colloïdal

$\%_{CS}$: concentration massique en chitosane sec d'une dispersion de NP_{SC}

ATG : analyse thermogravimétrique

C^* : concentration critique d'enchevêtrement d'un polymère

C_{gel} : concentration en chitosane dans les nanogels

CS : chitosane

D : dispersité (a remplacé depuis 2009 I_p , l'indice de polydispersité)

DA : degré d'acétylation du chitosane

dn/dc : incrément d'indice de réfraction

\overline{d}_n : diamètre arithmétique, déterminé en microscopie

\overline{d}_{QELS} : diamètre hydrodynamique mesuré par QELS

$\overline{d}_{1/z}$: moyenne harmonique en z

γ : déformation de cisaillement (%)

γ_c : déformation critique, définit comme la déformation à laquelle G' et G'' se croisent

G' : module d'élasticité

G'_p : module élastique au plateau lors des balayages en déformation, lorsque $\gamma \rightarrow 0$

G'' : module de dissipation visqueuse

Gen. : génipine

Glc : motif glucose

GlcN : glucosamine

GlcNAc : acétyle-glucosamine

HLB : balance hydrophile-hydrophobe

I(q) : intensité diffuse en SAXS

M812 : Mygliol 812 N

MET : microscopie électronique en transmission

MeCell : methyl cellulose

$\overline{M_w}$: masse molaire moyenne en masse

$[NPs_C]_n$: concentration en nombre de particules d'une dispersion de NPs_C

NO₂ : nitrite

NPs_C : nanoparticules ou nanogels de chitosane

NPs_{PLA} : nanoparticules de PLA

NTA : nanoparticle tracking analysis

ω : fréquence de cisaillement (rad/s)

PEC : complexe polyélectrolyte

PDI : polydispersity index mesuré par QELS d'une population de particules

PLA : poly(acide lactique)

q : vecteur d'onde

QELS : diffusion quasi élastique de la lumière

R_w : rapport massique entre masse de chitosane sec et masse de PLA

R_w^{gel} : rapport massique entre masse de nanogels de chitosane et masse de PLA

R_s : rapport de surface spécifique entre NPs_C et NPs_{PLA}

SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering)

SEC : chromatographie d'exclusion stérique

SiRNA : petit ARN interférent

$\tan\delta$: facteur de perte

T_g : température de transition vitreuse

TPP : sodium tripolyphosphate

TS_{NPsC} : taux de solide (comprendre sous forme de gel) d'une dispersion de NPs_C

ω : fréquence d'oscillation en rhéologie

ζ_{NPsPLA} : potentiel zeta des nanoparticules de PLA

ζ_{NPsC} : potentiel zeta des nanoparticules de chitosane

INTRODUCTION GENERALE

La régénération de tissus *in situ* est un domaine de recherche thérapeutique qui nécessite de travailler avec des matériaux plurifonctionnels dont l'organisation à différentes échelles doit être parfaitement maîtrisée. Le cahier des charges est particulièrement strict, tant à l'échelle macroscopique, afin de permettre une mise en œuvre reproductible tout en diminuant les contraintes opératoires et postopératoires, qu'à l'échelle nanoscopique, où le matériau doit présenter une architecture et des fonctionnalités favorables à la croissance et la différenciation cellulaire conduisant à la formation de néo-tissus aux caractéristiques les plus proches du tissu natif.

Dans ce contexte, les assemblages colloïdaux constituent une famille de matériaux novateurs en pleine croissance depuis quelques années. Ces systèmes permettent d'obtenir des gels macroscopiques en mettant à profit les interactions attractives de faible énergie entre des précurseurs sous forme colloïdale. Les atouts de tels systèmes se révèlent être particulièrement intéressants pour l'ingénierie tissulaire : ils possèdent des propriétés mécaniques modulables, ils ont parfois la capacité de gélifier sur le site lésionnel et ils présentent généralement des propriétés rhéofluidifiantes facilitant leur injection. Les colloïdes précurseurs peuvent être obtenus à partir d'un grand choix de matériaux différents, offrant ainsi un large panel de propriétés physico-chimiques et biologiques. De plus, ces assemblages présentent une structure poreuse et hydratée, qui peut être favorable au développement cellulaire. La fonctionnalisation des colloïdes avec des molécules actives comme des facteurs de croissance offre également de nombreuses opportunités de développement.

Les travaux actuels sont en très grande majorité axés sur l'utilisation de colloïdes à base de polymères synthétiques. Or, il peut être avantageux d'élaborer des matériaux à base de polymères naturels, tirant profit de leur biocompatibilité, de leur biodégradabilité, et de leurs activités biologiques potentielles. C'est ainsi qu'au sein du laboratoire de l'Ingénierie des Matériaux Polymère, le concept de « leurre des milieux biologiques » a été développé. Ce sont des matériaux aux structures chimiques et physiques proches du milieu vivant, mais suffisamment différentes pour induire des réponses de l'organisme erronées susceptibles d'être bénéfiques pour l'application considérée. D'autres travaux du laboratoire ont permis de développer des méthodes d'élaboration de colloïdes à base de chitosane, en particulier de nano-hydrogels physiques de chitosane, par un procédé d'émulsion gélification. L'innovation majeure de cette technique est de permettre d'obtenir des nanogels exempts d'agent de

réticulation, répondant ainsi aux impératifs de sécurité des produits pour les applications biomédicales visées.

Dans un contexte d'élaboration d'assemblages colloïdaux à base de chitosane, les présents travaux de recherche se sont articulés en deux temps. En premier lieu, la synthèse des nanogels de chitosane a été entreprise, impliquant des problématiques d'assemblages macromoléculaires ainsi que des aspects de formulation d'émulsion. Un aspect important de cette partie a été la caractérisation et la compréhension des propriétés physico-chimiques de ces nano-objets en fonction de certains paramètres expérimentaux. En second lieu, nous nous sommes intéressés à l'étude de la formation d'assemblages colloïdaux. L'objectif initial était d'obtenir un système entièrement élaboré à partir de chitosane. Cependant, les difficultés rencontrées avec les nanogels de chitosane nous ont amenés à étudier la formation d'assemblages à partir de nanoparticules modèle de poly(acide lactique) (PLA), et de chitosane, soluble ou sous forme de nanogels.

Le présent manuscrit se découpe en trois parties :

- ✓ Le **premier chapitre** est une étude bibliographique présentant les connaissances actuelles sur le chitosane, notamment ses caractéristiques physico-chimiques à l'état soluble et sous forme d'hydrogel, ainsi que ses diverses applications, en particulier dans le domaine biomédical. Cette étude présente par ailleurs l'état de l'art des assemblages colloïdaux dans la médecine régénérative *via* une revue publiée et intitulée :
 - “Particle assemblies : toward new tools for regenerative medicine”, R. Roux, C. Ladavière, A. Montebault, T. Delair. *Material Science and Engineering : Part C*, 33 (2013), 997.
- ✓ Le **deuxième chapitre** résume le travail d'investigation réalisé sur les nanogels de chitosane. Un accent particulier est porté sur la caractérisation et la stabilité de ces colloïdes, ainsi que sur l'optimisation de leur cohésion.

✓ Le **troisième chapitre** présente l'étude réalisée sur la formation d'assemblages colloïdaux à base de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane. Ces recherches comportent deux axes : « gels composites » et « gels colloïdaux ».

S'agissant des « gels composites », les assemblages sont basés sur des interactions *colloïde-polymère*, respectivement des nanoparticules de PLA avec le chitosane sous forme soluble. Ce travail a fait l'objet d'une publication intégrée au présent manuscrit :

- “Shear thinning three-dimensional colloidal assemblies of chitosan and poly(acid lactic) nanoparticles”, R. Roux, C. Ladavière, A. Montembault, L. David, T. Delair. *Journal of Physical Chemistry, Part B*, 117 (2013), 7455.

Enfin, s'agissant des « gels colloïdaux », basés sur des interactions *colloïde-colloïde*, les précurseurs colloïdaux sont dans ce cas les nanoparticules de PLA et les nanogels de chitosane étudiés et mis au point dans le précédent chapitre.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I - LE CHITOSANE, UN MATERIAU NATUREL PLURI-FORMES AU TRES FORT POTENTIEL D'APPLICATIONS

1. Introduction

Nos sociétés humaines prennent conscience, depuis maintenant quelques années, des défis énergétiques et environnementaux qui se présentent à elles. Nos civilisations matérielles reposent sur la consommation massive de ressources fossiles, le pétrole et le gaz, qui non seulement ne sont pas inépuisables, mais entraînent également bien souvent des problèmes écologiques et de santé publique. Le monde de la recherche s'emploie donc activement à trouver de nouvelles sources de matières premières, susceptibles de remplacer ces combustibles fossiles. Il n'y aura certainement pas une solution simple à ce challenge majeur, mais plus probablement des solutions multiples, plus respectueuses de l'environnement, et adaptées aux échelles locales. Dans le domaine énergétique, des avancées significatives ont été faites avec le développement des énergies renouvelables, comme l'éolien, le solaire, la géothermie, la biomasse... Parallèlement, il est également urgent de trouver de nouvelles sources de matériaux capables de remplacer le pétrole sur lequel se repose aujourd'hui une très grande majorité de l'industrie du secondaire. Parmi ces nouvelles sources, les polysaccharides seront immanquablement des matériaux incontournables de demain. Ils constituent en effet une ressource renouvelable abondante, disponible partout sur la planète, puisqu'ils sont produits par les règnes végétal, animal et bactérien. Dotés de propriétés physico-chimiques et biologiques particulièrement attrayantes, les polysaccharides ont donc un grand rôle à jouer dans notre transition écologique.

Parmi ces polysaccharides, la chitine et son principal dérivé le chitosane, connaissent un engouement très important. En effet, le nombre de publications scientifiques ayant trait au chitosane connaît une progression exponentielle depuis maintenant une trentaine d'années (*cf.* Figure 1). Ainsi, il convient de dresser un aperçu général sur l'état des connaissances actuelles sur ce polymère naturel, dont l'attrait s'explique par ses propriétés physico-chimiques et biologiques remarquables. En effet, comme cela sera exposé ci-après, le chitosane qui peut être utilisé sous différentes formes physiques, présente un potentiel d'applications considérable.

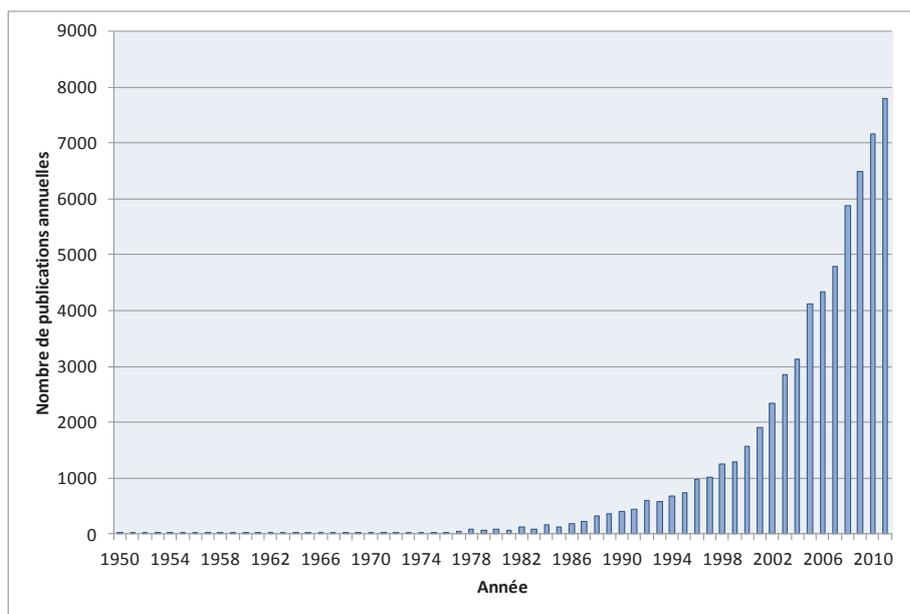


Figure 1. Evolution du nombre de publications ayant rapport au chitosane. *Données obtenues sur le moteur de recherche SciFinder, avec comme requête "chitosan" dans le champ "Research Topic".*

2. Généralités sur le chitosane

2.1. Introduction : chitine et chitosane

Le chitosane est un polysaccharide dérivé de la chitine, polymère naturel parmi les plus abondants sur la planète avec la cellulose [1,2].

La chitine est principalement présente dans le règne animal, notamment chez les invertébrés (insectes, crustacés, céphalopodes), de façon plus subsidiaire dans le règne végétal (parois cellulaires de certaines algues) ainsi que dans certains champignons (levure, penicillium, champignons de Paris) [3]. Elle a été découverte par le français Henri Braconnot en 1811 dans la paroi cellulaire de champignons [4]. Elle est définie comme un polymère d'unités saccharidiques N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liées en $\beta(1\rightarrow4)$ [5]. Actuellement, la principale source industrielle de chitine (et de chitosane) provient de la carapace de crustacés (crevettes) et de l'endosquelette de calmars. La structure de la chitine ressemble de très près à celle de la cellulose, toutes deux représentées en Figure 2.

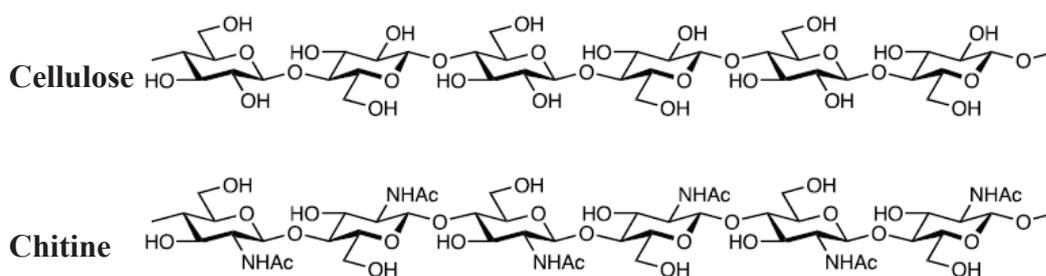


Figure 2. Similarités de structure entre la chitine et la cellulose.

En réalité, la chitine commerciale n'est pas uniquement composée de GlcNAc. En effet, en raison des traitements chimiques d'extraction, elle se trouve partiellement désacétylée. Les produits commerciaux sont généralement des copolymères d'unités GlcNAc et de glucosamine (GlcN), dont la formule est représentée en Figure 3.

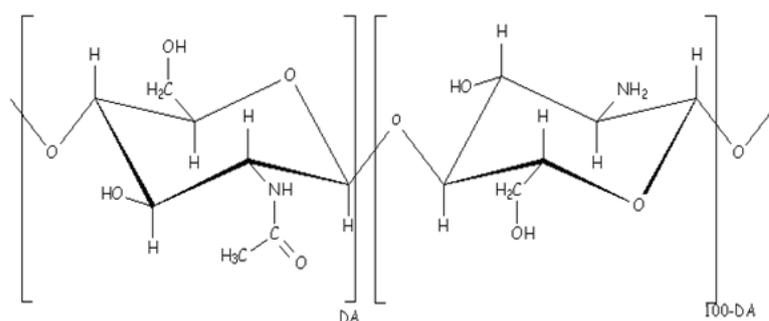


Figure 3. Structure chimique de la chitine (et chitosane).

Il est alors nécessaire d'introduire la notion de degré d'acétylation (DA), qui correspond à la fraction molaire d'unités GlcNAc sur l'ensemble des motifs.

$$DA (\%) = \frac{\text{nombre de moles de motifs GlcNAc}}{\text{nombre total de moles de motifs}} \quad (I.1)$$

Il est à noter que certains auteurs préfèrent l'utilisation du degré de désacétylation (DD) [6,7], simplement relié au DA par la relation $DD = 1 - DA$.

Le chitosane est un polymère obtenu par désacétylation de la chitine : la réaction est réalisée en présence de soude concentrée, à haute température (90 °C). L'opération est répétée jusqu'à quatre fois lorsque l'on souhaite obtenir un chitosane totalement désacétylé (DA = 0). Ce traitement relativement agressif entraîne cependant une diminution non négligeable de la masse molaire, et l'obtention de très faibles DA se fait généralement au dépend de la masse molaire. L'utilisation d'atmosphère inerte (N₂) et/ou de borohydrure de sodium permettent de diminuer les réactions secondaires en protégeant le milieu de l'oxygène et en évitant la formation d'espèces réactives [8].

Il n'existe pas de nomenclature officielle permettant de différencier chitine et chitosane avec une limite précise. Le chitosane se démarque de la chitine par le fait qu'il soit soluble en milieu aqueux acide. De ce fait, le DA constitue un critère relativement pertinent pour faire la distinction entre chitine et chitosane, et il est communément admis que :

- pour un DA > 60 %, on parlera de chitine ;
- pour un DA < 60 %, on parlera de chitosane [5].

Cette frontière est assez arbitraire et peut varier selon les auteurs [9]. En effet, étant donné que la chitine et le chitosane sont des polymères extraits de la biomasse, leurs caractéristiques physico-chimiques (masses molaires moyennes et distribution des unités GlcNAc) et donc leur solubilité peuvent varier selon la source d'approvisionnement.

2.2. Modifications chimiques

Les développements ci-après ne porteront que sur deux modifications chimiques du chitosane, l'acétylation et la dépolymérisation, sur lesquelles se sont concentrés les présents travaux. De nombreuses autres modifications sont en effet possibles, notamment le greffage sur la fonction amine de divers groupements chimiques. Pour plus d'informations à ce sujet, le lecteur peut se référer à différentes revues spécialisées [8,10–12].

2.2.1. Acétylation du chitosane

Cette réaction permet d'obtenir un chitosane de DA supérieur à celui de départ ("réacétylation" du chitosane). Pour cela, plusieurs techniques ont été développées, comme

des méthodes de réacétylation hétérogènes [13], mais cette réaction est généralement réalisée en milieu homogène. La technique utilisée dans notre travail est celle développée par Vachoud et coll. (Figure 4), employant de l'anhydride acétique dans un milieu hydro-alcoolique (mélange d'eau et de 1,2-propanediol) [14]. Grâce à sa viscosité élevée, le propanediol limite la réaction d'hydrolyse de l'anhydride par l'eau et permet un meilleur contrôle de la réaction.

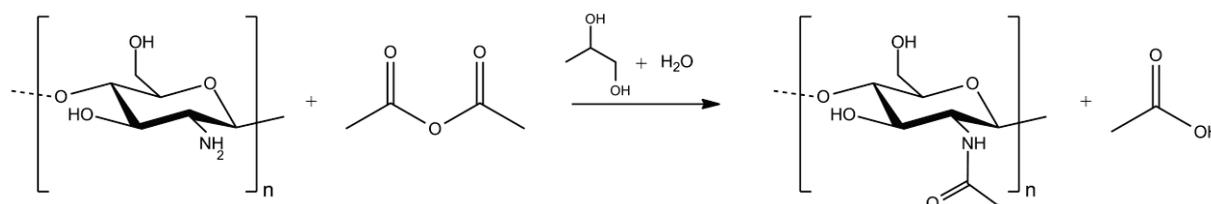


Figure 4. Réaction d'acétylation du chitosane par l'anhydride acétique en milieu hydro-alcoolique.

2.2.2. Dépolymérisation du chitosane

La dépolymérisation du chitosane est effectuée par rupture de la liaison glycosidique. Pour cela, de nombreuses voies sont possibles, parmi lesquelles l'hydrolyse acide (acide chlorhydrique [15], phosphorique [16]) la dégradation sous ultrasons [17,18], l'irradiation γ [19] ou la dépolymérisation enzymatique [20,21]. La méthode retenue dans notre étude est la désamination nitreuse par l'acide nitreux (Figure 5). Ce procédé étudié en détail par Allan et Peron [22,23] repose sur un mécanisme complexe représenté en Figure 6 : l'acide nitreux sous sa forme cation nitrosonium conduit à la nitrosation de la fonction amine, suivie d'un réarrangement en diasonium. Ce dernier se décompose pour former de l'azote et un carbocation en C2.

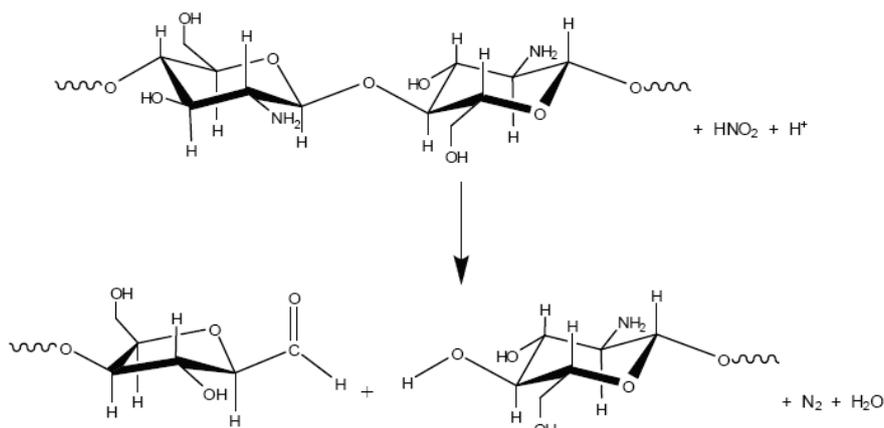


Figure 5. Dépolymérisation du chitosane par désamination nitreuse d'après [22].

Ce carbocation entraîne un réarrangement dans le squelette du sucre, conduisant à la rupture de la liaison glycosidique avec réduction du cycle en mannose, doté d'une fonction aldéhyde en C5, représentée sur la Figure 5. Ceci étant et tel que cela apparaît sur la Figure 6, cette réaction ne peut avoir lieu que sur les groupements GlcN.

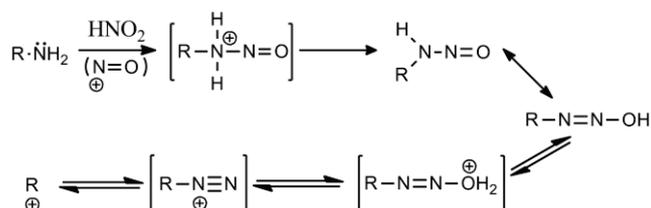


Figure 6. Mécanisme impliqué dans l'hydrolyse du chitosane. Formation d'un carbocation par attaque d'un cation nitrosonium

2.3. Caractérisation des paramètres structuraux du chitosane

2.3.1. Détermination du DA

De nombreuses techniques ont été mises au point pour mesurer le DA du chitosane (dosage conductimétrique [24,25], titration potentiométrique [7], spectroscopie UV [26,27]). Nous nous intéresserons ici seulement aux deux techniques les plus couramment utilisées : la spectroscopie infra-rouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton.

2.3.1.a. Détermination du DA par spectroscopie IR

La méthode d'analyse par spectroscopie IR est une méthode simple et rapide à mettre en œuvre pour déterminer le DA du chitosane. Les deux principales procédures de calcul sont celles dites de Miya [28] et de Baxter [29]. Le principe, illustré sur la Figure 7, est de comparer une bande caractéristique du motif N-acétyle (liaison amide à 1655 cm^{-1}) par rapport à une référence interne (soit la bande à 2867 cm^{-1} des liaisons C-H, ou la bande à 3450 cm^{-1} des liaisons O-H). Les deux techniques présentent tout de même certaines limitations (la méthode de Miya se restreint au DA faibles et celle de Baxter nécessite des échantillons parfaitement secs). L'analyse est généralement faite sur une pastille de KBr ou directement sur un film de chitosane, variante qui permet d'avoir une meilleure résolution.

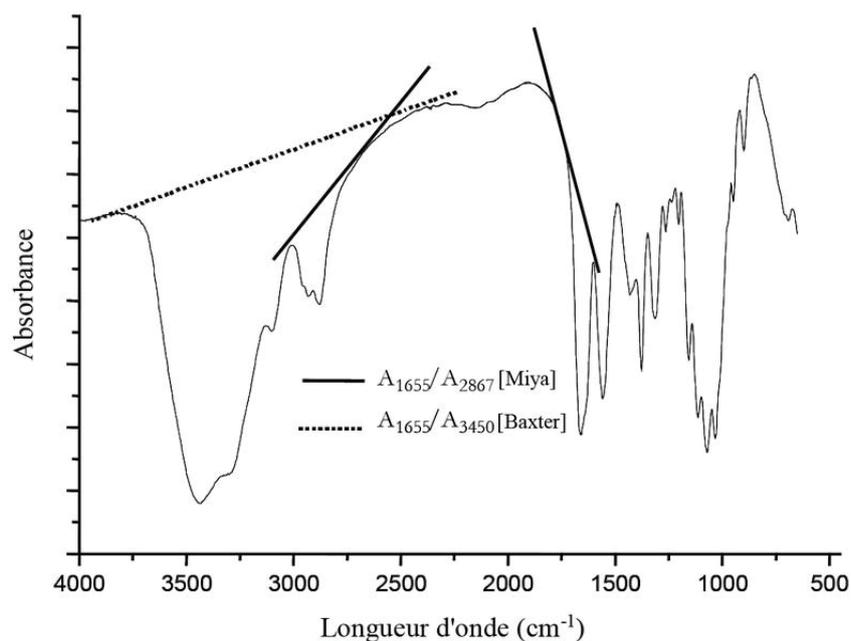


Figure 7. Spectre IR du chitosane [30]. Sont représentées les lignes de base utilisées pour les méthodes de Miya [28] et de Baxter [29].

2.3.1.b. Détermination du DA par spectrométrie RMN

La RMN du proton est la technique de choix pour la détermination du DA. Elle présente l'avantage contrairement à l'analyse IR de ne consommer que très peu de produit, elle ne nécessite pas d'étalonnage et permet de déterminer précisément le DA.

Différentes méthodes ont été proposées pour obtenir le DA à partir d'un spectre RMN ^1H , la plus utilisée ayant été proposée par Hirai et coll. [31]. Elle consiste à comparer l'intégrale du pic de résonance à 2 ppm environ, correspondant aux protons des CH_3 du groupe acétyle (mentionné CH_3 sur la Figure 8), par rapport à l'intégrale correspondant aux 6 protons $\text{H}_2\text{-H}_6$ du cycle glycosidique, situés entre 3 et 4,4 ppm.

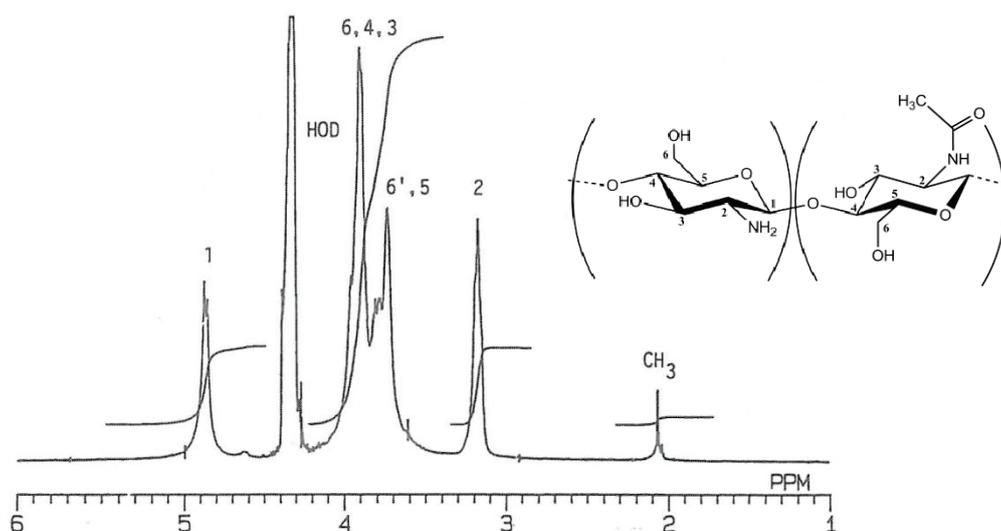


Figure 8. Exemple d'un spectre RMN ^1H du chitosane à 400 MHz réalisé à 70°C dans $\text{D}_2\text{O} + \text{DCl}$ [31].

On détermine le DA à l'aide de la formule suivante :

$$DA (\%) = \frac{\frac{1}{3} I_{\text{CH}_3}}{\frac{1}{6} I_{\text{H}_2\text{-H}_6}} \quad (\text{I.2})$$

Le spectre peut être effectué à chaud pour diminuer la viscosité de la solution de chitosane et ainsi améliorer la résolution des pics. Le chauffage permet également d'observer le pic du proton H_1 grâce à un plus fort blindage du pic résiduel de l'eau [32], les deux étant convolués à température ambiante.

2.3.2. Détermination de la masse molaire moyenne

La masse molaire du chitosane est une caractéristique importante du chitosane influençant les propriétés rhéologiques des solutions et donc leurs conditions de mise en œuvre. Elle est généralement déterminée par viscosimétrie capillaire ou par diffusion de la lumière couplée ou non à un système de chromatographie d'exclusion stérique.

2.3.2.a. Mesures viscosimétriques

La viscosimétrie capillaire permet de déterminer la masse molaire viscosimétrique du chitosane. Brièvement, le principe de cette mesure consiste à mesurer le temps d'écoulement d'un certain volume de solution à travers un capillaire de diamètre défini, à une température contrôlée. On détermine ainsi le temps d'écoulement de solutions de polymère à différentes concentrations, et on relie chaque temps à la viscosité réduite. L'extrapolation de cette viscosité à concentration nulle donne $[\eta]$, qui correspond au cas idéal où les macromolécules de soluté sont indépendantes les unes des autres.

On peut relier ensuite $[\eta]$ à la masse molaire viscosimétrique moyenne \overline{M}_v grâce à l'équation (I.3) de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS). Cela nécessite cependant de connaître les paramètres K et α , qui dépendent du couple polymère-solvant [33].

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (I.3)$$

La détermination de ces paramètres pour le chitosane pose un certain nombre de difficultés (considérant notamment la grande variabilité entre toutes les valeurs de la littérature [34]) et il est difficile d'établir une relation universelle. Le problème provient de la très grande diversité d'origine, du mode de préparation et de la polydispersité des échantillons (DA, force ionique, répartition des motifs,...).

2.3.2.b. Mesure par diffusion de la lumière couplée à un système de chromatographie d'exclusion stérique

La diffusion de la lumière est une technique de choix pour déterminer la masse molaire d'un polymère en solution. Elle peut être utilisée seule (détermination du diagramme Zimm plot) ou couplée à un fractionnement des masses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC en anglais). En connaissant la valeur d'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) du chitosane, on peut remonter à la valeur de masse molaire moyenne en masse \overline{M}_w . L'analyse des polyélectrolytes en SEC est cependant délicate à cause des nombreux effets de charges entre le polyion, l'éluant et la phase stationnaire. Il faut non seulement éliminer les interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire lors du fractionnement des échantillons, mais aussi limiter les interactions électrostatiques induites par le polyélectrolyte [35]. Dans le cas du chitosane, les phases stationnaires sont généralement constituées de gels de polyacrylamide [35] ou de gels de silice cationique [36]. L'éluant est typiquement un tampon acide (pH = 4.0-4.5) ayant une force ionique proche de 0.1 M pour écranter les charges du polymère. Le tampon acide acétique (0.2M) / acétate d'ammonium (0.15 M) (que nous appellerons tampon acétate 150 mM) utilisé dans la partie expérimentale permet de limiter les possibilités de liaisons hydrogène entre le chitosane et la phase stationnaire [36,37]. Par ailleurs, il possède un grand pouvoir d'association avec les charges cationiques diminuant ainsi la charge nette du polyélectrolyte.

Pour des raisons similaires aux paramètres de MHKS, l'incrément d'indice est sujet à beaucoup de discussions dans la littérature, et les valeurs diffèrent beaucoup selon les auteurs, comme on peut le voir dans le Tableau 1.

Tableau 1. Différentes valeurs de dn/dc tirées de la littérature.

Solvant	λ (nm)	DA (%)	dn/dc (mL/g)	Références
		0	0,208	
AcOH 0,2M /AcONa 0,1M	436	9	0,194	W. Wang [38]
		26	0,189	
		31	0,175	
AcOH 0,1M + NaCl 0,2M	633	5	0,201	M. Terbojevich [39,40]
		15	0,191	
		28	0,183	
		42	0,18	
AcOH 0,3M /AcONa 0,2M	633	2-21	0,163	M. Rinaudo [41]
		13-61	0,19	J. Brugneretto [42]
AcOH 0,3M /AcONa 0,1M	633	0-24	0,181	R.J. Beri [43]
AcOH 0,2M /AcONH ₄ 0,15 M	633	5,2	0,195	P. Sorlier [44]
		15,8	0,187	
		32	0,183	
		50,7	0,182	
		70,6	0,154	

Les travaux de Sorlier [44] et Schatz [45] ont permis une meilleure compréhension du comportement de dn/dc en fonction du DA. Dans les deux études, les échantillons de différents DA ont été obtenus en réacétylant en milieu homogène un chitosane de départ de très faible DA. Cette procédure a le double avantage *i)* d'être une technique non dégradante et donc d'obtenir des échantillons de \overline{M}_w et \overline{D} (ou I_p) de valeurs proches, et *ii)* de conduire à une distribution statistique des motifs acétylés le long de la chaîne, conférant ainsi au chitosane une très bonne solubilité et diminuant les phénomènes d'auto-association. Les mesures d'interférométrie différentielle ainsi réalisées sur des échantillons homogènes (en terme de \overline{M}_w , de \overline{D} et de distribution des motifs GlcNAc), n'ayant que pour seule variable le DA, ont permis d'établir une loi de comportement reliant dn/dc et le DA (Figure 9)

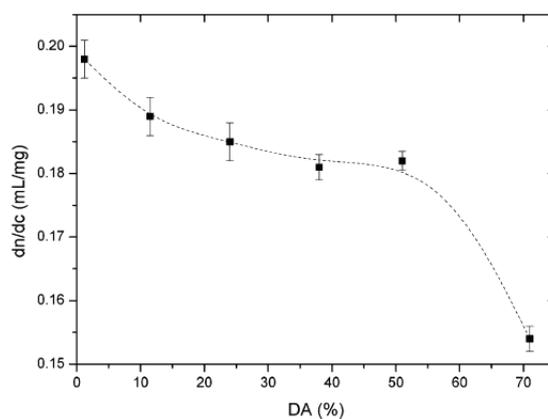


Figure 9. Variation de la valeur du dn/dc en fonction du DA. Eluant : tampon AcOH 0,2M / AcONH₃ 0,15M et $\lambda = 633$ nm [45].

La valeur de dn/dc est ainsi fortement dépendante du DA du chitosane. La courbe peut être découpée en trois différents domaines que les auteurs expliquent ainsi : *i*) aux $DA < 20$ %, les valeurs de dn/dc sont élevées et dépendantes du DA : le chitosane a un comportement de polyelectrolyte fort, avec des interactions électrostatiques prédominantes, qui diminuent lorsque le DA augmente, en rapport avec la diminution de charge apparente; *ii*) lorsque $DA > 50$ %, la diminution de dn/dc serait due à la diminution de la densité de charge ainsi qu'à l'augmentation des domaines hydrophobes; *iii*) enfin, le domaine intermédiaire $20 \% < DA < 50$ %, décrit comme un domaine de transition entre les comportements hydrophiles et hydrophobes de la chaîne de chitosane [45]. Précisons que ces valeurs ont été utilisées au cours de nos travaux pour déterminer les masses molaires moyennes de nos échantillons.

2.4. Propriétés biologiques

Les doses létales 50 (DL50, dose de la substance causant la mort de 50 % de la population testée) ont été déterminées chez la souris à 16g/kg/jour par voie orale (supérieures à celle du saccharose de 12 g/kg/jour), et à respectivement 10 g/kg/jour et 3 g/kg/jour pour des administrations en sous-cutanée et intra-péritonéal [46]. Chez l'homme, les conséquences d'une administration orale ont été étudiées [5,47], et aucune réaction indésirable n'a été relevée. Des études ont également montré que le chitosane ne présentait pas de toxicité par voie nasale chez l'animal [48,49] ainsi que chez l'humain [49–51].

Son squelette glycosidique lui confère une bonne biodégradabilité: les lysozymes et les chitinases sont les principaux acteurs de la dépolymérisation enzymatique chez l'homme [52,53]. La dégradation des portions désacétylées est cependant plus lente et le mécanisme est moins connu, mais les agents oxydants naturellement produits par l'organisme comme le monoxyde d'azote sont suspectés jouer un rôle [5]. Les produits de dégradation du chitosane sont ensuite métabolisés par l'organisme [54].

Le chitosane est peu présent chez les êtres vivants. Cependant, l'unité monomère GlcNAc est un groupement commun de la famille des glycosaminoglycanes (GAGs), classe de polymères (qui comprend également l'acide hyaluronique, le sulfate de chondroïtine, l'héparine,...) très répandue dans le règne animal. Les GAGs sont très présents dans la matrice extra cellulaire (MEC) des tissus conjonctifs des mammifères [55]. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (reconnaissance cellulaire, adhésion des cellules, réponse inflammatoire, interaction avec des agents pathogènes...). Le chitosane serait donc partiellement reconnu par le milieu vivant et les fragments non reconnus induiraient des réponses biologiques erronées, mais susceptibles d'être favorables pour l'organisme. C'est le concept de matériau leurre des milieux biologiques, développé depuis plusieurs années par notre équipe [56,57].

Jusqu'à aujourd'hui, aucun caractère antigénique du chitosane n'a été démontré [5,58]. Des études montrent qu'il possède un caractère hémostatique [59–61], expliqué par la présence des charges positives portées par les groupements amine qui interagissent avec les parois des cellules sanguines, et conduisent à l'activation plaquettaire et la coagulation sanguine. Il a également été montré que la présence de ces charges positives était en grande partie à l'origine des propriétés mucoadhésives du chitosane qui s'agrège sur la mucine (protéine constituante du mucus) [62]. En outre, plusieurs études ont révélé que le chitosane pouvait augmenter la perméabilité de diverses surfaces muqueuses [63,64]. Encore une fois, le mécanisme est attribué aux charges positives du polymère, qui semblent interagir avec la membrane des cellules, induisant une ouverture des jonctions serrées des cellules des tissus épithéliaux. Ces propriétés de mucoadhésion et de perméation des tissus muqueux sont mises à profit pour mettre au point notamment des systèmes de délivrance de principe actifs par voie nasale [48,50,65,66].

Le chitosane s'avère être un bon support pour l'ingénierie tissulaire : il favorise la prolifération cellulaire (notamment des fibroblastes et chondrocytes) et encourage la formation de collagène [67–69]. Il a été montré que les scaffolds à base de chitosane pouvaient induire la différenciation de cellules souches en chondrocytes [70], d'où l'intérêt croissant depuis un peu plus d'une dizaine d'années pour ce polymère dans des applications de régénération du cartilage.

Ce polysaccharide possède des propriétés bactériostatiques et fongicides [71–73], lui conférant un grand intérêt pour des applications médicales et agro-alimentaires, inhibant ainsi le développement de nombreux parasites. Le chitosane est également reconnu dans le domaine de la botanique comme étant un agent éliciteur [74], déclenchant chez certaines plantes des mécanismes de défense permettant de renforcer leurs défenses naturelles.

Le chitosane est également utilisé dans des applications diététiques pour ses effets d'hypocholestérolémie (réduction du taux de cholestérol dans le sang) [3,5]. Il permettrait également de limiter l'absorption des acides gras, biliaires et des triglycérides chez l'animal et chez l'humain [5].

3. Solubilité du chitosane

3.1. Influence du pH du milieu sur la solubilité.

Le chitosane est insoluble dans les solvants organiques, ainsi que dans l'eau à pH neutre et basique [5] en raison des nombreuses liaisons hydrogène entre les fonctions hydroxyle, amine, acétamide et éther. En revanche, il devient soluble en milieu acide grâce à la protonation de ses fonctions amine libres. Les répulsions électrostatiques entre les charges portées par les amines protonées deviennent alors plus importantes que les interactions attractives intra et interchaînes (liaisons hydrogène, effets hydrophobes,...) et permettent la solvataion de la chaîne. La solubilité du chitosane est donc principalement gouvernée par l'hydratation des sites chargés. Elle est ainsi régie par les propriétés acido-basiques des fonctions amine du chitosane, soit par l'équilibre suivant :



En réalité, pour les polyélectrolytes, le pKa n'est pas constant, mais dépend du degré de dissociation α . Ce dernier doit être calculé à partir du degré de neutralisation α' (I.5), directement relié à la quantité de base ajoutée lors du titrage acido-basique [44,75].

$$\alpha = \alpha' + \frac{[H^+]}{C} \quad (I.5)$$

avec $[H^+]$ la concentration en protons libre, pouvant être déduite à partir du pH, et C la concentration en groupement GlcN.

La valeur de pKa est donnée par la relation de Katchalsky (I.6) :

$$pKa = pH + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) = pK_0 - \frac{\varepsilon\Delta\Psi(\alpha)}{KT} \quad (I.6)$$

avec pK_0 le pKa intrinsèque d'une fonction amine isolée, ε la constante diélectrique du milieu, $\Delta\Psi(\alpha)$ la différence de potentiel entre un ion placé à la surface du polyélectrolyte et à une distance infinie [5,76,77].

Ainsi, en dessous du pKa du chitosane (qui, comme nous le verrons plus loin, varie en fonction du DA), une majorité de fonctions amine est protonée, et le polymère devient soluble. Ainsi, le chitosane statistique et protoné est considéré comme soluble dans un domaine de pH compris entre 1 et 6. Cette gamme n'est pas fixe et dépend fortement d'autres facteurs comme le DA et la masse molaire.

3.2. Influence du DA sur la solubilité

Comme nous l'avons abordé précédemment, la solubilité en milieu acide du chitosane s'explique par le caractère cationique de ses fonctions amine lorsqu'elles sont protonées, qui *i*) apportent une énergie électrostatique suffisante pour casser les nombreuses liaisons

hydrogène et *ii*) améliorent considérablement l'hydratation des chaînes. La densité de fonctions amine sur la chaîne polysaccharide, par conséquent le DA, va donc beaucoup jouer sur la solubilité du chitosane dans l'eau. Il est difficile de donner une gamme de solubilité, tant celle-ci est simultanément dépendante d'autres facteurs : pH, force ionique (f.i.), $\overline{M_w}$, ainsi que la distribution des unités N-acétyl le long de la chaîne polymère [78].

La tendance démontrée par Sorlier et coll. [75] sur une large gamme de DA est que le pK intrinsèque du chitosane (pK_0) augmente lorsque la valeur de DA augmente, et ce quelle que soit la valeur du degré de dissociation. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs avancent que l'hydrophobie apportée par les motifs acétylés augmente la cationicité des groupements ammonium. Ainsi, lorsque le DA augmente, le chitosane serait soluble sur une plus grande gamme de pH. En outre, l'augmentation de la proportion de motifs acétylés entraîne des gênes stériques qui seraient responsables d'une rigidification de la chaîne, ce qui favoriserait son hydratation [79]. A partir d'un certain DA, il peut devenir soluble dans l'eau à tout pH, notamment dans le cas de faibles masses molaires [78]. Il faut cependant préciser que la dissolution à pH neutre ou basique ne peut pas être directe : la solvation des chaînes de polymère étant toujours liée à la protonation des fonctions amine, il est impossible de solubiliser directement un chitosane de DA 50-60 % dans des solutions neutres ou basiques. Une pré-étape de dissolution en milieu acide est nécessaire afin de protoner les amines. On peut ensuite augmenter le pH par ajout d'une base sans provoquer la précipitation du chitosane dans le cas de chitosane de haut DA et/ou de faible masse molaire.

Il est important de comprendre les phénomènes qui entrent en jeu aux abords des limites de solubilité, lorsque l'on augmente le DA. Lors d'une réacétylation en milieu aqueux, Hirano et coll. ont observé la formation d'un gel à partir d'un DA de 80 % [80,81]. Cette gélification est due à la diminution de quantité de fonctions amine protonées, et donc à la diminution du caractère polyélectrolyte de la chaîne polymère. L'augmentation de groupements acétyl conduit à la formation de liaisons hydrogène et d'effets hydrophobes interchaînes, créant ainsi des points de jonction. Le polymère réacétylé devenu chitine n'est alors plus soluble, mais dans un état de gel hautement gonflé.

3.3. Influence de la masse molaire sur la solubilité

La masse molaire des lots de chitosane commerciaux peut varier énormément suivant les techniques de préparation employées. Des conditions de désacétylation trop drastiques se traduisent souvent par une diminution importante des masses molaires, et c'est pourquoi le chitosane de très faible DA dépasse difficilement les 500 000 g/mol de masse molaire moyenne en masse.

La variation de la solubilité du chitosane avec sa masse molaire n'a rien de surprenant pour un polymère (elle augmente lorsque $\overline{M_w}$ diminue). Une conséquence à prendre en compte est que la plage de pH dans laquelle le chitosane est soluble augmente lorsque sa masse diminue. Ainsi, un échantillon de haute masse qui n'était pas soluble à un certain pH peut le devenir suite à une dépolymérisation [20,73,78,82,83].

3.4. Influence de la force ionique du milieu sur la solubilité

Sorlier et coll. ont montré que, quel que soit le DA du chitosane testé, un effet d'écrantage était systématiquement observé lorsque la force ionique augmentait, entraînant une diminution du paramètre potentiel électrique $\Delta\Psi(\alpha)$ dans l'équation de Katchalsky (I.6). La conséquence est que la valeur du pK_0 , et donc du pK_a , augmente avec la force ionique, élargissant donc le domaine de pH dans lequel le chitosane est soluble. Ce phénomène est cependant limité, puisque dans le cas le plus important, c'est-à-dire pour les plus petits DA, l'augmentation n'est que de 0,3 unité de pK_a pour une force ionique multipliée par un facteur 10 [75].

4. Les matériaux à base de chitosane

4.1. Hydrogels de chitosane

4.1.1. Gélification du chitosane

Un gel est un réseau tridimensionnel continu retenant un solvant entre ses mailles. Le solvant est présent en grande quantité, généralement majoritaire. Dans le cas des hydrogels, ce solvant est l'eau.

Le gel est un matériau mou qui possède les propriétés viscoélastiques d'un solide. Ce sont des « solides visco-élastiques » [84]. Selon Burchard et Ross-Murphy, le module élastique G' d'un gel doit afficher un plateau sur une large gamme de fréquences. G' doit également être au moins dix fois supérieur au module de dissipation G'' (autrement dit, $\tan\delta < 0,1$) sur une gamme de fréquence de plusieurs décades [85]. Il n'est enfin pas exigé d'un gel qu'il possède un temps de relaxation infini [86].

Le chitosane, comme une grande partie des polysaccharides, est connu pour conduire à la formation de gels dans certaines conditions. Il y a communément deux voies pour obtenir un hydrogel de chitosane : la voie « chimique » et la « voie physique ». Dans le premier cas, la réticulation permettant d'obtenir un réseau 3D repose sur la création de liaisons covalentes. Ce sont donc des structures irréversibles (de surcroît non thermoreversibles ni solvoreversibles). Dans le deuxième cas, la réticulation repose sur des interactions de faibles énergies (liaisons hydrogène, forces de van der Waals,...) ou sur la formation de conformations stabilisées par la présence d'interactions ioniques, par exemple avec des ions métalliques.

4.1.2. Différentes voies de gélification

4.1.2.a. Gélification chimique

La réticulation se fait par réaction chimique entre un agent réticulant, notamment le glutaraldéhyde [87,88] ou l'épichlorhydrine [89], et deux fonctions amine nucléophiles. L'utilisation de tels agents réticulants, connus pour être cytotoxiques [90,91] dans le cas du glutaraldéhyde ou mutagène dans le cas de l'épichlorhydrine, peut constituer un obstacle à des

applications médicales. L'utilisation de la génipine, un agent réticulant naturel, utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise, peut s'avérer être une bonne alternative. Plusieurs équipes de recherche se sont en effet intéressées depuis le début des années 2000 [92] à cet agent difonctionnel comme réticulant du chitosane, présentant une toxicité nettement moindre que les réticulants classiques [93,94].

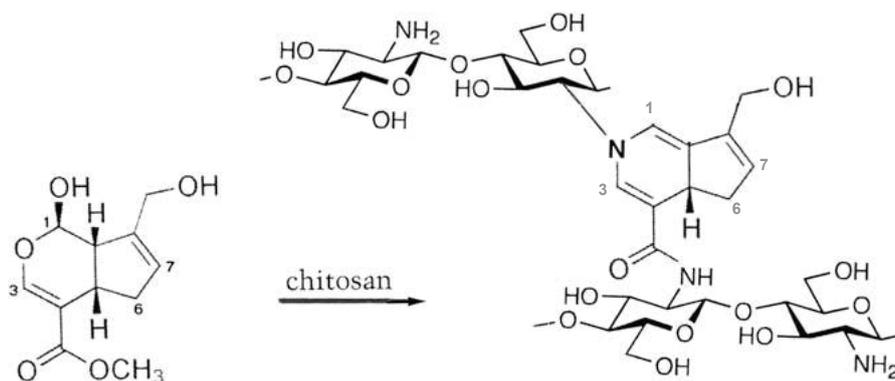


Figure 10. La génipine (à gauche) réagit avec deux fonctions amines primaires d'unités GlcN du chitosane. Reproduit de [94].

4.1.2.b. Gélification physique

Les hydrogels physiques sont réticulés par des interactions de type liaisons ioniques, liaisons hydrogène, interactions de van der Waals ou effets hydrophobes, qui sont qualifiés comme étant de faible énergie. En effet, leur énergie de cohésion est de l'ordre de l'énergie thermique kT [95], ce qui, dans le cas notamment des gels basés sur des interactions de type liaisons H, les rend souvent thermoréversibles [96]. Les points de réticulation ne sont plus aussi localisés que pour les hydrogels chimiques, mais ils peuvent s'étendre sur de nombreuses unités de répétition, constituant des domaines compacts plus ou moins grands, dans un ensemble amorphe et enchevêtré. Il a également été montré dans le cas des gels de chitosane la présence de cristallites, structures cristallisées de chitosane à grande échelle [97,98].

Plusieurs modes d'obtention d'hydrogels de chitosane ont été proposés dans la littérature. Nous reporterons ici les deux principales techniques utilisées dans notre équipe, qui reposent toutes deux sur une modification de la solubilité du chitosane. Ces deux modes de gélification physique présentent la particularité de conduire à des hydrogels de chitosane pur,

contrairement à d'autres modes, notamment ceux basés sur des interactions ioniques (avec des polyphosphates ou des organophosphates [99,100], des ions métalliques (Mo(VI) [101], Cu [102]), des acides organiques (acide oxalique[103], thioglycolique[104],...)). Ces procédés sont également valorisables en tant que procédés "eco-friendly", dès lors qu'ils nécessitent uniquement l'utilisation d'eau et de constituants tels que l'acide acétique et l'alcool ou l'hydroxyde d'ammoniaque, relativement sûrs et facilement retraitables.

i) Procédé par voie hydro-alcoolique

La première condition pour former un gel est d'avoir une concentration en polymère dans la solution qui soit supérieure à la concentration critique d'enchevêtrement, C^* , définie comme étant l'inverse de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ du polymère [105–107]. Ainsi, les nœuds d'enchevêtrements pourront jouer le rôle de jonctions physiques, et donner lieu à l'apparition d'un réseau réticulé tridimensionnel. En dessous de C^* , le nombre d'enchevêtrements des chaînes et de zones de jonctions physiques reste insuffisant pour permettre la gélification du système.

La balance des interactions hydrophiles-hydrophobes a également une influence importante sur la formation des gels de chitosane. Dans cette voie, la première étape est d'élaborer une solution hydro-alcoolique de chitosane. L'alcool choisi doit avoir une pression de vapeur saturante inférieure à l'eau et une température d'ébullition supérieure. Par une évaporation progressive de l'eau et de l'acide au sein de la solution, la constante diélectrique du milieu diminue, ce qui a pour effet de réduire la dissociation des sels d'ammonium. Les répulsions électrostatiques sont ainsi amoindries, ce qui, au fur et à mesure de l'évaporation de l'eau, favorise l'établissement de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes entre les chaînes de chitosane et entraîne progressivement la formation de nœuds de réticulation qui forment *in fine* le gel [107]. La formation de ces nœuds de réticulation peut être suivie en diffusion de la lumière statique, dans la mesure où l'intensité diffusée est directement reliée à la taille des clusters en formation. Finalement, le gel est neutralisé et lavé pour éliminer l'alcool et les sels formés. Les travaux d'A. Montembault ont montré qu'il était ainsi possible d'obtenir un hydrogel physique de chitosane, quel que soit son DA [30].

ii) Procédé par voie aqueuse

Les mêmes auteurs ont également démontré la faisabilité d'un hydrogel physique à partir d'une solution aqueuse de chitosane sur une large gamme de DA, sans avoir recours à un solvant organique [108]. Le mécanisme repose sur les mêmes facteurs que ceux précédemment évoqués: une concentration en polymère supérieure à C^* , et une modification de la balance des interactions hydrophiles-hydrophobes, via un changement physico-chimique du milieu. Dans la voie aqueuse, le changement est une augmentation de pH, en mettant en contact la solution de chitosane avec un flux d'ammoniac gazeux. L'augmentation du pH entraîne une neutralisation des fonctions amine, protonées jusqu'alors dans la solution acide. Cette diminution de la densité de charge apparente des chaînes de chitosane fait diminuer les répulsions électrostatiques entre les chaînes et favorise l'établissement de liaisons hydrogène et d'effets hydrophobes. En outre, cela provoque un changement dans le comportement du polymère en solution : d'une configuration de chaîne polyélectrolyte semi rigide en solution acide, les chaînes vont devenir plus flexibles avec l'augmentation de pH et la diminution de densité de charge. La mobilité moléculaire s'en trouve ainsi améliorée, ce qui favorise la formation de liaisons hydrogène et d'effets hydrophobes. Les auteurs ont également proposé l'existence d'une concentration critique C^{**} , au-delà de laquelle les chaînes s'assembleraient en nano-agrégats [98,108], favorisant une construction plus rapide du réseau tridimensionnel du gel. Une fois formés, les gels sont lavés à l'eau pour éliminer les sels d'ammonium et diminuer le pH jusqu'à un pH neutre.

Montembault et coll. ont de plus constaté que ces gels n'étaient pas détruits sous l'effet de la chaleur, d'une agitation ou avec l'ajout d'eau, ce qui semblerait confirmer la présence d'autres interactions que les liaisons hydrogènes, comme les interactions hydrophobes [30].

Le procédé de gélification par voie aqueuse ne fait donc appel à aucun réticulant chimique ni solvant organique toxique. C'est une méthode particulièrement simple à mettre en œuvre, qui permet d'obtenir rapidement des matériaux constitués essentiellement de polysaccharide biosourcé et d'eau. Il répond en cela aux préoccupations actuelles d'obtenir des matériaux par des techniques respectueuses de l'environnement, qui limitent l'utilisation de solvant et valorisent la biomasse.

4.1.3. Quelques exemples d'application du chitosane sous forme d'hydrogel

Boucard N. et coll. ont mis au point un matériau permettant d'améliorer la cicatrisation de brûlures du 3ème degré et qui repose sur le principe de leurre des milieux biologiques évoqué précédemment. Le pansement consiste en un hydrogel physique de chitosane bicouche mimant la structure de la peau native (voir Figure 11) : la première couche d'hydrogel (derme), constitue un matériau souple en contact direct avec la plaie, s'adaptant parfaitement à la géométrie de la zone brûlée ; la deuxième couche est plus rigide, joue le rôle de l'épiderme, protège la zone et assure une bonne résistance mécanique au pansement. Les études de Boucard N. et Dupasquier F. montrent que ces biomatériaux accélèrent la cicatrisation des brûlures, tout en améliorant l'aspect visuel des cicatrices [109–111].

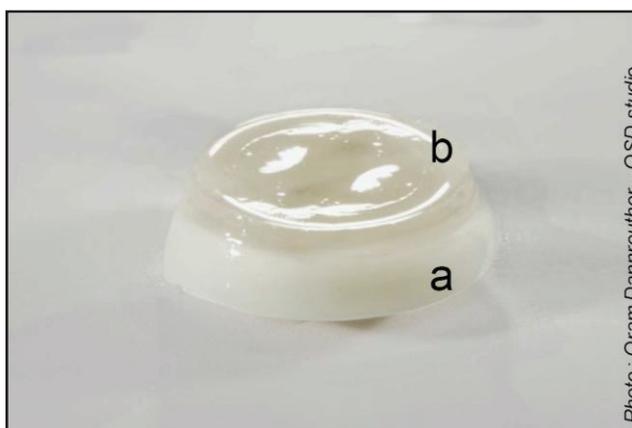


Figure 11. Hydrogel physique bicouche de chitosane. (a) : phase destinée à être en contact avec la plaie, (b) : couche externe [111].

Les hydrogels de chitosane font également l'objet de nombreuses études en tant que scaffold ou de matériaux leurres [57] dans le domaine de la régénération du cartilage [70,112]. Il ressort de Montembault et coll. que des chondrocytes de lapin ou humains mélangés à des broyats d'hydrogel de chitosane ne colonisaient pas ces derniers, mais s'aggloméraient à leur surface. En comparaison aux chondrocytes mis en culture sans biomatériaux, les chondrocytes mélangés à des hydrogels de chitosane ont produit significativement plus de matrice extracellulaire, et les cellules ont conservé leur phénotype pendant au moins 21 jours [57].

Les travaux de S. Ladet [113,114] ont conduit à la réalisation de matériaux multi-membranaires à base de chitosane. Ces matériaux ont montré leur intérêt dans le domaine de la culture cellulaire, jouant le rôle de bioréacteurs : des chondrocytes ont ainsi pu être cultivés dans un "oignon" multi-membranaires de chitosane, et ont proliféré tout en produisant de la membrane extracellulaire en grande quantité et en conservant leur phénotype durant toute la durée de l'étude (45 jours) [115]. Les cellules sont restées confinées dans l'espace inter-membranaire, indiquant que l'hydrogel empêchait toute diffusion des cellules, mais qu'il permettait cependant la diffusion de macromolécules. Le procédé a également été décliné afin de réaliser des tubes multi-membranaires pour la reconstruction de vaisseaux sanguins par exemple [116,117].

4.2. Le chitosane sous forme solide

Films. Le chitosane étant un polymère filmogène [118] de nombreuses applications sous forme de films ont été développées, notamment dans l'emballage alimentaire, mettant ainsi à profit ses propriétés antimicrobiennes et des propriétés barrières intéressantes envers l'oxygène [119]. L'enrobage de fruits et légumes par un film de chitosane prolonge sensiblement leur durée de vie en inhibant partiellement le développement de pourriture [120,121]. Dans le domaine biomédical, des études sont menées sur les films de chitosane pour réaliser des systèmes de relargage de principes actifs. Le gonflement progressif et la dégradation lente du chitosane permettent une libération contrôlée de divers médicaments comme des antibiotiques [122], des anti-inflammatoires [123]. Grâce à leurs propriétés antimicrobiennes et mucoadhésives, les films de chitosane peuvent ainsi être déposés sur des plaies et favoriser la cicatrisation par la délivrance de facteurs de croissance [124] ou d'huiles essentielles [125] par exemple.

Fils/Tissus. Le chitosane peut également être utilisé sous forme de fibres [54], pour servir en tant que fil de suture, ou bien être tissé pour confectionner des tissus médicaux. Ces textiles ont un grand potentiel notamment pour la réparation de plaies cutanées [9,126].

Eponges et Aérogels. Le chitosane peut également être utilisé sous forme d'éponge ou d'aérogel. Il trouve ainsi des applications dans l'ingénierie tissulaire [70,127,128], la culture cellulaire [129] ou le relargage de principes actifs [130], ou la catalyse [126], mettant à profit

une très grande surface spécifique. Les éponges sont obtenues par lyophilisation d'hydrogels, tandis que les aérogels sont obtenus par séchage au CO₂ supercritique d'alcogels, (eux-mêmes obtenus à partir d'hydrogels en remplaçant progressivement l'eau du gel par de l'alcool, par des bains successifs). Le procédé d'élaboration des aérogels permet de conserver de façon relativement fidèle la structure de l'hydrogel natif.

4.3. Le chitosane sous forme particulaire

4.3.1. Formation de particules par réticulation covalente

Ohya et coll. ont obtenu des nanoparticules par émulsification d'une solution de chitosane dans le toluène, suivi d'une réticulation au glutaraldéhyde [131]. Les auteurs obtiennent ainsi des particules sphériques avec un diamètre compris entre 250 et 300 nm, qui permettent d'encapsuler une molécule anticancéreuse, le 5 fluorouracil. Des nanoparticules de chitosane ont été obtenues en utilisant une méthode de micelle inverse de tensioactif (le sodium bis(ethylhexyl) sulfosuccinate) dans l'hexane. Le cœur aqueux de ces micelles contient une solution de chitosane qui est réticulé au glutaraldéhyde [132]. Les auteurs mettent en évidence que la taille dépend du taux de réticulation au glutaraldéhyde, le diamètre pouvant varier de 30 nm à 100 nm lorsque respectivement 10 % et 100 % des fonctions amine sont réticulées. Ces techniques constituent des procédés reproductibles avec un très bon contrôle des tailles, mais l'utilisation d'un réticulant chimique, cytotoxique dans le cas du glutaraldéhyde, et de solvant organique, peut porter préjudice à la biocompatibilité finale des nanoparticules.

4.3.2. Formation de particules par interactions électrostatiques

Il est possible de réticuler le chitosane en le complexant avec des espèces de charges opposées. Une des méthodes les plus documentées à ce sujet est la réticulation avec le tripolyphosphate (TPP) [133–136]. La formation des nanoparticules est immédiate après addition d'une solution de TPP dans une solution acide de chitosane, et on peut obtenir des particules de tailles variables en jouant sur différents paramètres comme la concentration en chitosane ou le ratio chitosane/TPP. D'autres espèces anioniques ont été utilisées pour

fabriquer des particules de chitosane, comme des ions sulfate [137], citrate [138] ou des anions métalliques Mo [139].

De la même façon, le chitosane peut être complexé en solution aqueuse avec des espèces macromoléculaires possédant des charges négatives, pour former des complexes polyélectrolytes (PECs) par interactions électrostatiques. La formation des PECs se fait sans utilisation de réticulant chimique, ce qui en fait de bons candidats pour des applications pharmaceutiques. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle requiert de travailler à faibles concentrations [140–142]. En effet, les phénomènes de complexation en jeu sont fortement dépendants de la viscosité du milieu, ce qui nécessite l'utilisation de grands volumes. Les PECs colloïdaux à base de chitosane peuvent être obtenus avec une grande variété de polymères. On citera comme polysaccharides fréquemment utilisés le sulfate de dextrane [142,143], l'alginate [144], l'héparine et l'acide hyaluronique [145,146]. Il existe également des travaux sur la formation de PECs avec des polypeptides comme le poly(acide glutamique) [147] ou le poly(aspartate) de sodium [148]. La complexation du chitosane avec des brins d'ADN [149,150] ou de siRNA [151] pour réaliser des « **polyplexes** », offrirait de grandes perspectives dans le domaine de la thérapie génique dans les prochaines années.

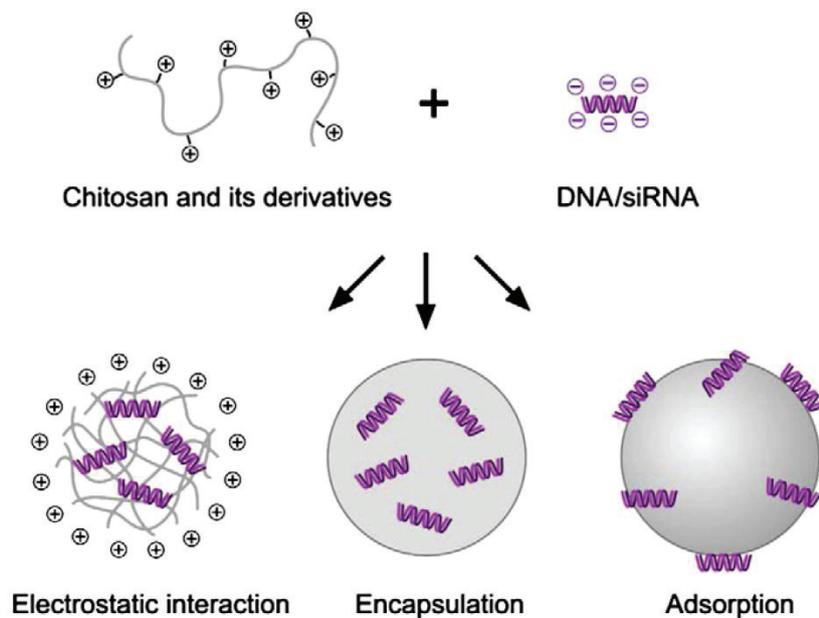


Figure 12. Représentation schématique de différentes techniques pour obtenir des nanoparticules à base de chitosane et de siRNA. Reproduit de [51]

4.3.3. Formation de particules par modification du pH

Schatz et coll. ont décrit la formation de nanoparticules lors de la neutralisation de solutions de chitosane avec $C < C^*$ par une solution de soude diluée [152]. Cette formation intervient à partir d'un pH critique qui dépend notamment du DA. La déprotonation d'une partie des fonctions amine du chitosane modifie la balance entre les interactions hydrophiles et hydrophobes, ce qui entraîne l'association macromoléculaire, et conduit à la formation de nanoparticules. D'après les auteurs, la taille des particules augmente avec le DA du chitosane, passant ainsi de 50-150 nm pour un DA de 1 % à 100-300 nm pour un DA de 51 %. Au-delà du pH critique, trop peu de fonctions amine sont protonées pour assurer une bonne stabilisation électrostatique, ce qui entraîne la formation d'un précipité macroscopique.

F. Brunel et coll. ont mis au point une technique permettant d'obtenir des nanogels de chitosane sans réticulant chimique. Le principe consiste à appliquer le procédé de gélification par voie aqueuse (évoqué en § 4.1.2.b) sur une miniémulsion inverse eau/huile [153]. Des nano-gouttelettes de solution acide de chitosane dispersées dans une huile biocompatible sont gélifiées par augmentation du pH du mélange, ce qui conduit à la formation de nanogels de chitosane. Cette technique qui a été utilisée dans les présents travaux, sera plus amplement détaillée ci-après (*cf.* Chapitre II).

4.3.4. Formation de particules par modification chimique du chitosane

La modification chimique du chitosane avec des groupements hydrophobes est une stratégie permettant d'obtenir un polymère amphiphile, avec des propriétés d'auto-assemblage en solution. Le greffage de ces groupements se fait généralement *via* les fonctions amine libres du chitosane. Le chitosane devenu amphiphile s'organise alors en milieu aqueux en structures sub-microniques « core-shell », les segments hydrophobes ségrévés au cœur de la particule, et les segments hydrophiles formant la couronne. Il est ainsi possible d'obtenir des nanoparticules de chitosane de quelques dizaines [154] à plusieurs centaines de nanomètres [155], dépendant du type de molécule greffée, et du taux de substitution. Pour éviter la précipitation de ces objets à pH physiologique, il est cependant nécessaire d'augmenter la solubilité du chitosane en greffant généralement un groupement glycol [156,157] ou succinate [158] sur l'alcool en C6 des motifs GlcN.

4.3.5. Applications du chitosane sous forme de nanoparticules

La grande majorité des études sur les nanoparticules à base de chitosane concerne le secteur biomédical, et en particulier dans le domaine du relargage de principe actif [159]. Les travaux de Vllasaliu et coll. ont montré que des nanoparticules de chitosane obtenues par gélification ionique induisent l'ouverture réversible des jonctions serrées de cellules épithéliales [160]. Ainsi, la combinaison des propriétés de muco-adhésion et d'amélioration de la perméabilité des tissus muqueux a conduit à utiliser ces nanoparticules pour l'administration de vaccins par voie muco-sale (orale, nasale, pulmonaire, etc) [66,161–163]. Il a également été constaté que les nanoparticules de chitosane pouvaient favoriser le transport de médicament jusqu'au cerveau [164]. L'administration par voie nasale de particules encapsulant de l'estradiol, une hormone utilisée dans le traitement contre la maladie d'Alzheimer, a permis, en traversant la muqueuse puis en suivant les nerfs olfactifs, de contourner la barrière hémato-encéphalique, un verrou pourtant majeur dans l'administration de médicaments au cerveau.

L'élaboration de nanoparticules à base de chitosane amphiphile est également prometteur pour la vectorisation. En effet, l'avantage de cette technique est qu'elle permet de greffer des molécules d'intérêt biologique lipophiles (des stéroïdes par exemple [154], des vitamines E [154,158] ou D [157]), qui seront piégées dans le cœur des particules, à des taux pouvant être très élevés (jusqu'à *ca.* 55 % dans certains cas [154]). Les principes actifs ainsi encapsulés peuvent être transportés et lentement relargués dans l'organisme, *via* l'hydrolyse de la liaison amide ou ester généralement utilisées pour le greffage.

L'utilisation de polyplexes à base de chitosane en thérapie génique est intéressante à plusieurs égards : biodégradables et cytocompatibles, leur efficacité à transporter du matériel génétique à l'intérieur de cellules a déjà été démontrée [165]. En fonction du pH du milieu et des caractéristiques du chitosane (DA, masse molaire), les nanoparticules pénètrent avec plus ou moins de facilité par endocytose dans les cellules, comme dans les cellules embryonnaires du rein [166], du carcinome du poumon, du mélanome [165,167]. Des PECs à base de chitosane et de plasmide ont également été évalués *in vitro* pour transférer des gènes thérapeutiques à l'intérieur de chondrocytes [168,169]. Les résultats révèlent, sous certaines conditions de pH et de ratio molaire chitosane/plasmide, une efficacité maximale ainsi qu'une survie de plus de 90 % des cellules transfectées.

L'utilisation de particules de chitosane intéresse également le secteur de l'agriculture, en tant qu'agent éliciteur, afin d'encapsuler des principes actifs ou en tant que pesticide [126], ainsi que le domaine de la dépollution des eaux et de la catalyse [170,171], en mettant à profit le pouvoir chélatant et complexant du polymère vis-à-vis notamment d'ions métalliques [172,173] de colorants [174], d'hydrocarbures aromatiques ou de protéines [2].

II - LES ASSEMBLAGES DE NANOPARTICULES

1. Introduction

Nous aborderons dans cette partie le sujet des assemblages colloïdaux, et plus exactement leur utilisation dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Ce secteur de la médecine régénérative impose un cahier des charges exigeant en termes de design et d'élaboration des matériaux. La régénération des tissus est un problème multi-échelle : des molécules de reconnaissance jusqu'au développement d'un néo-tissu, en passant par la croissance cellulaire, chaque échelle requiert une grande variété de signaux qui doivent être délivrés en temps et lieu. Les matériaux conçus doivent ainsi permettre la colonisation par des cellules, être capables de s'accommoder à différents phénotypes cellulaires, de présenter une morphologie favorisant le développement d'un néo-tissu approprié, et enfin de maintenir l'intégrité du tissu sain. Ces matériaux doivent également être en mesure de délivrer des facteurs de croissance permettant de réguler le développement tissulaire, et être dégradés en des sous-produits non toxiques, qui ne perturberont pas la croissance cellulaire. Enfin, ils doivent être facilement implantables ou injectables afin d'alléger au mieux les conditions opératoires et postopératoires.

Dans ce contexte, les matériaux à base de précurseurs colloïdaux représentent une famille de produits très prometteuse, qui propose plusieurs avantages : leur très grande surface spécifique, leur capacité à encapsuler et relarguer des molécules bioactives, et leur faculté d'auto-assemblage (éventuellement *in vivo*) permettant la formation de matériaux présentant des propriétés mécaniques, rhéologiques et physico-chimiques contrôlables. Enfin les colloïdes offrent l'avantage de pouvoir être produits facilement, même à grande échelle, et ce désormais à partir de matériel biodégradable, biocompatible et éventuellement biosourcé. Il Nous présenterons ci-après (paragraphe II-2) un état de l'art des procédés actuellement connus

pour mettre au point des matériaux via l'assemblage de colloïdes qui remplissent, au moins partiellement, le cahier des charges exigé en ingénierie tissulaire et médecine régénérative. Cette étude a fait l'objet d'une publication sous forme de revue publiée dans le journal *Materials Science and Engineering C* (2013, vol. 33, p. 997-1007), retranscrite dans le présent manuscrit.

2. Publication 1 : Particle assemblies: toward new tools for regenerative medicine

Particle assemblies: toward new tools for regenerative medicine

Roux R.,^a Ladavière C.,^a Montembault A.,^a Delair T. *^a

^a Université de Lyon, Université Lyon 1, IMP@LYON1, UMR CNRS 5223, 15 bld Latarjet, 69622, Villeurbanne Cedex, France.

* Corresponding author: thierry.delair@univ-lyon1.fr

Keywords

Regenerative medicine, colloids, self-assembly, hydrogels, smart materials

Abbreviations : dex-HEMA, dextran-hydroxyethylmethacrylate carbonate derivative; DMAEMA, dimethylaminoethylmethacrylate; ECM, extracellular matrix; G', elastic modulus; G'', viscous modulus; GMPs, gelatin microparticles; LCST, lower critical solubility temperature; MAA, methacrylic acid; mPEG, methoxy poly(ethylene glycol); MSCs, mesenchymal stem cells; NIPAM, N-isopropyl acrylamide; ODLLA, D,L-lactic acid oligomer; OPF, oligo(poly(ethylene glycol)fumarate); PCL, poly(ϵ -caprolactone); PEG, poly(ethylene glycol); PEGEEMA, poly(poly(ethylene glycol ethyl ether methacrylate)); PEGMEMA, poly(poly(ethylene glycol methyl ether methacrylate)); PEMA, poly(ethylene-co-maleic acid); PLA, poly(lactic acid); PLGA, poly(D,L-lactide-co-glycolide); pNIPAM, poly(N-isopropyl acrylamide); POA, poly(octadecanedioic anhydride); PPGMA, poly(propylene glycol methacrylate); PVAm, polyvinylamine; SMSs, sintered microspheres; $\tan(\delta)$, loss factor; τ_y , liquefaction stress; Tg, glass transition temperature; VEGF, vascular endothelial growth factor

2.1. Introduction

Particles have long been used in life sciences as drug or vaccine delivery systems [175,176] or in biotechnology for cell culture in bioreactors [177]. From the field of tissue engineering, new needs in terms of materials have emerged with particular specifications such as the capacity *i)* to allow cell growth in a highly hydrated 3D environment allowing diffusion of the nutrients and various chemokines, *ii)* to fit into a defect for optimum regeneration properties, *iii)* to be easily implanted in patients, *iv)* to feature mechanical properties matching those of a living tissue (elastic moduli ranging from less than 1 kPa for brain tissues to dozens of GPa for bones [178,179]), *v)* to be non cytotoxic and *vi)* to deliver growth factors with temporal and spatial control. Ideally, the properties of the materials should be flexible depending on the need or should evolve with time as the regeneration of the tissue takes place.

Particle assemblies constitute a new generation of materials obtained from the associations of micro or nanospheres, which meet some of the above constraints, in particular their mechanical properties can easily be tuned, they lead to porous materials potentially allowing cell colonization and capable of delivering biological cues *via* the encapsulation or the physical adsorption of various molecules. The particle associations can be achieved either by entrapment within a polymer network obtained by a polymerization reaction, physical interactions, physical processing (Figure 13A), or by physicochemical interactions between the particles dispersed in an aqueous continuous phase (Figure 13B). This paper aims at reviewing the current strategies used to obtain new materials from the controlled assembly of micro/nano-particles and their potential applications in the demanding field of regenerative medicine. We have chosen to divide this paper into two parts corresponding to the two main elaboration processes of micro/nano-particle-based 3D networks (Figure 13).

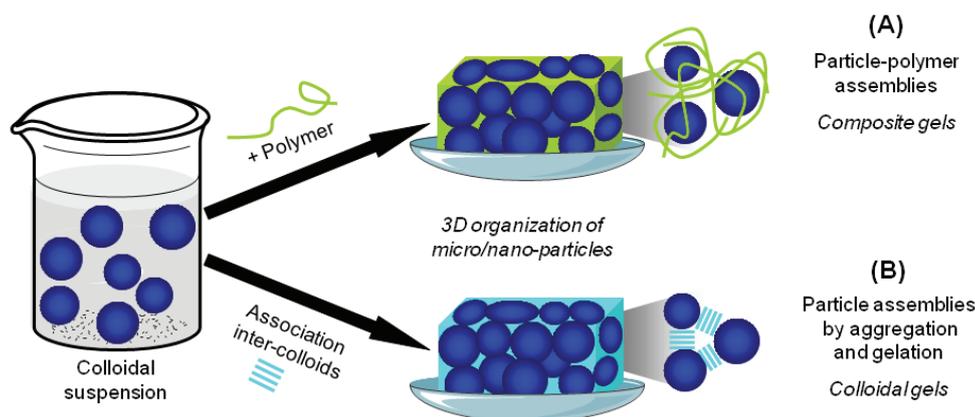


Figure 13. Schematic representation of particle assembly types presented in this paper: (A) Particle-polymer assemblies (composite gels) (B) particle assemblies by aggregation and gelation (colloidal gels).

2.2. Particle-polymer assemblies (composite gels)

Hydrogels are very attractive in tissue engineering because they are 3D structures that, similarly to the extracellular matrix (ECM), contain a high water content, thus providing a favourable environment for cell expansion and tissue regeneration [180]. The interest for composite gels, *i.e.* gels loaded with particles, has been increasing steadily because *i)* they allow the improvement of the mechanical properties in comparison with non-composite systems, *ii)* they favor cell expansion and differentiation, *iii)* the particles can be loaded with bioactive molecules involved in tissue regeneration and *iv)* the particles can modulate the biodegradability of the composite material. We can differentiate two types of particle-polymer assemblies, those resulting from the entrapment of particles within a polymer gel matrix, from those where the interactions between the dispersed phase and the polymer lead to the assembly.

2.2.1. Assemblies via particle entrapment in a polymer gel matrix

2.2.1.a. Chemically crosslinked matrix

In 2003, Mikos and co-workers reported a composite gel comprising of oligo(poly(ethylene glycol)fumarate) (OPF) and gelatin microparticles (GMPs) [181]. The gelation at physiological conditions took place in 8-10 minutes thanks to the addition of an ammonium persulfate initiator and a poly(ethylene glycol)-diacrylate cross linker. They

showed that the transforming growth factor- β 1 could be loaded in GMPs through polyionic complexation, and its *in vitro* release could be controlled by modulating the swelling properties of the OPF-GMPs composite gel. The authors showed that the *in vitro* burst release of the growth factor from OPF hydrogels was approximately 53% while it was reduced to 29-32% from composite gels (both with a similar mesh size of 136 Å). In physiological or biological media, GMPs appeared to act as sacrificial templates enzymatically generating pores, allowing a better control of the protein release, and increasing the kinetics of the hydrogel degradation [182].

Moving to implantable biodegradable scaffolds for cell culture, Mikos and co-workers associated chondrocytes or mesenchymal stem cells (MSCs) to the above composite gels, the particles serving as cell-adhesion points. Indeed, the presence of GMPs increased cellular proliferation and, with GMPs loaded with growth factors, the phenotype of chondrocytes was maintained [183], and the differentiation of MSCs into chondrocytes was induced [184,185]. In the latter case, the MSCs differentiation increased with the swelling ratio of the matrix, which was related to the molar mass of the poly(ethylene glycol) (PEG) entering in the formulation of the OPF [186]. *In vivo*, the filling of osteochondral defects with the composite gel embedding MSCs and GMPs loaded with growth factors was well tolerated after 12 weeks post implantation [187]. However, the histological investigation revealed that the newly formed tissues could still be perfectible.

To improve the performance of their composite gels, Mikos and co-workers developed the concept of a bilayer structure for the regeneration of bone and cartilage, represented in Figure 14. The lower layer of the gel was designed to favor bone growth whereas the upper layer was devoted to cartilage regeneration. To reach these objectives, the lower layer consisted in a crosslinked OPF hydrogel containing or not empty GMPs; the upper layer contained GMPs loaded with various growth factors [188,189]. At week 14 post implantation in rabbits, the lower layer allowed bone growth and the upper layer lead to a cartilage tissue, but thinner and more fibrous than in the surrounding healthy tissues. As an improvement of this first version, the authors demonstrated *in vitro* that MSCs could be added to the upper layer in synergy with osteogenic cells in the bottom layer [190,191].

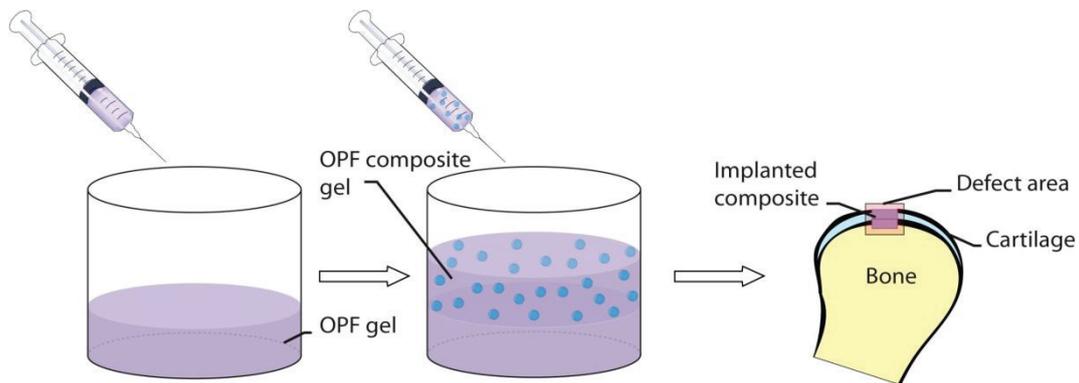


Figure 14. Schematic of bilayer composite gel synthesis and *in vivo* implantation in osteochondral defect. The upper layer, consisting in OPF hydrogel loaded with GMPs, was designed for chondrogenesis. The lower layer designed for bone growth, was an OPF hydrogel eventually loaded with GMPs or osteogenic cells. Adapted from [188].

Following a similar strategy involving a crosslinked polymer matrix improved with entrapped particles, Hong *et al.* used collagen coated poly(lactic acid) (PLA) microspheres dispersed in a gel consisting of a crosslinked water soluble derivative of chitosan and konjac glucomannan used as a thickening agent [192]. The gel was obtained by radical polymerization initiated by the addition of the redox couple ammonium persulfate and tetramethylethylenediamine. The elastic modulus (G') of the 10% (w/v) composite gel was found around 0.9-2 MPa, 100 fold higher than the hydrogel alone. Chondrocytes in the gel could attach and grow on the collagen coated microspheres to form confluent cell layers.

2.2.1.b. Thermo-gelling polymer matrix

Wang and co-workers designed composite gels fully based on naturally occurring polymers as matrixes for both the microcarrier and the hydrogel matrix. The authors reported three different routes for the elaboration of the microparticles using *i)* gellan microspheres crosslinked in a water-in-oil emulsion followed by a redox treatment to graft gelatin onto their surface [193], *ii)* gelatin emulsified at 70°C in an organic solvent mixture and crosslinked with genipin [194], *iii)* agarose emulsified in peanut oil [195]. After their purification, the particles were seeded with cells that attached to the microcarriers. One day post seeding, the particles were collected and dispersed in a liquefied low gelling point agarose to form, after cooling the composite gel. Whereas human foetal osteoblasts or human MSCs died in the non-composite gel, the composite one favoured survival and differentiation of osteo-progenitor

cells, thanks to the adhesion points offered by the microparticles. The strong potential of this approach lies in the fact that this composite system could easily be prepared without any additional step of chemical grafting of the material.

In situ gelling systems are very attractive in the field of tissue engineering because they can be introduced under the liquid form by a minimally invasive procedure, and also perfectly fit the defect to be repaired before gelling. Designing such a product is a challenge as the network should form spontaneously and also allow the culture and expansion of the desired cells. Hou *et al.* reported a temperature sensitive hydrogel composed of a 25% (w/w) triblock copolymer of poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) (PLGA) and PEG. The thermo-sensitivity of the PLGA-*b*-PEG-*b*-PLGA triblock depended on the molar ratio of hydrophilic to hydrophobic segments. The introduction of PLA microparticles up to 40% (w/v) had no impact on the sol-gel transition temperature, but the mechanical properties of the composite gel were increased in comparison with the gel alone [196]. Chitosan/nanohydroxyapatite/collagen composites were designed by Huang *et al.* as *in situ* forming scaffolds bearing bioceramic particles to support bone cells and tissue growth. The gel was formed at body temperature thanks to the addition of β -glycerophosphate that provided the thermo-sensitivity to the chitosan matrix [197]. Using various analytical tools such as scanning/transmission electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy, the authors showed that the obtained materials featured similar characteristics as the original bone [198]. In a later work, they proved the *in vitro* cytocompatibility of their material with rat bone marrow stem cells, and then successfully implanted the stem cell loaded composite gel in subcutaneous dorsum regions of Wistar rats. Stem cells survived inside the gel for at least 28 days and improved the biocompatibility of the material, in particular the presence of the stem cells reduced the inflammatory reaction in the host tissue [199].

2.2.2. Assemblies via particle-polymer physical interactions

Macroscopic gelation can also result from interactions between the dispersed solid phase and a polymer in solution. Microhydrogels were obtained by precipitation polymerization of N-isopropyl acrylamide (NIPAM), allyl amine and N,N'-methylene bisacrylamide, and

dispersed at 1.4% (w/w) solids dispersions in water. On addition of 2.10^{-3} % (w/w) of a high molecular weight polyacrylate. Cho et al. observed the bridging of the particles, by electrostatic interactions, into clusters that eventually grew further into macroscopic gels. On heating at 65°C, beyond the lower critical solubility temperature (LCST) of pNIPAM, the particles shrank, leading to a compaction of the composite gel, which was crosslinked with glutaraldehyde to increase the mechanical properties [200]. Similar results were obtained with poly(allylamine) or poly(ethyleneimine), instead of polyacrylates, but this time the clustering process was due to a depletion-induced aggregation [201,202]. In a subsequent work, the same team obtained 3D colloidal networks taking advantage of the production of water-soluble polymers during the formation of the pNIPAM-based nanogels. By depletion and bridging, the water-soluble polymer allowed the irreversible gelation of the dispersion, hence the authors could omit the glutaraldehyde crosslinking step [203].

Arimura et al. prepared a hyaluronic acid composite hydrogel obtained by crosslinking of the polyanionic polymer with cationic PLA microspheres. They showed that only positively charged microspheres indeed improved the mechanical properties of the gel, whereas the neutral PLA microspheres did not affect the lap shear strength compared to the hyaluronic acid gel alone. In vivo tests were conducted in order to evaluate the inflammation response or the presence of abnormal tissues induced by the composite. Results showed an enhanced biocompatibility compared to hyaluronic acid or collagen matrices [204].

Thixotropic, or at least shear thinning, systems are attractive in tissue engineering because they reversibly evolve from a gel state to a solution, according to a mechanical stress. After shear, the solution can easily be injected at the site where needed and, at rest, after filling the defect, gelation occurs. In 2008, thixotropic composite gels, for 3D cell culture, were obtained by an ammonia initiated sol-gel process involving tetraethoxysilane, a 4 arm star-shaped PEG and fumed silica particles (FS), 200 nm in diameter. The presence of the FS brought to the gel a large number of silanol moieties which, according to the authors increased the hydrogen bonding interactions. As a result, the authors observed an increase of τ_y , the liquefaction stress with the FS content, its rheological properties (G' increased with the content of nanoparticles), the stability with time in culture media (over 3 weeks as compared to 1 week without the particles) and the porosity (the void volume increased from ca. 50 % to ca. 90 % when FS were added to the composite) [205,206]. Therefore, the stiffness of the gel could be tailored,

as reports have shown the importance of matrix compliance in 3D cell delivery systems [207]. The mixing of cell culture media up to 30 % (v/v) to the composite hydrogel containing 15% (w/w) of FS particles decreases the G' value from 2.3 kPa down to 0.48 kPa. Human MSCs cultivated in the PEG-silica gels produced ECM components like fibronectin and collagen. Interestingly, over time, the cell laden gels featured a higher G' value than the composite without cells. The *in vitro* culture process could take advantage of the thixotropic properties. As represented in Figure 15, a portion of the colonized gel could be replaced by a fresh one, followed by a gentle mixing to obtain a diluted gel, thus favouring the cell proliferation, and avoiding the trypsinization, altering cell quality in long term [205].

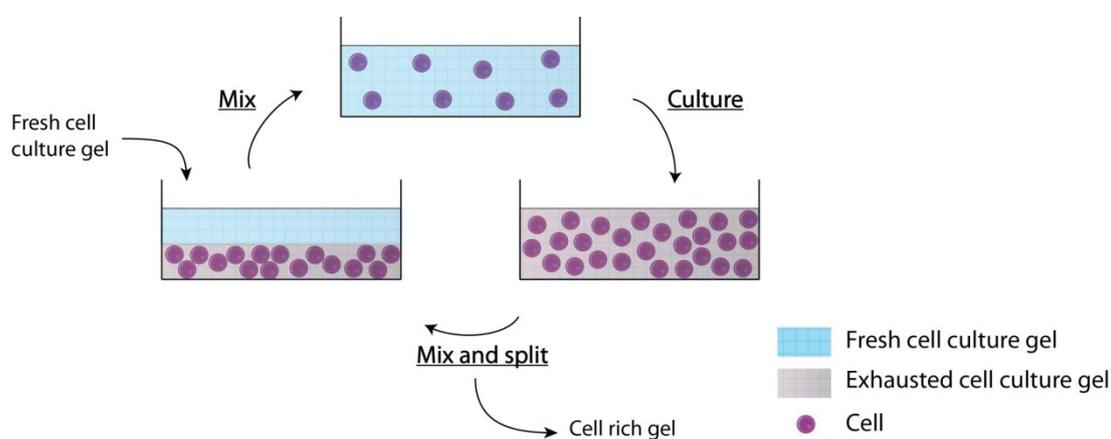


Figure 15. Cell culture schematized in thixotropic composite gel.

On the basis of the above observation that the stiffness of the composite hydrogel increased along with the production of ECM, the authors embarked on a systematic investigation to establish a relationship between the ECM concentration in the 3D device and its liquefaction stress (minimum shear stress required to liquify the gel). The 'law of mixtures' thus established allowed the determination of a gel composition with a stiffness matching that of the ECM. This 'law of mixtures' could also be used to determine the rigidity of the ECM generated by the cells in culture [208].

In 2011, these composite gels were used for the guided growth of dopaminergic neuron axons, by seeding the gel with a chemotropic protein. The establishment of a diffusion gradient of the protein in the device improved the axon upgrowth *in vitro*. The evaluation of the percentage of live and dead cells showed *in vitro* an absence of cytotoxicity, but *in vivo*,

the authors observed a late onset of an immune response in the long-term [209]. Moreover, the degradation of PEG was observed but not that of the silica particles, and this underlines the broader issue of silica particle toxicity, for which literature data are still conflicting [210–213].

Another important kind of composite gels is the colloidal inks which consist in a high volume fraction (40-60%) of particles associated to one another by a binding polymer, for a wide variety of application ranging from advanced ceramics to tissue engineering [214]. These inks can be used to directly write 3D self-supporting periodic structures (see Figure 16), *via* robotic deposition, hence they should meet the following specifications: *i*) well controlled viscoelastic response to flow through the deposition nozzle of the apparatus and to set instantaneously to allow shape retention; *ii*) high nanoparticle volume fraction to minimize shrinkage on drying [215].

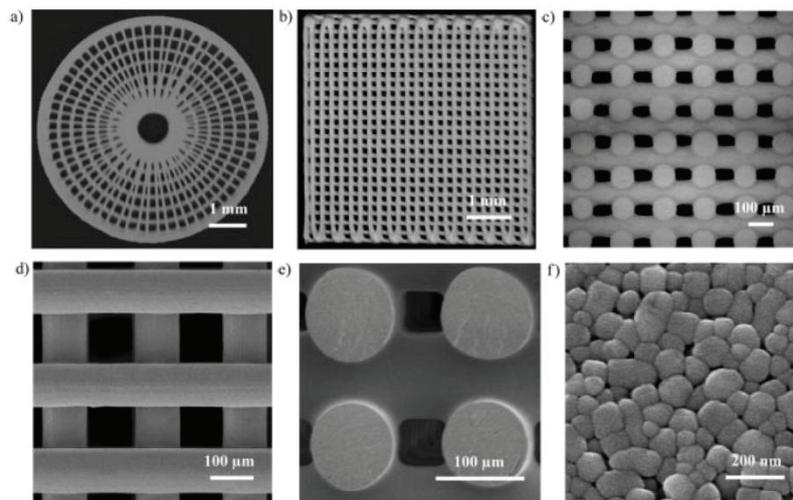


Figure 16. Optical and SEM images of different 3D periodic arrays assembled from concentrated BaTiO₃ nanoparticles (100 nm) inks deposited through a 100 μm nozzle. From [214] with permission.

Therefore, it is essential to control the interfacial properties of the colloid and the interactions with the gelling polymer in order to both generate a stable highly concentrated dispersion and an appropriate sol-gel transition. Xie *et al.* obtained three-dimensional polymer scaffolds for cell culture using colloidal inks composed of polyacrylate latex particles and pluronic as binding polymers. The optimal volume fraction of the particles was around 57%,

whereas that of the pluronic was 8%. The pluronic F127 (a poly(ethylene oxide-*b*-propylene oxide) block-copolymer) used displayed an LCST around 30°C [216], and allowed the formation of the scaffold [217]. The material formed depicted shear thinning properties, that the authors attributed to a release of water initially contained in the particle clusters, leading to a disruption of the percolating network. Within the colloidal ink, bovine serum albumin, a model protein, was associated and its kinetics of release from the scaffold could be controlled according to the formulation of the protein in the ink, either free or under the form of colloidal complexes with chitosan.

2.3. Particle assemblies by aggregation and gelation (colloidal hydrogels)

Mesoporous scaffolds can be obtained from the 3D organization of micro/nano-particles achieved *via* weak physical interactions, allowing the aggregation of particles and their subsequent gelation. The versatility of this strategy lays in the possibility to use particles of different types and sizes and also in the potential association of various biomolecules within the colloids or onto their surface.

2.3.1. Colloidal hydrogels including one single type of particles

Alexander and co-workers obtained injectable 3D-cell delivery systems based on PLGA colloids coated with a thermo-responsive copolymer poly(lactide-*co*-glycolide)-*block*-poly(poly(ethylene glycol methyl ether methacrylate))-*co*-poly(propylene glycol methacrylate)) (PLGA-*b*-(PPGMA-*co*-PEGMEMMA)) [218]. The particles could be obtained by nanoprecipitation or solvent displacement, leading to copolymer-coated PLGA colloids. The desolvation of the polyether corona at the particle interface, induced by heating the 60% (w/w) dispersion at 37°C (above the copolymer LCST), led to porous three dimensional assemblies (see Figure 17), with or without cells [219].

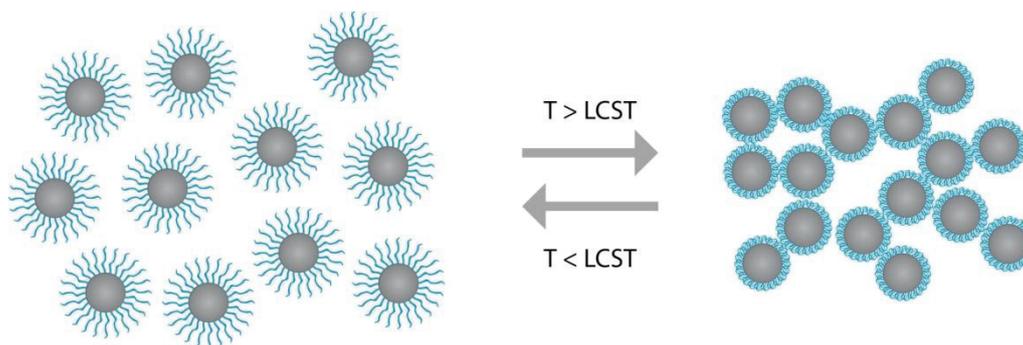


Figure 17. PLGA microparticles coated with thermosensitive corona (PPGMA-co-PEGMEMA), leading to colloidal aggregate gels when heated above LCST ($\sim 34\text{-}36\text{ }^{\circ}\text{C}$). The system could also return to original free-flowing state when cooled under LCST.

Following an analogous approach, Dong A. and co-workers obtained thermo-gelling system using thermo-responsive nanoparticles prepared by the nanoprecipitation method, with amphiphilic triblock copolymer consisting of methoxy PEG (mPEG), poly(octadecanedioic anhydride) (POA) and D,L-lactic acid oligomer (ODLLA) (mPEG-*b*-P(OA-DLLA)-*b*-mPEG) [220]. The freeze-dried particles (see Figure 18a), once redispersed in water at a solid content of 25% (w/w) (see Figure 18b), exhibited a sol-gel transition when incubated at 37°C (Figure 18c), due to interparticles hydrophobic interactions. At low temperature, drugs could be mixed with the nanoparticle dispersion and then entrapped on heating, resulting in a loaded colloidal gel thereby acting as a drug release system. The authors showed a close to zero-order release kinetics, dependent on the block length of the triblock. *In vivo* tests were conducted on mice, by injecting the nanoparticle dispersion in subcutaneous region, leading to the gel formation. The implant integrity was maintained up to 15 days and, according to the authors, it was non-cytotoxic, despite inducing a slightly inflammatory response.

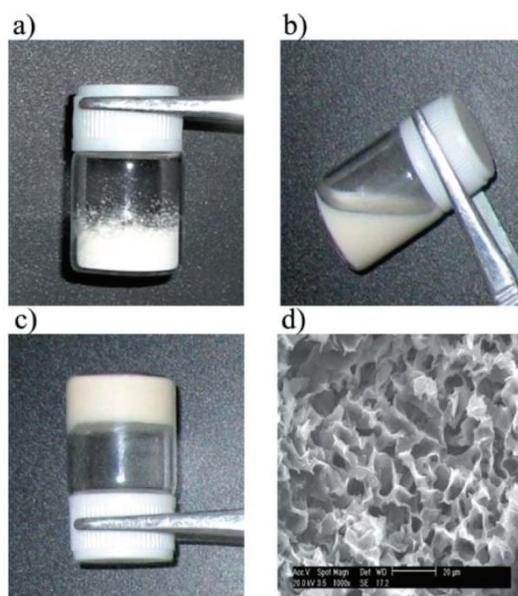


Figure 18. Freeze-dried particles of mPEG-*b*-P(OA-DLLA)-*b*-mPEG (a), once dispersed in water (b) exhibit a sol-to-gel transition when heated to 37 °C (c), then forming a sponge like hydrogel, observed by environmental scanning electron microscopy(d). From [220], with permission.

In a latter work [221], the same team designed a similar system, based on thermo-sensitive nanoparticles made of triblock of PEG and modified poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (PCL-*b*-mPEG-*b*-PCL). The formation of the colloidal gel took place at body temperature for a particle solid content of 25% (w/w). Moreover the authors established a relationship between the sol-gel transition temperature and the hydrophobicity/crystallinity of the hydrophobic blocks. The increase in the hydrophilic character of the PCL blocks, by copolymerizing trioxaspiro-undecanone units, led to a decrease in nanoparticle's core crystallinity, thus diminishing their stability and so enhancing the particle-particle interactions when heated.

Thermo-responsive properties were conferred to PLGA nanoparticles by surface adsorption of a graft copolymer of pNIPAM and poly(N,N dimethylaminoethyl methacrylate) (see Figure 19) having a positively charged backbone and thermo-responsive arms [222]. The authors could obtain a physical gel at body temperature, at much lower solid content than in the previous investigation, as 1% (w/w) of particles associated to 0.5% (w/w) of polymeric surfactant afforded a highly porous gel structure, containing 98.5% of water.

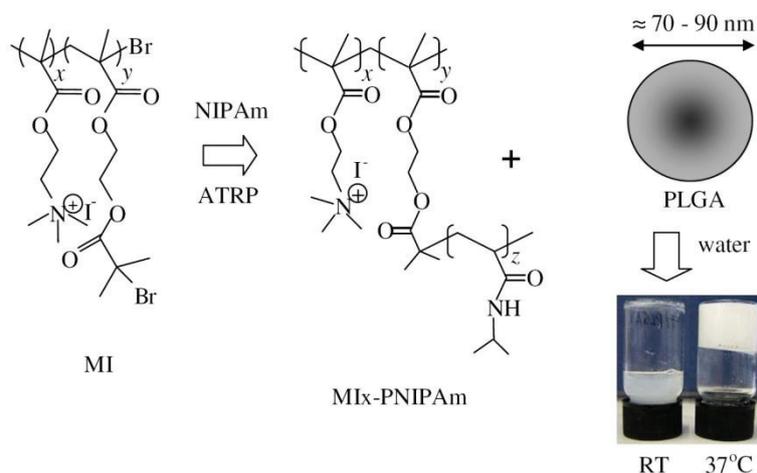


Figure 19. Preparation of cationic graft copolymer using a macroinitiator (MI) and its use to prepare thermogelling PLGA dispersions. From [222], with permission.

It would be interesting to know whether all the surfactant was actually on the particles or if some remained in the continuous phase which could play a major role in the gelation step as for the pNIPAM-based nanogels reported above [203]. Nevertheless, the reported elastic modulus G' was low, in the range of 50 Pa, and G'' , the viscous modulus was not always tenfold smaller than G' , a condition that defines a gel [85,223]. The presence of the PLGA particles improved the mechanical flexibility of the gel as G' started to decrease at 160% strain for the composite (with a solid content of 4% (w/w)) rather than 45% for the gel obtained with the thermo-sensitive polymer alone, at identical concentration. These gels allowed the proliferation and spreading after 72h of culture of *nucleus pulposus* cells from the intervertebral disk, but cell death remained more important than with collagen. Since the presence of pNIPAM could be responsible of the higher cell death observed, the same team designed a thermo-sensitive polymeric surfactant based on poly(poly(ethyleneglycol)ethyl ether methacrylate) (PEGEEMA) susceptible to adsorb onto the hydrophobic interface of PCL microparticles. The particles were obtained by a solvent evaporation method using poly(vinylalcohol) as a steric stabilizer. Prior to further use, the particles were 'cleaned' by immersion in an aqueous ethanolic sodium hydroxide solution, to improve the surface wettability and the cell adhesive properties, according to the authors. Below the LCST, the PEGEEMA corona ensured an efficient steric repulsion between particles, but above the LCST, the shrinkage of the corona induced the flocculation and the gelation of the system. Gels could be obtained at body temperature, for particle solid contents higher than 19% (w/w) combined with 6.5% (w/w) of polymeric surfactant, without syneresis [224]. For lower solid

contents, aggregates rather than self-supporting gels were obtained. Both gelling temperature and the elastic modulus G' were dependent on the particle solid content. When the particle concentration increased from 20 to 40% (w/w), the temperature decreased and G' increased. The culture of mouse fibroblasts was carried out with dispersions containing 30% (w/w) of particles and 3% (w/w) of polymeric surfactant so as to optimize the mechanical properties (in particular a sufficient strength for the material to be easily manipulated without falling apart) and the porosity to allow ingredient diffusion. The cells were successfully entrapped within the matrix and were viable with proliferation that continued over 2 weeks of culture. Interestingly, the cell-colonized gel could be fluidified, diluted, regelled again and cell culture could be continued [224].

2.3.2. Colloidal hydrogels including two types of particles

Colloids whose interfacial properties are complementary can form 3D assemblies for regenerative medicine. For instance, positively and negatively charged interfaces can lead to colloidal assemblies via attractive electrostatic interactions. Similarly, colloids with interfaces bearing D or L stereoisomers can self-assemble by forming stereocomplexes.

The approach based on electrostatic interactions has been the most documented, starting with the pioneering work of Arimura *et al.* in 2004 [225]. The authors synthesized PLA microparticles covered with branched tripeptides bearing either primary amino groups (from lysine residues) or carboxylates (from glutamic acid) and mixed them together at 0.4% solid content to obtain a biodegradable matrix. A more thorough investigation was undertaken by Van Tomme *et al.*, who used oppositely charged dextran microspheres to build self-gelling colloidal hydrogels. The dextran microspheres were obtained by a radical induced polymerization of a dextran-hydroxyethylmethacrylate carbonate derivative (dex-HEMA), emulsified in aqueous PEG solution. The surface functionalization was achieved with methacrylic acid (MAA) for the negative particles (dex-HEMA-MAA) and dimethylaminoethylmethacrylate (DMAEMA) for the positive ones (dex-HEMA-DMAEMA). The particle size was centred around 8 μm and contained 70% in weight of water in the hydrated form [226]. Gels only formed when the solid content was at least 15% (w/w) of dry polymer, corresponding to half of the water free in the medium, the other half being within the particles. The gelation took place instantly on mixing equal amounts of

positive and negative dispersions, as represented in Figure 20. The rheological investigation showed an increase in the elastic properties of the mixture, as compared to the dispersions analysed separately. The elastic modulus was of 500 Pa, and the loss factor $\tan(\delta)$ was lower than 0.1 indicating an elastic behaviour. Creep experiments confirmed the elastic properties, the system recovered almost completely after applying a shear stress leading to 0.15% strain [226].

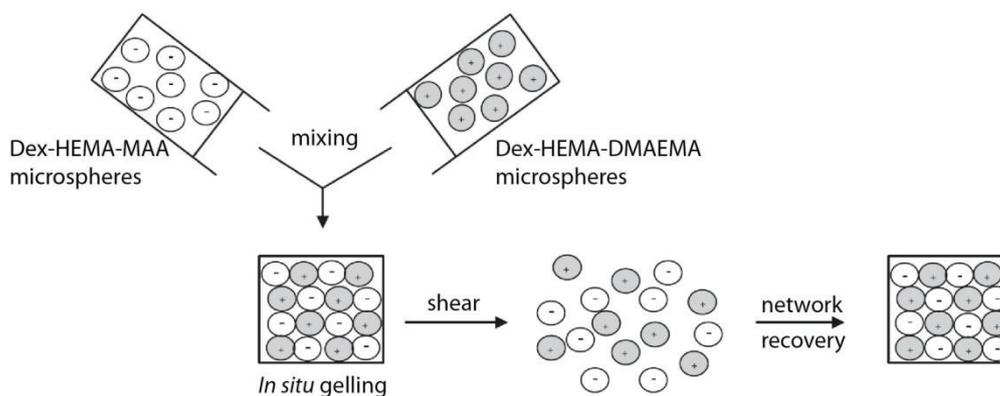


Figure 20. Schematic representation of colloidal gel formation after mixing dispersions of oppositely charged microspheres, made of dex-HEMA-MAA and dex-HEMA-DMAEMA. The network based on electrostatic interactions between negatively and positively microspheres respectively could disrupt under stress, and recover when shear is removed. From [226], with permission.

The rheological properties increased from around 500 Pa to 6500 Pa when the solid content increased from 15% to 25%. Conversely, when the ionic strength of the medium was increased, these rheological properties lowered and at 200 mM sodium chloride, $\tan(\delta)$ reached 1 and started increasing as a result of the charge screening, proving the involvement of electrostatic interactions in the formation of the hydrogel network. It is interesting to note that these properties also depended on the size of the microparticles, smaller microspheres leading to stronger colloidal 3D structures [227]. The maximal mechanical properties were actually obtained with a mixture of 75% (w/w) of small particles (7 μm) associated to 25% (w/w) of larger ones (25 μm). An important aspect to take into account is the injectability of the hydrogel: in order to avoid surgery it is quite advantageous to inject the gel on the spot, under the liquid form and let it gel. Hydrogels were loaded into syringes equipped with a 25 G needle typically used for subcutaneous injections and the displacement of the plunger was monitored. This investigation showed that hydrogels elaborated from 15% (w/w) solid

microparticles bearing a low interfacial charge were easily injectable whereas, for hydrogels obtained with highly charged colloids, the compression induced the expulsion of water from the gel leading to the formation of a cake of densely packed microparticles. Since the particle core consisted in a polymerizable dextran carbonate derivative, the degradation of the gel was studied as the carbonate groups are prone to hydrolysis. The first step of the degradation process was an initial swelling, corresponding to a water uptake as a result of the hydrolysis of carbonate crosslinks. The more water was uptaken, the more degradation of carbonate moieties took place, which resulted in a weight loss and a decrease in gel volume. Increasing the crosslink content resulted in an increased degradation time [228]. Interestingly, proteins could be incorporated within the colloidal assembly upon rehydration of the lyophilized particle mixture with aqueous solutions of proteins, allowing the release of the payload over 2.5 to 60 days depending upon the protein nature. The release was diffusion-controlled as the mobility of the proteins depended on their size and charge interactions with the particle network. Hence, smaller proteins were released faster than larger ones which have to percolate through the 3D structures [229].

With PLGA-based colloids of size ranging in the submicron domain (140-180 nm), thus smaller than in the previous work, Wang *et al.* obtained 3D structures on mixing particles of opposite charges [230]. These colloids were obtained by a solvent diffusion method, PLGA in acetone was added to an aqueous solution of polyvinylamine (PVAm) for the positive particles or poly(ethylene-co-maleic acid) (PEMA) for the negative ones. Drugs could eventually be encapsulated in the particles, as shown for dexamethasone for the repair of skeletal defect [231]. Scaffolds of different forms were obtained from 20% (w/w) colloidal gels resulting from the mixture of 1:1 mass ratio of oppositely charged particles (See Figure 21A-C). Rheological studies established the shear-thinning properties of the colloidal gels and the viscosities increased when the water content decreased. Multipotent human umbilical cord matrix stem cells in the culture media were deposited onto the scaffold poured in well plates. The cells remained viable (see Figure 21D) and the cell morphology was indicative of cellular adhesion on the scaffold. As an improvement of this technology, the same team used chitosan and alginate, respectively positively and negatively charged polysaccharides originating from biomass, as substitutes of the synthetic polymers PVAm and PEMA [232]. The same manufacturing strategy as above was used and particles of ca 250 nm or 180 nm were isolated after purification of the positive and negative carriers, respectively.

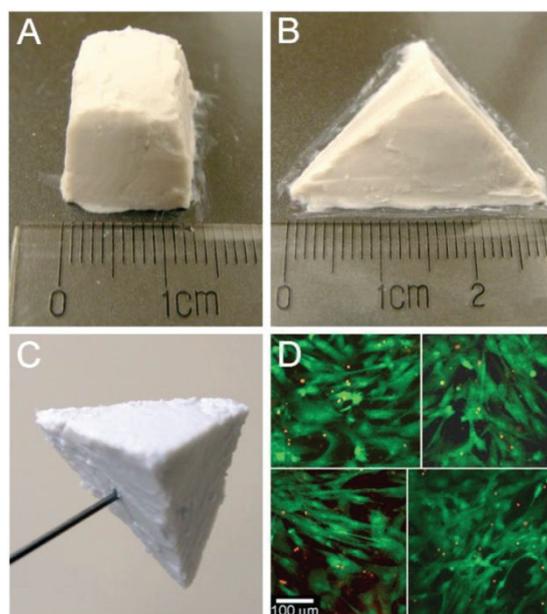


Figure 21. A-C) Different shapes of scaffolds made from 20 % w/v colloidal gels (PLGA-PVAm : PLGA-PEMA 1:1 mass ratio). D) Multipotent human umbilical cord matrix stem cells cultured on colloidal gels demonstrated high viability (green) and minimal cell death (red). From [230] with permission.

Mixing at room temperature these anionic and cationic dispersions at 20% (w/w) solids yielded colloidal gels with pseudoplastic properties, allowing the fabrication of specific shape materials, the shape stability being higher when the colloidal gels consisted in a charge-balanced mixture of cationic and anionic dispersions. Similarly, these charge-balanced mixtures featured the most reversible shear-thinning behaviour, with reconstruction of the porous structure, an interesting property for applications in molding, extrusion, or injection manufacturing technologies. Multipotent human umbilical cord matrix stem cells were cultured in these scaffolds for two weeks with little cell death in comparison with culture without colloidal assemblies.

Wang *et al.* designed colloidal gel based on oppositely charged gelatin nanospheres [233], made of positive or negative gelatin featuring an isoelectric point of 9 or 5 respectively. The nanoparticles (average diameter of *ca.* 150-200 nm) were obtained by precipitation with acetone and subsequent crosslinking with glutaraldehyde. By rheological measurements at different ionic strengths, the authors showed that the formation of the network was essentially based on electrostatic attractive interactions. The system was also highly pH-dependent, due to the zwitterionic character of gelatin, electrostatic interactions prevailing at pH around 7. A

comparative study of colloidal gel, obtained either with gelatin nanoparticles or microparticles (average diameter of *ca.* 26 μm), highlighted the better performances of nano-structured system in terms of viscoelasticity, injectability, cohesiveness recovery and *in vitro* degradation [234]. These differences were explained by the higher specific area of nanosphere-based system favoring strong interparticle interactions, thus increasing the cohesiveness of the material as compared to the microsphere-based system.

3D colloidal assemblies were also obtained with microgels based on PEG-diacrylate functionalized with (vinylbenzyl)trimethyl ammonium chloride or sodium acrylate for respectively the positive and negative ones. The optimal volume ratio of each 2.5% (w/w) solid content dispersion was 2 volumes of negative particles for one of positive ones, to obtain the highest G' value of 1,6 kPa. What is noticeable in this work, is the low solid content reported to provide such strong mechanical properties. One can speculate the material to be highly hydrated and, similarly to Van Tomme *et al.* [226], that a fraction of the water is entrapped within the particles. Therefore the volume fraction of the microgels would be high favouring interparticle associations. Proteins could be encapsulated within the core of the particles and their release, after the initial burst was a first order kinetics. The capacity of the microhydrogel assemblies carrying vascular endothelial growth factor (VEGF) to promote blood capillaries was examined *in vivo* on chicken embryos. The use of the assembly reduced the inflammatory response associated to VEGF. Also, the VEGF loaded assemblies allowed a threefold increase in capillary density [235].

The generation of colloidal assemblies using the strategy based on the formation of stereocomplexes between D and L stereoisomers is less documented than the electrostatic approach. Van Tomme *et al.* functionalized their dextran microparticles, previously used for the electrostatic assembly of particles of opposite charge, with D and L oligolactates and obtained colloidal assemblies on mixing both dispersions at 15% (w/w) in a HEPES buffer pH 7. Though the oligolactate functionalized microparticles have a hydrophobic interface and tend to associate in water at 10% (w/w) solids and higher, the storage moduli of hydrogels from the mixture were notably higher than for the dispersion alone. G' depended on the water content of the dispersion, as for the electrostatic assemblies, and also increased with the average degree of polymerization of the oligolactate chains [236]. The stereo-complexes based gelation proved reversible, under shear G' dropped and $\tan(\delta)$ increased, but upon

removal of the stress, the network rebuilt instantaneously. The incorporation of a model protein, lysosyme, was successfully achieved in the 3D colloidal assembly during mixing of the D and L oligolactate covered microparticles.

2.3.3. Sintered Microparticle Scaffolds

This last decade, significant attention has been paid to a recent technique developed in 2001 by Laurencin and co-workers, in the field of bone tissue engineering. They reported the elaboration of 3D scaffolds by sintering microspheres (see Figure 22), resulting in a mesoporous polymeric material of bound particles [237]. These scaffolds made of biodegradable polymers could eventually be loaded with drugs and the porosity could be tuned to allow cell colonisation, while maintaining high mechanical performances (Young's modulus increased up to 1.6 GPa), which met those of the native bone.

Two protocols were described to obtain sintered microspheres (SMSs) : after being poured into a mold, microspheres could be sintered either *i*) by heating to a temperature above the T_g of polymer, leading to a partial melting of surface layer, and bonding microspheres together [237,238], or *ii*) using a solvent to slightly solubilise the particle surface, entangle polymer chains leading to merged microspheres (Figure 22) [239–241]. Recently, Singh *et al.* proposed a variant of the last method, using subcritical CO_2 (high pressure gas) as sintering agent [242], thereby overcoming possible biocompatible issues when using organic solvent. Moreover, the harsh pressure and temperature conditions required in supercritical CO_2 were avoided thus, cells could be added during the sintering step and remained viable. The morphology, porosity and mechanical properties of the SMSs could be tuned through a control of sintering conditions (sintering time, heat or solvent mixture, crystallinity, viscosity, T_g , ...).

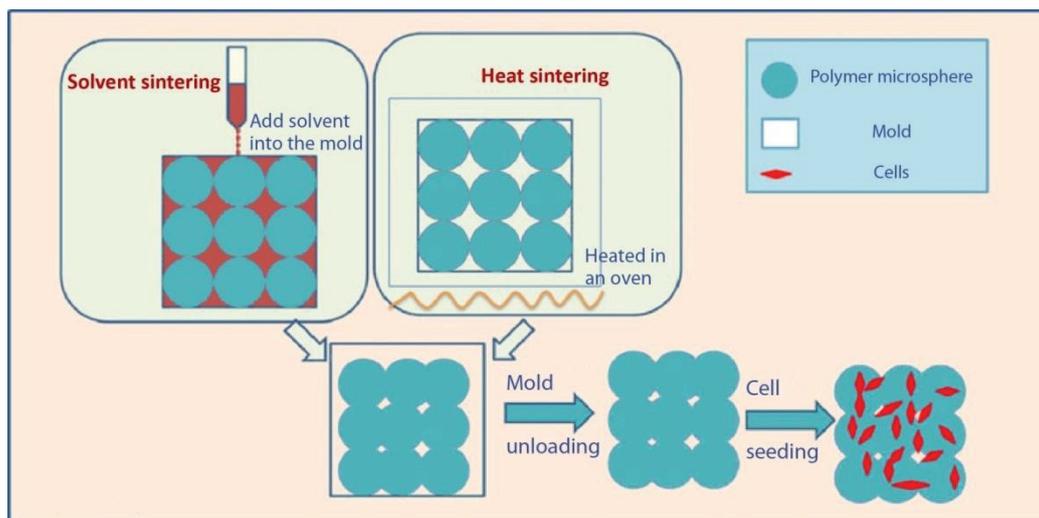


Figure 22. Schematic representation of the production of sintered microsphere scaffolds. Microspheres were placed into molds, and an appropriate solvent was added (solvent sintering) or the whole construct was put into an oven (heat sintering) with predetermined temperature and time period. After sintering, the mold was removed, and the scaffold made by solvent sintering was washed with deionized water. Cell seeding was performed by addition of cell suspension onto the drug-laden or plain scaffolds. Adapted from reference [243].

SMSs were generally made of PLGA, well known in scaffold art for its good biodegradability and biocompatibility properties, and has a suitable glass transition temperature (40-60 °C). Literature reports also studies with microspheres made of PCL [244], chitosan [245], or polyphosphazene [239]. Looking for an improvement of the scaffold integration and cell culture performances, microspheres were blended with natural polymers, osteogenic drugs or proteins and the resulting laden SMSs were seeded with osteoblasts or MSCs. The corresponding system exhibited significantly enhanced properties in terms of release control [246], proliferation, maturation or cell differentiation *in vitro* [247]. *In vivo* tests showed that loading SMSs with osteogenic differentiation drugs or recombinant human bone morphogenetic protein could improve the osteogenic properties of the scaffold, as bone formation appeared to be faster, more abundant and better distributed than with control nude implants [246,248]. SMSs have also been hybridized with ceramic materials like hydroxyapatite [249], silica nanoparticles [250] or bioactive glass [251], in order to confer additional bioactive and osteointegrative properties to the assembly.

Recently, Miranda *et al.*, proposed an original SMSs derived method. The classical sintering step, requiring pressure, heat or solvents, was substituted by a particle agglomeration based on the layer-by-layer technique [252]. A dispersion of chitosan microspheres was

poured into a cubic mesh, and successively dipped in alginate and chitosan solutions. This multi layer deposition lead to interconnected microspheres scaffolds, with a controlled porosity. Though the cytocompatibility tests were limited in range (no comparison with standards) and the mechanical characterization were lacking, this approach opened new routes toward the development of green elaboration

2.4. Conclusion and Prospects

Colloidal assemblies are emerging materials with a great potential of applications in regenerative medicine because of their unique versatility:

- their mechanical behaviours can be tuned to match to those of the tissues, from soft (like cardiac tissue) to hard (bone replacement) and they can be modulated in a reversal way *via* physical stimuli. Hence, the sol-gel transition can be adapted and modified to match the needs of multiple applications;
- their physicochemical properties like the electrostatic charge density, hydrophilicity, specific area, porosity can be tailored by adapting the properties of the particles;
- their biological properties can be varied by using bioactive polymers like proteins or naturally occurring polysaccharides and also by incorporating active substances, growth factors for instance, within the particles constituting the assembly or at the interface.

The success of the development of materials for tissue regeneration based on particle assemblies requires taking into account some key issues, early in the design process. First since these systems will be introduced in a patient, the safety issue is crucial. That means that we can have some concern with approaches based on the in situ polymerization as residual monomers and initiators may constitute a risk the patients' health. Similarly the use of materials with known toxicities like acrylamides and its derivatives will inevitably impede any further development. Even with well known biodegradable materials like PLA or PLGA, their degradation induce a local acidification which could affect the growth of the new tissue. Interestingly, we observed in various works cited in this review, a clear trend toward the use of bio-sourced materials like polysaccharides and proteins (gelatin for instance). Second, the

manufacturing process should remain simple, to favour an easy scale-up, reduced production costs, be energy efficient and avoid the use of toxic organic solvents. We have seen, going through the literature, that new processes are appearing like the sub critical CO₂ methodology whose experimental conditions were mild enough to accommodate living cells, and also the layer-by-layer approach that allowed particle agglomeration via an all-in-water process. Certainly other methodologies aiming at increasing the energy efficiency and also the safety of the production will come through in a near future. Third, the control of various cues allowing tissue development within the particle-based scaffolds is essential to increase the efficacy of the materials and ensure a major breakthrough. This issue was addressed only partly by the reviewed works: favoured cell adhesion with microparticles, added growth factors (encapsulated or physically adsorbed) or the elaboration of concentration gradients within the material itself. The cues are numerous and should be delivered in due place and time, which imposes a lot of constraints. These cues are not only biological, but also morphological [253] and mechanical such as the material stiffness for instance. The pioneering work by Engler *et al.* established that 2D in vitro cell culture media soft matrices were neurogenic, stiffer matrices were myogenic and more rigid ones osteogenic [178]. Since then, various authors have shown the matrix stiffness in 3D systems impacted the differentiation of embryonic stem cells [254] but also of more differentiated cells like osteoblasts [255] and the spreading of smooth muscles cells [207]. Fourth, the sterilization issue needs also to be addressed and it can be extremely critical as this step may induce some alteration of the materials whether heat or radiations are used. Unfortunately not so many works mention this point that can irreversibly alter the development of the project.

In conclusion, work is still needed to transform these exiting and versatile particle-based tools into efficient materials for the culture, amplification and delivery of cells, the regeneration of tissues and organs and other opportunities yet to be identified.

III - CONCLUSION

Le chitosane est un polysaccharide connu pour ses propriétés biologiques remarquables (cytocompatible envers les cellules humaines, antimicrobien, induction de l'hémostase, et résultats très encourageant en médecine régénérative). Ses propriétés physico-chimiques en font un polymère très polyvalent tant en termes de formes (film, hydrogel, aérogel, nanoparticules,...) que d'applications, allant du relargage de principes actifs ou de gènes, des scaffolds pour l'ingénierie tissulaire, des films alimentaires, aux dispositifs de dépollution des eaux, etc.

Nous avons ensuite dressé un état de l'art des assemblages colloïdaux, au travers d'une première publication. Cette science relativement récente, dont le but est d'obtenir des matériaux macroscopiques à partir de nano-objets, connaît un essor formidable depuis une dizaine d'années. Notre étude s'est plus particulièrement intéressée aux avancées réalisées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Les promesses apportées par ces systèmes colloïdaux, en termes de diversité de propriétés et de facilité de mise en œuvre par exemple sont très encourageants. Les propriétés mécaniques de ces matériaux (élasticité, résilience, thixotropie) peuvent être modulées en variant nature et composition des colloïdes, afin d'adapter le dispositif à différents types de tissus hôtes (os, cartilage, peau,...). Il est possible de fonctionnaliser les nano-objets, d'incorporer divers principes actifs, comme des facteurs de croissance pour encourager la prolifération cellulaire. Certaines limites ont été soulevées, concernant notamment des problèmes de biocompatibilité, induits par l'utilisation de réactifs chimiques potentiellement toxiques, ou des produits de dégradation peu cytocompatibles. Afin de palier à ces problèmes, de plus en plus d'équipes de recherche s'orientent vers l'utilisation de polymères bio-sourcés, comme des protéines ou des polysaccharides.

A partir de ce constat, nous avons cherché à développer des assemblages en s'appuyant sur le savoir-faire de notre équipe de recherche dans l'élaboration et la caractérisation de matériaux à base de chitosane. Nous présenterons dans la suite de cet ouvrage nos travaux sur la synthèse de nanogels de chitosane et la réalisation d'assemblages colloïdaux à base de chitosane et poly(acide lactique).

CHAPITRE II

ELABORATION DE
NANOGELES DE CHITOSANE

I - INTRODUCTION

Les nanoparticules font l'objet de nombreuses recherches, publications et brevets depuis plusieurs décennies. Agents antimicrobiens dans les peintures [256], nanovecteurs intelligents capables de cibler et tuer des cellules cancéreuses [257], pièges à polluant pour traiter les eaux usées [258], sont quelques exemples parmi les innombrables applications de notre quotidien dans lesquelles les nanoparticules ont déjà prouvé leur utilité. Si elles sont parfois source d'inquiétudes, notamment dans le cas des particules métalliques et minérales [259,260], certains domaines d'étude sont encore extrêmement riches en progrès et en promesses, notamment dans le secteur de la santé publique.

Dans le domaine des sciences de la Vie, et notamment en galénique, l'apparition et le développement des nanotechnologies dans les années 1970 a constitué un formidable saut technologique [261]. Leurs atouts sont nombreux : une très grande surface spécifique, des possibilités de fonctionnalisation très vastes, des architectures très variées (sphères pleines, capsules, micelles, compartimentées, ...), la possibilité d'encapsuler des principes actifs, et de les relarguer de manière contrôlée en temps et lieu, etc. On dispose également aujourd'hui d'un très riche choix de matériaux pour synthétiser ces nanoparticules (métaux, silice, polymères de synthèse, polymères naturels, ...) qui permettent d'apporter des propriétés extrêmement variées. En vue d'une application médicale, l'absence de toxicité, une bonne biocompatibilité et des propriétés bioactives sont les critères primordiaux que les nanoparticules doivent remplir. Pour cette raison, la famille des polymères naturels suscite un intérêt particulier pour la réalisation de nano-objets, compte tenu de leurs propriétés biologiques potentielles extrêmement riches et variées.

La synthèse de nanoparticules de chitosane pur, sans emploi de réticulant, a été mise au point par Fabrice Brunel lors de son travail de thèse au sein de l'équipe du laboratoire. Elle permet d'obtenir des nano-hydrogels de ce polyélectrolyte naturel, comportant une très grande teneur en eau. Le caractère polyélectrolytique du chitosane confère à ces particules une charge de surface importante en milieu acide. Cela leur offre une stabilisation exceptionnelle grâce à la formation d'une couronne de polymère solvatée et protonnée. Certaines difficultés quant à leur purification et leur caractérisation seront également discutées.

Le présent chapitre abordera la synthèse, la caractérisation et l'optimisation des nanogels de chitosane, dans l'optique d'utiliser ces objets pour la formation de gels colloïdaux, qui feront l'objet d'une étude en Chapitre III. Le lecteur trouvera une présentation et une discussion critique des différents résultats dans la première partie de ce chapitre, et le détail des conditions expérimentales dans la seconde partie.

II - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Il sera abordé dans cette partie la purification et la dépolymérisation du chitosane, puis le procédé d'élaboration des nano-hydrogels de chitosane. Nous discuterons en détail des caractéristiques physico-chimiques de ces objets, de l'influence de certains paramètres sur ces propriétés, des limitations rencontrées lors de leur utilisation, et des stratégies employées pour contourner ces limitations.

1. Préparation du chitosane

1.1. Purification

Le chitosane se présente sous forme d'une poudre blanche. Lorsqu'il est solubilisé, ce chitosane présente de nombreuses impuretés visibles à l'œil nu (filaments, particules). Il est donc nécessaire de le purifier avant toute utilisation.

Tableau 2. Caractéristiques des différents lots de chitosane 114 purifiés pour cette étude.

Lot	Rendement	DA ^a	\overline{M}_w ^b (g.mol ⁻¹)	\mathcal{D} ^b
CS400-1	76 %	3 % (± 0.5%)	410 000 ± 30 000	1.6 ± 0.2
CS400-2	76 %	3 % (± 0.5%)	390 000 ± 20 000	1.7 ± 0.2
CS400-3	68 %	3 % (± 0,5 %)	370 000 ± 30 000	1.7 ± 0.2

^a : déterminé par RMN¹H

^b : déterminé par SEC, dn/dc = 0,198 mL/g

Ainsi, au cours de cette étude, trois séries de purification ont été réalisées. Cette étape, essentielle afin de travailler avec un produit propre de bonne qualité, est très chronophage et fastidieuse. Les étapes de filtration sont particulièrement longues, notamment avec le chitosane de haute masse et de faible DA qui présente une conformation de chaîne plus rigide, et donc une solution plus visqueuse. Le rendement de l'étape de purification ne dépasse pas 80 % (voir Tableau 2).

Le chitosane 114 non purifié présente une masse molaire moyenne en masse de 450 000 g.mol⁻¹ (mesurée par SEC). Cette valeur diminue après purification. Deux explications à ce résultat peuvent être avancées : *i*) l'étape de purification est longue, et le polymère reste relativement longtemps (jusqu'à 3 jours, à température ambiante) solubilisé dans le tampon acide (pH 4.5) et peut donc s'hydrolyser partiellement; *ii*) il est possible que les très hautes masses molaires ($500\ 000\ \text{g.mol}^{-1} < \overline{M}_w < 1\ 000\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$), qui peuvent éventuellement s'organiser en agrégats, soient éliminées par la filtration, diminuant ainsi la masse molaire moyenne du chitosane purifié.

1.2. Préparation d'échantillons de chitosane de faible masse molaire

Il ressort des travaux de Fabrice Brunel que, pour avoir les meilleurs résultats en termes de taille et de distribution en taille, il est nécessaire de travailler avec un chitosane de chaîne courte, avec des masses molaires de l'ordre de 20 000 g/mol. La dépolymérisation du chitosane a été réalisée par réaction de désamination nitreuse décrite dans le chapitre précédent. La première étude a été de déterminer la cinétique de la réaction, afin d'être en mesure de prévoir et obtenir la masse molaire, selon les paramètres de réaction utilisés.

1.2.1. Etude cinétique de la dépolymérisation

La Figure 23 présente les résultats de deux études cinétiques de dépolymérisation indépendantes, réalisées sur le chitosane CS400-1 avec un rapport molaire $R_{\text{NO}_2/\text{GlcN}} = n_{\text{NaNO}_2}/n_{\text{GlcN}} = 0.187$. Il apparaît que la masse molaire du chitosane diminue de façon exponentielle avec le temps. Etant donné la faiblesse des écarts types, la reproductibilité de cette réaction est très satisfaisante.

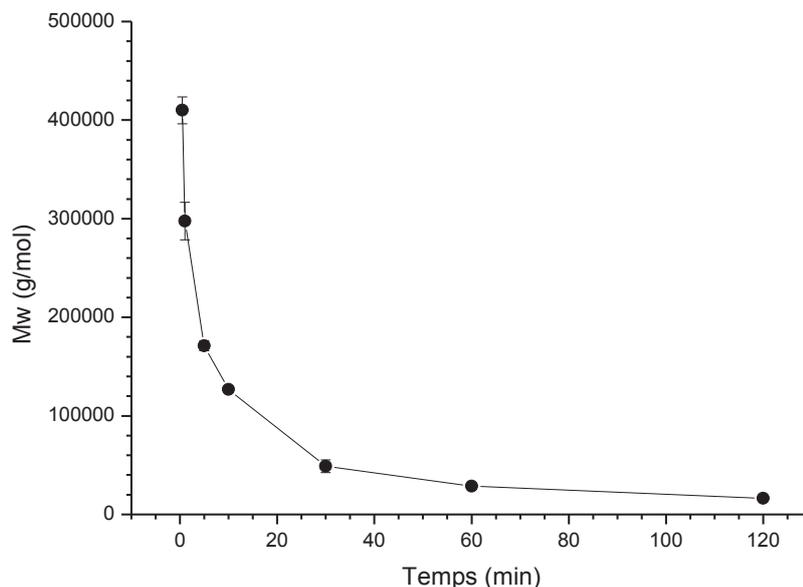


Figure 23. Cinétique de dépolymérisation du chitosane, solubilisé à 0.46 %w/w dans un tampon acétate 150 mM et avec un rapport molaire $R_{NO_2/GlcN} = 0.187$.

Ces résultats permettent ainsi de prédire la masse molaire selon le temps de réaction utilisé (avec $R_{NO_2/GlcN}$ de 0.187).

1.2.2. Préparation des différents échantillons de chitosane de faible masse molaire

Une fois l'étude cinétique de la réaction effectuée, la même expérience a été réalisée sur des quantités plus importantes. Pour obtenir un chitosane d'environ $25\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (valeur qui selon l'étude de Fabrice Brunel se situe dans une gamme de masse molaire optimale pour obtenir des nanogels avec des tailles et distributions en taille les plus étroites [262]), un temps réactionnel de 90 minutes a été retenu. Les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que les études cinétiques (chitosane solubilisé à *ca.* 0.5 % dans une solution tampon acétate 150 mM et un rapport molaire $R_{NO_2/GlcN}$ de 0,187. Notons qu'un dégagement gazeux apparaît systématiquement aux premiers instants de la réaction (correspondant au dégagement de diazote de la réaction de désamination) et s'estompe rapidement. Les

caractéristiques des lots de chitosane utilisés dans ce mémoire sont synthétisées dans le Tableau 3 ci-après.

Tableau 3. Caractéristiques des différents chitosanes préparés.

Lot	Chitosane initial	Rendement	\overline{M}_w^a (g.mol ⁻¹)	\mathcal{D}^a	DA ^b
rCS20-1	yCS400-3	90,7 %	24 000	1,5	3 %
yCS20-2	yCS400-2	95 %	22 100	1.3	3 %
yCS20-3	yCS400-2	97 %	29 800	1.4	3 %
yCS20-4	yCS400-2	92 %	26 700	1.3	3 %

^a : déterminé par RMN ¹H

^b : déterminé par SEC, dn/dc = 0,198 mL/g

1.3. Acétylation du chitosane dépolymérisé

Afin d'obtenir des échantillons de DA différents mais de masses molaires comparables, la stratégie a été dans un premier temps de dépolymériser une grande quantité de chitosane, puis, à partir de ce même lot de chitosane de faible masse molaire, de réaliser des réactions d'acétylation en ciblant différents DA.

Les lots CS20-2 CS20-3 et CS20-4 ont été réunis en un seul, constituant ainsi une quantité totale de 47 g de chitosane ($\overline{M}_w = 25\,800$ g/mol et $\mathcal{D} = 1.3$). Nous avons préparé, à partir de ce lot mère, 6 lots de chitosane de DA différents par la réaction d'acétylation à l'anhydride acétique (décrite dans le Chapitre I). Les DA visés étaient 10%, 20%, 30%, 40% et 60%.

La masse molaire moyenne du chitosane a une influence sur la viscosité de la solution. Cette dernière est donc un élément essentiel pour l'étape de réacétylation, puisqu'elle va influencer sur l'homogénéité du milieu réactionnel. Le choix de dépolymériser le chitosane avant la réacétylation n'est donc pas anodin. Si la réacétylation avait été réalisée avant la dépolymérisation, la réaction aurait pu être plus difficile à maîtriser, en raison d'une viscosité élevée, et la dépolymérisation de chaque lot de chitosane de DA différent n'aurait pas forcément conduit à des masses molaires moyennes en masse similaires (la cinétique de la

réaction de dépolymérisation étant notamment dépendante du DA du chitosane [22]), ce qui aurait posé ensuite des difficultés d'interprétation et de comparaison des résultats.

Tableau 4. Résultats des réactions d'acétylation.

Lot	DA ^a	\overline{M}_w ^b (g.mol ⁻¹)	Đ ^a	Rendement
CS20DA10	11 %	33 000	1.4	92 %
CS20DA20	20 %	32 000	1.3	97 %
CS20DA30	29 %	34 500	1.3	75 %
CS20DA40 *	36 %	39 500	1.5	99 %
CS20DA60 *	60 %	40 000	1.3	55 %

^a : déterminé par ¹H-RMN

* : purifié par dialyse

^b : déterminé par SEC, dn/dc déterminé suivant Fig. 9

n.d. : non déterminé

A partir du CS20DA30 (« 20 » pour 20 000 g/mol, et « DA30 » pour degré d'acétylation de 30%), le chitosane se solubilisait partiellement dans les eaux de lavage. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la solubilité du chitosane est sensible au DA et à sa masse molaire. Il était donc à prévoir qu'un chitosane de très faible masse molaire, avec un DA élevé présenterait une bonne solubilité dans l'eau. Ainsi, à partir d'un DA d'environ 40 %, le chitosane de faible masse molaire se solubilise dans une eau à pH neutre (eau permutée). Cela peut présenter des avantages pour certaines applications, mais dans le cas présent, cette solubilité a compliqué l'étape de lavage du chitosane.

Le mode de lavage a donc été changé pour les lots de DA40 et de DA60. Il est apparu préférable d'opter pour la technique de dialyse, qui, bien que plus longue, permet d'obtenir de meilleurs rendements (notés par « * » en Tableau 4).

Les valeurs de masses et de DA des échantillons ont ensuite été contrôlées en SEC et RMN ¹H. Cette dernière technique permet également de vérifier que le propanediol a été entièrement éliminé lors des étapes de lavage (voir Figure 24). Le spectre caractéristique de cette molécule présente en effet un doublet très net vers 1.1 ppm (voir encart Figure 24), correspondant aux protons du groupement méthyle. Ce pic n'a été observé sur aucun des spectres.

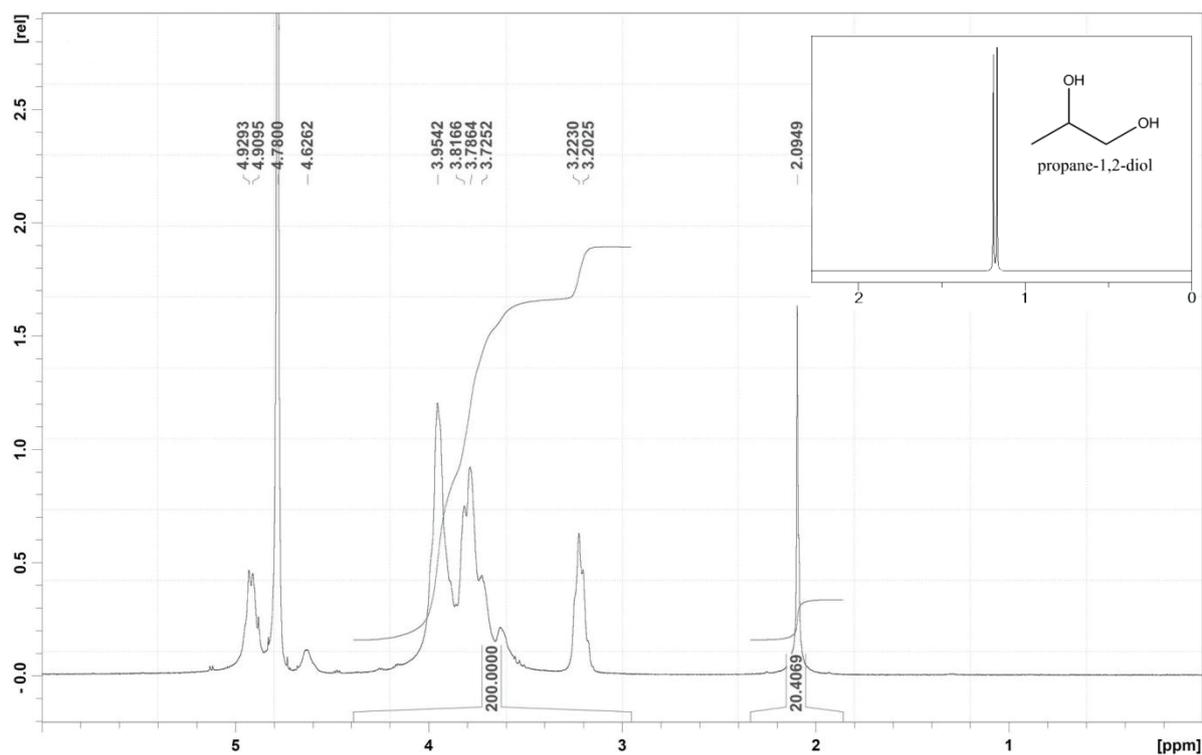


Figure 24. Spectre RMN ^1H du lot CS20DA20. On détermine ainsi le DA du chitosane, et l'absence du doublet du propanediol dans la région de 1.1 ppm est également vérifiée (dans l'encart en haut à droite est représenté le doublet en question sur le spectre RMN ^1H du propanediol).

Ces échantillons de chitosane de différents DA ont pu ensuite être utilisés pour la synthèse de NP_{SC}. Ces résultats feront l'objet de discussion ci-après (paragraphe II-4.1), lorsque la problématique de la cohésion des nanogels sera abordée.

2. Synthèse des nanogels de chitosane

2.1. Déroulement du procédé

La méthode mise au point par Fabrice Brunel a été utilisée pour synthétiser les nanogels de chitosane. Le principe est le suivant : 1) dispersion d'une solution acide de chitosane dans une phase organique contenant un tensioactif, puis 2) gélification des nano-gouttelettes en modifiant le pH du milieu [153]. On obtient ainsi des nano-hydrogels de chitosane, qui sont ensuite lavés pour éliminer la phase organique, et redispersés en tampon acide.

De façon plus détaillée, la phase aqueuse contenant le chitosane concentré à 3 %_{w/w} est pré-émulsionnée dans la phase organique, le Miglyol 812 (M812), qui est un solvant organique GRAS (Generally Recognized As Safe) [263], mélange de triglycérides d'acides gras (principalement acide caprylique et acide caprique, dont la structure chimique est représentée en Figure 26). L'étape de pré-émulsion a été ajoutée au protocole établi par Fabrice Brunel, permettant ainsi de réduire les temps de sonification et d'améliorer la reproductibilité de la synthèse.

Afin d'obtenir ensuite une miniémulsion et atteindre des tailles de gouttelettes de l'ordre de centaines de nanomètres, il est nécessaire d'apporter une grande quantité d'énergie, généralement par l'emploi de sondes à ultra-sons ou d'homogénéiseurs haute pression. Nous avons utilisé dans cette étude les ultrasons (voir Figure 25), bien adaptés aux volumes de laboratoire, et qui apportent une très grande énergie de cisaillement. Cette technique permet d'obtenir une dispersion cinétiquement stable de gouttelettes de taille submicronique [264].

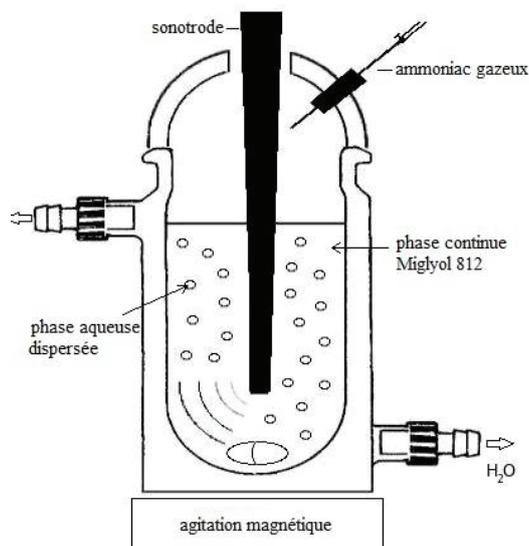


Figure 25. Schéma du montage de miniémulsification

La génération d'une multitude de gouttelettes conduit à une augmentation considérable de la surface interfaciale entre phase aqueuse et phase organique. Cet état n'est pas stable thermodynamiquement et il est nécessaire d'ajouter un tensioactif pour stabiliser chaque gouttelette, et limiter les phénomènes de fusion pouvant conduire à une démixtion du

mélange. De par leur caractère amphiphile, les tensioactifs se placent à l'interface des deux phases, diminuant ainsi l'énergie interfaciale du système et prévenant la coalescence des gouttelettes en augmentant les répulsions (stériques et/ou électrostatiques). Etant donné la faible constante diélectrique du M812, nous sommes limités à l'utilisation d'un tensioactif non ionique qui apportera une répulsion stérique. D'après le concept de balance hydrophile-lipophile (HLB) introduit par Griffin, il faut, pour stabiliser une émulsion w/o, utiliser un tensioactif avec une valeur de HLB comprise entre 3 et 6 [265]. Dans ce procédé, le monooléate de sorbitane (SPAN80, Fluka, Allemagne) est employé car il est fréquemment utilisé dans les émulsions inverses [264,266–268] pour sa faible valeur de HLB (4.3) (structure chimique présentée en Figure 26).

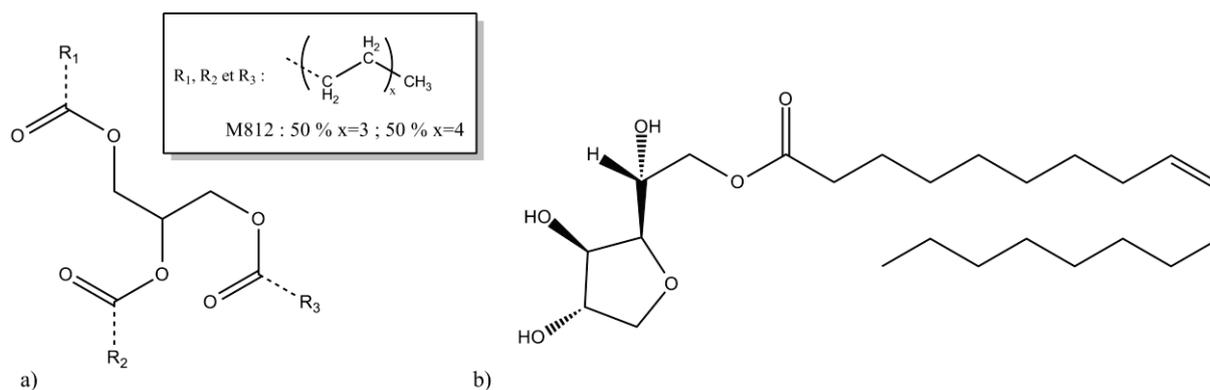


Figure 26. Structures chimiques a) du M812, avec R_1 , R_2 et R_3 , mélanges de chaînes aliphatiques à 7 et 9 carbones essentiellement; et b) du monooléate de sorbitane.

Notons que l'effet des ultrasons lors de l'étape d'émulsification sur le polymère de chitosane lui-même a été étudié par Brunel *et al.* [153]. Il a été montré que le traitement ultrason provoquait une forte diminution de masse dans le cas de chitosane de haute masse molaire, mais que le phénomène était négligeable dans le cas de plus petites masses molaires ($\overline{M}_w \leq 40\,000$ g/mol). Les analyses des présents travaux vérifient ces observations : 3 échantillons de chitosane CS20-1 ayant subi le traitement aux ultrasons ont été analysés en SEC, et d'après les résultats, les masses n'ont pas été modifiées (voir Tableau 5). Les écarts entre les trois masses obtenues sont compris dans l'incertitude sur la mesure.

Tableau 5. Influence du traitement aux ultrasons sur la masse molaire du CS20.

Avant traitement		Après traitement		
CS20-1		Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Mw	24 000 g/mol	25 200 g/mol	24 600 g/mol	26 800 g/mol
Ip	1.5	1.5	1.4	1.5

Il est habituellement nécessaire d'ajouter dans la phase dispersée un agent permettant de limiter le murissement d'Ostwald [269]. Ce phénomène tire son origine de la solubilité partielle de la phase dispersée dans la phase continue. En raison de la force de Laplace, les petites gouttelettes sont progressivement "transférées" dans les grandes par diffusion des molécules de la phase dispersée dans la phase continue, ce qui entraîne une augmentation de la taille moyenne et une diminution de la distribution en taille. L'ajout d'un composé dans la phase dispersée, totalement immiscible dans la phase continue, permet de contrer ce phénomène en générant une pression osmotique à l'intérieur des gouttelettes capable de compenser la force de Laplace. Dans notre système, le chitosane remplit cette fonction d'insoluble, puisque, du fait de son caractère polyionique, il n'a aucune affinité pour la phase organique, et ne peut donc pas être transféré d'une gouttelette à une autre.

Une fois la miniémulsion générée, un flux d'ammoniac gazeux est introduit dans le réacteur pour augmenter le pH du milieu (voir Figure 25). Cela provoque rapidement la gélification des nanogouttelettes de solution de chitosane, selon le principe décrit par Alexandra Montembault et coll. [108].

2.2. Pureté des nanogels de chitosane

Une fois les nanogels formés, le pH du milieu est basique (pH ~ 9-10), les particules sont agrégées, et facilement centrifugeables. Elles subissent alors des cycles de lavage-centrifugation d'abord à l'éthanol puis à l'eau. Le lavage à l'éthanol permet d'éliminer le M812 et le SPAN80 résiduels. Le lavage à l'eau permet quant à lui d'éliminer les sels et d'atteindre un pH neutre.

Pour contrôler leur pureté, une analyse RMN ^1H est systématiquement réalisée sur les NPs_C . A cet effet, un prélèvement est effectué sur le culot lavé pour être lyophilisé. Une pesée avant et après lyophilisation de ce prélèvement permet de déterminer l'extrait sec du culot. Le M812 et le SPAN80 étant très peu solubles dans l'eau, nous solubilisons le lyophilisat dans un mélange $\text{D}_2\text{O}:\text{DMSO-d}_6$ 1:1 (avec du DCl pour solubiliser le chitosane) afin de déceler la présence éventuelle de ces deux espèces.

L'analyse des spectres, dont un exemple est représenté en Figure 27, a permis de montrer l'absence (dans la limite de détection de l'appareil) de SPAN80 et de déduire la quantité résiduelle de M812. Un des pics caractéristiques du tensioactif SPAN80 à 5.2 ppm environ n'a en effet jamais été observé. En revanche, les pics situés à 0.8, 1.2 et 1.5 ppm correspondent respectivement à 9, 30 et 6 protons du M812. La comparaison de l'intensité de ces 3 pics à celle du massif entre 2.8 et 4.4 ppm (qui correspond aux 6 protons H_2 à H_6 du motif GlcN du chitosane) permet de déterminer la quantité résiduelle de M812. Il convient cependant de tenir compte de la présence de pics correspondant aux protons H_2 et H_3 du M812 dans ce massif (indiqués sur la Figure 27 par les deux flèches à 4 et 4.2 ppm), en soustrayant l'équivalent de 4 protons M812.

On obtient ainsi sur 17 synthèses de NPs_C une moyenne de 1.7 ± 0.7 % massique en M812 résiduel. Cette valeur, satisfaisante pour notre étude, pourrait être encore améliorée, en ajoutant des cycles de lavage-centrifugation (actuellement 2 à l'éthanol, 2 à l'eau) par exemple (mais au risque de dégrader les propriétés colloïdales des NPs_C) ou bien en effectuant une purification par dialyse.

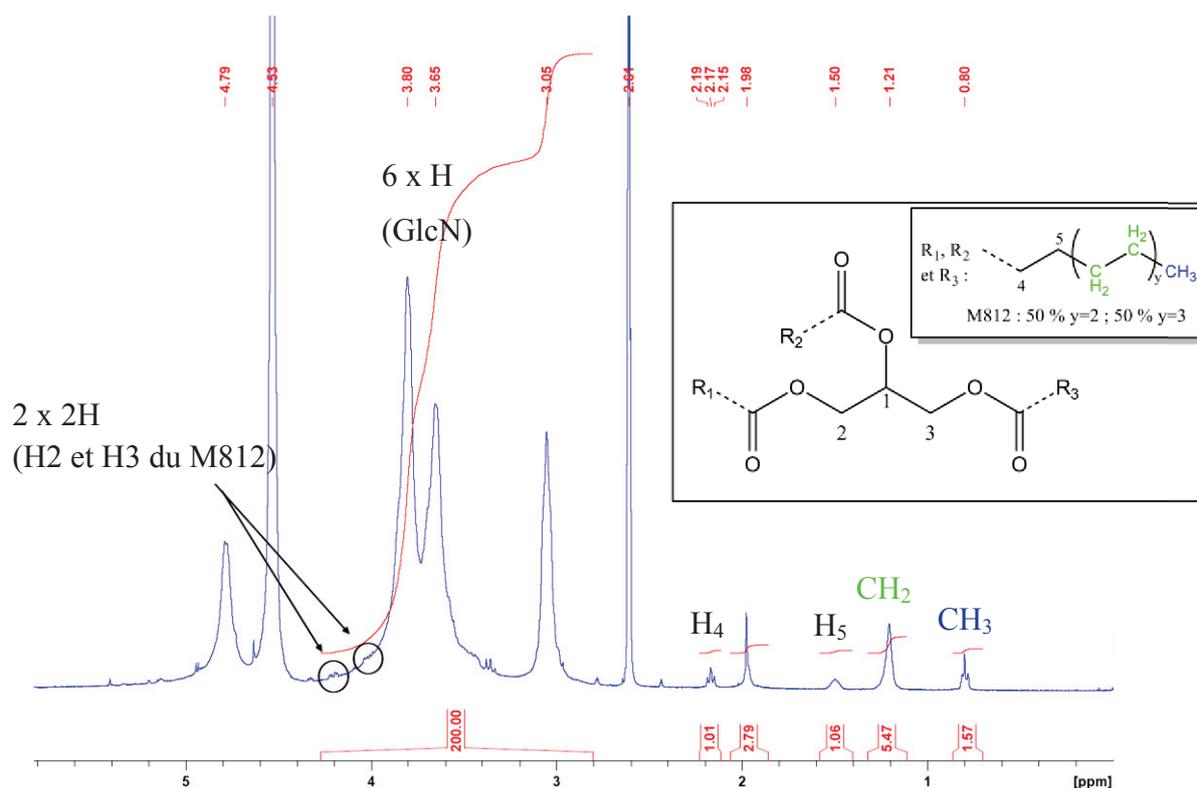


Figure 27. Exemple de spectre RMN ^1H dans $\text{D}_2\text{O}:\text{DMSO}-d_6$ 1:1 de NP_{SC} lyophilisées. On détecte des traces de M812 à travers la présence notamment des 3 pics de résonnance dans la zone 0.8-1.6 ppm qui correspondent respectivement aux protons aliphatiques H_5 (en noir), CH_2 (en vert) et CH_3 (en bleu) représentés en haut à droite. Le massif entre 2.7 et 4.4 ppm correspond aux 6 protons H_2 à H_6 du motif glucosidique du chitosane plus 4 protons dont il faut tenir compte pour les calculs de M812 résiduel.

3. Etude des caractéristiques physico-chimiques et morphologiques des nanogels de chitosane

3.1. Viscosité de la dispersion de nanogels de chitosane

Nous avons constaté que, suivant la concentration en particules, la viscosité des dispersions de NP_{SC} pouvait beaucoup varier. Or la viscosité est un paramètre important à prendre en compte lorsqu'on utilise des techniques de granulométrie basées sur la détermination de coefficient de diffusion comme la QELS (voir Annexe A et paragraphe II-3.2). Nous avons donc cherché à déterminer l'évolution de la viscosité de la dispersion en fonction de la concentration en particules. La viscosité de dispersions de nanogels de chitosane a donc été mesurée à l'aide d'un viscosimètre capillaire.

Il est nécessaire de réaliser dans un premier temps un étalonnage (temps-viscosité) du système en mesurant les temps de passage de solvants dont la viscosité est parfaitement connue. Nous avons choisi quatre solvants dont la viscosité [270] est rappelée dans le Tableau 6 ci-après.

Tableau 6. Viscosité [270] et temps de passage des différents solvants.

Solvant	Viscosité ^a (mPa.s)	Temps de passage (s)
Eau	0,890	88,2 (± 0,06)
1-propanol	1,945	238,52 (± 0,02)
2-butanol	3,100	367 (± 0,64)
1-octanol	7,288	900 (± 1,2)

^a : mesurée à 25 ± 0.1°C

Ces résultats permettent d'obtenir une droite d'étalonnage temps-viscosité d'équation (II.1) à partir de laquelle la détermination de la viscosité d'un échantillon à partir de son temps de passage dans le capillaire sera possible:

$$\eta [mPa.s] = 0,008 \times t [s] + 0,143 \quad (II.1)$$

A l'aide de cette équation, les viscosités de deux dispersions de NP_{SC} ($\overline{d_{QELS}}$ de 180 nm et 200 nm, tampon 150 mM, détail expérimental en paragraphe III-2.3.2) ont été déterminées à différentes dilutions. La viscosité s'est avérée être dépendante de la concentration en NP_{SC} suivant la relation (II.2) :

$$\eta = \exp(-1,54 \cdot 10^{-4} \cdot \%_{CS}^2 + 0,078 \cdot \%_{CS} - 0,138) \quad (II.2)$$

(η et $\%_{CS}$ sont exprimés respectivement en mPa.s et en mg/mL ; le coefficient de corrélation $R^2 > 99.99$)

Cette équation rend désormais possible la détermination rapide de la viscosité du milieu à partir de l'extrait sec d'une dispersion de NPs_C . Ceci aura son importance cela sera discuté plus loin pour les mesures de diffusion de la lumière sur les dispersions de NPs_C .

A noter que, pour caractériser la dispersion de nanogels, nous utilisons la notion d'extrait sec en chitosane, $\%_{CS}$, et non, comme il aurait été plus correct, la concentration *massique*, *volumique* ou *en nombre* de nanogels dans la dispersion. Ce choix est délibéré et il s'explique par l'incertitude qui subsiste sur la détermination de ces trois concentrations, toutes dépendantes d'un paramètre auquel il est difficile d'avoir accès : la concentration en polymère à l'intérieur des nanogels, nommée C_{gel} (qui donne une indication sur la masse de chitosane sec par particule). Ce point sera abordé plus en détail paragraphe II-3.4. La détermination de $\%_{CS}$ est quant à elle beaucoup plus fiable car puisqu'elle est déterminée directement par pesée avant et après lyophilisation (en tenant compte de la quantité de M812 résiduel déterminé par RMN).

3.2. Taille des nanogels par diffusion quasi élastique de la lumière

3.2.1. Présentation de la technique

La QELS est une technique très utilisée dans le domaine des colloïdes. Elle permet d'avoir rapidement accès aux tailles et à la distribution en taille de nanoparticules. Elle nécessite cependant de bien maîtriser certains paramètres expérimentaux, comme la température et la viscosité de la dispersion. Pour une description détaillée de la technique de QELS, le lecteur peut se reporter à l'Annexe A.

L'appareil Malvern Nano ZS utilisé au cours de cette étude dispose d'un module Pelletier qui permet d'avoir un bon contrôle de la température (± 0.1 °C). Comme mentionné auparavant, la viscosité est un paramètre qu'il faut prendre en compte en amont de la mesure QELS. En paragraphe II-3.1 une loi simple décrivant l'évolution de la viscosité d'une dispersion de nanogels de chitosane en fonction de la concentration en NPs_C a été établie. Dans cette partie, nous verrons dans quelle mesure la concentration en particules peut influencer sur les mesures de diffusion de la lumière.

3.2.2. Influence de la viscosité sur les analyses QELS

Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer le comportement des tailles des dispersions de NPs_C en fonction de la concentration. Pour cela, une dispersion de NPs_C de $C_{gel} = 3\%$ dispersées dans le tampon acétate 150 mM a été analysée. Les mesures ont été réalisées à différentes dilutions (réalisées avec le même tampon). Par défaut, l'appareil considère la viscosité du milieu égale à celle de l'eau, et il est donc nécessaire de renseigner la viscosité adaptée avant mesure.

Tableau 7. Résultats des analyses QELS sans et avec correction de la viscosité des dispersions à l'aide de l'équation (II.2)

$\%_{CS}$ (mg/mL)	13,1	6,6	3,3	1,6	0,82	0,41	0,20
$\eta_{(eau)}$ (mPa.s)	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89
$\overline{d_{QELS}}$ (nm)	775	420	300	245	225	215	205
$\eta_{(corrigée)}$ (mPa.s)	2,36	1,44	1,12	0,99	0,93	0,90	0,89
$\overline{d_{QELS}}$ (corrigé) (nm)	290	260	235	220	215	210	205

$\%_{CS}$: extrait sec de chitosane.

$\overline{d_{QELS}}$: taille des NPs_C mesurée en QELS

$\eta_{(eau)}$: viscosité de l'eau

$\eta_{(corrigée)}$: viscosité corrigée de la dispersion

Le Tableau 7 et la Figure 28 ci-après montrent l'évolution des tailles en fonction de $\%_{CS}$ en tenant compte ou non de la correction sur la viscosité. A concentration élevée, l'erreur sur la taille est considérable (à 13,1 mg/mL, l'erreur est de 165 % lorsqu'on ne tient pas compte de la correction sur la viscosité). Même à des concentrations relativement faibles, l'influence sur la taille n'est pas négligeable (à 1.6 mg/mL, l'erreur est encore de plus de 11 %). A noter que la valeur de PDI ne varie pas de façon significative sur toute la gamme de concentration étudiée, oscillant autour d'une moyenne de 0.16.

La viscosité du milieu d'analyse est malheureusement souvent négligée dans ce type de mesure, or elle peut avoir une très grande influence sur la détermination des tailles. Les valeurs de viscosité ont donc été systématiquement corrigées à l'aide de la formule corrective (II.2), pour toutes les mesures QELS des présents travaux.

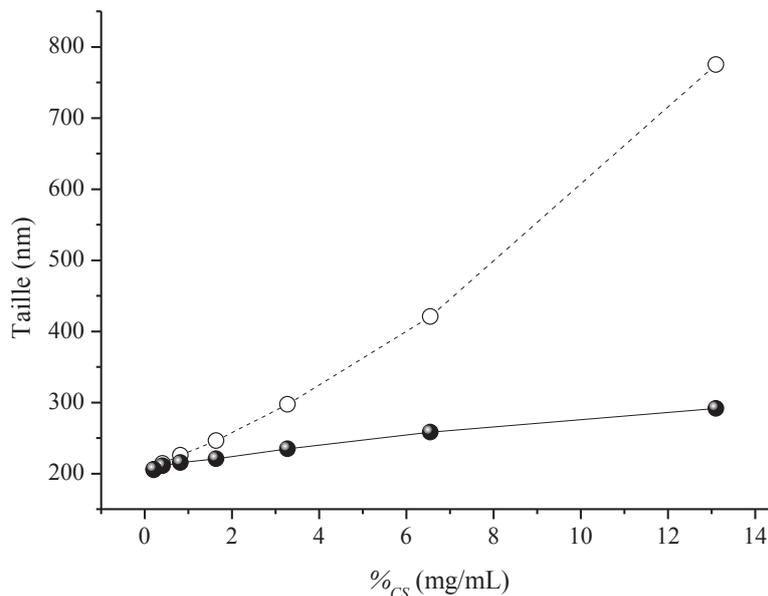


Figure 28. Evolution de la taille des NPs_C mesurée en QELS en fonction de la concentration. Les mesures ne tenant pas compte de la viscosité sont représentées en pointillés-cercles blancs. Les mesures avec la viscosité corrigée sont représentées en trait plein-cercles noirs.

Nous noterons tout de même que la taille des NPs_C n'est pas strictement constante sur la plage de concentration étudiée. En effet, le diamètre des particules augmente avec la concentration. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène:

- La viscosité d'une dispersion de particules peut être dépendante de la taille des particules. Or l'étude au paragraphe II-3.1 a été réalisée sur un lot de nanogels de tailles légèrement inférieures à celles utilisées pour la présente étude. Cela peut avoir une incidence sur l'équation corrective de la viscosité.
- L'augmentation de concentration augmenterait le nombre de chocs entre particules, diminuant ainsi les degrés de liberté des particules, ou favoriserait les déplacements coordonnés de plusieurs particules. De tels phénomènes pourraient entraîner une surestimation des tailles des objets détectés.

3.3. Stabilité colloïdale des nanogels de chitosane

Comme l'a déjà montré Fabrice Brunel, la nature du milieu continu influe sur la stabilité des NPs_C . Lorsque le culot est redispersé dans de l'eau pure, les particules sédimentent rapidement : les chaînes de surface sont très peu protonées et peu solvatées, elles restent adsorbées en surface (voir Figure 29a), et les NPs_C restent sous forme d'agrégats, maintenus par l'existence de liaisons hydrogène et d'effets hydrophobes entre les particules.

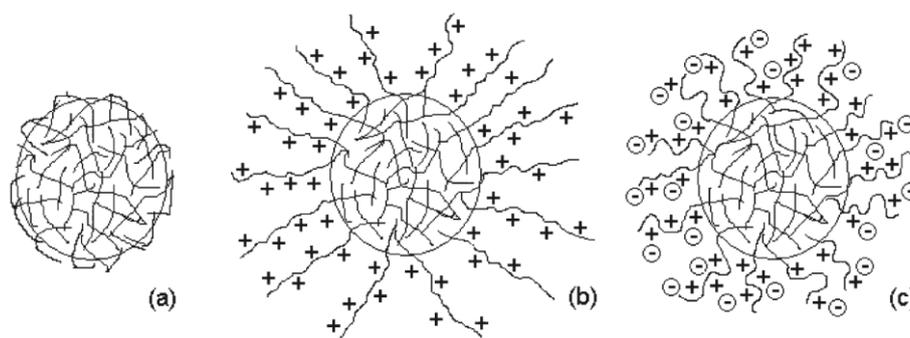


Figure 29. Modes de stabilisations des NPs_C : a) à pH neutre ou basique, aucune stabilisation, les NPs_C s'agrègent; b) en milieu acide avec une faible force ionique, les deux répulsions électrostatiques et stériques prédominent ; c) en milieu acide à forte force ionique, les charges sont écrantées et seule la répulsion stérique prédomine [271].

Le culot de centrifugation doit ainsi être redispersé dans un tampon acide pour permettre une bonne redispersion des NPs_C . L'acidité entraîne la solvation des chaînes de polymère en surface (voir Figure 29b), ce qui apporte ainsi une bonne répulsion stérique et électrostatique, et garantit une stabilité exceptionnelle. Nous avons en effet constaté que les particules pouvaient être conservées à température ambiante pendant plusieurs années, sans détérioration des propriétés colloïdales de la dispersion (voir Figure 30).

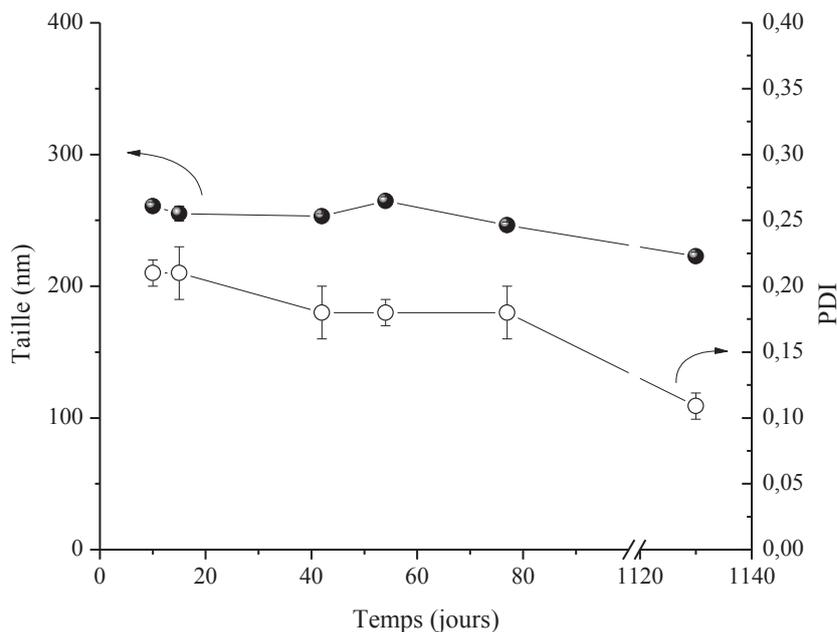


Figure 30. Stabilité colloïdale d'une dispersion de NPs_C au cours du temps (stockées à 5 mg/mL à t.a. dans un tampon acétate 150 mM pH 4.5). Les NPs_C font preuve d'une très grande stabilité puisque leur taille ainsi que le count rate mesuré (non représenté) ne varient presque pas au bout de 3 ans.

Fabrice Brunel a cependant observé que les NPs_C présentaient une stabilité détériorée lorsque le tampon acétate était remplacé par un tampon phosphate, ce dernier menant très rapidement à l'agrégation des NPs_C . Les ions acétates sont connus pour faciliter la solubilisation du chitosane par déstabilisation des liaisons hydrogène [36], contrairement aux ions phosphate pouvant être utilisés comme complexant du chitosane. Ceci expliquerait une meilleure solvation des chaînes de surface et donc une meilleure stabilisation dans le cas du tampon acétate.

Il a été montré que la force ionique du milieu n'avait pas une grande influence sur les propriétés colloïdales des particules. Aucune déstabilisation n'a effectivement été observée sur une dispersion de NPs_C en tampon acétate 150 mM avec $\%_{CS} = 15$ mg/mL, à laquelle a été ajoutée goutte à goutte une solution de NaCl concentrée jusqu'à une concentration finale en chlorure de 1,1 M. De la même façon, cette étude a permis de constater que la taille et la distribution de taille n'étaient pas dépendantes de la force ionique du tampon acétate. On peut

en effet voir dans le Tableau 8 que les propriétés colloïdales de NPs_C ($C_{gel} = 3 \%$ et $\%_{CS} = 1.8$ mg/mL pour ces analyses) demeurent inchangées lorsqu'on passe d'un tampon 25 mM à un tampon 150 mM. L'augmentation de la concentration en sel est généralement associée à un écrantage des charges, et donc à une déstabilisation des colloïdes basés sur une répulsion électrostatique. Ces résultats suggèrent que les NPs_C bénéficient d'une stabilisation double : stérique et électrostatique, et que, même en présence de sels, la couronne solvatée permet une stabilisation suffisante (Figure 29c).

Tableau 8. Influence de la force ionique du tampon sur les propriétés colloïdales des NPs_C ($C_{gel} = 3 \%$) diluées ($\%_{CS} = 1.8$ mg/mL).

	25 mM	50 mM	150 mM
\overline{d}_{QELS}	193 ± 2 nm	193 ± 4 nm	193 ± 4 nm
PDI	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.02

La centrifugation de ces dispersions pourrait s'avérer utile pour séparer les NPs_C d'une éventuelle fraction de chitosane solubilisé (voir paragraphe II-3.4), ou bien tout simplement pour augmenter leur concentration (voir Chapitre III). Or il a été impossible de centrifuger les NPs_C dispersées en tampon acétate. Les conditions les plus extrêmes ont été testées (force centrifuge maximum : 60 000 g) sans pouvoir récupérer de culot, même après 30 minutes de centrifugation. L'ajout de sel n'y a rien changé puisque même en centrifugeant les NPs_C avec 1.1 M de NaCl, aucun culot n'a pu être récupéré. Les nanogels dispersés en tampon acide semblent donc être particulièrement insensibles à la centrifugation. Pour expliquer ce résultat, l'hypothèse d'une densité similaire à celle du milieu continu peut être avancée, étant donné leur composition hautement hydratée (de 95 % à 97 % d'eau).

Les dispersions de nanogels ont également montré un comportement inattendu lors de la filtration. Nous avons analysé par QELS une dispersion de NPs_C ($C_{gel} = 3\%$) dispersées à $\%_{CS} = 1.2$ mg/mL dans un tampon 150 mM, avant et après filtration sur filtre 0.8 μm (Millipore). Les résultats de diffusion de la lumière sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Influence de la filtration sur les propriétés colloïdales des NPs_C de $C_{gel} = 3\%$.

	Avant filtration	Après filtration (0.8 μm)
$\overline{d_{QELS}}$	180 nm	148 nm
Pdi	0.22	0.27

Nous observons bien une diminution des tailles après filtration, mais la valeur de PDI augmente, contrairement à ce que l'on pouvait attendre. L'expérience a été reproduite sur plusieurs échantillons, et a conduit systématiquement au même effet. Nous supposons que les NPs_C sont fragiles, et qu'elles se fractionnent lors de leur passage à travers la membrane de filtration. On obtient ainsi des fragments plus petits, mais dont la polydispersité est plus importante.

3.4. Problématique de la concentration en chitosane dans les nano-hydrogels

On a vu que l'on pouvait déterminer rapidement la concentration massique en chitosane, $\%_{CS}$, dans une dispersion de NPs_C . Il suffit de peser le prélèvement du culot de centrifugation lavé avant et après lyophilisation, pour obtenir la concentration en chitosane dans le culot. En fonction de la quantité de tampon acétate ajoutée pour redisperser les particules, on obtient directement la concentration en chitosane dans la dispersion.

La concentration en particules, qu'elle soit exprimée en masse (TS_{NPs_C}) ou en nombre ($[NPs_C]_n$), est nettement plus complexe à obtenir précisément. TS_{NPs_C} , qui correspond à un *taux de solide en nano-hydrogels* (et qui comprend donc la masse de polymère + la masse d'eau contenue dans les nanogels), ou $[NPs_C]_n$, qui correspond au *nombre de nanogels* par volume de dispersion, sont tous deux reliés à C_{gel} par les équations (II.3) et (II.4).

$$TS_{NPs_C} = \frac{\%_{CS}}{C_{gel}} \quad (\text{II.3})$$

$$[NPs_C]_n = \frac{\%_{CS}}{\rho_{NPs_C} \cdot C_{gel}} \cdot \frac{3}{4\pi \cdot R_{NPs_C}^3} \quad (\text{II.4})$$

Dans ce manuscrit, et dans les calculs jusqu'à présent, le paramètre C_{gel} a été estimé égal à la concentration initiale en chitosane dans la solution avant émulsion (voir Aide-mémoire). La raison est que sa détermination précise n'est pas triviale, tout comme celle de $TS_{NP_{SC}}$ ou de $[NP_{SC}]_n$. En effet, comme nous allons le voir par la suite, il est difficile, particulièrement dans le cas des nanogels de chitosane, de trouver une méthode adaptée pour mesurer ces paramètres. Ainsi, les développements qui suivent présentent certaines pistes de travail, dont la pertinence sera discutée pour la détermination des paramètres C_{gel} ou la concentration en particules.

3.4.1. Détermination de la concentration en polymère dans les nanogels via la concentration en nombre de particules

D'après l'équation (II.4), on pourrait accéder à C_{gel} si l'on disposait d'un moyen pour déterminer de façon fiable $[NP_{SC}]_n$. Malheureusement, cette donnée est complexe à obtenir dans le cas de nanoparticules puisque, étant extrêmement petits, le « comptage » de ces objets est loin d'être trivial. Ceci est d'autant plus vrai dans notre cas d'objets hautement hydratés, et comportant une densité et un indice de réfraction très proches de celui de la phase continue aqueuse. Si la technique de QELS permet de déterminer la taille moyenne de particules via l'étude des fluctuations de l'intensité diffusée, elle ne permet pas d'accéder à une concentration en nombre.

Une nouvelle technique se développe depuis quelques années, nommée NTA pour Nanoparticle Tracking Analysis [272]. Cette technique combine diffusion de la lumière avec un microscope optique : chaque particule, sous le rayonnement d'un laser, diffuse dans toutes les directions et engendre ainsi une « tâche de diffusion » de taille bien supérieure à celle de la particule. Le microscope (couplé à une caméra CCD) peut ainsi détecter chaque particule diffusante, via cette tâche de diffusion (voir Figure 31), et enregistrer son trajet pendant un intervalle de temps donné. Cela permet de déterminer le coefficient de diffusion, lié au diamètre de la particule, et l'intensité diffusée pour chaque particule, de façon individuelle. L'acquisition du signal sur un volume donné de plusieurs centaines à plusieurs milliers de particules permet ainsi d'obtenir un échantillon statistique représentatif. Cette technique

permet, connaissant le volume dans lequel est réalisée l'analyse, de déterminer la concentration en particules $[NPs_C]_n$, par simple comptage des points de diffusion.

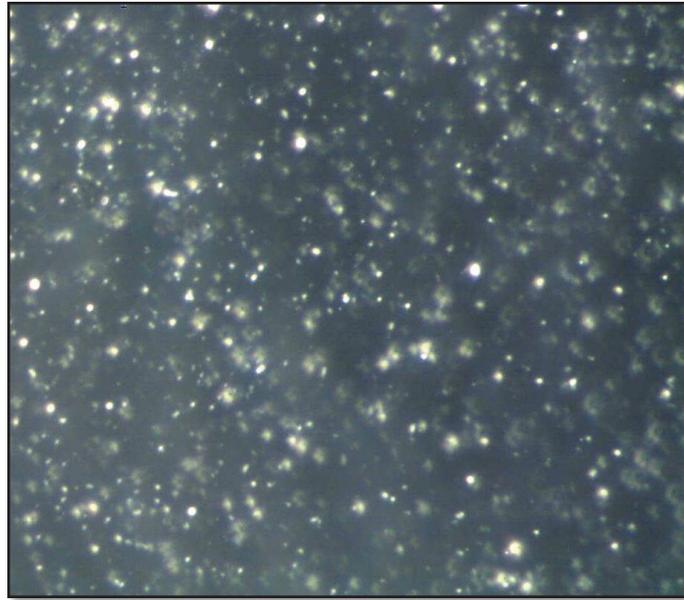


Figure 31. Suspension de nanogels dans le tampon acétate, observée au microscope optique grossissement X100 (chaque point blanc représente la « tâche de diffusion » d'un nanogel). On voit ainsi chaque particule se mouvoir individuellement, principalement sous l'effet du mouvement brownien.

Des mesures ont pu être réalisées sur un échantillon de NPs_C avec un système de NTA développé par NanoSight, (modèle LM10, Figure 32) équipé d'un laser monochromatique de longueur d'onde 635 nm, et d'un microscope de grandissement X20.

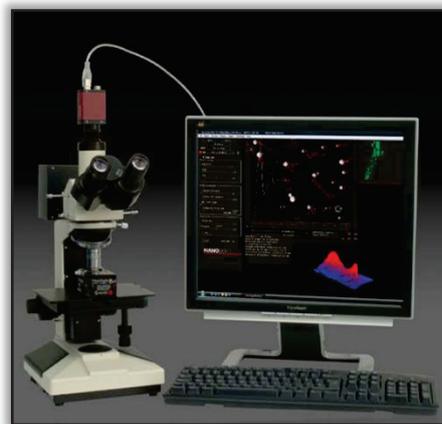


Figure 32. Système LM10 de Nanoparticle Tracking Analysis commercialisé par NanoSight.

Il est important de noter que les analyses réalisées avec ce système ont bien corroboré celles réalisées sur le même échantillon en QELS. On voit que les deux techniques permettent de retrouver un diamètre très proche, de 250 nm environ (*cf.* Tableau 10).

Tableau 10. Comparaison des résultats d'analyses QELS et NTA sur un même échantillon.

	QELS		NTA	
	\overline{d}_{QELS}	PDI	\overline{d}_{NTA}	SD
échantillon	243 nm	0.2	263 nm	66 nm

La dispersion de NPs_C (de $C_{gel} = 5\%$) a été analysée à un extrait sec $\%_{CS} = 0.3$ mg/mL. Il est ainsi possible de calculer la concentration de particules théorique en nombre à l'aide de l'équation (II.4), en faisant l'hypothèse que tout le chitosane est sous forme de nanogels :

$$[NPs_C]_n = \frac{0.03 \times 3}{1 \times 0.05 \times 4\pi \times (131.5 \times 10^{-6})^3} = 6.3 \times 10^{10} \text{ particules / mL}$$

Or les analyses NTA fournissent une valeur de concentration en nanoparticules de 1×10^9 particules/mL. On observe donc beaucoup moins de particules qu'attendu.

Cependant, cette valeur doit être prise avec précaution puisque nous n'avons pas eu le temps de réaliser d'essais complémentaires permettant de confirmer (ou infirmer) cette tendance. Il est néanmoins probable que la quantité de particules soit inférieure à celle que l'on attendait. Il faut garder à l'esprit que les particules sont dispersées dans un tampon acide. Ainsi, même si ces nanogels existent, et ces analyses de NTA nous en fournissent une nouvelle preuve, nous suspectons qu'une partie du chitosane est solubilisée lors de l'étape de dispersion des particules.

Il ne nous a cependant pas été possible de quantifier cette fraction solubilisée. En effet, nous l'avons vu précédemment, l'inconvénient majeur de ces nanogels est qu'ils ne sont pas centrifugeables, rendant toute séparation entre les NPs_C et le chitosane potentiellement solubilisé impossible. Des essais de filtration de dispersions de nanogels à travers des

dispositifs appelés "centricons" (Ultrafree-MC Biomax, MWCO 30 000 Da, Amicon Bioseparation), qui sont des eppendorfs centrifugeables équipés de membranes de filtrations (présentés en Figure 33), ont également été réalisés, sans être concluants (soit les NP_{SC} colmataient les pores de la membrane, soit ils la traversaient).

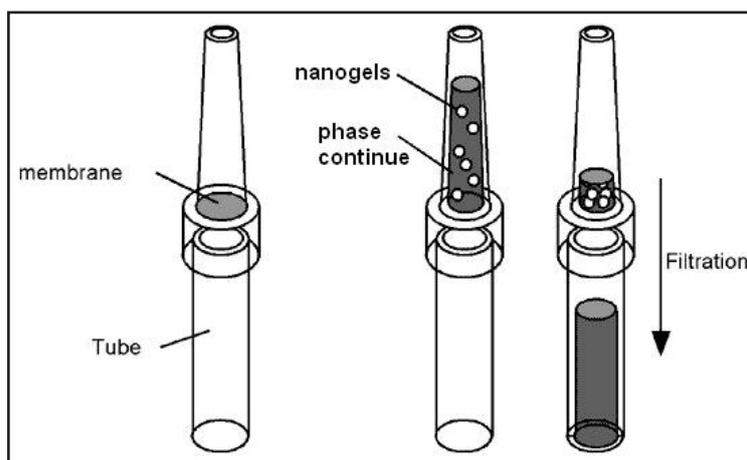


Figure 33. Représentation schématique du Système de filtration "centricons".

Ainsi, ces analyses NTA constituent la seule mesure que nous ayons eu à disposition pour accéder à la concentration en particules. Selon cette mesure, il y aurait 60 fois moins de particules qu'attendu dans notre dispersion. Il faut cependant rester prudent par rapport à ce résultat, qui, nous l'avons vu, demande à être vérifié par des essais complémentaires, afin de tester notamment la reproductibilité de cette analyse. Il serait intéressant d'approfondir cette étude en réalisant des mesures à différentes concentrations pour essayer de quantifier fraction solubilisée et fraction NP_{SC}.

3.4.2. Détermination de la concentration en polymère dans les nanogels par diffusion statique de la lumière

La technique de diffusion statique de la lumière a été utilisée par plusieurs équipes pour déterminer la concentration en polymère dans des microgels de pNIPAm [273–277]. Avec cette technique, sous certaines conditions, le rapport de Rayleigh $R_o(q)$ (excess Rayleigh ratio

en anglais) mesuré est directement relié à la concentration du soluté (C), à sa masse molaire moyenne en masse $\overline{M_w}$, son rayon de giration R_g et A_2 , le second coefficient de viriel, par la relation (II.5):

$$\frac{KC}{R_\theta(q)} \cong \frac{1}{\overline{M_w}} \left(1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2 C \quad (\text{II.5})$$

avec $K = 4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 / (N_A \lambda_0^4)$ et q le module du vecteur de diffusion $q = (4\pi n / \lambda_0) \cdot \sin(\theta/2)$, n étant l'indice de réfraction du solvant, dn/dc l'incrément d'indice de l'objet diffusant, θ et λ_0 respectivement la longueur d'onde du rayon incident et l'angle de diffusion.

En mesurant $R_\theta(q)$ à différents angles et différentes concentrations, il est possible d'établir un diagramme de Zimm [278], et de déterminer les valeurs de $\overline{M_w}$, R_g et A_2 en extrapolant à concentration et angle nuls. Cette technique a initialement été établie pour des polymères en solution [106], mais il est possible d'après la littérature de l'utiliser pour des dispersions de colloïdes, en considérant que $\overline{M_w}$ correspond alors à la masse de polymère contenue en moyenne dans chaque particule [279]. En couplant ces mesures avec des analyses QELS (pour obtenir le rayon hydrodynamique moyen, R_h), les auteurs déterminent ainsi la concentration moyenne en polymère dans chaque particule (C_{gel}) d'après :

$$\frac{4}{3} \pi R_h^3 C_{gel} = \frac{\overline{M_w}}{N_A} \quad (\text{II.6})$$

L'inconvénient principal de cette technique est qu'elle est très sensible à la moindre impureté. La présence de poussière ou de polluant (le M812 résiduel par exemple), peut fortement biaiser les résultats. Or nous avons vu qu'il nous est impossible de filtrer les dispersions de NPs_C sans les détériorer. De la même manière, plus la polydispersité des particules est importante, moins la mesure sera pertinente. Pour ces raisons, cette technique ne nous a pas semblée adaptée à notre système.

3.4.3. Détermination indirecte de la concentration en polymère dans les nanogels avec un colorant de haute masse molaire

Une méthode originale a été mise au point par Stenekes et Hennink pour déterminer la concentration en polymère dans des microgels de dextrane [280]. Ces derniers sont lyophilisés, puis introduits dans une solution aqueuse contenant un polymère de haute masse molaire (*blue dextran*, $\overline{M}_w = 2.10^6$ g.mol) fonctionnalisé avec un colorant bleu. Les microsphères lyophilisées vont progressivement s'hydrater et gonfler, captant ainsi l'eau du milieu. Le *blue dextran* présente un encombrement stérique trop important pour pénétrer à travers les pores des microgels, et reste ségrégué dans la phase continue. L'augmentation de la concentration en colorant dans la phase continue peut ainsi être suivie en spectrophotométrie. Grâce à un étalonnage préalable, on peut ensuite aisément déduire la concentration en polymère à l'équilibre dans les microgels, d'après la masse sèche introduite. Cette technique élégante n'est malheureusement pas applicable avec notre système, pour deux raisons : les nanogels de chitosane ne sont pas redispersables après lyophilisation, et ils ne sont pas centrifugeables, or ces deux étapes sont nécessaires pour séparer les nano/micro-gels de la phase continue, avant l'analyse en spectrophotométrie du surnageant.

3.5. Etude en imagerie microscopique des nanogels de chitosane

3.5.1. Microscopie électronique à transmission (MET)

Pour observer directement des nano-objets, il est nécessaire de recourir à la microscopie électronique, qui permet d'atteindre des résolutions bien meilleures que la microscopie optique, les derniers travaux dans le domaine atteignant même des résolutions atomiques [281].

De nombreuses tentatives ont été réalisées pour observer les nanogels de chitosane en MET classique mais la reproductibilité s'est avérée insatisfaisante. La plus grosse difficulté pour observer ces objets provient certainement du fait que ce sont des nano-hydrogels, qui sont constitués de moins de 10 % de polymère, le reste étant de l'eau. En MET classique se pose immédiatement le problème du vide : les conditions régnant dans l'enceinte du microscope (10^{-3} à 10^{-5} Pa) rendent l'observation d'objets hydratés à température ambiante

délicate. Les essais réalisés sur des dispersions de NPs_C ont tout de même permis l'observation des échantillons de concentration 3% dispersés dans un tampon 150 mM (Figure 34).

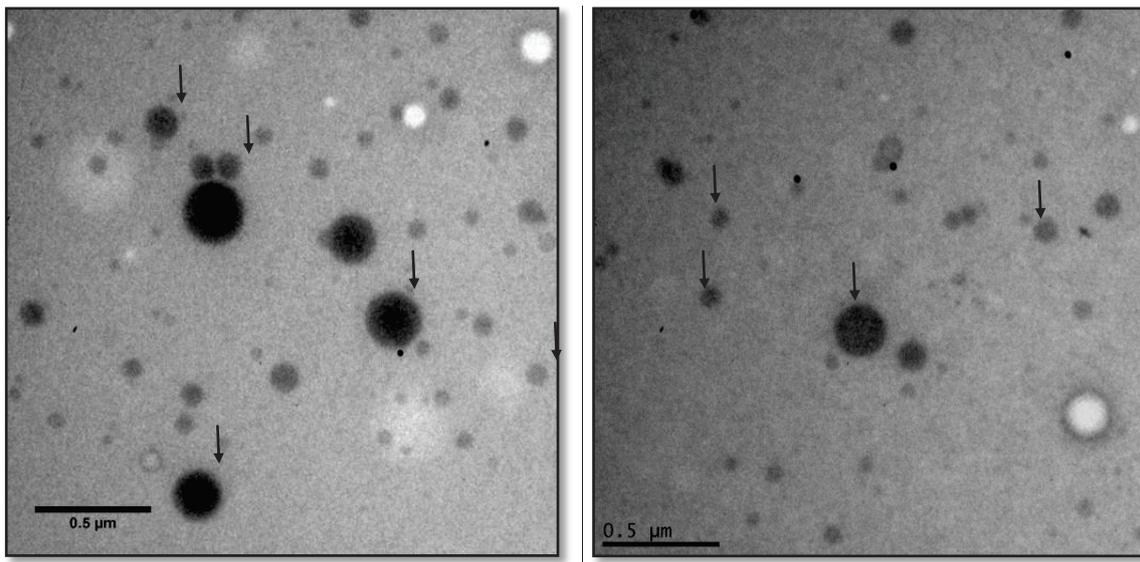


Figure 34. Clichés MET de deux lots différents de NPs_C ($C_{gel} = 3\%$) dispersées à 5 mg/mL dans un tampon acétate 150 mM à gauche et 20 mM à droite. Les flèches signalent quelques unes des NPs_C . La barre d'échelle correspond à 500 nm.

Sur ces échantillons, les particules contrastent remarquablement bien, et présentent une forme relativement sphérique. Une analyse de tailles sur ces clichés nous donne un diamètre moyen de 95 nm si l'on considère la moyenne arithmétique. En réalité, si l'on veut comparer les résultats de QELS avec les clichés MET, il est plus pertinent de s'intéresser à une moyenne harmonique en z , (ou "Z-average") dont la forme est donnée par l'équation (II.7) (voir Annexe A pour plus de détails) :

$$\overline{d_{1/z}} = \frac{\sum_i n_i \cdot d_i^6}{\sum_i n_i \cdot d_i^5} \quad (\text{II.7})$$

On obtient ainsi une moyenne $\overline{d_{1/z}} \sim 250$ nm pour les deux clichés de la Figure 34, ce qui est bien plus proche de la valeur obtenue en QELS (environ 200 nm pour les deux

échantillons). On note tout de même que les mesures de tailles en MET donnent des valeurs plus élevées que celles obtenues en QELS. Ceci peut être expliqué par le faible échantillon statistique utilisé pour ces calculs (environ 50 particules mesurées), qui peut ne pas être parfaitement représentatif de l'ensemble de la population de nanogels. Il est également possible que l'on ne puisse pas distinguer les plus petites particules (qui ne contrastent pas assez), surestimant ainsi le diamètre moyen.

Les mêmes NPs_C ont également été observées dans un tampon 25 mM (Figure 34 à droite). Les clichés ne mettent pas en évidence des différences notables entre les deux échantillons.

Nous avons réalisé des essais en employant des contrastants (acétate d'uranyle, acide phosphotungstique, tungstate de sodium et osmium), mais qui ont posé de gros problèmes de reproductibilité. Sur une grande partie des échantillons observés, la présence de cristaux et de gros agrégats ne permettait pas de distinguer les NPs_C . Ces cristaux sont à attribuer à la formation de sels avec le tampon acétate.

Ces résultats de microscopie MET sont à prendre avec précaution, puisque, nous l'avons déjà évoqué, cette technique n'est pas adaptée pour l'observation d'échantillons hydratés. On comprend en effet que dans les conditions de vide poussé du microscope, l'eau contenue dans les nano-hydrogels doit être au moins en partie expulsée, et les objets que l'on observe ne sont très certainement pas dans le même état qu'en milieu aqueux. Pour conserver la morphologie et la structure des nano-hydrogels, la technique de cryoMET a été utilisée.

3.5.2. Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-MET)

Le Centre Technologique des Microstructures (CT_μ , Villeurbanne) dispose d'un appareil de microscopie électronique à transmission, pouvant depuis peu accueillir un module d'observation à froid. Cette technique, appelée Cryo-MET, permet l'observation d'échantillons congelés, notamment des systèmes aqueux. Nous l'avons donc mis à profit pour l'observation de la structure et du comportement des nano-hydrogels dans différents milieux.

3.5.2.a. Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon pour l'observation en CryoMET est une étape cruciale et très délicate. L'échantillon doit être réfrigéré très rapidement (pour éviter la cristallisation de l'eau), pour deux raisons : *i)* l'eau ainsi figée dans un état amorphe devient quasi transparente pour le faisceau d'électrons; *ii)* contrairement à la glace cristalline, la glace amorphe ne se dilate pas, ce qui permet de préserver les structures fragiles comme les hydrogels. Pour assurer cette congélation très rapide, les échantillons ont été plongés à l'aide du Cryo-plongeur (cf. Figure 35) dans de l'éthane liquide. L'éthane est fréquemment utilisé comme agent cryogénique en cryo-MET. Il possède une très bonne conduction thermique (vitesse de refroidissement d'environ 10^5 K.s^{-1} mesurée par Siegel *et al* [282]) et une température d'ébullition (-88.6 °C à pression ambiante) plus élevée que l'azote liquide ($-195,8 \text{ °C}$ à pression ambiante) qui est connu pour former un film d'azote gazeux, ralentissant considérablement le refroidissement. Le Cryo-plongeur est un système permettant également de contrôler l'humidité de la chambre, et le temps de "plottage"/"tamponnage"/"buvar dage".

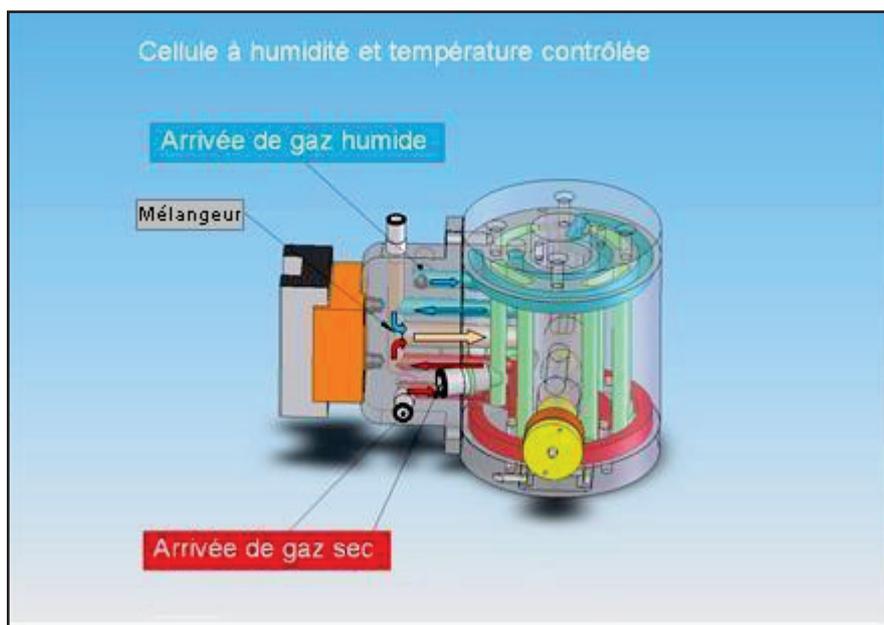


Figure 35. Représentation schématique du Cryo-plongeur, à humidité et température contrôlées.

Une fois l'échantillon congelé, il doit être transféré sur le porte-échantillon. Afin d'éviter la formation de givre sur l'échantillon froid, il faut limiter au maximum le contact avec

l'atmosphère humide. Pour cela, la grille est immédiatement transférée du bain d'éthane à un bain d'azote liquide, qui va permettre ensuite un transfert plus facile dans le porte échantillon. Cependant lors de ces deux étapes de transfert (de l'éthane au bain d'azote et du bain d'azote au porte-échantillon), l'échantillon est en contact pendant un court instant avec l'atmosphère ambiante.

Les observations des échantillons en Cryo-MET ont été particulièrement difficiles, en raison de la formation de givre sur les grilles. Ceci est bien illustré sur la Figure 36 : des billes de givre, déjà observées par d'autres équipes [282–284], sont présentes en grande quantité sur la plupart des échantillons (Figure 36b), ainsi que sur la grille nue (Figure 36a).

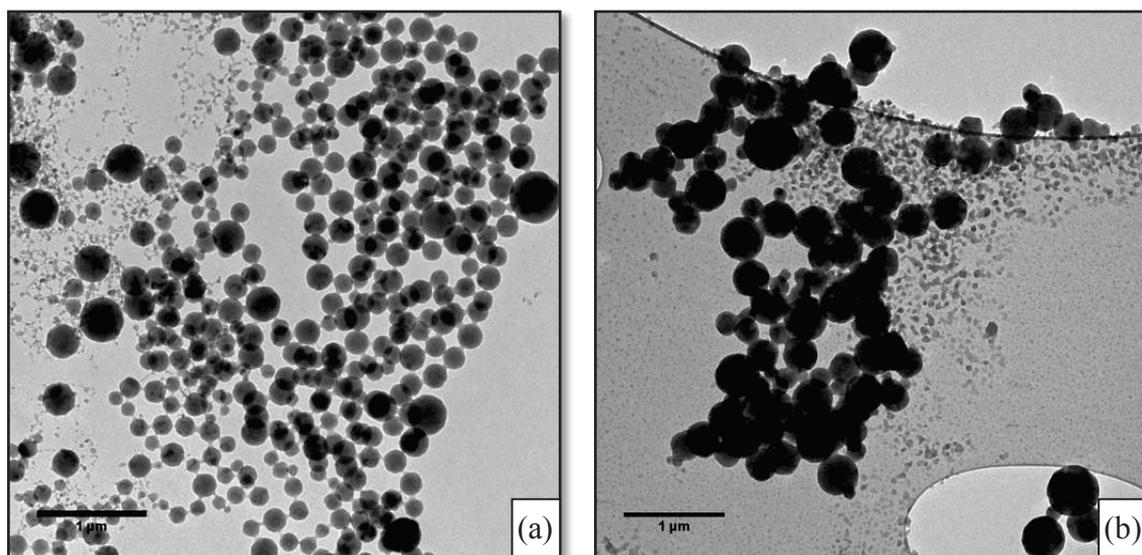


Figure 36. Artefacts dû au givre sur des clichés cryoMET de a) une grille nue, b) une grille avec un échantillon de NP_{sC} 3 mg/mL dans un tampon 150 mM. Dans les deux cas, on observe des billes sphériques d'eau cristallisée, dont le diamètre moyen se situe à environ 200 nm, et il est impossible de discerner les NP_{sC}.

Les billes de givre ont malheureusement un diamètre très proche de celui attendu pour les NP_{sC}. Nous n'avons pas trouvé d'autres objets ayant un contraste ou une forme qui nous permette de les discriminer de ces billes de givre. Deux hypothèses peuvent être avancées : soit les NP_{sC}, qui ont un diamètre d'environ 200 nm, sont très semblables à ces billes de givres, et nous n'arrivons pas à les distinguer de ces dernières; soit les NP_{sC} contrastent très peu par rapport aux billes de givre, et ne sont donc pas détectables.

3.5.2.b. Utilisation d'un contrastant

Pour tenter de palier aux problèmes de détection des particules, une suspension de NPs_C a été préalablement colorée à l'acétate d'uranyle avant observation en Cryo-MET. Pour cela, 50 μL d'une solution d'acétate d'uranyle 1 % (w/w) ont été ajoutés, 1 semaine avant observation, à 1600 μL d'une dispersion de NPs_C à $\%_{CS} = 5 \text{ mg/mL}$, et de diamètre moyen $\overline{d_{QELS}} = 206 \text{ nm}$. Sur la Figure 37a correspondante, on retrouve les billes de givres (indiquées par une flèche rouge). On distingue cependant d'autres formes, plus irrégulières et moins contrastées (indiquées par une flèche verte), attribuées aux NPs_C . L'acétate d'uranyle s'est donc complexé aux NPs_C , augmentant ainsi la densité électronique au sein des nanogels, et améliorant suffisamment le contraste pour que l'on puisse les observer.

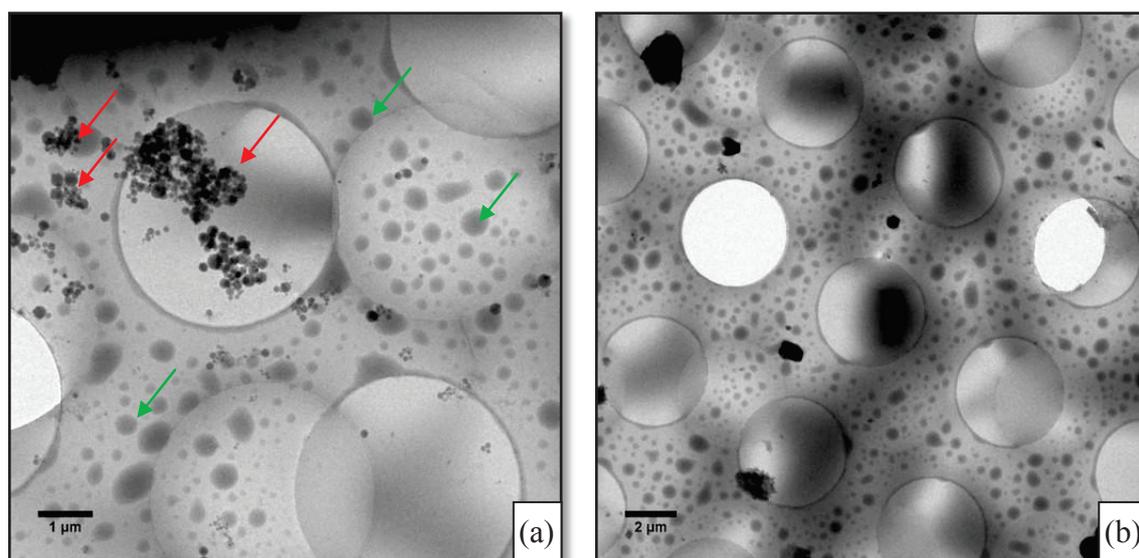


Figure 37. Clichés CryoMET d'une suspension de NPs_C dispersées dans un tampon acétate 150 mM, colorées avec de l'acétate d'uranyle. Sur a), on distingue bien la différence entre les billes de givre (flèche rouges) et les NPs_C (flèches vertes). Une étude statistique sur les tailles des NPs_C a été réalisée sur le cliché b).

Une mesure de taille a été réalisée sur le cliché de la Figure 37b à l'aide du logiciel ImageJ. Les moyennes arithmétiques ($\overline{d_n}$) et « Z-average harmonique » ($\overline{d_{1/z}}$, voir définition en Annexe A) d'un échantillon de 500 particules ont été calculés et sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11. Diamètre moyen arithmétique (\overline{d}_n), et harmonique en z ($\overline{d}_{1/z}$) mesurés en cryoMET.

\overline{d}_n (nm)	$\overline{d}_{1/z}$ (nm)
260	550

Comme nous l'avions déjà observé en MET, $\overline{d}_{1/z}$ est plus élevé que les mesures QELS, mais cette fois la différence est bien plus marquée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence : *i*) on voit sur les clichés que les plus petites particules contrastent très peu avec le fond, ce qui rend leur détection difficile. Il est donc possible que l'on ait ignoré un grand nombre de petites particules dans les calculs; *ii*) les NPs_C de grandes tailles auraient plus de facilité à s'adsorber sur la grille (plus sujettes à la gravité) lors du dépôt de l'échantillon, les plus petites au contraire seraient plus éliminées lors de l'étape de "buvardage".

4. Optimisation de la cohésion des nanogels de chitosane

4.1. Influence du DA du chitosane

Fabrice Brunel a étudié l'influence de différents paramètres sur les propriétés colloïdales des NPs_C. Ses travaux ont démontré qu'à concentration en chitosane constante, diminuer la masse molaire du polymère permettait d'obtenir des tailles et distributions en taille plus faibles. La diminution de la masse molaire entraînant une diminution de la viscosité de la phase aqueuse, le cisaillement des ultrasons est plus efficace (moins de dissipation visqueuse) et permet donc d'atteindre des tailles plus petites, avec une distribution plus étroite. Les meilleurs résultats en termes de tailles ont ainsi été obtenus avec des polymères de masses molaires de 10 000 à 40 000 g.mol⁻¹.

L'influence du DA avait également été étudiée, mais uniquement sur des échantillons de haute masse molaire (400 000 g.mol⁻¹) [153]. La tendance observée était que la taille et la polydispersité augmentaient avec le DA du chitosane, jusqu'à une valeur limite (DA = 30 %) au-delà de laquelle une gélification macroscopique avait lieu. Etant donné que nous utilisons désormais un chitosane de faible masse molaire pour synthétiser les nanogels, nous avons

réalisé la même étude que Brunel et coll. mais avec le CS20 pour vérifier que cette tendance était transposable sur les petites masses.

Nous avons ainsi synthétisé 6 lots de chitosane de DA différents (DA3, DA10, DA20, DA30, DA40 et DA60), de masse molaire équivalente (de l'ordre de 30-40 000 g.mol⁻¹). Pour chacun de ces lots, nous avons réalisé une série de 6 synthèses de nanogels, pour évaluer la reproductibilité et les propriétés colloïdales des NP_{sC} ainsi synthétisées. Le protocole utilisé est le même pour toutes les synthèses, décrit en paragraphe III-2.1. Les nanogels sont ensuite redispersés dans le tampon acétate 150 mM et caractérisés en termes de tailles et de polydispersité en QELS. Les résultats de cette étude sont présentés en Figure 38.

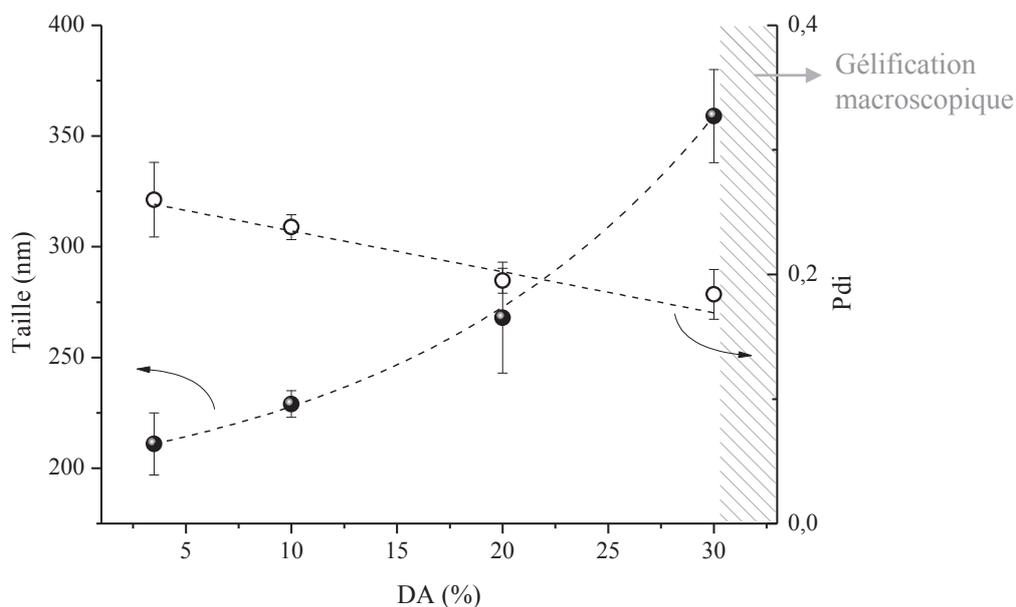


Figure 38. Influence du DA du chitosane sur les propriétés colloïdales des NP_{sC}. ● : diamètre et ○ : PDI, mesurés en QELS. Au-delà du DA 30, on obtient plus de nanoparticules mais une gélification macroscopique (zone hachurée).

Comme pour les hautes masses molaires [153], la taille des NP_{sC} est fortement dépendante du DA du chitosane. Pour le plus faible DA (3%) le diamètre moyen est d'environ 210 nm et il croît progressivement pour atteindre plus de 350 nm pour le DA 30%. Au-delà de ce DA limite, nous n'obtenons plus de nanogels mais des agrégats macroscopiques. On peut envisager plusieurs hypothèses pour expliquer cette évolution. La première serait que la diminution de la fraction d'amines protonées avec l'augmentation du DA puisse avoir un effet

délétère sur la stabilité colloïdale après redispersion dans la phase aqueuse. La diminution des charges positives en surface des particules entraînerait en effet une diminution de la répulsion électrostatique, favorisant l'établissement d'interactions attractives (liaisons hydrogène, effets hydrophobes), et donc la formation d'agrégats. Au-delà d'une valeur de DA critique de 30 %, la répulsion devient insuffisante et cela provoque une gélification macroscopique. Or nous avons remarqué que la déstabilisation intervenait systématiquement avant l'étape de redispersion dans le tampon acide. Cette observation tendrait donc à infirmer notre première hypothèse, étant donné que les particules ne présentent pas encore à ce stade de couronne protonée.

On peut également envisager que l'augmentation de l'hydrophobie apportée par les groupements N-acétyl entrainerait l'adsorption des chaînes hydrocarbonées du tensioactif sur la surface des gouttelettes pendant l'émulsion. Un tel phénomène causerait une diminution de l'efficacité du tensioactif, et donc de la stabilisation stérique des gouttelettes, conduisant à un accroissement de leur taille. On peut enfin penser qu'en augmentant le DA du chitosane, le coefficient de partage du chitosane serait moins discriminant vis-à-vis du Mygliol, ce qui pourrait entraîner une solubilisation partielle du polymère dans la phase continue, et une déstabilisation lors de l'étape de gélification.

La polydispersité quant à elle semblerait légèrement décroître avec l'augmentation du DA. Cet effet inattendu (le contraire serait en effet plus intuitif) est encore mal compris et va à l'encontre de ce qu'avaient observé Brunel *et al.* avec des chitosanes de haute masse molaire [153]. Cela peut être dû au comportement du chitosane en solution qui s'éloigne d'un comportement de polyélectrolyte fort lorsque le DA augmente, avec une conformation ressemblant de moins en moins à un bâtonnet rigide. Ces chaînes plus flexibles (avec une viscosité moindre) pourraient faciliter le procédé d'émulsification améliorant ainsi la distribution en taille. Des travaux complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ou non cette hypothèse, en mesurant par exemple les tailles et distributions en taille avant la phase de gélification à l'ammoniac.

4.2. Influence de la concentration en chitosane

Certains résultats nous ont conduits à penser que les NP_{S_C} obtenues à partir de solutions concentrées à 3 % présentaient une cohésion faible : *i*) l'augmentation du PDI après filtration sur membrane poreuse (paragraphe II-3.3), *ii*) les résultats obtenus en rhéologie avec les gels colloïdaux, discutés en Chapitre III. Ces deux points semblent montrer que les nanogels se déstructurent quand ils sont soumis à des contraintes mécaniques. Il s'est donc avéré pertinent de mesurer le comportement rhéologique des hydrogels de chitosane pour caractériser leur cohésion, leur résilience. Des macro-hydrogels ont donc été synthétisés dans des conditions les plus proches de celles des nanogels et leurs propriétés mécaniques ont été caractérisées. En faisant l'hypothèse que le changement d'échelle a un impact négligeable sur ces propriétés, on pourra considérer que les propriétés mécaniques des nanogels seront semblables.

4.2.1. Caractérisation rhéologique de macro-hydrogels

La synthèse de ces macro-hydrogels est décrite en paragraphe III-1.4. Comme les NP_{S_C}, ils ont été obtenus par modification du pH d'une solution aqueuse de chitosane. Nous nous sommes placés dans les conditions les plus proches de la synthèse des NP_{S_C}, même si dans le cas des macro-hydrogels, la gélification de la solution est notablement plus longue. L'ammoniaque diffuse en effet beaucoup plus rapidement dans les nano-sphères que dans une épaisseur de plusieurs millimètres comme c'est le cas pour les macrogels.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la concentration en chitosane sur le comportement mécanique d'hydrogels. Pour cela, une série d'hydrogels a été préparée à partir du chitosane CS20-1, aux concentrations 3, 5, 7 et 9 %. Les résultats des mesures rhéologiques sont présentés en Figure 39 et nous confirment que pour les 4 concentrations testées, les matériaux présentaient toutes les caractéristiques d'un gel : le module d'élasticité G' est constant sur une large gamme de fréquence, et $\tan\delta$ est inférieur à 0,1 sur l'ensemble de cette gamme, à l'exception du gel à 3 % (attribué à la grande incertitude sur la mesure).

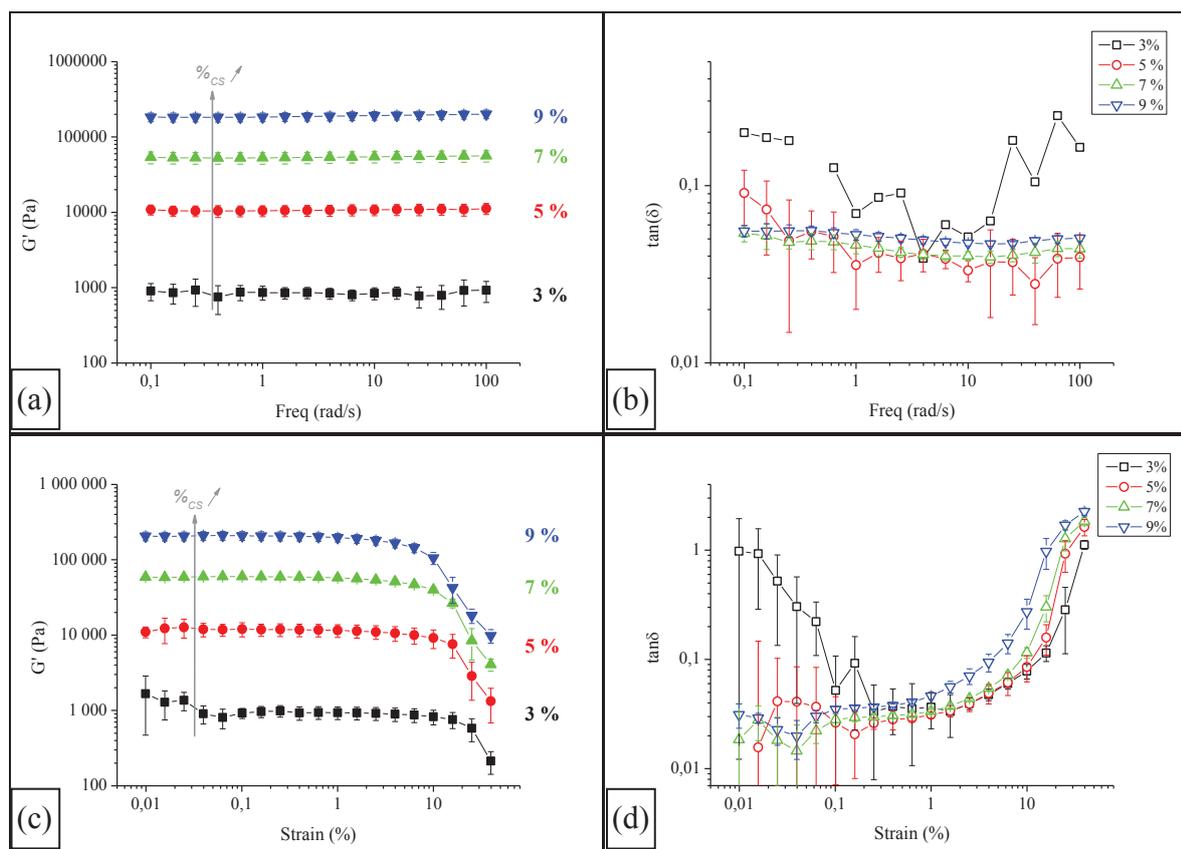


Figure 39. Influence de la concentration en chitosane sur les propriétés mécaniques des macro-hydrogels. Evolution de G' et de $\tan\delta$ lors de balayage en fréquence (respectivement a) et b), déformation de 0.2%) et en déformation (repectivement c) et d), fréquence de 5 rad/s). Les barres d'erreurs ainsi que certains points aberrants de la courbe 3% sur b) ont été volontairement masqués pour une meilleure lisibilité.

Les résultats des balayages en fréquence et en déformation montrent que la concentration en chitosane a une influence significative sur G' (Figure 39a et c). On observe un facteur 100 entre les modules des gels 3% et 9%, et visuellement, les gels présentaient effectivement une rigidité croissante avec la concentration. Ceci est bien cohérent avec une augmentation des nœuds de réticulation.

Les résultats des balayages en déformation (Figure 39c et d) indiquent que la déformation à la rupture, γ_c (que l'on définit comme étant la déformation à partir de laquelle $G' = G''$, ou $\tan(\delta) = 1$), varie entre 10 % et 30 %. Ces faibles valeurs sont en accord avec les observations visuelles, puisque le caractère extrêmement fragile de ces macrogels est immédiatement apparu. Ils se sont en effet avérés très friables, au point que l'opération de lavage a été particulièrement délicate, surtout dans le cas des gels à 3%. Sans précaution, un simple courant d'eau pouvait détruire la structure des gels.

On note que l'augmentation de la concentration a pour effet de diminuer légèrement la valeur de γ_c . Le nombre de nœuds augmentant avec la concentration en chitosane, la capacité du réseau à se déformer diminue [285].

4.2.2. Influence de la concentration en chitosane sur la stabilité et les propriétés des nanogels

En supposant que ces propriétés mécaniques soient similaires à l'échelle des nanogels, il est très probable que les NPs_C concentrées à 3 % soient extrêmement fragiles. Cette hypothèse permettrait d'expliquer certains problèmes soulevés en paragraphe II-3.3 ainsi que dans le Chapitre III avec les essais sur les gels colloïdaux. Dans la perspective d'améliorer la cohésion des nano-hydrogels, augmenter la concentration en polymère a donc été une piste de travail.

Cette voie a cependant ses limites, puisque en augmentant la concentration en polymère, la viscosité de la phase aqueuse augmente rapidement. Nous n'avons donc pas pu réaliser de mini-émulsion à partir d'une solution de chitosane concentrée à 9 %, celle-ci étant trop visqueuse pour être émulsifiée. Trois synthèses ont pu être réalisées à une concentration de 7 %, mais avec une mauvaise reproductibilité, deux sur les trois donnant lieu soit à des agrégats visibles à l'œil nu, soit à une gélification macroscopique. La concentration à 7 % a donc été abandonnée.

Les synthèses réalisées avec une solution concentrée à 5 % ont quant à elles conduit à des résultats satisfaisants : les synthèses sont reproductibles, les NPs_C correspondantes sont stables, et sur un total de 9 synthèses, le diamètre moyen est de 236 ± 22 nm le pdi de 0.19 ± 0.03 . La quantité de Mygliol résiduelle est comparable à celle des NPs_C avec une C_{gel} de 3%, puisqu'il subsiste en moyenne 1.9 ± 0.7 % en masse de Mygliol dans le culot lavé. Comme pour une C_{gel} de 3 %, la force ionique du tampon n'a pas d'influence sur les propriétés colloïdales des NPs_C à 5%.

Ceci prouve donc que la synthèse de NPs_C peut être réalisée avec $C_{gel} = 5$ %. Au vu des résultats rhéologiques obtenus sur les gels macroscopiques, une influence sur la cohésion des NPs_C est espérée. Malheureusement, l'augmentation de la concentration C_{gel} n'a pas amélioré la « centrifugeabilité » des NPs_C . En effet, aucun culot n'a été obtenu en centrifugeant ces dispersions, même à très hautes vitesses (60 000 G).

Des tests de filtration ont également été effectués. De la même manière que les NPs_C concentrées à 3 %, les NPs_C à 5 % sont fortement déstabilisées suite à un passage à travers le filtre de 0.8 μm, la taille moyenne et la distribution en taille évoluant de façon similaire. Cela ne signifie pas pour autant que la cohésion des NPs_C n'a pas été améliorée, mais qu'elle n'est du moins pas suffisante pour résister aux forces de cisaillement qui ont cours pendant la filtration. On discutera dans le Chapitre III l'influence de la concentration C_{gel} sur les propriétés des assemblages colloïdaux.

4.3. Influence de la réticulation par la génipine

Nous avons vu que la concentration en chitosane était un paramètre permettant d'améliorer les propriétés mécaniques des macro-hydrogels, mais sur lequel la marge de manœuvre était restreinte, puisque la viscosité de la solution devient rapidement un facteur limitant. Nous avons donc exploré la voie de la réticulation chimique, par la génipine (réticulant naturel bien mieux accepté que le glutaraldéhyde [94]), toujours dans l'optique d'obtenir des nanogels avec une cohésion améliorée. Comme précédemment, une étude sur des gels macroscopiques a été effectuée au préalable, leur caractérisation mécanique étant en effet plus aisée. La réticulation a ensuite été étudiée sur des NPs_C, afin d'étudier son influence sur leurs propriétés colloïdales.

4.3.1. Réticulation de macro-hydrogels et analyse de leurs propriétés rhéologiques

L'influence de la réticulation à la génipine a été étudiée en analysant des hydrogels réticulés ou non, préparés dans les mêmes conditions que les nanoparticules. Nous avons préparé des macro-hydrogels de 3%, 5%, 7% et 9%, selon le même procédé que précédemment, et nous les avons réticulés suivant le protocole décrit en paragraphe III-1.4.2. Un rapport molaire $n_{GlcN} / n_{gén} = 14$ a été fixé (n_{GlcN} et $n_{gén}$ étant respectivement les nombres de moles de motifs GlcN et de génipine), ce qui signifie que, si la réaction est totale, 2 motifs GlcN sur 14 réagiront avec une molécule de génipine (qui est difonctionnelle). Cette valeur est la même pour tous les macro-gels et correspond approximativement aux rapports utilisés dans des études issues de la littérature décrivant la réticulation du chitosane pour obtenir des hydrogels [286] ou des micro-hydrogels [287].

Après élaboration, les macro-hydrogels sont donc plongés dans une solution de génipine, et la réaction est maintenue dans un compartiment hermétique à température ambiante pendant 7 jours. La cinétique est effectivement lente et on a souvent recours au chauffage pour accélérer la réaction. Dans notre cas, travailler à température ambiante a été préféré en prévision de l'étude sur les nanogels, dont la stabilité en température n'est pas connue. Au bout d'un jour, les hydrogels prennent une teinte vert-bleutée qui s'intensifie progressivement (Figure 40).

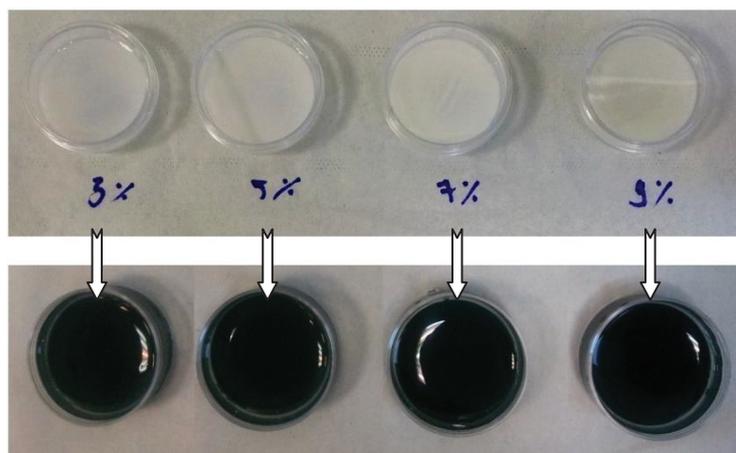


Figure 40. Réticulation des macro-hydrogels avec la génipine. Au bout de 5 jours de réaction à température ambiante, les hydrogels ont pris une teinte verte sombre, et sont plus rigides qu'avant réaction.

Une fois lavés, les macro-hydrogels réticulés sont analysés en rhéologie comme décrit en paragraphe III-1.5.4. Les résultats sont présentés en Figure 41 dans laquelle chaque courbe représente la moyenne de mesures sur 3 prélèvements différents. La Figure 42 synthétise l'ensemble des résultats de G'_p , qui est défini comme étant la valeur de G' au plateau à petites déformations.

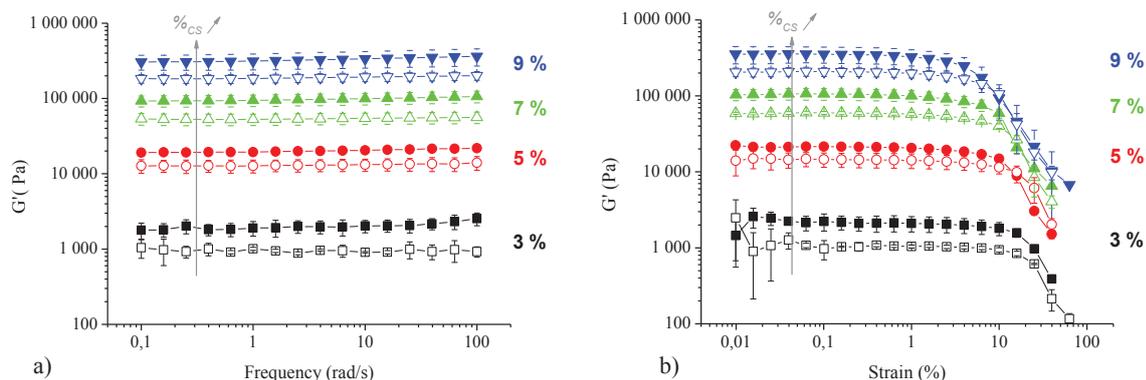


Figure 41. Influence de la réticulation par la génipine sur les propriétés rhéologiques de macro-hydrogels de chitosane. Balayages en fréquence (a) et en déformation (b) sur des macro-hydrogels concentrés à 3 % (■), 5 % (●), 7 % (▲) et 9 % (▼). Sont présentés les résultats sur les gels non réticulés (symboles creux) et réticulés (symboles pleins).

Comme attendu, la réticulation a entraîné, pour chaque concentration, une augmentation du module d'élasticité, qui est reliée à la densité de réticulation dans le matériau. On voit sur les balayages en fréquence (Figure 41a) et en déformation (Figure 41b) que le module G' est approximativement doublé. En revanche, l'influence sur la déformation à la rupture n'est pas probante : il semblerait que la réticulation augmente légèrement γ_c mais il nous est impossible de conclure sur ce point étant donné les incertitudes non négligeables. Visuellement, nous avons noté l'augmentation de la rigidité des hydrogels avec la réticulation.

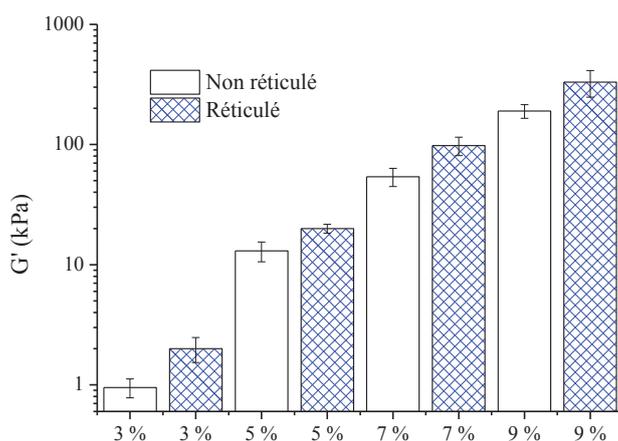


Figure 42. Influence de la réticulation par la génipine sur l'élasticité des macro-hydrogels.

Ces analyses confirment que les hydrogels de chitosane peuvent être post réticulés par la génipine, ce qui conduit à une augmentation significative du module élastique des matériaux, traduisant bien l'augmentation de la densité des nœuds de réticulation. Ces résultats nous permettent de penser que l'on pourrait améliorer la cohésion et la solidité des nanogels de chitosane en les réticulant avec de la génipine.

4.3.2. Réticulation de nanogels

Nous avons ensuite étudié la réaction de réticulation des nanogels de chitosane par la génipine. Des NPs_C avec une C_{gel} de 5%, préalablement synthétisées et dispersées dans un tampon acétate 150 mM (échantillons 1 à 3 et T1 et T2, Tableau 12) ou 50 mM (échantillon 4, T3 et T4) ont été mélangées avec différentes quantités de génipine. T1 à T4 sont des échantillons de contrôle.

Tableau 12. Différents échantillons préparés pour étudier la réticulation de NPs_C 5% par la génipine. $n_{gén}$, n_{CS} et n_{GlcN} sont respectivement les quantités de génipine, de chaînes de chitosane et de cycles GlcN.

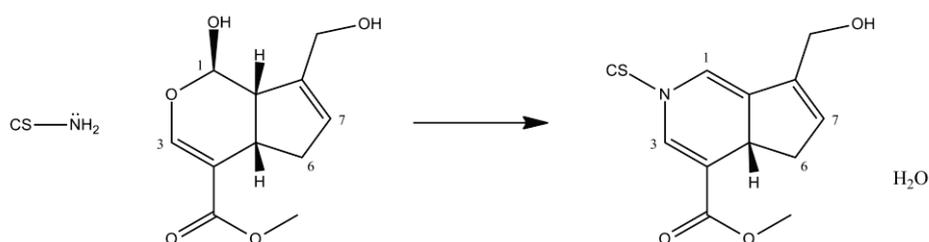
Ech.	% _{CS} (mg/mL)	[Gén] _f (µg/mL)	$n_{gén}/n_{CS}$	$n_{GlcN}/n_{gén}$
1	4,2	356	9	16
2	4,2	267	7	22
3	4,2	178	4	33
4*	4,2	356	9	16
T1	4,2	0	/	/
T2	0,0	356	/	/
T3*	0,0	356	/	/
T4*	4,2	0	/	/

* Utilisation du tampon acétate 50 mM au lieu du 150 mM pour les autres échantillons

[Gén]_f: concentration finale en génipine

La réaction a été suivie par spectrométrie UV-VIS qui permet d'enregistrer l'absorbance en fonction du temps des mélanges réactionnels dans la gamme de 300-800 nm (voir exemple de l'échantillon 1 en Figure 44a). Un pic d'absorbance apparaît à 600 nm (qui coïncide avec la teinte bleutée), correspondant à la formation de l'amide, suite à la réaction de substitution nucléophile du groupe ester de la génipine par la fonction amine primaire du chitosane (Figure 43, réaction 2).

Réaction 1



Réaction 2

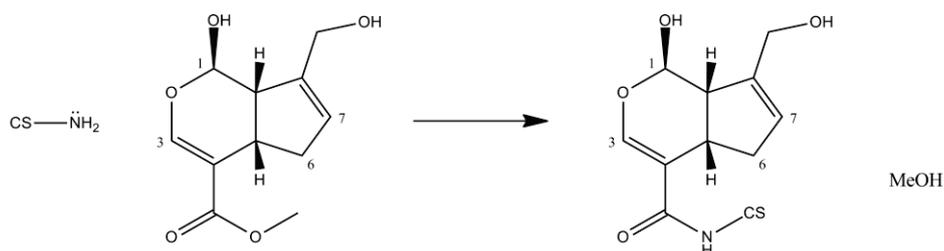


Figure 43. La réticulation du chitosane par la génipine implique deux réactions : 1) attaque nucléophile de l'amine du chitosane (CS) sur le carbone C3 conduisant à la formation de l'hétérocycle avec l'amine tertiaire ; 2) substitution nucléophile S_N2 conduisant à la formation d'une fonction amide. Pour le mécanisme détaillé de ces réactions, voir notamment la référence [288].

L'autre réaction, qui correspond à l'attaque nucléophile du carbone C3 (voir Figure 43, réaction 1) de la génipine par l'amine primaire du chitosane, est plus rapide et se traduit, en spectroscopie UV-VIS par une augmentation rapide de l'absorbance vers 280 nm, selon Butler *et al.* [288]. L'absorbance à cette longueur d'onde n'a pas été suivie car, aux concentrations étudiées, le capteur était saturé. Comme cette réaction est plus rapide, nous considérons que c'est la formation de l'amide qui est la réaction limitante. L'absorbance à 600 nm a donc été suivie pour évaluer la cinétique de la réaction de réticulation des échantillons (voir Figure 44b).

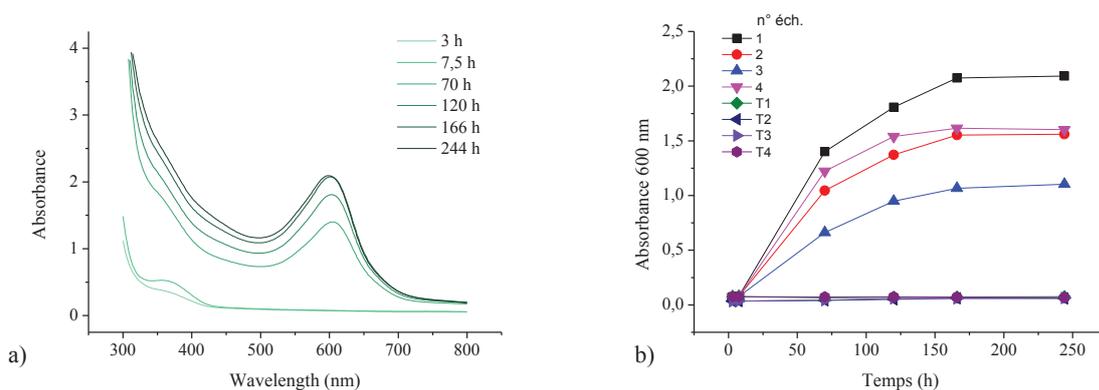


Figure 44. Suivi cinétique de la réticulation des NPs_C par spectrométrie UV-Visible. a) Evolution du spectre de l'échantillon 1 ; b) Evolution de l'absorbance à 600 nm en fonction du temps.

Les témoins T1 à T4 permettent de vérifier que la dispersion de NPs_C seule n'absorbe pas à 600 nm, et que la réaction 2 (Figure 43) n'a pas lieu lorsque la génipine n'est pas en présence de chitosane. La réaction se produit dans tous les autres échantillons, avec une évolution similaire : l'avancement augmente progressivement et atteint un palier au bout d'environ 166 h (~ 7 jours) pour tous les échantillons. Comme attendu, le rapport molaire a un impact sur le taux de réticulation : à concentration en chitosane constante, plus $n_{\text{chito}}/n_{\text{gén}}$ est faible, plus les dispersions absorbent à 600 nm, et donc plus la densité de réticulation est importante.

La force ionique du milieu semble avoir une influence sur la réaction de réticulation, puisqu'à concentrations équivalentes, l'absorbance maximale de l'échantillon 4 est significativement plus faible que celle de l'échantillon 1, qui a une force ionique plus forte. Ce résultat est cohérent avec les observations de Mi et coll. qui rappellent que la formation de l'amide est catalysée par la présence d'acide [289]. Ainsi nous observons que plus la force ionique du tampon acétate (pH = 4.5) est élevée, plus la réaction 2 sera favorisée. A contrario, les mêmes auteurs ont montré que la réaction 1 pouvait être inhibée en milieu acide, en raison de la protonation de l'amine. Nous n'avons cependant pas pu observer ce phénomène car la gamme de longueur d'onde correspondante (~ 240-280 nm) n'était pas accessible par l'appareillage dans ces gammes de concentrations.

Tableau 13. Influence de la quantité de génipine sur l'évolution des propriétés colloïdales des échantillons de NPs_C.

Ech.	% <i>f</i> _{CS} (mg/mL)	n _{chito} /n _{gén}	70 h		120 h		170 h		244 h	
			\overline{d}_{QELS}	pdi	\overline{d}_{QELS}	pdi	\overline{d}_{QELS}	pdi	\overline{d}_{QELS}	pdi
1	4,2	16	435	0,28	575	0,35	550	0,35	530	0,34
2	4,2	33	305	0,20	350	0,25	705	0,46	340	0,27
3	4,2	22	355	0,20	595	0,42	540	0,45	400	0,31
4	4,2	16	470	0,31	445	0,25	435	0,23	430	0,24
T1	4,2	/	245	0,21	225	0,19	225	0,17	220	0,17
T4	4,2	/	265	0,18	265	0,15	270	0,16	270	0,16

L'évolution des tailles des particules est plus complexe (voir Tableau 13). On observe tout d'abord que les témoins T1 et T4 n'évoluent pas de façon significative. En comparaison, l'augmentation des tailles et de la polydispersité des échantillons réticulés avec la génipine est significative, quelle que soit la concentration utilisée. La réaction de la génipine avec les fonctions amine primaires du chitosane entraîne certainement une diminution des charges en surfaces des nanogels. Il serait intéressant à l'avenir d'étudier l'influence de cette réticulation sur le potentiel zêta des particules. Il n'est cependant pas certain que la diminution de ces charges en surface soit suffisante pour perturber la stabilisation colloïdale des NPs_C. Nous avons en effet mentionné précédemment que, du fait du double mécanisme de stabilisation « électro-stérique », les nanogels n'étaient pas sensibles à l'écrantage des charges. Au vu de la très faible solubilité dans l'eau de la génipine (environ 6 mg/mL dans le tampon acétate), la réaction avec le chitosane doit modifier la balance hydrophile-hydrophobe en surface des particules, rétracter la couronne solvatée et ainsi favoriser l'agrégation des nanogels, ce qui conduirait à l'augmentation des tailles et de la polydispersité. Un autre phénomène également envisageable serait la réticulation de deux nanogels par une ou plusieurs molécules de génipine, ce qui aurait là aussi pour effet d'augmenter la taille et la dispersion en taille de nos échantillons.

Les discussions de l'incidence de la réticulation des nanoparticules de chitosane sur les propriétés des assemblages colloïdaux seront abordées dans le Chapitre III.

III - MATERIEL ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

1. Préparation du chitosane

Le chitosane commercial utilisé dans cette étude a été fourni par Mahtani Chitosan (Veraval, Gujarat, Inde) et fait partie d'un lot de type 114. Cette nomenclature du fournisseur correspond à un chitosane qui provient de chitine extraite de la plume de calmar, qui possède un DA de 2 % environ, et dont la viscosité en solution doit être supérieure à 2000 cps.

1.1. Purification

Pour réaliser cette étape de filtration, le chitosane est solubilisé à 0.5 %_{w/w} dans une solution d'acide acétique 0.2 %_{w/w}. Après une nuit sous agitation magnétique à température ambiante, la solution est filtrée sur des membranes de cellulose avec des tailles de pores successives de 3 µm, 0.8 µm et 0.45 µm (Millipore). Le polymère est ensuite précipité par ajout de solution d'ammoniaque concentrée (28 %_w). Plusieurs cycles de lavage/centrifugation à l'eau permutée sont ensuite nécessaires pour neutraliser le chitosane, qui est ensuite congelé et lyophilisé. Le chitosane purifié est finalement pesé, et caractérisé en RMN ¹H, chromatographie d'exclusion stérique (voir conditions en paragraphe III-1.5.3) et ATG.

La teneur en eau de ce polymère purifié est ensuite évaluée. Cette quantité d'eau systématiquement présente dans le chitosane (%_(eau)) est déterminée par une mesure thermogravimétrique (ATG) réalisée sur la poudre de chitosane. Il est important de connaître ce pourcentage afin de calculer la concentration exacte du chitosane en solution lors des différentes expériences.

Le chitosane ainsi obtenu présente comme caractéristiques : $\overline{M}_w = 450\ 000\ \text{g/mol} \pm 50\ 000\ \text{g/mol}$ ($\mathcal{D} = 1,7$), DA = 3 % \pm 0.2 %, %_(eau) = 9 % \pm 1 %.

1.2. Dépolymérisation du chitosane

1.2.1. Cinétique de dépolymérisation

100 mg de chitosane purifié sont dissous dans 20 mL d'une solution tampon 0.15M AcONH₃ / 0.2M AcOH (que nous appellerons par commodité tampon acétate 150 mM). Une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 7 mg/mL est préparée en parallèle, et 1 mL de cette solution est ajouté à la solution de polymère au temps t_0 , correspondant à un rapport molaire $R_n^{hydr} = n_{NaNO_2} / n_{GlcN} = 0.187$. Des prélèvements sont effectués à différents temps, pour lesquelles la réaction est arrêtée par ajout d'une solution d'ammoniaque. Chaque prélèvement de polymère est lavé à l'eau permutée, puis analysé en SEC (voir conditions en paragraphe III-1.5.3) pour obtenir la masse molaire. Les résultats obtenus sont la moyenne de deux expériences.

1.2.2. Dépolymérisation de grosses quantités de chitosane

Le chitosane de 450 000 g.mol⁻¹ a été dépolymérisé en mode "batch", pour obtenir de grandes quantités de chitosane de faible masse molaire. Typiquement, 5 g de polymère sont solubilisés dans 1 L de tampon acétate 150 mM pendant 1 nuit sous agitation magnétique. 50 mL d'une solution de NaNO₂ à 7 mg/mL sont ensuite ajoutés ($R_n^{hydr} = 0.187$) sous vive agitation pour une homogénéisation rapide. A noter que dans les premiers instants de la réaction, on observe l'apparition de bulles dans la solution qui correspondent au dégagement gazeux de N₂ (cf. Figure 5, Chapitre I). L'agitation est maintenue le temps nécessaire (déterminé à l'aide de la Figure 23, paragraphe III-1.2.1) selon la masse molaire souhaitée, puis la réaction est arrêtée en ajoutant de l'ammoniaque concentrée, jusqu'à l'obtention d'un pH d'environ 9-10. Le polymère est ensuite lavé à l'eau permutée avec 5 cycles de lavage-centrifugation jusqu'à atteindre un pH d'environ 5,5-6. Le chitosane lavé est égoutté, congelé puis lyophilisé. On récupère une poudre blanche avec une légère teinte jaune orangé. Cette poudre est caractérisée en RMN ¹H pour déterminer le DA et la masse molaire est obtenue en SEC (voir conditions en paragraphe III-1.5.3).

1.3. Acétylation du chitosane

L'anhydride acétique a été utilisé pour la N-acétylation du chitosane. 1 L de solution aqueuse contenant 10 g de chitosane avec l'acide acétique en quantité stœchiométrique (environ 3,2 mL) a été mélangé à 800 ml de 1,2-propanediol. Le milieu acétylant, contenant 200 mL de 1,2- propanediol et la quantité d'anhydride acétique nécessaire selon le DA visé, a été ajouté goutte-à-goutte dans la solution de chitosane sous forte agitation. La concentration finale de chitosane est de 0.5 %w/v. On laisse la réaction sous agitation mécanique (à pales) pendant une nuit. A la fin de la réaction, les produits ont été lavés par 14 cycles de lavage-centrifugation à l'eau permutée et finalement lyophilisés.

Les échantillons de DA40 et 60 ont cependant dû être lavés par dialyse, compte tenu des problèmes de solubilisation rencontrés à haut DA. Des membranes de dialyse (6-8 000 MWCO, Spectra/Por Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) contenant la solution acide de chitosane ont été plongées dans un bain d'eau permutée, avec une légère agitation magnétique. L'eau de lavage a été changée toutes les demi-heures pour les 4 premiers bains, toutes les heures pour les 5 suivants, puis toutes les deux heures pour les 5 derniers. Enfin les deux lots ont été congelés et lyophilisés. Les masses molaires et DA ont été contrôlés respectivement par SEC et RMN ¹H.

1.4. Synthèse d'hydrogels macroscopiques de chitosane

1.4.1. Synthèse des macro-hydrogels par voie aqueuse

Le polymère est solubilisé à la concentration voulue (3%, 5%, 7% ou 9 %), en ajoutant la quantité stœchiométrique d'acide acétique par rapport au nombre de moles de fonctions amines. Le mélange est agité pendant 12 heures. 3 g de solution sont ensuite pesés dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre. La boîte de Pétri est alors placée dans un contenant fermé (dessiccateur), sous atmosphère d'ammoniac, ce qui entraîne une augmentation du pH de la solution et par conséquent sa gélification progressive.

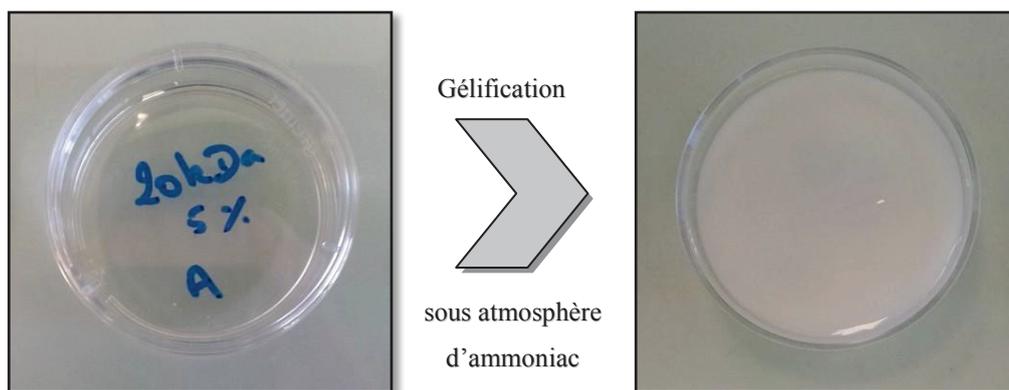


Figure 45. Obtention des macro-hydrogels aqueux de chitosane. La boîte de Pétri contenant la solution de chitosane CS20DA3 concentré à 5% (à gauche) est introduite dans une atmosphère d'ammoniac. L'augmentation du pH de la solution entraîne la gélification progressive du chitosane. On obtient au bout de 24 h un gel opaque blanc (à droite).

Les échantillons ont été maintenus ainsi pendant 24 h avant d'être retirés. On obtient des gels blancs opaques (voir Figure 45 à droite) qui doivent être lavés pour éliminer les sels et atteindre progressivement un pH neutre. Les lavages se font dans des béciers remplis d'eau permutée. L'eau doit être changée méticuleusement, jusqu'à ce que le pH soit proche de pH ~ 5-6. Les hydrogels sont conservés dans de l'eau permutée à température ambiante jusqu'à leur caractérisation et/ou une éventuelle post-réticulation à la génipine (voir paragraphe suivant).

1.4.2. Post-réticulation des macro-hydrogels

Certains gels ont subi une post-réticulation avec la génipine. Dans une boîte de Pétri contenant l'hydrogel lavé, on ajoute successivement :

- un volume V_1 d'une solution de génipine de concentration $C_{gen} = 8.2 \text{ mg.mL}^{-1}$
- un volume V_2 d'eau (apyrogène).

Le rapport molaire $n_{\text{GlcN}} / n_{\text{gén}}$ (nombre de moles de motifs GlcN / nombre de moles de génipine) est constant pour tous les gels, fixé à 14. Le volume V_1 à ajouter est donc calculé, pour chaque gel, en fonction de la masse sèche de chitosane de l'hydrogel, $m_{\text{CS}}^{\text{sec}}$ (que l'on estime égale à celle de la solution initiale) d'après les relations (II.8) et (II.9):

$$\frac{n_{GlcN}}{n_{gen}} = \frac{m_{CS}^{sec}}{M_{motif}} (1 - DA) \cdot \frac{M_{gen}}{V_1 \cdot C_{gen}} \quad (\text{II.8})$$

$$V_1 = \frac{m_{CS}^{sec} (1 - DA) M_{gen}}{14 \cdot M_{motif} C_{gen}} \quad (\text{II.9})$$

On fixe le volume total de solution à 4 mL pour tous les échantillons, de sorte que le gel soit parfaitement immergé. V_2 est donc égal à : $V_2(mL) = 4 - V_1$.

La boîte de Pétri est ensuite introduite sur un lit d'eau, dans un flacon fermé, pour assurer une atmosphère humide et éviter le séchage des hydrogels. Le milieu réactionnel est ainsi maintenu à température ambiante pendant 7 jours. Les gels sont alors retirés, précautionneusement lavés et analysés en rhéologie.

1.5. Techniques de caractérisation du chitosane et des nanogels

1.5.1. Mesures thermogravimétriques

Le chitosane est un composé hygroscopique. A l'air libre, il absorbe immédiatement une certaine quantité d'eau, non négligeable, pour former un complexe hydraté. La masse de l'eau absorbée doit être prise en compte pour les calculs de masse de chitosane. On détermine cette fraction d'eau par analyse thermogravimétrique (ATG).

Pour cela, nous disposons d'un TGA 2950 (TA Instruments), dont le four est placé sous flux d'hélium. L'analyse se fait sur un échantillon de 5 à 10 mg. Elle consiste en une rampe de 15 °C/min, de 25 °C à 160 °C, avec un palier de 20 min à 160 °C. La fraction d'eau (%_{eau}) est déduite de la différence entre la masse initiale et la masse finale de l'échantillon.

1.5.2. Analyses RMN ¹H

Les analyses RMN ¹H sont effectuées au Service de RMN du Réseau des Polyméristes Lyonnais, sur un spectromètre BRUKER Avance III 400 MHz, équipé de la sonde BBFO+.

Les échantillons sont préparés à une concentration d'environ 10 mg/mL. L'analyse est réalisée à 27 °C.

L'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel TOPSPIN (Bruker). Le DA du chitosane est déterminé selon la méthode de Hirai *et al.* [31].

Sauf mention contraire, les échantillons de chitosane sont solubilisés dans du D₂O, avec environ 4 µL de solution de DCI à 37%_{w/w} dans D₂O.

1.5.3. Détermination de la masse molaire

La masse molaire des différents échantillons a été déterminée à l'aide d'une chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à un détecteur de diffusion de la lumière.

Les échantillons de chitosane sont analysés sur deux colonnes en ligne (colonnes gels 2500 et 6000 TSK PW, ID = 7,8 mm et L = 300 mm), couplées à un réfractomètre différentiel (Optilab T-rEX, Wyatt Technology) et un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles (MALLS, Dawn EOS, Wyatt Technology) équipé d'un laser opérant à $\lambda = 690$ nm. L'éluant est le tampon pH4.5, 0.15M AcONH₃ / 0.2M AcOH (tampon acétate 150 mM), dégazé et filtré sur 0.45 µm, circulant à un débit de 0.5 mL/min. Les valeurs d'incrément d'indice de réfraction utilisées pour ces analyses ont été extraites de l'article de Schatz et coll. [45].

Les échantillons sont solubilisés à ~ 0.5 mg/mL dans le tampon acétate 150 mM, filtrés sur 0.45 µm puis injectés avec un système d'injection automatique. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel ASTRA 6.0.2 (Wyatt Technology).

1.5.4. Caractérisation rhéologique des macro-hydrogels de chitosane

Les hydrogels ont été analysés avec un rhéomètre ARES, équipé d'une géométrie plan-plan. Pour chaque hydrogel préparé, 3 prélèvements sont effectués, avec un emporte-pièce circulaire de 10 mm de diamètre, et analysés lors d'un balayage en fréquence de 100 rad/s à 0.1 rad/s (déformation fixée à 0,2 %, située dans le régime linéaire), puis en déformation de 0,01% à 40 % (fréquence fixée à 5 rad/s). Les résultats annoncés sont une moyenne des 3 prélèvements.

2. Synthèse et caractérisation des nanogels de chitosane

2.1. Protocole de synthèse des nanogels de chitosane

Emulsification et gélification :

6 mL de solution acide de chitosane CS20-1 de concentration variable sont filtrés sur membrane 0.45 μm et ajoutés à la phase organique, composée de 24 g de M812 et 300 mg de SPAN80. Le mélange est pré-émulsionné pendant 2 min sous forte agitation magnétique (1200 tr/min). La pré-émulsion est ensuite immédiatement introduite dans un réacteur à double enveloppe thermostaté à 15 °C, schématisé sur la Figure 25.

Le système à ultrasons utilisé est constitué d'un générateur hautes fréquences Bandelin (Sonoplus HD2200, 20 kHz, 200W), d'un transducteur Bandelin (UW 2200), d'un résonateur Bandelin (SH213G) et d'une sonde Bandelin (KE76) de 6 mm de diamètre. La sonotrode est positionnée au centre du réacteur, à une hauteur de 2 cm par rapport au fond. Le traitement ultrason est appliqué pendant 5 min à une puissance de 50 % de la puissance maximum. Au bout des 5 min un flux d'ammoniac gazeux est introduit dans le réacteur, et le traitement ultrason est maintenu. Ultrason et flux d'ammoniac sont ensuite arrêtés, et la dispersion laiteuse est transvasée dans des flacons pour être centrifugée.

Lavages :

Les flacons sont centrifugés à 800G pendant 6 min à température ambiante. Les nanoparticules sont ensuite lavées successivement par des cycles de lavage-centrifugation, deux fois à l'éthanol, et deux fois à l'eau permutée, jusqu'à atteindre un pH neutre. Un prélèvement sur le culot lavé est systématiquement réalisé, pour déterminer, après lyophilisation, l'extrait sec ($\%_{CS}$, qui correspond à la concentration massique en chitosane sec) et, par RMN ^1H , la quantité de M812 résiduelle. Enfin, sauf mention contraire, les nanoparticules sont redispersées dans le tampon acétate 150 mM.

2.2. Réticulation chimique des nanogels de chitosane

Les NPs_C utilisées ont une teneur en chitosane C_{gel} de 5 % et sont dispersées dans un tampon acétate 150 mM ou 50 mM à un extrait sec initial $\%_{CS}$ de 8.4 mg/mL. On introduit dans des eppendorfs un volume $V_{disp} = 750 \mu\text{L}$ de cette dispersion. On ajoute ensuite, en

fonction du rapport molaire $n_{\text{GlcN}}/n_{\text{gén}}$ souhaité, un volume $V_{\text{gén}}$ variable d'une solution de génipine concentrée à 0.70 mg/mL. On complète ensuite avec de l'eau stérile (V_{eau}) pour obtenir un volume totale de 1.5 mL. Le mélange est agité sur une roue à température ambiante pendant toute la durée de l'expérience. La taille des NP_{SC} et l'absorbance de la dispersion sont suivies respectivement en diffusion quasi-élastique de la lumière et en spectrométrie UV-Vis.

2.3. Caractérisation des nanogels de chitosane

2.3.1. Analyses RMN ^1H

La pureté des NP_{SC} a été contrôlée en RMN ^1H . Environ 10 mg de NP_{SC} lyophilisés sont solubilisés dans 400 μL d'eau deutérée avec $\sim 4 \mu\text{L}$ de DCI dans D_2O (37 % $_{\text{w/w}}$) pendant 30 min. On ajoute ensuite 400 μL de DMSO-d_6 sous agitation magnétique. Le mélange final est translucide. Les analyses RMN ^1H sont effectuées au Service de RMN du Réseau des Polyméristes Lyonnais, sur un spectromètre BRUKER Avance III 400 MHz, équipé de la sonde BBFO+. L'analyse est réalisée à 27 °C.

L'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel TOPSPIN (Bruker).

2.3.2. Viscosimétrie capillaire

L'appareil de mesure est un viscosimètre capillaire (diamètre intérieur 0,53 mm) Ubbelohde (Viscologic TI.1, SEMATech), qui dispose d'un système de dilution-injection automatique. La température du système est régulée par un système de double enveloppe.

2.3.2.a. Etalonnage

La courbe d'étalonnage a été obtenue en mesurant les temps de passage de l'eau (eau apyrogène, Versol®, Aguetant, France), le 1-propanol, le 1-octanol et le 2-butanol. Les mesures sont faites à 25°C. Chaque solvant est filtré sur 0.8 μm . On répète chaque mesure jusqu'à avoir au moins 4 temps avec un écart de moins de 0.5 %. Après chaque solvant, le système est lavé à l'éthanol filtré sur 0.8 μm .

2.3.2.b. Mesure de viscosités de dispersion de nanogels de chitosane à différentes concentrations

Nous avons ensuite mesuré les temps de passage d'une dispersion de NPs_C à différentes dilutions. Pour cette étude, nous avons utilisé une dispersion mère de nanogels ($C_{gel} = 3 \%$) dans le tampon acétate 150 mM, avec un extrait sec $\%_{CS} = 17.9 \text{ mg/ml}$, un $\overline{d_{QELS}} = 197 \pm 6 \text{ nm}$ et une valeur de PDI de 0,2 (Malvern Zetasizer Nano ZS). Les dilutions sont réalisées par le système de dilution automatique avec le même tampon. La température est contrôlée à 25°C. La mesure est répétée 5 fois pour chaque dilution.

2.3.3. Mesures de taille et de potentiel zeta des particules

Les mesures de taille ont été réalisées avec la technique de diffusion dynamique ou quasi-élastique de la lumière (QELS). L'appareil est un Malvern Zetasizer Nano ZS, équipé d'un laser He/Ne de 4 mW opérant à une longueur d'onde de $\lambda = 633 \text{ nm}$. Pour les mesures de taille, la dispersion de nanoparticules est introduite dans une cuve en polyacrylate que l'on place dans l'appareil, et la mesure se fait sur l'échantillon au repos. L'échantillon est thermostaté à l'aide d'un système Pelletier. Toutes les mesures sont réalisées à une température constante de 25 °C, à un angle fixe de 173 °. Le logiciel « Dispersion Technology Software » (DTS) 5.10 a été utilisé pour collecter et traiter les données. Les mesures ont été effectuées avec une position et un atténuateur automatique. La fonction d'auto-corrélation est traitée suivant la méthode des cumulants [290].

Pour les mesures de potentiel zeta, il est nécessaire d'utiliser des cuves dédiées DTS1061, permettant l'application d'un champ électrique à l'échantillon. La conductivité est systématiquement contrôlée et doit être inférieure à 4 mS/cm (au-delà, l'appareil ne fournit plus une mesure pertinente du potentiel zeta). Les résultats sont traités avec le mode "General Purpose".

2.3.4. Microscopie électronique en transmission (MET)

2.3.4.a. MET classique

L'appareil utilisé est un Philips CM120 avec une tension d'accélération du faisceau modulable de 60 à 120 kV d'une caméra ULTRASCAN 1000 2Kx2K // Orius 200 2Kx2K.

Une goutte de 5 μL d'échantillon est déposée sur une grille Cu Mesh 400 + Formvar, préalablement hydrophilisée par traitement sous plasma d'argon. La goutte est maintenue pendant 5 min, avant d'être absorbée délicatement au papier buvard. Lorsque l'échantillon doit être contrasté, la grille est déposée sur une goutte de solution aqueuse d'acétate d'uranyle 1 % pendant 15 s, avant d'être retirée et buvardée. La grille est séchée puis directement observée. Les observations se font à une tension de 80 kV (afin d'éviter la détérioration de l'échantillon).

2.3.4.b. Cryo-MET

Les échantillons ont été congelés avec un dispositif de refroidissement appelé « CryoPlunge » (CT μ , Villeurbanne) fourni par l'Université Paris Sud. Il s'agit d'un système automatisé permettant de contrôler différents paramètres de préparation et de congélation des grilles.

Une goutte de 5 μL de l'échantillon est déposée sur une grille Cu Mesh 300 + film de carbone troué. La grille est introduite dans le « CryoPlunge », dont l'humidité est contrôlée à une valeur de 60 %. La grille est dans un premier temps épongée avec deux vérins pneumatiques, puis le refroidissement est réalisé en plongeant rapidement la grille dans un bain d'éthane liquide. La grille ainsi congelée est ensuite déposée manuellement dans le module de transfert GATAN 626, lui-même maintenu à très basse température grâce à de l'azote liquide.

Les observations en cryo-MET ont été réalisées sur le Philips CM120 en mode Cryo, équipé d'une caméra ULTRASCAN 1000 2Kx2K // Orius 200 2Kx2K avec le module de cryotransfert GATAN 626. La tension d'accélération est réglée à 80 kV pour tous les échantillons. Le traitement des images a ensuite été réalisé avec le logiciel ImageJ 1.46g, disposant du module DM3 Reader.

IV - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce chapitre expose mes travaux sur la compréhension et l'optimisation des propriétés colloïdales de nanogels de chitosane. Le principe est relativement simple et repose sur le savoir-faire du laboratoire sur les hydrogels de chitosane : une solution acide de chitosane est émulsionnée dans une phase organique biocompatible à l'aide d'ultrasons, et les nanogouttelettes ainsi générées sont ensuite gélifiées par l'augmentation du pH. Cela permet, une fois lavés et redispersés dans un tampon acétate acide, d'obtenir des hydrogels physiques de chitosane sous forme colloïdale, sans utiliser de réticulant chimique. De tels objets représentent un potentiel pour des applications biomédicales, tirant pleinement profit des propriétés de biocompatibilité et de bioactivité du chitosane.

L'existence et la pérennité de ces nanogels en tampon acide ne sont *a priori* pas intuitives, mais néanmoins confirmées par un faisceau d'indices : les analyses en diffusion dynamique de la lumière montrent que des nano-objets de l'ordre de 200 nm sont présents, ce qui est confirmé par les analyses de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), cette technique permettant même de visualiser individuellement chaque particule. Les analyses en microscopie électronique, aussi bien classique qu'en cryo-MET, ont permis d'observer ces nanogels et de corroborer les résultats de taille obtenus en diffusion de la lumière.

Pourtant, plusieurs éléments conduisent à penser que ces nanogels présentent certains inconvénients. Aucune méthode n'a par exemple été trouvée pour séparer ces particules de la phase continue ce qui pose des difficultés pour purifier les NPs_C et déterminer la fraction de chitosane sous forme de nanogels et celle éventuellement sous forme soluble. Pour les mêmes raisons, la concentration en polymère dans chaque nanogel, paramètre important pour caractériser le système, s'avère complexe à mesurer, même si la technique de NTA pourrait à l'avenir apporter des éléments de réponse.

De même, certaines observations mettent en évidence la fragilité de ces nanogels. L'étude d'hydrogels macroscopiques nous a permis de mieux appréhender le fait que la faible masse molaire du chitosane conduisait à la formation d'hydrogels peu cohésifs, dû à la faible densité d'enchevêtrements de courtes chaînes macromoléculaires. L'augmentation de la solidité de ces nanogels a donc été recherchée par plusieurs moyens : en augmentant la concentration de la solution de chitosane, et donc la densité d'enchevêtrements, ce qui a permis de montrer

qu'une concentration de 5 % pouvait être atteinte sans perte de reproductibilité et de stabilité. Au-delà de 5 %, la synthèse n'était plus fiable. La réticulation chimique a également été envisagée pour augmenter encore la cohésion de ces nanogels. Pour cela, la génipine a été employée car c'est un réticulant naturel du chitosane, qui présente une cytotoxicité bien moindre que celle du glutaraldéhyde. Les nanogels ainsi réticulés augmentent en taille et en distribution de taille, ce qui peut être expliqué par une modification de la balance hydrophile-hydrophobe dans la couronne solvatée des particules, diminuant ainsi son pouvoir de répulsion.

Pour approfondir cet aspect de tenue mécanique des nanogels, plusieurs pistes mériteraient d'être suivies :

- La mise au point d'une technique permettant de mieux caractériser les propriétés mécaniques des nanogels (l'AFM serait une piste intéressante, en tant que nano-sonde mécanique) ;
- Une étude détaillée de l'influence des paramètres « concentration » et « masse molaire » sur les propriétés des nanogels ;
- L'ajout de sels dans la solution de chitosane pendant l'étape d'émulsion.

Ce procédé aurait pour effet de diminuer la viscosité de la phase aqueuse avant gélification, par écrantage des charges le long de la chaîne de chitosane. Cela pourrait permettre de travailler à des concentrations plus élevées en chitosane, et d'obtenir ainsi des nanogels plus cohésifs ;

- Une étude plus précise de l'influence de la réticulation des nanogels par la génipine sur leur cohésion.

Il s'agira d'évaluer une gamme plus large de taux de réticulation en travaillant éventuellement à des concentrations plus faibles en nanogels de manière à limiter, au maximum, les phénomènes de déstabilisation ou d'agrégation observés.

L'utilisation de ces nanogels de chitosane dans la réalisation d'assemblages colloïdaux fera l'objet d'une étude approfondie présentée dans le chapitre suivant. Ces nanogels sont en effet des colloïdes chargés en surface, charges qui peuvent être mises à profit pour établir des interactions électrostatiques avec des colloïdes de charge opposée. Ainsi, on verra que le mélange de tels colloïdes peut conduire à la formation de gels macroscopiques, qui présentent

des propriétés mécaniques intéressantes, pouvant être contrôlées en jouant sur différents paramètres physico-chimiques.

CHAPITRE III

ASSEMBLAGES COLLOÏDAUX

I - INTRODUCTION

Dans la partie bibliographique, l'essor des matériaux obtenus par assemblages de colloïdes a été mis en évidence. Ce type de matériaux se révèle être d'un grand intérêt dans les domaines de l'ingénierie tissulaire, en tant que scaffold implantable ou injectable. La combinaison récente des biotechnologies et des nanotechnologies a permis d'obtenir des matériaux avec des propriétés structurales et fonctionnelles qui se rapprochent de plus en plus du milieu vivant, et ce en utilisant des constituants naturels, ou du moins biocompatibles, garantissant ainsi une meilleure tolérance de l'organisme hôte.

Ce projet s'est inspiré des récents résultats dans le domaine des gels colloïdaux des équipes de Hennink et coll. et de Berkland et coll., qui ont respectivement travaillé sur l'association de microgels de dextrane modifié [226,227,229] ou de nanoparticules de PLGA fonctionnalisées [231,232]. Dans ce contexte, nous avons cherché à mettre à profit le savoir-faire du laboratoire de l'Ingénierie des Matériaux Polymères dans la mise au point d'assemblages colloïdaux, fort de plusieurs décennies d'expérience dans les domaines des colloïdes et des polysaccharides naturels, et notamment du chitosane. L'objectif de mes travaux était d'obtenir des gels colloïdaux à base de nanogels de chitosane, un polysaccharide d'origine naturel. La synthèse de ces nanogels avait été récemment mise au point au laboratoire [153,271,291]. Plus particulièrement, la stratégie de départ de ce projet était de réaliser des gels colloïdaux qui soient entièrement élaborés à base de chitosane sous forme colloïdale. Pour atteindre cet objectif, il était prévu de complexer les nanogels de chitosane « classiques », que l'on a décrits en Chapitre II et qui présenteraient une charge de surface positive, avec des nanogels de chitosane « modifiés » qui présenteraient une charge négative. Ces derniers auraient été obtenus en complexant les nanogels de chitosane « classiques » avec plusieurs polyanions naturels, comme le sulfate de chondroïtine et l'acide hyaluronique. En dépit de nombreux essais, qui ne seront pas présentés ici, il n'a pas été possible d'obtenir de nanogels négatifs stables. A partir de ce constat, il a été décidé de commencer ce travail sur les assemblages colloïdaux en étudiant la complexation de particules négatives modèles, les nanoparticules de poly(acide lactique) (PLA), dont la synthèse est très bien maîtrisée, avec le chitosane, sous forme soluble ou de nanogels.

Ce chapitre se décompose ainsi en deux parties, comme cela est illustré sur la Figure 46 : dans un premier temps seront présentés les travaux sur la complexation de nanoparticules de

PLA avec le chitosane en solution, conduisant à la formation de gels dits « composites » (Figure 46A), qui possèdent des propriétés rhéologiques particulières. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à la formation de gels dits « colloïdaux » (Figure 46B), issus de la complexation des mêmes nanoparticules de PLA avec les nanogels de chitosane, présentés dans le précédent chapitre. Nous discuterons l'influence de facteurs expérimentaux et ferons le parallèle avec les résultats obtenus avec les gels composites.

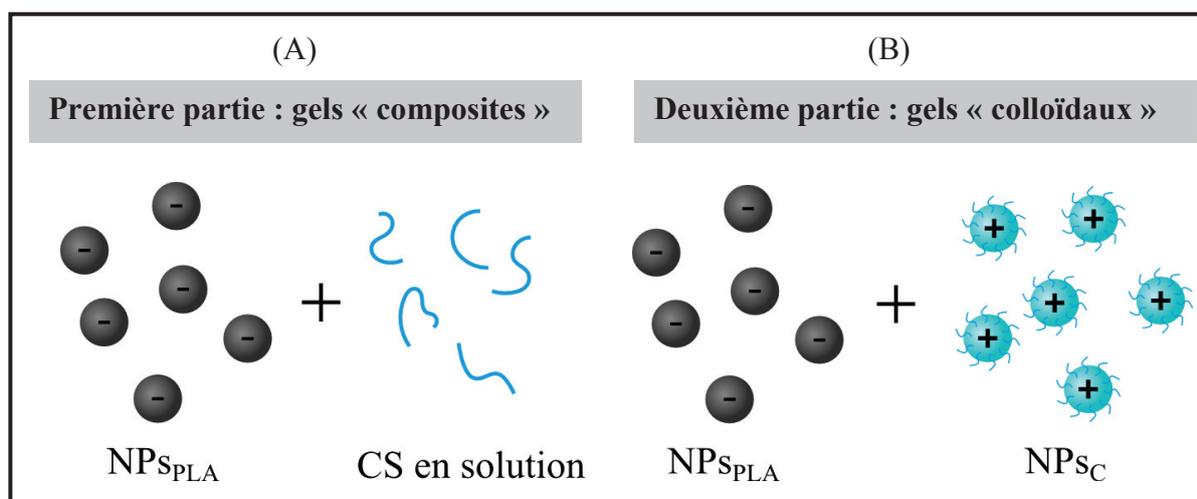


Figure 46. Organisation du Chapitre II : la première partie (A) traitera des assemblages de nanoparticules de PLA (NPs_{PLA}) avec du chitosane (CS) en solution, et la deuxième partie (B) des assemblages de NPs_{PLA} avec les nanogels de chitosane (NPs_C).

II - FORMATION DE « GELS COMPOSITES » A BASE DE NANOPARTICULES DE POLY(ACIDE LACTIQUE) ET DE CHITOSANE EN SOLUTION.

1. Publication 2 : Shear thinning three-dimensional colloidal assemblies of chitosan and poly(lactic acid) nanoparticles

Dans un premier temps, le couple « nanoparticules de PLA / chitosane en solution » sera examiné. Le mélange de ces deux composants de charges opposées entraîne effectivement, sous certaines conditions, la formation de macro-gels. Comme nous le verrons plus loin, ces derniers reposent sur l'établissement d'interactions électrostatiques entre le polycation et les nanoparticules négatives, et de liaisons hydrogène induites par la couche de chitosane adsorbée en surface. Le principal outil d'investigation pour caractériser ces assemblages a été la rhéologie en mode oscillatoire, technique très largement utilisée dans le domaine des

structures complexes [292]. Cette technique a permis de démontrer la présence d'assemblages au comportement de gel élastique, mais fragile. Ces matériaux présentent également des propriétés rhéofluidifiantes, ils s'écoulent sous contrainte puis retrouvent au repos leurs propriétés rhéologiques initiales, ce qui peut s'avérer particulièrement intéressant pour les applications de scaffolds injectables. Des analyses de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), couplées aux résultats de rhéologie, ont permis de mettre en évidence la couche de polymère adsorbée en surface des particules. Cette couche joue un rôle prééminent dans la réticulation, réversible, des particules entre elles, et de l'établissement d'un réseau 3D, responsable de la réponse élastique du matériau.

Ces résultats ont donné lieu à un article publié dans « The Journal of Physical Chemistry, Part B » (2013, vol. 117, p. 7455-7464), et qui sera retranscrite ici dans une mise en page adéquate au reste du manuscrit. Il convenait ensuite d'apporter plusieurs précisions relatives au contexte expérimental, que nous n'avons pas pu intégrer dans l'article soumis.

Shear Thinning Three-Dimensional Colloidal Assemblies of Chitosan and Poly(lactic acid) Nanoparticles

1.1. Abstract

In this study, new materials capable of reversible self-assembly, based on concentrated negatively charged poly(lactic acid) nanoparticles and chitosan, a natural polycationic polymer, were successfully fabricated. Electrostatic interactions between oppositely charged components along with weaker interactions led to the formation of a 3D network. The resulting macroscopic assemblies were characterized by dynamic mechanical measurements, and the influences of various parameters such as chitosan/poly(lactic acid) weight ratio, duration and temperature of the mixture, and molecular weight or chitosan degree of acetylation were studied. Our results showed that the mechanical properties of assemblies were highly dependent on the nanoparticle solid content and chitosan/nanoparticle ratio. In particular, at an optimum weight ratio the colloidal assemblies exhibited remarkable high elastic moduli (about 300 kPa) for a particle solid content of 18% w/w. Thanks to the weak and reversible nature of the interactions, these materials exhibited shear thinning properties, and could instantly recover their cohesiveness at rest. The mode of interactions between PLA particles and chitosan was shown to be in part due to electrostatic interactions, but the cross-linking of chitosane-covered particles was attributed to hydrogen bonding. These materials could be envisaged as good candidates for injectable scaffolds for tissue engineering, taking advantage of the biocompatibility and bioactivity of both components. However, some issues concerning temperature stability must be resolved before applying these colloidal assemblies to cell growth in physiological conditions.

1.2. Introduction

The field of tissue engineering has intensively developed over these past years to meet the tremendous need in skin [293], organ and orthopedic surgery [294–296]. It demands the elaboration of functional three-dimensional (3D) tissue using cells combined with scaffolds featuring desired mechanical properties [178], to favor cell growth, organization, and

differentiation. Injectable scaffolds hold great promise because they can be introduced under liquid form, thus facilitating surgery, diminishing cost and delay, and improving the patient's comfort [296–298]. Designing such materials is a challenge as they should be liquid during the injection, and the network should form *in situ* spontaneously once deposited, to fit perfectly the defect and allow cell growth.

Hydrogels are highly hydrated 3D networks, widely used in tissue engineering because they provide a favorable medium for cell growth and differentiation that mimics the physiological environment [299]. Research in recent years has particularly focused on *in situ* forming hydrogels [296,300], as a noninvasive method, as an alternative to open surgery, and which could be loaded with various bioactive agents. To obtain injectable hydrogels, various methods were developed, by either chemical or physical cross-linking. Chemical grafting can be carried out via radical polymerization [184], photopolymerization [301], and sulfide or sulfate chemistry, but this strategy raises the issue of biocompatibility because of the potentially toxic residual reactive moieties [302]. Physically cross-linked hydrogels are commonly obtained from temperature or pH sensitive polymers (PEO–PPO copolymers, pNIPAm, natural polymers, etc.). The sol–gel transition relies on physical cross-linking, based on electrostatic interactions, hydrogen bonding, and van der Waals interactions. However, the mechanical properties of physical hydrogels are often limited in comparison with chemical hydrogels [303].

Particular attention must be paid to mechanical strength in the development of injectable scaffolds. In recent years, hydrogel composites, especially those laden with colloids, have given rise to extensive research. They feature enhanced mechanical properties compared to noncomposite hydrogels [204]. Holland *et al.* have shown that colloids could also enhance the biodegradability of the hydrogel, acting as good enzymatically generated porogens [182].

Poly(lactic acid) (PLA) is a biodegradable polyester often used as a micro-/nanovector for drug delivery because of its biocompatibility and nontoxicity [304–307]. It is also commonly used as a material for the elaboration of scaffolds for tissue engineering [308,309] and it has been approved by the U.S. Food and Drug Administration for various biomedical applications. The degradation of PLA leads to lactic acid, which is resorbed by the body. In our research group, PLA nanoparticles were extensively studied [310–313]. Chitosan (CS) is a cationic polysaccharide, obtained by deacetylation of chitin, one of the most abundant

natural polymers. CS, a $\beta(1\rightarrow4)$ -copolymer of glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine, can feature positive charges along its backbone in acidic conditions, owing to the protonation of the amine moieties. CS is under intense investigation for drug delivery, gene therapy, and tissue engineering [5]. Its outstanding biological properties make it a very popular actor for repair of soft or hard tissue such as skin, cartilage, or bone [57,112].

The aim of this work was to develop injectable, *in situ* forming scaffolds for tissue engineering based on one of the most widely accepted biodegradable polymers, PLA, relying on a self-assembly strategy taking place in an aqueous, tissue-friendly environment. The self-assembly process should lead to materials with high moduli after *in situ* incorporation, so the strategy was based on electrostatic interactions between negatively charged PLA nanoparticles (uniform size 200 nm) and positively charged chitosan (CS) (Figure 47). The adsorption of CS chains on the particle surface led to macroscopic hydrogels. These new materials were characterized by rheological and small angle X-ray scattering (SAXS) measurements, and the influences of different parameters (inherent to CS or to environmental conditions such as temperature or mixing time) on the mechanical properties of the material were examined.

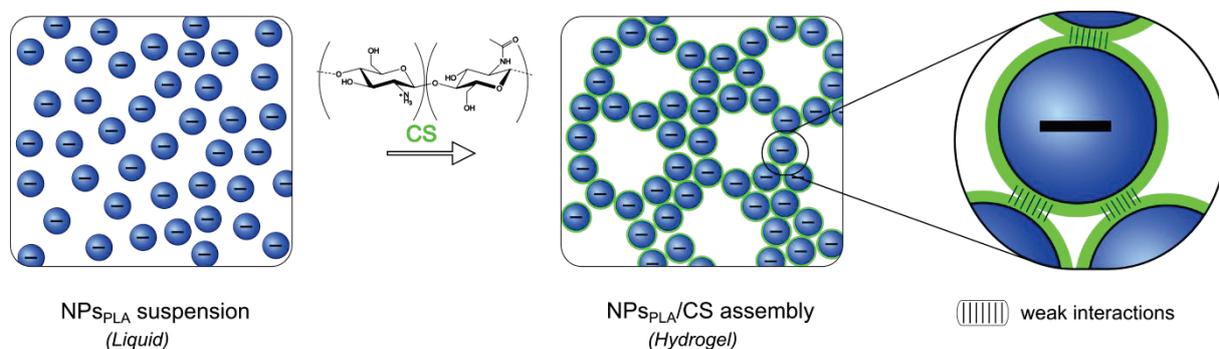


Figure 47. Complexation of negative PLA nanoparticles (NPsPLA) with chitosan polycationic chains (CS) leading to a macroscopic hydrogel. CS adsorbed as a thin layer (represented in green) onto the NPsPLA surface, leading to the assembly via weak interactions (black stripes).

The materials reported here arose from the assembly of a polymer and a colloid but differed from most composites since the polymer matrix binding the particles remained a minor component. Hence, these materials can be regarded as a new variant of colloidal assemblies.

1.3. Materials and methods

1.3.1. Materials

Chitosan 114 ($\overline{M}_w \sim 400$ kg/mol, $\overline{D} = 1.7$, DA = 3%) was provided by Mahtani Chitosan (Veraval, Gujarat, India). Acetic acid, ($\geq 99.8\%$), ammonium acetate ($\geq 97\%$) and deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO- d_6 , $>99.8\%$) were obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Acetone ($\geq 99\%$), ethanol (96% v/v), acetic anhydride ($\geq 99\%$), methyl cellulose (MeCell, powder, viscosity 4000 cP, 2% in water at 20°C, $\overline{M}_w = 350$ kg/mol determined in our laboratory), and deuterium oxide (D₂O, $>99\%$), were provided by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Poly(D,L-lactic acid) (PLA, $\overline{M}_w = 49$ kg/mol, $\overline{D} = 1.7$) with a carboxylic acid end group was obtained from Phusis (Saint Ismier, France).

1.3.2. Preparation and characterization of chitosan

To obtain high-purity chitosan, the polymer was successively solubilized at 0.5% (w/w) in a 50 mM acetic acid solution, filtered through membranes (Millipore) with a decreasing pore size from 3 μ m to 0.45 μ m, precipitated with dilute ammonium hydroxide, extensively rinsed with deionized water until neutral pH, and finally freeze-dried.

Purified chitosan was N-acetylated with acetic anhydride in homogeneous medium to obtain polymers with different degrees of acetylation (DA). The reaction was performed in a hydroalcoholic medium (water–propanediol), according to the method described by Vachoud *et al* [14]. After reaction, chitosans were neutralized with dilute ammonium hydroxide, rinsed with deionized water, and then freeze-dried.

The low molecular weight chitosan was produced by a nitrous deamination reaction [22,23]. Chitosan was dissolved at 0.5% (w/v) in a 0.2 M acetic acid/0.15 M ammonium acetate buffer (pH 4.5). Then, a 0.12 M sodium nitrite solution was added to the solution to obtain a molar nitrite/glucosamine ratio of 0.19. The reaction was performed under moderate magnetic stirring for 90 min. The reaction was then quenched by adding dilute ammonium hydroxide. After several washings with deionized water until neutrality, low molecular weight chitosans were freeze-dried.

The DA of chitosan was determined by ^1H NMR spectroscopy (Varian, 500 MHz), according to the method developed by Hirai *et al.* [31]. The DA of chitosans was not altered by the depolymerization reaction as similar DA values were obtained before and after the hydrolysis. ^1H NMR analyses also allow us to check the absence of propanediol within the acetylated chitosans. The water content was determined by thermogravimetric analysis (DuPont Instrument 2950). The weight-average molecular weight (\overline{M}_w) and the molar-mass dispersity (\mathfrak{D}) were measured by gel permeation chromatography (2500 and 6000 TSK PW gel columns, i.d. = 7.8 mm and L = 300 mm) coupled online with a differential refractometer (Optilab T-rEX, Wyatt Technology) and a multiangle laser light scattering (MALLS) instrument (Dawn EOS, Wyatt Technology) equipped with a laser operating at $\lambda = 690$ nm. A degassed and filtered (on 0.1 μm membrane) 0.2 M acetic acid/0.15 M ammonium acetate buffer (pH 4.5) was used as eluent. This buffer was also used as a solvent for samples, and the resulting solutions were filtered on a 0.45 μm membrane before injection. Light intensity measurements were achieved considering a chitosan DA-dependent refractive index increment (dn/dc) according to Schatz *et al.* [45]. The dn/dc value used for MeCell was 0.131 mL/g, and it was measured with the same differential refractometer as above.

The molecular features of chitosan samples used in this work are presented in Table 14.

1.3.3. Preparation and characterization of PLA nanoparticles

Surfactant-free PLA nanoparticles (NPs_{PLA}) were prepared using the nanoprecipitation method initially described by Fessi *et al.* [314]. Briefly, the polymer was dissolved at a concentration of 2% w/v in acetone, and the mixture was slowly added to a hydroalcoholic solution under moderate stirring. The mass transfer of acetone into the continuous water phase led to the formation of NPs_{PLA} . After completion, the solvents were removed by evaporation under reduced pressure at 30°C until the desired volume was reached. A dispersion of NPs_{PLA} with a maximum solid content of 18.8% was obtained, and further concentrations were prepared through dilutions with sterile water (pyrogen-free).

The solid content of the dispersion was measured by thermogravimetric analysis (DuPont Instrument 2950). The NPs_{PLA} size and size distribution were determined by quasi-elastic light scattering at 25°C, at an angle of 173°, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments

Ltd., Worcestershire, U.K.), equipped with a 4 mW He/Ne laser beam operating at 633 nm. Data were analyzed using the cumulant method [290]. The polydispersity value (PDI) measured is a dimensionless parameter defined as the ratio μ_2/Γ^2 , where μ_2 is the second cumulant of the correlation function and Γ is the average decay rate. Each value was the average of three series of 10 measurements. Characteristics of synthesized NPs_{PLA} are reported in Table 14.

Table 14.
Characteristics of PLA nanoparticles and chitosan used in this study.

PLA Nanoparticles			
sample	Z-av diam ^a (nm)	PdI ^a	ζ Potential ^a (mV)
NPs_{PLA}	203	0.01	- 30
Chitosans			
sample	\overline{M}_w ^b (kg/mol)	Đ^b	DA ^c (%)
CS400DA03	400	1.7	3
CS450DA30	450	1.7	28
CS450DA55	450	1.7	55
CS20DA03	20	1.4	3

^a. determined by QELS analyses

^b. measured from MALLS/RI/SEC analyses

^c. determined by ¹H-NMR spectroscopy

1.3.4. Preparation of colloidal assemblies

Chitosan solutions were prepared at solid contents between 0.10 and 2% by solubilizing appropriate weights of lyophilized polymer (taking into account the water content) and adding acetic acid in stoichiometry with respect to the free amines for each chosen DA. Weighted amounts of chitosan solution and NPs_{PLA} dispersion were mixed together to obtain a final blend of known chitosan and PLA solid contents, respectively $\% \delta_{\text{CS}}$ and $\% \delta_{\text{PLA}}$ (expressed as w/w), deducted from initial concentrations of the two components.

1.3.5. Rheological characterization

Dynamic rheological measurements were performed with a controlled stress rheometer (ARES, TA Instruments), using homemade mechanically roughened (to avoid wall slip) parallel plates of 8 mm. Immediately after preparation, samples were placed between the plates with a gap varying from 1 to 1.5 mm, depending on the samples.

We studied the evolution of G' and G'' , respectively shear storage modulus and loss modulus, through strain sweep measurements, with an increasing oscillatory strain (from 0.05 to 50%) in a logarithmic ramp profile, while frequency was kept constant ($\omega = 5$ rad/s). Frequency sweep tests from 100 to 0.1 rad/s were also carried out on specified samples at a strain of 0.2% located within the linear viscoelastic regime.

1.3.6. Synchrotron SAXS measurements

Small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements were performed at the BM2-D2AM beamline (ESRF, Grenoble, France). A monochromatic beam at incident energy of 16 keV was used in our study in order to characterize suspensions placed within silica glass tubes of 2 mm internal diameter (Deutero GMBH). The size of the beam was about 250 μ m width and 100 μ m height. The sample - detector distance was about 1.5 m. The intensity scattered by the empty cell (empty tube filled with solvent only) was subtracted from all the samples. An X-ray CCD camera from Ropper Scientific was used. Data analyses were performed with OriginPro 8.5 software. The data correction consisted of a subtraction of the dark image (image obtained with no incident beam but with the same exposure and reading conditions), normalization by the flat field (response of the camera to a homogeneous incident flux), correction by the camera distortion, and finally a normalization by the transmitted intensity that yielded corrected images that were further used to produce radial averages around the image center (beam center). The normalization of the image with transmitted intensity was also performed. The scattering vector range was calibrated thanks to silver behenate.

1.4. Results and discussions

1.4.1. Description of the NP_{PLA}/CS gel formation

Zeta (ζ) potential measurements indicated that PLA nanoparticles carried negative charges on their surface ($\zeta = -30$ mV, Table 14), conferred by carboxylic acid end groups. NP_{SPLA} benefited from an efficient electrostatic repulsion, and the colloidal dispersion had a high stability and a very low viscosity, close to water, even at high solid content. This naked eye observation (see tube inversion test in Figure 48a) was confirmed by frequency sweep measurements, where the G' modulus of the 18.8%_{w/w} dispersion (the maximum tested solid content here) was very low (gray triangles in Figure 48e), close to the detection limit of the rheometer.

When acidic solutions of chitosan were added to the NP_{SPLA} dispersion, gelation occurred instantly (see Figure 48b) and the G' modulus increased significantly (black circles in Figure 48e). The $\tan\delta$ (defined as G''/G') also strongly decreased to reach *ca.* 0.1 and stabilized below 0.1 (see Figure 48f), over several frequency decades, suggesting that the system was mainly elastic and had a gel behavior. To check that the assembly was indeed initiated by the cationic polysaccharide, we ran blank experiments substituting chitosan with acidic water (containing the same amount of acetic acid used to dissolve chitosan) or protonated glucosamine, the main repeat unit of chitosan, in water at the same concentration as for chitosan. Under all these conditions no gelation was observed (results not shown). In acidic conditions, amine moieties of chitosan are protonated, and the polymer provided many positive charges along the backbone, especially since its DA was very low. When mixed together, for appropriate weight ratios, positively charged chains of chitosan and negatively charged NP_{SPLA} self-assembled (see Figure 47), leading to a macroscopic gel.

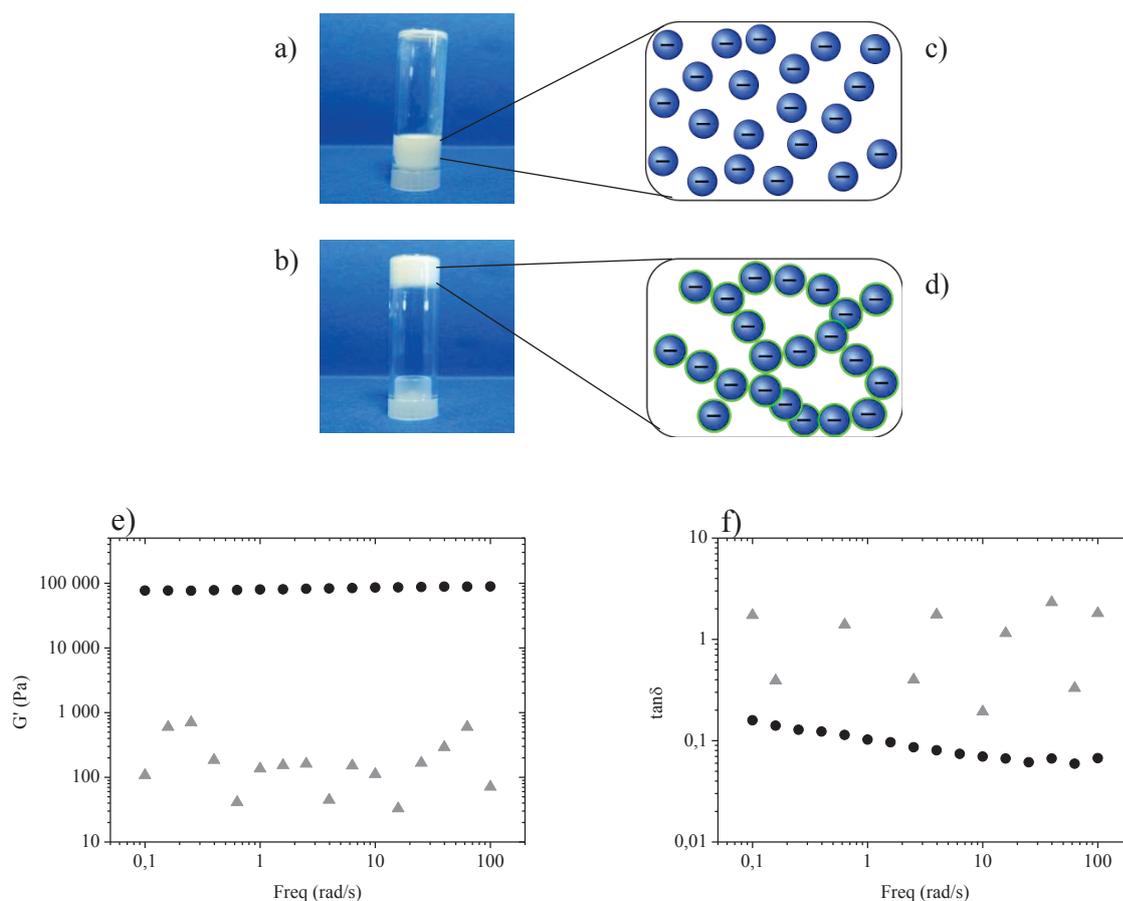


Figure 48. Formation of the $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS400}$ assembly ($\%f_{\text{PLA}} = 18\%$ and $\%f_{\text{CS}} = 0.033\%$). Tube inversion tests for NPs_{PLA} dispersion alone (a) and for colloidal assembly (b), 5 min after inversion. (c) Schematic representation of the NPs_{PLA} free in dispersion alone versus (d) the chitosan-cross-linked NPs_{PLA} assembly. Evolution of (e) G' and (f) $\tan\delta$ during frequency sweep of NPs_{PLA} dispersion alone (gray triangles) and colloidal assembly (black circles). The dispersion alone had a liquidlike behavior ($G' \sim 100$ Pa and $\tan\delta > 1$), while adding chitosan to linked together the nanoparticles and afforded a gel behavior ($G' \sim 100$ kPa, independent of frequency, and $\tan\delta < 0.1$).

It is worth noting that the acid amount in the composite assemblies is very low (see Table S1 in the Supporting Informations), and is used to obtain chitosan acetate. Though CS has been successfully used in various tissue engineering applications [5,57,112], the impact of acidity on cytocompatibility will need to be assessed in further investigations

1.4.2. Shear thinning properties and gel recovery

An important aspect of scaffold development for tissue engineering is the possibility of injecting the material with a subsequent *in situ* gelation, thus easing the implantation protocol.

Our $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS}$ assemblies exhibited shear thinning properties, and shear sweep measurements highlighted this phenomenon. The general behavior of such assemblies under stress is presented in Figure 49: at low strain values, both G' and G'' remained constant with a plateau value for G' called here G'_p , and $\tan\delta < 0.1$ (see Figure 49a), indicating that the assembly behaved like a viscoelastic gel. As γ increased, G' started to decrease while G'' passed through a maximum before decreasing as well. Such a G'' peak was observed in other works and could be related to a highly dissipative process going on in the network microstructure [315–317]. After this G'' peak, both moduli crossed over and then decreased with a power law (with G'' always above G'). This behavior can be described by the disruption of the gel network as the physical cross-links of colloidal assemblies relied on a combination of electrostatic interactions between positive charges along chitosan chains and the negative charges onto the NPs_{PLA} surface, and weak interactions between CS-covered particles (see discussion in section II-1.4.5). The G' and G'' crossover is commonly defined as the critical yield strain, denoted here as γ_c (see Figure 49a), and corresponds to the strain required to turn the gel to a fluid [318,319].

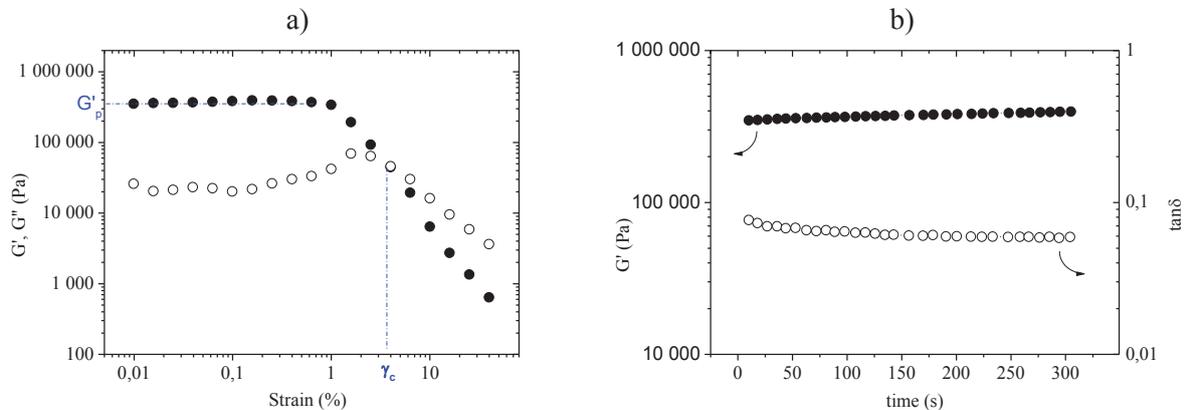


Figure 49. Shear thinning properties of $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS400}$ assemblies. A sample with $\%_{\text{PLA}}^f = 18\%$ and $\%_{\text{CS}}^f = 0,033\%$ formed immediately a gel after mixing of the two components, with $\tan\delta \sim 0.1$ ($G' \sim 10 G''$) at low strain, in (a) strain sweep measurements, and flowed above a critical strain γ_c , defined as the strain when G' and G'' overcross. The gel recovered its cohesiveness immediately after, as seen in time sweep measurements (b).

Once strain sweep tests were done, time sweep tests were immediately launched on the same sample, with fixed frequency and strain of 5 rad/s and 0.2%, respectively, to evaluate

the recovery of mechanical properties. As reported in Figure 49b, the cohesiveness of the $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS}$ assembly was immediately restored since the G' modulus reached from the first seconds the same value as the G'_p , and $\tan\delta$ was below 0.1. These results indicate that the system recovered immediately its cohesiveness and gel behavior, which is a major advantage for *in situ* gelling applications.

1.4.3. Influence of the PLA concentration

The mechanical properties of $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS}$ assemblies were directly impacted by the PLA content. Dynamic strain sweep tests on samples prepared with constant CS400 concentration ($\%f_{\text{CS}} = 0.033\%$) and PLA concentration ($\%f_{\text{PLA}}$) ranging between 10% and 18% w/w were carried out, and results are presented in Figure 50. G'_p increased with $\%f_{\text{PLA}}$, reaching a maximum of about 300 kPa for the highest solid content. This result is not surprising since an increase in particle content led to a decrease in the interparticular distance, thus promoting particle-particle interactions and increasing the elastic behavior [320]. Interestingly, the PLA content also impacted γ_c (see Figure 50b), which decreased with increasing $\%f_{\text{PLA}}$, as observed in a previous study [320] for concentrated silica colloids.

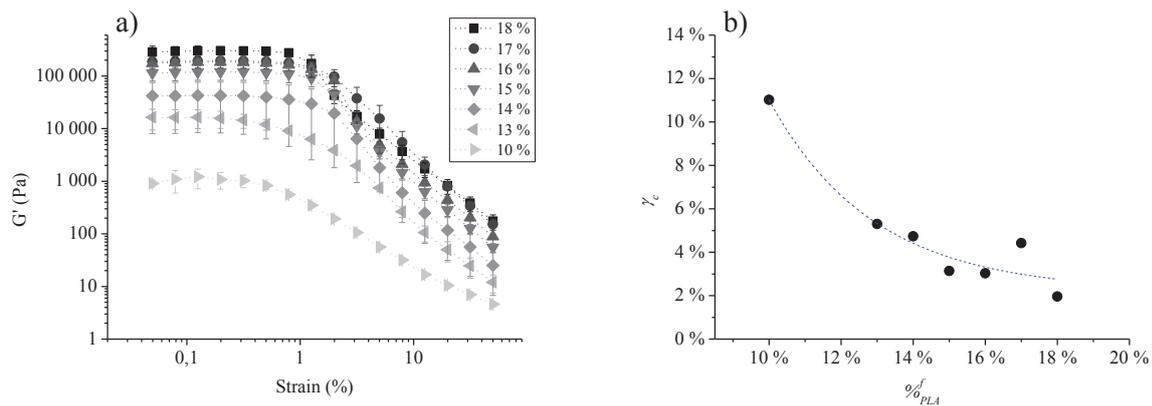


Figure 50. Influence of $\%f_{\text{PLA}}$ on the rheological behavior of $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{NPs}_{\text{C}}$ assemblies. (a) Dynamic strain sweep measurements on different samples with CS400 ($\%f_{\text{CS}}$ kept constant at 0.033%) as a function of $\%f_{\text{PLA}}$; (b) corresponding γ_c plotted versus $\%f_{\text{PLA}}$.

1.4.4. Time and temperature dependence

The rheological behavior of $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS}$ assemblies was investigated with time, and Figure 51 presents the results of strain sweep measurements on $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS400}$ ($\%f_{\text{PLA}} = 17\%$ and $\%f_{\text{CS}} = 0.024\%$) performed at four different times (immediately after mixing, 10 min after, 60 min after, and 24 h after), with each curve being the average of three independent experiments. Each sample was sealed during the storage period to prevent water evaporation. Despite a high standard deviation, the observed trend was a decrease of G'_p with time: the initial value after mixing of 67 kPa reached 22 kPa after 24 h. This can be explained by a reorganization of chitosan chains decreasing the number of weak interactions between CS-covered particles, or by a time-dependent ordering of $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS}$ leading to the formation of larger aggregates thus decreasing the density of cross-links and consequently the mechanical properties of the assemblies.

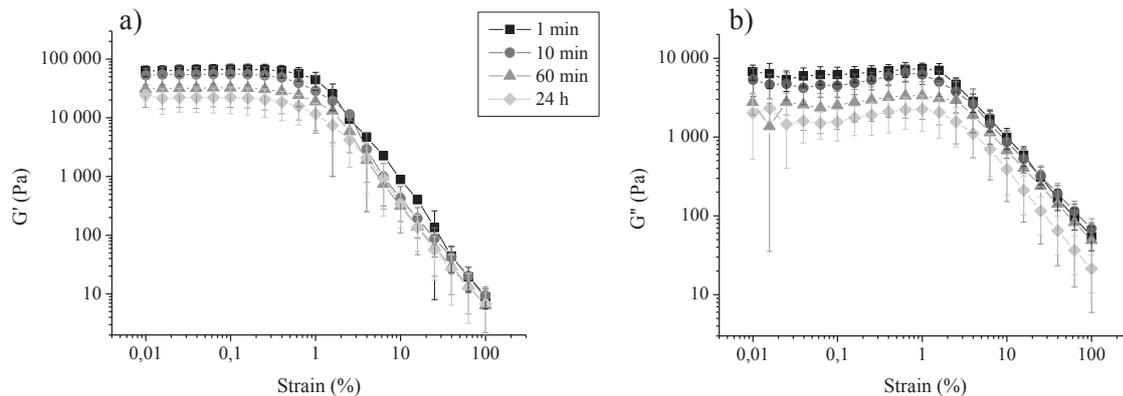


Figure 51. Dynamic strain sweep measurements ((a) G' and (b) G'') as a function of storing time of $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS400}$ assembly ($\%f_{\text{PLA}} = 17\%$; $\%f_{\text{CS}} = 0.024\%$). For readability reasons, some G' error bars of assemblies 1 and 10 min at high strains have been hidden.

To investigate the possible influence of temperature on the behavior $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS}$ assemblies, we prepared at room temperature 3×3 samples (with $\%f_{\text{CS}} = 0.024\%$ and $\%f_{\text{PLA}} = 17\%$), which were stored for 24h at 4, 22, and 37°C. Each sample was sealed to prevent water evaporation. After this treatment, the rheological behavior of the gels was examined by strain sweep measurements. The plateau modulus increased with decreasing temperature from 22°C ($G'_p = 10 \pm 1.5$ kPa) to 4°C ($G'_p = 53 \pm 20$ kPa). It is known that a temperature decrease

favors the formation of hydrogen bonds [321,322]. Hence, the increased cohesiveness of colloidal assemblies on cooling can be attributed to the formation of interchain hydrogen bonds, known to play a major role in CS autoassociation [75]. After 24h at 37°C, the NPs_{PLA}/CS assemblies had shrunk and appeared as hard and brittle solids, as a high amount of water had been expelled. Because of this fragile behavior, we were not able to perform the rheological measurements. Such a behavior was unexpected at this relatively low temperature. In fact, the low molecular weight of the PLA (50 kg/mol) could be responsible for an increased sensitivity against temperature, as previously described by Omelczuk and McGinity [323]. The authors observed a decrease in T_g from 56 to 44 °C when the PLA molecular weight was decreased from 137 to 41 kg/mol. Moreover, in the presence of water, surface PLA chains may undergo plasticization, leading to an additional decrease of T_g value. Craig *et al.* indeed demonstrated that T_g of PLA could decrease from 52 to 37°C by increasing the water content from 0 to *ca.* 3.5% [324]. A combination of these two phenomena could thereby lead the NPs_{PLA} to sinter irreversibly, leading to an expulsion of water and the formation of a fragile monoblock of PLA.

1.4.5. Influence of CS/PLA weight ratio (R_w)

NPs_{PLA}/CS assemblies exhibiting various degrees of cohesiveness were prepared by mixing NPs_{PLA} and chitosan at different weight ratios, R_w defined as the dry CS mass (milligrams) over the PLA mass (grams). Strain sweep measurements were conducted on these samples, and results of the plateau modulus G'_p plotted versus R_w are displayed in Figure 52. As seen before, for NPs_{PLA} dispersion only (*i.e.* $R_w = 0$, Figure 48), the G' value was very low (close to 100 Pa) and $\tan\delta$ was close to 1, corresponding to a liquidlike behavior. Increasing the chitosan content in the mixtures led to more cohesive gels, as shown by an increase in G'_p values. When R_w increased, the elastic modulus reached a maximum of *ca.* 300 kPa for a R_w value of 1.8 mg/g, a result in accordance with the expected increase in the density of cross-links resulting from the addition of more polycationic chains to the negatively charged nanoparticles.

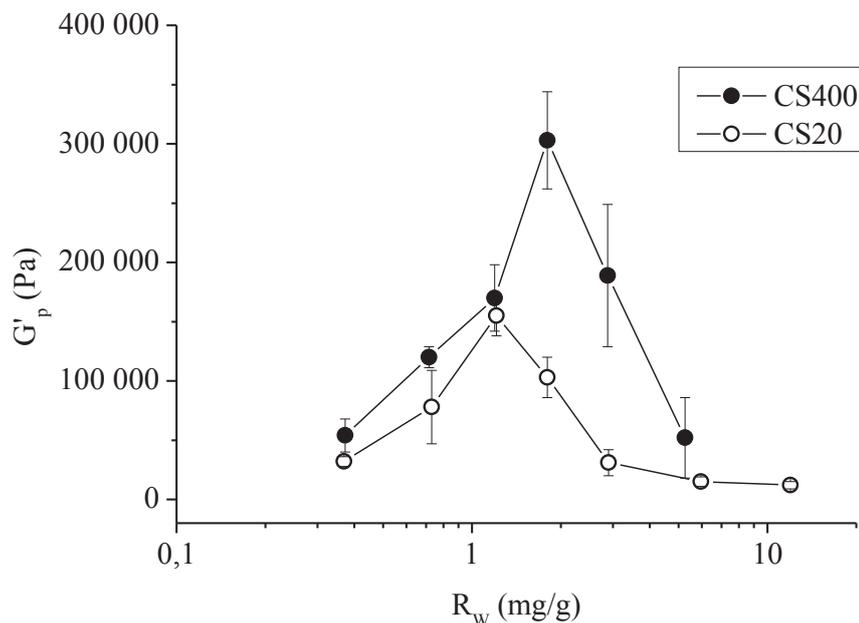


Figure 52. Evolution of the plateau modulus G'_p versus mass ratio R_w . Plateau moduli of $\text{NP}_{\text{SPLA}}/\text{CS}$ assembly based on CS400 (filled circles) and CS20 (open circles) as a function of R_w . $\% \phi_{\text{PLA}} = 18\%$; $\% \phi_{\text{CS}}$ varied between 0.0066 and 0.1%, for $\text{NP}_{\text{SPLA}}/\text{CS400}$ assemblies, and between 0.0066 and 0.2% for $\text{NP}_{\text{SPLA}}/\text{CS20}$ assemblies.

When R_w was increased above 1.8 mg/g (for $\text{NP}_{\text{SPLA}}/\text{CS400}$), the cohesiveness of the colloidal assemblies decreased sharply as shown by the drastic reduction in G'_p (but $\tan\delta$ remained lower than 0.1). In fact, an optimum chitosan to NP_{SPLA} mass ratio of $R_w = 1.8$ mg/g was observed, at which the network cohesiveness was maximal. This result was unexpected, as we had anticipated that as more polycationic chains were added, the assemblies became more cross-linked, on the basis that the gelation resulted from electrostatic interactions between the negatively charged colloid and the positively charged polysaccharide. Hence, we must reconsider the mode of interaction between PLA particles and chitosan responsible for the formation of an elastic gel. In a previous investigation, we showed that the adsorption of chitosan onto PLA nanoparticles was spontaneous due to electrostatic interactions between both partners [325]. Therefore, we can assume that, on adding chitosan to the concentrated PLA particle dispersion, the cationic polyelectrolyte first adsorbed at the particle interface and then the chitosane-covered particles interacted with one another to yield the gel via hydrogen bonding. The two following facts could support this hypothesis: (i) first, the optimum chitosan to PLA mass ratio was obtained at $R_w = 1.8$ mg/g

(equivalent to an amount of 0.08 mg of chitosane/m² of NP_{SPLA} surface, see calculation in Table S1, Supporting Information), which is consistent with the maximum covering capacity determined in the previous work cited above: 0.11 mg/m² for a similar system (369 kg/mol chitosan, DA 5.2%, and NP_{SPLA} of average diameter around 250 nm); (ii) second, the fact that on cooling the elasticity increased, as discussed in section II-1.3.4, suggesting the involvement of hydrogen bonds in the gel formation process. The decrease in modulus as R_w increased beyond the optimum value can be understood as a “plasticization” effect of unbound chitosan chains, favoring the movement of chitosan-covered PLA particles, hence the decrease in cohesiveness.

1.4.6. Influence of chitosan molecular weight

Nitrous depolymerization provided a low molecular weight chitosan sample, with a \overline{M}_w of 20 kg/mol (CS20), determined by SEC. Mixing CS20 with NP_{SPLA} dispersion also yielded hydrogels showing a shear thinning behavior. We studied the effect of R_w on NP_{SPLA}/CS20 assemblies with strain sweep test while keeping $\%f_{PLA}$ constant (18%). As shown in Figure 52 (open circles), CS20-based gels behaved similarly to those obtained with CS400, reaching a G'_p maximum for an optimal R_w . However, G'_p values for the NP_{SPLA}/CS20 assemblies were always lower than those for the NP_{SPLA}/CS400 assemblies, with a maximum at 150 kPa (300 kPa for NP_{SPLA}/CS400), meaning that the 20 kg/mol chitosan led to assemblies of lower cohesiveness. Interestingly, the maximum G'_p was reached at R_w close to 1 mg/g, lower than for CS400, suggesting that less chitosan was necessary to achieve the surface saturation. This is in complete agreement with Messai *et al.*, who showed that reducing the molecular weight of chitosan led to a decrease of the adsorbed amount [325], under a rod-like conformation [326]. An increase in molar mass of chitosan resulted in a increase in chain flexibility [327], and as described by Guo *et al.*, some segments of the polymer chains adsorbed on the particle surface (“trains”) and others formed loops extended toward the continuous phase [328]. These loops, interacting with one another, could be responsible for the increase in mechanical properties observed for CS400, but as discussed below, they were not large enough to cross-link more than two particles.

1.4.7. Influence of the degree of acetylation

The influence of the molar fraction of acetylated moieties in CS copolymer (DA) was investigated, with chitosan samples CS450DA55 and CS450DA30 obtained from homogeneous reacetylation of CS400. Assemblies $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS450DA55}$ and $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS450DA30}$ were prepared at $\%f_{\text{PLA}} = 18\%$ and $\%f_{\text{CS}} = 0.033\%$, similar conditions as for CS400 at optimal R_w . Strain sweep tests were carried out to characterize the stiffness and compliance of the assemblies as a function of DA. Results in Figure 53 show that G'_p values for the three different assemblies were similar, taking into account the standard deviation. Therefore, DA, or in other words the charge density of chitosan, had no influence on the mechanical properties of $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS}$ assemblies. This is in total accordance with our proposed mode of interactions favoring hydrogen bonding rather than pure electrostatic interactions. Nevertheless, to ensure that the presence of charges on the linking polymer played a major role in the assembly process, we substituted chitosan by a neutral methyl cellulose, MeCell ($\overline{M}_w = 350$ kg/mol determined by SEC), at an identical final concentration (0.033%). Results plotted in Figure 53 showed that the $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{MeCell}$ mixture displayed a cohesiveness far lower ($G'_p \sim 16$ kPa) than NPs_{PLA} with chitosan. Experimentally, this mixture was easily flowing when dropped on a surface, contrary to the $\text{NPs}_{\text{PLA}}/\text{CS}$ assembly. The observed lack of cohesion with MeCell confirms the hypothesis that the assembly process relied partially on electrostatic attractive interactions between chitosan positive charges and negative charges on NPs_{PLA} surfaces. However, the absence of impact of DA on the final cohesiveness of the assemblies and the fact that the maximal elasticity was found for a weight ratio corresponding to the maximal covering of the PLA particles by chitosan, support the major involvement of weak interactions, H bonds, in the mechanical properties of the assemblies.

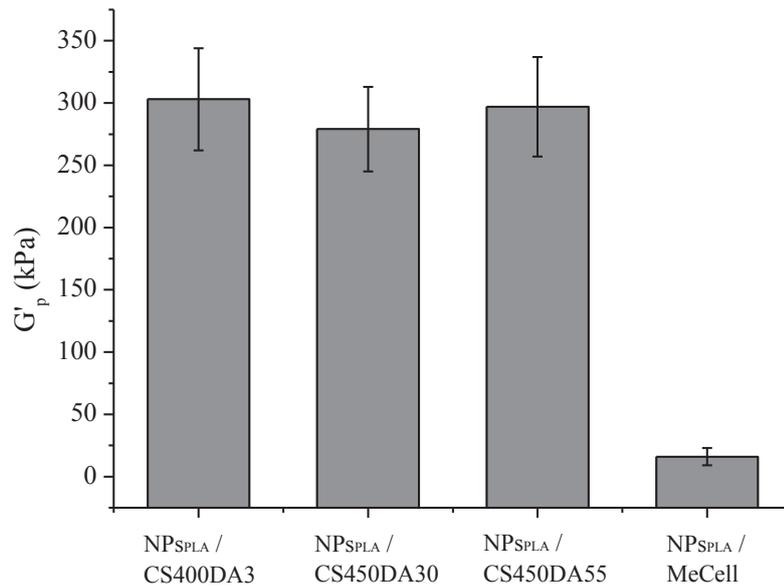


Figure 53. Influence of DA on G'_p of NPs_{SPLA}/CS assemblies (R_w of all samples is equal to 0.18%). Results are the average of three independent measurements.

1.4.8. Morphological study of NPs_{SPLA}/CS complexes

SAXS measurements were used to analyze the surface of the NPs_{SPLA} particles and confirm possible chitosan adsorption onto their surface. Four samples were analyzed (see Table 15): NPs_{SPLA} mixed with chitosan CS400 (entries 2 and 4) or not (entries 1 and 3), at high concentrations (entries 1 and 2, $\%f_{PLA} = 18\%$ and $\%f_{CS} = 0.032\%$), or at 20-fold dilution (entries 3 and 4). Figure 54a shows the scattered intensities as a function of the scattering vector $q = 4\pi \sin(\theta) / \lambda$ where 2θ is the scattering angle and λ is the incident wavelength (0.7749 Å). The size of the PLA particles was large in comparison with the assessable q -range, and the Guinier behavior [329] could not be observed. All samples presented a similar scattering pattern with an $I = I_0 \cdot q^{-\alpha}$ power law in the q -range between $8 \cdot 10^{-3}$ and $6 \cdot 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ with an α exponent close to 4 (Porod's law). This scattering behavior is thus characteristic of a sharp interface between PLA particles and the continuous phase. The "polyelectrolyte peak" [330] visible in pure chitosan solution could not be evidenced in the presence of the PLA particles.

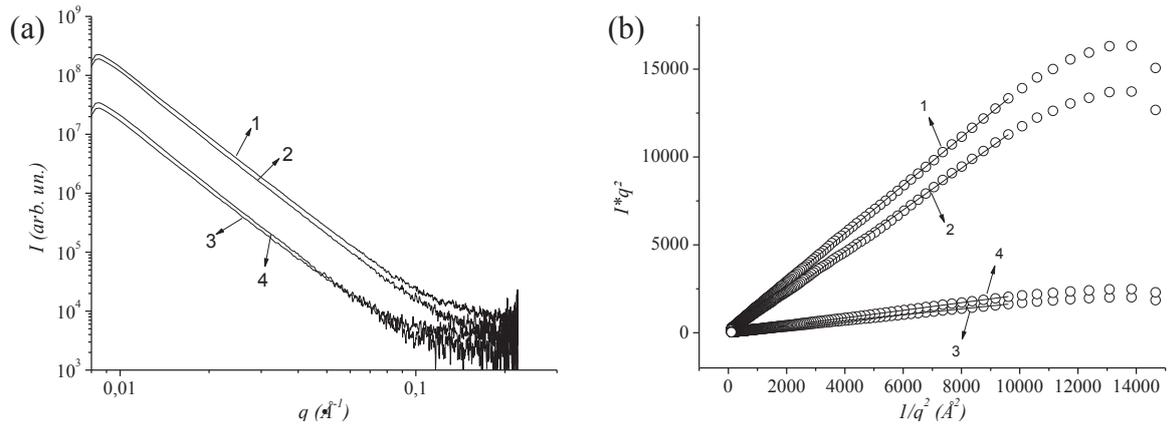


Figure 54. (a) SAXS relative intensities of different samples of NPs_{PLA} with or without chitosane. (b) Corresponding I^*q^2 reported as a function of $1/q^2$. Curves numbered 1–4 correspond to entries of Table 15.

Nevertheless, we could detect significant differences in the α exponent of the samples prepared with and without chitosan, with the latter presenting α values slightly lower (both 3.96) than the former (3.99 and 4.06). Such a slight difference probably reveals the low contrast between a highly hydrated chitosan corona and the aqueous medium, compared to the contrast of NPs_{PLA} . However, the difference corresponded to a density-gradient profile at the particle interface due to the presence of chitosan. Assuming the chitosan density varies linearly beyond the particle surface, we could estimate the thickness l_i of the adsorbed layer (if l_i is small compared to the particle size) using [331]:

$$I(q) = C/q^4 - B/q^2 \quad (\text{III.1})$$

where C is Porod's constant and B is related to the interface thickness.

Hence the I^*q^2 vs $1/q^2$ plot (see Figure 54b) was used to deduce B and C values, respectively, from the vertical axis intercept and the slope of the fitting line, determined between $(1/q^2)$ values of 9600 and 2650 \AA^2 , for which the standard deviation was minimized. l_i is deduced from the B and C values, according to :

$$l_i = \sqrt{\frac{12\pi B}{C}} \quad (\text{III.2})$$

Table 15.
Analyses of SAXS data^a.

Entry	Sample	α	B	C	l_i (Å)
1	NPs _{SPLA}	3,96±0,005	-184±13	1,367±0,002	/
2	NPs _{SPLA} + CS400	4,06±0,01	141±35	1,188±0,007	67±17
3	NPs _{SPLA} dil.	3,96±0,006	-190±2	0,1675±0,0004	/
4	NPs _{SPLA} + CS400 dil.	3,99±0,01	17±4	0,216±0,0007	54±13

^a For entry 1, %_{PLA} = 18% ; for entry 2, %_{PLA} = 18% and %_{CS} = 0.032% ; samples of entries 3 and 4 are 20-fold dilutions of 1 and 2, respectively. α was obtained from the slope of curves in Figure 54a ; B and C are parameters obtained from the linear regression in Figure 54b; l_i was obtained by means of (III.2). Results are given as the average ± standard deviation.

NPs_{SPLA} samples without chitosan, diluted or not (entries 1 and 3 in Table 15), presented the same α exponent and similar negative B values, which is consistent with a sharp particle interface with no transition layer; accordingly, no l_i value could be calculated. On the contrary, NPs_{SPLA} samples with chitosan (entries 2 and 4 in Table 15) featured a positive B value, hence allowing a calculation of l_i . Results show a diffuse organized layer of chitosan at the interface, whose width ranged from about 50 to 70 Å, hence confirming the adsorption of CS on NPs_{SPLA} surfaces. Interestingly, these values are low compared to the R_g of chitosan (in the range of 50 nm [54]). This supports the "train" model of adsorption previously mentioned, with occasionally the formation of a few "loops" on the surface of the particles, too small to cross-link several particles together, but large enough to play the role of anchorage, leading to the observed increase in G'_p for NPs_{SPLA}/CS400.

1.5. Conclusion

We achieved the assembly of PLA nanoparticles with chitosan, leading to a new material capable of self-gelling with shear thinning properties, based on completely biocompatible components. Upon mixing the NPs_{SPLA} dispersion and the chitosan solution, a network formed instantaneously, with positively charged chitosan chains interacting with the negative surface of NPs_{SPLA}. Our work established that electrostatic interactions between the particles and the polymer were necessary for the gelation to occur, but the cohesiveness of the gel was ensured by hydrogen bonding of the chitosan shell on the particles. Electrostatic attractive interactions

between the colloid and the polysaccharide were involved to surface functionalize the PLA particles with an outer shell of chitosan that could cross-link via low energy interactions to achieve gelation. SAXS measurements indicated that chitosan adsorbed onto the particle surface, forming a highly hydrated layer of a few nanometers in length. Owing to this combination of low energy cross-links, the system featured shear thinning properties, essential for injections in the context of a minimally invasive therapy. The gel reformed and immediately recovered its cohesiveness, potentially favorable for reducing the delay of surgery. Mechanical properties could be tuned by varying the relative amounts of each constituent, to match the desired cohesiveness in function of the tissue to be treated. However, stability problems of PLA nanoparticles appeared, since the low molecular weight polymer used in this study proved to be very sensitive to temperature. This issue will certainly be overcome with the use of a higher molecular weight, which features an improved Tg.

This study allowed us to understand mechanisms governing the assembly of PLA particles with chitosan. To develop further this material, we will consider the stability of such systems, in cell culture conditions, which is the next step of this work. We can also plan to encapsulate or surface adsorb growth factors or other bioactive agent on the nanoparticles [24,55], to favor cell amplification or differentiation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by a grant from the French Ministry of Research and Technologies. The authors are grateful to Dr. F. Gaudin and Dr. B. Verrier (IBCP-Lyon) for PLA supplies and technical support, and Pr. R. Fulchiron and P. Cassagnau for valuable discussions concerning the rheological aspects of this work.

2. Préparation des échantillons et contexte expérimental

L'objet des paragraphes suivants est de présenter certains aspects de notre étude n'apparaissant pas dans l'article, notamment les difficultés rencontrées pour obtenir une dispersion de nanoparticules de PLA concentrées, et la mise au point d'un protocole le plus reproductible possible de synthèse et de caractérisation des gels composites.

2.1. Préparation des nanoparticules de poly(acide lactique)

Les nanoparticules de PLA peuvent être préparées par différentes voies, notamment par méthode d'émulsion-évaporation, d'émulsion-diffusion, de "salting-out", ou bien de nano-précipitation, dont les principes sont bien exposés dans l'article de Quintanar-Guerrero *et coll.* [334]. Dans le cas de mes travaux, c'est la technique de nano-précipitation décrite par Fessi *et coll.* [314] qui a été retenue. Il s'agit d'une technique simple et rapide pour obtenir des nanoparticules de PLA chargées en surface, avec des tailles et distributions en taille bien maîtrisées, et en l'absence de tensioactif.

Cette technique repose sur le principe suivant : le polymère est solubilisé dans un solvant organique miscible avec l'eau (l'acétone dans notre étude). Cette solution est ensuite ajoutée goutte à goutte dans une solution hydro-alcoolique (mélange eau et éthanol dans notre étude). L'acétone en diffusant dans la phase hydro-alcoolique va entraîner la précipitation du polymère, qui est insoluble dans la phase continue, sous forme de nanoparticules. L'acétone et l'alcool sont ensuite éliminés par évaporation. On obtient ainsi des nanoparticules de PLA avec un diamètre moyen d'environ 180-200 nm, une distribution de taille étroite ($PDI < 0,05$ en QELS), et un taux de solide généralement compris entre 2 et 5 % w/w.

Or, comme cela a déjà été discuté dans la publication, le taux de solide est un paramètre important pour obtenir des assemblages avec des modules élastiques élevés. Il a donc été nécessaire d'obtenir des nanoparticules de PLA à des concentrations bien plus élevées que les concentrations habituelles. L'objectif initial était de se placer dans des conditions similaires à celles de la littérature pour la formation de gels colloïdaux [226,229,230], à savoir des concentrations de l'ordre de 20 %w/w. Or il est rapidement apparu que la dispersion de NPs_{PLA} n'était pas stable à de tels taux de solide.

La concentration limite d'une dispersion de NPs_{PLA} que nous avons pu obtenir se situe à environ 19 % w/w (considérant la densité du PLA égale à 1,27, la fraction volumique correspondante est de 15 %). Cette limite n'est pas précise. En effet, elle a pu varier suivant le procédé de concentration utilisé. Au-dessous de cette concentration critique, la dispersion présentait un état parfaitement fluide ; au-delà, nous avons observé la formation irréversible d'agrégats macroscopiques, pouvant aller jusqu'à la gélification entière de la dispersion pour les concentrations les plus élevées. Pourtant, dans le cas de sphères dures, la fraction volumique à laquelle sont habituellement déstabilisés les colloïdes est observée à des valeurs plus élevées : 50 % pour des nanoparticules de silice de 200 nm dans l'éthylène glycol [335], 30 % pour des nanoparticules de silice de 15 nm (Ludox HS40) [320], ou encore 40 % pour des nanoparticules de PMMA de 300 nm dans un mélange décaline/disulfure de carbone [336]. Faute de temps, ce phénomène de déstabilisation des NPs_{PLA} n'a pas été approfondi, mais plusieurs facteurs pourraient favoriser leur agrégation : *i*) une densité de charge en surface plus faible que dans le cas de particules de silice par exemple, pourrait autoriser le contact entre NPs_{PLA} et l'établissement de liaisons de plus faibles énergies, comme des effets hydrophobes; *ii*) les conditions expérimentales lors de l'élimination de l'eau, notamment de pression et de température, pourraient être trop rudes pour la stabilité des nanoparticules.

Pour concentrer ces particules, le type de procédé est important. Les méthodes de centrifugation et de filtration sont trop compliquées à mettre en œuvre, notamment en raison des phénomènes d'instabilité à forte concentration. La lyophilisation suivie d'une redispersion ne donne pas de bons résultats, les nanoparticules formant des agrégats impossibles à bien redisperser (à moins d'employer des cryo-protecteurs, mais qui auraient ensuite été difficiles à éliminer). Nous avons donc réalisé la concentration de ces particules en évaporant l'eau (via l'évaporateur rotatif). Il faut cependant veiller à plusieurs paramètres :

- Il est impossible de trop chauffer car, comme cela a été soulevé dans notre publication, les nanoparticules sont très sensibles à la température. La température ne doit donc pas dépasser 30 °C, sous peine de dégrader complètement les propriétés colloïdales de la dispersion.
- Il est également important d'utiliser une pompe à membrane avec un contrôleur de pression, qui permet de descendre en pression de manière progressive et douce. Il est en effet crucial de ne pas diminuer trop brusquement la pression, la dispersion

étant très sensible au bullage, phénomène d'autant plus sensible que le taux de solide augmente. Pour exemple, nos essais avec une pompe à palettes à deux étages (plus puissante et sans contrôle sur la pression) se sont tous soldés par un bullage intensif, des pertes très importantes, et un très mauvais contrôle du taux de solide final.

Malgré ces précautions, il est assez difficile d'atteindre avec exactitude les taux de solide souhaités, notamment parce qu'une partie du PLA a tendance à se déposer sur les parois du ballon. Toute cette quantité de particules, ne pouvant être redispersée, est perdue. Le taux de solide est donc systématiquement impacté (généralement de 5 à 10 % inférieur aux prévisions), et ce phénomène est difficile à maîtriser. Nous rappelons que le PLA et l'équipement nécessaire pour la synthèse des NPs_{PLA} nous a été fourni généreusement par l'équipe de Bernard Verrier de l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP).

2.2. Mise en place d'un protocole de synthèse des gels en vue de leur caractérisation rhéologique

Nous avons cherché à mettre au point un protocole qui puisse permettre de préparer le mélange (NPs_{PLA} + CS) et de le transférer sur le rhéomètre avec la meilleure reproductibilité possible.

Nous avons tout d'abord réalisé des essais simples, en mélangeant les deux dispersions dans un pilulier. Le problème qui se pose alors est l'étape de transfert, du contenant dans lequel a été préparé le mélange, à l'appareil de mesure (en l'occurrence le rhéomètre). Cette étape est cruciale puisqu'il faut qu'elle soit reproductible quel que soit le mélange. Or, selon les échantillons, les matériaux montraient des comportements très variables, allant du liquide peu visqueux, au gel compact (voir Figure 55).

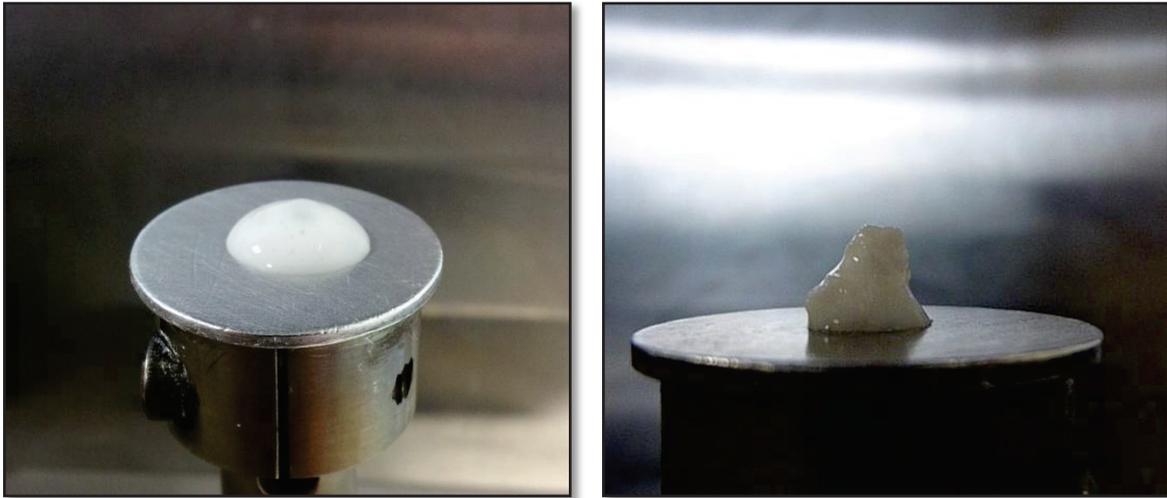


Figure 55. Exemple de mélanges $\text{NPs}_{\text{PLA}} + \text{NPs}_{\text{C}}$ donnant lieu à des matériaux aux aspects très différents. Dans le cas de gauche, on a un $R_w^{\text{gel}} = 100\%$ alors qu'à droite, on est proche du R_w^{gel} optimum. Dans le premier cas, l'échantillon flue lentement sous son poids, alors que dans le deuxième, l'échantillon forme un gel qui a un bon maintien et une réponse de gel élastique.

Nous avons donc élaboré un protocole « artisanal » schématisé en Figure 56 :

- Les deux composants sont pesés (dispersion de NPs_{PLA} puis solution de chitosane) dans une seringue modifiée, piston retiré. La filière de sortie est tronquée pour obtenir une ouverture d'environ 3 mm, qui est bouchée pendant la pesée et le mélange.
- La seringue contenant le mélange est agitée sur vortex mécanique pendant 3s. Le mélange gélifie instantanément.
- Le bouchon de l'ouverture est retiré, et le piston remplacé. Le gel est ainsi prêt à être transféré sur le rhéomètre en poussant délicatement le piston.

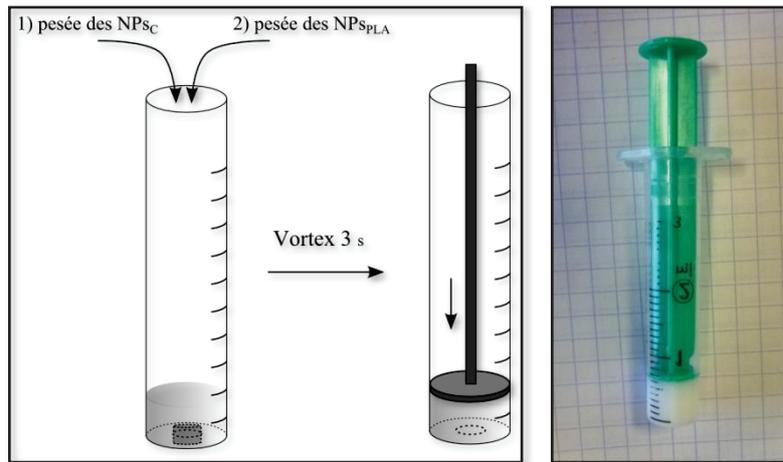


Figure 56. A gauche : préparation des gels composites avant transfert sur le rhéomètre. Les deux composants sont pesés tour à tour dans la seringue, puis vortexés. On ajoute ensuite le piston pour pouvoir déposer le mélange sur le rhéomètre. A droite, une photo d'un mélange prêt à être transféré sur le rhéomètre.

Cette technique a l'avantage de limiter au maximum les sollicitations sur le gel une fois celui-ci formé. La filière de sortie a été tronquée pour limiter les phénomènes de cisaillement lors de l'éjection du gel. Cette technique permet également de supprimer presque entièrement les pertes, et donc de ne peser que la quantité nécessaire à l'analyse rhéologique. Ce dernier point n'est pas négligeable étant donné le peu de matière dont nous disposons suite aux difficultés rencontrées pour obtenir des NPs_{PLA} concentrées. L'inconvénient majeur de ce protocole est qu'il est relativement long à mettre en œuvre et doit être répété pour chaque gel, ce qui rend les expériences très chronophages.

III - FORMATION DE « GELS COLLOÏDAUX » A BASE DE NANOPARTICULES DE POLY(ACIDE LACTIQUE) ET DE NANOGELS DE CHITOSANE.

1. Introduction

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons étudié la formation de ce que l'on a appelé des « gels composites », qui reposent sur les interactions entre des chaînes de chitosane en solution et des nanoparticules de PLA. Nous avons vu que les interactions entre ces deux composants conduisaient à des matériaux présentant des propriétés rhéologiques intéressantes. Leur assemblage et leur cohésion reposent sur la combinaison d'interactions électrostatiques, puisque les espèces sont de charges opposées, d'interactions de type liaisons hydrogène et d'effets hydrophobes.

Dans cette seconde partie, l'étude de la formation de ce qu'on appelle les « gels colloïdaux », qui repose sur l'association de particules de charges opposés, sera présentée.

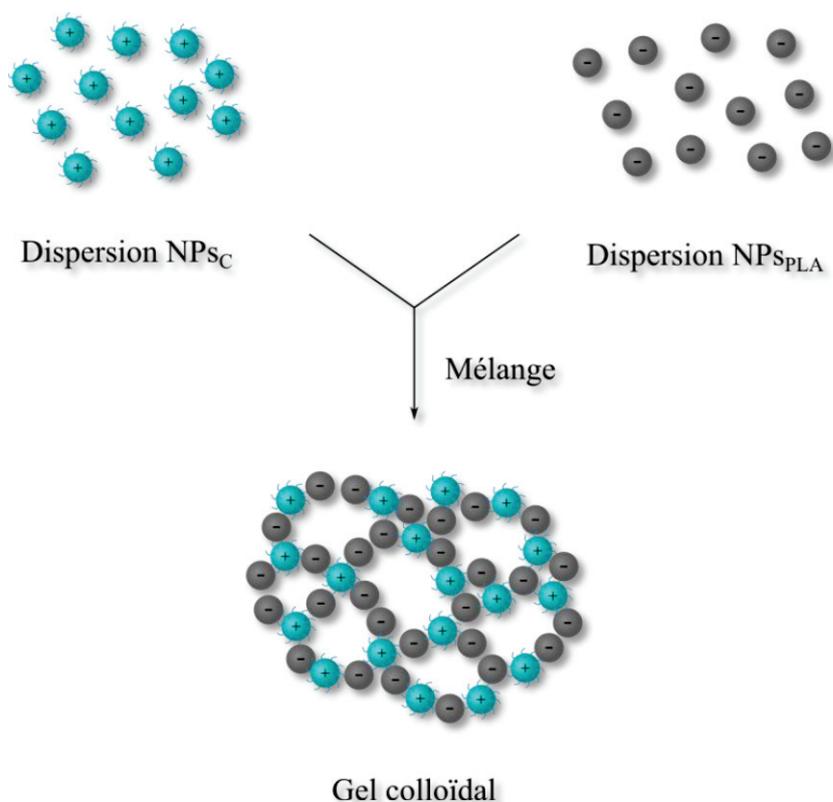


Figure 57. Principe de formation d'un gel colloïdal à base de NPs_C (sphères bleues) et de NPs_{PLA} (sphères grises) de charges opposées.

Nous présenterons donc dans cette dernière partie les récents résultats sur l'association des nanogels de chitosane, présentant une charge de surface positive, avec des nanoparticules de PLA, qui, elles, présentent une charge négative. Le mélange de ces deux composants conduit comme dans la précédente partie, à la formation de matériaux avec des propriétés rhéologiques intéressantes. Dans un premier temps les propriétés rhéologiques de ces matériaux et l'influence de divers facteurs sur ces propriétés seront exposés. Nous discuterons les similitudes observées entre ce système et celui des gels composites. Enfin, la formation de gels colloïdaux obtenus avec des nanogels de chitosane réticulés par la génipine sera abordée. Les détails expérimentaux sont présentés en fin de discussion.

2. Résultats et discussions

2.1. Comportement général des gels colloïdaux

Nous avons fait le choix de travailler dans cette partie de notre étude avec des NP_{SC} présentant une C_{gel} de 5 % (on rappelle que C_{gel} est la concentration en chitosane dans les nanogels), ceci pour favoriser la cohésion des nanogels. Nous discuterons plus tard de l'influence de cette concentration sur les propriétés des assemblages (*cf.* paragraphe III-2.4).

Les gels colloïdaux ont été obtenus en mélangeant des NP_{SPLA} et des NP_{SC} (conditions expérimentales décrites en paragraphe III-3) suivant un protocole identique à celui utilisé pour les gels composites. De la même manière que pour ces derniers (*cf.* paragraphe II-1), l'assemblage entre les nanogels de chitosane et les nanoparticules de PLA est immédiat. Ainsi, lorsque la seringue est agitée sur vortex mécanique, le mélange se fige instantanément. Les analyses rhéologiques ont confirmé ces observations : pour la dispersion de NP_{SPLA} seules, la Figure 58a montre un comportement de liquide viscoélastique, sans plateau newtonien. A l'inverse, une fois les deux dispersions mélangées, on observe un comportement typique de gel fragile, que nous avons déjà observé avec les gels composites. Aux faibles déformations, G' présente un plateau de valeur G'_p (voir Figure 58b), au cours duquel $\tan\delta \ll 0.1$. Au fur et à mesure que γ augmente, G' commence à décroître, tandis que G'' augmente dans un premier temps et atteint un maximum, pour ensuite diminuer à son tour. Les deux modules diminuent alors selon une loi puissance de type γ^n , G' de façon plus abrupte que G'' . Ainsi, G'' croise rapidement G' , pour une déformation nommée γ_c , pour laquelle le matériau devient majoritairement visqueux. Ce point critique correspond à la rupture des nœuds de réticulation à grande échelle et une déstructuration complète du réseau, permettant ainsi une dissipation majoritairement visqueuse de la contrainte.

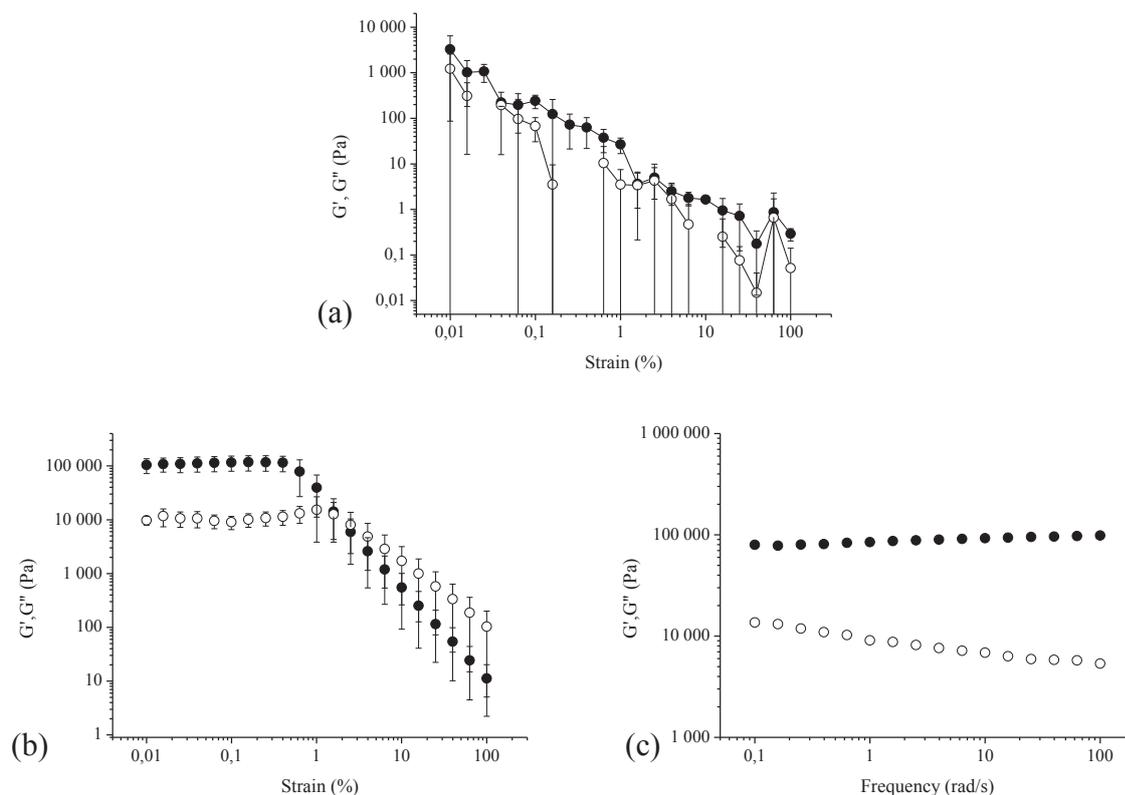


Figure 58. Différence de comportement entre une dispersion de NPs_{PLA} seule (a) et un gel colloïdal NPs_C/NPs_{PLA} (b et c). a) Balayage en déformation 0.01 % à 100 %, avec une fréquence imposée à 5 rad/s d'une dispersion de NPs_{PLA} concentrées à 16.6 %.; b) balayage en déformation de 0.01 % à 100 %, avec la fréquence imposée à 5 rad/s et c) balayage en fréquence d'un gel colloïdal avec un $\phi_{PLA} = 14.7$ %, et $\phi_{CS} = 0.5$ mg/mL, de 100 rad/s à 0.1 rad/s, avec déformation imposée à 0.2 %. Les cercles pleins et vides représentent respectivement G' et G'' .

Le pic de G'' a déjà été observé par d'autres équipes pour des systèmes différents : dans des colloïdes à l'état de surfusion [337], des colloïdes concentrés [320,338], des gels colloïdaux [339] ou des émulsions concentrées [340]. L'origine de ce pic n'est pas encore bien expliquée, et plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le phénomène : *i)* selon Koumakis et coll., ce maximum d'énergie dissipative correspondrait à la rupture des « cages » dans lesquelles sont séquestrées chaque particule [317]; *ii)* Yziquel et coll. proposent comme origine la rupture d'agrégats en de plus petits clusters, ayant un pouvoir dissipatif plus important [341]; *iii)* d'autres équipes évoquent des réarrangements internes de clusters instables [342] ou par glissement de clusters via des zones fragiles [338].

Dans le domaine viscoélastique linéaire, nous observons sur les balayages en fréquence que $\tan\delta$ est inférieur ou égal à 0.1 ($G' > 10G''$) sur une grande partie de la gamme de

fréquences étudiée (voir Figure 58c). Néanmoins, on observe une légère augmentation de $\tan\delta$ lorsque la fréquence diminue, comme déjà décrit pour d'autres systèmes colloïdaux [338,343]. Elle pourrait être attribuée à des relaxations structurales, comme des réarrangements de particules ou de clusters instables, qui seraient de plus en plus favorisées (temps de relaxation suffisamment longs). Le fait que l'on se situe à une déformation de 0.2 %, c'est-à-dire à la limite du régime linéaire, pourrait favoriser ce genre de phénomène de déstructurations locales.

2.2. Influence de la force ionique

La force ionique est un paramètre important pour ces systèmes basés sur des interactions électrostatiques. La présence de sels peut en effet perturber ces interactions en masquant les charges les unes aux autres et ainsi affaiblir les effets attractifs ou répulsifs. Les NPs_C sont dispersées dans un tampon acétate et nous avons vu précédemment qu'elles n'étaient pas sensibles à la force ionique du milieu. Les NPs_{PLA} sont quant à elles en suspension dans de l'eau distillée.

Tableau 16. Caractéristiques des nanoparticules utilisées en fonction de la force ionique du tampon acétate.

		25 mM	150 mM
NPs_C -1 120606	\overline{d}_{QELS}	248 ± 2 nm	250 ± 3 nm
	Pdi	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.04
	ζ	+ 44 ± 0.8 mV	+ 23 ± 1.7 mV
NPs_{PLA} 120625	\overline{d}_{QELS}	229 ± 4 nm	227 ± 3 nm
	Pdi	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01
	ζ	- 47 ± 1 mV	- 44 ± 0.8 mV

Les analyses de QELS ont été réalisées dans les conditions suivantes : les NPs_C , initialement dispersées dans le tampon 25 ou 150 mM ont ensuite été diluées dans de l'eau stérile. Dans le cas des NPs_{PLA} , initialement dispersées dans de l'eau stérile, il a été ajouté la même quantité de tampon (25 ou 150 mM selon le cas) que lors de la formation d'un gel colloïdal dans les conditions de R_w optimum (voir discussion en paragraphe III-2.4), soit 9 mg de tampon pour 191 mg de dispersion à 15,4 %_{w/w}.

Nous avons donc voulu connaître l'influence de la force ionique du tampon acétate sur la formation et sur les propriétés mécaniques des gels colloïdaux. Pour cela, nous avons préparé 2 échantillons de NPs_C (avec $C_{gel} = 5\%$), tous deux issus de la même synthèse (NPs_C -1), que nous avons dispersés dans 2 tampons acétates de force ionique différente : 25 mM et 150 mM. Les propriétés colloïdales mesurées en QELS sont présentées dans le Tableau 16.

Nous avons ensuite préparé des gels colloïdaux à partir de ces deux dispersions de NPs_C en suivant le protocole décrit en paragraphe III-3.2, avec un $\%f_{PLA} = 14.7\%$ et un $\%f_{CS} = 0.22\text{ mg/mL}$. On rappelle que la notation $\%f_i$ correspond à l'extrait sec de l'espèce i (masse sèche de chitosane dans le cas des NPs_C) après mélange. Immédiatement après avoir été synthétisés, ces gels ont été caractérisés en rhéologie. Des balayages en déformation ($\omega = 5\text{ rad/s}$) ont été effectués et les résultats sont regroupés en Figure 59, chaque courbe étant la moyenne des mesures de 3 gels indépendants.

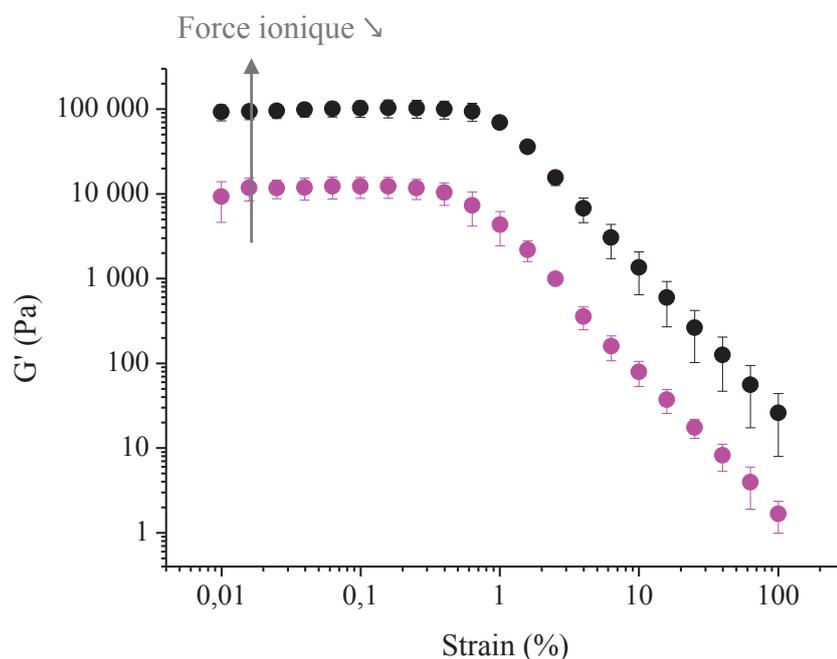


Figure 59. Influence de la force ionique du tampon acétate sur le comportement rhéologique des gels colloïdaux. Les points roses et noirs correspondent respectivement aux gels obtenus à partir de NPs_C dispersées dans un tampon acétate 150 mM ou 25 mM.

Cette Figure 59 montre que la force ionique a un impact significatif sur la cohésion de ces gels, puisque G'_p diminue d'un facteur 10 entre 25 et 150 mM, en passant d'environ 100 kPa à 10 kPa respectivement. Un effet similaire a déjà été observé par Van Tomme et coll. [226], et s'explique par l'écrantage des charges présentes à la surface des particules par les sels, ce qui a pour effet de diminuer les interactions électrostatiques. Cela est confirmé par les analyses de zétamétrie qui mettent en évidence une diminution (en valeur absolue) du potentiel zêta ζ apparent des NP_{SC} et des NP_{SPLA} (de façon moins prononcée) lorsque la force ionique du tampon augmente. A noter que la dispersion de NP_{SPLA} est parfaitement liquide et qu'aucune formation d'agrégats n'est observée lors de l'ajout du tampon seul, 25 mM ou 150 mM, ce qui confirme le rôle essentiel que jouent les NP_{SC} dans la formation des assemblages décrits plus haut. Précisons que ce lot de NP_{SPLA} a été utilisé pour réaliser l'ensemble des expériences de ce paragraphe III.

Ces résultats de rhéologie mettent donc en évidence le rôle des interactions électrostatiques dans la formation de ces assemblages colloïdaux. La présence de sels perturbe ces interactions et diminue leur intensité, conduisant à des gels moins cohésifs, avec des valeurs de G'_p plus faibles.

2.3. Influence du taux de solide des gels colloïdaux

Une série de gels colloïdaux a été préparée avec un taux de solide variable en fixant le rapport massique NP_{SC}/NP_{SPLA} , noté R_w^{sec} , à 0.16 % (la définition et l'influence de ce rapport NP_{SC}/NP_{SPLA} seront discutées en détails dans le paragraphe suivant). Chaque courbe en Figure 60a et Figure 60b représente respectivement l'évolution de G' et de $\tan\delta$ en fonction de la déformation, pour un extrait sec donné, noté $\%f$, qui est la concentration en matière sèche (comprenant la fraction massique de PLA additionnée à celle de chitosane sec) dans le matériau.

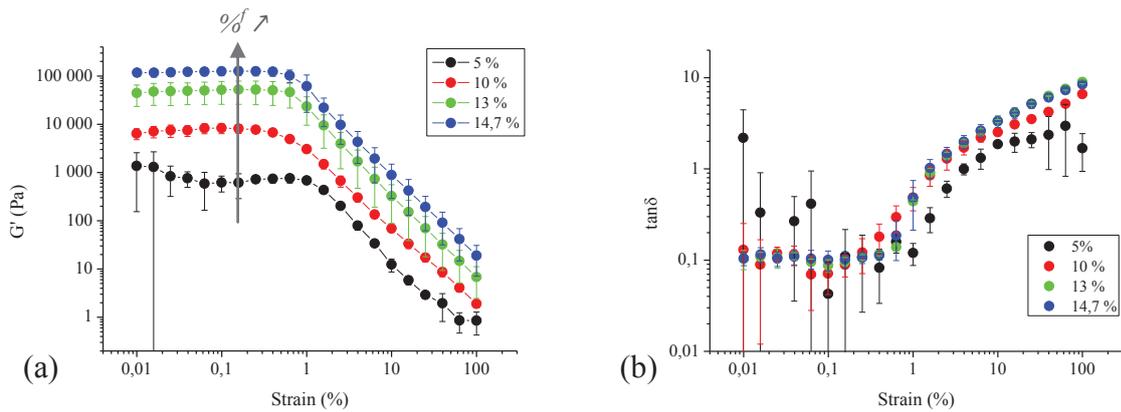


Figure 60. Influence du taux de solide sur les propriétés mécaniques des gels colloïdaux avec un rapport R_w^{sec} fixe égal à 0.16 %. Evolution du module G' (a) et de $\tan\delta$ (b) lors d'un balayage en déformation, de 0.01 % à 100 %, à une fréquence imposée de 5 rad/s, sur des mélanges avec $\%f$ égale à 5 % (noir), 10 % (rouge), 13 % (vert) et 14,7 % (bleu).

Pour les gels avec $\%f \geq 10\%$, la forme générale de la réponse est semblable : un plateau linéaire aux petites déformations avec $\tan\delta \approx 0.1$ (le matériau se comporte comme un solide élastique), suivi d'une rupture de la structure, qui se traduit par un effondrement de G' et une augmentation nette de $\tan\delta$. Dès lors, le matériau flue et se comporte comme un liquide visqueux. Dans le cas où $\%f = 5\%$, des variations importantes sont observées à faibles déformations, avec des incertitudes élevées. Cela est dû au couple très faible ($< 10^{-3}$ g/cm) enregistré par l'appareil, à la limite de sensibilité, reflétant un manque de cohésion des gels à ces faibles taux de solide.

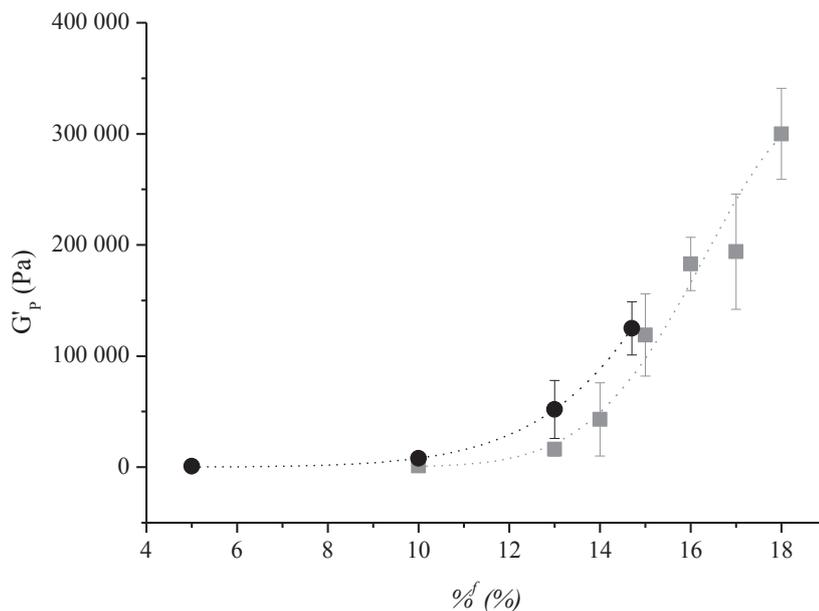


Figure 61. Evolution du module au plateau G'_p des gels colloïdaux (cercles noirs) comparée à celle des gels composites (carrés gris) en fonction de l'extrait sec total $\%d$. Chaque point est une moyenne des mesures réalisées sur 3 gels indépendants.

De même que pour les gels composites, G'_p augmente avec le taux de solide (Figure 60), ce qui correspond à un accroissement de la densité de nœuds de réticulation. Pour comparer ces résultats avec ceux des gels composites, nous avons représenté en Figure 61 l'évolution de G'_p des deux systèmes en fonction de $\%d$, qui, on le rappelle, représente l'extrait **sec** total final (masse de PLA + masse sèche de chitosane). On constate que G'_p évolue avec $\%d$ de façon similaire à celle observée pour les gels composites. Pour comprendre ce résultat, il faut garder à l'esprit que, pour tous les échantillons de la Figure 61, la masse des nanogels (c'est-à-dire la masse de chitosane + l'eau contenue dans les nanogels) ne représente qu'environ 3 % de la masse de solide de l'assemblage (masse de PLA + masse de nanogels de chitosane). La contribution des NP_{SPLA} dans le caractère élastique des assemblages doit donc être prééminente, ce qui expliquerait la contiguïté des modules des deux systèmes.

Nous nous sommes également intéressés à l'évolution de γ_c . Pour comparer les résultats avec ceux des gels composites, on a représenté sur la Figure 62 l'évolution de γ_c des deux systèmes en fonction de $\%d$. Contrairement aux gels composites, les gels colloïdaux semblent

plus sensibles à la déformation, puisque, à $\%f$ identique, les valeurs de γ_c sont significativement plus faibles.

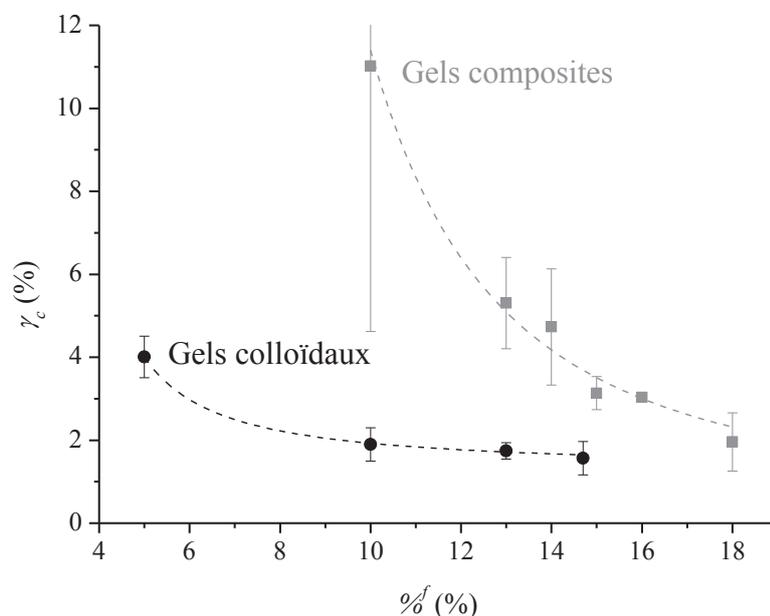


Figure 62. Evolution de γ_c en fonction de l'extrait sec total ($\%f$) pour les gels colloïdaux (cercles noirs) et pour les gels composites (carrés gris). Le rapport NPs_C/NPs_{PLA} est constant pour tous les gels colloïdaux ($R_w^{col} = 3.2\%$). Chaque point est une moyenne des mesures réalisées sur 3 gels indépendants.

Afin de bien comprendre ces résultats, plaçons-nous tout d'abord dans le cas d'un hydrogel composite à un taux de solide donné (en gris sur la Figure 62) : l'ensemble du chitosane est sous forme de chaînes protonées et solvatées, qui s'adsorbent sur la surface des NPs_{PLA} et forment la couche adhésive décrite dans la première partie de ce chapitre. Si maintenant on considère les gels colloïdaux, pour lesquels tout le chitosane est sous forme de nanogels, une grande partie des chaînes de polymère ne sont plus disponibles pour former cette couche adhésive. La diminution du nombre de points de réticulation disponibles entre les particules entraînerait une plus grande fragilité de l'assemblage lors d'un cisaillement, et donc une diminution de γ_c (points noirs sur la Figure 62).

2.4. Influence du rapport massique entre particules

Le rapport entre les deux types de particules a une influence majeure dans la formation de gels colloïdaux, comme l'ont montré les travaux de Van Tomme et coll. [227] et de Wang et coll. [230]. Quoique travaillant sur deux systèmes colloïdaux différents (à base de microsphères dans le premier cas, et de nanoparticules dans le deuxième), les deux études montrent notamment qu'il existe un rapport optimum pour lequel G' est le plus élevé (ou la viscosité dans le cas de Wang et coll.). Nous avons donc cherché à étudier l'influence du rapport NPs_C/NPs_{PLA} sur la formation des gels colloïdaux et sur leurs propriétés finales.

Dans le cadre de cette étude, il est important de bien rappeler certains aspects. Pour élaborer des gels colloïdaux, nous travaillons avec un mélange :

- de nanoparticules de PLA, qui sont des objets denses, et dont la masse volumique est $\rho_{NPs_{PLA}} = 1.27 \text{ g/cm}^3$, dispersées dans de l'eau.

- de nanogels de chitosane, qui sont des hydrogels majoritairement constitués d'eau, dispersés dans un tampon acide. Nous avons vu précédemment que la détermination de la concentration en polymère dans les NPs_C , C_{gel} , était très délicate, et que nous étions obligés de considérer qu'elle était la même que celle avant gélification des gouttelettes, à savoir 5 % dans cette étude. Par ailleurs, étant donné la très faible concentration en polymère, nous considérons la masse volumique de ces objets égale à celle de l'eau, c'est-à-dire $\rho_{NPs_C} = 1 \text{ g/cm}^3$.

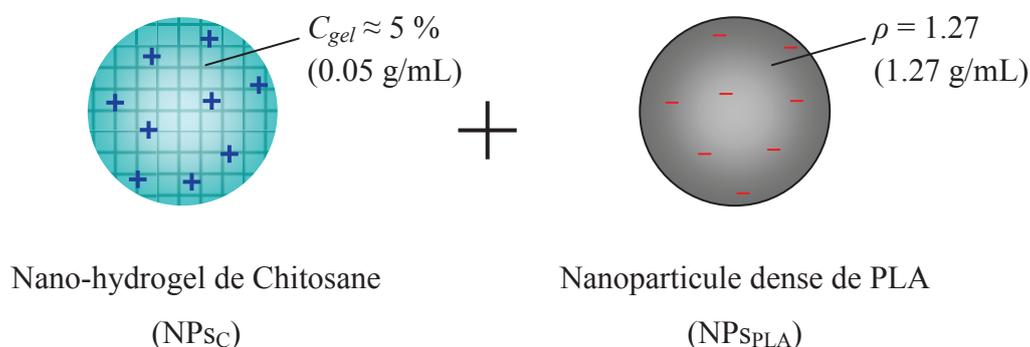


Figure 63. Représentation schématique des deux précurseurs colloïdaux. Les NPs_C sont des nanoparticules cationiques hautement hydratées avec une concentration interne en polymère appelée C_{gel} (la représentation élude volontairement la morphologie core-shell pour mieux mettre en évidence la notion de concentration de polymère C_{gel}). À l'inverse, les NPs_{PLA} sont des nanoparticules anioniques denses, avec une concentration en polymère et donc une cohésion plus importante.

Les mélanges ont été réalisés à partir des lots de NPs_{PLA} et de $\text{NPs}_{\text{C-1}}$ décrits en paragraphe III-2.2 et d'un deuxième lot de NPs_{C} , que nous appellerons $\text{NPs}_{\text{C-2}}$. Leurs caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 17** :

Tableau 17. Propriétés colloïdales des différents lots de nanoparticules utilisés pour les gels colloïdaux.

	NPs_{PLA}	$\text{NPs}_{\text{C-1}}$	$\text{NPs}_{\text{C-2}}$
$\overline{d}_{\text{OELS}}$	$229 \pm 4 \text{ nm}$	$248 \pm 2 \text{ nm}$	$203 \pm 3 \text{ nm}$
PDI	0.02 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.2 ± 0.02
ζ	$-47 \pm 1 \text{ mV}$	$+44 \pm 0.8 \text{ mV}$	$+45 \pm 1 \text{ mV}$

Les deux lots mère de NPs_{C} sont dispersés dans un tampon acétate 25 mM à des concentrations similaires.

Les différents gels colloïdaux ont été préparés de sorte que la concentration en NPs_{PLA} finale ($\%_{\text{PLA}}^f$) soit constante, en faisant varier la concentration finale en NPs_{C} . En pratique, nous pesons systématiquement dans la seringue la même masse $m_{\text{NPs}_{\text{PLA}}}^{\text{disp}}$ de dispersions de NPs_{PLA} , de concentration initiale $\%_{\text{PLA}} = 15,4 \text{ \%}_{\text{w/w}}$. Puis nous ajoutons une masse fixe $m_{\text{NPs}_{\text{C}}}^{\text{disp}}$ de dispersion de NPs_{C} de concentration variable ($\%_{\text{CS}}$, que nous exprimons en concentration de polymère sec). On définit alors le rapport massique R_w^{sec} comme étant le rapport de la masse sèche de chitosane (m_{CS}) sur la masse totale des NPs_{PLA} ($m_{\text{NPs}_{\text{PLA}}}^T$) dans le gel colloïdal (cf. (III.3))

$$R_w^{\text{sec}} = \frac{m_{\text{CS}}}{m_{\text{NPs}_{\text{PLA}}}^T} = \frac{\%_{\text{CS}}^f}{\%_{\text{PLA}}^f} \quad (\text{III.3})$$

masse sèche de chitosane dans le gel colloïdal
masse de PLA dans le gel colloïdal

Dans le cas des gels colloïdaux, le chitosane est sous forme de nanogels, à l'inverse des gels composites, dans lesquels il est sous forme soluble. Il est donc plus juste dans le cas des gels colloïdaux de raisonner avec le rapport massique R_w^{gel} , que l'on définit comme étant le rapport de la masse de chitosane non pas **sec**, mais sous forme d'**hydrogel** ($m_{NPs_C}^T$, masse de polymère + masse d'eau), sur la masse de PLA dans le gel colloïdal. Ce rapport est directement relié à R_w^{sec} par la relation (III.4) :

$$R_w^{gel} = \frac{m_{NPs_C}^T}{m_{NPs_{PLA}}^T} = \frac{m_{CS}}{C_{gel} \cdot m_{NPs_{PLA}}^T} = \frac{R_w^{sec}}{C_{gel}} \quad (III.4)$$

Immédiatement après leur formation, les gels colloïdaux ont été analysés en réalisant un balayage en déformation. Nous nous sommes notamment intéressés au module au plateau G'_p dont l'évolution en fonction du rapport R_w^{gel} est représentée en Figure 64.

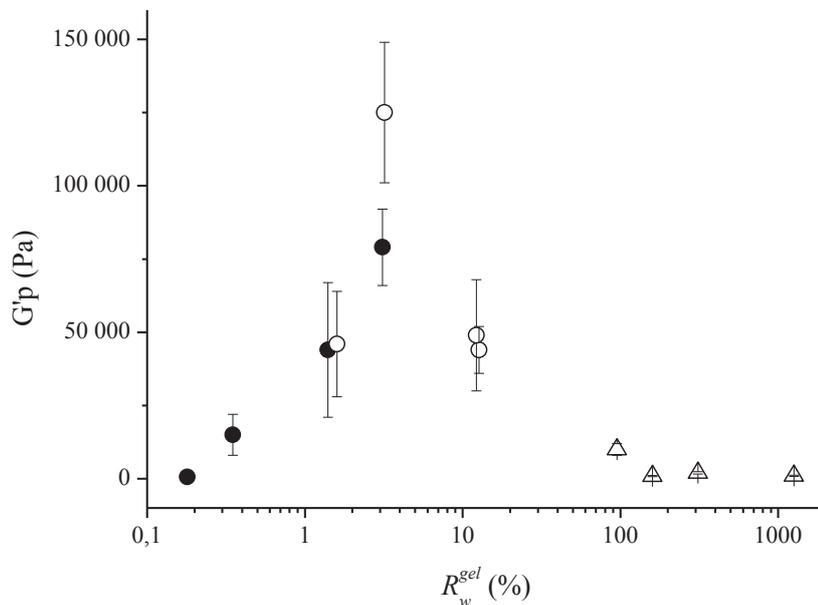


Figure 64. Evolution de G'_p en fonction du rapport massique R_w^{gel} NPs_C sur NPs_{PLA} , avec $\phi_{PLA} = 14.7\%$. Les cercles pleins et creux correspondent aux gels réalisés respectivement avec les NPs_C-1 et les NPs_C-2 . Les triangles correspondent à des essais complémentaires, avec des rapports plus élevés, mais réalisés à des ϕ_{PLA} plus faibles (voir dans le texte).

Il apparaît que G'_p dépend fortement du rapport NPs_C/NPs_{PLA} . Nous observons, comme pour les gels composites, l'existence d'un R_w^{gel} optimum pour lequel G'_p est maximum. Plus on s'éloigne de ce rapport optimum, plus le G'_p diminue. Cette tendance a bien été observée visuellement puisque en dessous d'un R_w^{gel} de 1 % un manque de cohésion très net a été observé. En pratique, nous n'avons pas pu réaliser de gels colloïdaux au-delà d'un R_w^{gel} de 12.7 %, puisque cela aurait nécessité, pour conserver un ϕ_{PLA} constant, une dispersion de NPs_C de concentration initiale trop élevée. Néanmoins, des essais de gels colloïdaux ont été réalisés avec un R_w^{gel} estimé de 150 %, 300 % et 1300 % environ (représentés en Figure 64 par des triangles), en diminuant ϕ_{PLA} à des valeurs de 13.6 %, 10 % et 6 % respectivement. Dans tous ces cas, les mélanges présentaient une cohésion nettement dégradée, concordant avec les modules G'_p mesurés inférieurs à 1000 Pa. Cependant, du fait que, pour atteindre de tels R_w^{gel} , il ait été nécessaire de diminuer ϕ_{PLA} , il est difficile de distinguer l'influence de la diminution du taux de solide en PLA de l'augmentation du rapport massique R_w^{gel} . On voit donc que les meilleures propriétés en terme de G'_p sont obtenues autour d'un R_w^{gel} optimum compris entre 3 et 10 %, valeur beaucoup plus faible que celle observée dans les travaux de Wang Q et coll. par exemple, où le R_w optimum se situe vers 100 % [230].

On sait que cet optimum peut varier selon la taille respective des particules [227]. Il pourrait donc être utile de s'intéresser à une autre expression du rapport NPs_C/NPs_{PLA} que le rapport des masses sèches, par exemple le rapport des surfaces développées par les deux types de particules. En réalité, il est apparu après calculs que la différence entre valeurs de rapport surfacique et de R_w^{gel} était très faible, et que considérer l'un ou l'autre rapport avait une influence négligeable sur les tendances observées. Cette remarque est la même pour un rapport en nombre (nombre de NPs_C sur nombre de NPs_{PLA}) ou en charge (tous ces calculs ainsi que les comparaisons des rapports en masse, en surface ou en nombre sont détaillés en Annexe C). Ainsi, que l'on raisonne en terme de rapport en masse, surface, nombre ou charge, l'optimum est très éloigné d'un rapport $NPs_{PLA}:NPs_C$ 1:1 contrairement à ce qui avait été observé jusqu'ici dans la littérature.

Il est important de noter que l'optimum observé sur la Figure 64 correspond à un R_w^{sec} de 1.6 mg/g, ce qui est très proche du R_w optimum des gels composites. Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment (voir discussion sur le taux de solide en paragraphe III-2.3), ces

assemblages $\text{NP}_{\text{SC}}/\text{NP}_{\text{SPLA}}$ semblent se rapprocher des gels composites étudiés dans la première partie de ce chapitre. La première raison à ce résultat réside certainement dans le fait que, dans les deux cas, gels composites et gels colloïdaux, la masse des NP_{SPLA} est grandement majoritaire, et celles-ci doivent donc gouverner les propriétés rhéologiques des assemblages.

Mais d'autres éléments, liés aux incertitudes propres aux NP_{SC} , soulevées en Chapitre II, sont suspectés de jouer un rôle. En effet, nous avons vu qu'il était possible qu'une fraction du chitosane ne soit pas sous forme de NP_{SC} mais sous forme solubilisée. D'autre part, dans les différentes études sur les gels colloïdaux, les assemblages étaient obtenus à partir de particules dures [230–232], ou de microgels covalents [226,227,229]. La force des liaisons structurant ces colloïdes est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle des liaisons inter-particules. Ainsi, lorsque ces gels sont déformés, ce sont les liaisons inter-particules qui cèdent, entraînant la rupture du réseau. A l'inverse, dans notre cas, un des précurseur colloïdaux, les NP_{SC} , est un *nano-hydrogel physique*. Les liaisons qui structurent et maintiennent l'intégrité de tels objets sont certainement de l'ordre de grandeur de celles qui s'établissent entre les NP_{SPLA} et les NP_{SC} . Il est donc probable que, sous cisaillement, les NP_{SC} soient déstructurées par les NP_{SPLA} , bien plus cohésives.

Dans ces éventualités, et selon l'ampleur du phénomène, une fois les deux colloïdes mélangés, l'assemblage combinerait deux modes de percolation comme représenté en Figure 65 : *i)* par interaction entre particules de charges opposées, comme pour un gel colloïdal classique, et *ii)* par l'adsorption du chitosane solubilisé en une couche adhésive à la surface des NP_{SPLA} , comme dans le cas des gels composites. Cela pourrait expliquer, en partie du moins, les similitudes de rapport optimum entre les gels colloïdaux et les gels composites.

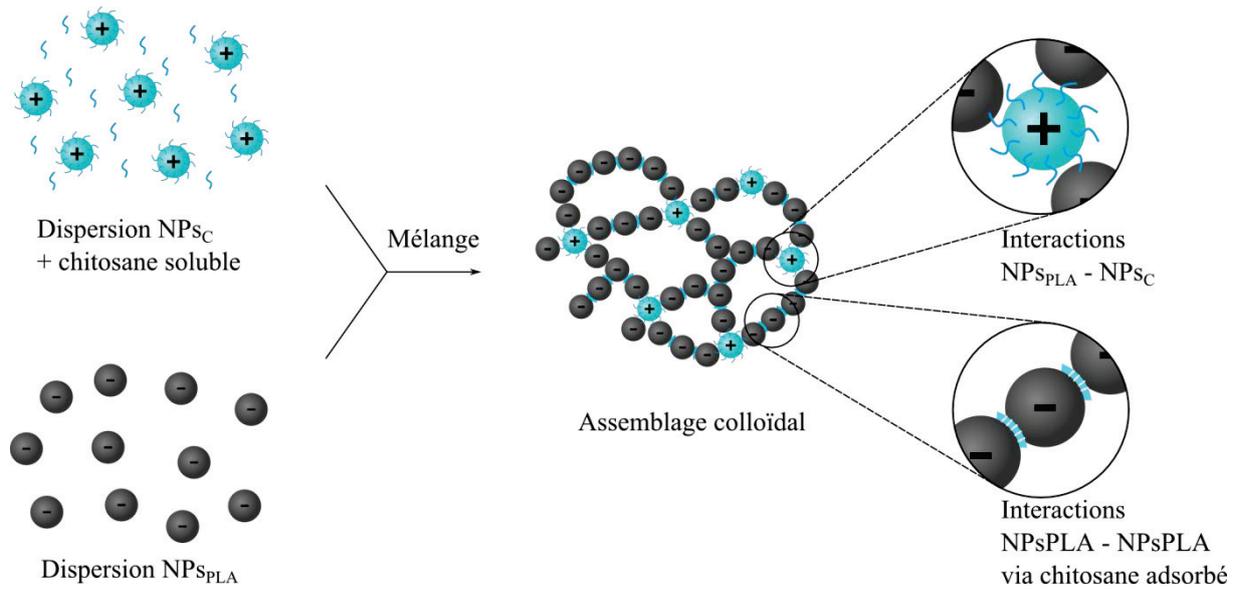


Figure 65. Représentation schématique d'un assemblage colloïdal entre une dispersion de NPs_{PLA} et une dispersion de NPs_{C} où une partie du chitosane serait solubilisée, soit dès le départ, soit suite au mélange avec les NPs_{PLA} . La fraction solubilisée s'adsorberait alors à la surface des NPs_{PLA} . L'assemblage se baserait donc sur un mélange d'interactions $\text{NPs}_{\text{C}}\text{-NPs}_{\text{PLA}}$ et de liaisons hydrogène identique à celles impliquées dans les gels composites.

En cela, l'augmentation de la concentration en polymère C_{gel} n'a pas apporté de différence significative sur le comportement des gels colloïdaux. En effet, les quelques assemblages réalisés à partir de NPs_{C} avec $C_{\text{gel}} = 3\%$ tendent à montrer que les assemblages présentent les mêmes caractéristiques qu'avec des NPs_{C} de $C_{\text{gel}} = 5\%$ (un exemple avec C_{gel} est comparé dans le Tableau 18). Même si les conditions diffèrent (notamment en terme de R_w^{gel}), elles semblent nous confirmer que l'augmentation de la concentration en chitosane C_{gel} de 3 à 5 % à l'intérieur des nanogels n'a pas eu beaucoup d'impact sur le comportement des NPs_{C} vis-à-vis des NPs_{PLA} .

Tableau 18. Influence de C_{gel} sur les propriétés mécaniques des assemblages colloïdaux. Assemblages réalisés à partir du même lot de NPs_{PLA} ($\%_{\text{PLA}}^f = 15.4\%$) et de lots de NPs_{C} avec des C_{gel} de 3% ou 5%. Compte tenu des incertitudes, les valeurs de G'_p et γ_c sont similaires)

	NPs_{C} 3 %	NPs_{C} 5 %
R_w^{gel}	15.4 %	12.7 %
$\%d$	14.7 %	14.7 %
G'_p	34 ± 20 kPa	44 ± 8 kPa
γ_c	2 %	2.3 %

2.5. Influence de la réticulation des nanogels de chitosane sur les propriétés des gels colloïdaux

L'augmentation de la concentration en polymère C_{gel} a été une première piste de travail pour résoudre la question de l'intégrité des NPs_C . Mais nous avons vu que, d'une part nous étions limités en terme de concentration avec notre procédé de gélification en miniémulsion, et que d'autre part cela ne semblait pas avoir un impact significatif sur les propriétés finales des assemblages colloïdaux. Nous avons donc cherché à réticuler chimiquement ces nanogels par l'ajout de génipine (voir Chapitre II), dans le but d'obtenir des objets plus solides et plus à même de résister au processus d'assemblage avec les NPs_{PLA} .

Des NPs_C de 203 ± 3 nm et avec $C_{gel} = 5$ % ont été réticulées avec différentes quantités de génipine (voir Tableau 19 et Tableau 20) en suivant le protocole décrit en paragraphe III.2.2. Différents assemblages ont ensuite été préparés à partir de ces NPs_C réticulées, en conservant un taux de solide final en PLA constant. Deux rapports R_w^{gel} ont été testés, ainsi que deux taux de réticulation (Tableau 19). Les dispersions de NPs_C réticulées ont été utilisées sans avoir éliminé la génipine résiduelle qui n'aurait pas réagi, car nous ne pouvions ni les centrifuger, ni les filtrer sans les dégrader, comme vu au Chapitre II.

Tableau 19. Différents échantillons de gels colloïdaux préparés avec les NPs_C réticulées avec des quantités de génipine variables. T1 et T2 sont des échantillons de contrôle, réalisés avec des NPs_C non réticulées.

NPs_C	Echantillon	A	B	C	T1	T2
		$n_{GlcN}/n_{gén}$	28	14	29	/
	$\% \phi_{PLA}^f$	14.7 %	14.7 %	14.7 %	14.7 %	14.7 %
Assemblages NPs_{PLA}/NPs_C	$\% \phi_{CS}^f$ (mg/mL)	0.46	0.24	0.24	0.46	0.24
	R_w^{gel}	6.4 %	3.2 %	3.2 %	6.4 %	3.2%

Les résultats présentés en Figure 66 montrent clairement que la réticulation des nanogels n'a pas apporté d'amélioration significative en terme de G'_p et de γ_c , quel que soit le rapport utilisé pour la réticulation. Cela peut signifier deux choses : soit que la réticulation, dans la gamme de rapports $n_{GlcN}/n_{gén}$ étudiée, n'entraîne pas une amélioration de la cohésion des NPs_C

suffisante pour éviter leur déstructuration en présence des NPs_{PLA} ; soit que les NPs_{C} résistent bien à l'étape de complexation, mais qu'elles ne contribuent que de façon négligeable à l'élasticité du matériau.

Cependant ces résultats sont partiels et il faudrait pour les compléter :

- tester l'ajout de génipine en plus grande quantité afin de déterminer s'il existe un taux de réticulation seuil, au-delà duquel il pourrait y avoir une amélioration des propriétés mécaniques des assemblages.
- étudier l'effet de la réticulation sur le R_w^{gel} optimum, pour lequel on s'attend à des effets plus marqués, s'il y en a. Les NPs_{C} réticulées devraient en effet mieux résister au mélange avec les NPs_{PLA} , et on s'attend ainsi à ce que le R_w^{gel} optimum se distingue de celui des gels composites.

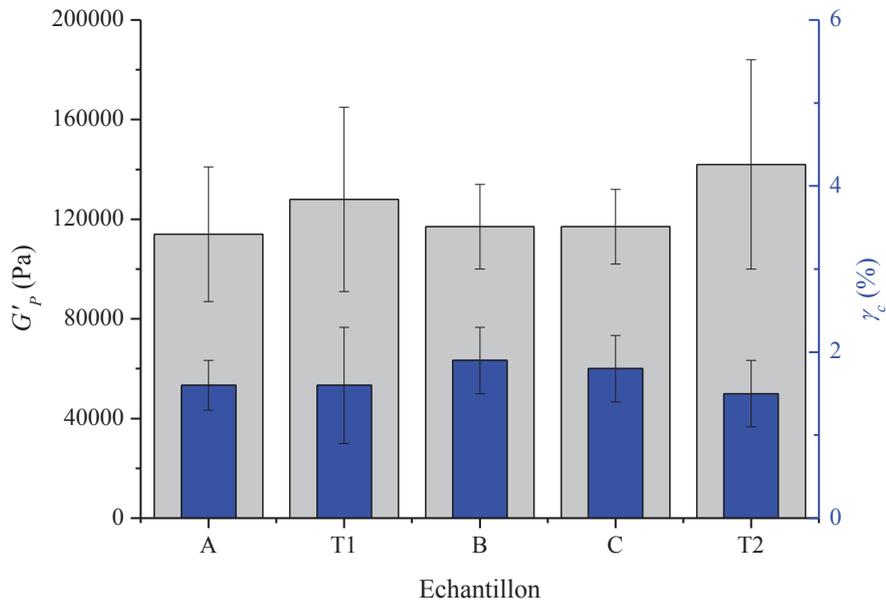


Figure 66. Module G'_p et déformation à la rupture γ_c pour différents gels colloïdaux, à base de NPs_{C} réticulées avec la génipine (A, B et C) ou non réticulées (T1 et T2). Les échantillons A et C ont un taux de réticulation théorique 2 fois supérieur à C. Les échantillons A et T1 ont une concentration en NPs_{C} 2 fois supérieure à celle des autres échantillons. Pour tous les échantillons, $\%f_{\text{PLA}} = 14.7\%$.

3. Préparation des échantillons et contexte expérimental

3.1. Préparation des nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane

3.1.1. Synthèse des nanoparticules de poly(acide lactique)

Le procédé de synthèse des NPs_{PLA} est strictement identique à celui décrit dans la publication. Les particules ont ensuite été concentrées de la même façon, en évaporant l'eau sur évaporateur rotatif. Nous avons ainsi synthétisé une dispersion mère de NPs_{PLA} avec un taux de solide $\%_{PLA}$ de 15.5 $\%_{w/w}$. Le taux de solide est ici plus faible que dans notre étude sur les gels composites (en raison de contraintes expérimentales), mais cela n'a pas posé de problème pour l'obtention d'assemblages cohésifs, comme nous le verrons par la suite.

3.1.2. Synthèse des nanogels de chitosane

Les nanogels ont été synthétisés suivant le protocole décrit dans le Chapitre II. Pour cette étude sur les gels colloïdaux, nous avons utilisé un lot de NPs_C synthétisées avec une concentration en chitosane C_{gel} estimée à 5 % et dispersées à différentes concentrations en particule, dans un tampon acétate pH 4.5 de force ionique variable.

Des nanogels de chitosane de $C_{gel} = 5 \%$, dispersés dans un tampon acétate 25 mM à un extrait sec initial $\%_{CS} = 20 \text{ mg/mL}$, ont été réticulés à la génipine suivant un protocole dérivé de celui décrit en Chapitre II. On introduit dans des eppendorfs un volume V_{disp} de cette dispersion. On ajoute ensuite, en fonction du rapport molaire $n_{GlcN}/n_{gén}$ souhaité, un volume V_{gen} variable d'une solution de génipine concentrée à 1.01 mg/mL. On complète ensuite avec du tampon (V_{tampon}) et de l'eau stérile (V_{eau}) pour obtenir un volume totale de 1.5 mL avec une force ionique constante. Les différents échantillons préparés sont présentés dans le Tableau 20. Le mélange est agité sur une roue à température ambiante pendant 10 jours avant d'être utilisé pour complexation avec les NPs_{PLA} .

Tableau 20. Préparation des différents échantillons de NPs_C réticulées à la génipine et des échantillons témoins.

Echantillon	A	T1	B	C	T2
V _{disp} (μL)	500	500	250	250	250
V _{tampon} (μL)	0	0	250	250	250
V _{eau} (μL)	0	500	0	250	500
V _{gén} (μL)	500	0	500	250	0
% ^f _{CS} (mg/mL)	10,4	10,4	5,2	5,2	5,2
n _{gén} /n _{CS}	5	0	10	5	0
n _{GlcN} /n _{gén}	28	/	14	29	/

3.2. Préparation des gels colloïdaux

Le manque de reproductibilité du protocole de préparation des gels colloïdaux a été une source de problèmes importante dans cette étude. La complexation entre les particules de PLA et celles de chitosane est en effet instantanée, et il a fallu trouver une méthode qui permette d'apporter une bonne homogénéisation du mélange, tout en minimisant le nombre d'étapes et les temps de mélange. Nous avons vu dans le Chapitre II que les NPs_C présentaient une certaine fragilité, et nous voulions absolument limiter les contraintes de cisaillement pour préserver au maximum l'intégrité des NPs_C. Dans leur premier article sur les gels colloïdaux, Van Tomme et coll. préparent des gels en mélangeant deux dispersions aqueuses de microsphères de dextrane de charges opposées [226]. Leur protocole initial implique donc un mélange en voie aqueuse. On constate cependant que leur protocole a évolué dans les travaux suivants : les particules de charges opposées sont mélangées sous forme lyophilisée [228,229]. Une fois le mélange bien homogène, le solvant est ajouté (en l'occurrence un tampon HEPES) jusqu'au taux de solide désiré. L'avantage de cette méthode est que le mélange se fait avec des particules sèches (sous forme de poudre) avant l'établissement des interactions électrostatiques entre particules, ce qui est propice à une bonne homogénéisation. Malheureusement, dans le cas du système NPs_C/NPs_{PLA}, cette méthode n'est pas applicable puisque ni les NPs_C ni les NPs_{PLA} ne sont redispersables après une lyophilisation (sauf en présence de cryoprotecteur dans le cas des particules de PLA).

Nous avons donc été obligés de conserver une méthode d'homogénéisation des mélanges en voie dispersée. Nous avons utilisé le même protocole que celui mis au point pour les gels composites. Nous avons vu que cette technique permet, en plus d'être économe en quantité de matière, de limiter au maximum les contraintes sur le gel une fois formé. Or ce point est sensible dans le cas des gels composites à base de nanogels de chitosane, puisque, comme nous l'avons vu précédemment, nous suspectons ces derniers d'être fragiles.

Le protocole est donc le même qu'en paragraphe II-2.2 :

- On pèse la dispersion de NPs_{PLA} puis celle de NPs_{C} dans la seringue modifiée, piston retiré, orifice bouché.
- La seringue contenant le mélange est ensuite agitée sur vortex mécanique pendant 3s. Le mélange gélifie instantanément.
- Le bouchon de l'orifice est retiré, et le piston remplacé. Le gel est ainsi prêt à être transféré sur le rhéomètre en poussant délicatement le piston.

3.3. Mesures rhéologiques des gels colloïdaux

Un rhéomètre ARES est utilisé pour obtenir les caractéristiques rhéologiques des mélanges $\text{NPs}_{\text{C}}/\text{NPs}_{\text{PLA}}$. Les mesures sont réalisées sur un dispositif de géométrie plan-plan, avec des plateaux en acier de 8 mm de diamètre. Une fois préparés, les gels colloïdaux sont immédiatement déposés sur le rhéomètre. Le plan supérieur est progressivement descendu pour atteindre un gap constant de 1000 μm pour tous les échantillons. Pour chaque condition, 3 gels sont réalisés, sur lesquels une seule mesure est faite. On considère que l'analyse est suffisamment rapide (2 min environ pour un balayage en déformation, 6 min environ pour un balayage en fréquence) pour que l'évaporation de l'eau du système soit négligeable.

Des balayages en déformation ont été réalisés entre 0.01 % et 100 % à une fréquence fixe de 5 rad/s. Certains échantillons ont été analysés par des balayages en fréquence de 100 rad/s à 0.1 rad/s, à une déformation fixe de 0.2 % (après s'être assuré que l'on se situait bien dans le domaine viscoélastique linéaire).

IV - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord étudié la complexation entre une dispersion concentrée de nanoparticules de PLA et des chaînes de chitosane. Initialement liquides, les deux composants conduisent, une fois mélangés, à la formation immédiate d'un gel macroscopique. Les mesures rhéologiques couplées à des analyses de SAXS ont permis de mettre en évidence le mode de formation de ce gel dit « **composite** », puisque basé sur des interactions *colloïde-polymère* : en milieu acide, les chaînes de chitosane protonées et chargées positivement s'adsorbent en fines couches à la surface des particules anioniques de PLA qui sont chargées négativement. Cette couche adsorbée engendre alors des interactions attractives entre les particules, conduisant à la formation d'un réseau percolant sur l'ensemble du volume. Etant donné le comportement de ces gels en fonction de la température, le comportement rhéologique des assemblages, et la faible épaisseur de la couche adsorbée, il est probable que ces interactions attractives soient de type liaisons hydrogène. Reposant donc sur des réticulations de faible énergie, ces assemblages se déstructurent aisément à des déformations relativement faibles, mais recouvrent rapidement leurs propriétés initiales une fois que les échantillons ne sont plus sous contrainte.

Dans un second temps, la complexation entre les mêmes nanoparticules anioniques de PLA avec du chitosane sous la forme de nanogels cationique a été étudiée. Nous avons vu que le mélange de ces deux colloïdes entraînait la formation immédiate de gels dits « **colloïdaux** », basés sur des interactions *colloïde-colloïde*. Tout comme les *gels composites*, ces assemblages présentent des propriétés rhéofluidifiantes, puisqu'ils s'écoulent au-delà d'une déformation critique. Cependant, cette dernière s'est avérée plus faible dans le cas des *gels colloïdaux*, faisant de ces assemblages des gels plus fragiles. Par ailleurs, certaines similitudes rhéologiques avec les *gels composites* ont été relevées. En effet, le module élastique en régime linéaire des deux assemblages évolue de la même manière avec le taux de solide et le rapport NPs_{PLA}/NPs_C . Ce résultat peut être expliqué par la proportion de NPs_{PLA} qui est dans les deux systèmes très supérieure à la quantité de chitosane. Deux autres éléments pourraient également expliquer ces similitudes :

- Etant donné que les nanogels sont des nano-hydrogels physiques, ils pourraient mal supporter les contraintes de cisaillement lors du mélange avec les particules de PLA, qui sont elles beaucoup plus cohésives. Une fois les nanogels de chitosane

déstructurés, le polymère pourrait se retrouver de nouveau en solution et se comporter plus ou moins comme dans le cas des gels composites.

- Si une partie du chitosane des dispersions de NPs_C n'était pas sous forme de nanogels mais sous forme solubilisée, comme cela a été évoqué en Chapitre II, cela conduirait, lors du mélange avec les particules de PLA, à un assemblage qui tendrait vers un système proche de celui des gels composites.

Pour tenter d'améliorer la cohésion des nanogels de chitosane, et montrer une éventuelle influence de celle-ci sur les propriétés des gels colloïdaux, nous avons réticulés les nanogels avec la génipine pour les associer aux NPs_{PLA} . Néanmoins, ces résultats préliminaires tendent à montrer que l'emploi de nanogels réticulés n'apporte pas de modification notable sur les propriétés rhéologiques des gels formés. Il sera cependant nécessaire de réaliser des essais complémentaires pour confirmer ou non ces observations, en étudiant notamment l'influence de paramètres comme le taux de réticulation, ou le rapport massique R_w^{gel} sur la formation et les propriétés de ces gels colloïdaux.

CONCLUSION GENERALE

Les assemblages colloïdaux constituent une nouvelle famille de matériaux résultant de l'association de particules entre elles. La gélification, résultant de la création de nœuds de réticulation physique, conduit à des structures tridimensionnelles qui peuvent être utilisées comme supports de croissance de cellules dans des applications d'ingénierie tissulaire, comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique. Les assemblages présentés dans cette étude ont été réalisés à partir de deux polymères issus de ressources naturelles: le chitosane aux propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité bien établies, et le poly(acide lactique) (PLA) biorésorbable et ayant de bonnes propriétés mécaniques.

Nous avons obtenu un premier type d'assemblage par mélange d'une dispersion de nanoparticules négatives de PLA avec une solution aqueuse de chitosane. La complexation de ces deux espèces de charges opposées conduit à la formation de gels, appelés « **gels composites** », qui sont basés sur des interactions *colloïde-polymère*. L'influence de plusieurs paramètres sur la synthèse et les propriétés finales des assemblages a été étudiée. L'importance du rapport entre les quantités de PLA et de chitosane a été démontrée notamment par des mesures de rhéologie. La température ainsi que la concentration se sont également révélées influentes. Les assemblages obtenus fluent au-delà d'une certaine déformation, et leurs propriétés mécaniques sont immédiatement restaurées une fois qu'ils ne sont plus sous contrainte. Ils présentent ainsi de réelles propriétés rhéofluidifiantes et de réversibilité. La combinaison des analyses de rhéologie et de diffusion de rayons X aux petits angles a permis d'élucider le mode de formation de ces gels : les chaînes de chitosane chargées positivement s'adsorbent en une fine épaisseur (quelques Å) à la surface des particules de PLA. Cette fine couche diminue la répulsion électrostatique entre les particules et favorise l'établissement d'interactions de faible énergie, de type liaisons hydrogène.

Le second type d'assemblage résulte du mélange de dispersions de particules anioniques de PLA et de nanogels cationiques de chitosane, conduisant à la formation de « **gels colloïdaux** » par interactions *colloïde-colloïde*. Les nanogels de chitosane ont été obtenus par un procédé de gélification d'une solution de chitosane légèrement acide en émulsion inverse, sans utilisation d'agent réticulant. La formation des gels macroscopiques a été observée immédiatement après mélange des deux dispersions. Les propriétés rhéologiques de ces assemblages ont été étudiées en fonction de plusieurs paramètres expérimentaux. Il est cependant apparu que ces *gels colloïdaux* se comportaient à plusieurs égards comme les *gels*

composites. Trois hypothèses, éventuellement complémentaires, sont avancées pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, la proportion particules de PLA dans les 2 types de mélange est nettement supérieure à celle de chitosane, ce qui peut expliquer les similitudes de modules rhéologiques observées. Une deuxième explication serait que la dispersion initiale de nanogels présente une quantité de chitosane solubilisé non négligeable, ce qui diminuerait l'impact des nanogels sur les propriétés rhéologiques des assemblages colloïdaux obtenus. Cependant, la fraction de chitosane solubilisé n'a jusqu'ici pas pu être réellement déterminée, compte tenu des difficultés rencontrées lors de la purification et de l'observation de ces nanoparticules. Enfin, une déstructuration des nanogels pourrait intervenir lors du mélange avec les nanoparticules de PLA en raison d'une cohésion insuffisante.

Eu égard à ces deux dernières hypothèses, une attention particulière a été portée sur la caractérisation des nanogels de chitosane et l'optimisation de leur cohésion. Compte tenu des difficultés rencontrées lors de la purification et de l'observation de ces objets, la fraction de chitosane solubilisé n'a jusqu'ici pas pu être déterminée. Afin d'améliorer l'intégrité de la forme physique des nanogels, en supposant que cette dernière soit altérée sous l'effet de cisaillement dû aux particules de PLA au cours du mélange, deux approches ont été envisagées. D'une part, la concentration en chitosane au cours de la synthèse des nanogels a été augmentée et, d'autre part, les nanogels ont été réticulés avec de la génipine. Cependant, nos résultats ont montré qu'aucune de ces deux voies n'influençait significativement les propriétés finales des gels colloïdaux.

PERSPECTIVES

Ce travail décrit pour la première fois la synthèse d'assemblages colloïdaux à base de nanoparticules de PLA et de chitosane, sous forme soluble ou sous forme de nanogels. Plusieurs aspects restent néanmoins à approfondir.

Concernant les **gels composites**, il conviendrait de parvenir à caractériser leur morphologie exacte, par des techniques de cryo-MET et/ou de cryo-MEB. Par ailleurs, il sera important de corriger le comportement de ces gels à température physiologique pour pouvoir considérer

des applications de support pour la culture cellulaire, par exemple en utilisant un PLA de plus haute masse molaire. Enfin, il conviendra d'évaluer l'intérêt de ces nouveaux matériaux pour l'ingénierie tissulaire, en caractérisant leurs performances en culture cellulaire.

Concernant les **gels colloïdaux**, l'originalité des présents travaux réside dans l'utilisation des nanoparticules sous forme de nano-hydrogels. Cette voie est particulièrement intéressante compte tenu du très fort potentiel des nanogels, qui comportent une grande quantité d'eau, offrant la possibilité d'incorporer et délivrer des principes actifs, ainsi qu'une biodégradation améliorée. Ceci étant, au vu des résultats obtenus avec les particules de PLA, il serait intéressant de travailler à obtenir des gels macroscopiques à partir de précurseurs qui soient tous deux, sous forme de nanogels. Dans cette perspective, au vu de la fragilité supposée des nanogels et des incertitudes s'agissant de la fraction solubilisé de chitosane, des investigations sur les nanogels de chitosane demeurent nécessaires. Il faudra notamment parvenir à quantifier cette quantité solubilisée, et mettre au point une méthode pour éliminer cette fraction soluble (par une méthode de dialyse par exemple) et ainsi obtenir des particules pures. Plusieurs pistes ont été proposées dans le Chapitre III pour travailler sur l'aspect de la tenue mécanique des nanogels (mise au point de nano-sonde mécanique pour une meilleure caractérisation, étude plus poussée de la réticulation à la génipine,...). Une fois cette problématique résolue, il sera nécessaire de travailler à obtenir des nanogels de charge négative afin de former des assemblages nanogels (+) / nanogels (-). Dans cette optique, il pourrait être envisagé d'adsorber à la surface des précédents nanogels cationiques divers polyanions, afin de modifier la charge de surface. La même méthode pourrait être utilisée sur des nanogels de chitosane plus « classiques », obtenus par gélification ionique avec le triphosphate de sodium par exemple, complexés dans un second temps avec des espèces anioniques. Enfin, la technique de complexation polyélectrolytique pourrait également être une alternative permettant d'obtenir des particules de charges opposées en variant les rapports chitosane/polyanions.

Il reviendra ensuite de caractériser la stabilité des assemblages obtenus, ainsi que leur capacité à s'auto-assembler dans des milieux plus complexes. Il s'agira enfin de procéder à l'évaluation de la cyto-compatibilité de ces matériaux, ainsi qu'à celle de leurs performances à des fins d'applications en médecine régénérative.

ANNEXES

ANNEXE A – DIFFUSION QUASI ELASTIQUE DE LA LUMIERE

La détermination de la taille de nanoparticules est complexe, principalement à cause de leur taille submicronique, qui rend toute observation optique impossible. Une technique répandue dans la science des colloïdes est la diffusion quasi élastique de la lumière (ou QELS pour Quasi Elastic Light Scattering). L'appareil dont nous disposons au laboratoire est un Malvern ZetaSizer Nano ZS, qui permet de mesurer la taille et le potentiel zêta de colloïdes. La technologie de mesure en backscattering (détecteur placé à 173° par rapport au rayon incident) permet de mesurer avec une bonne fiabilité des échantillons à forte concentration.

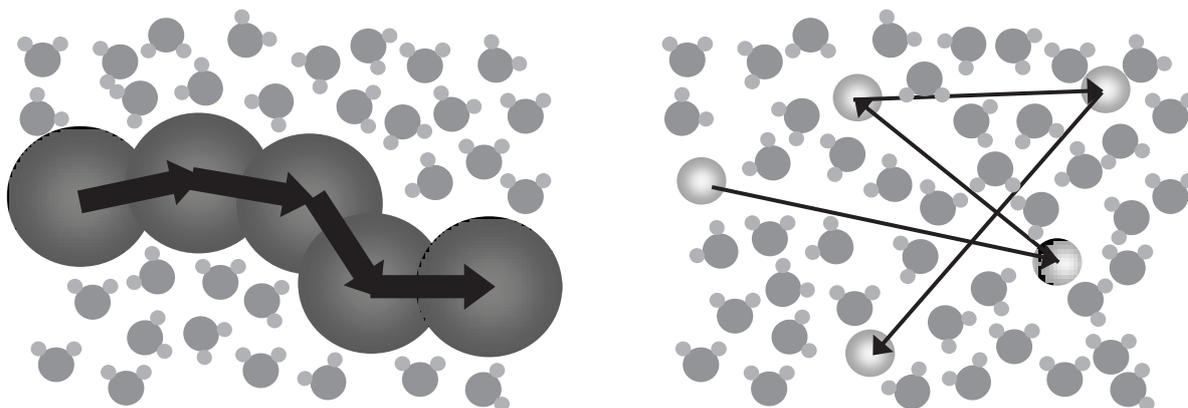


Figure 67: Vitesse de particules évoluant dans un solvant. Les chocs entre les grosses particules (à gauche) et les molécules de solvant sont moins efficaces qu'avec les petites particules (à droite). Ces dernières se déplacent plus rapidement.

Le principe de la mesure est le suivant : les nanoparticules en suspension sont soumises au mouvement brownien, causé par les chocs entre les molécules de solvant et les particules. Lorsqu'un volume de dispersion est irradié par un laser, les nanoparticules diffusent la lumière incidente dans toutes les directions. Un capteur enregistre cette lumière diffusée à un angle donné. L'intensité diffusée varie sur des intervalles de temps court, et ces fluctuations sont dépendantes de la taille des particules : les petites particules sont en effet plus influencées par les chocs que les plus grosses particules et se déplacent plus vite (voir Figure 67).

La fonction d'auto-corrélation de l'intensité diffusée, enregistrée par le capteur, s'exprime comme :

$$G^{(2)}(\tau) = A + B |g^{(1)}(\tau)| \quad (\text{B.1})$$

où A et B sont des constantes d'appareillage, τ le "delay time" ou temps de retard, et $g^{(1)}(\tau)$ la fonction d'auto-corrélation du champs électrique. Dans le cas idéal d'une solution de sphères solides monodisperses, $g(\tau)$ peut se réduire à une exponentielle simple :

$$g^{(1)}(\tau) = \exp(-\Gamma \tau) \quad (\text{B.2})$$

où Γ est le taux de décroissance, qui est relié au coefficient de diffusion translationnel D des objets par :

$$\Gamma = q^2 D \quad (\text{B.3})$$

q étant le l'intensité du vecteur de diffusion. On sait d'autre part que D est directement relié à la taille des objets par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_{eff}} \quad (\text{B.4})$$

T , η et k_B sont respectivement la température, la constante de Boltzmann et la viscosité de la phase continue. Le diamètre effectif mesuré, d_{eff} , correspond à une sphère théorique ayant le même coefficient de diffusion que les particules concernées. Ce coefficient n'est pas seulement dépendant de la taille du cœur de la particule, mais également de toute structure ou phénomène à sa surface, comme des chaînes de polymères déployées ou une agrégation d'ions, qui vont gêner l'évolution de la particule au sein du solvant. On parle également de

diamètre hydrodynamique. Cela signifie que la taille mesurée en QELS est souvent plus grande que celle mesurée en microscopie électronique.

Dans le cas plus réaliste d'une suspension de particules polydisperses, $g^{(1)}(\tau)$ est en réalité une somme d'exponentielles (une pour chaque population de taille) et l'équation (B.2) devient

$$|g^{(1)}(\tau)| = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma \quad (\text{B.5})$$

où $G(\Gamma)$ représente la fonction de distribution du taux de décroissance Γ . La détermination de cette fonction est complexe et constitue le plus gros verrou de la technique de QELS. La méthode des cumulants est souvent utilisée. Dans ce modèle, la fonction de corrélation est représentée par des séries infinies où chaque terme représente un moment statistique d'ordre de plus en plus grand, donnant des informations sur la forme de la distribution du taux de décroissance. Généralement, ces séries sont limitées à 2 ou 3 termes, car seuls les deux premiers moments peuvent être déterminés avec précision. L'équation est valable seulement en absence de diffusion multiple, c'est-à-dire quand les objets diffusant ne sont pas trop concentrés.

En utilisant la méthode des cumulants [290,329,344], on obtient le taux de décroissance moyen $\bar{\Gamma}$ et sa variance normalisée μ , qui sont reliés à l'indice de polydispersité (pdi) par :

$$pdi = \frac{\mu^2}{\bar{\Gamma}^2} \quad (\text{B.6})$$

Il est important de noter que cette technique nous donne accès à la moyenne harmonique en z du diamètre, car le taux de décroissance moyen $\bar{\Gamma}$ est une moyenne en intensité :

$$\bar{\Gamma} = \frac{\sum f_i M_i^2 P_i(\theta) \Gamma_i}{\sum f_i M_i^2 P_i(\theta)} \quad (\text{B.7})$$

f_i , M_i et $P_i(\theta)$ étant respectivement la fraction, la masse et le facteur de forme des particules avec un taux de décroissance Γ_i . Si l'on se place dans les conditions d'une approximation de Rayleigh [345] (petite particule ou petit angle, ce qui est notre cas), alors $P_i(\theta) \sim 1$ et (B.7) se simplifie [346]:

$$\bar{\Gamma} = B \frac{\sum f_i d_i^5}{\sum f_i d_i^6} = B \left(\frac{1}{d} \right)_z \quad (\text{B.8})$$

Le diamètre obtenu en QELS $\overline{d_{QELS}}$ est ainsi donné par la relation (B.9) :

$$\overline{d_{QELS}} = \overline{d_{1/z}} = \frac{\sum f_i d_i^6}{\sum f_i d_i^5} \quad (\text{B.9})$$

$\overline{d_{1/z}}$ étant la moyenne harmonique en z du diamètre [346]. Il faut donc être prudent lors de l'interprétation des résultats de QELS, car la moyenne $\overline{d_{1/z}}$ surestime les grandes tailles par rapport aux petites, comme cela est illustré en Figure 68.

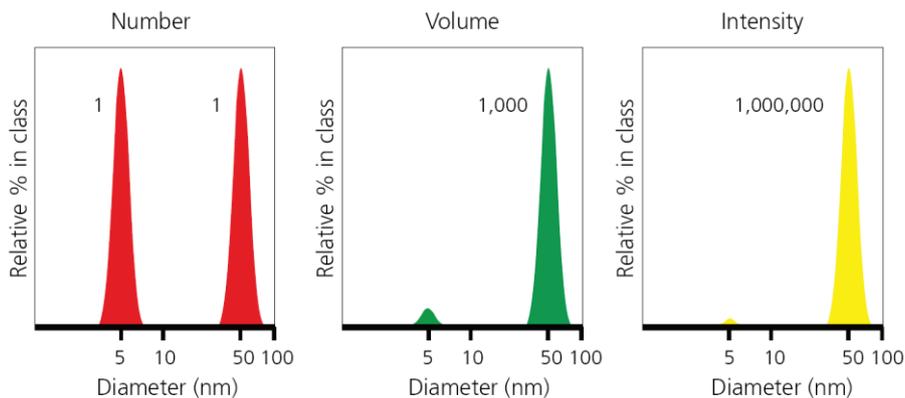


Figure 68 : Exemples de distributions en nombre, en volume et en intensité d'un même échantillon. La différence de tailles des deux populations rend quasiment invisible la plus petite des deux lorsqu'on regarde la moyenne en intensité. Illustration empruntée de la documentation Malvern.

L'appareil est également capable de mesurer le potentiel zêta, qui est lié à la charge de la particule. La détermination se fait dans des cuves spécialement dédiées permettant l'application d'un champ électrique qui met les espèces chargées en mouvement vers l'électrode de charge opposée (électrophorèse). Pour une intensité de champ donnée E , la vitesse des particules sera fonction de leur taille et leur potentiel :

$$\mu = \frac{2\varepsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa a)}{3\eta} = V \cdot E \quad (\text{B.10})$$

avec μ : la mobilité électrophorétique en $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1} / \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ κ : paramètre de Debye
 ε : la constante diélectrique du milieu a : rayon de la particule
 ζ : le potentiel zêta en mV V : la vitesse en $\mu\text{m}/\text{s}$
 $f(\kappa a)$: fonction de Henry E : le champ magnétique en V/cm

L'appareil détermine la mobilité électrophorétique moyenne des particules par mesure de l'électrophorèse par effet Doppler [347]. Cela consiste à mesurer les variations de fréquence de la lumière diffractée par les particules en mouvement. Pour des nanoparticules suffisamment grosses et un milieu polaire aqueux, on utilise généralement l'approximation de Smoluchowski, dans laquelle la double couche est considérée comme comprimée ($\kappa a > 1$, et $f(\kappa a) \rightarrow 1,5$).

ANNEXE B – SHEAR THINNING 3D-COLLOIDAL ASSEMBLIES OF
CHITOSAN AND POLY(LACTIC ACID) PARTICLES.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Chitosan/NP_{SPLA} ratios for different NP_{SPLA}/CS samples

Samples	% <i>f</i> _{CS}	% <i>f</i> _{PLA}	Amount of chitosan per g of NP _{SPLA} (<i>R_w</i>) (mg/g)	Amount of chitosan per surface of NP _{SPLA} (mg/m ²)
NP _{SPLA} /CS400	0,0067%	18%	0,37	0,02
	0,013%	18%	0,72	0,03
	0,021%	18%	1,2	0,05
	0,032%	18%	1,8	0,08
	0,052%	18%	2,9	0,12
	0,094%	18%	5,3	0,22
NP _{SPLA} /CS20	0,0066%	18%	0,37	0,02
	0,013%	18%	0,73	0,03
	0,022%	18%	1,2	0,05
	0,032%	18%	1,8	0,08
	0,052%	18%	2,9	0,12
	0,11%	18%	6,0	0,25
	0,21%	18%	12	0,51

%_f_{CS} and %_f_{PLA} are respectively the final concentrations of chitosan and NP_{SPLA} in the composite hydrogel.

Amount of chitosan per surface or mass of NP_{SPLA} are obtained from following calculations :

Specific area of NP_{SPLA} :

$$S_{spe} = \frac{S_{sph}}{m_{sph}} = \frac{3 \cdot 4\pi R^2}{4\pi R^3 \cdot d_{PLA} \cdot 10^{-3}} = \frac{3}{R \cdot d_{PLA} \cdot 10^{-3}}$$

with S_{sph} and m_{sph} the surface and the mass of one nanosphere of PLA, R (nm) the sphere radius and d_{PLA} (g/mL) the PLA density (measured equal to 1.27).

$$\text{Chitosan amount per surface of NP}_{\text{SPLA}} = \frac{m_{\text{CS}}}{m_{\text{PLA}} \cdot S_{\text{spe}}} = \frac{R_w \cdot R \cdot d_{\text{PLA}}}{3} \text{ with } m_{\text{CS}} \text{ and } m_{\text{PLA}} \text{ the}$$

mass of CS and PLA respectively in the mixture, and $\frac{m_{\text{CS}}}{m_{\text{PLA}}} = R_w$ (mg/g)

ANNEXE C – DETAILS DES CALCULS EMPLOYES DANS LA PARTIE SUR LES GELS COLLOÏDAUX

Dans le Chapitre III sont utilisés divers rapport NPs_C/NPs_{PLA} . Cette note a pour but d'éclairer le lecteur sur le détail de l'expression de ces rapports, et leur pertinence.

Calcul de R_w^{gel}

On rappelle que, dans le cas des gels colloïdaux, le rapport massique R_w^{gel} est utilisé pour caractériser le rapport de la quantité de NPs_C sur la quantité de NPs_{PLA} . Il est égal, comme développée dans l'équation (C.2), au rapport de la masse totale des NPs_C ($m_{NPs_C}^T$) sur la masse totale des NPs_{PLA} ($m_{NPs_{PLA}}^T$). Ces masses sont reliées aux à $m_{NPs_C}^{disp}$ et $m_{NPs_{PLA}}^T$ respectivement les masses de dispersions de NPs_C et de NPs_{PLA} introduites initialement, d'extraits secs respectifs $\%_{CS}^i$ et $\%_{PLA}^i$. Dans le cas des nanogels, il est nécessaire de prendre en compte le fait que ce sont des hydrogels constitués de la masse de chitosane **et** de la masse d'eau liée en introduisant la concentration C_{gel} .

$$R_w^{gel} = \frac{m_{NPs_C}^T}{m_{NPs_{PLA}}^T} = \frac{m_{NPs_C}^{disp} \cdot \%_{CS}^i \cdot \frac{1}{C_{gel}}}{m_{NPs_{PLA}}^{disp} \cdot \%_{PLA}^i} \quad (C.1)$$

$$R_w^{gel} = \frac{R_w^{sec}}{C_{gel}} \quad (C.2)$$

Calcul de R_S

Le rapport surfacique R_S est défini comme étant le rapport de la surface développée par l'ensemble des nanogels de chitosane ($S_{NPs_C}^T$) sur celle développée par l'ensemble des nanoparticules de PLA ($S_{NPs_{PLA}}^T$) (C.3).

$$R_S = \frac{S_{NPS_C}^T}{S_{NPS_{PLA}}^T} \quad (C.3)$$

On rappelle que la surface S et le volume V d'une sphère de diamètre d sont reliés par la relation (C.4).

$$S = \frac{6V}{d} \quad (C.4)$$

Ainsi, les quantités $S_{NPS_C}^T$ et $S_{NPS_{PLA}}^T$ deviennent :

$$\left\{ \begin{array}{l} S_{NPS_C}^T = \frac{6V_{NPS_C}^T}{d_{NPS_C}} \\ S_{NPS_{PLA}}^T = \frac{6V_{NPS_{PLA}}^T}{d_{NPS_{PLA}}} \end{array} \right. \quad (C.5)$$

V_i^T étant le volume total occupé par l'ensemble des particules i de diamètre d_i .

Ainsi, la combinaison de (C.3) et (C.5) permet d'obtenir (C.6):

$$R_S = \frac{d_{NPS_{PLA}}}{d_{NPS_C}} \frac{V_{NPS_C}^T}{V_{NPS_{PLA}}^T} \quad (C.6)$$

On sait également que V_i^T est relié à m_i^T , la masse totale des particules i par la relation (C.8):

$$V_i^T = m_i^T \cdot \rho_i \quad (C.7)$$

D'où :

$$R_S = \frac{d_{NPS_{PLA}}}{d_{NPS_C}} \frac{m_{NPS_C}^T}{m_{NPS_{PLA}}^T} \frac{\rho_{NPS_{PLA}}}{\rho_{NPS_C}} \quad (C.8)$$

On obtient finalement l'équation (C.9) qui relie R_S et R_w^{gel} :

$$R_S = \frac{d_{NP_{S_{PLA}}}}{d_{NP_{S_C}}} \frac{\rho_{NP_{S_{PLA}}}}{\rho_{NP_{S_C}}} R_w^{gel} \quad (C.9)$$

Calcul de R_n

Le rapport en nombre R_n est défini comme étant le rapport du nombre de nanogels de chitosane ($N_{NP_{S_C}}$) sur le nombre de nanoparticules de PLA ($N_{NP_{S_{PLA}}}$) (C.3).

$$R_n = \frac{N_{NP_{S_C}}}{N_{NP_{S_{PLA}}}} \quad (C.10)$$

Or le nombre N_i de particules i peut s'exprimer comme le rapport de la masse totale m_i^T de ces particules sur la masse m_i d'une particule. On obtient ainsi la relation (C.11).

$$R_n = \frac{\frac{m_{NP_{S_C}}^T}{m_{NP_C}}}{\frac{m_{NP_{S_{PLA}}}^T}{m_{NP_{PLA}}}} = R_w^{gel} \frac{m_{NP_{PLA}}}{m_{NP_C}} \quad (C.11)$$

Qui devient enfin :

$$R_n = R_w^{gel} \cdot \left(\frac{d_{NP_{S_{PLA}}}}{d_{NP_{S_C}}} \right)^3 \cdot \frac{\rho_{NP_{S_{PLA}}}}{\rho_{NP_{S_C}}} \quad (C.12)$$

En résumé :

$$\left\{ \begin{array}{l} R_w^{gel} = \frac{m_{NPSC}^T}{m_{NPSPLA}^T} \\ R_S = \frac{S_{NPSC}^T}{S_{NPSPLA}^T} = \frac{d_{NPSPLA}}{d_{NPSC}} \frac{\rho_{NPSPLA}}{\rho_{NPSC}} R_w^{gel} \\ R_n = \frac{N_{NPSC}}{N_{NPSPLA}} = \left(\frac{d_{NPSPLA}}{d_{NPSC}} \right)^3 \frac{\rho_{NPSPLA}}{\rho_{NPSC}} R_w^{gel} \end{array} \right. \quad (C.13)$$

La Figure 69 représente l'évolution des rapports R_S et R_n par rapport au R_w^{gel} en fonction du rapport d_{NPSPLA}/d_{NPSC} . Les courbes ont été tracées à l'aide des expressions (C.13) ci-dessus, avec comme densités $\rho_{NPSC} = 1 \text{ g/cm}^3$ et $\rho_{NPSPLA} = 1,27 \text{ g/cm}^3$, et un R_w^{gel} de 3.2 %, ce qui correspond aux conditions du maximum observé en Figure 64. Cela permet d'illustrer que, pour les deux valeurs de rapport d_{NPSPLA}/d_{NPSC} utilisées dans cette étude (représentées par les pointillés), Les rapports R_S et R_n demeurent du même ordre de grandeur que le R_w^{gel} .

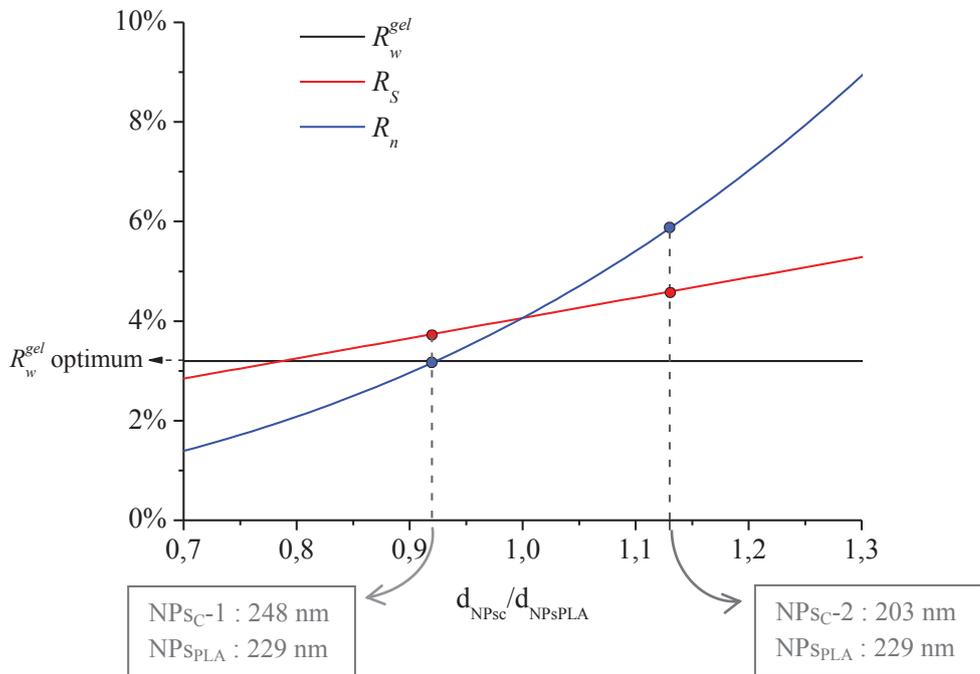


Figure 69 : Dépendance de R_w^{gel} , R_S et R_n en fonction du rapport des diamètres des $NPSC$ et des $NPSPLA$ (selon les équations (C.13)).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. Rinaudo, Chitin and Chitosan: Properties and Applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632.
- [2] K. Kurita, Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans, *Mar. Biotechnol.* 8 (2006) 203–226.
- [3] A.M. Neyrinck, L.B. Bindels, F. De Backer, B.D. Pachikian, P.D. Cani, N.M. Delzenne, Dietary Supplementation with Chitosan Derived from Mushrooms Changes Adipocytokine Profile in Diet-induced Obese Mice, a Phenomenon Linked to Its Lipid-lowering Action, *Int. Immunopharmacol.* 9 (2009) 767–773.
- [4] H. Braconnot, Sur La Nature Des Champignons, *Annales de Chimie et de Physique.* 79 (1811) 265.
- [5] A. Domard, M. Domard, Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications, in: *Polymeric Biomaterials (2nd Ed.)*, Marcel Dekker, Inc., 2002: pp. 187–212.
- [6] Y.W.N. Cho, S.H. Chung, G. Yoo, S.W. Ko, Water-soluble Chitin as a Wound Healing Accelerator, *Biomaterials.* 20 (1999) 2139–2145.
- [7] X. Jiang, L. Chen, W. Zhong, A New Linear Potentiometric Titration Method for the Determination of Deacetylation Degree of Chitosan, *Carbohydr. Polym.* 54 (2003) 457–463.
- [8] R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences, *Adv. Polym. Sci.* 186 (2005) 151–209.
- [9] O.C. Agboh, Y. Qin, Chitin and Chitosan Fibers, *Polym. Adv. Technol.* 8 (1997) 355–365.
- [10] H. Sashiwa, S. Aiba, Chemically Modified Chitin and Chitosan as Biomaterials, *Prog. Polym. Sci.* 29 (2004) 887–908.
- [11] T.-H. Kim, H.-L. Jiang, D. Jere, I.-K. Park, M.-H. Cho, J.-W. Nah, et al., Chemical Modification of Chitosan as a Gene Carrier in Vitro and in Vivo, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 726–753.
- [12] N.M. Alves, J.F. Mano, Chitosan Derivatives Obtained by Chemical Modifications for Biomedical and Environmental Applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (2008) 401–414.
- [13] S. Hirano, M. Zhang, B.G. Chung, S.K. Kim, The N-acylation of Chitosan Fibre and the N-deacetylation of Chitin Fibre and Chitin-cellulose Blended Fibre at a Solid State, *Carbohydr. Polym.* 41 (2000) 175–179.

- [14] L. Vachoud, N. Zydowicz, A. Domard, Formation and Characterisation of a Physical Chitin Gel, *Carbohydr. Res.* 302 (1997) 169–177.
- [15] K.M. Varum, M.H. Ottoy, O. Smidsrod, Acid Hydrolysis of Chitosans, *Carbohydr. Polym.* 46 (2001) 89–98.
- [16] Z. Jia, D. Shen, Effect of Reaction Temperature and Reaction Time on the Preparation of Low-molecular-weight Chitosan Using Phosphoric Acid, *Carbohydr. Polym.* 49 (2002) 393–396.
- [17] R. Czechowska-Biskup, B. Rokita, S. Lotfy, P. Ulanski, J.M. Rosiak, Degradation of Chitosan and Starch by 360-kHz Ultrasound, *Carbohydr. Polym.* 60 (2005) 175–184.
- [18] J.A. de M. Delezuk, M.B. Cardoso, A. Domard, S.P. Campana-Filho, Ultrasound-assisted Deacetylation of Beta-chitin: Influence of Processing Parameters, *Polym. Int.* 60 (2011) 903–909.
- [19] W.S. Choi, K.J. Ahn, D.W. Lee, M.W. Byun, H.J. Park, Preparation of Chitosan Oligomers by Irradiation, *Polym. Degrad. Stab.* 78 (2002) 533–538.
- [20] A. V Ilyina, V.E. Tikhonov, A.I. Albulov, V.P. Varlamov, Enzymic Preparation of Acid-free-water-soluble Chitosan, *Process Biochemistry.* 35 (2000) 563–568.
- [21] D.X. Lee, W.S. Xia, J.L. Zhang, Enzymatic Preparation of Chitooligosaccharides by Commercial Lipase, *Food Chem.* 111 (2008) 291–295.
- [22] G.G. Allan, M. Peyron, Molecular-Weight Manipulation of Chitosan .1. Kinetics of Depolymerization by Nitrous-Acid, *Carbohydr. Res.* 277 (1995) 257–272.
- [23] G.G. Allan, M. Peyron, Molecular-Weight Manipulation of Chitosan .2. Prediction and Control of Extent of Depolymerization by Nitrous-Acid, *Carbohydr. Res.* 277 (1995) 273–282.
- [24] L. Raymond, F.G. Morin, R.H. Marchessault, Degree of Deacetylation of Chitosan Using Conductometric Titration and Solid-state NMR, *Carbohydr. Res.* 246 (1993) 331–336.
- [25] Z.M. dos Santos, A.L.P.F. Caroni, M.R. Pereira, D.R. da Silva, J.L.C. Fonseca, Determination of Deacetylation Degree of Chitosan: a Comparison Between Conductometric Titration and CHN Elemental Analysis, *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 2591–2595.
- [26] R.A.A. Muzzarelli, R. Rocchetti, Determination of the Degree of Acetylation of Chitosans by First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry, *Carbohydr. Polym.* 5 (1985) 461–472.

- [27] D. Liu, Y. Wei, P. Yao, L. Jiang, Determination of the Degree of Acetylation of Chitosan by UV Spectrophotometry Using Dual Standards, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 782–785.
- [28] M. Miya, R. Iwamoto, S. Yoshikawa, S. Mima, I.r. Spectroscopic Determination of CONH Content in Highly Deacetylated Chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 2 (1980) 323–324.
- [29] A. Baxter, M. Dillon, K.D. nthony Taylor, G.A.F. Roberts, K.D. Anthony Taylor, Improved Method for I.r. Determination of the Degree of N-acetylation of Chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 14 (1992) 166–169.
- [30] A. Montebault, Elaboration d'hydrogels physiques de chitosane : Application à l'ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage, Université Claude Bernard Lyon 1, 2004.
- [31] A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima, Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan by H NMR Spectroscopy, *Polym. Bull.* 26 (1991) 87–94.
- [32] H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, *The Journal of Organic Chemistry.* 62 (1997) 7512–7515.
- [33] G. Couarraze, J.-L. Grossiord, Initiation à La Rhéologie, 3ème ed., TEC&DOC, 2000.
- [34] C. Schatz, Chitosane : comportement en solution et formation de particules., Université Claude Bernard Lyon 1, 2003.
- [35] A. Domard, N. Cartier, Glucosamine Oligomers : 3. Study of the Elution Process on Polyacrylamide Gels, Application to Other Polyamine Oligomer Series, *Polymer Communications.* 32 (1991) 116–119.
- [36] A. Domard, M. Rinaudo, Gel-Permeation Chromatography of Cationic Polymer on Cationic Porous Silica-Gels, *Polymer Communications.* 25 (1984) 55–58.
- [37] M.H. Ottoy, K.M. Varum, B.E. Christensen, M.W. Anthonsen, O. Smidsrod, Preparative and Analytical Size-exclusion Chromatography of Chitosans, *Carbohydr. Polym.* 31 (1996) 253–261.
- [38] W. Wang, S. Bo, S. Li, W. Qin, Determination of the Mark-Houwink Equation for Chitosans with Different Degrees of Deacetylation, *Int. J. Biol. Macromol.* 13 (1991) 281–285.
- [39] M. Terbojevich, A. Cosani, G. Conio, E. Marsano, E. Bianchi, Chitosan: Chain Rigidity and Mesophase Formation, *Carbohydr. Res.* 209 (1991) 251–260.

- [40] M. Terbojevich, A. Cosani, B. Focher, A. Naggi, G. Torri, Chitosans from *Euphausia Superba*. 1: Solution Properties, *Carbohydr. Polym.* 18 (1992) 35–42.
- [41] M. Rinaudo, M. Milas, P. Le Dung, Characterization of Chitosan. Influence of Ionic Strength and Degree of Acetylation on Chain Expansion, *Int. J. Biol. Macromol.* 15 (1993) 281–285.
- [42] J. Brugnerotto, J. Desbrières, G. Roberts, M. Rinaudo, Characterization of Chitosan by Steric Exclusion Chromatography, *Polymer.* 42 (2001) 9921–9927.
- [43] R.G. Beri, J. Walker, E.T. Reese, J.E. Rollings, Characterization of Chitosans via Coupled Size-exclusion Chromatography and Multiple-angle Laser Light-scattering Technique, *Carbohydr. Res.* 238 (1993) 11–26.
- [44] P. Sorlier, C. Viton, A. Domard, Relation Between Solution Properties and Degree of Acetylation of Chitosan: Role of Aging, *Biomacromolecules.* 3 (2002) 1336–1342.
- [45] C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, A. Domard, Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 641–648.
- [46] S. Hirano, H. Seino, Y. Akiyama, I. Nonaka, Biocompatibility of Chitosan by Oral and Intravenous Administrations., *Polymeric Materials Science and Engineering.* 59 (1988) 897–901.
- [47] S. Mutalik, K. Manoj, M. Reddy, P. Kushtagi, A. Usha, P. Anju, et al., Chitosan and Enteric Polymer Based Once Daily Sustained Release Tablets of Aceclofenac: In Vitro and In Vivo Studies, *AAPS PharmSciTech.* 9 (2008) 651–659.
- [48] L. Illum, N.F. Farraj, S.S. Davis, Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Peptide Drugs, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1186–1189.
- [49] O. Skaugrud, A. Hagen, B. Borgersen, M. Dornish, Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan, in: S. Harding (Ed.), *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews Vol.16*, Intercept LTD Scientific, 1999: pp. 23–40.
- [50] T.J. Aspden, J.D.T. Mason, N.S. Jones, J. Lowe, Ø. Skaugrud, L. Illum, Chitosan as a Nasal Delivery System: The Effect of Chitosan Solutions on in Vitro and in Vivo Mucociliary Transport Rates in Human Turbinates and Volunteers, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 509–513.
- [51] S. Mao, W. Sun, T. Kissel, Chitosan-based Formulations for Delivery of DNA and siRNA, *Adv. Drug Delivery Rev.* 62 (2010) 12–27.
- [52] M.J. Alonso, A. Sánchez, The Potential of Chitosan in Ocular Drug Delivery, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 1451–1463.

- [53] K.B. Eide, A.L. Norberg, E.B. Heggset, A.R. Lindbom, K.M. Vårum, V.G.H. Eijssink, et al., Human Chitotriosidase-Catalyzed Hydrolysis of Chitosan, *Biochemistry*. 51 (2012) 487–495.
- [54] M. Desorme, Filage du chitosane pour l'élaboration de textiles biomédicaux innovants, Université Claude Bernard Lyon 1, 2011.
- [55] N. Afratis, C. Gialeli, D. Nikitovic, T. Tsegenidis, E. Karousou, A.D. Theocharis, et al., Glycosaminoglycans: Key Players in Cancer Cell Biology and Treatment, *FEBS J.* 279 (2012) 1177–1197.
- [56] A. Clayer, L. Vachoud, C. Viton, A. Domard, Atypical Polysaccharide Physical Gels: Structure/property Relationships, *Macromol. Symp.* 200 (2003) 1–8.
- [57] A. Montembault, K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M.T. Corvol, A. Domard, A Material Decoy of Biological Media Based on Chitosan Physical Hydrogels: Application to Cartilage Tissue Engineering, *Biochimie*. 88 (2006) 551–564.
- [58] B.A. Cheba, Chitin and Chitosan: Marine Biopolymers with Unique Properties and Versatile Applications, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 6 (2011) 149.
- [59] C. Chatelet, O. Damour, A. Domard, Influence of the Degree of Acetylation on Some Biological Properties of Chitosan Films, *Biomaterials*. 22 (2001) 261–268.
- [60] R.W.J. Millner, A.S. Lockhart, H. Bird, C. Alexiou, A New Hemostatic Agent: Initial Life-Saving Experience With Celox (Chitosan) in Cardiothoracic Surgery, *The Annals of Thoracic Surgery*. 87 (2009) e13–14.
- [61] S.B. Rao, C.P. Sharma, Use of Chitosan as a Biomaterial: Studies on Its Safety and Hemostatic Potential, *Journal of Biomedical Materials Research*. 34 (1997) 21–28.
- [62] I.A. Sogias, A.C. Williams, V. V Khutoryanskiy, Why Is Chitosan Mucoadhesive?, *Biomacromolecules*. 9 (2008) 1837–1842.
- [63] N.G.M. Schipper, K.M. Vårum, P. Artursson, Chitosans as Absorption Enhancers for Poorly Absorbable Drugs. 1: Influence of Molecular Weight and Degree of Acetylation on Drug Transport Across Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1686–1692.
- [64] N.G.M. Schipper, S. Olsson, J.A. Hoogstraate, A.G. DeBoer, K.M. Vårum, P. Artursson, Chitosans as Absorption Enhancers for Poorly Absorbable Drugs 2: Mechanism of Absorption Enhancement, *Pharm. Res.* 14 (1997) 923–929.
- [65] S. Yu, Y. Zhao, F. Wu, X. Zhang, W. Lü, H. Zhang, et al., Nasal Insulin Delivery in the Chitosan Solution: In Vitro and in Vivo Studies, *Int. J. Pharm.* 281 (2004) 11–23.

- [66] L. Illum, I. Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe, A.N. Fisher, S.S. Davis, Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Vaccines, *Adv. Drug Delivery Rev.* 51 (2001) 81–96.
- [67] Y. Okamoto, K. Shibasaki, S. Minami, A. Matsushashi, S. Tanioka, Y. Shigemasa, Evaluation of Chitin and Chitosan on Open Wound Healing in Dogs, *Journal of Veterinary Medical Science.* 57 (1995) 851–854.
- [68] T. Kosaka, Y. Kaneko, Y. Nakada, M. Matsuura, S. Tanaka, Effect of Chitosan Implantation on Activation of Canine Macrophages and Polymorphonuclear Cells After Surgical Stress, *Journal of Veterinary Medical Science.* 58 (1996) 963–967.
- [69] H. Ueno, H. Yamada, I. Tanaka, N. Kaba, M. Matsuura, M. Okumura, et al., Accelerating Effects of Chitosan for Healing at Early Phase of Experimental Open Wound in Dogs, *Biomaterials.* 20 (1999) 1407–1414.
- [70] R.A.A. Muzzarelli, F. Greco, A. Busilacchi, V. Sollazzo, A. Gigante, Chitosan, Hyaluronan and Chondroitin Sulfate in Tissue Engineering for Cartilage Regeneration: A Review, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 723–739.
- [71] C. Jarry, C. Chaput, A. Chenite, M. Renaud, M. Buschmann, J. Leroux, Effects of Steam Sterilization on Thermogelling Chitosan-based Gels, *Journal of Biomedical Materials Research.* 58 (2001) 127–135.
- [72] E.I. Rabea, M.E.-T. Badawy, C. V Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 1457–1465.
- [73] C. Qin, H. Li, Q. Xiao, Y. Liu, J. Zhu, Y. Du, Water-solubility of Chitosan and Its Antimicrobial Activity, *Carbohydr. Polym.* 63 (2006) 367–374.
- [74] B.-E. Amborabé, J. Bonmort, P. Fleurat-Lessard, G. Roblin, Early Events Induced by Chitosan on Plant Cells, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 2317–2324.
- [75] P. Sorlier, A. Denuziere, C. Viton, A. Domard, Relation Between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan, *Biomacromolecules.* 2 (2001) 765–772.
- [76] A. Katchalsky, N. Shavit, H. Eisenberg, Dissociation of Weak Polymeric Acids and Bases, *Journal of Polymer Science.* 13 (1954) 69–84.
- [77] A. Katchalsky, Polyelectrolytes, *Pure Appl. Chem.* 26 (1971) 327–373.
- [78] K.M. Varum, M.H. Ottoy, O. Smidsrod, Water-Solubility of Partially N-Acetylated Chitosans As A Function of Ph - Effect of Chemical-Composition and Depolymerization, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 65–70.

- [79] P. Sorlier, Etude physico-chimique de solution de chitosane et relations avec ses propriétés antigéniques, Université Claude Bernard Lyon 1, **2002**.
- [80] S. Hirano, Y. Ohe, Chitosan Gels - Novel Molecular Aggregation of Chitosan in Acidic Solutions on A Facile Acylation, *Agricultural and Biological Chemistry*. 39 (**1975**) 1337–1338.
- [81] S. Hirano, R. Yamaguchi, N-acetylchitosan Gel: A Polyhydrate of Chitin, *Biopolymers*. 15 (**1976**) 1685–1691.
- [82] N. Kubota, Y. Eguchi, Facile Preparation of Water-soluble N-acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-solubility, *Polymer Journal*. 29 (**1997**) 123–127.
- [83] N. Kubota, N. Tatsumoto, T. Sano, K. Toya, A Simple Preparation of Half N-acetylated Chitosan Highly Soluble in Water and Aqueous Organic Solvents, *Carbohydr. Res.* 324 (**2000**) 268–274.
- [84] W. Burchard, S.B. Ross-Murphy, Introduction : Physical Gels From Synthetic and Biological Macromolecules, in: W. Burchard, S.B. Ross-Murphy (Eds.), *Physical Networks : Polymers and Gels*, Elsevier Applied Science, **1990**: pp. 1–15.
- [85] K. Almdal, J. Dyre, S. Hvidt, O. Kramer, Towards a Phenomenological Definition of the Term “Gel”, *Polymer Gels and Networks*. 1 (**1993**) 5–17.
- [86] T. Fuchs, W. Richtering, W. Burchard, K. Kajiwara, S. Kitamura, Gel Point in Physical Gels: Rheology and Light Scattering from Thermoreversibly Gelling Schizophyllan, *Polymer Gels and Networks*. 5 (**1997**) 541–559.
- [87] W. Argüelles-Monal, F.M. Goycoolea, C. Peniche, I. Higuera-Ciapara, Rheological Study of the Chitosan/glutaraldehyde Chemical Gel System, *Polymer Gels and Networks*. 6 (**1998**) 429–440.
- [88] M. Ruiz, A.M. Sastre, E. Guibal, Palladium Sorption on Glutaraldehyde-crosslinked Chitosan, *React. Funct. Polym.* 45 (**2000**) 155–173.
- [89] T.C. Coelho, R.R. Laus, A.S. Mangrich, V.T. de Favere, M.C.M. Laranjeira, V.T. de Favere, Effect of Heparin Coating on Epichlorohydrin Cross-linked Chitosan Microspheres on the Adsorption of Copper (II) Ions, *React. Funct. Polym.* 67 (**2007**) 468–475.
- [90] C. Nishi, N. Nakajima, Y. Ikada, In Vitro Evaluation of Cytotoxicity of Diepoxy Compounds Used for Biomaterial Modification, *Journal of Biomedical Materials Research*. 29 (**1995**) 829–834.

- [91] H.-W. Sung, R.-N. Huang, L.L.H. Huang, C.-C. Tsai, C.-T. Chiu, Feasibility Study of a Natural Crosslinking Reagent for Biological Tissue Fixation, *Journal of Biomedical Materials Research*. 42 (1998) 560–567.
- [92] F.-L. Mi, H.-W. Sung, S.-S. Shyu, Synthesis and Characterization of a Novel Chitosan-based Network Prepared Using Naturally Occurring Crosslinker, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 38 (2000) 2804–2814.
- [93] F.-L. Mi, Y.-C. Tan, H.-F. Liang, H.-W. Sung, In Vivo Biocompatibility and Degradability of a Novel Injectable-chitosan-based Implant, *Biomaterials*. 23 (2002) 181–191.
- [94] R.A.A. Muzzarelli, Genipin-crosslinked Chitosan Hydrogels as Biomedical and Pharmaceutical Aids, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 1–9.
- [95] J.F. Joanny, The Sol-gel Transition, *Physica B: Condensed Matter*. 156-157 (1989) 381–385.
- [96] N. Te, Editor., Thermoreversible Networks: Viscoelastic Properties and Structure of Gels, Springer, 1997.
- [97] S. Popa-Nita, P. Alcouffe, C. Rochas, L. David, A. Domard, Continuum of Structural Organization from Chitosan Solutions to Derived Physical Forms, *Biomacromolecules*. 11 (2010) 6–12.
- [98] R. Rivas-Araiza, P. Alcouffe, C. Rochas, A. Montembault, L. David, Micron Range Morphology of Physical Chitosan Hydrogels, *Langmuir*. 26 (2010) 17495–17504.
- [99] H.Y. Zhou, Y.P. Zhang, W.F. Zhang, X.G. Chen, Biocompatibility and Characteristics of Injectable Chitosan-based Thermosensitive Hydrogel for Drug Delivery, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1643–1651.
- [100] F.-L. Mi, S.-S. Shyu, T.-B. Wong, S.-F. Jang, S.-T. Lee, K.-T. Lu, Chitosan–polyelectrolyte Complexation for the Preparation of Gel Beads and Controlled Release of Anticancer Drug. II. Effect of pH-dependent Ionic Crosslinking or Interpolymer Complex Using Tripolyphosphate or Polyphosphate as Reagent, *J. Appl. Polym. Sci.* 74 (1999) 1093–1107.
- [101] K.I. Draget, K.M. Varum, E. Moen, H. Gynnild, O. Smidsrod, Chitosan Cross-linked with Mo(VI) Polyoxyanions: A New Gelling System, *Biomaterials*. 13 (1992) 635–638.
- [102] K. Kofuji, Y. Murata, S. Kawashima, Sustained Insulin Release with Biodegradation of Chitosan Gel Beads Prepared by Copper Ions, *Int. J. Pharm.* 303 (2005) 95–103.
- [103] S. Hirano, R. Yamaguchi, N. Fukui, M. Iwata, A Chitosan Oxalate Gel: Its Conversion to an N-acetylchitosan Gel via a Chitosan Gel, *Carbohydr. Res.* 201 (1990) 145–149.

- [104] A. Bernkop-Schnurch, T.E. Hopf, Synthesis and in Vitro Evaluation of Chitosan-thioglycolic Acid Conjugates, *Scientia Pharmaceutica*. 69 (2001) 109–118.
- [105] M. Terbojevich, A. Cosani, M. Palumbo, F. Pregolato, Structural Properties of Hyaluronic Acid in Moderately Concentrated Solutions, *Carbohydr. Res.* 149 (1986) 363–377.
- [106] H.G. Barth, J.W. Mays, Modern Methods of Polymer Characterization, Wiley, 1991.
- [107] A. Montembault, C. Viton, A. Domard, Physico-chemical Studies of the Gelation of Chitosan in a Hydroalcoholic Medium, *Biomaterials*. 26 (2005) 933–943.
- [108] A. Montembault, C. Viton, A. Domard, Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution Without Cross-Linking Agent, *Biomacromolecules*. 6 (2005) 653–662.
- [109] N.G. Vizio, Elaboration et caractérisation d'hydrogels physiques de chitosane pour la cicatrisation thérapeutique des brûlures, Université Claude Bernard Lyon 1, 2005.
- [110] L. David, A. Montembault, N.G. Vizio, A. Crepet, C. Viton, A. Domard, et al., Ordering in Bio-polyelectrolyte Chitosan Solutions, *Macromol. Symp.* 222 (2005) 281–286.
- [111] F. Dupasquier, Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré, Université Claude Bernard Lyon 1, 2011.
- [112] R.A.A. Muzzarelli, Chitins and Chitosans for the Repair of Wounded Skin, Nerve, Cartilage and Bone, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 167–182.
- [113] S. Ladet, L. David, A. Domard, Multi-membrane Hydrogels, *Nature*. 452 (2008) 76–U6.
- [114] S. Ladet, Elaboration et étude des propriétés d'un bioréacteur multi-membranaire, Université Claude Bernard Lyon 1, 2007.
- [115] S. Ladet, K. Tahiri, A.S. Montembault, A.J. Domard, M.-T.M. Corvol, Multi-membrane Chitosan Hydrogels as Chondrocytic Cell Bioreactors, *Biomaterials*. 32 (2011) 5354–5364.
- [116] R.N.R. Araiza, C. Rochas, L. David, A. Domard, Interrupted Wet-Spinning Process for Chitosan Hollow Fiber Elaboration, *Macromol. Symp.* 266 (2008) 1–5.
- [117] A. Domard, L. David, R. Rivas, Hollow, Particularly Multiple-membrane, Fibers, Their Method of Preparation by Spinning, and Device for Implementing Said Method., 2009.

- [118] C. Tual, E. Espuche, M. Escoubes, A. Domard, Transport Properties of Chitosan Membranes: Influence of Crosslinking, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 38 (2000) 1521–1529.
- [119] F.S. Kittur, K.R. Kumar, R.N. Tharanathan, Functional Packaging Properties of Chitosan Films, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A.* 206 (1998) 44–47.
- [120] Y. Jiang, Y. Li, Effects of Chitosan Coating on Postharvest Life and Quality of Longan Fruit, *Food Chem.* 73 (2001) 139–143.
- [121] Y. Jiang, J. Li, W. Jiang, Effects of Chitosan Coating on Shelf Life of Cold-stored Litchi Fruit at Ambient Temperature, *LWT -- Food Science and Technology.* 38 (2005) 757–761.
- [122] S. Noel, H. Courtney, J. Bumgardner, W. Haggard, Chitosan Films: A Potential Local Drug Delivery System for Antibiotics, *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 466 (2008) 1377–1382.
- [123] L.B. Rodrigues, H.F. Leite, M.I. Yoshida, J.B. Saliba, A.S.C. Junior, A.A.G. Faraco, In Vitro Release and Characterization of Chitosan Films as Dexamethasone Carrier, *Int. J. Pharm.* 368 (2009) 1–6.
- [124] K. Mizuno, K. Yamamura, K. Yano, T. Osada, S. Saeki, N. Takimoto, et al., Effect of Chitosan Film Containing Basic Fibroblast Growth Factor on Wound Healing in Genetically Diabetic Mice, *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 64A (2003) 177–181.
- [125] D. Ahtiok, E. Ahtiok, F. Tihminlioglu, Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 21 (2010) 2227–2236.
- [126] G. Crini, P.-M. Badot, E. Guibal, Chitine Et Chitosane : Du Biopolymère à L'application, Presses universitaires de Franche-Comté, 2009.
- [127] M. Gingras, I. Paradis, F. Berthod, Nerve Regeneration in a Collagen–chitosan Tissue-engineered Skin Transplanted on Nude Mice, *Biomaterials.* 24 (2003) 1653–1661.
- [128] K. Rinki, P.K. Dutta, Chitosan Based Scaffolds by Lyophilization and sc.CO2 Assisted Methods for Tissue Engineering Applications, *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* 47 (2010) 429–434.
- [129] J. Li, J. Pan, L. Zhang, Y. Yu, Culture of Hepatocytes on Fructose-modified Chitosan Scaffolds, *Biomaterials.* 24 (2003) 2317–2322.
- [130] K. Oungbho, B.W. Müller, Chitosan Sponges as Sustained Release Drug Carriers, *Int. J. Pharm.* 156 (1997) 229–237.

- [131] Y. Ohya, M. Shiratani, H. Kobayashi, T. Ouchi, Release Behavior of 5-Fluorouracil from Chitosan-Gel Nanospheres Immobilizing 5-Fluorouracil Coated with Polysaccharides and Their Cell Specific Cytotoxicity, *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* 31 (1994) 629–642.
- [132] T. Banerjee, S. Mitra, A. Kumar Singh, R. Kumar Sharma, A. Maitra, Preparation, Characterization and Biodistribution of Ultrafine Chitosan Nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 243 (2002) 93–105.
- [133] M.J.J. Alonso, P. Calvo, C. Remunan, J.. L. Vila Jato, Application of Nanoparticles Based on Hydrophilic Polymers as Pharmaceutical Forms for the Administration of Active Macromolecules, U.S. Patent 6649192, 2003.
- [134] B. Hu, C. Pan, Y. Sun, Z. Hou, H. Ye, X. Zeng, Optimization of Fabrication Parameters To Produce Chitosan–Triphosphate Nanoparticles for Delivery of Tea Catechins, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 7451–7458.
- [135] R. Harris, E. Lecumberri, I. Mateos-Aparicio, M. Mengibar, A. Heras, Chitosan Nanoparticles and Microspheres for the Encapsulation of Natural Antioxidants Extracted from *Ilex Paraguariensis*, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 803–806.
- [136] L. Calderón, R. Harris, M. Cordoba-Diaz, M. Elorza, B. Elorza, J. Lenoir, et al., Nano and Microparticulate Chitosan-based Systems for Antiviral Topical Delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (2013) 216–222.
- [137] A. Berthold, K. Cremer, J. Kreuter, Preparation and Characterization of Chitosan Microspheres as Drug Carrier for Prednisolone Sodium Phosphate as Model for Anti-inflammatory Drugs, *J. Controlled Release.* 39 (1996) 17–25.
- [138] S. Chen, M. Liu, S. Jin, B. Wang, Preparation of Ionic-crosslinked Chitosan-based Gel Beads and Effect of Reaction Conditions on Drug Release Behaviors, *Int. J. Pharm.* 349 (2008) 180–187.
- [139] L. Dambies, T. Vincent, A. Domard, E. Guibal, Preparation of Chitosan Gel Beads by Ionotropic Molybdate Gelation, *Biomacromolecules.* 2 (2001) 1198–1205.
- [140] C. Schatz, J.-M. Lucas, C. Viton, A. Domard, C. Pichot, T. Delair, Formation and Properties of Positively Charged Colloids Based on Polyelectrolyte Complexes of Biopolymers, *Langmuir.* 20 (2004) 7766–7778.
- [141] C. Schatz, A. Domard, C. Viton, C. Pichot, T. Delair, Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes, *Biomacromolecules.* 5 (2004) 1882–1892.
- [142] T. Delair, Colloidal Polyelectrolyte Complexes of Chitosan and Dextran Sulfate Towards Versatile Nanocarriers of Bioactive Molecules, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78 (2011) 10–18.

- [143] A. Drogoz, L. David, C. Rochas, A. Domard, T. Delair, Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides : Formation and Stoichiometry Monitoring, *Langmuir*. 23 (2007) 10950–10958.
- [144] K.L. Douglas, C.A. Piccirillo, M. Tabrizian, Effects of Alginate Inclusion on the Vector Properties of Chitosan-based Nanoparticles, *J. Controlled Release*. 115 (2006) 354–361.
- [145] S. Boddohi, N. Moore, P.A. Johnson, M.J. Kipper, Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complex Nanoparticles from Chitosan, Heparin, and Hyaluronan, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 1402–1409.
- [146] N. Duceppe, M. Tabrizian, Factors Influencing the Transfection Efficiency of Ultra Low Molecular Weight Chitosan/hyaluronic Acid Nanoparticles, *Biomaterials*. 30 (2009) 2625–2631.
- [147] Y.-H. Lin, C.-K. Chung, C.-T. Chen, H.-F. Liang, S.-C. Chen, H.-W. Sung, Preparation of Nanoparticles Composed of Chitosan/Poly- γ -glutamic Acid and Evaluation of Their Permeability Through Caco-2 Cells, *Biomacromolecules*. 6 (2005) 1104–1112.
- [148] Y. Zheng, W. Yang, C. Wang, J. Hu, S. Fu, L. Dong, et al., Nanoparticles Based on the Complex of Chitosan and Polyaspartic Acid Sodium Salt: Preparation, Characterization and the Use for 5-fluorouracil Delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 621–631.
- [149] W. Liu, S. Sun, Z. Cao, X. Zhang, K. Yao, W.W. Lu, et al., An Investigation on the Physicochemical Properties of chitosan/DNA Polyelectrolyte Complexes, *Biomaterials*. 26 (2005) 2705–2711.
- [150] R. Jayakumar, K.P. Chennazhi, R.A.A. Muzzarelli, H. Tamura, S. V Nair, N. Selvamurugan, Chitosan Conjugated DNA Nanoparticles in Gene Therapy, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 1–8.
- [151] K.A. Howard, U.L. Rahbek, X. Liu, C.K. Damgaard, S.Z. Glud, M.O. Andersen, et al., RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Chitosan/siRNA Nanoparticle System, *Mol Ther.* 14 (2006) 476–484.
- [152] C. Schatz, C. Pichot, T. Delair, C. Viton, A. Domard, Static Light Scattering Studies on Chitosan Solutions: From Macromolecular Chains to Colloidal Dispersions, *Langmuir*. 19 (2003) 9896–9903.
- [153] F. Brunel, L. Veron, L. David, A. Domard, T. Delair, A Novel Synthesis of Chitosan Nanoparticles in Reverse Emulsion, *Langmuir*. 24 (2008) 11370–11377.
- [154] J.P. Quiñones, K.V. Gothelf, J. Kjems, A.M.H. Caballero, C. Schmidt, C.P. Covas, N,O6-partially Acetylated Chitosan Nanoparticles Hydrophobically-modified for Controlled Release of Steroids and Vitamin E, *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 143–151.

- [155] C.-G. Liu, K.G.H. Desai, X.-G. Chen, H.-J. Park, Linolenic Acid-Modified Chitosan for Formation of Self-Assembled Nanoparticles, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2004) 437–441.
- [156] J. Hyung Park, S. Kwon, M. Lee, H. Chung, J.-H. Kim, Y.-S. Kim, et al., Self-assembled Nanoparticles Based on Glycol Chitosan Bearing Hydrophobic Moieties as Carriers for Doxorubicin: In Vivo Biodistribution and Anti-tumor Activity, *Biomaterials*. 27 (2006) 119–126.
- [157] J.P. Quiñones, K.V. Gothelf, J. Kijems, A.M.H. Caballero, C. Schmidt, C.P. Covas, Self-assembled Nanoparticles of Glycol Chitosan – Ergocalciferol Succinate Conjugate, for Controlled Release, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 1373–1377.
- [158] J.P. Quiñones, K.V. Gothelf, J. Kijems, C. Yang, A.M.H. Caballero, C. Schmidt, et al., Self-assembled Nanoparticles of Modified-chitosan Conjugates for the Sustained Release of D α -tocopherol, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 856–864.
- [159] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent Advances on Chitosan-based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery, *J. Controlled Release*. 100 (2004) 5–28.
- [160] D. Vllasaliu, R. Exposito-Harris, A. Heras, L. Casettari, M. Garnett, L. Illum, et al., Tight Junction Modulation by Chitosan Nanoparticles: Comparison with Chitosan Solution, *Int. J. Pharm.* 400 (2010) 183–193.
- [161] I.M. van der Lubben, J.C. Verhoef, G. Borchard, H.E. Junginger, Chitosan and Its Derivatives in Mucosal Drug and Vaccine Delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 201–207.
- [162] I.M. van der Lubben, J.C. Verhoef, G. Borchard, H.E. Junginger, Chitosan for Mucosal Vaccination, *Adv. Drug Delivery Rev.* 52 (2001) 139–144.
- [163] H. Zhang, M. Oh, C. Allen, E. Kumacheva, Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery, *Biomacromolecules*. 5 (2004) 2461–2468.
- [164] X. Wang, N. Chi, X. Tang, Preparation of Estradiol Chitosan Nanoparticles for Improving Nasal Absorption and Brain Targeting, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 735–740.
- [165] M. Köping-Höggård, I. Tubulekas, H. Guan, K. Edwards, M. Nilsson, K.M. Varum, et al., Chitosan as a Nonviral Gene Delivery System. Structure-property Relationships and Characteristics Compared with Polyethylenimine in Vitro and After Lung Administration in Vivo, *Gene Ther.* 8 (2001) 1108–1121.
- [166] T. Kean, S. Roth, M. Thanou, Trimethylated Chitosans as Non-viral Gene Delivery Vectors: Cytotoxicity and Transfection Efficiency, *J. Controlled Release*. 103 (2005) 643–653.

- [167] T. Sato, T. Ishii, Y. Okahata, In Vitro Gene Delivery Mediated by Chitosan. Effect of pH, Serum, and Molecular Mass of Chitosan on the Transfection Efficiency, *Biomaterials*. 22 (2001) 2075–2080.
- [168] X. Zhang, C. Yu, XuShi, C. Zhang, T. Tang, K. Dai, Direct Chitosan-mediated Gene Delivery to the Rabbit Knee Joints in Vitro and in Vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (2006) 202–208.
- [169] H.-D. Lu, H.-Q. Zhao, K. Wang, L.-L. Lv, Novel Hyaluronic Acid–chitosan Nanoparticles as Non-viral Gene Delivery Vectors Targeting Osteoarthritis, *Int. J. Pharm.* 420 (2011) 358–365.
- [170] H. Yang, B. Yuan, Y. Lu, R. Cheng, Preparation of Magnetic Chitosan Microspheres and Its Applications in Wastewater Treatment, *Science in China Series B: Chemistry*. 52 (2009) 249–256 LA – English.
- [171] E. Guibal, Heterogeneous Catalysis on Chitosan-based Materials: a Review, *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 71–109.
- [172] D. Hritcu, D. Humelnicu, G. Dodi, M.I. Popa, Magnetic Chitosan Composite Particles: Evaluation of Thorium and Uranyl Ion Adsorption from Aqueous Solutions, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1185–1191.
- [173] S.M. Nomanbhay, K. Palanisamy, Removal of Heavy Metal from Industrial Wastewater Using Chitosan Coated Oil Palm Shell Charcoal, *Electronic Journal of Biotechnology; Vol 8, No 1 (2005)*. (2005) .
- [174] G. Oguntimein, O. Animashaun, I. Okpere, Application of Chitosan in Remediation of Dyes, in: E. Nzewi, G. Reddy, S. Luster-Teasley, V. Kabadi, S.-Y. Chang, K. Schimmel, et al. (Eds.), Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology SE - 43, Springer New York, 2009: pp. 319–324 LA – English.
- [175] J. Panyam, V. Labhasetwar, Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue, *Adv. Drug Delivery Rev.* 55 (2003) 329–347.
- [176] M. Köping-Höggard, A. Sanchez, M.J. Alonso, Nanoparticles as Carriers for Nasal Vaccine Delivery, *Expert Review of Vaccines*. 4 (2005) 185–196.
- [177] L.-Y. Sun, S.-Z. Lin, Y.-S. Li, H.-J. Harn, T.-W. Chiou, Functional Cells Cultured on Microcarriers for Use in Regenerative Medicine Research, *Cell Transplantation*. 20 (2011) 49–62.
- [178] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, *Cell*. 126 (2006) 677–689.

- [179] J.-Y. Rho, T.Y. Tsui, G.M. Pharr, Elastic Properties of Human Cortical and Trabecular Lamellar Bone Measured by Nanoindentation, *Biomaterials*. 18 (1997) 1325–1330.
- [180] S. Varghese, N.S. Hwang, A.C. Canver, P. Theprungsirikul, D.W. Lin, J. Elisseeff, Chondroitin Sulfate Based Niches for Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, *Matrix Biol.* 27 (2008) 12–21.
- [181] T.A. Holland, Y. Tabata, A.G. Mikos, In Vitro Release of Transforming Growth Factor- β 1 from Gelatin Microparticles Encapsulated in Biodegradable, Injectable Oligo(poly(ethylene Glycol) Fumarate) Hydrogels, *J. Controlled Release*. 91 (2003) 299–313.
- [182] T.A. Holland, J.K. V Tessmar, Y. Tabata, A.G. Mikos, Transforming Growth Factor B1 Release from Oligo(poly(ethylene Glycol) Fumarate) Hydrogels in Conditions That Model the Cartilage Wound Healing Environment, *J. Controlled Release*. 94 (2004) 101–114.
- [183] H. Park, J.S. Temenoff, T.A. Holland, Y. Tabata, A.G. Mikos, Delivery of TGF- β 1 and Chondrocytes via Injectable, Biodegradable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering Applications, *Biomaterials*. 26 (2005) 7095–7103.
- [184] H. Park, J.S. Temenoff, Y. Tabata, A.I. Caplan, A.G. Mikos, Injectable Biodegradable Hydrogel Composites for Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cell and Growth Factor Delivery for Cartilage Tissue Engineering, *Biomaterials*. 28 (2007) 3217–3227.
- [185] H. Park, J.S. Temenoff, Y. Tabata, A.I. Caplan, R.M. Raphael, J.A. Jansen, et al., Effect of Dual Growth Factor Delivery on Chondrogenic Differentiation of Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in Injectable Hydrogel Composites, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 88A (2009) 889–897.
- [186] H. Park, X. Guo, J.S. Temenoff, Y. Tabata, A.I. Caplan, F.K. Kasper, et al., Effect of Swelling Ratio of Injectable Hydrogel Composites on Chondrogenic Differentiation of Encapsulated Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 541–546.
- [187] X. Guo, H. Park, S. Young, J.D. Kretlow, J.J. van den Beucken, L.S. Baggett, et al., Repair of Osteochondral Defects with Biodegradable Hydrogel Composites Encapsulating Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Model, *Acta Biomaterialia*. 6 (2010) 39–47.
- [188] T.A. Holland, E.W.H. Bodde, L.S. Baggett, Y. Tabata, A.G. Mikos, J.A. Jansen, Osteochondral Repair in the Rabbit Model Utilizing Bilayered, Degradable Oligo(poly(ethylene Glycol) Fumarate) Hydrogel Scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 75A (2005) 156–167.

- [189] T.A. Holland, E.W.H. Bodde, V.M.J.I. Cuijpers, L.S. Baggett, Y. Tabata, A.G. Mikos, et al., Degradable Hydrogel Scaffolds for in Vivo Delivery of Single and Dual Growth Factors in Cartilage Repair, *Osteoarthritis and Cartilage*. 15 (2007) 187–197.
- [190] X. Guo, H. Park, G. Liu, W. Liu, Y. Cao, Y. Tabata, et al., In Vitro Generation of an Osteochondral Construct Using Injectable Hydrogel Composites Encapsulating Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells, *Biomaterials*. 30 (2009) 2741–2752.
- [191] X. Guo, J. Liao, H. Park, A. Saraf, R.M. Raphael, Y. Tabata, et al., Effects of TGF- β 3 and Preculture Period of Osteogenic Cells on the Chondrogenic Differentiation of Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in a Bilayered Hydrogel Composite, *Acta Biomaterialia*. 6 (2010) 2920–2931.
- [192] Y. Hong, Y. Gong, C. Gao, J. Shen, Collagen-coated Polylactide Microcarriers/chitosan Hydrogel Composite: Injectable Scaffold for Cartilage Regeneration, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 85A (2008) 628–637.
- [193] C. Wang, Y. Gong, Y. Zhong, Y. Yao, K. Su, D.-A. Wang, The Control of Anchorage-dependent Cell Behavior Within a Hydrogel/microcarrier System in an Osteogenic Model, *Biomaterials*. 30 (2009) 2259–2269.
- [194] T.T. Lau, C. Wang, D.-A. Wang, Cell Delivery with Genipin Crosslinked Gelatin Microspheres in Hydrogel/microcarrier Composite, *Composites Science and Technology*. 70 (2010) 1909–1914.
- [195] C. Wang, G.N. Adrianus, N. Sheng, S. Toh, Y. Gong, D.-A. Wang, In Vitro Performance of an Injectable Hydrogel/microsphere Based Immunocyte Delivery System for Localised Anti-tumour Activity, *Biomaterials*. 30 (2009) 6986–6995.
- [196] Q. Hou, D.Y.S. Chau, C. Pratoomsot, P.J. Tighe, H.S. Dua, K.M. Shakesheff, et al., In Situ Gelling Hydrogels Incorporating Microparticles as Drug Delivery Carriers for Regenerative Medicine, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3972–3980.
- [197] Z. Huang, J. Tian, B. Yu, Y. Xu, Q. Feng, A Bone-like Nano-hydroxyapatite/collagen Loaded Injectable Scaffold, *Biomedical Materials*. 4 (2009) 55005.
- [198] Z. Huang, Q. Feng, B. Yu, S. Li, Biomimetic Properties of an Injectable Chitosan/nano-hydroxyapatite/collagen Composite, *Materials Science and Engineering: C*. 31 (2011) 683–687.
- [199] Z. Huang, B. Yu, Q. Feng, S. Li, Y. Chen, L. Luo, In Situ-forming Chitosan/nano-hydroxyapatite/collagen Gel for the Delivery of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, *Carbohydr. Polym.* 85 (2011) 261–267.
- [200] E.C. Cho, J.W. Kim, A. Fernandez-Nieves, D.A. Weitz, Highly Responsive Hydrogel Scaffolds Formed by Three-Dimensional Organization of Microgel Nanoparticles, *Nano Lett.* 8 (2007) 168–172.

- [201] C. Gogelein, G. Nagele, J. Buitenhuis, R. Tuinier, J.K.G. Dhont, Polymer Depletion-driven Cluster Aggregation and Initial Phase Separation in Charged Nanosized Colloids, *J. Chem. Phys.* 130 (2009) 204905.
- [202] A. Milling, B. Vincent, Depletion-induced Aggregation and Colloidal Phase Separation, *Colloid-Polym. Interact.* (1999) 147–173.
- [203] E.C. Cho, J.W. Kim, D.C. Hyun, U. Jeong, D.A. Weitz, Regulating Volume Transitions of Highly Responsive Hydrogel Scaffolds by Adjusting the Network Properties of Microgel Building Block Colloids, *Langmuir*. 26 (2010) 3854–3859.
- [204] H. Arimura, T. Ouchi, A. Kishida, Y. Ohya, Preparation of a Hyaluronic Acid Hydrogel Through Polyion Complex Formation Using Cationic Polylactide-based Microspheres as a Biodegradable Cross-linking Agent, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 16 (2005) 1347–1358.
- [205] Y.S. Pek, A.C.A. Wan, A. Shekaran, L. Zhuo, J.Y. Ying, A Thixotropic Nanocomposite Gel for Three-dimensional Cell Culture, *Nature Nanotechnology*. 3 (2008) 671–675.
- [206] Y.S. Pek, A.C.A. Wan, J.Y. Ying, The Effect of Matrix Stiffness on Mesenchymal Stem Cell Differentiation in a 3D Thixotropic Gel, *Biomaterials*. 31 (2010) 385–391.
- [207] D. Dikovsky, H. Bianco-Peled, D. Seliktar, Defining the Role of Matrix Compliance and Proteolysis in Three-Dimensional Cell Spreading and Remodeling, *Biophys. J.* 94 (2008) 2914–2925.
- [208] Y.S. Pek, A.C.A. Wan, Characterization of Early Extracellular Matrix Secretions in a Three-dimensional Thixotropic Cell Culture System, *Acta Biomaterialia*. 7 (2011) 3981–3987.
- [209] E. Tamariz, A.C.A. Wan, Y.S. Pek, M. Giordano, G. Hernández-Padrón, A. Varela-Echavarría, et al., Delivery of Chemotropic Proteins and Improvement of Dopaminergic Neuron Outgrowth Through a Thixotropic Hybrid Nano-gel, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 22 (2011) 2097–2109.
- [210] X. He, H. Nie, K. Wang, W. Tan, X. Wu, P. Zhang, In Vivo Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9597–9603.
- [211] A. Kunzmann, B. Andersson, T. Thurnherr, H. Krug, A. Scheynius, B. Fadeel, Toxicology of Engineered Nanomaterials: Focus on Biocompatibility, Biodistribution and Biodegradation, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1810 (2011) 361–373.
- [212] A.T. Bauer, E.A. Strozyk, C. Gorzelanny, C. Westerhausen, A. Desch, M.F. Schneider, et al., Cytotoxicity of Silica Nanoparticles Through Exocytosis of Von Willebrand

- Factor and Necrotic Cell Death in Primary Human Endothelial Cells, *Biomaterials*. 32 (2011) 8385–8393.
- [213] V. Rabolli, L.C.J. Thomassen, F. Uwambayinema, J.A. Martens, D. Lison, The Cytotoxic Activity of Amorphous Silica Nanoparticles Is Mainly Influenced by Surface Area and Not by Aggregation, *Toxicol. Lett.* 206 (2011) 197–203.
- [214] Q. Li, J.A. Lewis, Nanoparticle Inks for Directed Assembly of Three-Dimensional Periodic Structures, *Advanced Materials*. 15 (2003) 1639–1643.
- [215] J.E. Smay, J. Cesarano, J.A. Lewis, Colloidal Inks for Directed Assembly of 3-D Periodic Structures, *Langmuir*. 18 (2002) 5429–5437.
- [216] A. Higuchi, T. Yamamoto, K. Sugiyama, S. Hayashi, T.M. Tak, T. Nakagawa, Temperature-Dependent Cell Detachment on Pluronic Gels, *Biomacromolecules*. 6 (2005) 691–696.
- [217] B. Xie, R. Parkhill, W. Warren, J.E. Smay, Direct Writing of Three-Dimensional Polymer Scaffolds Using Colloidal Gels, *Adv. Funct. Mater.* 16 (2006) 1685–1693.
- [218] S.R. Abulatefeh, A.O. Saeed, J.W. Aylott, W.C. Chan, M.C. Garnett, B.R. Saunders, et al., Facile Synthesis of Responsive Nanoparticles with Reversible, Tunable and Rapid Thermal Transitions from Biocompatible Constituents, *Chemical Communications*. (2009) 6068–6070.
- [219] W. Wang, H. Liang, R. Cheikh Al Ghanami, L. Hamilton, M. Fraylich, K.M. Shakesheff, et al., Biodegradable Thermoresponsive Microparticle Dispersions for Injectable Cell Delivery Prepared Using a Single-Step Process, *Advanced Materials*. 21 (2009) 1809–1813.
- [220] Y. Liang, Y. Qiao, S. Guo, L. Wang, C. Xie, Y. Zhai, et al., Thermoreversible Gelation of Poly(ethylene Glycol)/poly(ester Anhydride) Triblock Copolymer Nanoparticles for Injectable Drug Delivery Systems, *Soft Matter*. 6 (2010) 1915–1922.
- [221] W. Wang, L. Chang, X. Li, Y. Wu, J. Xing, L. Deng, et al., Controlled Thermal Gelation of Poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene Glycol) Block Copolymers by Modifying Cyclic Ether Pendant Groups on Poly(ϵ -caprolactone), *Soft Matter*. 8 (2012) 1575–1583.
- [222] M.R. Fraylich, R. Liu, S.M. Richardson, P. Baird, J. Hoyland, A.J. Freemont, et al., Thermally-triggered Gelation of PLGA Dispersions: Towards an Injectable Colloidal Cell Delivery System, *J. Colloid Interface Sci.* 344 (2010) 61–69.
- [223] K. Nishinari, Some Thoughts on the Definition of a Gel, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 136 (2009) 87–94.

- [224] R. Cheikh Al Ghanami, B.R. Saunders, C. Bosquillon, K.M. Shakesheff, C. Alexander, Responsive Particulate Dispersions for Reversible Building and Deconstruction of 3D Cell Environments, *Soft Matter*. 6 (2010) 5037–5044.
- [225] H. Arimura, Y. Ohya, T. Ouchi, H. Yamada, Preparation of a Biodegradable Matrix Through Polyion Complex Formation by Mixing Polylactide-based Microspheres Having Oppositely Charged Surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 270 (2004) 299–303.
- [226] S.R. Van Tomme, M.J. van Steenberg, S.C. De Smedt, C.F. van Nostrum, W.E. Hennink, Self-gelling Hydrogels Based on Oppositely Charged Dextran Microspheres, *Biomaterials*. 26 (2005) 2129–2135.
- [227] S.R. Van Tomme, C.F. van Nostrum, M. Dijkstra, S.C. De Smedt, W.E. Hennink, Effect of Particle Size and Charge on the Network Properties of Microsphere-based Hydrogels, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 522–530.
- [228] S.R. Van Tomme, C.F. van Nostrum, S.C. De Smedt, W.E. Hennink, Degradation Behavior of Dextran Hydrogels Composed of Positively and Negatively Charged Microspheres, *Biomaterials*. 27 (2006) 4141–4148.
- [229] S.R. Van Tomme, B.G. De Geest, K. Braeckmans, S.C. De Smedt, F. Siepmann, J. Siepmann, et al., Mobility of Model Proteins in Hydrogels Composed of Oppositely Charged Dextran Microspheres Studied by Protein Release and Fluorescence Recovery After Photobleaching, *J. Controlled Release*. 110 (2005) 67–78.
- [230] Q. Wang, L. Wang, M. Detamore, C. Berkland, Biodegradable Colloidal Gels as Moldable Tissue Engineering Scaffolds, *Advanced Materials*. 20 (2008) 236–239.
- [231] Q. Wang, J. Wang, Q. Lu, M.S. Detamore, C. Berkland, Injectable PLGA Based Colloidal Gels for Zero-order Dexamethasone Release in Cranial Defects, *Biomaterials*. 31 (2010) 4980–4986.
- [232] Q. Wang, S. Jamal, M.S. Detamore, C. Berkland, PLGA-chitosan/PLGA-alginate Nanoparticle Blends as Biodegradable Colloidal Gels for Seeding Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 96A (2011) 520–527.
- [233] H. Wang, M.B. Hansen, D.W.P.M. Löwik, J.C.M. van Hest, Y. Li, J.A. Jansen, et al., Oppositely Charged Gelatin Nanospheres as Building Blocks for Injectable and Biodegradable Gels, *Advanced Materials*. 23 (2011) H119–H124.
- [234] H. Wang, O.C. Boerman, K. Sariibrahimoglu, Y. Li, J.A. Jansen, S.C.G. Leeuwenburgh, Comparison of Micro- Vs. Nanostructured Colloidal Gelatin Gels for Sustained Delivery of Osteogenic Proteins: Bone Morphogenetic Protein-2 and Alkaline Phosphatase, *Biomaterials*. 33 (2012) 8695–8703.
- [235] R.J. DeVolder, H.J. Kong, Three Dimensionally Flocculated Proangiogenic Microgels for Neovascularization, *Biomaterials*. 31 (2010) 6494–6501.

- [236] S.R. Van Tomme, A. Mens, C.F. van Nostrum, W.E. Hennink, Macroscopic Hydrogels by Self-assembly of Oligolactate-grafted Dextran Microspheres, *Biomacromolecules*. 9 (2008) 158–165.
- [237] M. Borden, M. Attawia, Y. Khan, C.T. Laurencin, Tissue Engineered Microsphere-based Matrices for Bone Repair:: Design and Evaluation, *Biomaterials*. 23 (2002) 551–559.
- [238] X. Shi, Y. Wang, L. Ren, C. Lai, Y. Gong, D.-A. Wang, A Novel Hydrophilic Poly(lactide-co-glycolide)/lecithin Hybrid Microspheres Sintered Scaffold for Bone Repair, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 92A (2010) 963–972.
- [239] J.L. Brown, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Solvent/non-solvent Sintering: A Novel Route to Create Porous Microsphere Scaffolds for Tissue Regeneration, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*. 86B (2008) 396–406.
- [240] A. Jaklenec, E. Wan, M.E. Murray, E. Mathiowitz, Novel Scaffolds Fabricated from Protein-loaded Microspheres for Tissue Engineering, *Biomaterials*. 29 (2008) 185–192.
- [241] M. Singh, C.P. Morris, R.J. Ellis, M.S. Detamore, C. Berkland, Microsphere-Based Seamless Scaffolds Containing Macroscopic Gradients of Encapsulated Factors for Tissue Engineering., *Tissue Engineering, Part C: Methods*. 14 (2008) 299–309.
- [242] M. Singh, B. Sandhu, A. Scurto, C. Berkland, M.S. Detamore, Microsphere-based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: Using Subcritical CO₂ as a Sintering Agent, *Acta Biomaterialia*. 6 (2010) 137–143.
- [243] X. Shi, K. Su, R. Varshney, Y. Wang, D.-A. Wang, Sintered Microsphere Scaffolds for Controlled Release and Tissue Engineering, *Pharm. Res*. 28 (2011) 1224–1228.
- [244] A. Luciani, V. Guarino, L. Ambrosio, P. Netti, Solvent and Melting Induced Microspheres Sintering Techniques: a Comparative Study of Morphology and Mechanical Properties, *J. Mater. Sci.: Mater. Med*. 22 (2011) 2019–2028.
- [245] W.I. Abdel-Fattah, T. Jiang, G.E.-T. El-Bassyouni, C.T. Laurencin, Synthesis, Characterization of Chitosans and Fabrication of Sintered Chitosan Microsphere Matrices for Bone Tissue Engineering, *Acta Biomaterialia*. 3 (2007) 503–514.
- [246] X. Shi, L. Ren, M. Tian, J. Yu, W. Huang, C. Du, et al., In Vivo and in Vitro Osteogenesis of Stem Cells Induced by Controlled Release of Drugs from Microspherical Scaffolds, *J. Mater. Chem*. 20 (2010) 9140–9148.
- [247] T. Jiang, W.I. Abdel-Fattah, C.T. Laurencin, In Vitro Evaluation of Chitosan/poly(lactic Acid-glycolic Acid) Sintered Microsphere Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Biomaterials*. 27 (2006) 4894–4903.

- [248] H. Liang, K. Wang, A.L. Shimer, X. Li, G. Balian, F.H. Shen, Use of a Bioactive Scaffold for the Repair of Bone Defects in a Novel Reproducible Vertebral Body Defect Model, *Bone*. 47 (2010) 197–204.
- [249] M.D. Kofron, J.A. Cooper, S.G. Kumbar, C.T. Laurencin, Novel Tubular Composite Matrix for Bone Repair, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 82A (2007) 415–425.
- [250] X. Shi, Y. Wang, L. Ren, N. Zhao, Y. Gong, D.-A. Wang, Novel Mesoporous Silica-based Antibiotic Releasing Scaffold for Bone Repair, *Acta Biomaterialia*. 5 (2009) 1697–1707.
- [251] J. Yao, S. Radin, P. S. Leboy, P. Ducheyne, The Effect of Bioactive Glass Content on Synthesis and Bioactivity of Composite Poly (lactic-co-glycolic Acid)/bioactive Glass Substrate for Tissue Engineering, *Biomaterials*. 26 (2005) 1935–1943.
- [252] E.S. Miranda, T.H. Silva, R.L. Reis, J.F. Mano, Nanostructured Natural-Based Polyelectrolyte Multilayers to Agglomerate Chitosan Particles into Scaffolds for Tissue Engineering., *Tissue Engineering, Part A*. 17 (2011) 2663–2674.
- [253] C.M. Nelson, R.P. Jean, J.L. Tan, W.F. Liu, N.J. Sniadecki, A.A. Spector, et al., Emergent Patterns of Growth Controlled by Multicellular Form and Mechanics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 11594–11599.
- [254] N.D. Evans, C. Minelli, E. Gentleman, V. Lapointe, S.N. Patankar, M. Kallivretaki, et al., Substrate Stiffness Affects Early Differentiation Events in Embryonic Stem Cells, *European Cells and Materials*. 18 (2009) 1–14.
- [255] K. Chatterjee, S. Lin-Gibson, W.E. Wallace, S.H. Parekh, Y.J. Lee, M.T. Cicerone, et al., The Effect of 3D Hydrogel Scaffold Modulus on Osteoblast Differentiation and Mineralization Revealed by Combinatorial Screening, *Biomaterials*. 31 (2010) 5051–5062.
- [256] O. Choi, K.K. Deng, N.-J. Kim, L. Ross Jr., R.Y. Surampalli, Z. Hu, The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles, Silver Ions, and Silver Chloride Colloids on Microbial Growth, *Water Res.* 42 (2008) 3066–3074.
- [257] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54 (2002) 631–651.
- [258] W. Zhang, Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview, *Journal of Nanoparticle Research*. 5 (2003) 323–332.
- [259] C. Buzea, I. Pacheco, K. Robbie, Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity, *Biointerphases*. 2 (2007) MR17–MR71 LA – English.

- [260] G. Bystrzejewska-Piotrowska, J. Golimowski, P.L. Urban, Nanoparticles: Their Potential Toxicity, Waste and Environmental Management, *Waste Management*. 29 (2009) 2587–2595.
- [261] J.-P. Foulon, P. Couvreur, Nanotechnologies Et Médicaments, *L'actualité Chimique*. 363 (2012) 29–30.
- [262] F. Brunel, Elaboration de colloïdes à partir de polysaccharide en émulsion inverse : application comme vecteurs de biomolécules., Université Claude Bernard Lyon 1, 2008.
- [263] K.A. Traul, A. Driedger, D.L. Ingle, D. Nakhasi, Review of the Toxicologic Properties of Medium-chain Triglycerides, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 79–98.
- [264] M. Antonietti, K. Landfester, Polyreactions in Miniemulsions, *Prog. Polym. Sci.* 27 (2002) 689–757.
- [265] B.P. Binks, Editor., Modern Aspects of Emulsion Science, Royal Soc. Chem., 1998.
- [266] K. Landfester, M. Willert, M. Antonietti, Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions, *Macromolecules*. 33 (2000) 2370–2376.
- [267] M. Porras, C. Solans, C. Gonzalez, J.M. Gutierrez, Properties of Water-in-oil (W/O) Nano-emulsions Prepared by a Low-energy Emulsification Method, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 324 (2008) 181–188.
- [268] S.F. Medeiros, A.M. Santos, H. Fessi, A. Elaissari, Synthesis of biocompatible and thermally sensitive poly(N-vinylcaprolactam) nanogels via inverse miniemulsion polymerization: Effect of the surfactant concentration, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 48 (2010) 3932–3941.
- [269] P. Taylor, Ostwald Ripening in Emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 75 (1998) 107–163.
- [270] D.R. Lide, Handbook of Chemistry and Physics, 87th Ed., CRC Press, 2006.
- [271] F. Brunel, L. Veron, C. Ladaviere, L. David, A. Domard, T. Delair, Synthesis and Structural Characterization of Chitosan Nanogels, *Langmuir*. 25 (2009) 8935–8943.
- [272] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates, *Pharm. Res.* 27 (2010) 796–810.
- [273] C. Wu, S. Zhou, S.C.F. Au-yeung, S. Jiang, Volume Phase Transition of Spherical Microgel Particles, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*. 240 (1996) 123–136.

- [274] H. Senff, W. Richtering, Influence of Cross-link Density on Rheological Properties of Temperature-sensitive Microgel Suspensions, *Colloid & Polymer Science*. 278 (2000) 830–840.
- [275] J. Gao, Z. Hu, Optical Properties of N-Isopropylacrylamide Microgel Spheres in Water, *Langmuir*. 18 (2002) 1360–1367.
- [276] X. Xia, Z. Hu, Synthesis and Light Scattering Study of Microgels with Interpenetrating Polymer Networks, *Langmuir*. 20 (2004) 2094–2098.
- [277] Z. Hu, Crystallization of Microgel Spheres, in: *Microgel Suspensions*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011: pp. 207–228.
- [278] B.H. Zimm, Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering; Preliminary Results on Polystyrene Solutions, *J. Chem. Phys.* 16 (1948) 1099–1116.
- [279] P. Schurtenberger, E.M. Newman, Characterization of biological and environmental particles using static and dynamic light scattering, in: J. Buffle, H.P. van Leeuwen (Eds.), *Environmental Particles*, Vol. 2, CRC Press Inc, 1993: pp. 37–115.
- [280] R.J.H. Stenekes, W.E. Hennink, Equilibrium Water Content of Microspheres Based on Cross-linked Dextran, *Int. J. Pharm.* 189 (1999) 131–135.
- [281] R. Erni, M.D. Rossell, C. Kisielowski, U. Dahmen, Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe, *Phys. Rev. Lett.* 102 (2009) 96101.
- [282] D.P. Siegel, W.J. Green, Y. Talmon, The Mechanism of Lamellar-to-inverted Hexagonal Phase Transitions: a Study Using Temperature-jump Cryo-electron Microscopy, *Biophys. J.* 66 (1994) 402–414.
- [283] H. Cui, T.K. Hodgdon, E.W. Kaler, L. Abezgauz, D. Danino, M. Lubovsky, et al., Elucidating the Assembled Structure of Amphiphiles in Solution via Cryogenic Transmission Electron Microscopy, *Soft Matter*. 3 (2007) 945–955.
- [284] H. Friedrich, P.M. Frederik, G. de With, N.A.J.M. Sommerdijk, G. de With, Imaging of Self-Assembled Structures: Interpretation of TEM and Cryo-TEM Images, *Angewandte Chemie International Edition*. 49 (2010) 7850–7858.
- [285] X. Zhang, H. Yang, Y. Song, Q. Zheng, Rheological Behaviors of Randomly Crosslinked Low Density Polyethylene and Its Gel Network, *Polymer*. 53 (2012) 3035–3042.
- [286] J. Moura, M. Figueiredo, H. Gil, Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 3823–3829.

- [287] K. Kamiński, K. Zazakowny, K. Szczubiałka, M. Nowakowska, pH-Sensitive Genipin-Cross-Linked Chitosan Microspheres For Heparin Removal, *Biomacromolecules*. 9 (2008) 3127–3132.
- [288] M.F. Butler, Y.-F. Ng, P.D.A. Pudney, Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction Between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 41 (2003) 3941–3953.
- [289] F.-L. Mi, S.-S. Shyu, C.-K. Peng, Characterization of Ring-opening Polymerization of Genipin and pH-dependent Cross-linking Reactions Between Chitosan and Genipin, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 43 (2005) 1985–2000.
- [290] D.E. Koppel, Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants, *J. Chem. Phys.* 57 (1972) 4814–4820.
- [291] F. Brunel, L. Véron, L. David, A. Domard, B. Verrier, T. Delair, Self-Assemblies on Chitosan Nanohydrogels, *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 424–432.
- [292] R.G. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids*, 1999.
- [293] A.D. Metcalfe, M.W.J. Ferguson, Tissue Engineering of Replacement Skin: The Crossroads of Biomaterials, Wound Healing, Embryonic Development, Stem Cells and Regeneration, *J. R. Soc., Interface*. 4 (2007) 413–437.
- [294] L.G. Griffith, G. Naughton, Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities, *Science*. 295 (2002) 1009–1014.
- [295] E.M. Darling, K.A. Athanasiou, Biomechanical Strategies for Articular Cartilage Regeneration, *Ann. Biomed. Eng.* 31 (2003) 1114–1124.
- [296] T. Delair, In Situ Forming Polysaccharide-based 3D-hydrogels for Cell Delivery in Regenerative Medicine, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1013–1019.
- [297] M.K. Nguyen, D.S. Lee, Injectable Biodegradable Hydrogels, *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 563–579.
- [298] R. Roux, C. Ladavière, A. Montembault, T. Delair, Particle Assemblies: Toward New Tools for Regenerative Medicine, *Mater. Sci. Eng., C*. 33 (2013) 997–1007.
- [299] M.W. Tibbitt, K.S. Anseth, Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture, *Biotechnol. Bioeng.* 103 (2009) 655–663.
- [300] S.R. Van Tomme, G. Storm, W.E. Hennink, In Situ Gelling Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications, *Int. J. Pharm.* 355 (2008) 1–18.
- [301] K.T. Nguyen, J.L. West, Photopolymerizable Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Biomaterials*. 23 (2002) 4307–4314.

- [302] Q. Hou, P.A. De Bank, K.M. Shakesheff, Injectable Scaffolds for Tissue Regeneration, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 1915–1923.
- [303] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel Crosslinking Methods to Design Hydrogels, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54 (2002) 13–36.
- [304] J.M. Anderson, M.S. Shive, Biodegradation and Biocompatibility of PLA and PLGA Microspheres, *Adv. Drug Delivery Rev.* 28 (1997) 5–24.
- [305] X. Shi, Y. Wang, R.R. Varshney, L. Ren, Y. Gong, D.-A. Wang, Microsphere-based Drug Releasing Scaffolds for Inducing Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro, *Eur. J. Pharm. Sci.* 39 (2010) 59–67.
- [306] A.A. Ignatius, L.E. Claes, In Vitro Biocompatibility of Bioresorbable Polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide), *Biomaterials.* 17 (1996) 831–839.
- [307] D.L. Biggs, C.S. Lengsfeld, B.M. Hybertson, K. Ng, M.C. Manning, T.W. Randolph, In Vitro and in Vivo Evaluation of the Effects of PLA Microparticle Crystallinity on Cellular Response, *J. Controlled Release.* 92 (2003) 147–161.
- [308] T. Phattanaphibul, P. Koomsap, Investigation of PLA-based Scaffolds Fabricated via SVM Rapid Prototyping, *J. Porous Mater.* 19 (2012) 481–489.
- [309] T. Serra, J.A. Planell, M. Navarro, High-resolution PLA-based Composite Scaffolds via 3-D Printing Technology, *Acta Biomaterialia.* 9 (2013) 5521–5530.
- [310] T. Trimaille, C. Pichot, T. Delair, Surface Functionalization of Poly(d,l-lactic Acid) Nanoparticles with Poly(ethylenimine) and Plasmid DNA by the Layer-by-layer Approach, *Colloids Surf., A.* 221 (2003) 39–48.
- [311] Y. Taman-Onal, S. Munier, A. Ganee, C. Terrat, P.Y. Durand, N. Battail, et al., Surfactant-free Anionic PLA Nanoparticles Coated with HIV-1 P24 Protein Induced Enhanced Cellular and Humoral Immune Responses in Various Animal Models, *J. Controlled Release.* 112 (2006) 175–185.
- [312] F. Rancan, D. Papakostas, S. Hadam, S. Hackbarth, T. Delair, C. Primard, et al., Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy, *Pharm. Res.* 26 (2009) 2027–2036.
- [313] N. Handké, T. Trimaille, E. Luciani, M. Rollet, T. Delair, B. Verrier, et al., Elaboration of Densely Functionalized Polylactide Nanoparticles from N-acryloxysuccinimide-based Block Copolymers, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 49 (2011) 1341–1350.
- [314] H. Fessi, J.P. Devissaguet, F. Puisieux, C. Theis, C. Thies, Process for the Preparation of Dispersible Colloidal Systems of a Substance in the Form of Nanoparticles, U.S. Patent U.S. Patent 5,049,322, 1991.

- [315] J.M. Brader, M. Siebenbürger, M. Ballauff, K. Reinheimer, M. Wilhelm, S.J. Frey, et al., Nonlinear Response of Dense Colloidal Suspensions Under Oscillatory Shear: Mode-coupling Theory and Fourier Transform Rheology Experiments, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.* 82 (2010) 61401.
- [316] S. Srivastava, J.H. Shin, L.A. Archer, Structure and Rheology of Nanoparticle-polymer Suspensions, *Soft Matter*. 8 (2012) 4097–4108.
- [317] N. Koumakis, A. Pamvouxoglou, A.S. Poulos, G. Petekidis, Direct Comparison of the Rheology of Model Hard and Soft Particle Glasses, *Soft Matter*. 8 (2012) 4271–4284.
- [318] V. Carrier, G. Petekidis, Nonlinear Rheology of Colloidal Glasses of Soft Thermosensitive Microgel Particles, *J. Rheol.* 53 (2009) 245–273.
- [319] M. Laurati, S.U. Egelhaaf, G. Petekidis, Non-linear Rheology of Colloidal Gels with Intermediate Volume Fraction, *J. Rheol.* 55 (2011) 673.
- [320] E. Di Giuseppe, A. Davaille, E. Mittelstaedt, M. François, Rheological and Mechanical Properties of Silica Colloids: From Newtonian Liquid to Brittle Behaviour, *Rheol. Acta*. 51 (2012) 1–15.
- [321] E. Arunan, G.R. Desiraju, R.A. Klein, J. Sadlej, S. Scheiner, I. Alkorta, et al., Defining the Hydrogen Bond: An Account (IUPAC Technical Report)., *Pure Appl. Chem.* 83 (2011) 1619–1636.
- [322] M. Rinaudo, Non-Covalent Interactions in Polysaccharide Systems, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 590–610.
- [323] M.O. Omelczuk, J.W. McGinity, The Influence of Polymer Glass Transition Temperature and Molecular Weight on Drug Release from Tablets Containing Poly(DL-lactic Acid), *Pharm. Res.* 9 (1992) 26–32.
- [324] N. Passerini, D.Q.M. Craig, An Investigation into the Effects of Residual Water on the Glass Transition Temperature of Polylactide Microspheres Using Modulated Temperature DSC, *J. Controlled Release*. 73 (2001) 111–115.
- [325] I. Messai, D. Lamalle, S. Munier, B. Verrier, Y. Ataman-Önal, T. Delair, Poly(D,L-lactic Acid) and Chitosan Complexes: Interactions with Plasmid DNA, *Colloids Surf., A*. 255 (2005) 65–72.
- [326] H.W. Walker, S.B. Grant, Influence of Surface Charge and Particle Size on the Stabilization of Colloidal Particles by Model Polyelectrolytes, *Colloids Surf., A*. 135 (1998) 123–133.
- [327] M.L. Tsaih, R.H. Chen, Effect of Molecular Weight and Urea on the Conformation of Chitosan Molecules in Dilute Solutions, *Int. J. Biol. Macromol.* 20 (1997) 233–240.

- [328] C. Guo, R.A. Gemeinhart, Understanding the Adsorption Mechanism of Chitosan onto Poly(lactide-co-glycolide) Particles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 597–604.
- [329] L.H. Hanus, H.J. Ploehn, Conversion of Intensity-Averaged Photon Correlation Spectroscopy Measurements to Number-Averaged Particle Size Distributions. 1. Theoretical Development, *Langmuir.* 15 (1999) 3091–3100.
- [330] S. Popa-Nita, C. Rochas, L. David, A. Domard, Structure of Natural Polyelectrolyte Solutions: Role of the Hydrophilic/Hydrophobic Interaction Balance, *Langmuir.* 25 (2009) 6460–6468.
- [331] O. Glatter, O. Kratky, Small Angle X-ray Scattering., Academic Press, 1982.
- [332] G. Berth, H. Dautzenberg, The Degree of Acetylation of Chitosans and Its Effect on the Chain Conformation in Aqueous Solution, *Carbohydr. Polym.* 47 (2002) 39–51.
- [333] S. Kona, D. Specht, M. Rahimi, B.P. Shah, T.A. Gilbertson, K.T. Nguyen, Targeted Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery to Smooth Muscle Cells, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12 (2012) 236–244.
- [334] D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Allémann, E. Doelker, Influence of Stabilizing Agents and Preparative Variables on the Formation of Poly(d,l-lactic Acid) Nanoparticles by an Emulsification-diffusion Technique, *Int. J. Pharm.* 143 (1996) 133–141.
- [335] T.G. Mason, D.A. Weitz, Linear Viscoelasticity of Colloidal Hard Sphere Suspensions Near the Glass Transition, *Phys. Rev. Lett.* 75 (1995) 2770–2773.
- [336] P.N. Pusey, M. Van W., Phase Behavior of Concentrated Suspensions of Nearly Hard Colloidal Spheres., *Nature (London, U. K.).* 320 (1986) 340–342.
- [337] K. Miyazaki, H.M. Wyss, D.A. Weitz, D.R. Reichman, Nonlinear Viscoelasticity of Metastable Complex Fluids, *EPL (Europhysics Letters).* 75 (2006) 915.
- [338] P. Menut, S. Seiffert, J. Sprakel, D.A. Weitz, Does Size Matter? Elasticity of Compressed Suspensions of Colloidal- and Granular-scale Microgels, *Soft Matter.* 8 (2012) 156–164.
- [339] J. McParlane, D. Dupin, J.M. Saunders, S. Lally, S.P. Armes, B.R. Saunders, Dual pH-triggered Physical Gels Prepared from Mixed Dispersions of Oppositely Charged pH-responsive Microgels, *Soft Matter.* 8 (2012) 6239–6247.
- [340] T.G. Mason, J. Bibette, D.A. Weitz, Elasticity of Compressed Emulsions, *Phys. Rev. Lett.* 75 (1995) 2051–2054.
- [341] F. Yziquel, P.J. Carreau, P.A. Tanguy, Non-linear Viscoelastic Behavior of Fumed Silica Suspensions, *Rheol. Acta.* 38 (1999) 14–25.

- [342] M. Parthasarathy, D.J. Klingenberg, Large Amplitude Oscillatory Shear of ER Suspensions, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* 81 (1999) 83–104.
- [343] M. Laurati, G. Petekidis, N. Koumakis, F. Cardinaux, A.B. Schofield, J.M. Brader, et al., Structure, Dynamics, and Rheology of Colloid-polymer Mixtures: From Liquids to Gels, *J. Chem. Phys.* 130 (2009) 134907–134914.
- [344] J.C. Thomas, The Determination of Log Normal Particle Size Distributions by Dynamic Light Scattering, *J. Colloid Interface Sci.* 117 (1987) 187–192.
- [345] C.F. Bohren, D.R. Huffman, Absorption and Scattering of Light by Small Particles., John Wiley and Sons, 1983.
- [346] R. Finsy, N. De Jaeger, Particle Sizing by Photon Correlation Spectroscopy. Part II: Average Values, *Part. Part. Syst. Character.* 8 (1991) 187–193.
- [347] D.G. Dalgleish, Measurement of Electrophoretic Mobilities and Zeta-potentials of Particles from Milk Using Laser Doppler Electrophoresis, *J. Dairy Res.* 51 (1984) 425–438.

Élaboration d'assemblages colloïdaux à partir de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane

Les assemblages colloïdaux représentent une nouvelle piste très prometteuse dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Idéalement, ce type d'assemblage permet l'obtention de matériaux injectables et gélifiants sur le site lésionnel, favorisant par la suite le développement de néo-tissus viables. Ce travail porte sur la formation de tels assemblages à base de chitosane et de poly(acide lactique) (PLA).

Deux types d'assemblages ont été conçus et étudiés dans ce travail. Dans une première approche, le mélange de particules anioniques de poly(acide lactique) (PLA) avec du chitosane en solution faiblement acide conduit à la formation de « **gels composites** », résultant des interactions *colloïde-polymère*. Des analyses rhéologiques et de diffusion des rayons X aux petits angles ont permis de mettre en évidence le mode de formation et l'influence de plusieurs paramètres sur les propriétés finales de ces gels. Notamment, ils présentent des propriétés rhéofluidifiantes et un caractère réversible, c'est-à-dire que le gel peut se reformer après déstructuration mécanique.

Le second type d'assemblage résulte du mélange de particules anioniques de PLA et de nanogels cationiques de chitosane, conduisant à la formation de « **gels colloïdaux** », par interactions *colloïde-colloïde*. L'influence de plusieurs facteurs sur la formation et les propriétés de ces gels a également été étudiée par mesures rhéologiques. Notre étude s'est notamment orientée sur la caractérisation et la stabilité des hydrogels physiques de chitosane sous forme colloïdale, ainsi que sur l'optimisation de leur cohésion.

Mots clés : Assemblages colloïdaux, gels colloïdaux, gels composites, hydrogels, biomatériaux, chitosane, nanogel de chitosane, nanoparticules de poly(acide lactique), rhéologie, ingénierie tissulaire, médecine régénérative.

Colloidal assemblies based on poly(lactic acid) nanoparticles and chitosan

Colloidal assemblies may be a promising pathway to obtain injectable scaffolds favoring the development of neo-tissue in regenerative medicine. This work investigates the formation of such assemblies composed of chitosan, soluble or in suspension (nano-hydrogel), and poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles.

Two types of assemblies are studied. As a first approach, mixing negatively charged PLA particles and chitosan solution leads to the formation of “**composite gels**”, based on *colloid-polymer* interactions. Rheological and Small Angle X-Ray Scattering measurements highlighted the formation process and the influence of various parameters on final properties of these gels, which features shear-thinning and reversibility behavior, that is, the capacity to gel again after yielding.

PLA nanoparticles could also be mixed with cationic chitosan nanoparticles, which are crosslinker free nano-hydrogels, leading to the formation of “**colloidal gels**”, based on *colloid-colloid* interactions. Influence of various parameters on gel synthesis and properties are investigated through rheological measurements. The study also focuses on the characterization and control of the morphological and cohesion properties of chitosan nanogel.

Keywords : Colloidal assemblies, colloidal gel, composite gel, nanocomposite, hydrogels, chitosan, chitosan nanogels, poly(lactic acid) nanoparticles, scaffold, rheology, tissue engineering, regenerative medicine.