

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'UMR PAM D'AGROSUP DIJON, AU LABORATOIRE LEON BRILLOUIN ET AU SYNCHROTRON
SOLEIL

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat de Biotechnologies agro-alimentaires

Par

Maire du Poset Aline

« Hydrogels de polygalacturonate réticulés par les ions Fe^{2+} : Impact du mode d'association local sur les mécanismes de gélification, contrôle de la structure à différentes échelles et modulation des propriétés mécaniques »

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 24 septembre 2018

Composition du Jury :

M. Couvercelle Jean-Pierre	Professeur, Université de Bourgogne - Franche-Comté	Président
Mme Ralet-Renard Marie-Christine	Directrice de recherche, INRA Nantes	Rapporteuse
Mme Tanchoux Nathalie	Chargée de recherche, Institut Charles Gerhardt Montpellier	Rapporteuse
Mme Briois Valérie	Directrice de recherche, Synchrotron SOLEIL	Examinatrice
Mme Ström Anna	Associate professor, Chalmers University of Technology	Examinatrice
M. Assifaoui Ali	Maître de conférences, Université de Bourgogne – Franche-Comté	Directeur de thèse
M. Cousin Fabrice	Directeur de recherche, Laboratoire Léon Brillouin	Codirecteur de thèse
M. Lerbret Adrien	Ingénieur de recherche, UMR PAM AgroSup Dijon	Invité
M. Zitolo Andrea	Chargé de recherche, Synchrotron SOLEIL	Invité

Avant-propos

Ce travail de thèse est le fruit d'une collaboration entre trois laboratoires de recherche : L'UMR PAM d'AgroSup Dijon, le Laboratoire Léon Brillouin (LLB) qui est le laboratoire français de diffusion neutronique, (CEA de Saclay) et le synchrotron SOLEIL qui est le centre français de rayonnement synchrotron (Saint Aubin). Il a été co-financé à 50 % par le LLB et SOLEIL et à 50 % par le conseil régional de Bourgogne Franche-comté. Cette collaboration m'a permis de travailler dans un cadre riche car j'ai pu mener mon étude en couplant des expériences de physico-chimie et des mesures mécaniques standards avec des mesures structurales et spectroscopiques avancées, respectivement la diffusion de neutrons aux petits angles au LLB et la spectroscopie d'absorption de rayons X à SOLEIL. J'ai également pu confronter certains de mes résultats expérimentaux avec des modèles issus de simulations de dynamique moléculaire réalisées au sein de l'UMR PAM.

Remerciements

Comme présenté précédemment, ma thèse est le fruit d'une collaboration entre l'UMR PAM d'AgroSup Dijon, le Laboratoire Léon Brillouin (LLB) et le synchrotron SOLEIL. Je tiens donc tout d'abord à remercier Patrick Gervais et Laurent Beney successivement directeurs de l'UMR PAM, Christiane Alba-Simionesco et Eric Eliot successivement directrice et directeur du LLB, Gregory Chaboussant et Alain Menelle directeurs adjoints du LLB et enfin Jean Daillant, directeur de SOLEIL, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire. Je souhaite également remercier la Région de Bourgogne Franche-comté et le Pari Alim + pour avoir participé au financement de mes travaux de thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements à Marie-Christine Ralet-Renard et Nathalie Tanchoux pour avoir accepté d'être rapportrices de ce manuscrit de thèse. Les discussions que nous avons eues lors de ma soutenance ont été très enrichissantes. Je souhaite également remercier Jean-Pierre Couvercelle pour avoir présidé le jury le jour de ma soutenance, Valérie Briois et Anna Ström pour avoir accepté d'être examinatrices de ma thèse. Tack Anna for the long trip you did in order to come for my defense and thank you for the warm welcome when i came to Chalmers in April 2018.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à mes "chefs" car au delà de la science, ma thèse a été une très belle aventure humaine grâce à eux. Je remercie donc mon directeur de thèse Ali Assifaoui pour sa confiance dès mes premiers pas dans la recherche en janvier 2014. Ali, merci pour ces 5 années où nous avons travaillé ensemble. Tu m'as permis d'acquérir autonomie et confiance très rapidement et tu as toujours fait preuve de bienveillance à mon égard. Merci également de m'avoir fait faire visiter un peu les alentours de Göteborg avec ta famille lors de ma venue en Suède. Merci à Audrey pour sa gentillesse. Je tiens également à remercier Fabrice Cousin, mon co-directeur de thèse du LLB. Fabrice, merci tout particulièrement pour ton aide et ta disponibilité lors de la rédaction de ce manuscrit, merci aux navettes du CEA et aux retards des transports en commun parisiens pour t'avoir permis de corriger mes chapitres en un temps record! Merci également d'avoir su me remettre en confiance dans les périodes de creux. Merci à Andrea Zitolo, mon co-encadrant de thèse basé à SOLEIL. Andrea, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité lors de mes séjours à Saclay. Merci pour ta pédagogie lorsque tu m'as appris à utiliser linux et GNXAS et lorsque tu m'as initié aux mesures XAS. Enfin, merci à Adrien Lerbret, mon second encadrant de thèse basé à l'UMR PAM. Adrien, merci pour ta disponibilité et ton efficacité que soit pour les corrections de mes chapitres, articles, abstracts ... ou pour l'envoi des résultats obtenus dans tes simulations. Merci également pour tes qualités pédagogiques qui m'ont permis de comprendre au mieux les principes des simulations de dynamique moléculaires. J'aimerais également vous remercier collectivement car notre collaboration a été une vraie synergie qui a permis de com-

biner les spécialités de chacun et ainsi d'aller au delà des objectifs initiaux établis pour le projet.

J'aimerais remercier également François Boué, Serge Pin et Emiliano Fonda qui ont composé mon comité de suivi de thèse. François, merci pour votre aide et votre gentillesse lors de la préparation de ma soutenance. Les discussions que nous avons eu au cours de ma thèse ont été déterminantes dans la compréhension de notre système d'étude. Serge, merci également pour ce que tu as apporté au projet et merci pour ta gentillesse et ton soutien. Ma candidature à la bourse l'Oréal UNESCO n'a pas abouti mais la lettre que tu as écrite me concernant m'a énormément touchée. Emiliano merci également pour ton aide sur le projet et pendant les manip XAS. Merci également pour ton accueil sur la ligne.

Je souhaite adresser des remerciements tous particuliers à Camille Loupiac, qui a été mon encadrante de stages de M1 et M2 avec Ali Assifaoui. Camille, tu as également été à l'origine de mon goût pour la recherche. C'est grâce à toi que ma thèse a vu le jour car tu as mis en contact Ali avec le LLB et SOLEIL donc merci infiniment car j'ai évolué dans un environnement idéal. Merci à Thomas Karbowiak qui a été à l'écoute tous le long de ma thèse. Thomas, merci pour ton amitié et ta bonne humeur au labo, sur les terrains de beach volley et de bad, jusqu'au don du sang. Merci également de m'avoir proposé le logement chez Christiane pour mon dernier mois à Dijon. Merci également à Philippe Cayot qui a accepté d'être directeur de ma thèse au début de projet en attendant qu'Ali passe son HDR.

Je ne peux également que remercier Bernadette Rollin, technicienne du laboratoire dans lequel j'ai évolué à Dijon. Bernadette, merci pour tout ! Que ce soit par ton soutien moral et technique, tu as toujours répondu présente. Merci pour ta gentillesse et ton dévouement, et bien-sûr, merci pour la trancheuse à saucisson !! Je tiens également à adresser mes remerciements à Alexandra Da Silva et Josèphe Gautheron respectivement secrétaire de l'équipe dans laquelle j'ai évolué à Dijon et gestionnaire comptable de l'UMR PAM pour avoir été disponibles, compréhensives et efficaces tout au long de mes trois années de thèse.

Pour terminer avec les personnes avec lesquelles j'ai évolué à Dijon, je tiens à remercier mes collègues et amis thésards. Merci Kevin, je pense que nous avons formé un très bon binôme au labo que ce soit pour refaire la salle de pause ou pour s'aider mutuellement. Bon courage pour la fin de ta thèse, ne t'en fais pas trop et n'oublie pas que tu peux le faire ! Julie, on s'est croisé que plus tard mais merci pour ton soutien et ton amitié également. Je croise les doigts pour ta future thèse ! Ann, Yanis, François, Héra et Max merci pour votre gentillesse, ça a été un vrai plaisir de faire votre connaissance ! Ann thanks again for the sushis the day of my defense ! Bon courage à vous tous pour la fin ! Jeancarlo muchas gracias ! Thank you for the long discussions we had and your support from Dijon or China ! Merci également à Samar, Nour et Thierry, les collègues du 2ème étage ! Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse ! J'espère que l'on se recroisera et je vous souhaite vraiment le meilleur pour la suite ! Merci également à Sophie qui est passé par AgroSup et qui m'a fait le plaisir de revenir le jour de ma soutenance. Merci également à Boni, Claire et Francine que j'ai un peu moins croisé mais que je remercie pour leur gentillesse !

Je voudrais également remercier différentes personnes du LLB pour leur accueil et leur soutien pendant les derniers mois de ma thèse. Je remercie donc José Texeira, Stéphane Lon-

gevilles, Didier Lairez, Lay-Theng Lee, Jacques Jestin, Patrick Judeistein, Annie Brulet. Je voudrais remercier tout particulièrement Alexis Cheneviere et Clémence Le Coeur pour leur amitié, leur aide et leur bienveillance à toutes mes visites au LLB. Merci également à Oriana, David, Florian, Jade, Sumit, Rodrigo, Erigène, Marion, Marguerite, Marc- Antoine, Antoine et Azad qui sont les thésards, postdocs et stagiaires que j'ai rencontré au LLB au cours de ces 3 années. Votre accueil a toujours été très chaleureux et ça a été un vrai plaisir de tous vous connaître.

Merci également aux personnes de SOLEIL que j'ai pu croisées même si j'y ai passé un peu moins de temps. Merci aux chercheurs et au personnel technique des lignes SAMBA et ROCK, qui m'ont toujours accueillie très chaleureusement.

Dans une dernier temps, j'aimerais remercier tous mes amis et ma famille qui ont fait le déplacement le jour de ma soutenance. Nanou, Amélie, depuis Jules Haag nous ne nous quittons pas ! Je vous attends donc en Suède pour la suite de nos aventures ! Merci à mes grands-parents d'être venus, j'ai pu lire beaucoup de fierté dans vos yeux, ça m'a énormément touché. Merci à la Cauly family pour leur accueil dans leur maison pendant mes derniers mois de thèse et merci Ben pour le tuning de la trancheuse à saucisson. Merci également à mes deux frères ! Adrien merci d'avoir été présent à distance pendant cette période difficile de la rédaction. Tu as su m'écouter et comme tu connais bien ta grande sœur, tu as toujours su trouver les mots. Pierre, ton soutien a été plus pudique mais tu as toujours été présent également donc merci ! Enfin, merci à mes parents. Papa et Maman, je crois que je vous ai rendu fiers, j'en suis très heureuse ! Merci pour votre soutien pendant toutes mes années d'étude ! Merci de m'avoir fait confiance dans mes choix qui sont passés de "Je ne ferai pas d'études longues" à "Je vais faire une thèse" en passant par " La recherche ça n'est pas fait pour moi".

Table des matières

Résumé	1
Introduction générale	3
1 Revue Bibliographique	5
1.1 Quelles sont les caractéristiques du fer et son importance pour la santé?	5
1.1.1 Carte d'identité du fer	5
1.1.2 Rôle du fer dans l'organisme	6
1.1.3 Biodisponibilité du fer	7
1.1.4 Fer et alimentation	8
1.1.5 Carence en fer, anémie et traitements	8
1.1.6 Enrichissement en fer dans les aliments	9
1.2 Pourquoi les polyosides anioniques sont-ils capables d'interagir avec des cations divalents?	10
1.2.1 Caractéristiques des polyosides anioniques	10
1.2.2 Les alginates	11
1.2.3 Les pectines	12
1.2.4 L'acide polygalacturonique	13
1.3 Quels sont les mécanismes d'associations mis en jeu lors de la formation d'un hydrogel?	13
1.3.1 Mécanismes d'associations locales entre les cations divalents et les unités uronates	15
1.3.2 Mécanismes d'associations des chaînes	20
1.3.3 Comment l'association locale de deux chaînes mène-t-elle à la formation d'un réseau continu?	24
1.3.4 Comment obtenir un gel continu à partir de la mise en contact de cations divalents avec des chaînes de polyuronate?	26
2 Description du comportement du mélange Fe^{2+}-polygalacturonate en régime dilué	31
2.1 Caractérisation structurale du polygalacturonate en solution	31
2.1.1 Matériel d'étude	31
2.1.2 Détermination de la distribution de tailles du polygalacturonate	32
2.1.3 Détermination de la concentration de recouvrement	33
2.1.4 Détermination de la structure des chaînes de polygalacturonate en solution	34
2.2 Étude des associations entre le polygalacturonate et les ions Fe^{2+} en régime dilué	36
2.2.1 Méthodes	36

2.2.2	Détermination de la viscosité en fonction du rapport molaire $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{galacturonate}]$	38
2.2.3	Détermination de la turbidité en fonction du rapport molaire $R [\text{Fe}^{2+}]/[\text{galacturonate}]$	39
2.2.4	Détermination de l'enthalpie d'association en fonction du rapport molaire $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{galacturonate}]$	40
2.2.5	Bilan sur l'étude des interactions entre les cations Fe^{2+} et les unités galacturonates en système dilué	41
3	Élaboration et caractérisation des gels Fe^{2+}-polygalacturonate	45
3.1	Optimisation du protocole de gélification	45
3.2	Détermination des conditions de gélification	47
3.2.1	Effet du temps de gélification	48
3.2.2	Effet de la concentration en cations dans le réservoir	51
3.2.3	Bilan sur les diagrammes d'état	53
3.3	Choix des conditions expérimentales pour l'étude des gels	54
3.4	Bilan matière	55
3.5	Propriétés mécaniques	57
3.5.1	Module de Young	57
3.5.2	Rhéologie oscillatoire	59
3.5.3	Bilan des propriétés mécaniques le long des hydrogels Fe^{2+} -polyGalA	60
3.6	Caractérisation de la structure du réseau formé aux échelles locales	61
3.7	Détermination de l'état d'oxydation du fer	63
3.8	Effet de la concentration en polyGalA	65
3.9	Mécanisme de gélification	68
4	Etude de l'environnement local autour des ions Fe^{2+} au sein des gels	73
4.1	Théorie de l'EXAFS	73
4.1.1	Détermination de l'environnement local du fer au sein d'un même gel	75
4.2	Simulations de dynamique moléculaire	78
4.3	Combinaison de l'EXAFS et des simulations MD : Mode d'association des cations Fe^{2+} avec les groupements carboxylates du polyGalA	80
4.3.1	Simulations MD utilisant des champs de force existants	80
4.3.2	Simulations MD modélisant les différents modes d'association probables	83
4.3.3	Modification d'un champ de force permettant de modéliser le mode d'association Fe^{2+} avec les unités GalA	86
5	Influence de la nature du cation sur la structure des hydrogels	89
5.1	Influence de la nature du cation sur le gradient macroscopique des hydrogels de polyGalA	89
5.1.1	Observations macroscopiques	89
5.1.2	Distribution des chaînes de polyGalA et des cations au sein des hydrogels	91
5.2	Caractérisation structurale et mécanique d'hydrogels de polyGalA obtenus avec différents cations	94
5.2.1	Effet des cations divalents	94
5.2.2	Effet du cation trivalent Fe^{3+}	99
5.2.3	Mécanismes de formation des hydrogels	103
	Conclusion générale	109

A	Diffusion de neutrons aux petits angles	113
B	Mesures de la distribution de tailles des chaînes de polyGalA	119
C	Titration calorimétrique isotherme	121
D	Mesures des propriétés mécaniques	123
E	Spectroscopie d’Absorption X	127
F	Draft de l’étude sur l’incorporation d’une protéine modèle dans les hydrogels Ca ²⁺ -polyGalA	133
	Bibliographie	153

Résumé

Ce travail de thèse décrit la formulation d'hydrogels de polygalacturonate (polyGalA) réticulés par les cations Fe^{2+} , ainsi que leur caractérisation expérimentale depuis les échelles moléculaires jusqu'aux échelles macroscopiques, en utilisant notamment la spectroscopie d'absorption X (EXAFS), la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) ainsi que des mesures de rhéologie. Nous avons élaboré un protocole de gélification robuste permettant d'obtenir des gels cylindriques reproductibles qui présentent des gradients de concentration contrôlés depuis leur partie basale jusqu'à leur partie apicale. Le rapport $R = [\text{Fe}]/[\text{GalA}]$ a une valeur constante de 0,25 tout au long du gel, ce qui prouve que les cations Fe^{2+} s'associent avec 4 unités galacturonates. La confrontation des résultats d'EXAFS et de dynamique moléculaire a démontré que ces associations se font via le modèle "egg-box". Les mécanismes de réticulation qui contrôlent la structure du réseau formé par les chaînes aux échelles locales sont donc les mêmes dans l'ensemble du gel, ce qui est confirmé par les mesures de DNPA. La formation des gradients de concentration macroscopiques provient des mécanismes de diffusion des cations à travers le gel lors de sa formation. Ces gradients de concentration contrôlent les propriétés mécaniques des gels. En outre, nous avons prouvé que le mode d'association "egg-box" permettait la protection des ions Fe^{2+} contre l'oxydation, ce qui confère à ces hydrogels un potentiel applicatif pour soigner l'anémie car ils pourraient permettre la vectorisation du fer sous cette forme réduite biodisponible jusqu'à l'intestin.

Nous avons étendu notre étude à la formulation d'hydrogels avec d'autres cations (Ca^{2+} et Zn^{2+}). Ces hydrogels présentent des propriétés macroscopiques proches de celles des hydrogels Fe^{2+} -polyGalA car les mécanismes de diffusion des cations régissant la formation des gradients macroscopiques lors de la formation des gels sont similaires. Les hydrogels présentent cependant des structures locales différentes car les modes d'associations locaux varient d'un cation à l'autre. L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer un mécanisme généralisé permettant de décrire les mécanismes de formation d'hydrogels de polyGalacturonate pour les cations divalents, et ainsi de moduler finement leur structure sur plusieurs échelles. Ces hydrogels pourraient donc être des outils de choix pour la vectorisation de molécules actives et le contrôle de leur relargage.

Abstract

This Ph.D. thesis describes the design of polygalacturonate hydrogels (polyGalA) cross-linked by the Fe^{2+} cations, and their experimental characterization from the molecular scales up to the macroscopic scales, by combining EXAFS spectroscopy, Small Angle Neutron Scattering (SANS) and rheological measurements. We designed a robust gelling protocol that allowed to obtain reproducible cylindrical gels with controlled concentration gradients from the lower side to the upper side of the gel. The ratio $[\text{Fe}]/[\text{GalA}]$ has a constant value of 0.25 all along the gel, which suggests that the Fe^{2+} cations are associated with 4 galacturonate units. The comparison of EXAFS measurements and molecular dynamics simulation has shown that these associations followed the "egg-box" model. The crosslinking mechanisms that control the structure of the network made by the chains at local scale is therefore the same throughout the whole gel, which is confirmed by SANS measurements. The formation of the macroscopic concentration gradients comes from the mechanisms that drive the cations diffusion through the gel during the gelation process. These gradients control the gels mechanical properties. Besides, we proved that the "egg-box" association enables to protect Fe^{2+} against oxidation, which gives to these hydrogels an applicative potential to cure anemia as they could allow to target iron under its bioavailable form up to the gut.

We have extended the study to the design of hydrogels with other cations (Ca^{2+} et Zn^{2+}). The macroscopic properties of these hydrogels are very close to that of the Fe^{2+} -polyGalA hydrogels because the cation diffusion mechanisms that govern the formation of macroscopic gradients during the gelation

process are similar. The hydrogels have however different local structures because the cation-polyGalA local association varies from one cation to another. All these results allowed us to propose a generalized mechanism that describes the polygalacturonate hydrogels formation for divalent cations, and thus to tune their structure over several scales. These hydrogels could therefore be promising tools for the vectorization of active molecules and the control of their release.

Introduction générale

En 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé a reporté qu'une personne sur quatre souffrait d'anémie liée à une carence en fer[1]. Cette pathologie est définie comme une diminution du nombre de globules rouges dans le sang qui entraîne une fatigue extrême, des maux de tête et peut induire des désordres métaboliques dans les cas les plus graves. Différents traitements existent pour traiter cette maladie mais présentent malheureusement de nombreux effets secondaires (problèmes intestinaux, nausées). Afin d'appréhender la problématique majeure de cette pathologie, il est important d'avoir en tête que la quantité de fer absorbée au niveau intestinal varie entre 2 et 35 % de la quantité de fer apportée par l'alimentation. Cette importante variation dépend directement de la forme d'apport du fer et notamment de son état d'oxydation. Ce sont les ions Fe^{2+} qui présentent la plus haute biodisponibilité mais cet état de valence est très sensible à l'oxydation dans les conditions physiologiques. La consommation d'ions ferreux via l'alimentation est donc indispensable mais peut toutefois être insuffisante pour un renouvellement optimal des réserves en fer de l'organisme et pour assurer des fonctions physiologiques normales (transport de l'oxygène dans le sang, respiration cellulaire, réactions d'oxydo-réduction ...).

L'objectif de cette thèse est de proposer une alternative aux traitements existants contre l'anémie en vectorisant les ions Fe^{2+} jusqu'à l'intestin tout en les protégeant contre l'oxydation. Pour cela, notre stratégie a été de formuler des hydrogels de polyGalacturonate (polyGalA), polyside anionique constituant le squelette des pectines, qui sont largement utilisées en industries agroalimentaire et pharmaceutique pour leur capacité à gélifier en présence de cations divalents ainsi que pour leur résistance au pH de l'estomac lorsqu'elles sont réticulées. Nous souhaitons donc utiliser les ions Fe^{2+} comme agents de réticulation pour les protéger contre l'oxydation via leur association au polyGalA, ce qui permettrait de vectoriser *in fine* le micro-nutriment jusqu'à ses sites d'absorption.

Il existe un ensemble important de connaissances sur la description des mécanismes de gélification impliquant les cations divalents et les polyuronates¹. Elles montrent notamment que les mécanismes d'association locaux dépendent directement de la nature du cation. Nous nous sommes donc basés sur ces études pour formuler des hydrogels Fe^{2+} -polyGalA stables et caractériser leur structure depuis les échelles moléculaires jusqu'aux échelles macroscopiques. Afin d'étudier l'influence du mode d'association local sur les mécanismes de gélification, nous avons ensuite étendu cette étude en formulant des hydrogels à partir d'autres cations. Le polyGalA étant un très bon modèle pour les pectines, cette démarche nous a permis de déterminer les paramètres clés régissant la formation des hydrogels de polysides anioniques.

1. Les polyuronates sont des polysides anioniques qui regroupent les pectines et les alginates que nous présenterons en détails dans le chapitre 1.

Ce manuscrit est divisé en 5 chapitres dont 4 sont consacrés à la description de nos résultats expérimentaux. Les figures en anglais qui se trouvent dans les différents chapitres sont issues d'un article déjà publié. [2]

Le premier chapitre est une revue bibliographique qui décrit l'importance du fer dans l'organisme et l'intérêt de protéger les ions Fe^{2+} contre l'oxydation. Il présente ensuite les propriétés des polyosides anioniques et notamment leur structure moléculaire qui leur confère la capacité de former des gels en présence de cations divalents. Nous y détaillons également les mécanismes d'associations entre différents cations divalents et les unités constitutives des pectines et des alginates afin de faire un état de l'art des connaissances sur ces systèmes.

Le second chapitre de ce manuscrit présente dans une première partie la caractérisation du polyGalA seul en solution, puis dans une deuxième partie les résultats obtenus sur des mélanges de polyGalA et d'ions Fe^{2+} en système dilué. Cette étude nous a permis notamment de déterminer si les cations Fe^{2+} étaient capables d'interagir avec le polyGalA, et de comparer le système Fe^{2+} -polyGalA avec d'autres systèmes cations-polyGalA [3].

Le troisième chapitre est la base de notre travail sur les hydrogels. En effet, nous y présentons le protocole de gélification que nous avons mis en place pour formuler des gels Fe^{2+} -polyGalA parfaitement reproductibles. Nous y décrivons les diagrammes d'état que nous avons établi pour déterminer les conditions physico-chimiques les plus propices à l'obtention de ces gels. Nous présentons également dans ce chapitre le lien existant entre les propriétés macroscopiques des hydrogels et la structure des réseaux formés aux échelles locales, ce qui nous a permis de proposer un mécanisme général décrivant le processus de gélification. Enfin, nous présentons les mesures qui nous ont permis de déterminer l'état d'oxydation du fer au sein de ces hydrogels.

Le chapitre 4 s'intéresse à l'étude des mécanismes fins d'association des cations Fe^{2+} avec les unités galacturonates au niveau moléculaire. La stratégie que nous avons employée pour cette étude a été de confronter des mesures de spectroscopie d'absorption de rayons X avec des simulations de dynamique moléculaire.

Enfin, dans le chapitre 5 nous avons souhaité comparer les résultats obtenus dans les chapitres 3 et 4 sur les hydrogels Fe^{2+} -polyGalA avec des hydrogels de Ca^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{3+} préparés avec le même protocole de gélification. Ainsi, en se basant à la fois sur nos données expérimentales et sur les résultats reportés dans la littérature sur les modes d'associations des cations divalents étudiés, nous décrivons comment la nature du cation² permet de moduler les propriétés des hydrogels depuis les échelles locales du réseau de polyGalA jusqu'aux échelles macroscopiques.

2. En fonction de ses orbitales atomiques ou de son état d'oxydation.

Chapitre 1

Revue Bibliographique

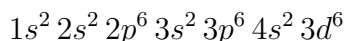
Introduction

Dans ce travail de thèse, nous souhaitons formuler des hydrogels de polyGalA en utilisant les ions Fe^{2+} comme agents de réticulation pour qu'en retour ils soient protégés contre l'oxydation. Il est donc important de comprendre ce qu'est le fer et quelle est son importance pour la santé. C'est pourquoi nous avons présenté les différentes questions que nous nous sommes posées pour déterminer nos conditions expérimentales et pour comprendre les mécanismes de gélification auxquels nous allons nous confronter.

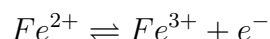
1.1 Quelles sont les caractéristiques du fer et son importance pour la santé ?

1.1.1 Carte d'identité du fer

Le fer est le 26^{ème} élément du tableau périodique et appartient à la famille des métaux de transition. Il possède la configuration électronique suivante :



Le fer est majoritairement présent en solution sous deux formes ioniques : sous sa forme dite ferreuse, Fe^{2+} ou sous sa forme dite ferrique, Fe^{3+} .



Ces deux états d'oxydation du fer vont être fonction du pH de la solution ou encore de la présence d'oxygène (Figure 1.2). Le fer présente une géométrie octaédrique en solution aqueuse comme présenté dans la Figure 1.1.

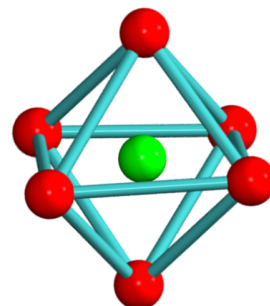


FIGURE 1.1 – Représentation de la géométrie des cations Fe^{2+} dans l'eau.

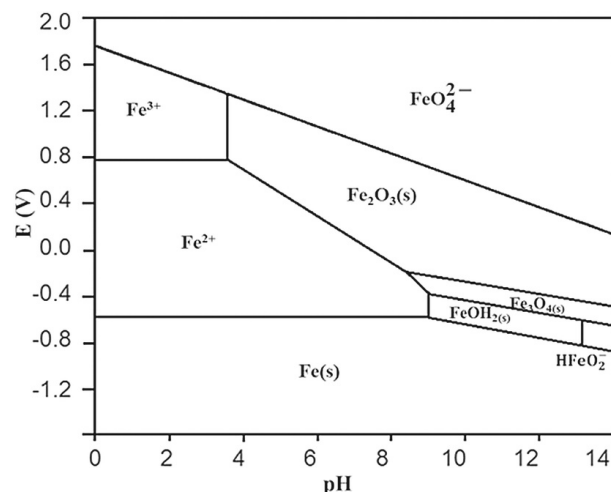


FIGURE 1.2 – Diagramme de Pourbaix du fer dans l'eau représentant les états d'oxydation du fer en fonction du potentiel d'oxydo-réduction et du pH de la solution[4].

1.1.2 Rôle du fer dans l'organisme

Le fer est un oligoélément jouant un rôle essentiel chez tous les organismes vivants. Dans le corps humain, le fer est présent sous différentes formes et participe à de nombreuses fonctions vitales.[5] En effet, 80 % du fer se trouve associé à des protéines pour former des complexes qui interviennent dans un grand nombre de fonctions physiologiques (transport de l'oxygène dans le sang, réactions d'oxydo-réduction, transferts d'électrons...). Le complexe fer-protéine majoritaire dans l'organisme est l'hémoglobine (65 % de la quantité totale du fer dans le corps humain). Cette protéine se trouve dans les érythrocytes, i.e. les globules rouges, et leur confère leur capacité à fixer l'oxygène pour ensuite le distribuer dans tous les organes. L'hémoglobine est composée de quatre molécules d'hème qui possèdent chacune un atome de fer (sous forme réduite Fe^{2+}) lié par quatre atomes d'azote. L'atome de fer est également lié à une molécule d'histidine (acide aminé) qui permet de relier l'ensemble des molécules d'hème au sein de l'hémoglobine. La sixième et dernière liaison de coordination permet au fer de capter une molécule de dioxygène qui confère à l'hémoglobine sa fonction principale : le transport de quatre molécules de dioxygène à travers le corps (Figure 1.3).

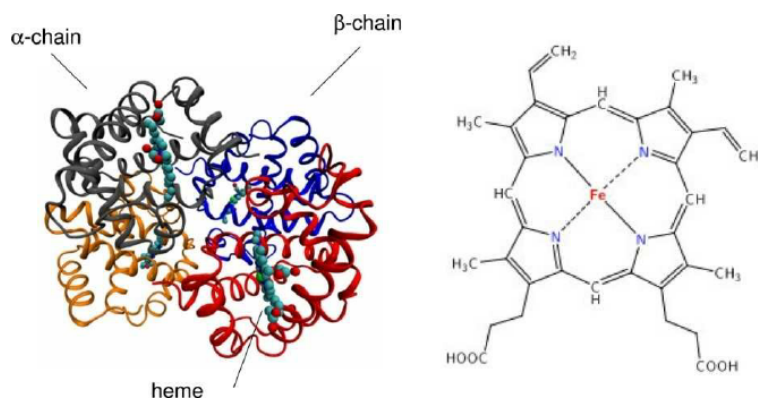


FIGURE 1.3 – Structure de l'hémoglobine à gauche et des hèmes à droite d'après [6].

Le fer présent dans l'organisme et qui n'est pas associé à des protéines correspond princi-

palement aux réserves du corps humain. En effet, les globules rouges, les enzymes et les autres complexes possédant du fer dans leur composition ont des durées de vies bien définies, ce qui nécessite leur renouvellement continu. Il est donc nécessaire que les réserves en fer soient suffisantes pour que ces complexes puissent se reformer afin d'assurer les fonctions physiologiques correspondantes. L'apport en fer via le recyclage n'est pas suffisant, ce qui implique que le fer doit également être apporté de façon exogène et notamment par l'alimentation. Il est important de contrôler la quantité de fer au sein de l'organisme pour un bon fonctionnement du métabolisme. En effet, une trop grande quantité de fer dans le corps peut entraîner des pathologies sévères.[7] Son absorption au niveau intestinal est donc finement régulée par des mécanismes spécifiques qui ne sont pas encore entièrement élucidés à ce jour.

1.1.3 Biodisponibilité du fer

L'absorption du fer au niveau de l'intestin est une étape clé du métabolisme du fer et de sa régulation. Elle se fait au niveau du duodenum et de la partie proximale du jéjunum.[8] Cette absorption est possible grâce à des transporteurs membranaires spécifiques au cation et n'est possible que lorsque le cation est sous sa forme réduite ou bien lorsqu'il s'agit de fer héminique (fer associé à des molécules d'hème). Il faut savoir que seulement 2 à 35 % du fer apporté par l'alimentation est absorbé au niveau cellulaire. Cette grande variabilité est due à plusieurs facteurs :

La forme d'apport du fer et son état d'oxydation : Les transporteurs membranaires permettant au fer de passer de la lumière intestinale à l'intérieur des entérocytes (cellules intestinales) sont soit spécifiques des ions Fe^{2+} soit du fer dit héminique. Lorsque le fer est sous sa forme Fe^{3+} et qu'il arrive au niveau des entérocytes, une étape de réduction a lieu afin de permettre son passage dans les cellules. Cette étape de réduction est dépendante de différents facteurs (inflammation des cellules, présence d'autres nutriments,) et est donc la clé du phénomène d'absorption du fer.

Facteurs intrinsèques aux individus : Chaque organisme a une capacité plus ou moins grande à absorber le fer. Ce phénomène est dû notamment à des facteurs génétiques qui font varier l'efficacité de l'absorption. Certaines pathologies vont être responsables de difficultés à absorber le fer et en particulier les pathologies qui entraînent des inflammations de la paroi intestinale qui vont limiter la réduction du fer ferrique en fer ferreux (obésité, maladie de Crohn).

Les habitudes alimentaires des individus : Lors d'un repas, un individu consomme un ensemble de nutriments présents dans un ou plusieurs aliments. Il est alors possible que l'un d'entre eux ait un impact sur l'absorption du fer au niveau intestinal. En effet, il existe des nutriments qui ont un rôle inhibiteur sur l'absorption du fer (phytates, polyphénols,...) alors que d'autres ont une influence positive sur la réduction du fer (acide ascorbique) ou sur son passage par le transporteur membranaire. Une personne présentant une carence en fer devra donc prêter attention aux aliments qu'elle consomme.

1.1.4 Fer et alimentation

Le fer peut être apporté naturellement via l'alimentation sous deux formes : héminique et non-héminique. Comme nous l'avons rapporté précédemment, le fer héminique est la forme la plus biodisponible. Le fer héminique est retrouvé dans les viandes rouges (boudin noir, foie, poissons, fruits de mer ou encore volaille). Malheureusement, ces produits sont chers et tout le monde n'a pas la possibilité d'y avoir accès. Par ailleurs, de plus en plus de personnes adoptent des régimes végétariens ou végétaliens qui les privent totalement de cet apport de fer héminique.

Le fer non héminique, i.e. non associé à une molécule d'hème, se trouve dans les végétaux de manière générale, et particulièrement dans les lentilles, les haricots, les épinards ainsi que dans un bon nombre d'épices. Ces aliments ne permettent pas toujours de satisfaire les besoins en fer de l'organisme, même ceux qui possèdent une forte quantité de fer non héminique. En effet, le fer non héminique est sous sa forme oxydée (Fe^{3+}) ce qui complique son absorption (moins de 5 % du fer non héminique apporté via l'alimentation sera réduit puis absorbé au niveau intestinal).

1.1.5 Carence en fer, anémie et traitements

La carence en fer est une pathologie courante qui touche autant les pays développés que sous développés. En 2015, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a publié une étude établissant que 25% de la population mondiale souffrait d'anémie, qui est la forme avancée de la carence en fer.

Pathologie

Une carence en fer peut être définie par différents niveaux de gravité. Lorsque ce manque est léger, les symptômes engendrés ne sont que mineurs et la carence peut être comblée en contrôlant mieux son alimentation. Lorsque la carence est plus importante, elle peut entraîner une pathologie appelée anémie. Cette maladie est définie comme un déficit en globules rouges dans le sang. Elle induit de la fatigue, un teint pâle, un essoufflement rapide ou encore des étourdissements et des maux de tête. Dans les cas les plus graves, des troubles métaboliques sont observés. L'anémie peut être le résultat d'une forte carence en fer (50 % des cas). Cependant, des pathologies (comme la thalassémie) induisent des anémies sans lien avec une carence en fer.

Personnes à risque

Certains individus sont plus susceptibles d'être touchés par une anémie liée à une carence en fer que d'autres. Selon l'OMS [1], que ce soit dans des pays développés ou sous-développés, les enfants, les femmes en âge de procréer, les femmes enceintes et les personnes âgées sont des groupes à risques.

Les besoins en fer des enfants varient en fonction de l'âge de 0,6 à 2 mg par jour. En effet, la croissance demande de grandes ressources en fer, que ce soit pour le bon fonctionnement des fonctions physiologiques que pour parer aux variations de volumes sanguins (production d'hémoglobine) induits par la croissance. Dans le cas des nourrissons, si la mère a été anémiée pendant la grossesse, ils peuvent également naître avec cette pathologie et présenter des troubles

cognitifs.

Les femmes en âge de procréer sont, avec les femmes enceintes, les personnes les plus touchées par l'anémie. Les pertes de sang mensuelles peuvent entraîner des carences en fer et à terme une anémie. On préconise donc un apport de $\sim 2,5$ mg par jour par femme. Concernant les femmes enceintes, la croissance du fœtus induit un accroissement du volume sanguin afin de fournir à ce dernier une quantité suffisante d'oxygène. Ce changement de volume sanguin est donc associé à une production de globules rouges qui épuise les réserves en fer de l'organisme. Si ces réserves ne sont pas réapprovisionnées correctement, une anémie peut avoir lieu et peut entraîner des problèmes de développement chez le fœtus. Ces deux catégories de personnes sont la principale cible des ONG¹ qui cherchent à prévenir les maladies nutritionnelles.

Les personnes âgées font également partie d'un groupe à risque. En effet, ces personnes sont souvent sujettes à des problèmes de petits saignements au niveau intestinal et gastrique voire à des ulcères. Ces problèmes sont parfois liés à la prise de certains médicaments qui favorisent ces phénomènes (l'aspirine en particulier). Ces petites pertes de sang, associées à l'absorption intestinale des nutriments qui diminue avec l'âge peuvent, à terme, entraîner une anémie.

Traitements

Les traitements couramment prescrits aux personnes qui souffrent d'anémies sont des médicaments associant du fer sous forme ferreux ou ferrique à des sels tels que des sulfates ou des fumarates. Malheureusement ces solutions induisent des problèmes gastriques et digestifs (constipation, douleurs abdominales,...). Les médecins mettent également en garde leurs patients contre la consommation de certains aliments qui peuvent réduire l'absorption du fer (thé, café, protéines animales ...) et leur conseillent de consommer de la vitamine C qui va avoir une action réductrice sur le fer.

1.1.6 Enrichissement en fer dans les aliments

Différentes stratégies ont été mises en place pour parer aux effets secondaires induits par les traitements contre les carences en fer. Une des principales a été d'essayer de compléter des produits alimentaires avec du fer. Une étude a fait le bilan de différentes approches [9] et a conclu dans un premier temps que l'accès à des essais cliniques était un frein important à la validation des différentes pistes envisagées. D'autre part, les auteurs de cette étude ont pointé une problématique importante disant qu'ajouter du fer au sein d'une matrice alimentaire complexe, même si elle contient des composants capables d'augmenter l'absorption du fer (fibres), n'améliorent pas forcément la biodisponibilité du fer. En effet, certains des ingrédients présents dans la matrice alimentaire peuvent être porteurs de groupements pouvant lier le fer et ne permettent donc pas le relargage du fer pendant la digestion.

1. Organisations non gouvernementales.

1.2 Pourquoi les polyosides anioniques sont-ils capables d'interagir avec des cations divalents ?

Le polyGalA fait partie de la famille des polyosides anioniques, ce qui signifie que lorsque le pH est supérieur au pKa des fonctions carboxyles qui le composent, sa charge globale devient négative et permet sa gélification en présence de cations divalents.

1.2.1 Caractéristiques des polyosides anioniques

Les polyosides anioniques sont des biopolymères largement utilisés en industries agroalimentaires et pharmaceutiques en tant qu'épaississants, stabilisants, gélifiants ou encore agents d'encapsulation. Dans cette thèse, je me focaliserai sur les propriétés gélifiantes de ces macromolécules. Bien que largement étudiées, ces propriétés ne sont pas encore complètement comprises car les mécanismes de formation des gels, ainsi que leur structure, ne sont pas encore complètement connus.

De nombreux facteurs intrinsèques aux chaînes de polyosides peuvent moduler ces mécanismes de gélification. En effet, les polyosides anioniques peuvent être issus de plantes (pectines), ou d'algues (alginate, carraghénanes), ce qui, en fonction de la nature de ces êtres vivants et de leurs conditions de croissance, induit des compositions en sucres très variables. En effet, selon les origines, les polyosides sont composés de monomères constitutifs différents et on différenciera alors les homopolyosides, dont les chaînes sont composées de monomères d'une seule nature, des hétéropolyosides qui sont constitués d'au moins deux types de monomères. De plus, le squelette de ces chaînes de monomères peut être interrompu par d'autres sucres pouvant être le point d'attache de ramifications.

L'ensemble de ces facteurs influencent le comportement des chaînes qui varient aussi bien en système dilué qu'en système concentré, ce qui module le mécanisme de gélification². Enfin, les monomères constitutifs des polyosides anioniques, qui varient en nombre, portent des groupements de différentes natures chimiques (carboxyles pour les pectines et l'alginate, sulfates pour les carraghénanes). Ainsi, la taille des chaînes et la répartition des groupements chargés le long des chaînes de biopolymère pourront également moduler les propriétés du polyoside correspondant.

Outre ces paramètres intrinsèques, les paramètres physico-chimiques tels que le pH, la force ionique, la température, la concentration en biopolymères, la présence d'ions ou d'autres molécules (protéines, chélateurs, autres polyosides, dépresseurs d'activité d'eau) sont des facteurs extrinsèques qui influencent le processus de gélification. Ces conditions physico-chimiques modulent notamment la charge du polyélectrolyte et donc les interactions inter et intramoléculaires susceptibles d'avoir lieu en solution diluée ou concentrée.

La famille des polyosides étant trop vaste pour être discutée de façon exhaustive dans ce manuscrit, je ne présenterai dans ce chapitre que les alginates et les pectines, polyosides souvent comparés dans la littérature du fait de leurs unités constitutives qui possèdent des groupements

2. Ces propriétés structurales seront détaillées respectivement pour les alginates et les pectines dans les sections 1.2.2 et 1.2.3.

carboxyles qui peuvent suivre les mêmes mécanismes de gélification. En effet, les alginates sont des polysides linéaires pouvant être comparés au polygalacturonate qui constitue le squelette des pectines.

1.2.2 Les alginates

Les alginates sont des polysides anioniques linéaires issus d'algues brunes ou de bactéries. Ces macromolécules sont des hétéropolymères composés de résidus de D-mannuronyle (M) et L-guluronyle (G) liés respectivement en β et α (1-4) dont la répartition va dépendre de l'organisme dont les alginates sont issus et de leurs conditions de croissance.[10] Les chaînes d'alginate sont constituées de blocs homopolymériques de M ou de G interrompus par des régions où les deux unités coexistent et sont alternés (MG-blocs)(Figure 1.4)[11] . Smidsrød a défini les proportions des différents blocs comme augmentant dans le sens [12] :

$$MG - blocs < MM - blocs < GG - blocks$$

Dans ce même article Smidsrød propose que ce sont les groupements G qui permettent de fixer les ions calcium. La proportion majoritaire de G-blocs confère donc la capacité des alginates à gélifier et à former des gels rigides.

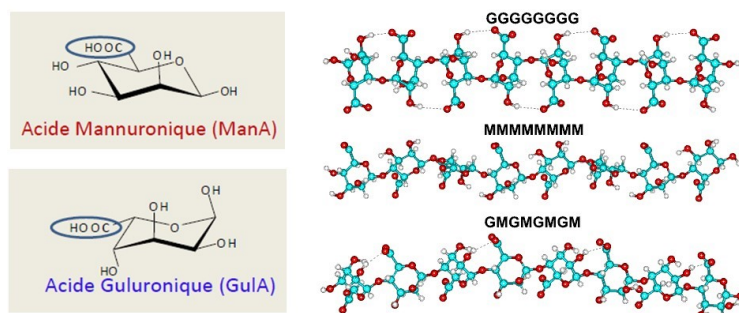


FIGURE 1.4 – Schéma des groupements constitutifs des chaînes d'alginate et de leur répartition. Les groupements M correspondent aux acides mannuroniques et les groupements G aux acides guluroniques d'après [13].

Les groupements G (ou GulA) sont presque des énantiomères³ des galacturonyles (GalA) qui composent le squelette des pectines (Figure 1.5). Ainsi, dans la littérature, la comparaison des mécanismes de gélification mettant en jeu ces deux types de macromolécules, appelées polyuronates est très courante.

3. Le groupe hydroxyl O_3-HO_3 est en position équatoriale pour les GalA et en position axiale pour le GulA (cf groupement entourés en orange sur la Figure 1.5).

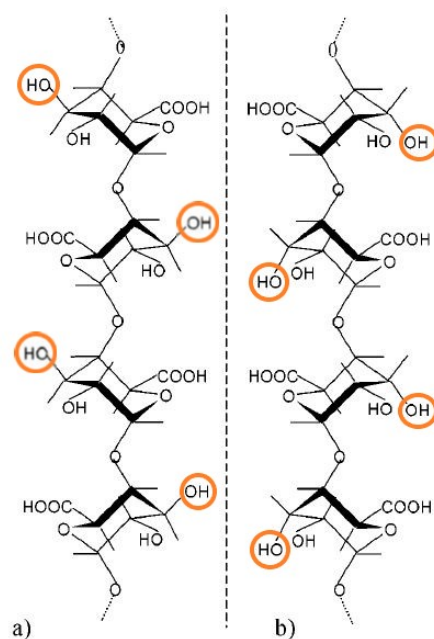


FIGURE 1.5 – Schéma des structures en hélice du a) polygalacturonate et du b) polyguluronate d'après [14].

Dans la littérature, différents cations divalents et trivalents ont été utilisés pour former des hydrogels à partir de ces chaînes. Les ions les plus souvent utilisés sont les ions Ca^{2+} même si les ions Ba^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{3+} ou encore Al^{3+} ont également fait l'objet de différentes études.[15, 16, 12]

1.2.3 Les pectines

Les pectines sont des polysides anioniques ramifiés extraits des parois cellulaires de nombreux végétaux. Le plus souvent, elles sont issues de pelure de pommes ou de citrons ou encore de pulpe de betteraves sucrières. La structure de base des pectines consiste en un polymère linéaire de résidus -D galacturonyle liés en $\alpha(1-4)$ par une liaison glycosidique (Figure 1.6)

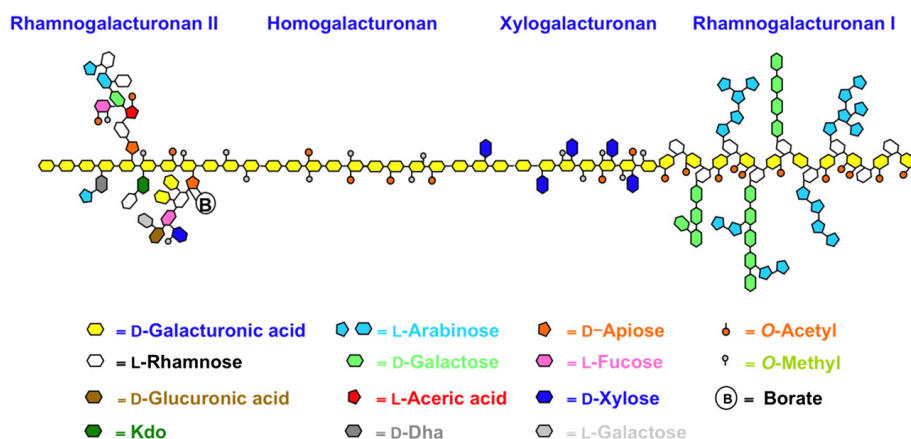


FIGURE 1.6 – Schéma de la structure des pectines d'après [17].

4. liste non exhaustive.

Les groupements carboxyles des galacturonyles (GalA) peuvent être naturellement méthylé (Figure 1.7). On définit ainsi le degré de méthylation (DM), comme étant le nombre de fonctions carboxyles méthylées pour cent motifs de galacturonyles. Ce même groupe carboxyle peut, au cours du traitement industriel de déméthylation en milieu ammoniacal, être amidé. Dans ce cas, on parlera du degré d'amidation (DA) et de pectines amidées (AM) (Figure 1.7). La chaîne principale de monomères est interrompue par des résidus de rhamnose qui font office de points d'attache pour les ramifications (composées de sucres neutres) (Figure 1.6). A partir du DM, on définit deux catégories de pectines. On distingue les pectines faiblement méthylées (LM) des pectines fortement méthylées (HM). Une pectine LM possède un DM inférieur à 50% alors qu'une pectine HM possède un DM supérieur à cette valeur. De ce fait, les propriétés de gélification sont différentes entre ces deux catégories de pectines. En effet, les pectines HM vont gélifier en milieu acide et en présence d'un dépresseur d'activité d'eau (saccharose) et les pectines LM vont gélifier à froid en présence de cations divalents⁵ tels que Ca^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{2+} . [19, 20, 3, 21]

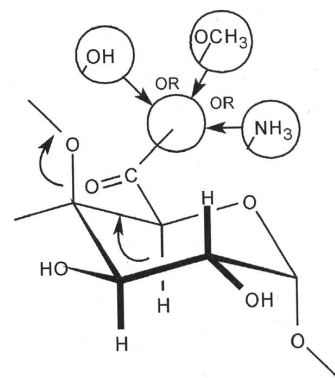


FIGURE 1.7 – Schéma d'une unité galacturonyl pouvant être composée d'un groupement carboxyl, d'un groupement ester ou d'un groupement amide d'après [18].

1.2.4 L'acide polygalacturonique

Comme décrit précédemment l'acide polygalacturonique constitue le squelette des pectines. C'est donc un polyside linéaire qui peut être anionique lorsque le pH utilisé pour sa solubilisation est supérieur au pKa de ces fonctions carboxyliques (3,4). L'utilisation de ce biopolymère est un système modèle pour étudier les associations mises en jeu entre les pectines (ou les alginates) et les cations divalents car la macromolécule ne contient pas de groupements hydrophobes et de ramifications susceptibles d'interférer dans le processus de gélification. De plus, elle permet de maximiser la présence des groupements carboxylates et ainsi d'obtenir un maximum de sites de fixations pour les cations divalents.

1.3 Quels sont les mécanismes d'associations mis en jeu lors de la formation d'un hydrogel ?

Nous avons donc présenté les particularités structurales des chaînes d'alginate et de pectine, mais savons-nous pourquoi ces chaînes, lorsqu'elles sont chargées négativement, ont la capacité de former des hydrogels en présence de cations divalents ?

En se basant sur l'état des connaissances de 1969 sur les alginates et les pectines, Rees, qui est le précurseur du modèle de l'association des polyuronates avec les cations divalents, avait alors supposé que : *" The general explanation is that the solution (or sol) that exists before gelation is a typical solution of polymer molecules, but, that gel formation involves association of chain segments resulting in a three-dimensional framework that contains solvent in the interstices. The associated regions are known as junction zones, and may be formed from two or more*

5. là encore la liste n'est pas exhaustive.

chains". [22] Ce sont spécifiquement ces "zones de jonctions" qui ont fait l'objet de nombreuses études depuis lors. Leur description a été faite majoritairement sur le système Ca^{2+} -alginate. Rees a décrit que ces zones de jonctions nécessitent une forte énergie d'activation pour être dissociées, ce qui d'après lui, en plus des résultats obtenus par diffraction rayons X, suggère la formation de "microcrystallites", sièges de phénomènes d'attractions fortes qui coopèrent.

Suite à cette étude, Grant *et al.* ont schématisé pour la première fois en 1973 le modèle de l'association entre les cations calcium et les unités GulA (Figure 1.8).[23] Ils ont alors décrit le modèle "egg-box" en expliquant que l'association des cations calcium avec les unités GulA était un mécanisme coopératif qui mettait en jeu 2 chaînes ou plus. Les chaînes forment alors une structure à deux dimensions où les interstices peuvent emprisonner les cations calcium. Ainsi les chaînes peuvent être assimilées aux compartiments d'un boîte à œufs et les cations aux œufs. On définit alors deux chaînes de polymères liées entre elles par des cations divalents comme un dimère.

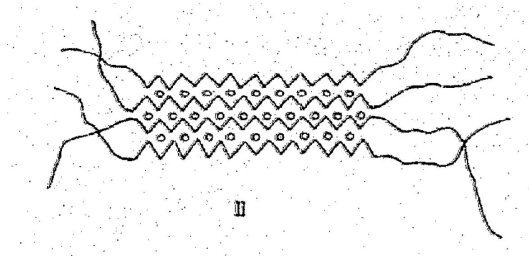


FIGURE 1.8 – Schéma du modèle "egg-box" proposé par Grant *et al.* pour illustrer l'organisation des chaînes de polyuronate les unes par rapport aux autres en présence d'ions calcium.

Le modèle "egg-box" est le point commun à toutes les études portant sur la compréhension des mécanismes de gélification. Cependant, il est important d'avoir en tête que ces études ont présenté des modèles décrivant les structures formées à différentes échelles spatiales. On différenciera alors, les études décrivant les interactions entre le cation divalent étudié et les unités uronates, de celles portant sur la mise en place du réseau des chaînes de polymère.

Au cours de l'histoire, ces caractérisations ont été faites en fonction de la nature du cation divalent étudié car les interactions cation divalent-GulA ou (GalA) vont dépendre des propriétés physiques de ce cation, en particulier sa géométrie dans l'eau, ses orbitales atomiques, son diamètre ou encore sa capacité à se désolvater, ce qui modifie le réseau formé. C'est pourquoi, dans les paragraphes suivants, je ferai la distinction entre ces deux échelles d'observation pour des gels formés avec différents cations divalents.

Avant d'entrer dans le détail de cette section, il est important de définir un paramètre indispensable à la compréhension des structures formées. Ce paramètre clé est le rapport molaire R défini comme :

$$R = \frac{[M^{2+}]}{[\text{unités uronates}]} \quad (1.1)$$

où : $[M^{2+}]$ est la concentration molaire en cations divalents et $[\text{unités uronates}]$ est la concentration molaire en unités GulA (pour l'alginate) ou GalA (pour la pectine ou le polyga-

lacturonate).

Le rapport R qui a été défini comme celui permettant la gélification des alginate et des pectines est égal à 0,25. Cette valeur traduit ce qui a été proposé dans le modèle "egg-box" [23] qui décrit qu'un cation divalent interagit avec 4 unités GulA ou GalA pour former un gel.

1.3.1 Mécanismes d'associations locales entre les cations divalents et les unités uronates

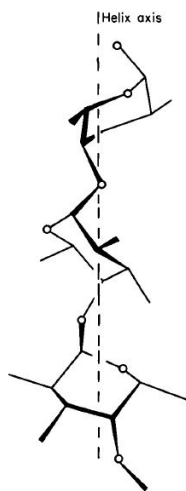


FIGURE 1.9 – Structure en hélice des chaînes de polyuronate présentées par Rees. [22].

Dans son article précurseur du modèle "egg-box" dans lequel il a décrit l'organisation des chaînes en "zones de jonction", Rees a également essayé de comprendre comment les cations calcium interagissaient avec les unités uronates. Il a alors déterminé que, grâce à la structure en hélice des chaînes de polyuronate (Figure 1.9), des cavités pouvant "accueillir" le cation étaient réparties le long des chaînes. Ce sont d'ailleurs ces cavités qui ont été assimilées à des "nids" et qui ont inspiré Grant *et al.* dans la définition de leur modèle "egg-box" où ils avaient décrit que la structure en hélice des chaînes de polyuronate orientait les unités d'une telle manière que les cations calcium pouvaient s'associer avec 4 oxygènes venant de deux unités successives.

A cette époque Rees avait contredit l'hypothèse qui présentait l'association des cations divalents aux unités GulA et GalA comme une simple interaction électrostatique et proposa l'hypothèse que cette association était la combinaison de différents types d'associations mettant en jeu les forces électrostatiques, les groupements carboxylates et les groupements hydroxyls des unités uronates.

En partant de cette théorie, Angyal en 1973 a proposé un mode d'interaction mettant justement en jeu les différentes fonctions chimiques décrites par Rees (Figure 1.10).

Un second type d'hypothèse a ensuite été avancé par Dheu-Anries et Pérez en 1983[25] à partir d'une revue des données de littérature de l'époque. Ils ont proposé que l'association entre le cation divalent et le site de fixation était fonction de la géométrie du site de chélation qui permet ou non le contact entre les groupements carboxylates et le cation plutôt que de la conformation des chaînes. Ils ont déterminé que statistiquement les groupements carboxylates étaient placés autour de l'atome de calcium dans un rayon de 2,30 à 2,85 Å. Ce type d'associations induirait des contraintes géométriques sur le cation et sa couche d'hydratation si bien qu'ils ont proposé 4 géométries probables des cations calcium. L'hypothèse qu'ils estiment la plus pro-

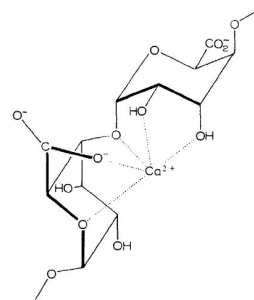


FIGURE 1.10 – Mode d'association entre les cations calcium et deux unités GulA successives d'après Angyal [24].

bable considère que l'atome de calcium interagit avec 8 oxygènes (Figure 1.11 c)). Les deux autres possibilités décrivent que l'atome de calcium interagit avec 7 (Figure 1.11 a) et b)) ou 9 (Figure 1.11 b)) oxygènes, ce qui correspondrait à une association tridentate avec les sites de fixation.

Quelques mois plus tard, Mackie *et al.*[26] ont à leur tour proposé un modèle d'association. La force de cette étude est qu'ils se sont basés sur des données expérimentales couplées à des modélisations moléculaires. De ce fait, ils ont défini, en prenant en compte des dimères uro-nates, les atomes d'oxygènes impliqués dans la fixation du calcium.

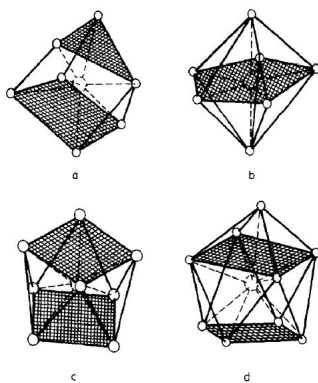


FIGURE 1.11 – Géométries des ions calcium pouvant décrire leur association avec les unités GulA [25].

Leurs résultats leur ont permis de proposer l'hypothèse que les oxygènes O(2), O(3), O(61'), O(62') et O(5) (Figure 1.12) peuvent correspondre à des points d'interactions avec les cations calcium. De plus, ils ont décrits les atomes d'oxygènes O(2), O(3) et O(61') comme étant capable de former une liaison tridentate avec les cations calcium.

Ils ont également ajouté que les dimensions du site de fixation du calcium composé de deux unités guluronate liées en α (1-4) permettent à une grande variété de cations d'y être associés tout en maintenant l'angle de torsion de la liaison glycosidique. Le mode d'association qu'ils ont décrit est valable, d'après leur modélisation, pour des chaînes associées de façon parallèle ou antiparallèle.

La conclusion de cette étude précise cependant que ces résultats sont seulement spéculatifs et nécessitent un approfondissement des calculs des énergies d'interactions et l'élucidation de la structure cristalline des complexes polyuronate-calcium.

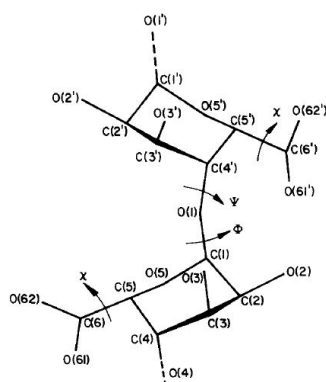


FIGURE 1.12 – Structure moléculaire de deux unités uronates liées en α (1-4) d'après [26]. Les groupements capables d'avoir un certain angle de rotation sont identifiés par les lettres χ , Ψ et Φ .

Cette remarque pointe le problème majeur de toutes les études citées dans cette section qui n'ont pas pu faire le parallèle entre des données simulées (souvent non réalistes) et des données expérimentales nécessitant le plus souvent une préparation des échantillons pouvant induire des modifications structurales des systèmes étudiés.

Ce n'est que des années plus tard (2001) qu'une étude a réussi à mettre en place des modélisations moléculaires capables de mettre en évidence les interactions mises en jeu dans le modèle "egg-box". Braccini et Pérez [14], ont d'ailleurs remis en cause pour les pectines le modèle proposé initialement par Grant *et al.*. La Figure 1.13 présente les associations les plus favorables entre les chaînes de polyguluronate (alginate) et les ions calcium (a) et les chaînes de polygalacturonate (pectine) et les ions calcium (b) dans le cas de différents types d'organisation des chaînes. Ces mo-

délimitations présentent des associations distinctes pour les alginate et les pectines. Les auteurs ont alors proposé pour la pectine un mode d'association appelé "shifted egg-box". Ce modèle permet un maximum d'interactions de Van der Waals entre les chaînes lorsqu'elles sont associées au cation, des cavités symétriques ayant une taille appropriée pour les cations calcium et engendre la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires. L'ensemble de ces interactions entraîne une association très forte des chaînes, ce qui est cohérent avec les données expérimentales de l'époque. Cependant, il est à noter que les modélisations présentées dans ces travaux ont été effectuées sans prendre en compte l'effet de l'hydratation des chaînes sur les interactions mises en jeu avec les ions calcium. Les auteurs précisent donc que ces résultats sont à prendre avec précaution.

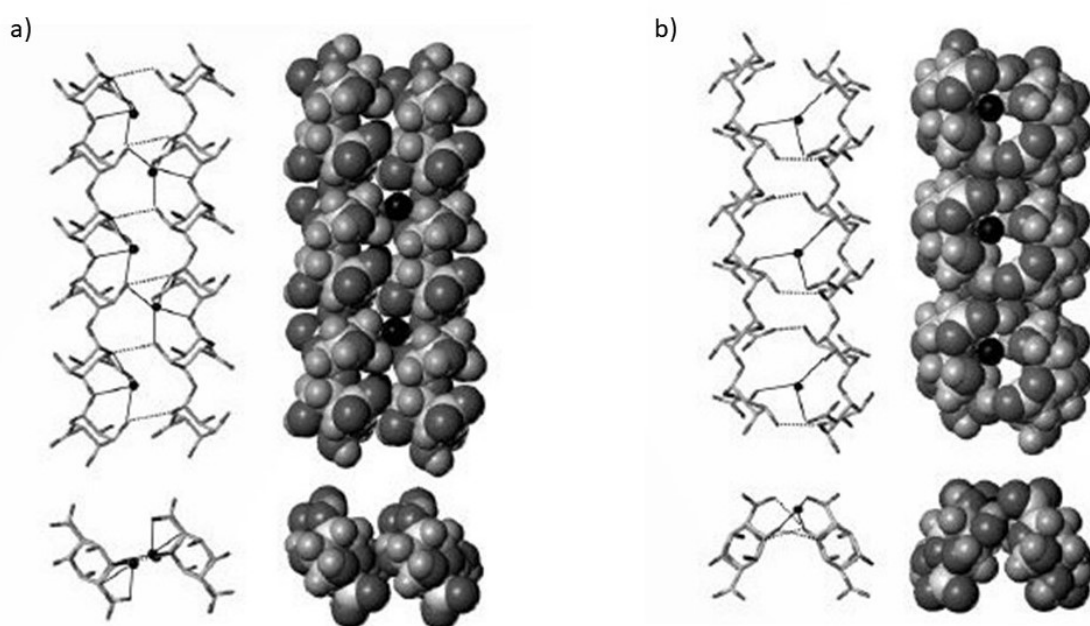


FIGURE 1.13 – Structure des complexes calcium-polyuronate (a) et calcium-polugalacturonate (b) d'après [14].

Nous savons que le modèle "egg-box" consiste en l'association d'un cation divalent avec quatre unités GulA ou GalA, mais qu'en est-il du mode fin d'association du cation avec les fonctions chimiques qui composent les unités uronates ? En 2015, Assifaoui *et al.* ont étudié via des simulations de dynamique moléculaire, prenant en compte l'hydratation des chaînes, les interactions entre le polygalacturonate et deux cations divalents connus pour leurs capacité à former des hydrogels : le calcium et le zinc. En accord avec ce qu'avaient supposés Braccini et Pérez, ils ont montré que le calcium ne s'associait pas aux unités GalA en suivant le modèle "egg-box" mais semblait s'associer de façon bidentate avec les fonctions carboxylates (Figure 1.14 a)). Ainsi, l'ion calcium interagit avec 4 molécules d'oxygène venant de deux fonctions carboxylates situés sur deux unités GalA provenant de deux chaînes différentes. Dans le cas du zinc, il semblerait que l'association du cation suive le modèle "egg-box". Le cation s'associe donc de façon monodentate avec deux oxygènes provenant de deux fonctions carboxylates de deux chaînes différentes et est également maintenu par deux oxygènes provenant de fonctions hydroxyles des deux chaînes adjacentes (Figure 1.14 b)). Ils ont également mis en évidence dans cette étude que les différences d'associations locales mises en évidence par les simulations ont des impacts sur les propriétés des réseaux formés et ont montrés des structures plus ou moins

hétérogènes⁶.

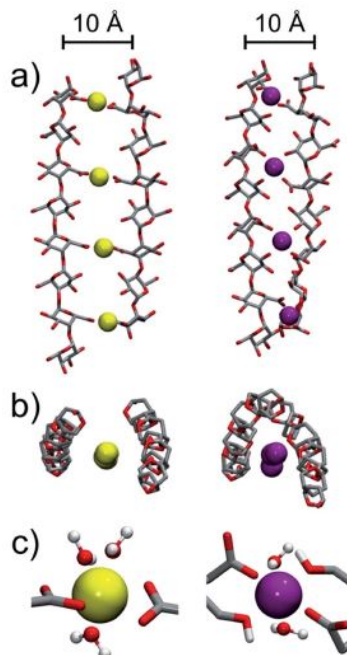


FIGURE 1.14 – Modélisations des associations bidentate des ions calcium (a) et monodentate des ions zinc (b) avec les unités galacturonate d'après [20].

Huynh *et al.* 2016 [3] ont ensuite montré par des simulations de dynamique moléculaire que la mise en place du réseau formé lors du phénomène de gélification était très dépendante de la nature du cation (Figure 1.15). Ils se sont intéressés aux ions calcium, car c'est le cation divalent le plus étudié, aux ions barium et magnésium⁷ qui comme le calcium appartiennent à la famille des alcalino-terreux mais qui possèdent des diamètres différents⁸ et aux ions zinc car ils ont la même taille que les ions magnésium mais sont capables de former des gels en présence de pectine.

La partie a) de la Figure 1.15 présente les potentiels de force moyenne (PMFs) représentant l'interaction des ions Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} et Mg^{2+} avec leurs molécules d'eau. L'évolution des potentiels traduisent la capacité d'un cation à libérer une molécule d'eau de sa première (I) ou de sa seconde (II) couche d'hydratation. Afin de définir la probabilité de la désolvatation d'un cation, on prendra en compte : (i) la valeur du PMF correspondante au minimum du puits de potentiel et (ii) la barrière en énergie entre deux puits de potentiel. (i) plus la valeur du PMF est petite, plus la présence d'une molécule d'eau à la distance cation-eau correspondante est probable. Cependant, si (ii) la barrière en énergie entre deux puits de potentiel est importante, le passage d'une molécule d'eau de (I) à (II) sera difficile voir impossible. C'est ce que nous pouvons observer pour les ions magnésium et les ions zinc qui possèdent des barrières en énergie très importantes lorsqu'il s'agit de perdre une molécule d'eau de leur première couche d'hydratation alors que le PMF de leurs puits de potentiels (I) sont égaux à ceux observés dans le cas des ions

6. Ces résultats seront présentés dans la section 1.3.3.

7. Les ions Mg^{2+} n'induisent pas la réticulation des polyuronates[27].

8. la taille de ces ions évolue dans le sens $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ mais tous possède la même structure électronique np^6 .

calcium et barium. Ainsi, nous pouvons classer les cations par leur capacité à se débarrasser de leur couche d'hydratation dans l'ordre suivant :

$$Ba^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+}$$

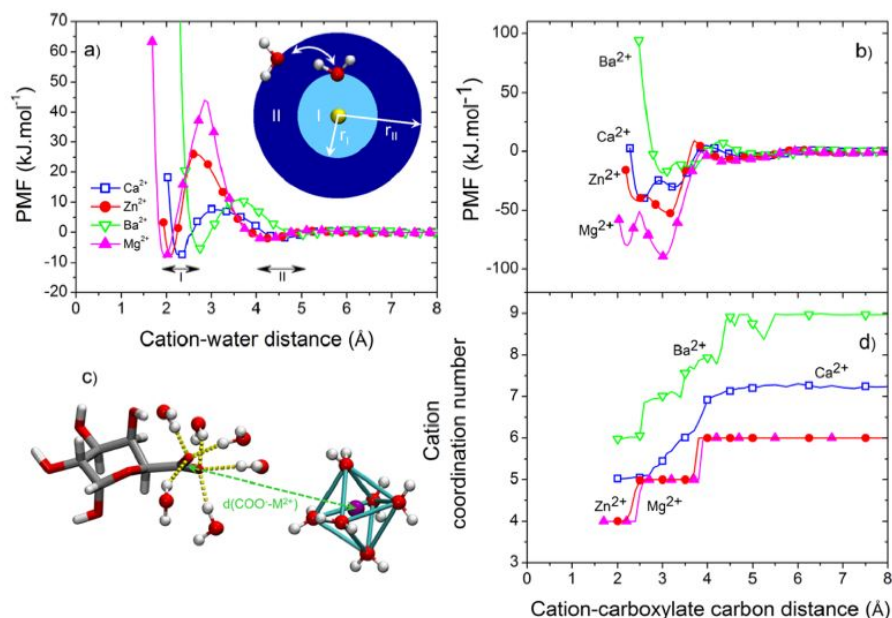


FIGURE 1.15 – Potentiels de force moyenne (PMFs) de l'interaction entre les cations divalents et a) leurs molécules d'eau ou b) les unités GalA. Le cation est éloigné de l'unité GalA afin de mesurer les PMFs correspondants, comme l'illustre c). Seule les molécules de la première couche d'hydratation du cation et des fonctions carboxylates sont représentées ici et les lignes pointillées jaunes représentent les liaisons hydrogène. Le nombre de coordination moyen du cation en fonction de la distance cation-carboxylate est présenté en d).[3].

La partie b) de la figure 1.15 présente les potentiels de force moyenne (PMFs) représentant l'interaction des ions Ca²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺ et Mg²⁺ avec les groupements carboxylates en fonction de la distance entre les cations et les fonctions carboxylates. Nous pouvons déjà remarquer que plus le cation est petit, plus il est facile de le rapprocher de la fonction carboxylate. Lorsque l'on éloigne le cation de la fonction carboxylate, on peut observer deux puits de potentiels (entre 2,0 et 3,7 Å en fonction du cation considéré). Ces deux minimums correspondent à des interactions dites CIP (Contact Ion Pair) qui traduisent l'association du cation avec un oxygène (association dite monodentate) ou deux oxygènes (association dite bidentate) provenant du groupement carboxylate. Une association bidentate correspond à une distance cation-oxygène du carboxylate globalement plus courte qu'une association monodentate car on considère la liaison avec le carbone de la fonction carboxylate. Ainsi, il apparaît que les cations calcium et barium interagissent préférentiellement de façon bidentate avec la fonction carboxylate et les cations zinc et magnésium de façon monodentate. Ce type d'association correspondrait au "egg-box" décrit dans la littérature. On remarque également un minimum de potentiel plus large et beaucoup moins profond à des distances plus grandes (4,5 - 5,5 Å) qui correspond à un type d'interaction de type SSIP (Solvent-Shared Ion Pair)⁹. Lorsque l'on regarde la barrière d'énergie libre entre les minimums correspondant aux association CIP et le minimum correspondant

9. Ce type d'interaction correspond au partage de la couche d'hydratation de deux éléments qui, ici, sont le carboxylate et le cation divalent.

à l'association SSIP, on remarque qu'elle est beaucoup plus importante dans le cas des ions zinc et magnésium, ce qui signifie qu'une énergie importante est nécessaire pour que ces deux cations viennent partager une molécule d'eau avec une fonction carboxylate. Cela veut également dire que si les cations zinc ou magnésium viennent s'associer en CIP avec les fonctions carboxylate, cette association sera très stable. La barrière de désolvatation du magnésium est la plus importante de tous les cations présentés ici, ce qui peut expliquer que ce cation ne puisse pas former de gel en présence de polygalacturonate. Les auteurs ont donc décrit que ce cation entraînait un phénomène de polycondensation via l'écrantage des charges des chaînes mais qu'il ne forme pas de points de réticulation, comme attendu lors d'un phénomène de gélification.

1.3.2 Mécanismes d'associations des chaînes

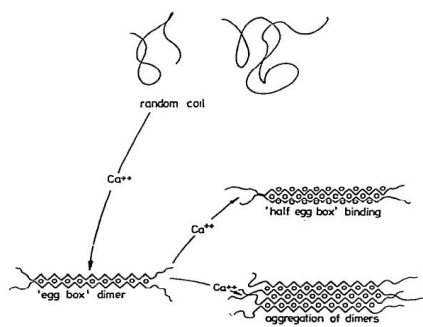


FIGURE 1.16 – Représentation des interactions inter-chaînes d'après [28].

Nous avons vu que les cations, suivant leur nature et leur capacité à se désolvater vont interagir localement de façon différentes avec les unités galacturonate. Il est alors intéressant de comprendre, à partir de ces associations locales, comment les chaînes de polyuronate vont s'organiser. Différents modèles ont essayé d'illustrer quels étaient les mécanismes d'association des chaînes les unes par rapport aux autres lorsqu'elles sont mises en contact avec des cations divalents. Il est à noter que souvent ces études ont été réalisées sur des systèmes dilués afin de réduire au maximum la probabilité d'association des chaînes et ainsi essayer de comprendre la mise en place progressive des "zones de jonctions".

Le modèle "egg-box" présenté par Grant *et al.* [23] décrit que les chaînes s'associent les unes avec les autres en formant des dimères via la présence des cations dans les cavités. Ces dimères s'assembleraient les uns avec les autres pour former des multimères.

En 1978, Morris *et al.* a repris le modèle "egg-box" mais a modulé les associations possibles en disant que ce modèle était très majoritairement favorable à la formation de dimères et que d'autres chaînes ne viendraient pas s'associer à cette structure déjà formée (Figure 1.16).[28] Ils ont justifié cette hypothèse par le fait que les mesures de dichroïsme circulaire qu'ils ont effectuées ont mis en évidence la fixation des cations calcium par des séquences répétées et peu agrégées de chaînes de polyuronate.

Environ 30 ans plus tard, Fang *et al.* ont proposé un tout autre modèle en introduisant le fait que l'organisation des chaînes évoluait avec le rapport molaire R représentant le rapport de concentrations entre les cations divalents et les unités Gula (ou GalA). En effet, à partir des mesures d'enthalpie d'association obtenue par ITC¹⁰(cf Chapitre 2), de viscosité et de dosage du calcium libre, ils ont déterminé que pour des rapports molaire $R < 0,25$, les cations calcium interagissent avec une seule chaîne d'alginate en formant ce qu'ils ont appelé un monocomplexe. Lorsque $0,25 < R < 0,55$, il y a formation de dimères, tels qu'ils ont été décrits par Rees et

10. Isothermal Titration Calorimetry.

Morris *et al.* [29, 22, 28] Enfin, pour des valeurs $R > 0,55$, les dimères s'associent pour former des multimères (Figure 1.17).

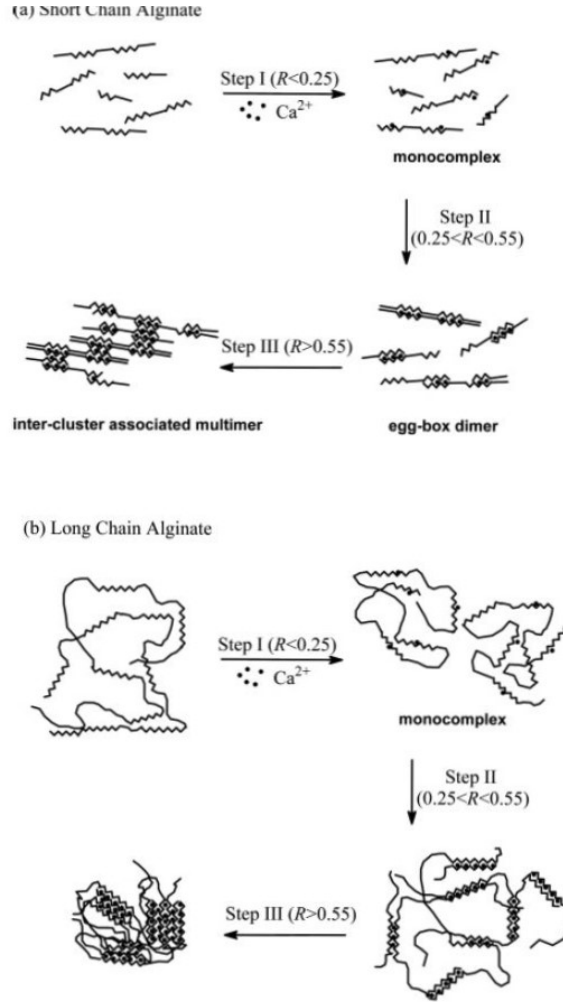


FIGURE 1.17 – Mécanisme de gélification de l'alginate (courtes et longues chaînes) en présence des cations calcium proposé par Fang *et al.* [29].

Plus récemment ce modèle a été remis en cause par Ventura *et al.*, qui ont étudié la gélification des pectines LM par des mesures de DXPA et des mesures de propriétés visco-élastiques, et ont également décrit que le rapport molaire avait une importance sur les associations inter-chaînes. Cependant, contrairement à Fang *et al.*, ils ont supposé que les monocomplexes, les dimères et les multimères formés pouvaient coexister pour un R donné. De plus, ils ont proposé un mode d'association supplémentaire pouvant expliquer la gélification des pectines qu'ils ont appelé points de réticulation ponctuels (ou point like cross-links). [19] Ils ont même ajouté que plus la concentration en cations augmentait, plus le nombre de points de réticulation ponctuels augmentait (Figure 1.18).

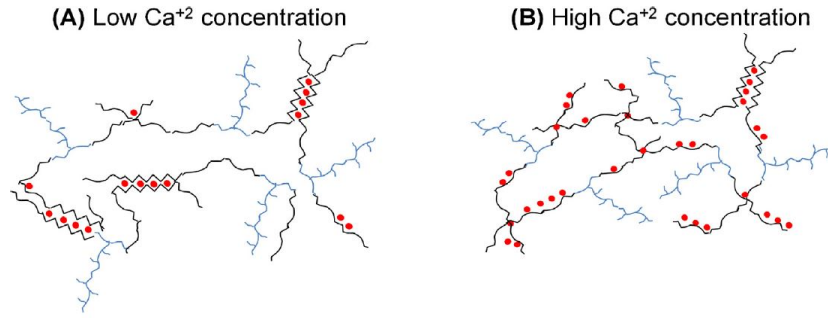


FIGURE 1.18 – Mécanisme de gélification des pectines LM en présence de calcium proposé par Ventura *et al.*. Les points rouges représentent les cations calcium et les portions bleues sur les chaînes représentent les ramifications de la pectine.[19].

Cette hypothèse a été reprise en 2016 par Huynh *et al.* qui ont cependant modulé le mécanisme en fonction notamment de la nature du cation divalent.[3] Ils ont alors défini une valeur R^* qui correspond à la valeur seuil du rapport molaire R permettant le passage des modes d'associations de type monocomplexe et points de réticulation ponctuels à la formation de dimères et de multimères. Ce R^* a été défini pour différents cations et semble donc être fonction des modes d'association présentés précédemment (Figure 1.15). R^* est petit quand il y a un équilibre entre le nombre et la stabilité des points de réticulations ponctuels. Ainsi, les auteurs ont défini :

$$R_{Ca^{2+}}^* < R_{Ba^{2+}}^* \sim R_{Zn^{2+}}^* \quad (1.2)$$

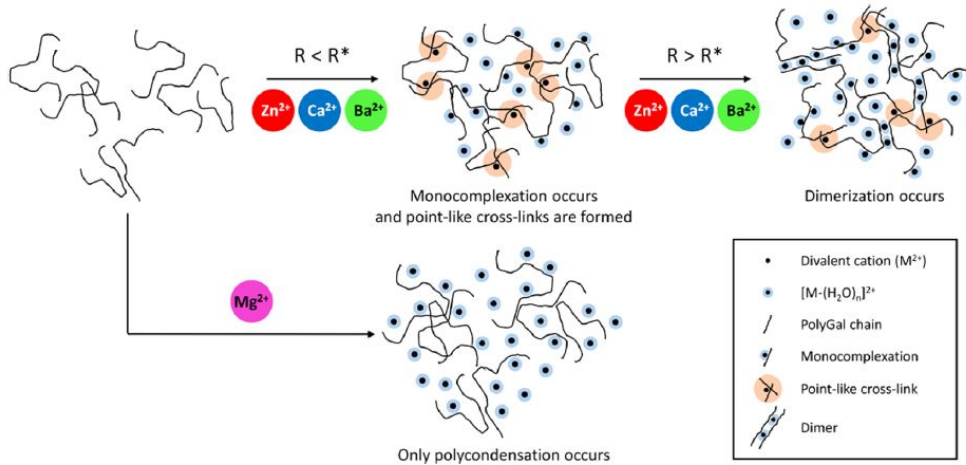


FIGURE 1.19 – Mécanisme de gélification du polygalacturonate en présence de différents cations divalents proposé par Huynh *et al.*[3].

Le barium, qui se "débarrasse" facilement de sa couche d'hydratation, se lie facilement aux unités galacturonates et forme donc facilement des réticulations ponctuelles mais ces dernières ne sont pas stables (Figure 1.20). A l'inverse, les ions zinc ont besoin de plus d'énergie pour se débarrasser de leur couche d'hydratation. De ce fait, le nombre de points de réticulation est faible mais leur stabilité est très importante (Figure 1.20). Le calcium lui, semble se trouver dans une situation intermédiaire en produisant un nombre suffisant de points de réticulations stables. Le magnésium ne se débarrasse pas de sa couche d'hydratation, ce qui induit qu'il ne s'associe donc pas fortement aux fonctions carboxylates. L'ajout de magnésium à une solution de polygalacturonate entraîne un phénomène de polycondensation dû à un écrantage des charges et non un phénomène de réticulation.

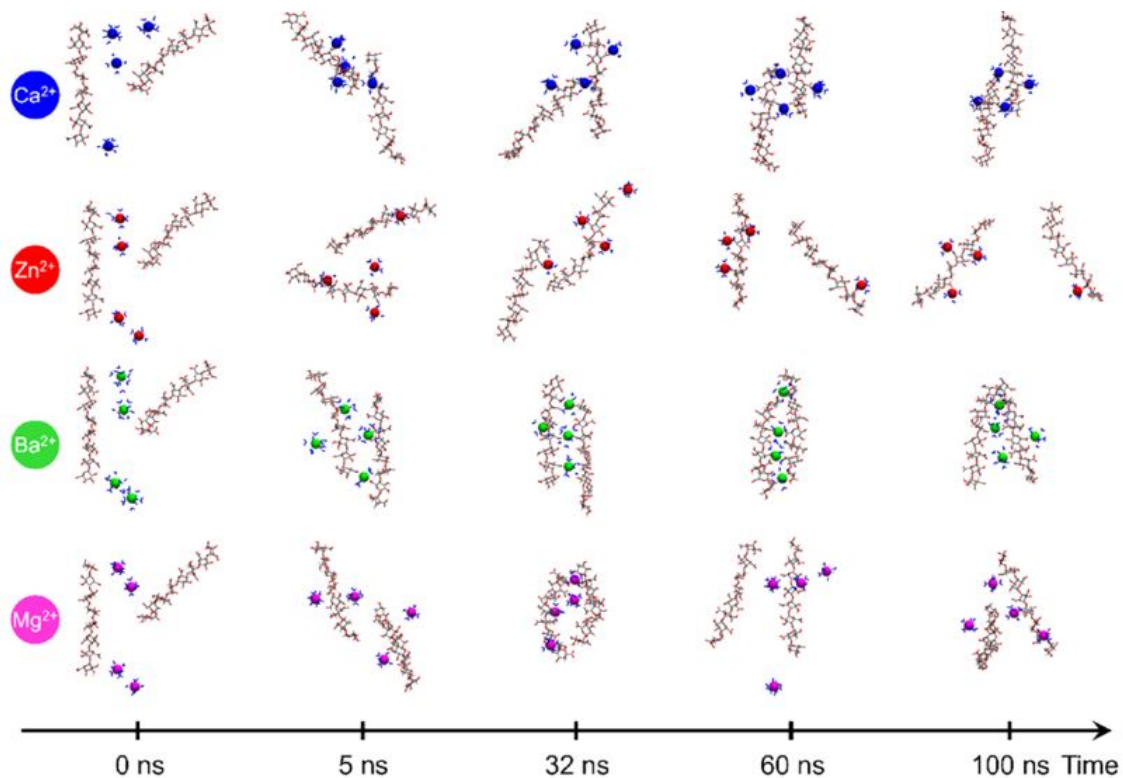


FIGURE 1.20 – Images des simulations de dynamique moléculaire présentant deux chaînes de polyGalA en présence de 4 cations (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+}) à différents temps de simulation. À $t = 0$, les deux chaînes sont dissociées et aucun des cations n'est en contact avec elles. À $t = 100$ ns (fin des simulations), la monocomplexation des cations Ca^{2+} , Zn^{2+} et Ba^{2+} a eu lieu (c'est à dire que chaque cation est lié à au moins une chaîne de polyGalA) mais aucun cation Mg^{2+} n'est lié. De plus, seulement les ions Ca^{2+} et Ba^{2+} ont pu se lier à deux chaînes via la formation de ponts $\text{GalA} - \text{M}^{2+} - \text{GalA}$. [3].

1.3.3 Comment l'association locale de deux chaînes mène-t-elle à la formation d'un réseau continu ?

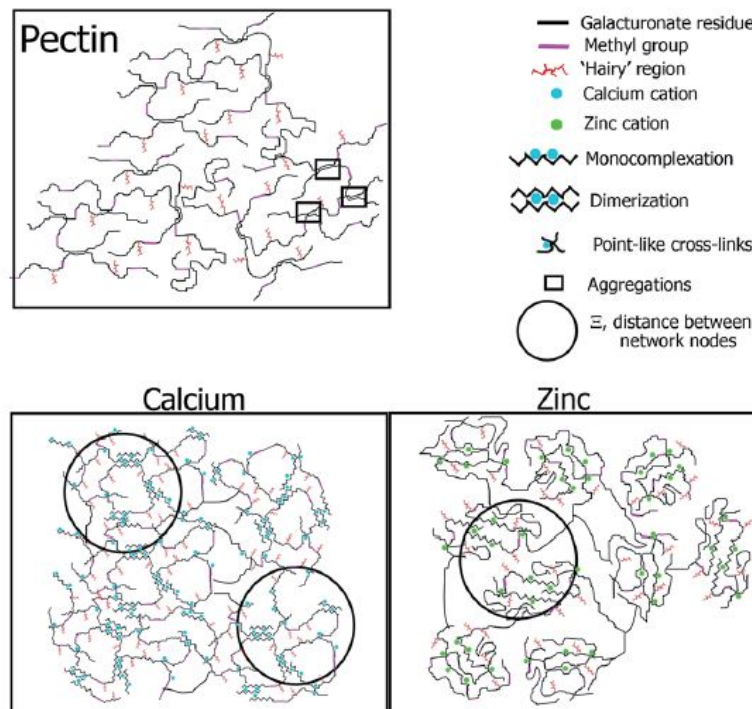


FIGURE 1.21 – Schémas illustrant les réseaux formés à partir du mélange des ions calcium et des ions zinc avec des chaînes de pectine. Le réseau Ca-pectine présente une organisation homogène alors que Zn-pectine présente une organisation hétérogène.[20].

Le lien entre les associations locales des chaînes et la structure finale du réseau n'est pas trivial. En effet, les mécanismes d'association des chaînes de polyuronate est fonction de la nature du cation et du mode d'association local correspondant. Il est donc important de comprendre quel est l'impact des associations locales mettant en jeu quelques chaînes sur la formation d'un réseau continu et dans quelle mesure ce dernier est homogène ou non.

Un des travaux qui illustre très bien le lien entre modes d'associations locaux et structure du réseau formé est celui de Assifaoui *et al.*[20] En effet, dans cet article, en parallèle des simulations de dynamique moléculaire que j'ai présenté précédemment, les auteurs ont effectué des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) et des mesures macroscopiques de viscosité et de turbidité afin d'obtenir des informations sur l'organisation du réseau formé. La DNPA est une technique utilisant le rayonnement neutron pour sonder des échelles d'observation locales allant de quelques nm à une centaine de nm. La mesure consiste à envoyer un faisceau monochromatique de neutrons, qui sont individuellement considérés comme une onde plane, sur un échantillon dont les noyaux des n atomes qui le constitue vont diffuser ces ondes planes incidentes en une somme de n ondes sphériques dont les interférences résultantes seront détectées (Le principe est détaillé dans l'annexe A). En faisant varier la longueur d'onde des neutrons constituant l'onde et la distance entre l'échantillon et le détecteur, il est alors possible de sonder un gamme de vecteurs de diffusion q correspondant aux échelles d'observations décrites. En traçant les spectres représentant l'intensité de diffusion $I(q)$ de l'échantillon

en fonction du vecteur de diffusion q , il est alors possible de déterminer l'organisation globale d'objets étudiés pour des petits q (état d'agrégation, rayons de giration de polymères à chaînes courtes...) et leur structure plus locale pour des grands q (section d'une chaîne de polymère, longueur de persistance...)

Pour leur études, les auteurs se sont placés dans des conditions de concentration en pectine ($C < C^*$ ¹¹) ne permettant pas la formation d'un gel et ont fait varier la concentration en cations pour tester des $R < 0,25$ et des $R > 0,25$.

Dans le cas du calcium, ils ont montré que lorsque R augmente, il y a de très fortes variations de viscosité associées à une faible augmentation de la turbidité, ce qui signifie que macroscopiquement la structure formée est homogène. Aux échelles locales, les mesures de DNPA ont montré qu'il n'y avait pas de différence majeure en terme d'état d'agrégation selon que R est inférieur ou supérieur à 0,25. A l'inverse, dans le cas du zinc, ils ont montré que, quand R augmente, la viscosité de la solution de pectine n'augmente que légèrement alors que sa turbidité augmente fortement. Ceci veut dire qu'il doit exister en solution des zones très denses avec des structures de taille importante réparties en solution et des zones très diluées, dont la viscosité est proche de celle de l'eau, qui permettent l'écoulement de la solution. Ce résultat a été confirmé par les mesures DNPA qui ont montré une augmentation de la densité de longueur de diffusion moyenne des chaînes qui a été assimilée à la création de zones denses associées à des zones beaucoup moins denses dans l'échantillon.

D'autres études se sont intéressées à l'organisation du réseau de polymère au sein de gels de pectine en fonction de la nature du cation divalent et du type de pectine¹² et ce pour différentes conditions de pH¹³. C'est le cas notamment de Kyomugasho *et al.* qui ont réalisé des images de microscopie électronique à balayage sur des gels plongés initialement dans de l'azote liquide pour figer la structure (cryo-SEM). Dans cette figure, ils ont comparé des hydrogels formulés à partir de pectines issus de pelures de citrons (CP) et de pectines issus de bettrave sucrière (SBP), à différents DM (donné par la valeur de pourcentage) et pour différents cations divalents. Ils ont donc comparé deux pectines avec des propriétés très différentes vis-à-vis de la gélification en obtenant finalement des structures qui semblent relativement identiques, ce qui laisse planer un doute sur la méthode employée pour la caractérisation de la structure locale du réseau de polymère formé. Il est à noter que tous les échantillons présentés dans la Figure 1.22 ont été préparés à partir de la même concentration en pectine.

11. C^* est la concentration de recouvrement et décrit la valeur de concentration à partir de laquelle les chaînes de polymères sont enchevêtrées et peuvent être facilement associées les unes avec les autres par réticulation.

12. Ils ont testés des pectines venant de pelures de citron et de bettraves sucrières ainsi que différents degrés d'estérification.

13. pH inférieur ou supérieur au pKa des fonctions carboxylates.

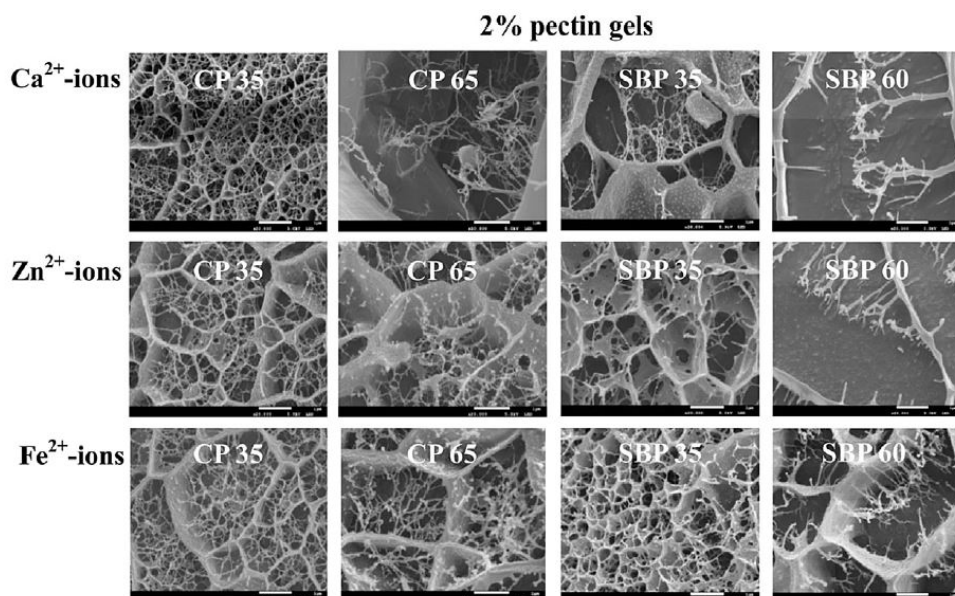


FIGURE 1.22 – Images obtenues par cryo-SEM (la barre d'échelle correspond à 1 μm) de gels de pectines (de concentration 2%) obtenus avec différents cations divalents pour différents types de pectines (CP = pectine issue de pelures de citron et SBP = pectine issue de bettraves sucrières).[30].

Les auteurs n'ont pu faire que des comparaisons qualitatives des différents réseaux formés et n'ont pas pu remonter à la détermination d'une taille de maille de réseau comme il est classique de faire via des mesures de diffusion de rayonnement X et neutrons. La détermination par cryo-SEM des réseaux formés après le processus de gélification est à prendre avec précaution. En effet, ces systèmes étant très riches en eau (jusqu'à 98%), il est difficile d'être certain que le processus de cryo-congélation ne modifie pas la structure des réseaux formés.

Récemment une étude a décrit l'utilisation d'un logiciel pour simuler un spectre DXPA à partir d'images d'hydrogels issue de microscopie électronique à transmission (TEM).[31] En comparant des données simulées avec des données expérimentales de DXPA, Hernandez-Cerdan *et al.* confirment le fait que l'épaisseur des chaînes et leur flexibilité observées par TEM est certainement modifiée par le traitement des échantillons avant l'observation microscopique. Cependant ils estiment que les structures mesurées par TEM et SAXS sont préservées pour des tailles supérieures à 20 nm.

1.3.4 Comment obtenir un gel continu à partir de la mise en contact de cations divalents avec des chaînes de polyuronate ?

Les études présentées jusqu'à présent ont décrit des systèmes dilués ou ont sondé des hydrogels à des structure locales. Il est maintenant intéressant de comprendre si la manière dont on mélange des cations divalents avec des chaînes d'uronates peut influencer la structure d'un hydrogel pour un mode d'association local donné.

La question que nous nous posons ici est donc la suivante : " Comment mettre en contact deux objets ayant une forte affinité l'un pour l'autre tout en créant un réseau continu et si possible homogène qui permet la formation d'un gel macroscopique?". Différentes techniques

de gélification sont présentées dans la littérature et induisent des propriétés macroscopiques différentes.

Gélification "externe"

Le premier protocole de formulation d'hydrogels que nous présentons ici est appelé protocole de gélification "externe". Ce qualificatif est utilisé car le compartiment qui contient l'agent réticulant est séparé du compartiment où se trouve la solution de biopolymères. La diffusion des cations se fait donc d'un compartiment à l'autre grâce à l'utilisation, le plus souvent, d'une membrane de dialyse¹⁴ possédant un seuil de coupure permettant uniquement le passage des cations.

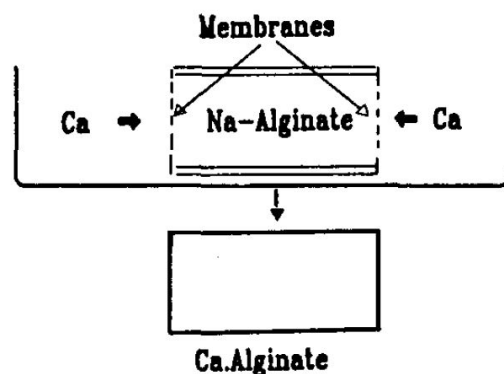


FIGURE 1.23 – Protocole de formation d'un gel en utilisant un protocole de gélification externe d'après [32]. Ici la diffusion se fait de part et d'autre du compartiment où se trouve le polyoside mais peut également se faire de manière unidirectionnelle.

Ce type de protocole a été utilisé et étudié à de nombreuses reprises, notamment parce qu'il est connu pour induire la formation d'hydrogels anisotropes présentant des gradients de concentration en polymère et en cations corrélés à un gradient de propriétés mécaniques.[33, 32, 34, 35] La partie du gel la plus proche de la membrane de dialyse devient très concentrée en polymère et très rigide et à l'inverse, la partie qui en est la plus éloignée devient moins concentrée et moins rigide. Skjåk-Bræk *et al.* ont mis en évidence que les gradients observés (gels de Ca^{2+} -alginate et pectate) étaient plus importants quand la concentration en polymères augmentait, quand la masse moléculaire des chaînes diminuait ou encore quand la concentration en cations dans le réservoir diminuait.[32] L'importance du gradient induit par la gélification est gouverné par la diffusion relative des chaînes de polymère par rapport aux cations divalents et de leur nature respective.[36, 37] La formation du réseau induit la formation d'un gradient de concentration local qui entraîne la diffusion du polymère en direction du front de migration.[38, 35, 39, 21].

Ce type de protocole de gélification met en évidence le fait qu'un réseau homogène formé par l'association d'un cation divalent avec les unités uronates peut engendrer un hydrogel possédant une structure hétérogène macroscopiquement. Ces hétérogénéités macroscopiques

14. Dans certaines études les auteurs font une membrane via la création d'une fine couche de gel obtenue après avoir vaporisé la solution de cations divalents à la surface de la solution de polyuronate. Ils ajoutent ensuite sur cette membrane la solution de cations.

observées pour ce protocole de gélification avaient été expliquée par des variations de structures locales du réseau dans les différentes parties du gel[12]. Cependant, à notre connaissance, aucun étude n'a sondé ces tailles caractéristiques pour valider cette hypothèse.

Gélification "interne"

Afin d'éviter la formation d'hydrogels macroscopiquement anisotropes, il est possible de procéder à un protocole de gélification dit "interne". Ce protocole consiste à libérer lentement et progressivement les cations divalents dans la solution à réticuler via l'utilisation d'un complexe insoluble. Couramment, les gels sont formés avec des cations calcium associés à des carbonates ou à des chélatants tels que l'EDTA¹⁵. La réduction lente du pH entraîne la protonation des groupements qui étaient initialement associés aux cations et ces derniers sont donc libérés progressivement, ce qui permet la formation d'un hydrogel. Un des avantages de ce protocole est qu'il permet le suivi cinétique de la formation d'hydrogels et notamment le suivi de l'évolution des propriétés visco-élastiques. Il présente cependant un inconvénient puisqu'il implique l'ajout de différents composants dans la solution de polymère, ce qui peut rendre complexe la compréhension des mécanismes d'association.

Formation de billes

La formation de billes est un procédé de gélification un peu en marge des deux protocoles cités précédemment car les applications recherchées sont différentes. En effet, la formation de billes est couramment utilisé pour l'encapsulation et la vectorisation de molécules actives (notamment dans le domaine de la pharmacie). Cependant, il est intéressant de faire le parallèle avec le procédé de gélification externe car là aussi, les cations diffusent d'un réservoir extérieur à la solution de biopolymère. En effet, le principe de ce protocole est de plonger une goutte de solution de biopolymère, à une concentration suffisante¹⁶, dans un réservoir contenant le cation divalent en excès. L'association des cations avec le biopolymère étant très rapide, la périphérie de la goutte gélifie instantanément et forme une coquille formant une membrane ne laissant passer que les cations (Figure 1.24). Un gradient de concentration se forme alors depuis la périphérie de la goutte jusqu'à son centre. La périphérie de la bille est donc très rigide et dense en chaînes de polymères contrairement au cœur de la bille qui est moins dense et flexible.

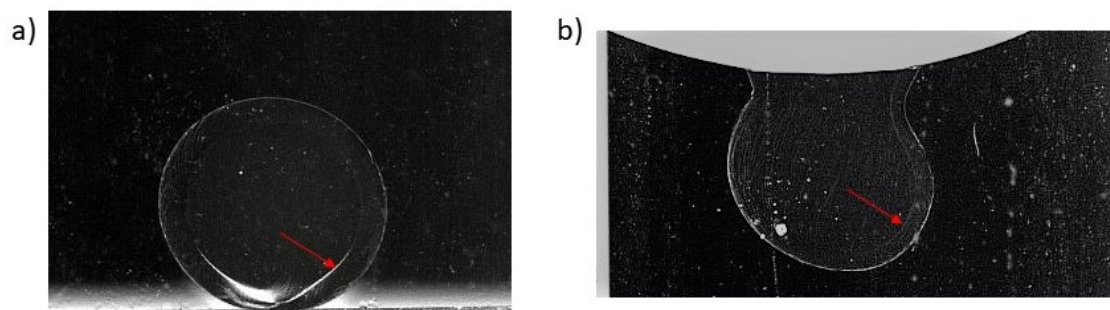


FIGURE 1.24 – Image de billes en formation (a) Ca^{2+} -polyGalA et b) Fe^{2+} -polyGalA) que nous avons formulées. On observe le front de gélification en périphérie des billes (pointé par la flèche rouge).

15. Ethylènediaminetrétraacétique.

16. $C > C^*$.

Conclusion

Le fer est un nutriment indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Pour qu'il soit assimilé au niveau intestinal et que la refection des réserves de l'organisme soit optimale, il faut le consommer sous sa forme réduite, Fe^{2+} . Cependant cet état d'oxydation du fer est très sensible à l'oxydation dans les conditions physiologiques. Sa protection est donc nécessaire jusqu'à ses sites d'absorption intestinaux. La formulation d'hydrogels de polyGalA en utilisant ces ions Fe^{2+} en tant qu'agent de réticulation pourrait être un moyen de vectoriser le fer jusque dans l'intestin.

Les différentes parties de ce chapitre mettent en évidence qu'il est important de prendre en compte l'échelle d'observation à laquelle les hydrogels doivent être caractérisés en terme de structure. Ainsi, les modes d'associations vont avoir un impact sur les mécanismes d'association des chaînes qui vont engendrer des réseaux de structures différentes. De plus, la façon dont les cations divalents et les chaînes vont être mis en contact va également modifier la structure macroscopique des gels. Il est important de noter que sur toutes les études portant sur la structure des hydrogels, un échelle spatiale n'a pas été décrite. En effet, la caractérisation des hydrogels à des échelles mesoscopiques n'a jamais été entreprise du fait des techniques d'analyse qui nécessitent une modification des échantillons (traitement thermique, ajout de sondes fluorescentes...).

Cet état de l'art, nous permet de comprendre quels vont être les points clés de la formulation des hydrogels Fe^{2+} , que ce soit pour l'étude des mélanges en système dilués, pour la définition du protocole de gélification, pour la définition des conditions de concentration en cation et pour les échelles spatiales à sonder.

Chapitre 2

Description du comportement du mélange Fe^{2+} -polygalacturonate en régime dilué

Introduction

Lorsque l'on souhaite étudier les capacités gélifiantes d'un biopolymère, une des premières étapes consiste à le caractériser dans les conditions physico-chimiques définies pour l'étude, c'est à dire, connaître sa taille, sa dispersité ou encore sa structure en solution dans différentes conditions de concentration. Dans un second temps, la détermination de la capacité du biopolymère à interagir avec le réticulant est également primordiale afin de définir les conditions expérimentales permettant de favoriser ou à l'inverse de limiter la formation d'un gel. L'ensemble de cette démarche permet de comprendre dans quelle mesure l'ajout d'un agent de réticulation modifie la structure et l'organisation des chaînes du polymère étudié.

2.1 Caractérisation structurale du polygalacturonate en solution

2.1.1 Matériel d'étude

Le polygalacturonate (polyGalA) a été acheté chez Sigma Aldrich. Le pourcentage de pureté de la poudre est estimé, par le fabricant, à 90 %. Pour la préparation de nos solutions de polyGalA, le biopolymère a été dispersé dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) de concentration 10 mM. Cette concentration en sel a été choisie pour travailler à une force ionique constante et pour se placer dans des conditions optimales à la solubilisation du biopolymère. Le pH de la solution a ensuite été ajusté à 5,5 grâce à l'ajouts successifs de volumes d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1 M. Ainsi, nous avons travaillé à un pH supérieur au pKa (3,4), pour lequel un maximum d'unités galacturonyles sont négativement chargées et donc permettent au polyGalA d'interagir avec les cations divalents. Nous laissons ensuite le mélange sous agitation pendant 2 heures pour permettre une dispersion homogène des chaînes de polyGalA. Avant toute expérimentation, la solution obtenue a été ensuite dialysée systématiquement contre 3

bains de 2 heures de NaCl à 10 mM, en utilisant une membrane de dialyse possédant un seuil de coupure de 3,5 kDa. Ainsi, nous faisons en sorte d'éliminer un maximum d'ions et de petites molécules susceptibles d'interférer avec le processus de gélification.

Les solutions de Fe^{2+} ont été préparées en dispersant la quantité nécessaire de FeCl_2 tétrahydrate dans du NaCl à 10 mM. Nous n'avons pas ajusté le pH des solutions de FeCl_2 car l'ajout de NaOH aurait entraîné la formation d'un précipité d'hydroxyde de fer ferreux ($\text{Fe}(\text{OH})_2$).

Après la préparation des solutions mères de polyGalA et de FeCl_2 , nous avons pris soin de barboter ces dernières avec de l'azote afin d'enlever au maximum l'oxygène dissout dans les deux préparations. Nous avons limité ainsi une possible oxydation des ions Fe^{2+} lors de leur mélange à la solution de polyGalA.

2.1.2 Détermination de la distribution de tailles du polygalacturonate

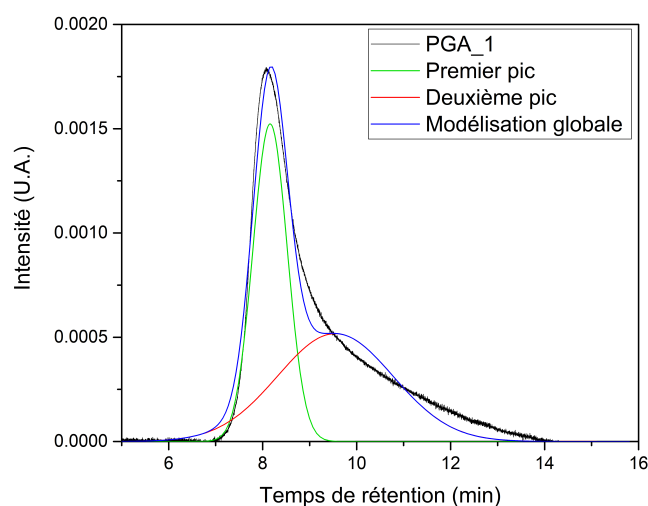


FIGURE 2.1 – Chromatogramme obtenu sur une de nos solutions mère de polyGalA. La courbe noire correspond à notre échantillon de polyGalA, la courbe verte modélise la première population présente dans le lot, la courbe rouge modélise la seconde population présente dans le lot et la courbe bleue correspond à la modélisation de la somme de deux gaussiennes.

La première étape de la caractérisation du polyGalA, purifié par voie enzymatique par le fabricant, a consisté à déterminer la masse moléculaire des chaînes. En effet, le fournisseur indique, sur le lot que nous avons utilisé tout le long de la thèse, une distribution de tailles des chaînes allant de 25 à 50 kDa. Afin de vérifier que cette distribution estimée était la bonne, nous avons préparé des solutions mères de polyGalA en suivant le protocole décrit dans la section 2.1.1. Nous avons ensuite dilué ces solutions mères pour les amener à une concentration de 1 g/L permettant une séparation optimale des chaînes de polyGalA et leur détection par chromatographie. L'utilisation d'un appareil de chromatographie d'exclusion de taille (SEC-HPLC) couplé à un réfractomètre nous a permis d'effectuer la mesure en question. Le protocole que

nous avons utilisé est décrit en annexe B.

Les résultats obtenus pour nos trois répétitions sont parfaitement superposables. Nous avons donc choisi de présenter ici le chromatogramme correspondant à une des solutions de polyGalA que nous avons préparés (Figure 2.1). Nous observons que le résultat obtenu correspond à la combinaison de plusieurs masses moléculaires. Afin d'identifier ces différentes populations, nous avons modélisé nos résultats par la somme de deux gaussiennes (Résultats détaillés en annexe B).

Nous avons alors pu calculer les masses moléculaires moyennes (M_w) des deux populations et le calcul de l'aire sous les deux gaussiennes nous donne la proportion de chaque distribution de taille au sein de l'échantillon. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.1.

M_w moyenne première population (kDa)	Proportion moyenne (%)	M_w moyenne deuxième population (kDa)	Proportion moyenne (%)
173	47,7	84	52,3

TABLE 2.1 – Masses moléculaires moyennes (M_w moyenne) des populations identifiées et proportions moyennes de chacune de ces populations au sein des échantillons.

Pour le lot avec lequel nous avons travaillé, il existe deux populations distinctes de proportions environ égales. Le lot contiendrait $\sim 50\%$ de chaînes de 84 kDa et $\sim 50\%$ de chaînes de 173 kDa. Les tailles mesurées sont supérieures à celles annoncées par le fabricant. L'appareil de chromatographie que nous avons utilisé était également équipé d'un détecteur d'absorption UV-visible. Pendant la mesure, ce détecteur a enregistré un signal pour une longueur d'onde de 250 nm. Or, le polygalacturonate étant un polyside, il ne possède pas de groupement constitutif absorbant dans cette gamme de longueur d'onde. Nous pensons donc que des enzymes utilisées pour la purification du polyside seraient toujours présentes dans la solution contenant le polyGalA. Ceci pourrait expliquer la masse moléculaire mesurée plus importante que la valeur donnée par le fabricant (Tableau 2.1 deuxième population). De plus, ces enzymes pourraient ponter deux ou plusieurs chaînes de polyGalA, et ce faisant augmenterait la masse moléculaire des objets en solution (Tableau 2.1 première population).

2.1.3 Détermination de la concentration de recouvrement

Nous avons déterminé la valeur de concentration de recouvrement du polyGalA. Cette concentration C^* correspond à la valeur de concentration en polymère marquant le passage d'un régime dilué à un régime semi-dilué.[40] Dans un régime dilué, les chaînes de polymère sont éloignées les unes des autres, ce qui rend les interactions intermoléculaires très peu probables et la formation d'un gel n'est pas possible. À l'inverse, dans un régime semi-dilué, les chaînes sont enchevêtrées. L'ajout d'un agent de réticulation induit la formation de ponts entre les chaînes et donc la formation d'un réseau.

La détermination du C^* du polyGalA a été faite en mesurant la viscosité de solutions de polyGalA (η) en fonction de leur concentration nominale (C) (Figure 2.2). Cette mesure

de viscosité à été faite en utilisant un module plan-plan de 25 mm (rhéomètre Anton Paar MC320).

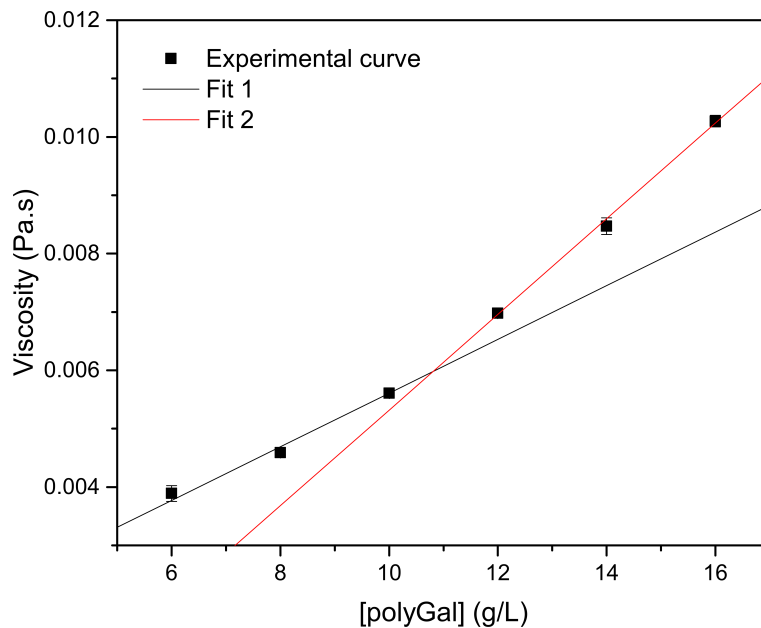


FIGURE 2.2 – Évolution de la viscosité en fonction de la concentration en polyGalA. Les deux droites permettent de mettre en évidence le changement de régime et donc la concentration de recouvrement du polyGalA.

La Figure 2.2, présente une évolution de la viscosité à deux régimes lorsque la concentration en polyGalA augmente. Chaque régime est représenté respectivement par une droite noire et rouge qui correspondent respectivement aux relations $\eta \sim C$ et $\eta \sim C^2$. Le point d'intersection de ces droites correspond à la valeur de C^* qui est donc égale à 11 g/L. Cette mesure nous a donc permis de choisir une concentration bien supérieure à la concentration de recouvrement pour formuler nos hydrogels (utilisation d'une concentration de 20 g/L). A l'inverse, lorsque nous avons voulu limiter au maximum les interactions inter-chaines, nous avons travaillé à une concentration de 0,5 g/L.

2.1.4 Détermination de la structure des chaînes de polygalacturonate en solution

La détermination de la conformation des chaînes par DNPA dans nos conditions expérimentales a également été une étape nécessaire à notre étude. En effet, la connaissance de la conformation des chaînes permet de comprendre l'influence de la présence des ions Fe^{2+} sur la structure finale du réseau. Nous avons dans un premier temps déterminé la conformation du polyGalA en régime dilué, à 5 g/L (courbe bleue de la Figure 2.3) afin de nous placer à une concentration inférieure à C^* et avoir une quantité suffisante de chaînes pour la mesure de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).

Le spectre obtenu suit une évolution à deux régimes. Le premier entre 0,028 et 0,5 $\text{\AA}^{-1}$ suit une décroissance en q^{-1} caractéristique d'un objet à une dimension, i.e. une structure de type bâtonnet. Ce régime met en évidence la structure des chaînes à des tailles sondées inférieures à la longueur de persistance (L_p) du polymère. Effectivement, à cette échelle d'observation, le

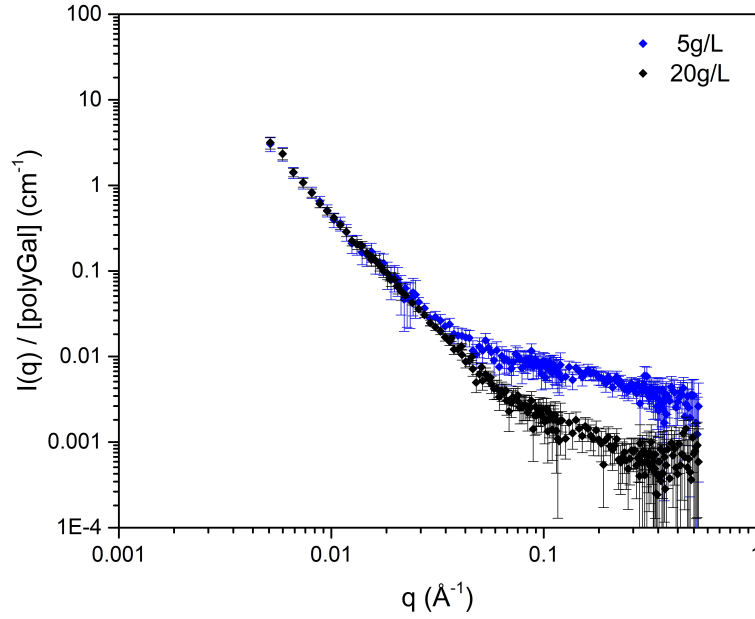


FIGURE 2.3 – Spectre DNPA de solutions de polyGalA à 5 g/L (spectre bleu) et 20 g/L (spectre noir). Les spectres ont été normalisés par la concentration en polyGalA.

polyGalA se comporte comme un segment rigide [41]. Pour des plus petits vecteurs de diffusion, le polyGalA non agrégé et parfaitement hydraté présenterait en solution aqueuse un spectre suivant une décroissance en $q^{-1,7}$ caractéristique du comportement d'une chaîne isolée dans un bon solvant, comme observé dans une étude antérieure sur un système similaire (pectine avec un $DM=0$). [41] Dans le cas de notre étude, pour des vecteurs de diffusion inférieurs à $0,028 \text{ \AA}^{-1}$, le spectre présente une décroissance en $q^{-2,7}$. Cette valeur signifie que le polyGalA est légèrement agrégé à grande échelle. Ce résultat est en adéquation avec ceux obtenus lors de la détermination de la distribution de tailles des chaînes (section 2.1.2) pour laquelle nous avons suspecté un reste d'enzyme. Cette mesure nous a également permis de déterminer la L_p de notre biopolymère, cette valeur n'ayant pas été trouvée dans la littérature. La L_p est mise en évidence par le changement de régime observé au q^* correspondant au passage d'un régime à l'autre (ici $0,028 \text{ \AA}^{-1}$), et est calculée en appliquant l'Équation 2.1. Le polyGalA possède une L_p proche de $70 \text{ \AA}$.

$$q^* = \frac{6}{\pi \times L_p} \quad (2.1)$$

Afin de mettre en évidence une possible corrélation entre l'état d'agrégation des chaînes et leur concentration en solution, nous avons procédé à la même mesure mais cette fois pour une concentration de 20 g/L. Cette mesure nous a également servi de référence pour la détermination de la structure locale des chaînes de polyGalA lorsqu'elles sont réticulées.

D'après la Figure 2.3, après normalisation de l'intensité diffusée par la concentration en polyGalA, nous remarquons que pour une concentration supérieure à C^* , deux régimes sont observables et possèdent exactement les mêmes valeurs de pentes que dans le cas de la solution de polyGalA à 5 g/L. Cela signifie que, quelle que soit la concentration en polyGalA, les chaînes ont le même état d'agrégation et donc, nous considérons que la réticulation du biopolymère n'en

est pas affectée.

La valeur de q^* est différente de la mesure précédente car nous nous sommes placés à une concentration telle que les chaînes sont enchevêtrées ce qui ne permet pas la détermination simple de la L_p . Nous pourrions parler ici d'une longueur de persistance apparente qui est égale, d'après l'équation 2.1, à environ 30 Å.

2.2 Étude des associations entre le polygalacturonate et les ions Fe^{2+} en régime dilué

Avant de formuler nos hydrogels, nous avons souhaité répondre à la question : “*Les ions Fe^{2+} sont-ils capables de s'associer au polyGalA ?*”. Pour cela, nous avons choisi dans un premier temps de nous placer dans des conditions de concentration très inférieures à C^* en travaillant à une concentration en polyGalA de 0,5 g/L. Ce choix est justifié par la volonté de réduire la probabilité de créer des liens inter-chaînes et ainsi de comprendre les modes d'association entre les cations Fe^{2+} et les fonction carboxylates du polyGalA. Pour ce faire, nous avons préparé des mélanges de polyGalA et de Fe^{2+} à différents rapports molaires R correspondant au rapport entre la concentrations en cations divalents et la concentration en unités galacturonate¹. Nous avons fait varier R entre 0 et 0,5 et avons mesuré, d'une part la viscosité et la turbidité des solutions et d'autre part l'énergie d'interaction entre les cations Fe^{2+} et les groupements carboxylates par titration calorimétrique isotherme (ITC).

2.2.1 Méthodes

Préparation des mélanges

Les mesures de viscosité, de turbidité et de titration calorimétrique isotherme ont été faites à partir d'une solution mère de polyGalA de concentration 0,5 g/L (soit 2,84 mM) qui a été préparée dans les conditions décrites dans la partie 2.1.1. La solution mère de $FeCl_2$ a été préparée à une concentration de 13,5 mM également dans les conditions décrites dans la partie 2.1.1. Les volumes de solution de fer nécessaires à l'obtention de rapport molaire R compris entre 0 et 0,5 ont été ajoutés à la solution de polyGalA. Entre les rapports molaires 0 et 0,4, le mélange est resté limpide et visuellement homogène. A l'inverse, le rapport molaire égal à 0,5 était turbide et présentait des petites portions de gel en suspension. Nous n'avons donc pas testé ce rapport molaire pour les différentes techniques citées car ces mesures auraient été perturbées par l'hétérogénéité de cet échantillon.

Mesures de viscosité

Les mesures de viscosité ont été effectuées grâce à l'utilisation d'un viscosimètre capillaire (SI analytics, Allemagne). Le but de cette mesure a été de déterminer si les ions Fe^{2+} sont capables de modifier la viscosité de la solution et donc de créer des ponts entre les chaînes. Le principe de cette technique consiste à mesurer le temps d'écoulement (t) de solutions. Les

1. Les mélanges ont été préparé sous agitation afin d'éviter la formation de microbilles de gel.

mesures ont été faites à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Nous avons utilisé un capillaire présentant une gamme de mesure de viscosités allant de 1,2 à $10 \text{ mm}^2/\text{s}$.

Nous avons déterminé les viscosités (S) de nos échantillons en normalisant leur viscosité relative (par rapport au solvant NaCl 10 mM) par la viscosité relative du polyGalA seul à 0,5 g/L en appliquant l'équation 2.2. Ainsi, nous mettons en exergue les effets spécifiques de l'ajout du cation sur le mélange.

$$S = \frac{\frac{t_R}{t_{\text{solvant}}}}{\frac{t_{R=0}}{t_{\text{solvant}}}} \quad (2.2)$$

Ici, t_R correspond au temps d'écoulement du rapport molaire testé et $t_{R=0}$, au temps d'écoulement de l'échantillon de rapport molaire 0, autrement dit, de la solution de polyGalA à 0,5 g/L. t_{solvant} correspond au temps d'écoulement d'une solution de NaCl à 10 mM. Les résultats présentés dans la partie 2.2.2 sont issus de 3 répétitions.

Mesures de turbidité

Nous avons déterminé la turbidité de nos échantillons à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (UV-1200 de chez UVisco) à une longueur d'onde de 500 nm et à température ambiante. L'objectif de cette mesure était d'avoir une idée de l'homogénéité du système final en présence de Fe^{2+} . Un système est d'autant plus turbide qu'il diffuse la lumière, ce qui traduit la présence de fluctuations de plusieurs centaines de nanomètres. La mesure de transmittance nous a permis de déterminer la turbidité τ de nos mélanges à différents R grâce à l'équation suivante :

$$\tau = \left(-\frac{1}{L}\right) \ln \left(\frac{I_t}{I_0}\right) \quad (2.3)$$

où L est la longueur du trajet optique (ici 1 cm), I_t est l'intensité de lumière transmise par l'échantillon et I_0 est l'intensité de lumière transmise par la solution de polyGalA à 0,5 g/L.

Titration calorimétrique isotherme : ITC

La titration calorimétrique isotherme est une technique qui permet de déterminer la thermodynamique des interactions entre deux molécules. Ici, nous cherchons à mesurer l'enthalpie liée à l'association des cations Fe^{2+} avec les unités galacturonates (Principe présenté en annexe C). Les mesures ont été réalisées à température constante (25°C) et à l'aide du microcalorimètre VP-ITC de chez GE Healthcare. Avant chaque mesure, nous avons dégazé les différentes solutions pendant 15 min afin d'enlever les bulles susceptibles de perturber la mesure. Les ajouts successifs de FeCl_2 sont faits dans une cellule de titration qui contient 1,46 mL de polyGalA de concentration 0,5 g/L. Pour les mesures, nous avons fixé le volume de la solution de cations à injecter dans la solution de polyGalA ($3 \mu\text{L}$ pour les 15 premières injections et $5 \mu\text{L}$ pour les 16 suivantes) et l'intervalle entre ces injections (1000 s). La seringue d'injection est une Hamilton rotative (250 rpm) qui permet une agitation constante et contrôlée du mélange pendant la mesure.

La quantité de chaleur émise après chaque injection est déterminée en calculant l'aire sous chaque pic généré. La quantité de chaleur totale Q de la solution de volume V_0 est donnée par l'équation 2.4

$$Q = [M]_t V_0 N \Delta H \theta \quad (2.4)$$

où $[M]_t$ est la quantité totale de polyGalA dans la cellule de titration, N est le nombre de site de liaison par unité galacturonate, ΔH est l'enthalpie d'association et θ est la fraction de sites occupés par les ions Fe^{2+} . Le modèle est basé sur un mode de liaison où tous les sites sont indépendants les uns des autres.

2.2.2 Détermination de la viscosité en fonction du rapport molaire $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{galacturonate}]$

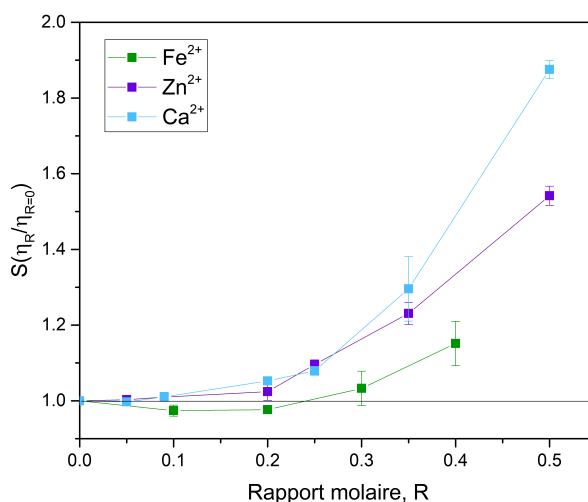


FIGURE 2.4 – Évolution de la viscosité de la solution de polyGalA en régime dilué en fonction du rapport molaire R comparée à des données de la littérature [3] sur le même système en présence de deux autres cations divalents. La courbe verte correspond à la solution de Fe^{2+} -polyGalA, la courbe violette correspond à la solution de Zn^{2+} -polyGalA et la courbe bleue correspond à la solution de Ca^{2+} -polyGalA.

La mesure de la viscosité en fonction de l'augmentation du rapport molaire R nous montre une évolution à deux régimes (Figure 2.4). Lorsque le rapport molaire R varie de 0 à 0,2, la viscosité de la solution diminue. Ce phénomène a déjà été décrit pour un système similaire.[42] Une faible concentration en cations permet d'écranter les charges du polyoside et lui confère donc plus de flexibilité, ce qui réduit la viscosité de la solution. Au delà de $R=0,2$, la viscosité augmente progressivement lorsque R augmente. Cette augmentation de viscosité peut s'expliquer par la présence d'objets de plus grande masse moléculaire, ce qui prouve que les cations Fe^{2+} se sont associés aux chaînes de polyGalA et ont formé probablement des points de réticulation et/ou des dimères et/ou des multimères.

Dans un travail antérieur, mon équipe avait travaillé sur les mêmes protocoles en utilisant deux autres cations divalents, les ions calcium et zinc.[3][20] Le calcium et le zinc n'engendraient pas de changement de viscosité entre $R=0$ et $R=0,2$. Mais au delà de cette valeur, les deux cations présentaient un comportement différent l'un par rapport à l'autre. Dans le cas des ions calcium, lorsque R augmente, ils ont observé une augmentation très forte de la viscosité. Concernant le zinc, ils avaient observé un comportement différent avec une augmentation de la viscosité plus progressive. Lorsque l'on compare nos résultats expérimentaux avec ces résultats obtenus sur le zinc, nous remarquons que les ions Fe^{2+} engendrent une évolution de la viscosité similaire, mais plus limitée, lorsque R est supérieur à 0,2.

2.2.3 Détermination de la turbidité en fonction du rapport molaire R $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{galacturonate}]$

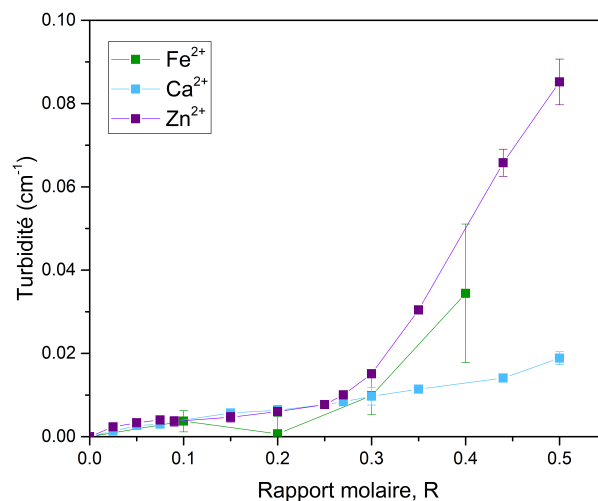


FIGURE 2.5 – Évolution de la turbidité de la solution de polyGalA en régime dilué en fonction du rapport molaire R comparée à des données de la littérature [3] sur le même système en présence de deux autres cations divalents. La courbe verte correspond à la solution de Fe^{2+} -polyGalA, la courbe violette correspond à la solution de Zn^{2+} -polyGalA et la courbe bleue correspond à la solution de Ca^{2+} -polyGalA.

Comme pour les mesures de viscosité, nous pouvons observer deux régimes distincts concernant l'évolution de la turbidité en fonction de l'augmentation du rapport molaire R (Figure 2.5). Entre $R=0$ et $R=0,2$, la turbidité évolue très peu. Au delà de cette valeur, il y a une très forte augmentation de la turbidité, ce qui traduit la formation de structures diffusant fortement la lumière. Nous supposons ici que l'association des ions ferreux entraîne la formation d'une structure hétérogène qui entraîne des fluctuations de densité à des échelles de l'ordre de la centaine de nanomètre. Lorsque nous comparons ces résultats avec ceux obtenus dans l'étude antérieure, nous remarquons que, comme pour la mesure de viscosité, le comportement du fer est similaire à celui du zinc.[3]

2.2.4 Détermination de l'enthalpie d'association en fonction du rapport molaire $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{galacturonate}]$

La Figure 2.6 correspond à la courbe de titration brute de la solution de polyGalA par une solution de FeCl_2 obtenue par ITC. Chaque pic correspond à une injection de la solution de fer ferreux, comme nous l'avons expliqué dans la Section 2.2.1. La courbe suit une évolution à deux régimes. Pour des injections où la concentration finale en Fe^{2+} dans la cellule de mesure correspond à un rapport molaire R inférieur à 0,25 (ligne pointillée sur la Figure 2.6), nous remarquons que le système revient à l'équilibre pendant les 1000 secondes séparant chaque ajout de cations. À l'inverse, quand le rapport molaire devient supérieur à 0,25, le système ne revient pas à l'équilibre entre deux injections, et nous pouvons observer une variation importante du flux de chaleur lorsque le nombre d'injection augmente.

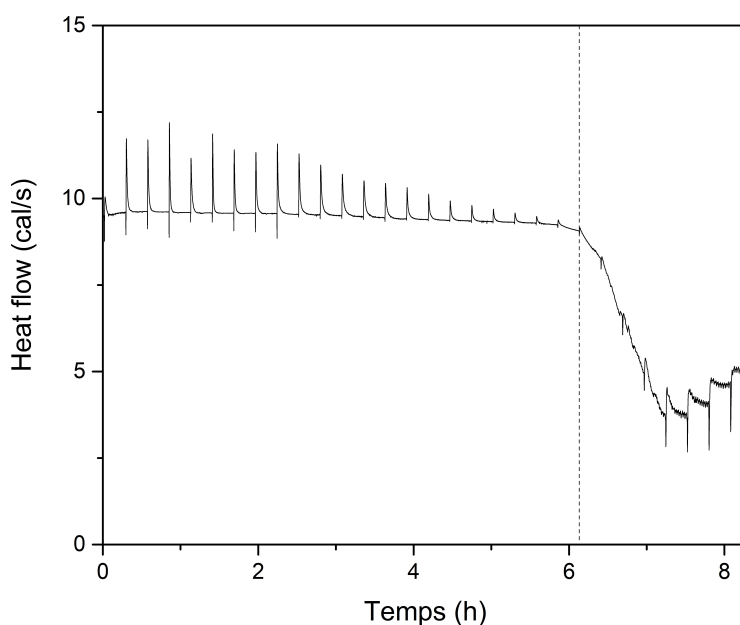


FIGURE 2.6 – Présentation des données brutes obtenues pendant les mesures d'ITC. La ligne pointillée matérialise l'injection correspondant à un rapport molaire R égal à 0,25.

À partir des données brutes présentées ci-dessus, nous pouvons tracer l'évolution de l'enthalpie d'association en fonction de l'augmentation du rapport molaire (Courbe verte de la Figure 2.7). Lorsque le rapport molaire augmente, le signal est pratiquement plat entre $R=0$ et $R=0,25$, puis quand R augmente présente de grands écarts types. Cette valeur seuil $R=0,25$ correspond à celle à partir de laquelle le système ne revient pas à l'équilibre (Figure 2.6). Le calcul des aires sous les pics n'est donc pas correct ce qui explique les grandes variations de ΔH en fin de mesure.

La valeur de $R=0,25$ est connue dans la littérature, pour être la valeur décrivant l'association entre les cations divalents et les unités galacturonates qui estime qu'un cation interagit avec 4 unités galacturonates (section 1.3 du Chapitre 1). De ce fait, nous pensons qu'entre $R=0$ et $R=0,25$, les cations Fe^{2+} viennent s'associer progressivement à toutes les fonctions carboxylates présentes en solution, induisant une valeur d'enthalpie positive est constante au cours du temps. Au delà de cette valeur R , le système deviendrait hétérogène, ce qui est conforté par les mesures de turbidité (2.2.3) et rend par conséquent la mesure de l'enthalpie incorrecte.

Dans le cas des ions calcium, Huynh *et al.* ont décrit qu'il semblerait que deux processus aient lieu avec une diminution puis une augmentation de ΔH à un faible R . Dans le cas des ions zinc, de gros écarts types apparaissent pour des valeurs de $R \sim 0,25$.

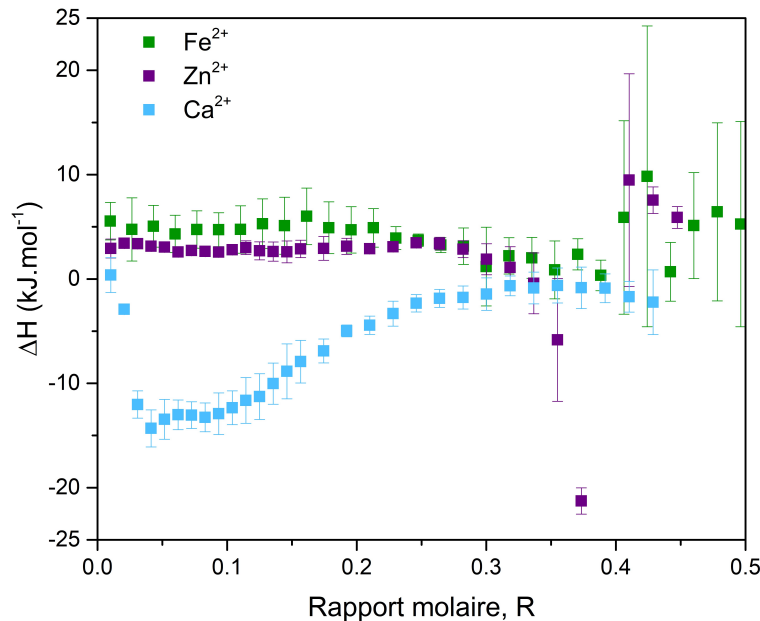


FIGURE 2.7 – Évolution de l'enthalpie d'association en régime dilué en fonction du rapport molaire $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{unités galacturonique}]$ comparée à des données de la littérature [3] sur le même système en présence de deux autres cations divalents. La courbe verte correspond à la solution de Fe^{2+} -polyGalA, la courbe violette correspond à la solution de Zn^{2+} -polyGalA et la courbe bleue correspond à la solution de Ca^{2+} -polyGalA.

La comparaison des résultats obtenus pour les ions zinc avec ceux obtenus pour les ions Fe^{2+} nous laissent penser que l'association Fe^{2+} -polyGalA est similaire à l'association Zn^{2+} -polyGalA.[3]

2.2.5 Bilan sur l'étude des interactions entre les cations Fe^{2+} et les unités galacturonates en système dilué

La combinaison des résultats des mesures de viscosité, de turbidité et d'enthalpie d'association en système dilué, nous a permis d'entrevoir le mode d'association existant entre les cations Fe^{2+} et les chaînes de polyGalA. En effet, nous avons confronté nos résultats à ceux obtenus dans des travaux antérieurs [3], où Huynh *et al.* avaient couplé ces mesures avec des simulations de dynamique moléculaire, et avons remarqué que leurs résultats obtenus sur le zinc sont très proches de ceux que nous avons obtenus pour les cations Fe^{2+} . Cette similitude peut être expliquée par le fait que ces deux éléments sont des métaux de transitions qui possèdent une géométrie similaire dans l'eau. Nous nous référons au mode d'association proposé par Huynh *et al.* pour expliquer l'association du zinc avec les chaînes de polyGalA.

Lorsque le rapport molaire entre la concentration en cations Fe^{2+} et la concentration en unité galacturonate dépasse une valeur de 0,2, la viscosité de la solution augmente légèrement. Cette augmentation étant très faible, cela signifie que les associations entre les chaînes de polymère et le fer n'entraîne pas la formation d'un réseau continu en solution, et donc que la

présence de dimères et de multimères est bien moins importante que dans le cas du calcium, pour un même R. Notre hypothèse est donc que, comme le zinc, les ions ferreux forment préférentiellement des points de réticulation entre les chaînes, et ce parce que l'affinité entre le cation et les groupements carboxylates est telle que la liaison est très stable donc la formation de dimères est difficile. En parallèle, la turbidité augmentant très fortement au delà d'un ratio 0,2, nous supposons que la structure résultant de l'association des chaînes du polymère et du cation est hétérogène. Ceci pourrait aller de pair avec le fait que l'affinité entre les ions ferreux et les groupements carboxylates est forte et donc que la structure formée est stable. Ainsi, plus le rapport molaire augmente, plus le nombre de points de réticulation augmente et plus les chaînes se connectent sans pouvoir se réorganiser. Par conséquent, le système devient hétérogène.

Les résultats obtenus par ITC ont montré que l'association du polyGalA avec les ions Fe^{2+} n'engendrait pas de grandes variations d'enthalpie jusqu'à un rapport molaire égal à 0,25 et qu'au delà de cette valeur le système devient trop hétérogène pour que la mesure puisse être correcte, ce qui est concordant avec les mesures de turbidité.

De façon remarquable, les trois techniques que nous comparons dans ce chapitre convergent vers une conclusion commune : Le rapport molaire R induisant des variations de viscosité, de turbidité et ne permettant plus les mesures d'enthalpie est proche de 0,25. Comme nous l'avons présenté dans le chapitre 1, cette valeur a été décrite dans la littérature comme le rapport molaire décrivant l'association entre les cations divalents et les unités galacturonates.[22]. Ce résultat pourrait décrire une association des chaînes sous forme de dimères jusqu'à un $R = 0,25$ et qu'au delà de cette valeur, les dimères s'associent les uns avec les autres (ces association pourraient être électrostatiques [43] en formation des zones très denses localement et qui rendent le système de plus en plus hétérogène quand R augmente.

Conclusion du chapitre

Ce second chapitre présente les fondations de ce travail de thèse. La caractérisation du polyGalA nous a permis de déterminer que le polymère possède une masse moléculaire de 80 kDa mais qu'il présente une certaine polydispersité car il se retrouve quelque peu agrégé lorsqu'il est solubilisé dans du NaCl à 0,1 M. Cependant cette caractéristique est intrinsèque au lot que nous avons utilisé dans cette étude et n'est donc pas dépendante de la concentration en polyGalA. En effet, quand le polyGalA est à une concentration inférieure ou supérieure à son C^* de 11 g/L, il semble conserver exactement la même structure. Cet état d'agrégation ne devrait donc pas impacter la réticulation des chaînes par les cations Fe^{2+} .

Dans cette partie de notre étude, nous avons également mis en évidence que les cations Fe^{2+} interagissaient avec les fonctions galacturonates et entraînaient la formation d'un réseau discontinu ne modifiant que très peu la viscosité de la solution de polyGalA. Cependant ces associations modifient sa turbidité ce qui signifie que la structure formée est hétérogène à des échelles d'observation intermédiaires (quelques centaines de nanomètres au plus). Ce processus d'association et les propriétés qui en découlent sont directement corrélés au rapport molaire correspondant. En effet, nous avons remarqué que pour un rapport molaire seuil de 0,25, le système passait de peu visqueux, non turbide et thermodynamiquement stable à plus visqueux, très turbide et possédant une enthalpie très fluctuante. Tous ces résultats peuvent être expliqués par le mécanisme d'association suivant : Les cations Fe^{2+} s'associent de manière très stable et

forte avec les fonctions carboxylates. D'après l'étude de Huynh *et al.*, la stabilité de la liaison entre un cation divalent et les unités galacturonates dépend de la capacité du cation à se désolvater.[3] Dans le cas du zinc, ils ont montré que ce dernier ne se séparait pas facilement de ces molécules d'eau mais qu'à partir du moment où il est associé aux groupements carboxylates, la liaison était très stable. Les résultats que nous avons obtenus pour les cations Fe^{2+} étant très proches de ceux obtenus sur le zinc dans l'étude en question, nous pensons que le même phénomène est observé. De ce fait, la formation de dimères et de multimères est très peu probable, ce qui n'induit qu'une faible augmentation de la viscosité. De plus, cette forte interaction, ne permet pas au système de se réorganiser pour former une structure homogène au fur et à mesure que R augmente. De ce fait, le système devient turbide lorsque $R > 0,25$, ou autrement dit quand tous les sites de fixation des cations Fe^{2+} sont saturés.

Tous les mélanges Fe^{2+} - polyGalA que nous avons testés dans ce chapitre étaient des échantillons liquides, ce qui veut dire que malgré les associations qui ont eu lieu entre les chaînes de polyGalA, leur concentration étant très faible, un réseau continu n'a jamais pu être formé. Nous avons donc choisi de nous intéresser aux associations qui peuvent avoir lieu dans un système où la concentration en polyGalA est supérieure à C^* . Nous voulons également savoir si, comme pour le système dilué, le rapport molaire de 0,25 peut être atteint et modifie la structure du réseau de polyGalA formé.

Chapitre 3

Élaboration et caractérisation des gels Fe^{2+} -polygalacturonate

Introduction

Ce troisième chapitre est la clef de voûte de mon travail de thèse. Il retrace les premières étapes qui nous ont permis de déterminer les conditions expérimentales nécessaires à la formation des hydrogels Fe^{2+} -polyGalA. Comme présenté dans le Chapitre 1, la gélification des polysides anioniques est fonction de différents facteurs tels que le temps de mise en contact des cations divalents avec le biopolymère, la concentration en chaînes de polymère et la concentration en agents de réticulation. À partir des conclusions présentées dans le Chapitre 2, nous avons cherché à comprendre dans quelle mesure, les différents facteurs pré-cités peuvent influencer la structure des hydrogels obtenus, et ce à différentes échelles d'observation.

Pour ce faire, nous avons déterminé les conditions physico-chimiques permettant la formulation des hydrogels, et avons mis en place une stratégie permettant de caractériser les hydrogels Fe^{2+} -polyGalA de l'échelle macroscopique à l'échelle du réseau de polymère tout en vérifiant que la formation de ce dernier protège bel et bien les ions Fe^{2+} contre l'oxydation.

3.1 Optimisation du protocole de gélification

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place pour permettre la gélification du polyGalA, comme présenté dans le Chapitre 1. Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi de formuler nos gels en faisant diffuser des cations Fe^{2+} au travers d'une membrane de dialyse en contact avec un réservoir considéré comme infini à la solution de polyGalA. Cette technique de gélification permet de travailler avec un système simple en terme de composition et ainsi de mesurer la seule influence des ions ferreux sur la gélification du polyGalA. Ce protocole de gélification est bien connu pour entraîner la formation d'hydrogels présentant des gradients de concentration en polymère et de propriétés mécaniques.[32] Nous avons donc fait en sorte que, malgré les hétérogénéités produites par ce protocole, nous puissions former des gels parfaitement reproductibles et facilement manipulables pour procéder aux différentes caractérisations physico-chimiques. Pour ce faire, nous avons testé différents montages permettant la gélification "externe" du polyGalA.

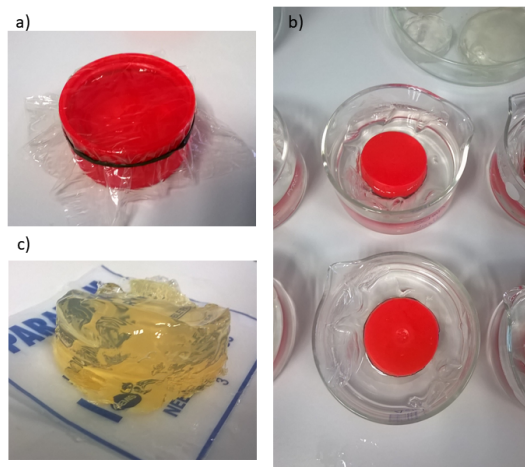


FIGURE 3.1 – Photographies du premier protocole de gélification. L'image (a) présente le récipient contenant la solution de polyGalA et la membrane de dialyse utilisée pour la maintenir dans ce compartiment. L'image (b) illustre la manière avec laquelle les récipients ont été plongés dans les réservoirs contenant la solution de cation. L'image (c) présente une vue plongeante des gels obtenus avec ce protocole de gélification (partie la plus éloignée de la membrane de dialyse pendant la gélification orientée vers le haut).

Le premier protocole de gélification que nous avons mis en place consistait à utiliser un récipient en plastique à l'intérieur duquel nous avons placé la solution de polyGalA (20 g/L). Cette dernière était retenue à l'intérieur du récipient par une membrane de dialyse (seuil de coupure 3,5 kDa) comme présenté sur la Figure 3.1 (a). Le récipient était ensuite placé dans un réservoir contenant la solution de cation possédant un volume 10 fois supérieur à celui de la solution de polyGalA (Figure 3.1 (b)) dans une géométrie telle que la diffusion se fasse du bas vers le haut. Ce rapport de volumes avait été choisi afin de favoriser la diffusion du cation au travers de la solution de polyGalA. L'extraction des hydrogels était compliquée et entraînait une destruction non négligeable des échantillons, ce qui compromettait la répétabilité des résultats (Figure 3.1 (c)).

La seconde méthode a consisté à utiliser un montage pour lequel la diffusion des cations ne se faisait plus du bas vers le haut mais, cette fois, du haut vers le bas. Ce protocole a été inspiré d'un protocole de gélification utilisé par Agulhon *et al.*[44] Nous avons donc placé une solution de polyGalA au fond d'un récipient puis l'avons recouverte avec un disque de papier filtre ne contenant pas de minéraux. Sur ce papier filtre, jouant le rôle de séparateur entre les deux compartiments (taille des pores 11 μm), nous avons ensuite versé la solution de cation servant à la réticulation (Figure 3.2 a)). Les gels obtenus (Figure 3.2 b) ne présentaient pas une épaisseur uniforme. Nous n'avons donc pas validé ce second protocole car les gels auraient été trop difficiles à analyser (notamment pour des mesures de rhéologie).

Suite aux premiers essais présentés ci-dessus, nous avons décidé d'utiliser un protocole plus proche de celui présenté dans la Figure 3.1, l'épaisseur des gels obtenus étant plus homogène. Le problème de ce protocole résidait dans l'extraction des gels hors du récipient. Notre démarche a donc été de trouver un contenant possédant (i) un matériau inerte vis-à-vis du processus de gélification, (ii) une géométrie permettant de contraindre la forme finale des hydrogels pour qu'ils aient une épaisseur homogène et (iii) une forme permettant d'extraire les hydrogels sans

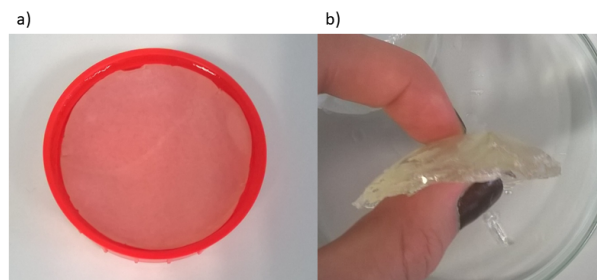


FIGURE 3.2 – Photographies du second protocole de gélification. L'image (a) présente une vue de dessus du récipient contenant les deux solutions séparées par le papier filtre. L'image (b) présente une vue de côté des gels obtenus avec ce protocole de gélification (la partie bombée correspond à la partie en contact avec le filtre pendant la gélification).

les détériorer. Ce protocole est illustré dans la Figure 3.3.

La Figure 3.3 présente le montage que nous avons mis en place pour la formulation des hydrogels tout le long de la thèse. Nous avons utilisé des tubes en verre mesurant 2,1 cm de diamètre et 15 cm de hauteur à l'intérieur desquels nous avons placé un volume de 5 mL de solution de polyGalA à gélifier. La solution de polyGalA est maintenue à l'intérieur du tube grâce à l'utilisation d'une membrane de dialyse (seuil de coupure égal à 3,5 kDa) fixée à l'aide d'un élastique. Le seuil de coupure a été choisi de façon à permettre uniquement le passage des ions et donc la rétention totale du polyGalA (le poids des chaînes de polyGalA est d'environ 80 kDa comme mesuré dans le Chapitre 2). L'avantage de l'utilisation de ces tubes en verre réside dans le fait qu'ils sont ouverts à leurs deux extrémités. Ainsi, les gels peuvent être extraits en étant poussés depuis l'intérieur du tube.

Cet assemblage est ensuite plongé dans le réservoir contenant la solution de FeCl_2 . Le choix de la géométrie du réservoir (bêcher de 250 mL, forme haute (Figure 3.3 a)) a été fait de telle sorte qu'une partie suffisante du tube soit immergée dans la solution de FeCl_2 (Figure 3.3 c)). Afin de favoriser la diffusion des cations du réservoir à la solution de polyGalA, nous avons fixé le volume de la solution de cations à une valeur 10 fois supérieure à celle du volume de la solution de polyGalA, soit 50 mL.

À l'issue du temps de gélification choisi, nous retirons simplement le tube en verre du réservoir et extrayons le gel, qui a pris la forme d'un cylindre, pour procéder à sa caractérisation.

Comme précisé dans le chapitre 2 pour l'étude des systèmes dilués, nous avons pris des précautions vis-à-vis de l'oxydation des ions Fe^{2+} . Nous avons fait barboter nos solutions de polyGalA et de FeCl_2 avec de l'azote avant toute formulation de gel. De plus, durant la totalité du temps de gélification, nous avons couvert notre montage avec du parafilm[®] et de l'aluminium pour limiter au maximum le passage d'oxygène et/ou de lumière au travers des solutions.

3.2 Détermination des conditions de gélification

La détermination des conditions de gélification du polyGalA a consisté à définir dans quelles conditions de temps de gélification et de concentration en cations dans le réservoir un gel macroscopique se forme lorsque l'on fixe la concentration de la solution mère de polyGalA à

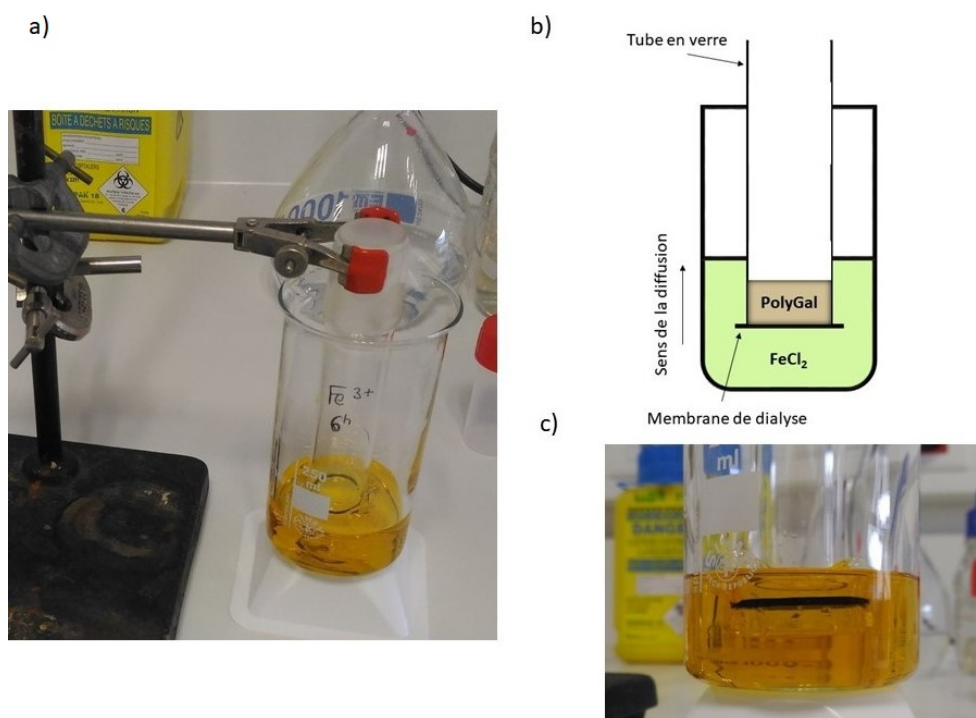


FIGURE 3.3 – Photos (a et c) et schéma (b) du protocole de gélification utilisé pour la formulation des hydrogels au cours de la thèse. Le tube en verre est rempli avec 5 mL de solution polyGalA et est maintenu plongé (a) dans 50 mL de solution de FeCl_2 (sur la photo les solutions sont oranges car il s'agissait de FeCl_3). Les deux compartiments sont séparés par une membrane de dialyse de seuil de coupure permettant uniquement aux ions présents en solution de passer au travers (seuil de coupure 3,5 kDa). La membrane est retenue par un élastique (c) est une vue de profil de la partie basse du tube en verre qui est en contact avec la solution de fer.

20 g/L (comme définit dans la section 2.1.3). Nous avons donc établi des diagrammes d'état pour lesquels nous avons fait varier, d'une part le temps de gélification à une concentration en FeCl_2 donnée et d'autre part la concentration de la solution de FeCl_2 pour un temps de gélification donné. Ces diagrammes d'état ont été combinés à des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) afin de caractériser la structure locale du réseau de polyGalA pour les différentes conditions physico-chimiques testées.

3.2.1 Effet du temps de gélification

Nous avons formulé des hydrogels en fixant la concentration du réservoir de Fe^{2+} à 100 mM. Cette condition expérimentale a été choisie de façon à se placer dans des conditions de concentration où le rapport molaire $R = [\text{Fe}^{2+}]/[\text{GalA}] \sim 1$ et donc où toutes les fonctions carboxylates peuvent être impliquées quel que soit le mode d'association mis en jeu ("egg-box", monodentate, bidentate ou encore monocomplexation comme présenté dans le Chapitre 1). Suivant le protocole de gélification décrit dans la section précédente, nous avons plongé le tube en verre contenant la solution de polyGalA (20 g/L) dans le réservoir de Fe^{2+} pendant les temps de gélification suivant : 5, 15, 45, 90, 180, 360 et 1440 minutes.

L'étude de l'évolution de l'épaisseur du gel en fonction du temps de gélification nous a permis dans un premier temps de déterminer le temps à partir duquel la solution de polyGalA commence à gélifier. Ainsi, il faut attendre un temps supérieur à 15 minutes pour qu'il apparaisse

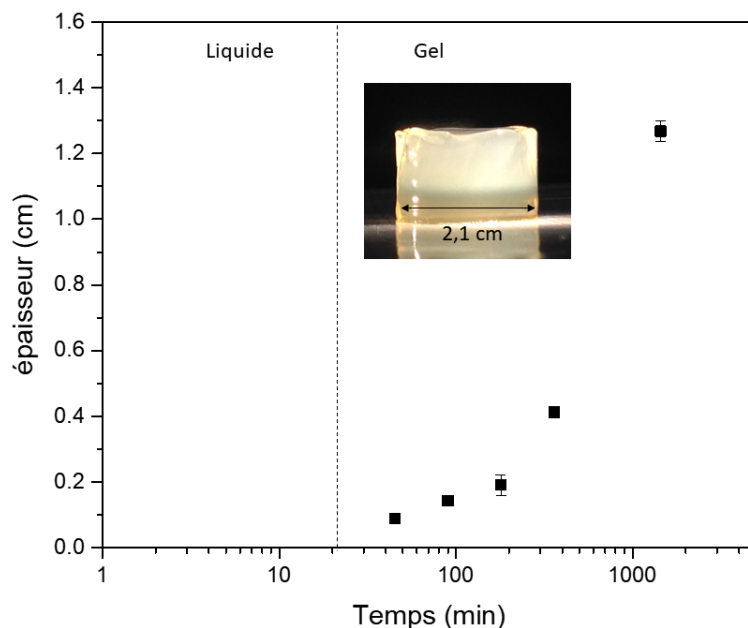


FIGURE 3.4 – Évolution de l'épaisseur des gels et diagramme d'état en fonction du temps de gélification (échelle log). La photographie présente un gel obtenu après 24 h de gélification.

un gel dans le tube. Pour ces courts temps de gélification, le gel formé est macroscopiquement homogène mais reste toutefois très fin et très fragile.

D'autre part, nous pouvons remarquer que lorsque le temps de gélification augmente, un front de gélification, parallèle à la membrane de dialyse, se déplace avec une vitesse constante au cours du temps (Figure 3.4). Ainsi, pour une gélification de 24 h, les hydrogels atteignent une épaisseur maximale moyenne de $\sim 1,2$ cm et la totalité de la solution de polyGalA présente initialement dans le tube est gélifiée.

En parallèle de la croissance du gel, nous avons observé l'apparition d'un gradient de turbidité et de couleur du gel de la partie la plus proche de la membrane de dialyse pendant la gélification à la partie qui en est la plus éloignée, le gel passe de transparent à turbide et, dans le même temps, de verdâtre à blanchâtre, comme présenté sur la photo de la Figure 3.4. Ces gradients de couleur et de turbidité sont d'autant plus visibles que le temps de gélification est long.

A la vue des hétérogénéités macroscopiques importantes, nous avons souhaité savoir si la structure du réseau de polyGalA suivait les gradients observés. De ce fait, nous avons procédé à des mesures de DNPA et avons tracé les intensités de diffusion des différents temps de gélification en fonction du vecteur de diffusion (Figure 3.5). Pour ce faire, nous avons extrait les échantillons du tube et les avons placés dans des cellules adaptées aux mesures, de sorte que le système ne puisse plus évoluer pendant la mesure. Ces conditions expérimentales sont décrites en annexe A.

La Figure 3.5 présente donc les spectres DNPA pour les différents temps de gélification décrits ci-dessus. Pour des temps de gélification inférieurs à 45 min, les spectres DNPA, sont parfaitement identiques à celui de la solution de polyGalA seule, en accord avec la Figure 3.4. Cela signifie que pour des temps de gélification courts, la faible quantité de cations ayant dif-

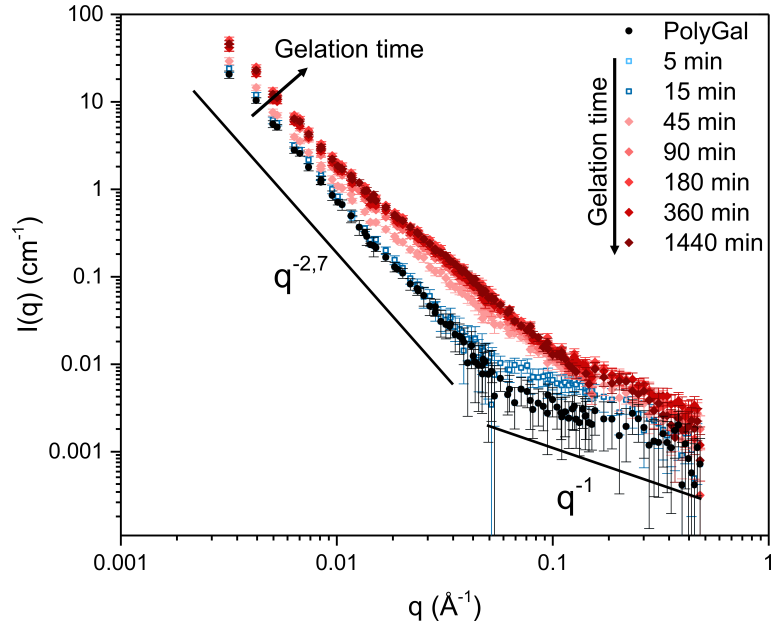


FIGURE 3.5 – Suivi de la cinétique de gélification du polyGalA de 0 à 1440 min de gélification par DNPA. Les spectres représentés ici correspondent, pour les échantillons liquides (5 et 15 min), à la totalité de la solution de polyGalA présente dans le tube et pour les échantillons gélifiés (temps supérieur ou égal à 45 min) à la partie du gel la plus proche de la membrane de dialyse pendant la gélification. La flèche montre l'évolution de l'intensité diffusée en fonction de l'augmentation du temps de gélification.

fusée n'engendre pas ou engendre très peu de ponts entre les chaînes et donc que globalement, la conformation des chaînes de polyGalA n'est pas modifiée.

À partir d'un temps de gélification de 45 min, un épaulement est visible pour des valeurs de vecteur de diffusion compris entre 0,01 et 0,15 $\text{\AA}^{-1}$. Ce temps de gélification correspond à celui à partir duquel nous observons macroscopiquement la formation du gel. Nous pouvons donc attribuer la présence de cet épaulement à la création du réseau de polyGalA en présence des ions ferreux. Pour les temps de gélification testés inférieurs à 6 h le gel formé a une épaisseur proche de 2 mm et a donc pu être mis entièrement dans la cellule de mesure. Pour des temps de gélification égaux ou supérieurs à 6 h, les gels étaient plus épais et ont donc été coupés en tranches et nous avons représenté ici les spectres correspondant à la partie du gel en contact avec la membrane de dialyse pendant la gélification. Pour les plus petits vecteurs de diffusion, la décroissance en $q^{-2,7}$ observée sur les solutions diluées est retrouvée mais nous pouvons observer que l'intensité de diffusion augmente alors que la forme globale des spectres reste identique. De ce fait, nous pouvons supposer que la structure locale du réseau de polyGalA n'évolue plus une fois que le réseau est formé mais que sa concentration en chaînes varie, à l'instar de ce qui est observé pour ce type de protocole de gélification [32], ce qui peut expliquer les variations d'intensités de diffusion observées. Le fait que la structure du réseau semble être identique pour tous les temps de gélification testés nous laisse penser que le système ne se réorganise que très peu lors du phénomène de gélification.

3.2.2 Effet de la concentration en cations dans le réservoir

Nous avons formulé des hydrogels en utilisant les concentrations en FeCl_2 suivantes : 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM et 250 mM correspondant respectivement à des rapports molaires R de 0,04, 0,09, 0,44, 0,88 et 2,20. Pour ces concentrations, nous avons fixé un temps de gélification de 6 h de manière à obtenir un gel suffisamment long pour les mesures de caractérisation pour les différentes conditions de concentrations testées.

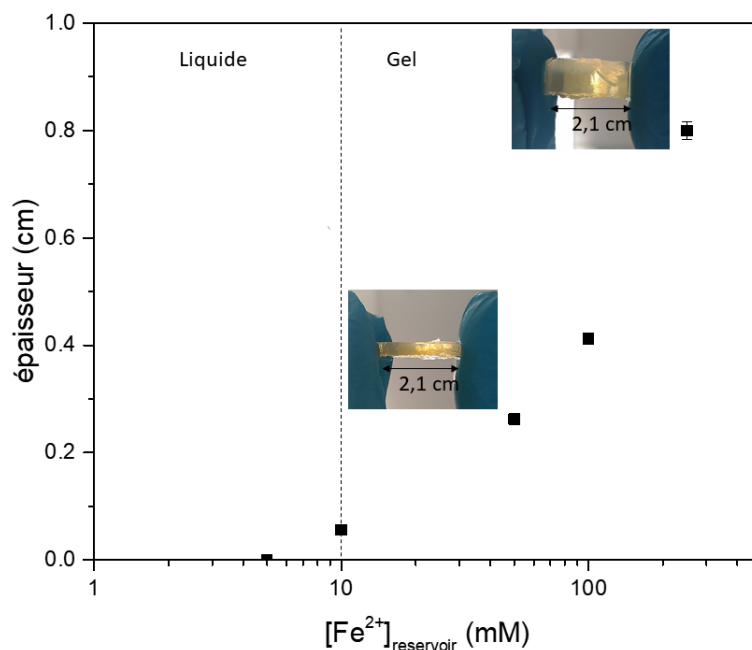


FIGURE 3.6 – Graphique qui illustre l'évolution de l'épaisseur des gels en fonction de la concentration en Fe^{2+} dans le réservoir. Les deux photographies sont des vues de profil de gels obtenus pour les concentrations en cations 50 et 250 mM. La partie basale correspond à la partie du gel en contact avec la membrane de dialyse pendant le processus de gélification.

La Figure 3.6 illustre le fait qu'à une concentration en cations inférieure à 10 mM, il n'y a pas de gel qui se forme bien que nous nous soyons placés à une concentration en polyGala bien supérieure à la concentration de recouvrement. Dans cette condition, la quantité de cations qui a diffusé au sein de la solution de polyGala pendant les 6 h de gélification est trop faible pour créer un nombre suffisant de points de réticulation, et/ou de dimères et ainsi former un gel. Au delà de cette valeur, un gel commence à se former. À 10 mM, le gel obtenu est très fin ($\sim 0,5$ mm). Il présente une couleur uniforme et est totalement translucide. Lorsque la concentration du réservoir est de 50 mM, le gel obtenu est plus épais ($\sim 2,6$ mm). Pour ce gel, il est possible d'observer une hétérogénéité entre la partie basale du gel (proche de la membrane de dialyse pendant la gélification) et la partie apicale du gel. En effet, les gradients de couleur et de turbidité sont d'autant plus marqués que l'épaisseur du gel est importante comme nous l'avons observé dans la Figure 3.2.1. Lorsque la concentration en cations dans le réservoir est égale à 100 mM, l'épaisseur du gel obtenu augmente encore par rapport aux concentrations en cation précédentes ($\sim 4,1$ mm). Pour cet échantillon, la différence d'aspect macroscopique entre la partie basale et la partie apicale est beaucoup plus nette. La partie basale possède une couleur verdâtre et est translucide alors que la partie apicale est blanchâtre et turbide.

Pour la dernière valeur de concentration testée, 250 mM, l'épaisseur totale du gel est supérieure aux valeurs précédentes ($\sim 8,0$ mm) et le gel présente des différences de couleur et de turbidité entre les parties basales et apicales du gel. L'épaisseur de la partie verdâtre et translucide est cependant plus importante que dans le cas du gel fait à 100 mM.

La variation de concentration en cations dans le réservoir nous a permis de mettre en évidence que l'épaisseur du gel formé était d'autant plus importante que la concentration en Fe^{2+} est importante. De plus, les hétérogénéités du gel sont variables et fonction de la concentration en cations présente initialement dans le réservoir. Dans la littérature, Skjåk-Bræk *et al.*[32] ont décrit que le gel formé est d'autant plus hétérogène que la concentration en cations est faible. Le fait que nous observions l'effet inverse lorsque la concentration en Fe^{2+} est faible, est probablement dû au fait que les gels formés sont très fins et donc qu'il est difficile de distinguer lesdites hétérogénéités. À l'œil nu cependant, les observations macroscopiques entre les gels faits à 100 et 250 mM de Fe^{2+} , qui ont un volume plus important, vont bien dans le sens de ce que l'étude a décrit puisque la proportion de gel de couleur verdâtre et translucide est plus importante pour 250 mM que pour 100 mM. Cela pourrait signifier que cet échantillon est globalement plus homogène. Le fait qu'un hydrogel formulé à partir d'un réservoir de FeCl_2 concentré soit macroscopiquement plus homogène pourrait venir du fait que le coefficient de diffusion des cations est plus grand par rapport à celui des chaînes qui se déplacent dans la direction opposée.[21]

Le fait de varier la concentration en Fe^{2+} pour formuler des gels module le rapport molaire R, ce qui pourrait engendrer des différences de mécanismes d'association, et ce faisant modifier la structure locale du réseau. Nous avons donc effectué des mesures de DNPA afin de suivre l'évolution de la structure du réseau de polyGalA aux échelles locales en fonction de la concentration en cations utilisée pour la gélification. La Figure 3.7 présente les spectres DNPA des gels formulés à partir de 5 concentrations en Fe^{2+} en comparaison avec la solution de polyGalA à 20 g/L qui a permis la formulation des gels. Les spectres des concentrations 100 et 250 mM correspondent uniquement à la partie du gel la plus proche de la membrane de dialyse pendant la gélification. Nous remarquons que, comme pour l'étude de cinétique (Figure 3.5), tous les spectres correspondants à un échantillon gélifié présentent 3 régimes : une décroissance en $q^{-2.7}$ aux petits vecteurs de diffusion caractéristique de l'état d'agrégation des chaînes (Section 2.1.4), un épaulement dans des gammes de vecteurs de diffusion intermédiaires caractéristique de la formation d'un gel et une décroissance en q^{-1} aux grands vecteurs de diffusion caractéristique de la structure du polyGalA pour des distances inférieures à la longueur de persistance. Cependant, l'échantillon 10 mM se différencie des échantillons 50, 100 et 250 mM qui semblent avoir des spectres identiques à un facteur d'intensité près¹. En effet, pour cet échantillon l'épaulement caractéristique de la formation d'un gel est situé à des vecteurs de diffusion plus grands, ce qui suggérerait que la structure locale du réseau posséderait une taille caractéristique plus petite que dans les autres conditions. Cette hypothèse est totalement contre-intuitive du fait qu'une concentration en cations plus faible devrait induire la formation d'un réseau plus lâche et donc une taille caractéristique du réseau plus grande. Cet échantillon correspond au seul gel

1. L'intensité de diffusion des spectres 50, 100, 250 mM décroît lorsque la concentration en cations augmente et se rapproche alors de l'intensité de la solution de polyGalA (20 g/L). Cela signifie que l'hétérogénéité de concentration en polymère induite par le protocole de gélification est moins importante quand la concentration en cations augmente. Ce résultat est en accord avec l'étude menée par Skjåk-Bræk *et al.*[32].

formé dans des conditions où R est inférieur à 0,25, ce qui signifie que tous les groupements carboxylates susceptibles d'interagir avec un cation Fe^{2+} ne peuvent jamais tous être liés, et ce même pour un temps de gélification infini (Section 1.3 Chapitre 1). En d'autres termes, le spectre ne peut correspondre qu'à la combinaison linéaire d'un mélange composé d'un gel et de chaînes libres sans qu'il ne soit possible d'estimer les fractions respectives de chaînes liées et libres. L'intensité de l'épaule est donc sous-estimée par rapport à l'intensité du facteur de forme des chaînes libres ($q^{-2,7}$ puis q^{-1}). Il n'est donc pas possible de modéliser correctement la taille caractéristique du réseau pour cet échantillon (la modélisation de la taille caractéristique du réseau sera décrite dans la section 3.6 de ce chapitre).

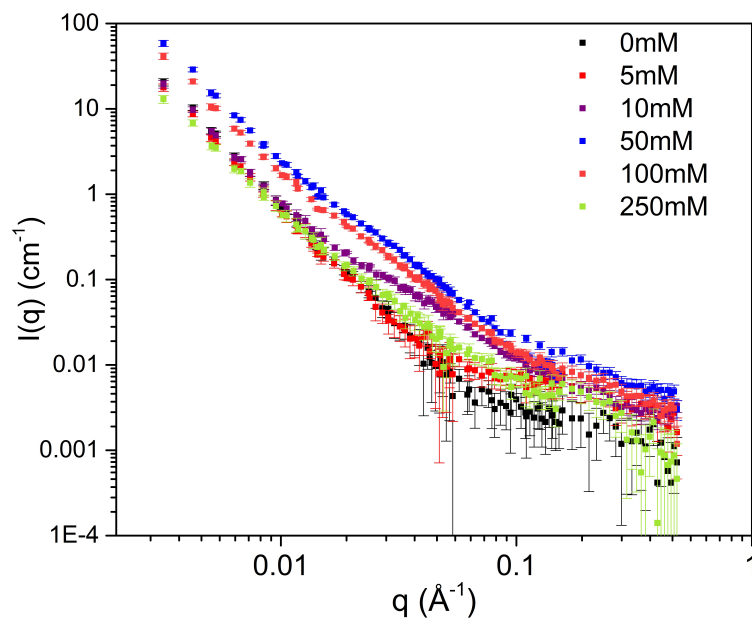


FIGURE 3.7 – Spectres DNPA décrivant l'évolution de la structure locale des chaînes de polyGalA en fonction de la concentration en ions Fe^{2+} dans le réservoir. Les spectres 100 et 250 mM correspondent à la partie du gel la plus proche de la membrane et les autres spectres correspondent à la totalité du gel formé.

3.2.3 Bilan sur les diagrammes d'état

La combinaison des observations macroscopiques et des mesures de DNPA sur les différentes conditions de temps de gélification et de concentration en cations testées nous a permis d'identifier les conditions optimales pour l'obtention d'un gel. De plus, elle nous a permis d'établir les conditions pratiques nécessaires à la caractérisation de leur réseau aux échelles locales. En effet, pour une concentration en cations pouvant permettre l'implication d'un maximum d'unités galacturonates, il est nécessaire d'atteindre un temps de gélification seuil permettant la diffusion d'une quantité de cations suffisante à la formation de ponts entre les chaînes puis d'un réseau continu. Il en va de même lorsque le temps de gélification choisi est long mais que la concentration en cations dans le réservoir est trop faible, un réseau continu ne peut pas être formé. De plus, si la concentration en cations permet la formation d'un gel macroscopique mais que le rapport molaire correspondant est inférieur à 0,25, la caractérisation de la taille du réseau formé ne peut pas être faite correctement.

De façon surprenante, lorsque le temps de gélification est suffisant et que la concentration en

cations est assez importante pour obtenir un rapport molaire initial $R > 0,25$, nous obtenons des gels macroscopiquement hétérogènes mais qui semblent avoir des structures de réseaux de polyGalA identiques aux échelles locales. Néanmoins, au regard des variations d'intensités brutes des spectres, les mesures DNPA ont révélées des variations de concentration qui sont corrélées à des gradients d'hétérogénéité plus ou moins importants.[32] Il est à noter que nous avons sondé les réseaux de polyGalA formés uniquement dans les parties du gel les plus proches de la membrane de dialyse durant le processus de gélification et donc les parties du gel apparaissant macroscopiquement verdâtres et transparentes. De ce fait, nous avons adapté notre protocole de gélification et d'analyse afin de sonder l'ensemble de la structure du gel à différentes échelles.

3.3 Choix des conditions expérimentales pour l'étude des gels

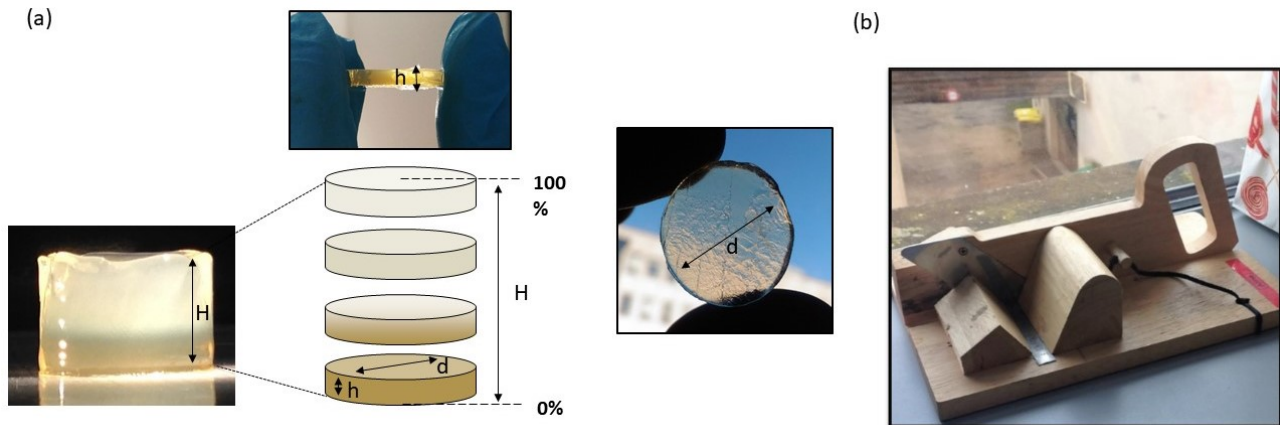


FIGURE 3.8 – Protocole de découpe des tranches de gel. (a) Les photographies présentent une vue de profil d'un gel entier (d'épaisseur H) et deux vues d'une tranche issue de ce gel : une vue de côté (mise en évidence de l'épaisseur h des tranches) et une de la section des gels (mise en évidence du diamètre $d = 2,1\text{cm}$). h correspond à l'épaisseur de la tranche. L'identification des tranches de gel a été définie en prenant le rapport des épaisseurs h et H (exprimé en pourcentage). On définit donc la position d'une tranche comme un pourcentage de l'épaisseur totale du gel. Par exemple une tranche de gel découpée à partir de la zone la plus proche de la membrane de dialyse pendant la gélification (0 %), d'épaisseur $h \sim 2\text{mm}$, a été identifiée comme la tranche 0 - 25 %. (b) La photographie présente l'appareil que nous avons usiné pour découper les gels et obtenir des tranches d'épaisseur contrôlée et homogène.

L'hétérogénéité macroscopique des hydrogels est évidente pour des temps de gélification longs et pour des concentrations en cations suffisamment hautes pour obtenir des gels épais. Grâce aux diagrammes d'états que nous avons établi, nous savons que pour un temps de gélification de 24 h et une concentration de Fe^{2+} de 100 mM, nous pouvons gélifier la totalité de la solution de polyGalA présente initialement dans le tube en verre (5 mL) tout en ayant un gradient de turbidité et de couleur important. C'est pourquoi, nous avons décidé de fixer ce temps de gélification et cette concentration en cations pour formuler des hydrogels que nous pourrions étudier à différentes échelles d'observation. Ainsi nous pourrions obtenir des données expérimentales sur la structure des différentes parties du gel aux échelles locales et macro-

scopiques et pourrons les confronter aux mécanismes proposés dans la littérature décrivant la formation de gels hétérogènes basés sur des hypothèses des variations de structures locales du réseau mais qui n’ont jamais été mesurées expérimentalement. Pour ce faire, nous avons décidé de découper les gels obtenus et de sonder leur structure et leurs propriétés mécaniques pour différents pourcentages de l’épaisseur (Figure 3.8).

Comme nous l’avons décrit dans la section 3.2.1, les gels obtenus présentent une couleur et une turbidité hétérogènes et graduelles de la partie qui était en contact avec la membrane de dialyse (0 %) à la partie la plus éloignée (100 %). Le gradient de couleur peut être dû à une concentration en cations moins importante vers 100 % de l’épaisseur que dans la partie 0 %. La turbidité importante de la partie la plus extrême du gel signifie que l’organisation du gel diffuse la lumière de manière très importante ce qui implique qu’il possède une structure qui varie sur des échelles de tailles caractéristiques de quelques centaines de nanomètres ou plus. Il est donc intéressant de sonder les différentes parties d’un même gel pour décrire finement l’évolution de sa structure de 0 à 100 % de l’épaisseur.

3.4 Bilan matière

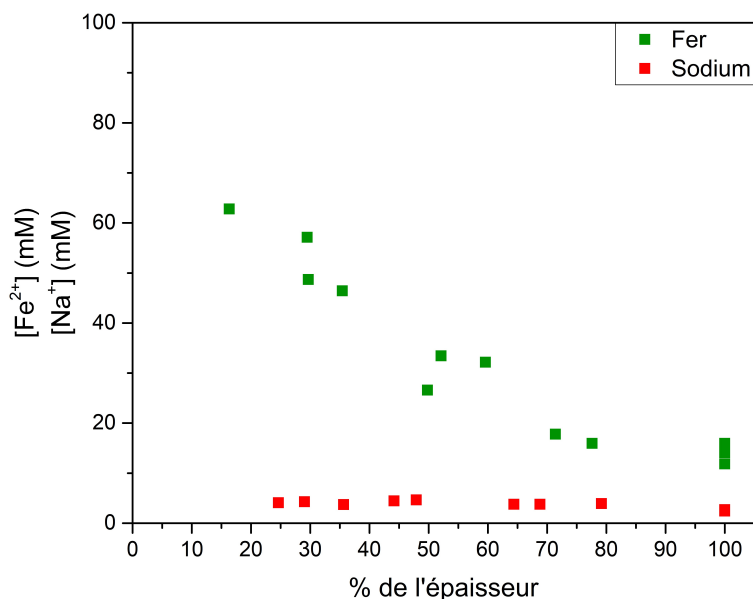


FIGURE 3.9 – Évolution de la concentration en fer et en sodium en fonction de la position dans le gel (exprimée en % de l’épaisseur totale du gel).

Le protocole de gélification choisi engendre un gradient de concentration suivant le sens de déplacement du front de migration des cations au sein des hydrogels. De ce fait, nous avons souhaité quantifier ce gradient pour la détermination des concentrations respectives du polyGalA et du fer. Afin de doser la concentration en polyGalA, nous avons déterminé la quantité de matière sèche (séchage des gels à 105 °C pendant 24 h) présente dans chaque tranche à laquelle nous avons retranché la quantité de fer présente dans une même tranche.

Nous avons considéré que la quantité d’ions chlorure et sodium présente dans le gel à l’issue de la gélification était très faible et donc négligeable par rapport à celles de polyGalA et de fer

dans la matière sèche totale obtenue, car nous avons procédé à un lavage des tranches de gels préalablement aux différentes mesures afin d'éliminer les ions en question pouvant être restés piégés dans le gel. Nous avons confirmé cette hypothèse en dosant la quantité d'ions sodium au sein des différentes tranches de gel et en la comparant à la mesure de la concentration de fer dans les différentes tranches de gel (Mesures de spectroscopie d'émission atomique (ICP-AES)) (Figure 3.9).

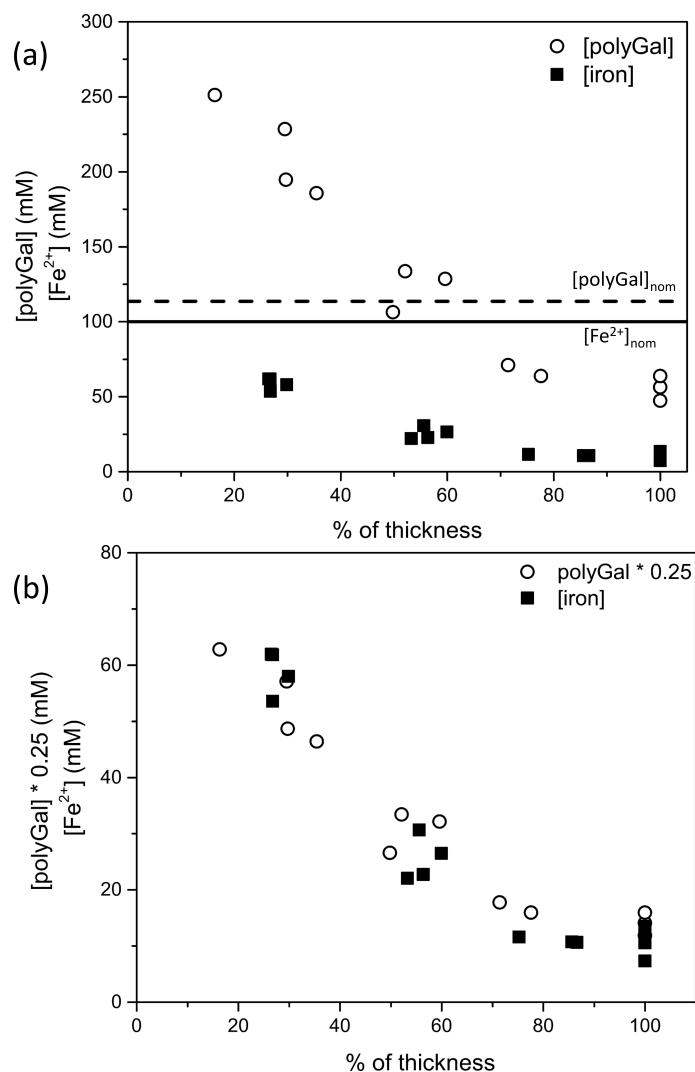


FIGURE 3.10 – (a) Évolution des concentrations molaires du polyGalA et des ions ferreux en fonction de la position dans le gel (exprimée en % de l'épaisseur totale du gel). La ligne en pointillés correspond à la concentration nominale de la solution de polyGalA ayant servi à former le gel. La ligne noire correspond à la concentration dans le réservoir de fer. (b) Comparaison des évolutions respectives de la concentration molaire du polyGalA multipliée par 0,25 et de la concentration en fer permettant de mettre en évidence le rapport molaire $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{GalA}]$ de 0,25 au sein des gels.

La figure 3.10 présente l'évolution des gradients de concentrations en polyGalA et en fer. La partie (a) montre que le gradient de polyGalA engendré par le processus de gélification est très important. De façon remarquable, la concentration de polyGalA dans la partie du gel la plus proche de la membrane de dialyse a doublé par rapport à la concentration en polyGalA nominale (illustrée par les pointillés). Dans la partie correspondant à 100 % de l'épaisseur, la concentration

a quant à elle diminuée d'un facteur 2 par rapport à la valeur initiale. L'importance de ce gradient est due au fait que la concentration en polyGalA initialement utilisée pour former les hydrogels était élevée [32].

Un gradient de concentration en fer est également observé. La valeur de cette concentration, et ce quelle que soit la position dans le gel, ne dépasse ou n'égale jamais la concentration en fer dans le réservoir même si ce dernier est largement en excès. Il apparaît que la concentration en polyGalA est environ 4 fois supérieure à la concentration en fer tout le long du gel. Afin de mettre en évidence ce rapport molaire, nous avons multiplié la concentration molaire de polyGalA par un facteur 0,25 pour la comparer directement à celle du fer (Figure 3.10 (b)). Ainsi, nous remarquons que quelle que soit la position dans le gel, le rapport molaire entre les cations Fe^{2+} et les unités galacturonates est toujours le même, et ce malgré les gradients de concentration. Nous pouvons alors imaginer que le procédé de gélification choisi induit des phénomènes de réticulation et d'association identiques quelles que soient les concentrations en polyGalA et en cation des différentes parties du gel et qu'un maximum d'unités galacturonates sont impliquées.

3.5 Propriétés mécaniques

3.5.1 Module de Young

Les propriétés mécaniques des gels ont été mesurées grâce à différentes techniques. Dans un premier temps, nous avons déterminé le module de Young des différentes tranches de gels par des mesures de compression afin de comprendre l'évolution des propriétés mécaniques en fonction de la distribution du polyGalA et du fer le long des gels. Le module de Young, E , définit la rigidité d'un matériau, ce qui signifie que plus E est grand plus la rigidité d'un matériau est importante. Il a été mesuré ici en appliquant une déformation de 30 % à l'échantillon et en mesurant la contrainte résultante (Principe de la technique détaillé en annexe D). Pour ce faire, nous avons utilisé une géométrie plan-plan de diamètre 25 mm (diamètre supérieur à celui du gel). E est défini comme la pente à l'origine représentant la contrainte σ en fonction de la déformation, $\frac{\Delta l}{l_0}$ (Loi de Hooke, équation 3.1).

$$\sigma = E \times \frac{\Delta l}{l_0} \quad (3.1)$$

Les tranches de gels n'étant pas parfaitement planes après la découpe, la géométrie utilisée pour la mesure ne pouvait pas être en contact avec la totalité de la surface du gel pour une déformation de 0 %. Il a donc fallu définir une distance parcourue par le module de mesure pour laquelle ce dernier n'était pas totalement en contact avec la surface de l'échantillon. Nous avons alors défini la distance réelle Δl parcourue par le module pour déformer le gel comme la différence entre la distance mesurée par l'appareil l_{mesure} et la distance à partir de laquelle le module est totalement en contact avec l'échantillon (l_{contact}). La déformation $\frac{\Delta l}{l_0}$ a donc été calculée de la manière suivante :

$$\frac{\Delta l}{l_0} = \frac{l_{\text{mesure}} - l_{\text{contact}}}{l_0} \quad (3.2)$$

où l_0 est l'épaisseur totale de la tranche (H sur la Figure 3.8). $l_{contact}$ a été déterminée de la manière suivante : Pour les premiers points de la mesure quand $l_{mesure} < l_{contact}$, la contrainte mesurée est très faible et bruitée et ne suit pas une évolution linéaire. Quand la tranche de gel est en contact avec la totalité du module, la valeur de contrainte augmente fortement et suit une évolution linéaire lorsque la déformation augmente, jusqu'à une valeur de déformation $\frac{\Delta l}{l_0} \sim 0,05$ à 0,1 (en fonction de l'échantillon). $l_{contact}$ a donc été définie à partir du seuil entre ces deux régimes (Figure 3.11).

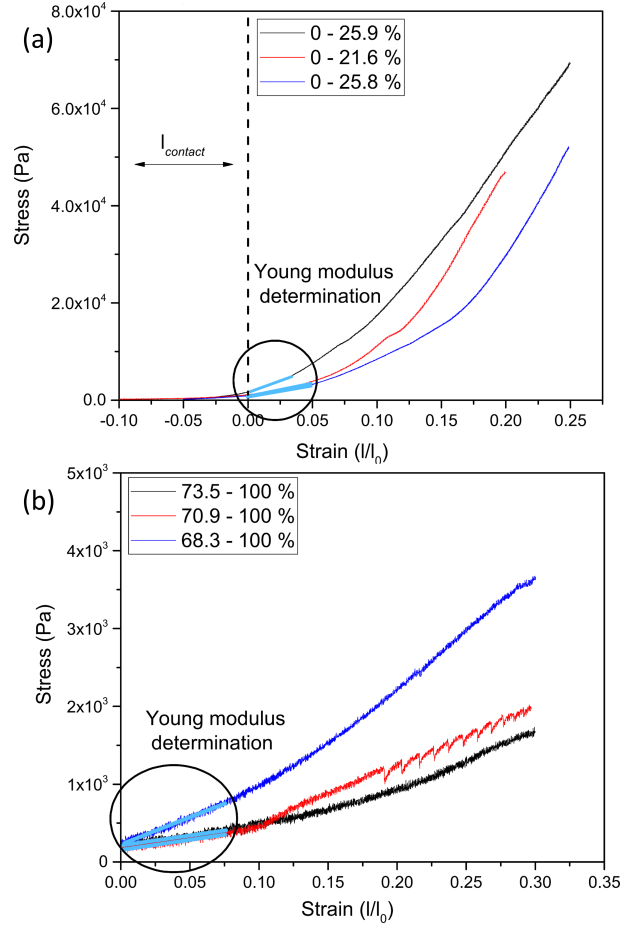


FIGURE 3.11 – Détermination de la zone de linéarité permettant le calcul du module de Young pour deux tranches présentant des modules très différents. La vitesse de déplacement du module a été fixée à 1 mm/s.

Nous avons tracé l'évolution du module de Young en fonction de la position dans le gel. Nous pouvons remarquer qu'un important gradient est observable (Figure 3.12). En effet, la valeur de module de Young varie sur deux décades malgré le fait que les mesures présentent des écarts types importants. Sur la Figure 3.12, nous avons souhaité mettre en évidence une possible relation entre l'évolution du module de Young et l'évolution de la concentration. Nous remarquons que la concentration en polyGalA diminue sur une décade de 0 % à 100 % de l'épaisseur. Il semblerait donc que $E \sim [polyGalA]^2$.

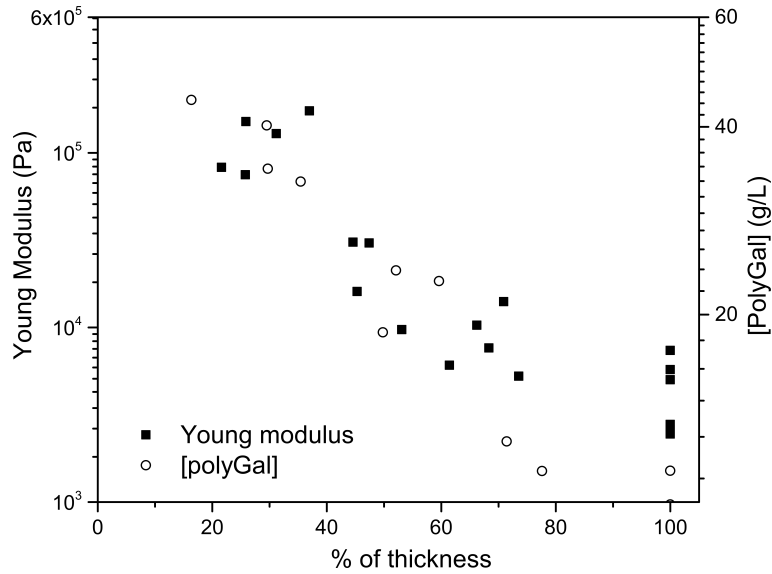


FIGURE 3.12 – Evolution du module de Young et de la concentration en polyGalA en fonction de la position de la tranche le long du gel (exprimée en % de l'épaisseur totale du gel).

3.5.2 Rhéologie oscillatoire

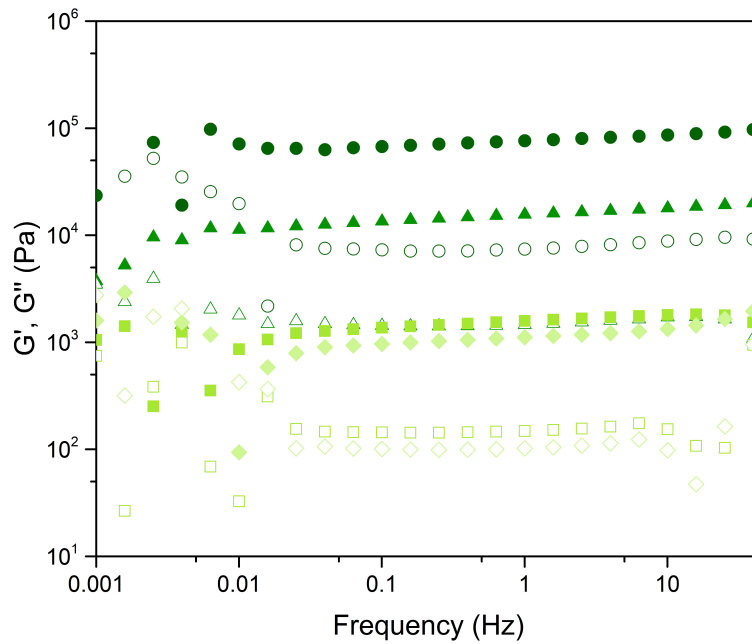


FIGURE 3.13 – Détermination des modules de conservation (G') et de perte (G'') en fonction de la fréquence de sollicitation à une déformation de 0,1 % (Les symboles pleins correspondent aux G' et les symboles vides correspondent aux G''). Les ronds représentent la tranche 0 - 25 %, les triangles représentent la tranche 25 - 50 %, les carrés représentent la tranche 50 - 75 % et les losanges représentent la tranche 75 - 100 n%.

Les mesures de module de Young étant bruitées, nous avons décidé de déterminer les modules de conservation, G' et de perte, G'' (Figure 3.14) afin de pouvoir comparer nos valeurs de G' aux valeurs de module de Young et de suivre l'évolution du module visqueux de nos échantillons (Principe en annexe D).

La première étape de la détermination des propriétés viscoélastiques de nos échantillons a été de déterminer la fréquence et la déformation auxquelles nous devons travailler afin d'extraire des valeurs de modules dans la zone de linéarité viscoélastique (LVE). Pour ce faire nous avons utilisé une géométrie plan-plan de diamètre 25 mm. Nous avons tout d'abord effectué un balayage en fréquence en appliquant aux échantillons une déformation de 0,1 % (Figure 3.13).

Suite à ces mesures, nous avons décidé de fixer la fréquence de sollicitation à 1 Hz afin d'effectuer des mesures à différents pourcentages de déformation. Ainsi, nous avons extrait nos valeurs de G' et de G'' pour une fréquence de 1 Hz et pour une déformation de 0,1%.

La Figure 3.14 montre qu'à l'instar des modules de Young déterminés en compression, les valeurs de modules élastique et visqueux diminuent sur deux décades depuis la partie du gel la plus proche de la membrane pendant la gélification jusqu'à la partie qui en est la plus éloignée. De plus, nous pouvons observer que les évolutions des deux modules sont parallèles et que le facteur de perte correspondant, $\tan \delta$, est de 0,1. Cette prédominance du module élastique prouve qu'en dépit de la très grande quantité d'eau présente dans nos hydrogels (de $\sim 95\%$ à $\sim 98\%$ en masse), ces derniers présentent une rigidité très importante. Ces mesures confirment également que le long des hydrogels, le module de conservation diminue sur deux décades et que la concentration en polyGalA suit cette diminution en variant sur une décade.

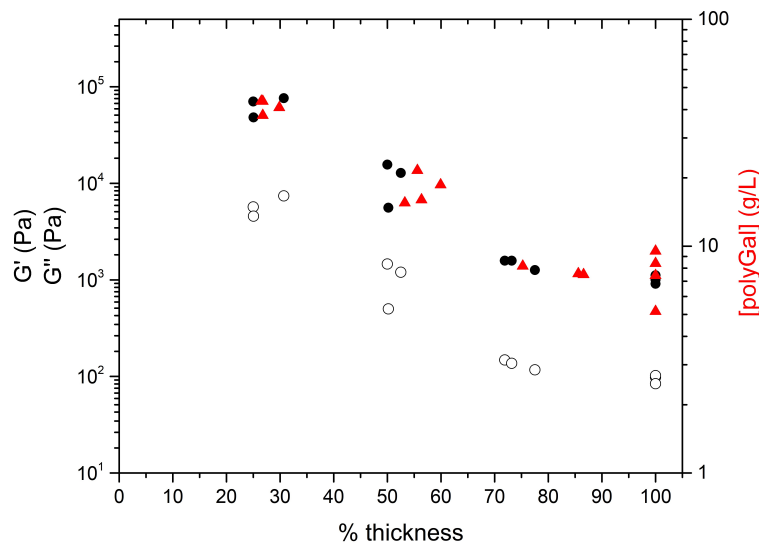


FIGURE 3.14 – Evolution des modules G' (symboles pleins) et G'' (symboles vides) en fonction de la distance dans le gel pour une fréquence de 1 Hz et une amplitude de cisaillement de 0,1 %. Cette évolution est également comparée avec celle de la concentration en polyGalA dans le gel (triangles rouges).

3.5.3 Bilan des propriétés mécaniques le long des hydrogels Fe^{2+} -polyGalA

Les hydrogels Fe^{2+} -polyGalA présentent un gradient de rigidité important où la partie du gel la plus rigide correspond à la partie du gel où la densité de points de réticulation est la plus importante et, à l'inverse où la partie la moins rigide correspond à la zone où la densité de points de réticulation est la plus faible. Lorsque que l'on s'intéresse aux propriétés viscoélastiques des différentes tranches du gel, nous remarquons que les modules de conservation et de perte ont

une évolution similaire en fonction de la concentration (Figure 3.14)², ce qui tend à nous faire penser que la structure locale du réseau formé est identique quelle que soit la partie du gel sondée et que seules les variations de concentration en polyGalA expliquent les variations de propriétés mécaniques. Il existe d'ailleurs une relation entre ces deux paramètres puisque le module de conservation (ou le module de Young) est globalement proportionnel au carré de la concentration. Cette relation concentration-module a déjà été mise en évidence dans des études antérieures sur des systèmes similaires[45, 39, 12] et prouve que la réticulation des chaînes de polyuronate par des cations divalents induit la formation d'une structure hétérogène à une échelle d'observation macroscopique. En effet, si le module élastique était uniquement fonction de la concentration en chaînes, la relation serait $G' \sim [\text{chaînes}]^3$.

3.6 Caractérisation de la structure du réseau formé aux échelles locales

Afin de comprendre si la structure du réseau de polyGalA formé lors de l'association des ions Fe^{2+} avec les unités galacturonates était effectivement identique quelle que soit la position dans le gel comme supposé dans la section précédente, nous avons décidé de réaliser des mesures de DNPA en sondant la structure du réseau dans les différentes tranches de nos hydrogels.

Nous avons donc choisi de tracer dans la Figure 3.15 (a) les spectres obtenus pour les différentes tranches du gel en les comparant avec le spectre de la solution de polyGalA utilisée pour formuler le gel. Nous pouvons observer que, contrairement à la solution de polyGalA qui présentait deux régimes différents ($q^{-2,7}$ à petits q et q^{-1} à grands q), les spectres décrivant la structure du polyGalA gélifié présentent une évolution à trois régimes. Premièrement, pour les petits vecteurs de diffusion, nous retrouvons la pente décrivant une décroissance en $q^{-2,7}$ caractéristique de l'organisation à grande échelle des chaînes de polyGalA dans nos solutions, comme décrit dans la section 2.1.4 du chapitre 2. D'autre part, pour les grands vecteurs de diffusion, nous retrouvons la décroissance en q^{-1} caractéristique d'un objet à une dimension qui correspond à ce qui est attendu pour un tel biopolymère. Un épaulement apparaît pour des valeurs de vecteurs de diffusion intermédiaires. Lorsque l'on représente les intensités diffusées absolues, il est difficile de voir si cet épaulement est similaire pour les différentes parties du gel sondées. En effet, les intensités aux petits q des différentes tranches diminuent de la partie la plus proche de la membrane de dialyse pendant la gélification à la partie la plus éloignée, ce qui rappelle l'évolution de la concentration en polyGalA le long de nos hydrogels. La concentration en polyGalA pourrait être directement responsable de ces variations d'intensités diffusées, ces dernières étant directement proportionnelles à la fraction volumique d'objets diffusants. Nous avons donc choisi de normaliser les intensités diffusées des différents spectres par la valeur de concentration en polyGalA mesurée dans chacune des tranches. Pour cela, nous avons normalisé les intensités de diffusion par le rapport entre la fraction volumique de polyGalA de la tranche sondée, ϕ_{sample} et la fraction volumique initiale de la solution de polyGalA, $\phi_{\text{polyGalAsolution}}$ suivant l'équation 3.3.

$$I(q)_{\text{normalized}}(cm^{-1}) = \frac{I(q)}{\phi_{\text{sample}}/\phi_{\text{polyGalAsolution}}} \quad (3.3)$$

2. Cette évolution a été déjà été observée par Huynh *et al.* [21].

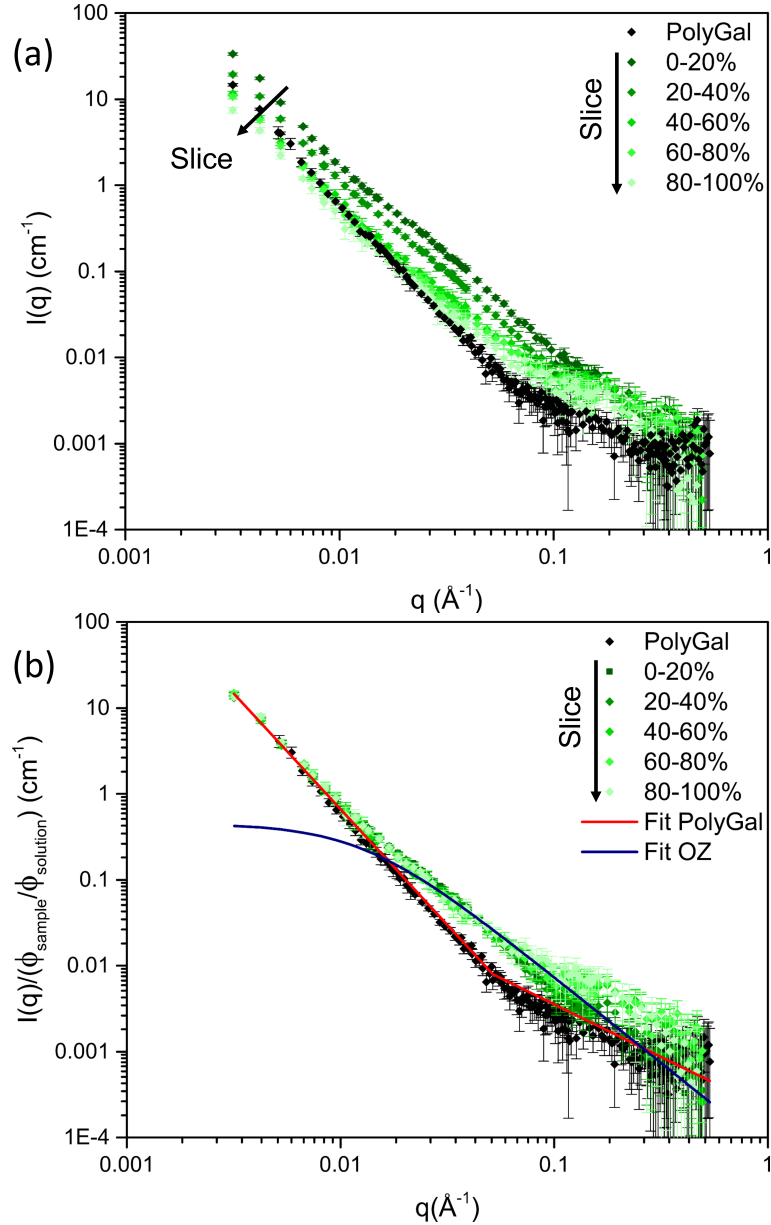


FIGURE 3.15 – Mesures de diffusion de neutrons aux petits angles des différentes tranches d'un gel après 24 h de gélification comparées avec la mesure de la solution de polyGalA ayant servi à la formulation des gels (20 g/L). (a) Intensités absolues des spectres. La flèche montre l'évolution des intensités de diffusion en fonction de la distance dans le gel. (b) Intensités de diffusion normalisées par la concentration en polyGalA dans les différentes tranches.

Ainsi, nous mettons en évidence (Figure 3.15 (b)) que, quelle que soit la position dans le gel, l'épaule est strictement identique et donc que la structure locale du réseau de polyGalA est parfaitement similaire. L'apparition de cet épaule est liée, à l'apparition d'une nouvelle taille de corrélation lorsque le gel est formé et peut être associée à la taille de maille du réseau de polyGalA, ξ (Figure 3.5). Le fait que cet épaule ne modifie pas la structure aux petits vecteurs de diffusion prouve que la distance de corrélation correspondant au réseau de polyGalA a été formée au sein de la structure du polyGalA préexistante. Nous avons utilisé le modèle d'Ornstein Zernicke pour déterminer cette distance de corrélation ξ . Les spectres ont ensuite été modélisés sur l'ensemble de la gamme de vecteurs de diffusion par l'équation :

$$I(q)(cm^{-1}) = I(q)_{polyGalAsolution} + k \frac{1}{1 + (q \times \xi)^2} \quad (3.4)$$

Cette équation est communément utilisée pour caractériser une longueur de corrélation caractéristique, ξ dans un système. Elle considère en effet que la fonction de corrélation de paires $g(r)$ peut se décrire dans l'espace réel comme $g(r) \sim e^{-r/\xi}$, ce qui se traduit par une Lorentzienne dans l'espace réciproque (Équation 3.4). Le calcul de la taille des mailles du réseau de polyGalA dans les différentes tranches du gel donne un ξ égal à $75 \pm 5 \text{ \AA}$. Le fait que la taille de maille soit constante quelle que soit la position dans le gel implique qu'il y ait le même ratio de réticulation dans l'ensemble du gel ce qui est totalement en accord avec le fait que R soit constant dans les différentes parties du gel.

3.7 Détermination de l'état d'oxydation du fer

La détermination de la structure de nos gels de l'échelle macroscopique à l'échelle de la structure du réseau montre que les chaînes de polyGalA sont réticulées par les cations Fe^{2+} . Cependant, bien que nous ayons pris toutes les précautions vis-à-vis de l'oxydation au début de chaque formulation, nous devons nous assurer que l'état d'oxydation du fer est bel et bien conservé après l'association des cations Fe^{2+} avec les unités constitutives du polyGalA. Pour cela, nous avons effectué des mesures de spectroscopie d'absorption de rayons X (XAS). Cette technique permet la caractérisation de l'environnement local d'un atome photoabsorbeur³ et nous a également permis d'identifier l'état d'oxydation du fer dans les hydrogels par la détermination de l'énergie du seuil d'absorption. En effet, plus un élément possède un état d'oxydation élevé, plus il a un seuil d'absorption haut en énergie. Nous avons pu mettre en évidence cette différence en mesurant les spectres d'absorption de deux solutions de référence constituées respectivement d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} dans l'eau. La Figure 3.16 présente les spectres XAS des deux solutions de référence. L'énergie du seuil d'absorption, E_0 n'est pas simple à identifier sur ce type de représentation. Pour déterminer expérimentalement et plus précisément la valeur du seuil d'absorption de l'ion photoabsorbeur, on représente la dérivée première des spectres XAS et E_0 correspond au maximum du signal.

La Figure 3.17 a) présente les dérivées premières des spectres XAS des deux solutions de référence comparées à la dérivée première du spectre XAS du fer dans la tranche 0% - 25%. Ainsi, nous pouvons remarquer que l'énergie du seuil d'absorption du fer ferrique se situe à 4 eV de plus que pour le fer ferreux. Lorsque l'on compare les seuils d'absorption de ces deux solutions avec celui du spectre XAS obtenu pour notre échantillon de gel, il apparaît que le fer reste sous sa forme réduite Fe^{2+} dans la tranche sondée (Figure 3.17 a)), et ce quelle que soit la position dans le gel (Figure 3.17 b)). L'association des cations Fe^{2+} avec les groupements constitutifs du polyGalA permet donc leur protection contre l'oxydation.

3. Le chapitre 4 présentera la technique plus en détails.

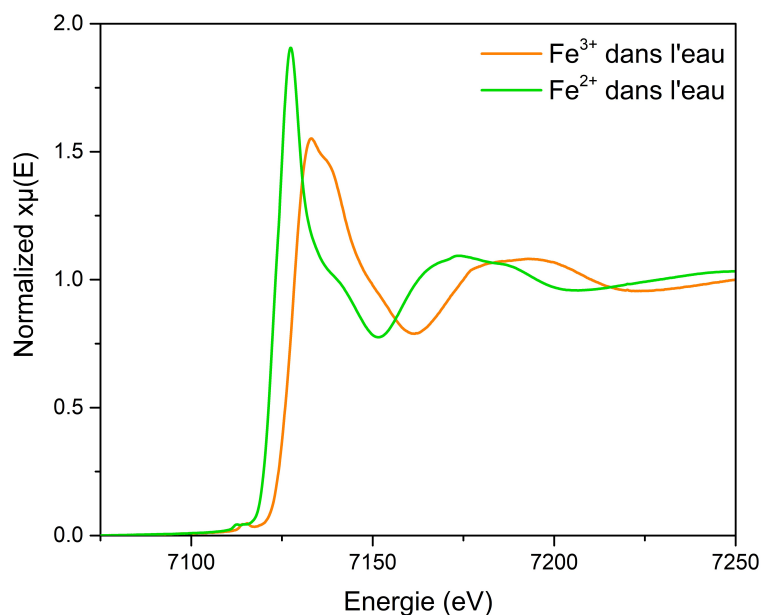


FIGURE 3.16 – Spectres XAS des ions Fe^{2+} (courbe verte) et Fe^{3+} (courbe orange) dans l'eau.

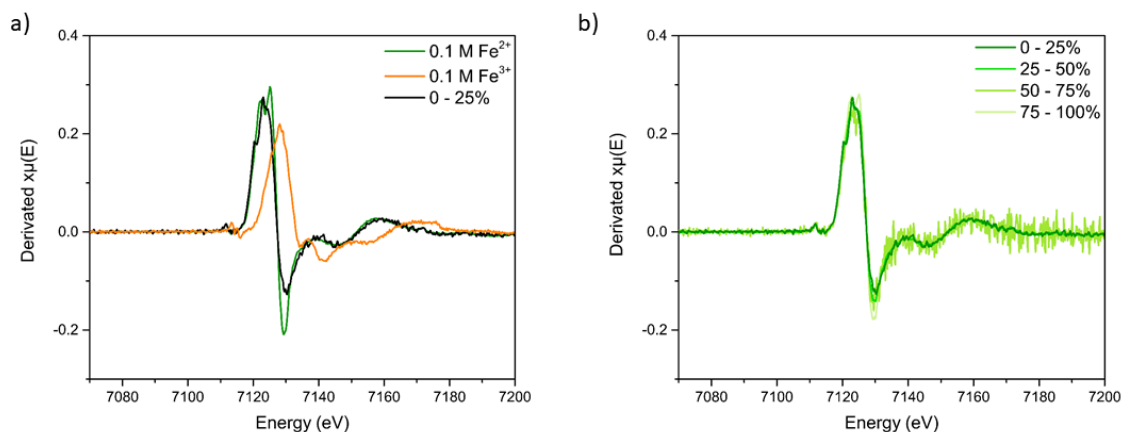


FIGURE 3.17 – Détermination de l'état d'oxydation du fer au sein des hydrogels. a) Comparaison de la dérivée première du signal XAS de la tranche de gel 0-25 % avec deux solutions standards de FeCl_2 et de FeCl_3 . b) Comparaison des dérivées premières des signaux XAS de toutes les tranches d'un même gel.

Afin de vérifier si cette association permet une protection dans des conditions physico-chimiques favorables à l'oxydation, nous avons plongé une tranche de gel dans de l'eau saturée en oxygène. Après 3 h d'immersion à température ambiante, nous avons à nouveau mesuré le signal XAS de la tranche de gel et avons vu que l'état d'oxydation du fer ferreux était conservé (Figure 3.18 a)). D'autre part, nous avons laissé sécher à l'air libre une tranche de gel sans aucun contrôle pendant 24 h (Figure 3.18 b)). Là aussi, nous remarquons que l'état d'oxydation du fer est maintenu lors du séchage de l'hydrogel. Ainsi, nous sommes sûrs que même dans des conditions oxydatives, le polyGalA est capable de maintenir l'état d'oxydation du fer. De plus, cette expérience montre que tout le fer qui a diffusé dans le gel est fortement associé aux groupements constitutifs du polyGalA.

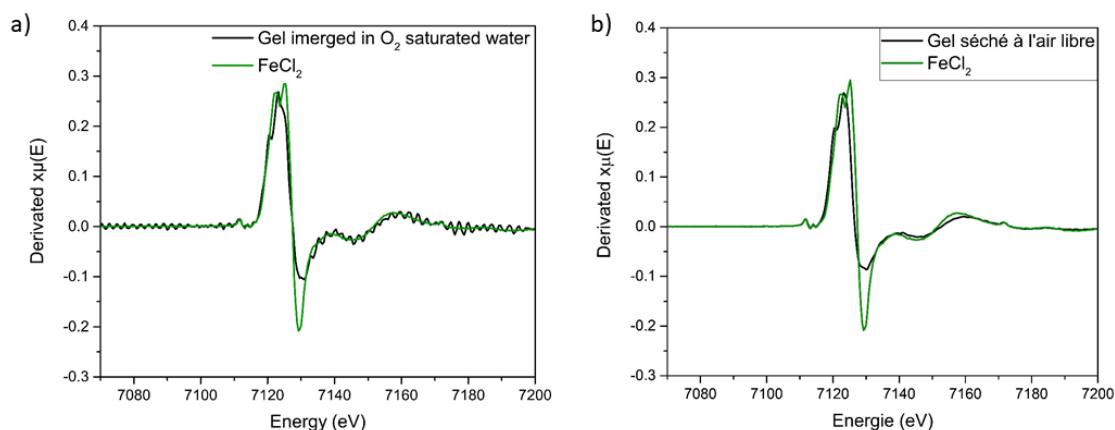


FIGURE 3.18 – a) Dérivée première du signal XAS d'une tranche de gel qui a été plongée 3 h dans de l'eau saturée en oxygène et b) d'une tranche de gel qui a été séchée à l'air libre pendant 24 h en comparaison avec la dérivée première d'une solution de FeCl_2 à 100 mM.

3.8 Effet de la concentration en polyGalA

Dans les parties précédentes, nous avons étudié la formation de gels pour une concentration en polyGalA de 20 g/L et des conditions physico-chimiques variées et avons montré que la taille de maille du réseau est identique quelles que soient ces conditions. Nous avons voulu savoir si la concentration en polyGalA de la solution présente initialement dans le tube pouvait entraîner des modifications de la distance de corrélation moyenne entre les chaînes. Nous avons donc formulé des gels avec le protocole décrit dans la Figure 3.3 en utilisant une concentration de 10 g/L de polyGalA (valeur proche de la concentration de recouvrement, comme mesurée dans la section 2.1.3) puis une concentration de 5 g/L (valeur bien inférieure à la concentration de recouvrement) pour un temps de gélification de 24 h. Pour chacune de ces formulations, nous avons respecté un rapport molaire $R \sim 1$ en plaçant respectivement dans le réservoir des solutions de FeCl_2 à 50 et 25 mM.

Pour le gel préparé à partir d'une solution de polyGalA à 10 g/L ($C > C^*$), nous nous attendions à ce que la formation d'un gel soit possible et puisse être similaire à ce que nous avons trouvé pour le gel préparé à 20 g/L de polyGalA car le processus de gélification induit une diffusion des chaînes vers la partie la plus proche de la membrane de dialyse. Pour le gel préparé à partir de la solution de polyGalA à 5 g/L ($C < C^*$), nous pensions ne pas pouvoir obtenir un gel à cause de la trop faible concentration en chaînes en solution.

Lorsque l'on s'intéresse à l'aspect macroscopique des hydrogels (Figure 3.19), nous remarquons qu'à l'œil nu, le gel formé à partir de la solution mère de polyGalA à 10 g/L semble plus homogène que le gel issu de la solution à 20 g/L. Ceci va dans le sens de ce qui a été décrit dans la littérature.[32] Sur ces gels, nous n'avons pas procédé à des mesures de propriétés mécaniques mais avons "au touché" pu distinguer un gradient de rigidité de la partie la plus proche de la membrane à la partie la plus éloignée. La partie 100 % de l'épaisseur de ce gel semblait plus fragile que la partie 100 % du gel formulé à partir de la solution de polyGalA à 20 g/L. Nous pensons que nous aurions pu sonder exactement les mêmes modules que dans le cas du gel à 20 g/L mais sur des épaisseurs trop faibles pour pouvoir être analysées.

Concernant la solution de polyGalA à 5 g/L, du fait des mécanismes menant à l'augmentation

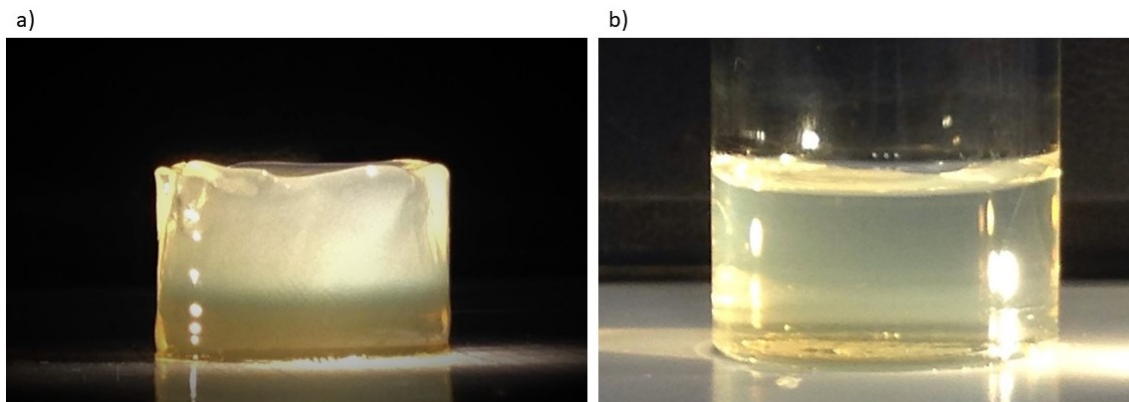


FIGURE 3.19 – Observations macroscopiques de gels Fe^{2+} -polyGalA faits à partir de solutions mères à (a) 20 g/L et à (b) 10 g/L.

de la concentration en polyGalA près de la membrane, qui ont été décrits dans la section 1.3.4, un gel a pu se former dans la partie la plus proche de la membrane de dialyse car la concentration de polyGalA est devenue supérieure à C^* . En revanche, une partie de la solution de polyGalA présente dans le tube n'est pas gélifiée à l'issue des 24 h.

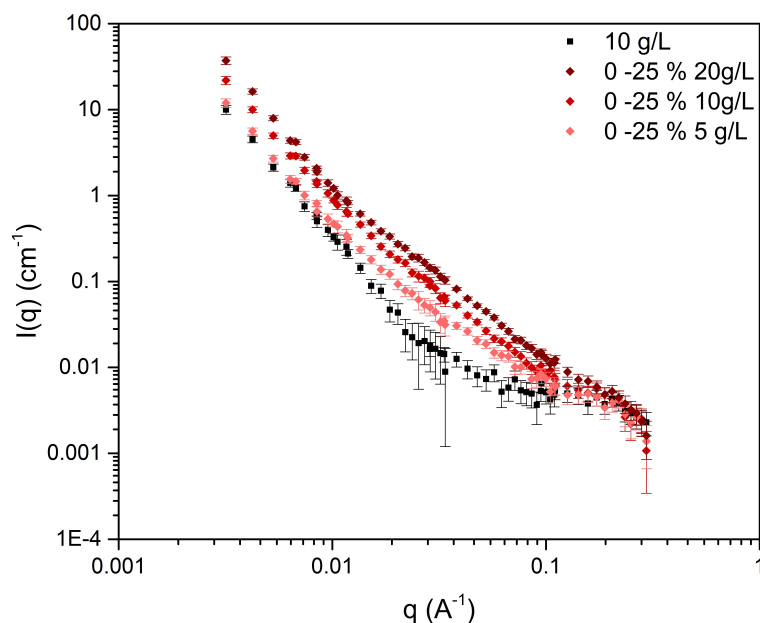


FIGURE 3.20 – Spectre DNPA des parties de gel les plus proches de la membrane pour des gels formulés à partir de solutions de polyGalA à 20, 10 et 5 g/L en comparaison avec le spectre DNPA de la solution de polyGalA à 10 g/L (spectre noir).

La figure 3.20 présente les spectres DNPA obtenus pour les tranches 0 - 25 % de l'épaisseur de trois gels formulés à partir de solutions de polyGalA à 20, 10 et 5 g/L comparés au spectre d'une solution de polyGalA à 10 g/L (spectre noir). Nous pouvons remarquer, en comparant les intensités de diffusion brutes des spectres de ces trois gels, que la partie la plus proche de la membrane de dialyse pendant la gélification voit sa concentration augmenter de manière importante. En effet, la concentration en polyGalA double dans cette partie des gels et ce quelle que soit la concentration initiale de polyGalA.

La Figure 3.21 présente les spectres correspondants aux différentes tranches issues de la découpe d'un gel formé à partir d'une solution de polyGalA à 10 g/L (spectre noir) plongé dans une solution de FeCl_2 à 50 mM⁴ pendant 24 h. Les intensités absolues de diffusion ont chacune été multipliées par un facteur a afin de mieux distinguer les différents régimes observables sur les spectres.

Comme présenté dans la Figure 3.20, le spectre correspondant à la tranche la plus proche de la membrane de dialyse présente le même facteur de structure correspondant à une taille de maille ξ de 75 ± 5 Å. Lorsque l'on sonde la partie intermédiaire du gel (33-66 % de l'épaisseur), nous remarquons que l'épaule se déplace vers les plus hautes valeurs de q et que son intensité est réduite, ce qui nous rappelle les observations faites pour le gel formé à 10 mM de Fe^{2+} pour une concentration de 20 g/L de polyGalA. Lorsque l'on sonde la partie la plus éloignée de la membrane de dialyse, nous ne pouvons presque plus observer l'épaule. Nous pensons donc que le réseau de polyGalA formé à 10 g/L est identique à celui formé à 20 g/L. Cependant, lorsque l'on sonde les parties du gel les plus éloignées de la membrane de dialyse, la concentration en polyGalA est inférieure à C^* . De ce fait, les points de réticulations inter-chaînes ne sont pas nombreux et l'épaule correspondant est donc très faible. Nous mesurons alors un mélange du signal de la maille du gel et du signal des chaînes libres de polyGalA (comme dans le cas des gels faits à 10 mM pour 20 g/L) .

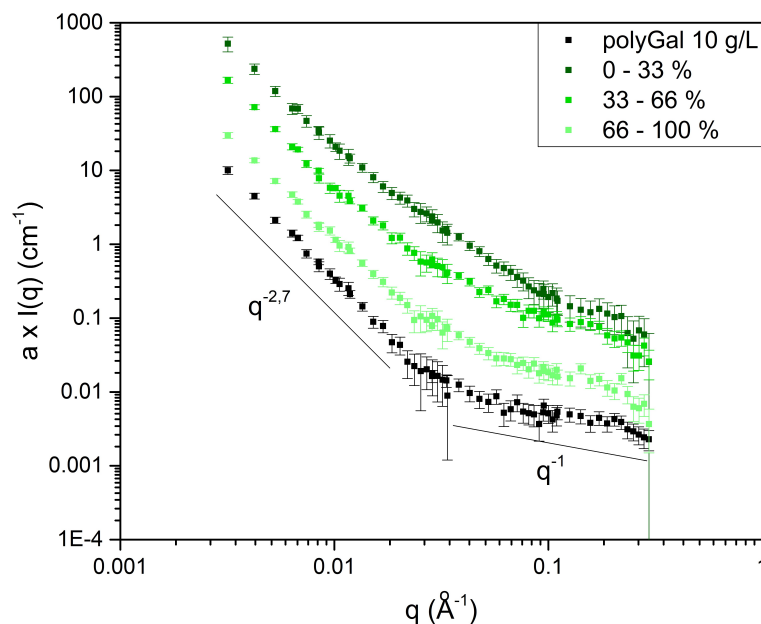


FIGURE 3.21 – Spectre DNPA des différentes tranches du gel issu de la gélification de la solution à 10 g/L (50 mM) pendant 24 h. Le facteur a est égal à 50 pour la tranche 0-33 %, à 15 pour la tranche 33-66 % et 3 pour la tranche 66-100 % et permet de séparer les spectres les uns des autres pour leur description.

4. Nous nous sommes placés dans des conditions où le rapport molaire entre la concentration en cations dans le réservoir et la concentration en chaînes est proche de 1, comme nous l'avons fait pour les gels formulés à 20 g/L.

3.9 Mécanisme de gélification

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre nous permettent de proposer un mécanisme de gélification expliquant la structure finale du réseau, les propriétés mécaniques des gels et leur aspect macroscopique. Ce mécanisme se déroule en plusieurs étapes qui sont illustrées par les schémas suivants :

Initialement, les chaînes de polyGalA sont distribuées de façon homogène en solution et les ions sodium jouent le rôle de contre-ions des chaînes de polyGalA, ce qui implique que la diffusion des ions sodium et des chaînes est couplée. Les cations sodium n'interfèrent pas avec la réticulation des ions ferreux mais leur présence en solution permet de neutraliser une partie des charges du polyélectrolyte, ce qui augmente le coefficient de diffusion des chaînes.[46, 35] Quand les chaînes de polyGalA arrivent à proximité de la membrane de dialyse, la diffusion des cations commence. Lorsque les premiers cations rentrent en contact avec les chaînes de polyGalA, ils viennent remplacer les cations sodium et forment quelques points de réticulation ponctuels à proximité de la membrane de dialyse. Le nombre de ces points de réticulation étant très faible, il ne permet pas la formation d'un réseau continu [3] et la structure moyenne des chaînes de polyGalA n'est pas modifiée, comme nous l'avons montré dans la section 3.2.1. Il n'y a par ailleurs à ce stade pas de modification de la concentration de polyGalA.

Plus la quantité de cations Fe^{2+} augmente dans la solution de polyGalA, plus le nombre de points de réticulation augmente. Ainsi, des dimères et des multimères se forment lorsque le rapport molaire $R = [\text{Fe}^{2+}]/[\text{GalA}]$ atteint une valeur seuil appelée R^* . Il a été décrit sur des systèmes analogues que la formation de dimères est possible lorsque le seuil R^* est atteint, ce dernier étant fonction du nombre et de la stabilité des points de réticulation formés par le cation. [3] Un réseau tridimensionnel est alors formé dans la partie du tube la plus proche de la membrane avec une taille de maille, ξ de $75 \pm 5 \text{ \AA}$. La formation de ce réseau induit la formation d'un gradient de concentration local entre les chaînes immobilisées et les chaînes libres, ce qui induit la diffusion des chaînes libres dans la direction opposée à celle de la diffusion des cations Fe^{2+} . Une zone de déplétion est alors formée à l'interface entre la partie gelée des chaînes de polyGalA et la partie en solution, ce qui renforce le phénomène de diffusion des chaînes libres de polyGalA vers la partie gélifiée, dans la direction inverse de celle des cations divalents.[38] Ce phénomène entraîne la formation d'un gradient de concentration en polyélectrolyte et conduit à la formation d'un champ électrique local généré par le déplacement des charges, qui accélère également la diffusion des chaînes libres.[35] L'ensemble de ces phénomènes engendrent une sortie d'eau de la partie gélifiée de l'échantillon vers la partie non gélifiée (synérèse) ce qui entraîne la compression du réseau formé.[39] Ceci permet d'expliquer que le polyGalA se concentre fortement au voisinage de la membrane par rapport à la concentration nominale en polyGalA. Le gradient de concentrations induit le gradient de rigidité au sein des gels (Figure 3.14). Comme les cations Fe^{2+} continuent de diffuser au travers du gel jusqu'à la partie non gelée des chaînes de polyGalA, ces dernières sont progressivement réticulées à leur tour et forment un réseau continu qui croît progressivement et déplace le front de gélification de plus en plus loin de la membrane. [32] Nous pensons que l'interaction entre les cations ferreux et le polyGalA est très forte, ce qui implique que le phénomène de gélification est irréversible et que des hétérogénéités peuvent être facilement formées. [47]. Dans la littérature, de telles hétérogénéités de concentration ont été largement étudiées au sein des gels (ou billes) et associées à différents facteurs tels que la concentration en polyélectrolyte, la concentration en cations ainsi que leur coefficient de

diffusion dans différentes conditions physico-chimiques, leur nature, leur masse moléculaire et la force ionique. [39][37][32] Plus la concentration nominale en chaînes de polyGalA est faible, plus le système est hétérogène, ce qui explique que les gels ne sont pas turbides dans la partie la plus concentrée en chaînes mais qu'il existe un gradient de turbidité qui augmente à mesure que l'on s'éloigne de la membrane de dialyse.

Étant donné que la formation de points de réticulation par les cations ferreux entraîne toujours la formation de la même structure du réseau de polyGalA aux échelles locales, la seule manière d'expliquer la diminution progressive de la concentration en chaînes est l'existence d'hétérogénéités à une échelle mésoscopique avec la présence de zones de faible densité au sein des gels. Ce sont ces fluctuations de densités qui diffusent la lumière dans les parties turbides.

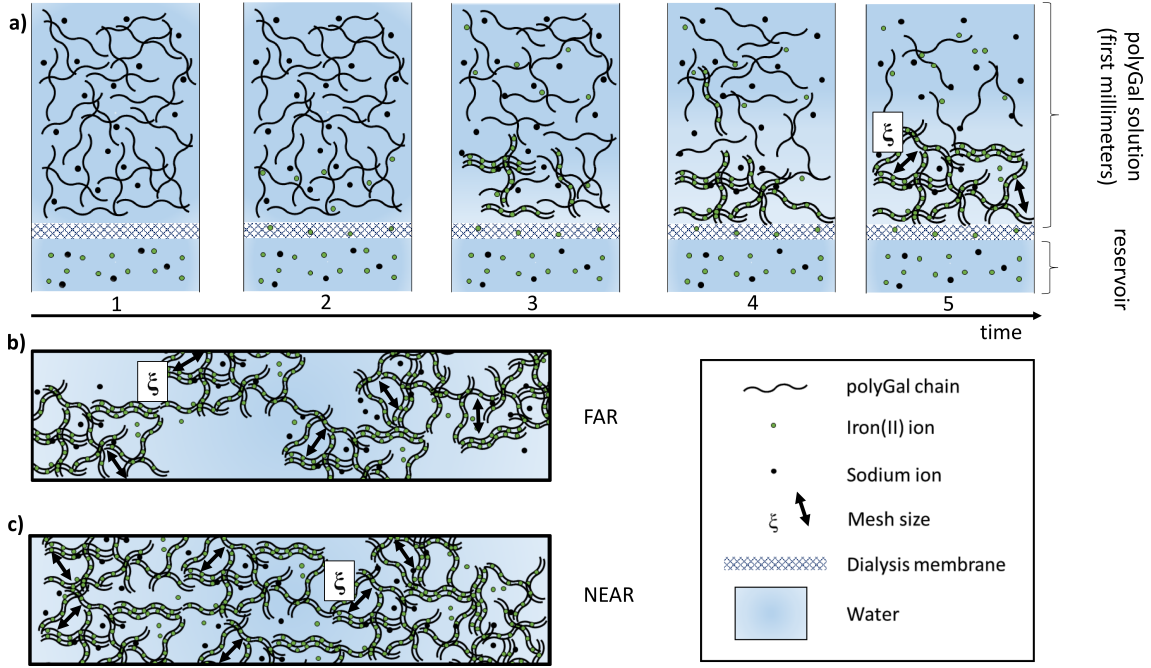


FIGURE 3.22 – a) Schéma du mécanisme de gélification que nous proposons pour expliquer la formation du réseau de polyGalA et la structure des hydrogels à différentes échelles d'observation. b) Schéma de la structure mésoscopique finale supposée d'un hydrogel Fe^{2+} -polyGalA dans la partie la plus éloignée de la membrane pendant la gélification. c) Schéma de la structure mésoscopique finale supposée d'un hydrogel Fe^{2+} -polyGalA dans la partie la plus proche de la membrane pendant la gélification.

Dans la partie du gel qui est la plus proche de la membrane de dialyse et qui est formée dès les premières étapes de notre procédé de gélification, la structure du gel devrait être globalement homogène à la vue de la limpidité macroscopique. Afin de tester cette hypothèse, il est possible de comparer la valeur de ξ obtenue par les mesures de DNPA avec celle pouvant être extraite des mesures de module de Young ξ_E estimé à partir de la théorie moléculaire d'élasticité. [48][49]

En effet, dans le cas d'une structure homogène, les points de réticulation (ici les cations Fe^{2+}), appelés CL ont une répartition homogène au sein du réseau de polyGalA avec une densité ρ_{CL} qui est liée au module de cisaillement G et au module de Young E suivant l'équation [48] :

$$\rho_{CL} = \frac{G}{R \times T} = \frac{E}{3 \times R \times T} \quad (3.5)$$

où T est la température et R est la constante des gaz parfaits.

ρ_{CL} est ensuite corrélée à ξ_E via la relation :

$$\xi_E = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi \times \rho_{CL} \times N_A}} = \sqrt[3]{\frac{18 \times R \times T}{\pi \times E \times N_A}} \quad (3.6)$$

où N_A est le nombre d'Avogadro.

Cette approche nous permet de calculer une taille de maille $\xi_E \sim 60 \text{ \AA}$ pour $E = 10^5 \text{ Pa}$, ce qui correspond à la valeur de module mesurée dans la partie 0 - 20 % du gel. Cette taille de maille calculée est de l'ordre de grandeur de la valeur ξ obtenue par DNPA ($75 \text{ \AA}$), ce qui confirme que dans cette partie du gel, la structure est globalement homogène.

Concernant la partie du gel la plus éloignée de la membrane de dialyse pendant la gélification, cette approche n'est pas possible du fait de la présence de plus grosses hétérogénéités qui diffusent fortement la lumière. En effet, en faisant une estimation grossière de ξ_E à partir du module mesuré dans cette partie du gel, on obtient une valeur de $\xi_E \sim 230 \text{ \AA}$ (pour $E = 10^3 \text{ Pa}$, comme obtenu dans la partie du gel 80 - 100 %), très supérieure aux mesures neutrons (donnant une valeur de ξ environ 3 fois inférieure) et qui ne traduit pas la taille des hétérogénéités présentes dans cette partie du gel qui doivent être beaucoup plus grandes étant donné qu'elles diffusent fortement la lumière (gel très turbide). La densité de points de réticulation, ρ_{CL} n'est donc plus homogène dans l'échantillon. Le gel doit donc être composé de zones denses en polyGalA pour lesquelles ρ_{CL} est la même que dans les zones homogènes initialement formées et de zones pauvres en polymère (Figure 3.22 b).

Conclusion du chapitre

La gélification "externe" de la solution de polyGalA par les ions Fe^{2+} induit la formation d'hydrogels présentant d'importants gradients macroscopiques. Cependant, nous avons réussi à développer un protocole permettant la formulation d'hydrogels très reproductibles permettant de maîtriser les gradients en question.

Nous avons mis en évidence que lorsque le rapport molaire entre la concentration en cation dans le réservoir et la concentration en polyGalA dans le tube est supérieur à 0,25, le gel formé présente une structure locale à l'échelle du réseau de polyGalA qui est toujours la même. De plus, lorsque l'on dose la quantité de fer présente dans le gel à l'issue de la gélification, nous remarquons que nous retrouvons toujours le rapport molaire $R = 0,25$. L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe des hétérogénéités mésoscopiques qui se forment au cours du processus de gélification qui seraient responsables des propriétés macroscopiques des hydrogels.

Le fait que le réseau formé ait toujours la même taille de maille $\xi = 75 \pm 5 \text{ \AA}$ et que le rapport molaire soit identique quelles que soient les parties du gel sondées semble indiquer que le mode d'association entre le cation et les unités galacturonates soit toujours le même.

Même si les gels sont hétérogènes, notre protocole de gélification est robuste ce qui nous rend capables de sélectionner une partie de gel pour une rigidité ou une quantité de fer voulue. La quantité importante d'ions Fe^{2+} dans les hydrogels, qui varie entre 4 et 0,5 mg, leur confère

une application probable en tant qu'alternative aux traitements actuels contre l'anémie car il est recommandé de consommer entre 1 et 2 mg de fer par jour. Cependant, des tests *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires pour vérifier que les ions Fe^{2+} sont libérés au niveau de leurs sites d'absorption dans les conditions physiologiques.

Chapitre 4

Etude de l'environnement local autour des ions Fe^{2+} au sein des gels

Introduction

Le chapitre précédent décrivait la mise en place d'un protocole de gélification robuste pour la formulation de gels protégeant les cations Fe^{2+} contre l'oxydation, ayant une structure contrôlée et des propriétés mécaniques pouvant être modulées par le choix de la concentration initiale de polyGalA. Ce chapitre 4 vient compléter le chapitre précédent car il présente la stratégie que nous avons établie pour caractériser l'environnement local des ions Fe^{2+} au sein des hydrogels, et ce afin d'accéder aux mécanismes locaux d'association entre ce cation et les unités GalA. La force de cette partie de ma thèse réside dans le fait qu'elle combine à la fois les résultats obtenus lors de mesures de spectroscopie d'absorption de rayons X (XAS) qui permettent de caractériser la géométrie de systèmes désordonnés et les résultats issus de simulations de dynamique moléculaire (MD). Cette synergie permet de tester différents modèles d'associations possibles par les simulations et de valider le meilleur des modèles en le confrontant aux données expérimentales.

4.1 Théorie de l'EXAFS

La détermination de l'environnement local du fer au sein des gels formulés en suivant le protocole décrit dans la section 3.3 a été possible via l'utilisation de la spectroscopie XAS. Cette technique est basée sur l'effet photoélectrique et consiste à exciter les électrons de niveaux de cœur d'un atome donné (appelé photoabsorbeur) par l'absorption d'un photon possédant une énergie $h\nu$, ce qui induit l'éjection d'un photoélectron (Annexe E). Elle permet de caractériser l'ordre local dans un système, quel que soit son état chimique, et ainsi de déterminer les distances entre le photoabsorbeur et les atomes voisins dont on pourra déterminer la nature et le nombre.[50]

Un spectre XAS est divisé de façon conventionnelle en deux parties en fonction de l'énergie du photon incident (Figure 4.1). Lorsque l'énergie du photon est supérieure à l'énergie du seuil d'absorption (E_0 sur la Figure 4.1), le photoélectron émis par l'excitation des niveaux de cœur a une énergie cinétique faible et un libre parcours moyen important. Le signal XAS correspond alors à des phénomènes de diffusion multiples (comme schématisé dans la partie en gris foncé de la Figure 4.1) avec les atomes environnants. Cette partie du spectre est appelée spectre XANES

(X-ray Absorption Near Edge Structure) et s'étend de quelque eV avant E_0 jusqu'à 50 eV au delà de E_0 et donne des informations sur la structure électronique (cf détermination de l'état d'oxydation d'un élément dans le chapitre 3) du photoabsorbeur et sur son ordre local.

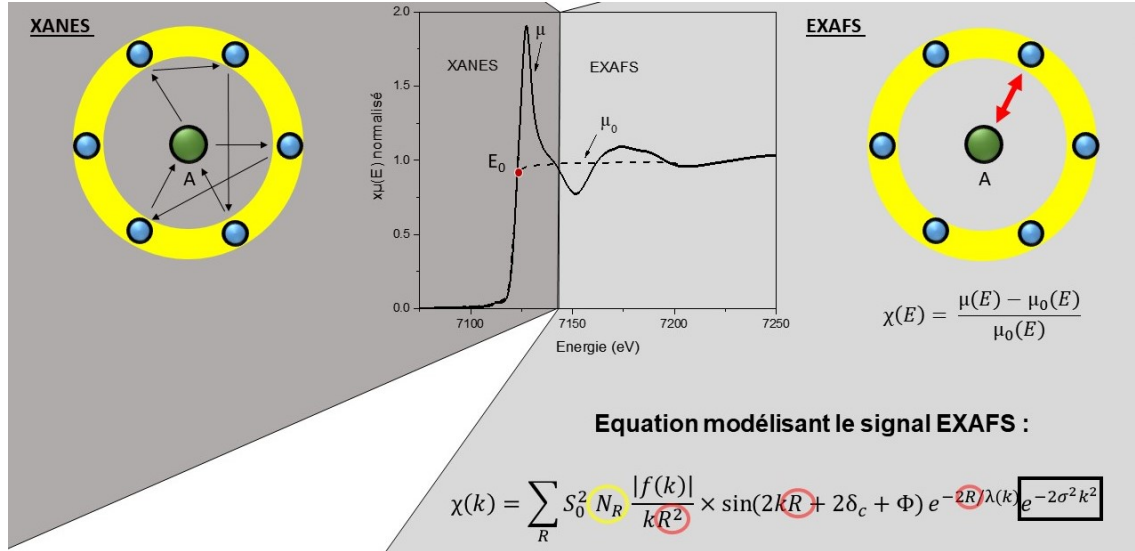


FIGURE 4.1 – Représentation schématique d'un spectre d'absorption X (Seuil K du fer) et des processus qui ont lieu dans les parties XANES et EXAFS.

Au delà de 50 eV, on s'intéresse à la partie EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure). Dans cette région, le photoélectron possède une énergie cinétique forte et un libre parcours moyen faible, ce qui signifie que le photoélectron est sujet à une diffusion simple avec les atomes voisins (comme schématisé sur la partie en gris clair de la Figure 4.1). Le signal EXAFS $\chi(k)$ (où k est le vecteur d'onde du photoélectron) est défini dans la théorie comme la différence entre le coefficient d'absorption μ et le coefficient d'absorption de l'atome central dans l'hypothèse où il n'y a pas de phénomène de rétrodiffusion par ses voisins μ_0 , autrement dit d'un atome isolé, le tout normalisé par le même μ_0 4.1.

Le signal EXAFS peut s'exprimer en fonction du vecteur d'onde k du photoélectron comme une somme de fonctions sinusoïdales, correspondant chacune à un chemin de rétrodiffusion (comme noté dans la Figure 4.1) et il peut être modélisé afin de déterminer la nature et le nombre des atomes voisins du photo-absorbeur (N_R mis en évidence par la couleur jaune sur la Figure 4.1) et les distances qui les séparent (R mis en évidence par la couleur rouge sur la Figure 4.1). Il donne également des informations du désordre local ($e^{-2\sigma^2 k^2}$: Facteur de Debye Waller souligné par le cadre noir de la Figure 4.1).

k est défini par l'équation :

$$k = \sqrt{\frac{2m_e}{\hbar^2} (E - E_0)} \quad (4.1)$$

où m_e est la masse du photoélectron, $\hbar$ est la constante de Plank et E_0 est l'énergie du seuil d'absorption.

L'équation de la modélisation du signal EXAFS présentée dans la Figure 4.1 correspond à la combinaison de paramètres calculés théoriquement *ab initio* et de paramètres issus de la modélisation que nous effectuons sur nos données expérimentales. La modélisation nous permet d'extraire les paramètres R , N_R et $e^{-2\sigma^2 k^2}$ cités ci-dessus. Les paramètres calculés théoriquement sont $f(k)$ l'amplitude de la rétro-diffusion, $2\delta_c$ le déphasage introduit par le potentiel de l'atome central, $\lambda(k)$ le libre parcours moyen du photoélectron, ϕ la phase de la rétrodiffusion et S_0^2 le facteur de réduction d'amplitude (dû à des effets multiélectroniques).

4.1.1 Détermination de l'environnement local du fer au sein d'un même gel

Les mesures de spectroscopie d'absorption des rayons X nous ont permis dans un premier temps de comparer les spectres XAS bruts correspondant au Fe^{2+} dans l'eau et au Fe^{2+} au sein des gels. La Figure 4.2 présente cette comparaison.

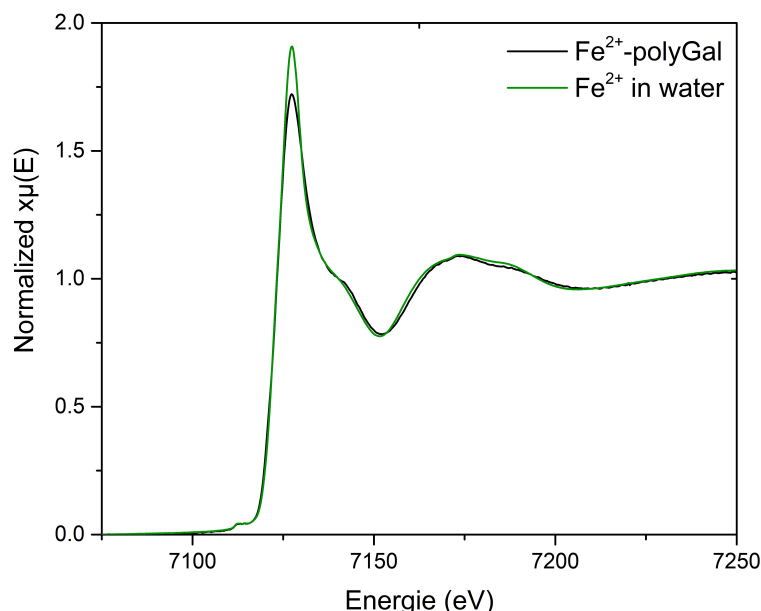


FIGURE 4.2 – Seuils K des cations Fe^{2+} dans de l'eau et dans les gels Fe^{2+} -polyGalA

Nous remarquons que les signaux XAS des ions Fe^{2+} dans les deux environnements comparés sont très similaires. Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, les seuils d'absorption sont identiques du fait de l'état d'oxydation du fer qui est le même dans l'eau et dans les hydrogels formulés. Au delà des seuils d'absorption, nous remarquons que les signaux sont quasiment superposables à l'exception du premier pic du spectre (appelé raie blanche), qui a une amplitude un peu plus faible dans le cas du gel, ainsi que la présence d'un plateau plus prononcé à 7140 eV, avec un léger déplacement du spectre entre 7140 eV et 7165 eV. Une petite différence entre les deux signaux est observée également entre 7180 eV et 7215 eV. A partir de cette observation, nous supposons que les cations Fe^{2+} conservent leur géométrie octaédrale au sein des gels. Cependant, puisque nous avons montré dans le chapitre 3 que le R était égal à 0,25 dans l'ensemble du gel, il est exclu que le fer ne s'associe pas aux fonctions carboxylates et doit donc perdre au moins deux de ses molécules d'eau pour lier deux chaînes entre elles (mode d'association monodentate). De plus, comme dans le gel le fer est protégé contre l'oxy-

dition, il y a de grandes chances pour que ce soit l'association du cation avec les groupements carboxylates qui permettent le maintien de son état d'oxydation.

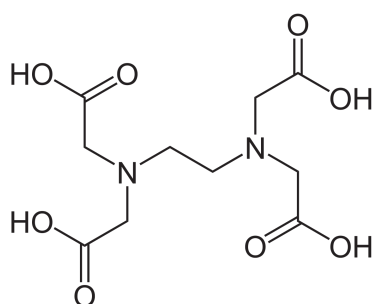


FIGURE 4.3 – Formule chimique de la molécule d'EDTA

Nous nous sommes donc intéressés aux petites différences observées entre les spectres et avons cherché à prouver que ces différences viennent bel et bien de l'association des cations Fe^{2+} avec les fonctions carboxylates des unités GalA. Pour ce faire, nous avons effectué une expérience permettant de mettre en évidence cette hypothèse et d'explorer les limites de la technique. Nous avons ainsi mélangé des molécules d'EDTA¹ et les ions ferreux à différents rapports de concentration. Nous avons choisi l'EDTA car c'est une molécule qui possède des fonctions carboxylates et qui est très connue pour ses propriétés chélatantes (Figure 4.3).

L'idée est de dire que si nous ajoutons de l'EDTA en excès dans une solution de FeCl_2 , nous permettons la complexation d'un maximum de cations et augmentons le signal Fe^{2+} -carboxylates au détriment du signal Fe^{2+} -eau (Figure 4.4).

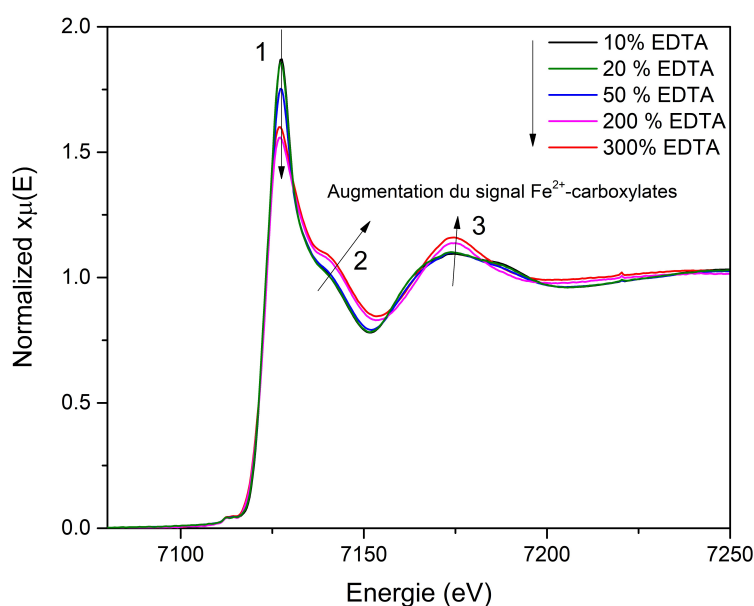


FIGURE 4.4 – Seuil K du fer de différents rapports molaires $[\text{EDTA}]/[\text{Fe}^{2+}]$ (exprimés en %)

Nous remarquons : (i) que l'intensité de la raie blanche diminue quand la quantité d'EDTA augmente (flèche 1), (ii) puis nous voyons que le premier épaulement à 7140 eV voit son intensité augmenter et son signal se déplace à plus haute énergie (comme le montre la position du minimum à 7150 eV) (flèche 2), et enfin (iii) nous remarquons que l'intensité du second épaulement à 7173 eV augmente (flèche 3). Ce sont les mêmes différences qui étaient observées entre le signal correspondant aux ions ferreux dans l'eau et celui correspondant aux ions ferreux dans le gel (Figure 4.2). Nous avons donc un argument fort pour affirmer que les cations Fe^{2+} sont bel et bien associés aux fonctions carboxylates même si les distances entre le fer et ses premiers voisins ne sont pas fortement modifiées. Il est à noter que cette expérience est uniquement

1. Ethylènediaminetétraacétique

qualitative et ne nous a donc pas permis de quantifier le nombre d'ions Fe^{2+} liés aux fonctions carboxylates via l'analyse des spectres.

La compréhension du mode d'association des ions Fe^{2+} aux unités GalA nécessite donc la modélisation du signal EXAFS afin de déterminer les distances fer-oxygène (Fe-O) de la première sphère de coordination dans l'eau et au sein des gels.

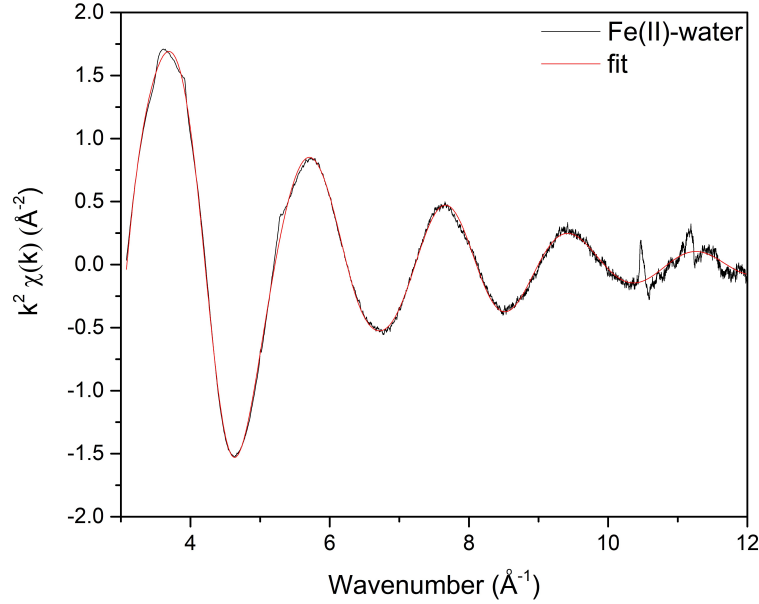


FIGURE 4.5 – Spectre EXAFS des cations Fe^{2+} dans l'eau. Le spectre noir correspond aux données expérimentales et le spectre rouge au spectre calculé théoriquement.

La Figure 4.5 présente le spectre EXAFS de la solution de Fe^{2+} dans l'eau (courbe noire). et le spectre EXAFS théorique calculé (courbe rouge). On applique un facteur k^2 au signal EXAFS $\chi(k)$ afin de mieux visualiser les oscillations car la fonction $\chi(k)$ décroît rapidement en fonction de k .

Les paramètres de cette modélisation sont présentés dans le tableau 4.1 et comparés avec la littérature [51].

Paramètres	$R(\text{\AA})$	$\sigma^2 (\text{\AA}^2)$	β
Fe^{2+} -O issus des expériences	2,11(2)	0,007(1)	0,1(2)
Fe^{2+} -O d'après [51]	2,12(1)	0,008(1)	0,3(2)

TABLE 4.1 – Paramètres calculés via la modélisation du signal EXAFS obtenu sur le Fe^{2+} dans l'eau et comparaison des données obtenues par D'Angelo *el al.*[51]. R correspond à la distance Fe-O, σ^2 est le facteur de Debye et β est un paramètre de symétrie. Le chiffre entre parenthèses donne l'écart-type sur le dernier chiffre.

Ces résultats sont parfaitement en accord avec les données issues de la littérature dans la limite des erreurs de la modélisation. Nous avons procédé à la même analyse afin de déterminer les distances Fe^{2+} -O de la première sphère de coordination des ions ferreux dans les hydrogels (Figure 4.6). Les résultats de la modélisation nous donnent les paramètres présentés dans le tableau 4.2.

	R(Å)	σ^2 (Å ²)	β
Fe ²⁺ -O dans les hydrogels	2,09(1)	0,0092(4)	0,0(1)

TABLE 4.2 – Paramètres calculés via la modélisation du signal EXAFS obtenu sur le Fe²⁺ dans les hydrogels. R correspond à la distance Fe-O, σ^2 est le facteur de Debye et β est un paramètre de symétrie. Le chiffre entre parenthèses donne l'écart-type sur le dernier chiffre.

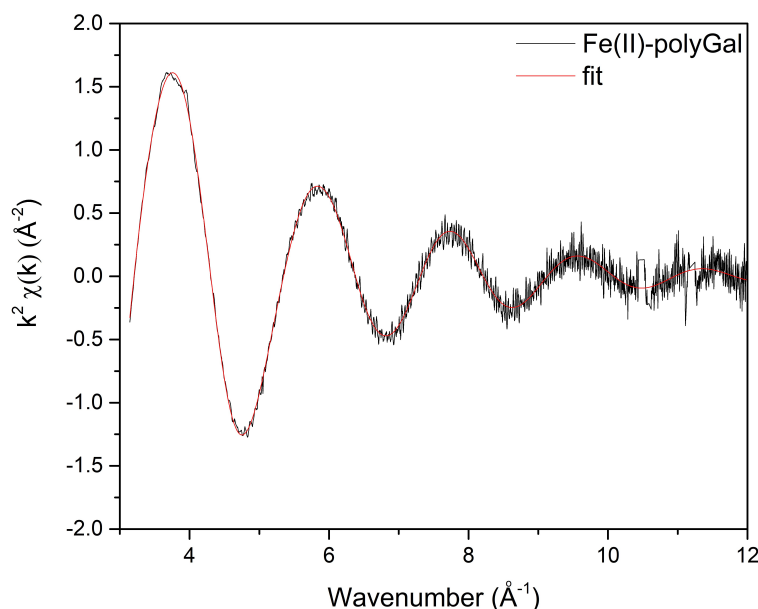


FIGURE 4.6 – Spectre EXAFS des cations Fe²⁺ dans les hydrogels. Le spectre noir correspond aux données expérimentales et le spectre rouge au spectre théorique calculé

Nous constatons que les distances Fe-O dans les hydrogels sont similaires à celles du fer dans l'eau dans la limite des erreurs de la modélisation. Cependant, nous remarquons que le facteur de Debye Waller (σ^2) est légèrement plus élevé pour le fer dans le gel. Cette différence pourrait signifier que l'association des ions Fe²⁺ avec les unités GalA perturbe partiellement la géométrie de l'octaèdre, ce qui augmenterait légèrement le désordre structural. Il est probable que le fer dans l'eau et le fer dans le gel aient une distribution de distances Fe-O similaires mais que, dans le gel, le fer est à la fois lié à des oxygènes de sa couche d'hydratation et à des oxygènes provenant des groupement chimiques du polyGalA (comme les groupements carboxylates ou hydroxyles dans notre cas).

L'EXAFS est une technique très sensible aux distances séparant le photoabsorbeur de ses atomes voisins. Cependant à elle seule elle ne nous permet pas d'avoir des informations plus précises sur la géométrie de l'association Fe²⁺. Nous avons donc couplé nos mesures expérimentales à des simulations MD qui nous ont permis de simuler des signaux EXAFS correspondants à différents modes d'association.

4.2 Simulations de dynamique moléculaire

Une simulation de dynamique moléculaire consiste à simuler, par des calculs informatiques basés sur les principes fondamentaux de la dynamique, l'évolution d'un système de particules au

cours du temps. La première étape de ces simulations consiste à construire un environnement, i.e. une boîte, dans lequel il faut ajouter les molécules que l'on veut étudier. Dans notre cas, nous avons mis ensemble des chaînes de polyGalA, des atomes de fer (II) et des molécules d'eau pour prendre en compte les couches d'hydratation de l'ensemble des atomes présents dans la boîte (Figure 4.7). Chaque liaison entre atomes d'une même molécule, chaque angle (par exemple pour l'eau : l'angle H-O-H) ou encore chaque distance intramoléculaire est contrôlée par des paramètres d'énergie assimilés à des ressorts et sont définis par des lois de mouvements de Newton [52]. Il faut dans le même temps trouver le bon équilibre entre un nombre suffisant d'atomes permettant d'avoir une simulation réaliste et un nombre d'atomes permettant un temps de calcul raisonnable et l'occurrence des associations étudiées.

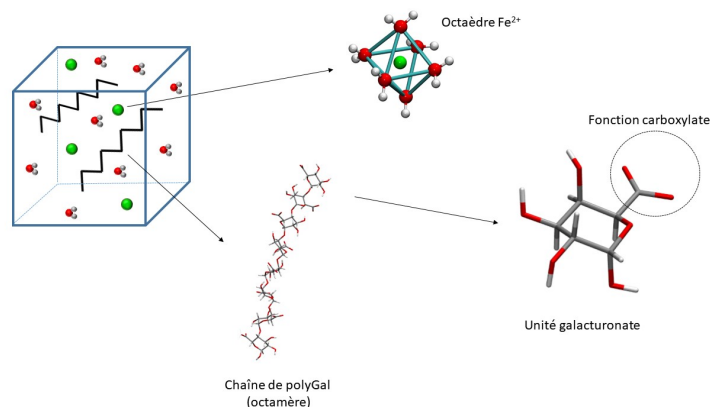


FIGURE 4.7 – Principe simplifié de la mise en place des simulations de dynamique moléculaire pour le polyGalA en présence de Fe^{2+}

Lorsque tous les éléments que l'on souhaite étudier sont dans la boîte avec les bons paramètres géométriques (lorsqu'il s'agit de molécules connues comme nos chaînes de polygalacturonate), il est nécessaire de définir un champ de force pour chaque type de molécule. Un champ de force définit les énergies potentielles d'interactions entre les atomes pris en compte pour la simulation. Dans nos simulations, nous avons fixé les champs de forces des chaînes de polyGalA et des molécules d'eau suivant ce qui a été défini dans l'étude de Huynh *et al.*[3]. Il a ensuite fallu définir un champ de force adapté pour les cations Fe^{2+} en nous basant sur ce qui avait été proposé pour les cations Fe^{2+} dans l'eau. D'après la revue de Li et Merz de 2017 [53] présentant les champs de force qui existent pour simuler les ions métalliques dans l'eau, nous avons choisi de tester les champs de force :

- 12-6 de Babu et Lim [54] qui a décrit les interactions de van der Waals par un potentiel de Lennard-Jones non-lié.
- 12-6-4 de Li *et al.* [55] qui a décrit les interactions de van der Waals par un potentiel 12-6-4
- Curtiss de Curtiss et al. [56] qui est un potentiel empirique.
- Dummy de Duarte *et al.*[57] et Dummy Jiang de Jiang *et al.*[58] qui utilisent des atomes fictifs que l'on appelle "dummy atoms" auxquels on répartit des charges de telle sorte que la charge de l'ion métallique soit celle voulue (+2 dans notre cas).
- Curtiss/12-6 et Curtiss/12-6-4 qui sont une combinaison des champs de force du même nom que nous avons faite et qui décomposent un potentiel pour l'interaction Fe^{2+} -eau et un potentiel pour l'interaction Fe^{2+} -unités GalA.

4.3 Combinaison de l'EXAFS et des simulations MD : Mode d'association des cations Fe^{2+} avec les groupes carboxylates du polyGalA

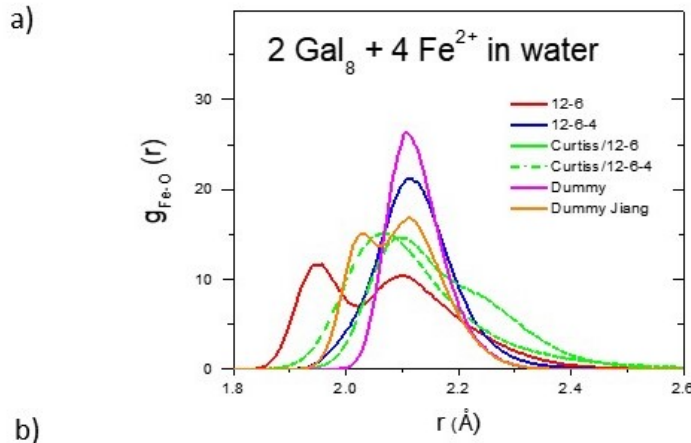
4.3.1 Simulations MD utilisant des champs de force existants

Les premières simulations MD, que nous avons réalisées pour simuler l'environnement local des ions Fe^{2+} dans les gels, ont consisté à utiliser des champs de force qui ont été proposés dans la littérature pour simuler la géométrie des ions Fe^{2+} dans l'eau.

La Figure 4.8 présente les fonctions de distributions radiales $g(r)$ obtenues à partir des champs de forces testés. La fonction de distribution radiale présentée ici correspond à la variation de densité en oxygènes en fonction de la distance Fe-O calculée pendant les simulations et le maximum du pic correspond donc à la distance Fe-O la plus probable. Lorsque l'on compare les $g(r)$ entre elles, nous remarquons que certaines $g(r)$ sont bimodales (12-6, Dummy-Jiang et Curtiss/12-6) alors que d'autres sont monomodales (12-6-4, Dummy et Curtiss/12-6-4). La bimodalité des $g(r)$ s'explique par la contribution de différents types d'oxygènes pouvant intervenir dans l'association du cation et des unités GalA, i.e. des oxygènes provenant de différentes fonctions chimiques du polyGalA ou de molécules d'eau. Nous avons donc procédé à la décomposition des $g(r)$ pour calculer les spectres EXAFS théoriques afin de prendre en compte la contribution respective des oxygènes provenant des carboxylates (O-carb), des oxygènes provenant des hydroxyles (O-nocarb) et des oxygènes provenant des molécules d'eau (O-water) (Figure 4.9)

Le Tableau de la Figure 4.8 présente les distances Fe-O ($d_{\text{Fe-O}}$ est déterminée à partir du maximum du pic de la $g(r)$, $\bar{d}_{\text{Fe-O}}$ est la valeur moyenne calculée à partir du premier pic de la $g(r)$), le nombre de coordination N_R et le paramètre d'ordre $\bar{q}_{\text{oct}}$ qui caractérise la géométrie du fer (plus la valeur est proche de 1, plus la géométrie du fer est proche d'un octaèdre régulier), et ce pour les différents champs de force testés. Dans ce tableau, nous avons également rappelé la distance Fe-O déterminée expérimentalement et qui est donc celle attendue, le nombre de coordination et la valeur $\bar{q}_{\text{oct}}$ attendus.

Lorsque l'on prend en considération à la fois les parties a) et b) de la Figure 4.8, il est clair que le choix du champ de force a une influence considérable sur la coordination des ions Fe^{2+} . Tout d'abord, il a une influence sur le nombre de coordination en oxygènes. Pour les champs de force 12-6-4, Curtiss/12-6 et Curtiss/12-6-4, le nombre de coordination devient supérieur à 6 (Tableau 4.8). Ce phénomène est dû à la présence d'une molécule d'eau supplémentaire dans la première couche de coordination pour 3 des 4 ions Fe^{2+} complexés. Ces observations suggèrent que ces modèles ne sont probablement pas adaptés pour représenter les interactions entre les ions Fe^{2+} et le polyGalA. De plus, on remarque pour ces champs de force que la valeur $\bar{q}_{\text{oct}}$ est très inférieure à 1, ce qui n'est pas concordant avec les résultats expérimentaux qui suggèrent que le fer conserve sa géométrie octaédrale dans les hydrogels. A la seule lecture des valeurs du tableau, nous pouvons donc déjà conclure que les modèles 12-6-4 et Curtiss/12-6 et Curtiss/12-6-4 ne sont pas adaptés à la modélisation du fer dans le gel. D'après le tableau, les champs de force qui pourraient modéliser l'association des ions Fe^{2+} avec les unités GalA sont donc les champs de force 12-6, Dummy et Dummy-Jiang. Il est à noter que pour le champ de force Dummy les distances Fe-O sont un peu élevées par rapport à celles attendues.



b)

Champs de force	2 chaînes de 8 unités Gal + 4 Fe ²⁺ + 3600 H ₂ O			
Nom	$d_{Fe-O} (\text{\AA})$	$\bar{d}_{Fe-O} (\text{\AA})$	N_R	$\bar{q}_{oct}$
12-6	1,95 / 2,10	$2,09 \pm 0,12$	6,0	0,76
12-6-4	2,12	$2,13 \pm 0,08$	6,7	0,49
Dummy	2,12	$2,13 \pm 0,05$	6,0	0,77
Dummy – Jiang	2,03 / 2,11	$2,10 \pm 0,07$	6,0	0,74
Curtiss/12-6-4	2,10	$2,18 \pm 0,11$	7,0	0,27
Curtiss/12-6	2,07	$2,14 \pm 0,14$	6,8	0,33
	$d_{Fe-O} (\text{\AA})$		N_R	$\bar{q}_{oct}$
Valeurs attendues	$2,09 \pm 0,01$		6,0	~ 1

FIGURE 4.8 – a) Fonctions de distributions radiales $g(r)$ obtenues à partir des différents champs de force testés b) Tableau résumant les résultats des simulations MD issues des différents champs de force testés pour le fer dans le gel. d_{Fe-O} correspond à la distance Fe-O déterminée par le maximum du pic de la $g(r)$, $\bar{d}_{Fe-O}$ correspond à la distance Fe-O correspondant à la valeur moyenne du premier pic de la $g(r)$ (il y a deux distances quand la $g(r)$ est bimodale), N_R est le nombre de coordination en oxygène et $\bar{q}_{oct}$ est un paramètre d'ordre qui est fonction de la géométrie octaédrale du fer (plus la valeur est proche de 1, plus le fer possède une géométrie proche d'un octaèdre régulier)

Grâce à l'équation 4.2, nous avons calculé les spectres EXAFS théoriques à partir des $g(r)$ obtenues par les champs de force 12-6, Dummy et Dummy-Jiang.

$$\chi(k) = \int_0^{\infty} dr 4\pi r^2 g(r) A(k, r) \sin[2kr + \phi(k, r)] \quad (4.2)$$

$A(k, r)$ et $\phi(k, r)$ sont respectivement les fonctions d'amplitude et de déphasage, $g(r)$ est la fonction de distribution radiale (ici Fe-O), ρ est la densité de l'atome diffuseur (ici la densité des atomes d'oxygène).

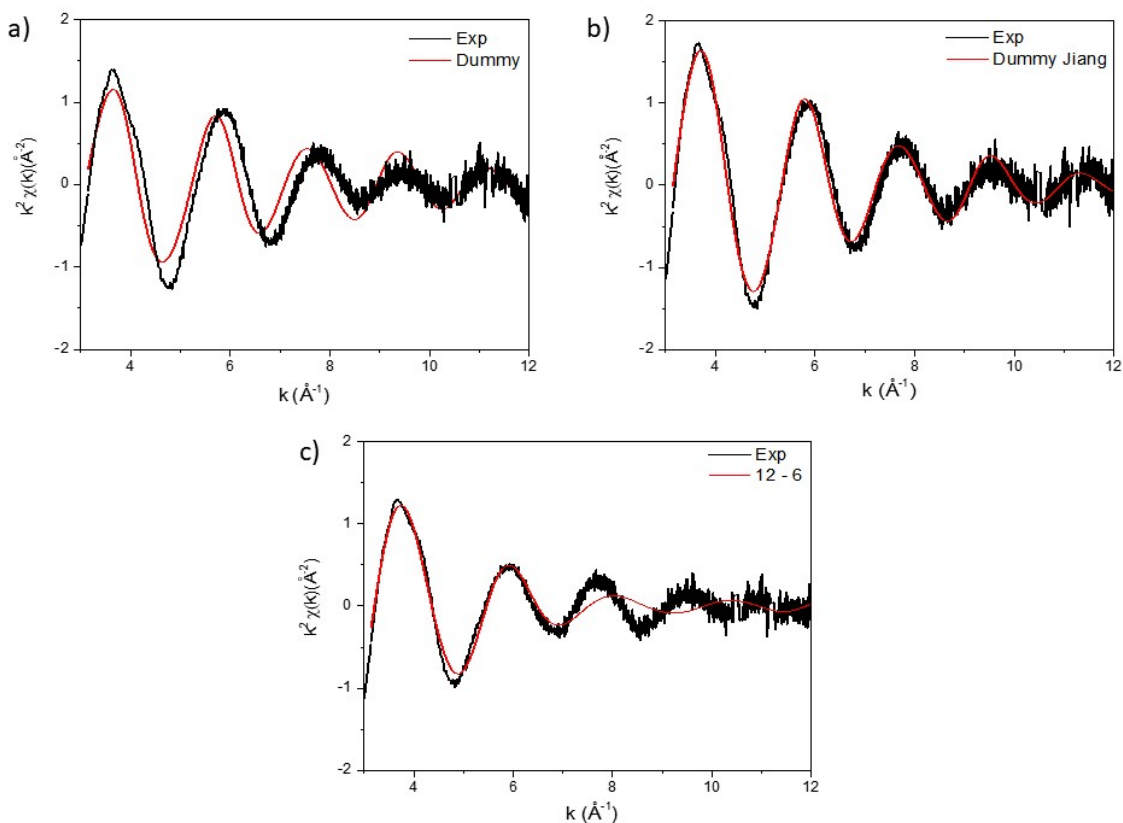


FIGURE 4.9 – Comparaison du spectre EXAFS expérimental du fer dans le gel (courbe noire) avec les spectres EXAFS calculés à partir des simulations (courbe rouge) pour les champs de force a) Dummy, b) Dummy Jiang et c) 12-6.

Les Figures 4.9 a), b) et c) comparent le signal EXAFS expérimental avec les signaux EXAFS calculés pour les champs de forces testés a) Dummy, b) Dummy-Jiang et c) 12-6. Comme nous pouvions nous y attendre d'après les distances Fe-O calculées à partir du champ de force Dummy, le signal calculé à partir de ce modèle n'est pas en accord avec les données expérimentales. En effet, les oscillations des deux signaux ne sont pas en phase et les amplitudes des oscillations sont différentes. Le signal EXAFS calculé à partir du champ de force 12-6 est en phase avec le signal EXAFS expérimental sur les deux premières oscillations puis l'amplitude du signal EXAFS calculé ne suit plus celle du signal expérimental. Dans le cas du signal calculé à partir du champ de force Dummy-Jiang, les amplitudes des signaux calculés et expérimentaux sont semblables mais sont légèrement déphasés.

Le champ de force Dummy Jiang permet de calculer le signal EXAFS le plus proche du signal expérimental. Lorsque l'on regarde la conformation finale de deux chaînes réticulées par 4 ions Fe^{2+} pour ce champ de force et que nous la comparons avec celle décrite dans la Figure 1.14 pour les ions Zn^{2+} , nous remarquons que les ions Fe^{2+} s'associent majoritairement en suivant le modèle "egg-box" (Figure 4.10).

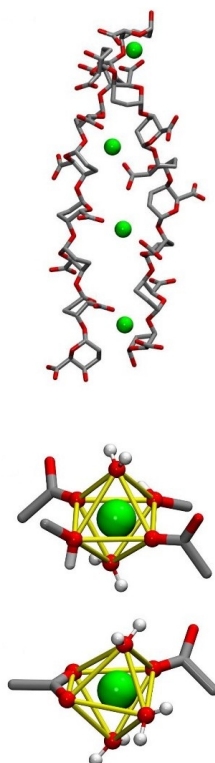


FIGURE 4.10 – Capture d'écran de la simulation effectuée à partir du champ de force Dummy Jiang présentant l'association de 4 ions Fe^{2+} avec deux chaînes de polyGalA et deux "zooms" sur les associations locales qui en sont issues.

4.3.2 Simulations MD modélisant les différents modes d'association probables

Ces premières simulations ont montrées que l'utilisation des champs de force 12-6 et Dummy-Jiang pourrait être envisagée pour modéliser l'association Fe-GalA. Cependant les comparaisons des signaux calculés avec le signal expérimental n'étant pas totalement satisfaisante, nous avons opté pour une autre stratégie en nous basant sur les mesures EXAFS qui nous ont permis de déterminer les distances Fe-O dans les gels formulés ($2,09 \pm 0,02 \text{ \AA}$). Nous avons choisi de contraindre la géométrie du fer dans les simulations pour retrouver ces distances, ce qui a consisté à augmenter les paramètres de rigidité des liaisons Fe-O et des angles O-Fe-O afin de tester différents types d'associations probables car nous ne savons pas comment les ions Fe^{2+} interagissent avec les unités GalA.

Pour simuler ces modes d'associations, nous avons le choix d'utiliser le champ de force 12-6 ou le champ de force Dummy-Jiang. Nous avons calculé les signaux EXAFS correspondant au fer dans l'eau pour ces deux champs de force (Annexe E) et les avons comparés au signal EXAFS expérimental. Contrairement à ce que nous avons observé pour le fer dans le gel, le champ de force 12-6 présente le meilleur accord avec les données expérimentales. Nous avons donc choisi de nous baser sur ce champ de force pour modéliser les différents modes d'association probables car les ions Fe^{2+} pourraient garder un certain nombre de molécules d'eau dans certains des modèles d'association testés.

Comme précisé précédemment, les spectres XAS de la solution de Fe^{2+} et des ions Fe^{2+} dans le gel étant très proches, nous supposons que la géométrie du fer ne change pas, ou seulement légèrement, lorsqu'il interagit avec les unités GalA. Nous pouvons proposer 6 modes d'association qui respectent à la fois la géométrie du fer et son nombre de coordination en oxygène (Figure 4.11) :

- Le mode d'association "egg-box" c'est à dire que le cation divalent substitue 4 oxygènes provenant de ses molécules d'eau par 2 oxygènes provenant de carboxylates et 2 oxygènes d'hydroxyles provenant de deux chaînes.
- L'association bidentate, i.e. le mode d'association décrit pour caractériser l'interaction des ions calcium avec les unités GalA, correspondant à l'association des ions Fe^{2+} avec 4 oxygènes provenant de deux fonctions carboxylates de deux chaînes différentes.
- Le mode d'association monodentate 180° qui correspond à l'association avec deux oxygènes d'une fonction carboxylate provenant de 2 chaînes avec un angle O-Fe-O de 180° .
- Le mode d'association monodentate 90° qui est similaire au mode d'association monodentate 180° , mais avec un angle O-Fe-O de 90° .
- Le mode d'association monocomplexation correspond au cation Fe^{2+} qui s'associe de façon monodentate à une seule chaîne de polyGalA et qui conserve donc 5 molécules d'eau. Ce mode d'association a été décrit comme la première étape de liaison des ions calcium et des polyosides anioniques tels que l'alginate et les pectines comme présenté dans le chapitre 1.
- Le mode SSIP également décrit dans le chapitre 1 comme un mode d'association où le fer totalement hydraté (6 molécules d'eau) entre en contact avec la couche d'hydratation d'au moins un groupement carboxylate sans qu'il n'y ait substitution d'une molécule d'eau.

Les fonctions de distributions radiales $g(r)$ de chaque mode d'association sont également représentées sur la Figure 4.11. La décomposition des $g(r)$ en 3 populations d'oxygènes présente respectivement la contribution des oxygènes provenant des carboxylates (O-carb, courbes rouges), des hydroxyles (O-noncarb, courbes bleues) et des molécules d'eau (O-water magenta). La forme des pics dépend donc de la contribution de chaque type d'oxygène dans la liaison du fer avec les unités GalA, ce qui veut dire que puisqu'ils ne sont pas tous identiques, la géométrie du fer n'est pas maintenue comme un octaèdre régulier. La comparaison entre les spectres EXAFS issus des simulations et ceux issus des expériences est présentée dans la dernière partie de la Figure 4.11 (pour tous les modes d'association testés). Il apparaît donc que l'on peut d'ores et déjà exclure la coordination bidentate des modes d'association probables des ions Fe^{2+} avec les unités GalA. Ce résultat est tout à fait en accord avec une étude précédente que nous avons présenté dans le chapitre 1 [3] et qui a montré que le mode d'association (bidentate ou monodentate) avec les carboxylates des unités GalA dépend de l'affinité du cation divalent pour sa première couche d'hydratation. Les auteurs ont montré que les ions Ba^{2+} et Ca^{2+} avaient préférentiellement une association bidentate alors que l'association monodentate était favorisée pour les ions Zn^{2+} et Mg^{2+} .

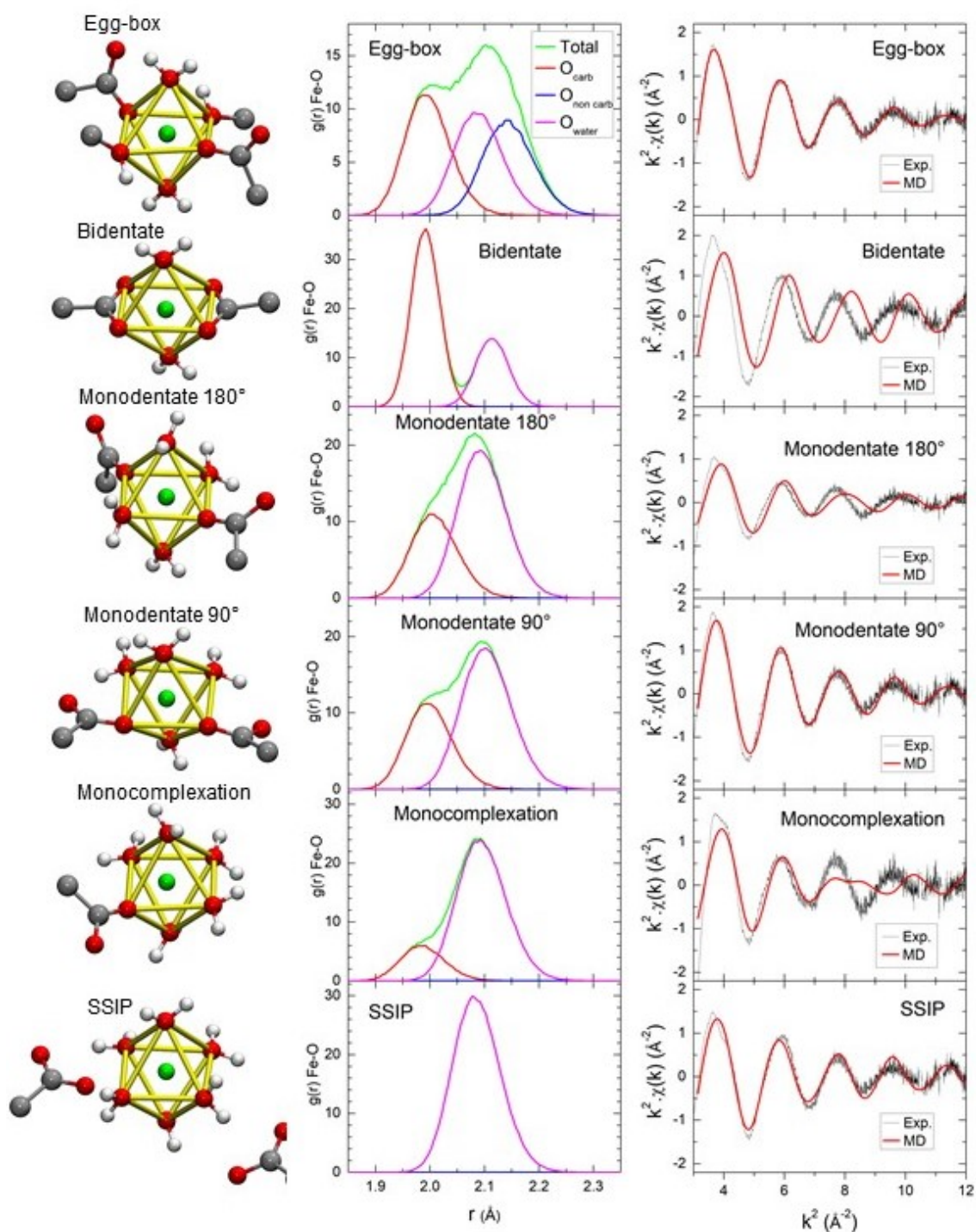


FIGURE 4.11 – Présentation des différents modes d'association probables pour l'association des ions Fe^{2+} avec les unités GalA imposés en contraignant la géométrie des ions Fe^{2+} à partir des résultats expérimentaux. Les contraintes ont été mises en place à partir du champ de force 12-6.

De toute évidence, le mode d'association monocomplexation n'est pas plausible, ce qui est justifié par le fait que cette étape est transitoire et suivie par la formation d'un point de réticulation qui implique deux chaînes. Le mode d'association SSIP n'est également pas probable car il correspond à une association faible entre les ions Fe^{2+} hydratés et les groupements carboxylates des unités GalA et ne peut donc pas être envisagé comme un mode d'association probable. En

effet, nous avons montré dans le chapitre 3 que les ions Fe^{2+} étaient protégés contre l'oxydation au sein des gels même dans des conditions oxydatives, ce qui suggère une association forte.

Il ne reste donc plus que 3 modes d'associations qui soient encore possibles du fait de la coordination monodentate des ions Fe^{2+} : Monodentate 180° , monodentate 90° et "egg-box"². Cependant, le mode d'association monodentate 180° ne permet pas l'obtention d'un signal EXAFS qui est en accord avec le signal expérimental. Le modèle qui présente le meilleur accord entre les signaux EXAFS calculés à partir des simulations et les signaux EXAFS expérimentaux est le mode d'association "egg-box" ($R = 0,57 \cdot 10^{-6}$)³. Cependant, le mode d'association monodentate 90° , qui pourrait correspondre à une étape menant au mode d'association "egg-box", ne peut pas être totalement exclu car il présente un accord tout de même satisfaisant avec les données expérimentales ($R = 0,80 \cdot 10^{-6}$). Les ressemblances entre les ions Fe^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} en terme de nombre de coordination (6 pour tous les trois), de distance avec les oxygènes de leur première couche d'hydratation (environ 2,11 Å pour Fe^{2+} et 2,09 Å pour Mg^{2+} et Zn^{2+}) et d'affinité pour l'eau (énergies libres d'hydratation de -1840 kcal/mol pour Fe^{2+} , -1830 kcal/mol pour Mg^{2+} et -1955 kcal/mol pour Zn^{2+}) suggèrent également que les ions Fe^{2+} s'associent préférentiellement en mode monodentate avec les groupements carboxylates des unités GalA et non en bidentate.

Nous avons choisi d'utiliser le champ de force 12-6 pour modéliser les différents modes d'association probables car il permettait de calculer un signal EXAFS correspondant au fer dans l'eau en accord avec les expériences. Cependant, il semblerait que le mode d'association des ions Fe^{2+} avec les unités GalA corresponde majoritairement au modèle "egg-box". Nous souhaitons donc répéter ces simulations mais cette fois en utilisant le champ de force Dummy-Jiang car il semblerait que les simulations présentées dans la section précédente sans contrainte de géométrie engendraient ce type d'association (Figure 4.10). Les temps de calculs pour réaliser ces simulations étant longs, ils sont encore en cours à l'heure où je termine ce manuscrit et ne sont donc pas présentés ici.

4.3.3 Modification d'un champ de force permettant de modéliser le mode d'association Fe^{2+} avec les unités GalA

Nous avons donc réussi à proposer un mode d'association qui est en accord avec les résultats obtenus expérimentalement. Cependant, le modèle "egg-box" a pu être validé à partir de simulations pas complètement réalistes car nous avons appliqué des paramètres de contraintes géométriques sur les ions Fe^{2+} .

2. Pour rappel le mode d'association "egg-box" correspond à un mode d'association monodentate avec les groupements carboxylates et s'associe également avec deux groupements hydroxyles

3. R représente le facteur d'accord entre les spectres expérimentaux et théoriques. Plus la valeur de R est petite plus l'accord entre les simulations et les données expérimentales est bon.

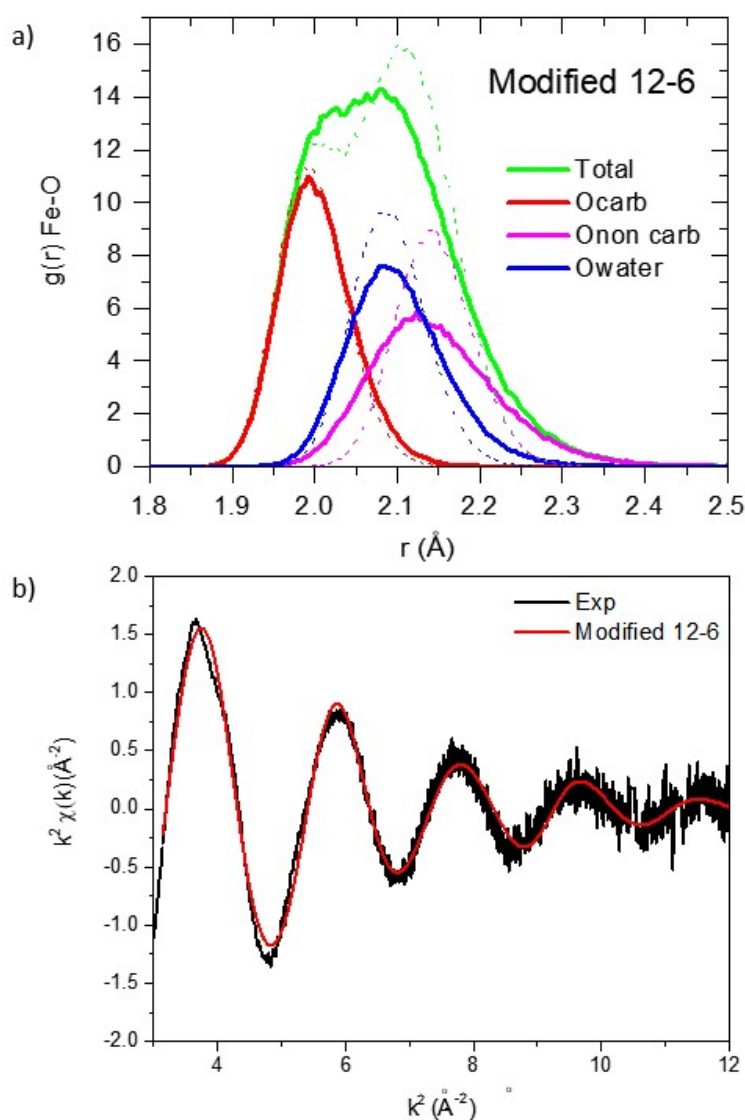


FIGURE 4.12 – a) Décomposition de la $g(r)$ obtenue pour la simulation utilisant le champ de force 12-6 modifié (traits pleins) en comparaison avec la décomposition de la $g(r)$ obtenue pour le modèle "egg-box" contraint (traits pointillés). b) Comparaison des spectres EXAFS simulés avec le champ de force 12-6 modifié (courbe rouge) et expérimental (courbe noire).

Nous avons donc cherché à adapter le champs de force 12-6 qui nous a permis de faire les modélisation présentées dans la section précédente pour arriver à cette coordination du fer que nous avons considérée comme la plus probable. En particulier, si nous comparons les $g(r)$ déterminées avec ce modèle pour le modèle "egg-box" et sans contrainte de géométrie, il apparaît que la distance $\text{Fe}^{2+}\text{-O}$ provenant des carboxylates est sous-estimée (1,95 Å contre 1,99 Å), alors que la distance $\text{Fe}^{2+}\text{-O}$ des hydroxyles est surestimée (2,21 Å contre 2,14 Å). Afin d'améliorer la description des interactions $\text{Fe}^{2+}\text{-polyGalA}$ avec le modèle 12-6, nous avons modifié légèrement les paramètres du rayon des forces de van der Waals pour l'interaction des ions Fe^{2+} avec les oxygènes des carboxylates et des hydroxyles du polyGalA. Ainsi, les $g(r)$ déterminées avec le champ de force 12-6 modifié sont en accord avec ceux déterminés dans le modèle "egg-box" contraint que nous avons validé. Les $g(r)$ correspondantes sont présentées dans la Figure 4.12 a) ainsi que le signal EXAFS calculé comparé au signal EXAFS expérimental (Figure 4.12 b)).

La comparaison des spectres EXAFS issus des simulations et des expériences donne un accord presque parfait ($R = 0,63.10^{-6}$).

Ces résultats montrent d'une part qu'il est possible d'améliorer significativement la description de la géométrie de coordination des ions Fe^{2+} avec le polyGalA, sondée grâce à l'EXAFS, en changeant légèrement les paramètres d'interactions de van der Waals du modèle 12-6. D'autre part, cette démarche a prouvée que le mode d'association egg-box était le plus probable pour décrire le mode d'association des ions Fe^{2+} avec les unités GalA. Nous ne pouvons cependant pas exclure que quelques ions Fe^{2+} puissent s'associer avec les unités GalA en suivant un mode d'association monodentate 90° mais le modèle "egg-box" doit tout de même être le mode d'association majoritaire. Par la suite, s'il s'avérait que les simulations que nous menons actuellement avec le champ de force Dummy Jiang contraint est plus réaliste que le modèle 12-6 contraint pour décrire les associations Fe^{2+} -GalA, nous pourrions également le modifier afin de déterminer s'il permet un accord encore meilleur avec les données expérimentales.

Conclusion

La combinaison des mesures de spectroscopie XAS avec les simulations MD permet d'obtenir des informations précises sur la géométrie de l'association entre les ions Fe^{2+} et les unités GalA. En effet, les résultats expérimentaux nous ont permis de mettre en place des simulations MD réalistes capables de reproduire les spectres EXAFS calculés expérimentalement en définissant un champ de force adapté. Ceci nous a également permis de démontrer que le modèle "egg-box" permet de décrire le mode d'association des ions Fe^{2+} avec les unités GalA. À notre connaissance, c'est la première fois que des mesures expérimentales permettent d'identifier ce modèle qui a été débattu depuis qu'il a été proposé il y a près de 50 ans. Cette conclusion va également dans le sens de ce que nous avons décrit dans le chapitre 2, où nous avons pointé la ressemblance des résultats obtenus concernant les ions Fe^{2+} et Zn^{2+} qui suivent eux aussi le mode d'association "egg-box". [20].

Chapitre 5

Influence de la nature du cation sur la structure des hydrogels

Dans les chapitres précédents, nous avons été en mesure de caractériser la structure des hydrogels Fe^{2+} -polyGalA de l'échelle macroscopique à l'échelle moléculaire en identifiant le modèle "egg-box" comme mode d'association des ions Fe^{2+} avec les unités galacturonates. Une question reste cependant en suspens : "Est-ce le mode d'association du cation avec les unités galacturonates qui est responsable de la structure locale du réseau quelles que soient les conditions de concentrations en polyGalA et en cations testées?". Afin de répondre à cette interrogation, nous avons formulé des hydrogels en utilisant d'une part deux cations dont le mode d'association local est connu et dont on a comparé les comportements en système dilué avec celui des ions Fe^{2+} , i.e. les ions calcium et les ions zinc [20], et d'autre part les ions Fe^{3+} pour étudier si l'état d'oxydation du fer a une influence sur la structure finale des hydrogels.

5.1 Influence de la nature du cation sur le gradient macroscopique des hydrogels de polyGalA

Nous avons utilisé le même protocole de gélification que celui décrit dans le chapitre 3 pour formuler des gels Ca^{2+} -polyGalA, Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{3+} -polyGalA. Nous avons donc utilisé une solution de polyGalA à 20 g/L que nous avons plongée pendant 24 h dans une solution de cations (CaCl_2 , ZnCl_2 ou FeCl_3) à une concentration de 100 mM¹. A l'instar de ce que nous avons obtenu pour les ions Fe^{2+} , le protocole de gélification a engendré des gradients macroscopiques pendant la formation des hydrogels .

5.1.1 Observations macroscopiques

Lorsque l'on s'intéresse simplement à l'aspect macroscopique des différents hydrogels formulés, nous pouvons déjà d'ores et déjà constater des différences. La Figure 5.1 présente des photographies de 4 gels formulés à partir des 4 cations testés. J'ai disposé les images de la

1. Pour rappel, cette concentration en cation correspond à un rapport molaire entre la concentration en cations dans le réservoir et la concentration en unités GalA ~ 1 .

gauche vers la droite du moins turbide au plus turbide et donc du gel le plus homogène macroscopiquement au plus hétérogène macroscopiquement. Le gel Ca-polyGalA apparaît totalement transparent depuis sa partie basale (correspondant à la partie en contact avec la membrane de dialyse pendant la gélification) jusqu'à sa partie apicale. On observe cependant que la partie en contact avec le support semble avoir subi un phénomène de contraction pendant la gélification car elle n'est pas plane. Concernant le gel Zn-polyGalA, on observe un gradient de turbidité de la partie 0 % de l'épaisseur à la partie 100 % de l'épaisseur. Ce gradient est cependant moins important que dans le cas du gel Fe^{2+} -polyGalA. Pour ce gel, on observe également une contraction de la partie en contact avec le support mais de façon moins importante que dans le cas du gel de calcium.

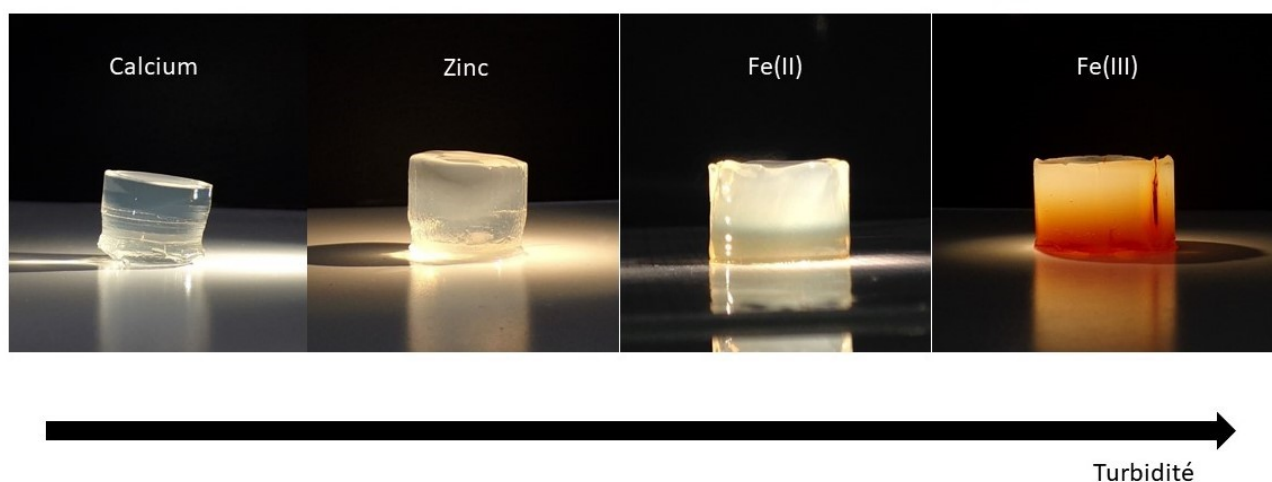


FIGURE 5.1 – Observations macroscopiques faites sur des gels Ca^{2+} - polyGalA, Zn^{2+} - polyGalA, Fe^{2+} - polyGalA et Fe^{3+} - polyGalA. Les gels ont été formulés à partir d'une solution de polyGalA à 20 g/L plongée pendant 24 h dans la solution de cations ayant une concentration de 100 mM. La partie des gels en contact avec le support correspond à celle qui était en contact avec la membrane de dialyse pendant la gélification (0 % - 25 % de l'épaisseur).

La comparaison macroscopique de ces trois gels formulés à partir des cations divalents testés est cohérente avec les résultats que nous avons décrits dans le chapitre 2. En effet, lorsque nous avons comparé les résultats des mesures de viscosité, de turbidité et d'enthalpie d'association en système dilué pour ces trois cations, nous avons conclu que les cations Zn^{2+} et les cations Fe^{2+} présentaient des comportements très similaires, contrairement aux ions Ca^{2+} . Assifaoui *et al.* ont décrit en 2015 les réseaux de pectine LM formés soit par les ions calcium soit par les ions zinc [20]. Ils avaient conclu, d'après leurs mesures macroscopiques et la caractérisation de la structure locale des réseaux formés, que les ions zinc induisaient la formation d'un réseau hétérogène alors que les ions calcium induisaient la formation d'un réseau plutôt homogène. Ces résultats peuvent expliquer pourquoi le gel de calcium apparaît complètement transparent alors que le gel de zinc présente une turbidité plus importante résultant de la présence de fluctuations de densité.

Le gel Fe^{3+} -polyGalA est quant à lui plus turbide que le gel Fe^{2+} -polyGalA. On observe

dans ce gel des gradients de couleur et de turbidité avec la partie en contact avec le support qui est transparente et orange foncé² et la partie la plus éloignée du support qui est très trouble et orange pâle. Ce gel est donc celui qui parait le plus hétérogène macroscopiquement. Il est donc intéressant de comprendre si ces hétérogénéités correspondent à une distribution particulière des chaînes de polyGalA le long des gels, comme nous l'avons observé pour les ions Fe^{2+} .

5.1.2 Distribution des chaînes de polyGalA et des cations au sein des hydrogels

A l'œil nu, nous avons donc remarqué des différences notables entre les différents hydrogels. Qu'en est-il du gradient de concentration en polyGalA et en cations au sein des gels ? Pour répondre à cette question, nous avons eu la même démarche que celle présentée dans la section 3.4.

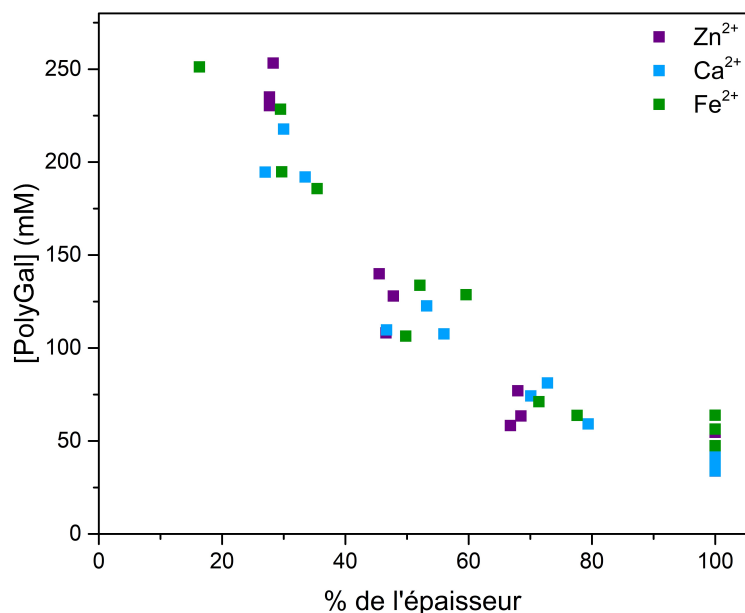


FIGURE 5.2 – Évolution de la concentration en polyGalA en fonction de la position dans les gels (exprimée en % de l'épaisseur totale du gel) de calcium (en bleu), de zinc (en violet) et de fer ferreux (en vert).

La Figure 5.2 présente l'évolution de la concentration en polyGalA le long de gels de Ca^{2+} -polyGalA, Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{2+} -polyGalA. Bien que leur aspect soit macroscopiquement différent, nous remarquons que la concentration de polyGalA évolue de manière identique dans les trois différents types de gels. Nous pouvons donc conclure que le gradient de concentration en polyGalA n'est pas fonction de la nature des cations divalents testés, bien qu'ils aient des modes d'associations locaux différents.[3] Les mécanismes de diffusion des chaînes décrits dans la littérature [32, 37, 38] et dont nous nous sommes servis dans le chapitre 3 pour expliquer la mise en place du réseau de polyGalA en présence des ions Fe^{2+} , semblent donc être identiques pour les cations divalents testés.

2. la couleur est induite par la présence des ions Fe^{3+} .

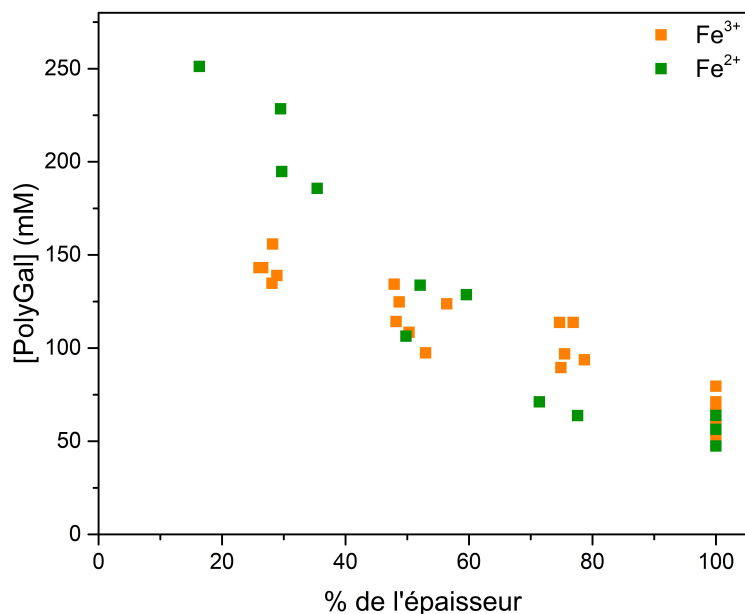


FIGURE 5.3 – Évolution de la concentration en polyGalA en fonction de la position dans les gels (exprimée en % de l'épaisseur totale du gel) de fer ferreux (en vert) et de fer ferrique (en orange).

Lorsque l'on compare les gels obtenus pour les deux états d'oxydation du fer, nous remarquons des évolutions de la distribution des chaînes très différentes (Figure 5.3). Dans le cas des gels Fe^{3+} -polyGalA, nous observons que le gradient de concentration est bien moins important que dans le cas des gels formulés avec les ions Fe^{2+} . Les gels Fe^{3+} -polyGalA, bien qu'il paraissent macroscopiquement plus hétérogènes que les gels Fe^{2+} -polyGalA possèdent un gradient de concentration en chaînes de polyGalA moins important.

Le premier constat que nous pouvons faire ici est que les cations divalents vont engendrer les mêmes phénomènes de diffusion des chaînes de polyGalA pendant le processus de gélification, contrairement à l'ion trivalent testé ici. Sachant que les modes d'associations locaux sont différents en fonction de la nature du cation, nous avons souhaité déterminer si le rapport molaire 0,25 entre la concentration en cations et la concentration en chaînes que nous avons mis en évidence le long des gels Fe^{2+} dans le chapitre 3 était également retrouvé ici. Pour cela, nous avons comparé l'évolution de la concentration molaire en cations³ et l'évolution de la concentration molaire en polyGalA multipliée par ce facteur 0,25 en fonction de la position dans le gel. La Figure 5.4 montre que quel que soit le cation qui a été utilisé pour former les hydrogels, le rapport molaire R est toujours constant quelle que soit la position dans le gel, ce qui veut dire qu'indépendamment du mode d'association, i.e. bidentate pour les ions Ca^{2+} et "egg-box" pour les ions Zn^{2+} et les ions Fe^{2+} , tous les sites de fixation disponibles sont susceptibles d'être occupés par un cation. Dans le cas des ions Fe^{3+} nous ne connaissons pas le mode d'association qui est mis en jeu mais il apparaît que là aussi le rapport molaire entre la concentration en cations et les unités galacturonates est constant et égal à 0,25.

3. La concentration des différents ions dans les tranches de gel a été mesurée par spectroscopie d'émission atomique (ICP-AES) après minéralisation des tranches de gel ($T = 600^\circ\text{C}$) et solubilisation des cendres.

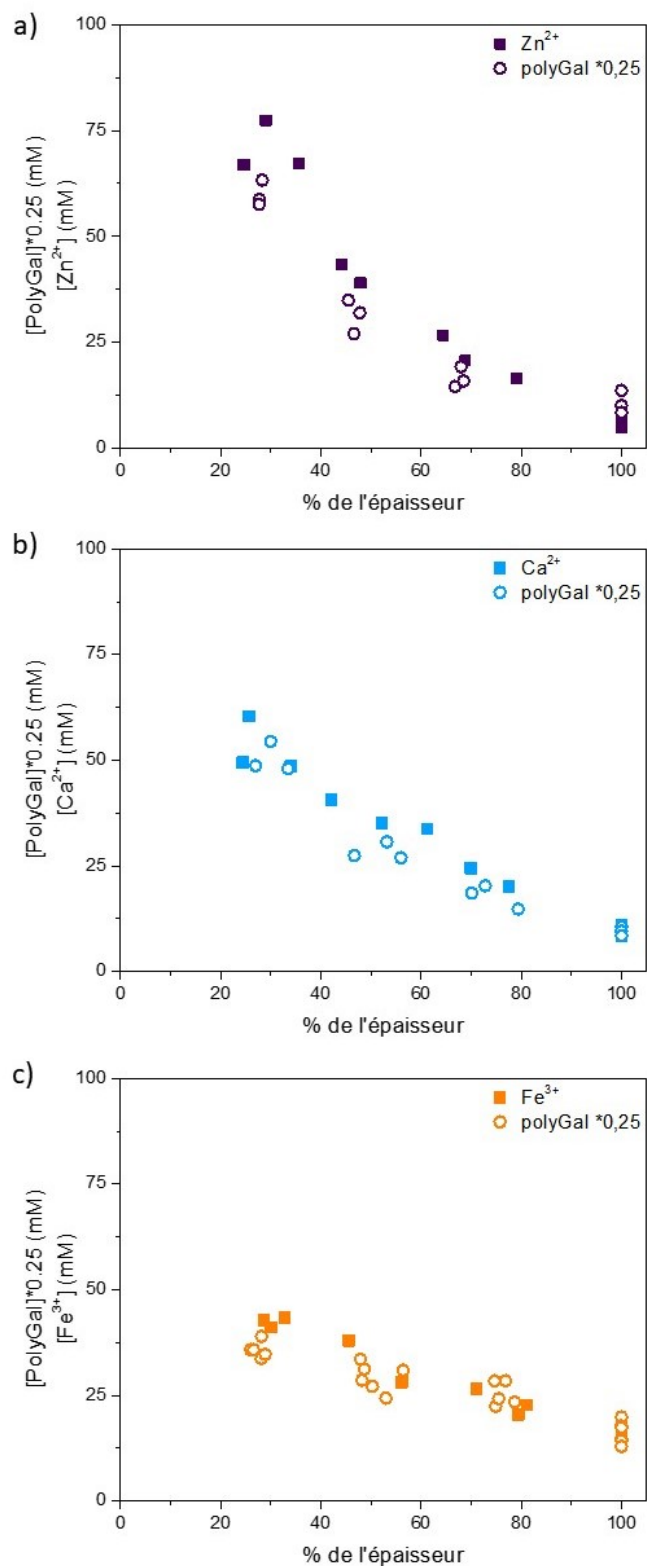


FIGURE 5.4 – Comparaison des évolutions respectives des concentrations en polyGalA multipliée par 0,25 (ronds vides) et des concentrations des différents cations testés (carrés pleins) en fonction de la position dans le gel. a) correspond aux courbes obtenues pour les gels Zn²⁺-polyGalA, b) correspond aux courbes obtenues pour les gels Ca²⁺-polyGalA et c) correspond aux courbes obtenues pour les gels Fe³⁺-polyGalA.

5.2 Caractérisation structurale et mécanique d'hydrogels de polyGalA obtenus avec différents cations

Dans le cas des gels de Fe^{2+} , nous avons montré que le rapport molaire R constant dans les différentes tranches du gel coïncidait avec une structure locale du réseau formé identique dans les différentes parties du gel. Nous pouvons donc émettre la même hypothèse pour les gels Ca^{2+} -polyGalA, Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{3+} -polyGalA. Cependant, les gels Fe^{3+} -polyGalA présentant une distribution des chaînes de polyGalA très différente des 3 autres cations divalents, nous commenterons dans un premier temps les résultats obtenus pour les 3 cations divalents puis dans un second temps les résultats obtenus pour le cation trivalent.

5.2.1 Effet des cations divalents

Structure locale du réseau formé

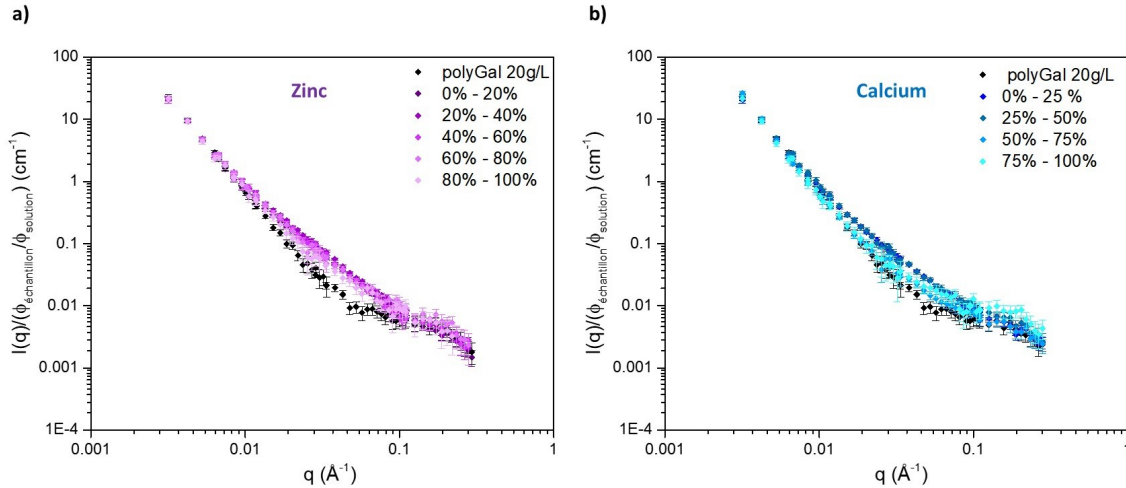


FIGURE 5.5 – Mesures de diffusion de neutrons aux petits angles de différentes tranches de gels obtenus avec les cations calcium et zinc après 24 h de gélification d’une solution de polyGalA à 20 g/L. a) Spectres des différentes tranches d’un gel Zn^{2+} -polyGalA dont les intensités sont normalisées par leur concentration en polyGalA en comparaison avec la solution de polyGalA qui a permis la formation du gel. b) Spectres des différentes tranches d’un gel Ca^{2+} -polyGalA dont les intensités sont normalisées par leur concentration en polyGalA en comparaison avec la solution de polyGalA qui a permis la formation du gel.

La Figure 5.5 a) présente les spectres DNPA de différentes tranches d’un gel Zn^{2+} -polyGalA et de la solution de polyGalA (20 g/L)⁴ dont est issu le gel et dont les intensités ont été normalisées par leur concentration nominale en polyGalA. Nous remarquons que les spectres correspondant aux différentes tranches sont tous identiques et présentent 3 régimes. On retrouve respectivement aux petits et aux grands vecteurs de diffusion les régimes $q^{-2,7}$ et q^{-1} qui sont identiques aux facteurs de forme du polyGalA en solution. À des vecteurs de diffusion intermédiaires, nous observons un épaulement semblable, a priori, à celui observé pour les gels Fe^{2+} -polyGalA que nous avons associé à la formation du réseau de polyGalA.

4. La description du spectre correspondant au polyGalA seul en solution est la même que celle faite dans le chapitre 2.

La Figure 5.5 b) présente les spectres DNPA de différentes tranches d'un gel Ca^{2+} -polyGalA et de la solution de polyGalA (20 g/L) dont est issu le gel et dont les intensités ont été normalisées par leur concentration nominale en polyGalA. Le premier constat que nous pouvons établir est que tous les spectres correspondant aux différentes tranches du gel ne sont pas similaires. Les tranches 0 % - 25 % et 25 % - 50 % présentent des spectres à trois régimes avec les mêmes caractéristiques que celles des spectres des tranches du gel de Zn^{2+} décrits précédemment. Concernant les deux dernières tranches, nous remarquons que les spectres ne présentent plus l'épaule caractéristique de la présence du réseau bien que macroscopiquement ces tranches correspondent bien à des gels. Ils présentent les décroissances caractéristiques du polyGalA seul en solution⁵. Ces gels présentent donc une structure locale moyenne qui semble évoluer lorsque que l'on se déplace vers la partie la moins dense.

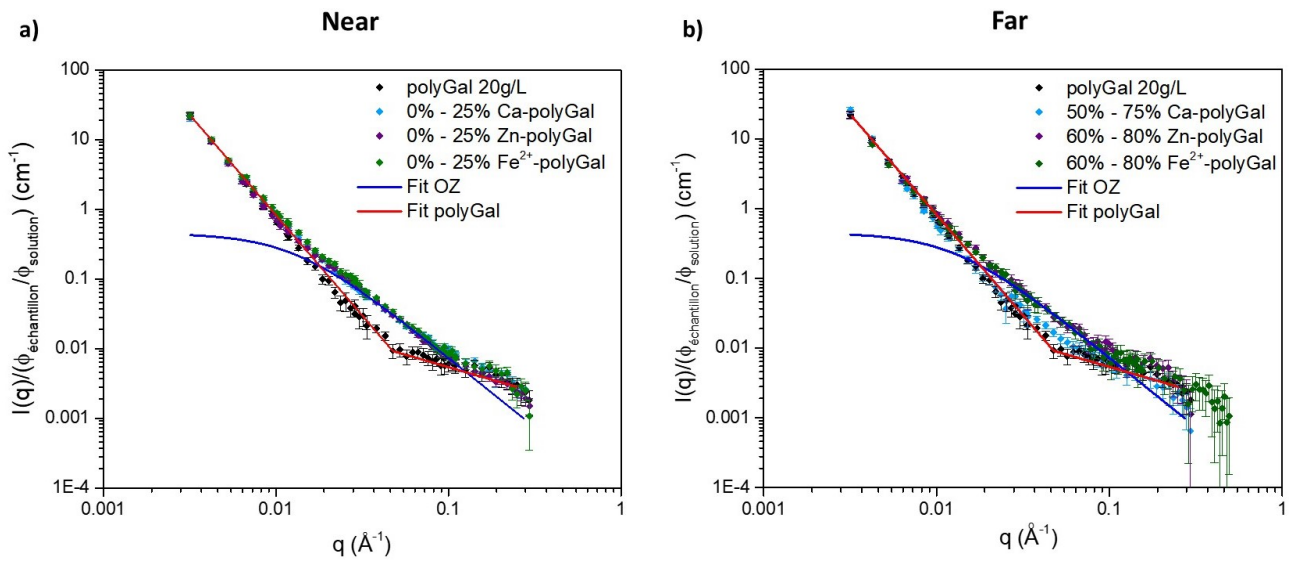


FIGURE 5.6 – a) Spectres DNPA des tranches 0 % - 25 % de gels Ca^{2+} -polyGalA, Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{2+} -polyGalA (appelées near) formulés dans les mêmes conditions dont les intensités sont normalisées par leur concentration en polyGalA en comparaison avec la solution de polyGalA qui a permis la formation du gel. b) Spectres DNPA des tranches les plus éloignées de la membrane de dialyse (appelée far) de gels Ca^{2+} -polyGalA, Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{2+} -polyGalA formulés dans les mêmes conditions dont les intensités sont normalisées par leur concentration en polyGalA en comparaison avec la solution de polyGalA qui a permis la formation du gel. Nous n'avons pas présenté ici les tranches les plus extrêmes mais des tranches suffisamment concentrées pour obtenir une bonne statistique sur l'ensemble de la gamme de q sondée.

Nous avons cherché à caractériser la taille de maille des réseaux obtenus pour les gels Ca^{2+} -polyGalA et Zn^{2+} -polyGalA par rapport à ce que nous avons obtenu pour les gels Fe^{2+} -polyGalA. La Figure 5.6 a) présente la comparaison des spectres DNPA obtenus pour les tranches 0 % - 25 % des gels en question. Nous constatons que l'épaule observable pour la gamme de q intermédiaire est parfaitement identique pour les 3 types de gel, ce qui signifie que la structure locale des réseaux obtenus possèdent la même taille de maille caractéristique de $75 \pm 5 \text{ \AA}$. Lorsque nous comparons de la même façon les tranches correspondant à des parties moins concentrées en polyGalA des différents hydrogels (Figure 5.6 b)), nous remarquons que la

5. On pourrait avoir l'impression que la tranche 50 % - 75 % présente un petit épaulement dans la gamme de q intermédiaire mais nous pensons que la contribution du signal de diffusion caractéristique est simplement très faible car la tranche est peu concentrée en polyGalA.

structure locale des réseaux Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{2+} -polyGalA est identique avec donc une taille de maille caractéristique de $75 \pm 5 \text{ \AA}$. Concernant le calcium, nous remarquons que la structure du réseau est différente.

Les gels Ca^{2+} -polyGalA ont, d'après les mesures présentées au début de ce chapitre, des densités de points de réticulation pour une tranche donnée identiques à celles mesurées pour les gels Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{2+} -polyGalA. Cependant, à la vue des observations macroscopiques et de l'étude menée par Assifaoui *et al.* en 2015 [20], les ions calcium semblent former des réseaux de chaînes de polyGalA plus homogènes. Ce faisant, il est possible que pour une tranche de gel la densité globale de points de réticulation soit identique aux autres cations divalents mais que la répartition de ces points de réticulation soit plus homogène sur l'ensemble d'une tranche. Ainsi, pour les tranches 0 % - 25 %, nous pouvons observer une seule et même structure locale pour les 3 cations car la structure de cette partie de gel est relativement homogène, comme nous l'avons supposé dans le chapitre 3 concernant les ions Fe^{2+} . A l'inverse, pour les tranches les plus éloignées on perd le signal correspondant à la maille du réseau car les points de réticulation étant répartis de façon plus homogène dans la tranche, il est alors possible que la taille de maille soit trop grande pour être mesurée et/ou que son signal soit trop faible par rapport à celui de l'état d'agrégation du polyGalA. La taille de maille pourrait être égale à $230 \text{ \AA}$ si on calcule ξ à partir du module élastique obtenu que nous présenterons plus loin dans ce chapitre en considérant les gels Ca^{2+} comme parfaitement homogènes. Cette hypothèse pourrait être cohérente avec le fait que la quantité de matière sèche dans cette partie du gel est la même pour tous les cations divalents mais que les gels Ca^{2+} apparaissent transparents et ne possèderaient pas les mêmes hétérogénéités mésoscopiques que celles que nous avons décrites pour les gels Fe^{2+} .

Dans le cas des gels de zinc, leur structure locale semble être très similaire à celle des gels Fe^{2+} -polyGalA, ce qui est concordant avec le fait que ces deux cations semblent s'associer avec les unités GalA en suivant le même modèle, i.e. le modèle "egg-box". Cependant, étant donné que macroscopiquement les gels de zinc présentent une turbidité plus faible que dans le cas des gels de fer ferreux, il se peut que les hétérogénéités mésoscopiques soient un peu plus petites et/ou un peu moins nombreuses.

Propriétés mécaniques des hydrogels à base de cations divalents

La présence d'hétérogénéités mésoscopiques peut être mise en exergue par la comparaison de l'évolution des modules élastiques et visqueux avec celle de la concentration. La Figure 5.7 présente l'évolution des modules élastiques et visqueux le long des gels Ca^{2+} -polyGalA, Zn^{2+} -polyGalA en comparaison avec les résultats que nous avons obtenus pour les gels Fe^{2+} -polyGalA. Nous pouvons observer que quel que soit le cation étudié, les modules G' et G'' diminuent sur deux décades de 0 % à 100 % de l'épaisseur et que leur évolution est parallèle ($\tan \delta \sim 0,1$). Cependant, lorsque l'on compare les valeurs de G' et G'' entre les différents cations pour une partie de gel donnée, nous pouvons observer quelques différences. Ces différences ont été mises en évidence par les courbes de tendance (guide pour les yeux) bleue (pour les ions Ca^{2+}), violette (pour les ions Zn^{2+}) et verte (pour les ions Fe^{2+})⁶.

6. Nous n'avons pas tracé les courbes de tendance jusqu'à 100 % de l'épaisseur car la mesure des modules G' et G'' dans cette partie des gels présente de grands écarts types. Ce phénomène est dû au fait que cette partie

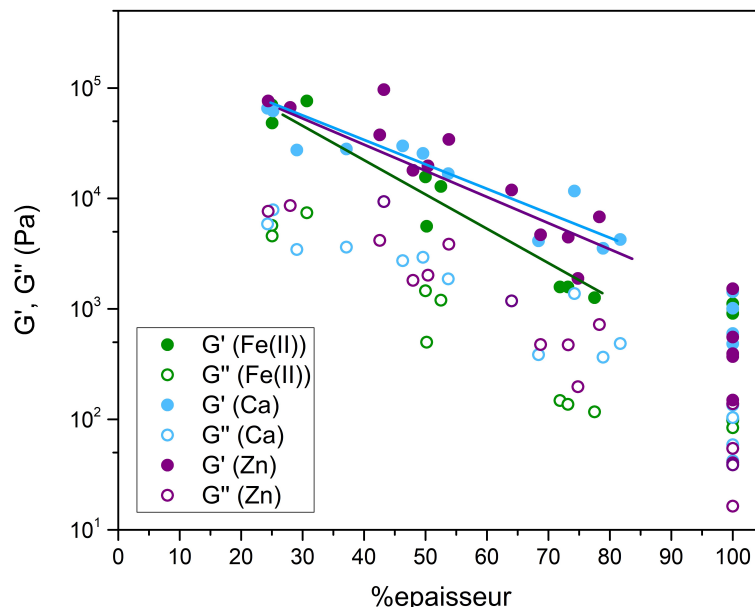


FIGURE 5.7 – Évolution des modules G' (symboles pleins) et G'' (symboles vides) des différentes tranches de gels Ca^{2+} -polyGalA, Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{2+} -polyGalA pour une fréquence de 1 Hz et un cisaillement de 0,1 %. Les droites sont des courbes de tendance (guides pour les yeux) qui présentent les pentes modélisant l'évolution des modules G' en fonction de la position dans le gel.

Dans la partie du gel 0 %- 25 % de l'épaisseur, nous remarquons que les modules G' et G'' pour les différents cations sont sensiblement les mêmes. Ce résultat est en accord avec les différentes mesures présentées pour les 3 cations divalents dans ce chapitre, i.e. cette partie du gel est transparente (Figure 5.1) donc il n'y a pas (ou très peu) d'hétérogénéités mésoscopiques et elle possède une densité de points de réticulation identique (Figure 5.4) corrélée à une taille caractéristique de réseau similaire (Figure 5.6 a)). Lorsque l'on s'éloigne de cette partie du gel on remarque que les valeurs de modules semblent être un peu plus élevées pour les gels Ca^{2+} -polyGalA et Zn^{2+} -polyGalA que pour les gels Fe^{2+} -polyGalA. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les gels en question sont un peu plus homogènes macroscopiquement, c'est-à-dire que les hétérogénéités mésoscopiques sont moins grandes ou moins nombreuses que dans le cas des gels Fe^{2+} -polyGalA. Ces différences ne se retrouvent pas clairement dans la partie apicale du gel (80 %- 100 %). Ce résultat est probablement dû au fait que cette partie du gel est très riche en eau et que le système relaxe très vite pendant la mesure des modules G' et G'' . Afin de mettre en exergue ces observations, nous avons représenté les évolutions des modules G' et du carré de la concentration en polyGalA le long des gels (Figure 5.8).

est très riche en eau et relaxe très vite pendant la mesure.

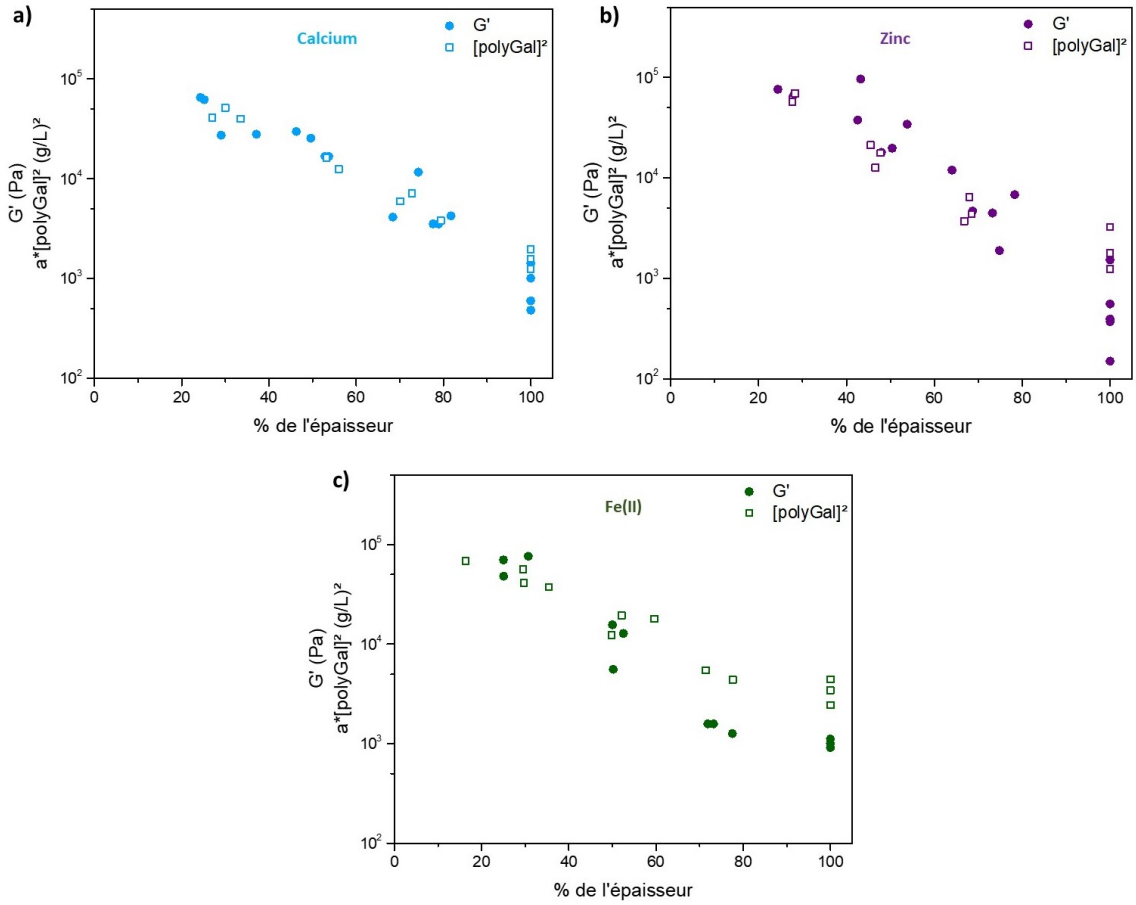


FIGURE 5.8 – Évolution des modules G' (ronds pleins) mesurés à une fréquence de 1 Hz et un taux de cisaillement de 0,1% et du carré de la concentration en polyGalA en fonction de la position dans le gel (exprimée en % de l'épaisseur) (a est un préfacteur de normalisation et est égal à 35 pour tous les cations).

La Figure 5.8 présente la comparaison de l'évolution du module élastique G' et du carré de la concentration en polyGalA en fonction de la position dans les gels (exprimée en % de l'épaisseur du gel). Nous avons choisi cette représentation car la relation $G' \sim [polyGalA]^2$ a souvent été décrite notamment pour des gels calcium-alginate [33]. Il est à noter que cette relation est la preuve que ce type d'hydrogel n'a pas une structure totalement homogène à toute échelle d'observation. En effet, selon la théorie moléculaire d'élasticité[48, 49], quand le module élastique est directement lié à la densité de points de réticulation et donc que le système est totalement homogène, le module évolue avec le cube de la concentration car nous sommes en présence d'un réseau tridimensionnel.

La partie a) de la Figure 5.8 présente les résultats obtenus sur le gel Ca^{2+} -polyGalA. Nous remarquons que sur l'ensemble de l'épaisseur du gel, la relation $G' \sim [polyGalA]^2$ est vraie. Dans la partie b) de cette même figure qui concerne les gels Zn^{2+} -polyGalA, on remarque que la relation testée est retrouvée mais que les écarts types sont plus importants que pour les gels Ca^{2+} -polyGalA. Finalement quand on regarde la comparaison pour les gels Fe^{2+} -polyGalA, nous remarquons que la relation n'est vraie que jusqu'à 50 % de l'épaisseur et qu'au delà de cette valeur on diverge de la relation de $G' \sim [polyGalA]^2$ de façon plus importante que dans le cas des ions Zn^{2+} .

5.2.2 Effet du cation trivalent Fe^{3+}

Structure locale du réseau formé

La Figure 5.9 présente les spectres DNPA des différentes tranches d'un gel Fe^{3+} -polyGalA ainsi que les modélisations que nous avons faites pour déterminer la taille caractéristique du réseau. La partie a) de cette figure présente les spectres des différentes tranches en comparaison avec le spectre de la solution de polyGalA à 20 g/L. Les intensités des spectres ont été normalisées par leur concentration nominale en polyGalA. Les spectres correspondant aux différentes tranches présentent 3 régimes. Aux grands vecteurs de diffusion, les spectres présentent une décroissance en q^{-1} comme le polyGalA en solution. À des vecteurs de diffusion intermédiaires, nous observons un épaulement qui s'étend sur une grande gamme de q beaucoup plus importante que celle obtenue jusqu'à présent pour les autres gels. Pour les petits vecteurs de diffusion, les spectres présentent à la fois une décroissance plus importante et une intensité de diffusion plus élevée que celle du spectre de la solution de polyGalA. Ces deux remarques nous laissent penser que le polyGalA a subi un phénomène d'agrégation pendant sa gélification en présence des ions Fe^{3+} .

La modélisation de la taille de maille du réseau que nous avons effectuée pour les différentes tranches de gels Fe^{3+} -polyGalA a été légèrement différente de celle que nous avons présentée dans le chapitre 3 pour le cas des ions Fe^{2+} . En effet, au lieu de modéliser les différents spectres par la somme du signal du polyGalA seul en solution⁷ et du signal modélisé par l'équation d'Ornstein Zernicke (OZ) caractérisant la taille de maille du réseau, nous avons tout d'abord modélisé la pente représentative de l'état d'agrégation du polyGalA dans les hydrogels pour ensuite la sommer au signal de la taille de maille du réseau (courbes bleues des parties b), c) et d) de la Figure 5.9). Les droites violettes sur les parties b), c) et d) de la Figure 5.9 représentent la modélisation de l'état d'agrégation du polyGalA. Les pentes calculées présentent respectivement des décroissances en $q^{-3,3}$, $q^{-3,6}$ et $q^{-3,4}$ pour les tranches 0 %- 33 %, 33 %- 66 % et 66 %- 100 % (Tableau 5.1). Ces valeurs de pente signifient qu'entre les deux premières tranches l'état d'agrégation augmente et se rapproche d'une décroissance en q^{-4} caractéristique d'un système très agrégé⁸. La décroissance caractéristique de la tranche 66 %- 100 % est plus petite que celle de la tranche 33 %- 66 %, ce qui signifie que le polyGalA serait un peu moins agrégé dans la tranche 66 %- 100 %. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que la concentration en polyGalA dans cette partie est moins importante que dans les autres tranches.

7. qui présentait la même pente aux petits q que le polyGalA dans les gels.

8. Une décroissance en q^{-4} correspond classiquement à une loi de Porod qui caractérise les intensités de diffusion aux surfaces et aux interfaces.

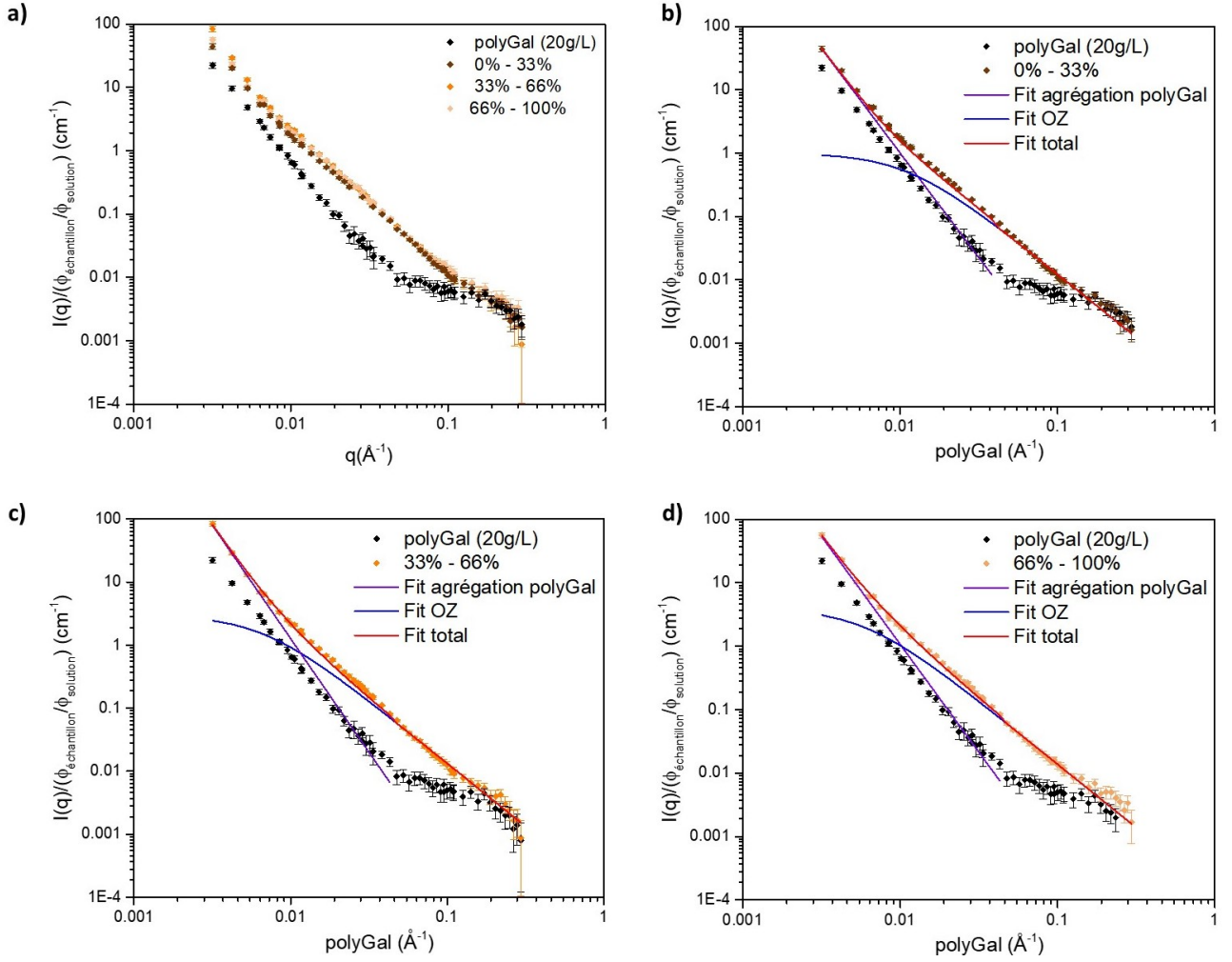


FIGURE 5.9 – Mesures de diffusion de neutrons aux petits angles de différentes tranches de gels obtenus avec les ions Fe^{3+} après 24 h de gélification d’une solution de polyGalA à 20 g/L. a) Spectres des différentes tranches de gel Fe^{3+} -polyGalA dont les intensités sont normalisées par leur concentration en polyGalA en comparaison avec la solution de polyGalA qui a permis la formation du gel. b) Spectre de la tranche 0 % - 33 % en comparaison avec la solution de polyGalA et présentation de la modélisation appliquée. c) Spectre de la tranche 33 % - 66 % en comparaison avec la solution de polyGalA et présentation de la modélisation appliquée. d) Spectre de la tranche 66 % - 100 % en comparaison avec la solution de polyGalA et présentation de la modélisation appliquée.

Les courbes rouges des parties b), c) et d) de la Figure 5.9 présentent la modélisation totale des spectres correspondant aux tranches du gel Fe^{3+} -polyGalA. Les tailles de mailles calculées correspondantes sont présentées dans le tableau 5.1.

Tranche	ξ (Å)	Loi de puissance aux petits q (q^{-x})
0 % - 33 %	90 ± 5	$x=3,3$
33 % - 66 %	150 ± 5	$x=3,6$
66, % - 100 %	170 ± 5	$x=3,4$

TABLE 5.1 – Taille de maille moyenne déterminée à partir des modélisations des spectres DNPA des différentes tranches de gel Fe^{3+} -polyGalA et loi de puissance décrivant la décroissance aux petits q du spectre correspondant.

Les résultats des modélisations montrent que la taille moyenne des mailles du réseau aug-

mente lorsque l'on se déplace de 0 % à 100 % de l'épaisseur du gel.

Les résultats obtenus sur ces gels étant très différents de ceux obtenus sur les gels Fe^{2+} -polyGalA, nous avons souhaité déterminer dans quelle mesure la concentration en cations Fe^{3+} pouvait influencer la structure locale du réseau de polyGalA formé. C'est pourquoi, de la même façon que pour les gels de Fe^{2+} -polyGalA⁹, nous avons procédé à la gélification du polyGalA en fixant un temps de gélification de 6 h et en testant les concentrations en FeCl_3 dans le réservoir suivantes : 0 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM et 250 mM.

La Figure 5.10 présente les spectres des gels formés entre 0 et 10 mM et les spectres des tranches 0 % - 25 % des gels formés avec les concentrations en FeCl_3 plus élevées. Nous pouvons tout d'abord noter que contrairement aux ions Fe^{2+} , les ions Fe^{3+} permettent la formation d'un gel de polyGalA à une concentration de 5 mM, ce qui peut vouloir dire que l'interaction des ions Fe^{3+} avec les chaînes de polyGalA entraîne la formation de zones réticulées très denses qui percolent et forment un réseau macroscopique sans impliquer toutes les chaînes.

À cette concentration en cations, le spectre obtenu est cependant très similaire à celui de la solution de polyGalA ce qui signifie que le spectre correspond majoritairement au signal de chaînes de polyGalA libres. Pour la concentration de cations de 10 mM, le spectre présente 3 régimes avec des valeurs de pente aux petits et grands vecteurs de diffusion égales à celle du polyGalA seul en solution. Aux valeurs de q intermédiaires, nous faisons exactement la même observation que dans le cas des ions ferreux. L'épaule observé ne peut pas être modélisé par une taille de maille caractéristique car il doit sûrement correspondre à un mélange de signaux de chaînes libres et de chaînes gélifiées¹⁰. Les trois autres spectres correspondant respectivement aux concentrations dans le réservoir de 50, 100 et 250 mM présentent 3 régimes. Aux grands vecteurs de diffusion, les spectres présentent les mêmes pentes que le spectre de la solution de polyGalA. À des vecteurs de diffusion intermédiaires, nous remarquons que l'épaule caractéristique de la formation du réseau de polyGalA est toujours le même, ce qui veut dire que la structure du réseau formé dans la partie proche de la membrane de dialyse est toujours la même quelle que soit la concentration en cation utilisée lorsque le rapport molaire $R > 0,25$. Concernant les pentes aux petits vecteurs de diffusion, nous remarquons que ces dernières augmentent avec la concentration en polyGalA dans le réservoir alors qu'il semblerait que la quantité de cation fixé par le polyGalA ne dépasse pas le rapport molaire 0,25¹¹. Nous pensons donc que le coefficient de diffusion des cations qui augmente avec leur concentration dans le réservoir a une influence sur l'agrégation du polyGalA au sein des gels.[21]

9. Résultats présentés dans la section 3.2.2 du chapitre 3.

10. Nous rappelons que ce phénomène est sûrement dû au fait que le rapport molaire R correspondant est $< 0,25$ et donc que tous les sites de fixation existants ne sont pas impliqués.

11. Les déterminations du rapport molaire R dans les tranches de gels ont montré, pour un réservoir de FeCl_3 à 100 mM, que ce dernier était toujours égal à 0,25. Nous pouvons donc supposer qu'il en est de même pour les gels formulés à 50 et 250 mM.

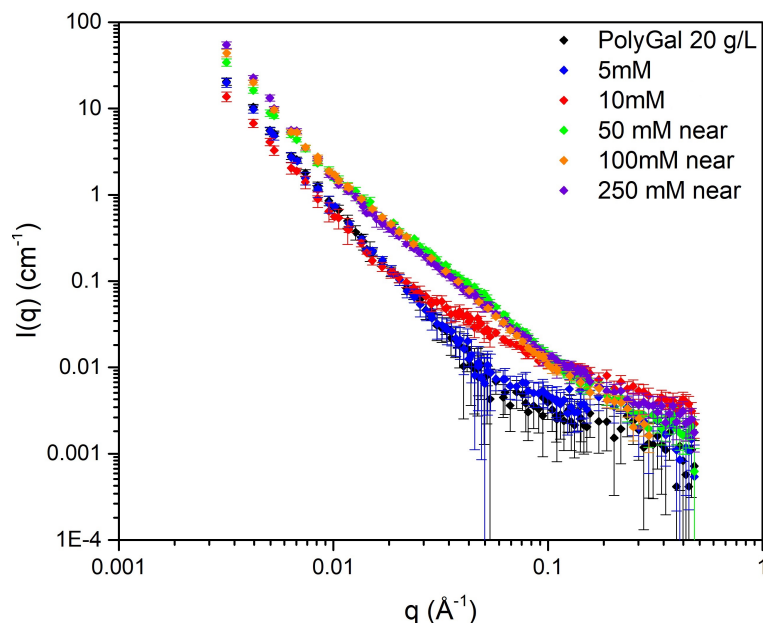


FIGURE 5.10 – Spectres DNPA de gels formés à 5 mM et 10 mM de FeCl_3 dans le réservoir et des tranches 0 %- 25 % des gels formés à 50, 100 et 250 mM de FeCl_3 dans le réservoir (appelées near).

Propriétés mécaniques des hydrogels Fe^{3+} -polyGalA

Dans le chapitre 3, nous avons émis l'hypothèse que les propriétés mécaniques des gels Fe^{2+} -polyGalA étaient directement corrélées à la distribution des chaînes le long des gels. Nous avons donc souhaité vérifier si cette hypothèse est vraie quel que soit le cation. Nous avons donc effectué des mesures de rhéologie oscillatoire en utilisant le même protocole que celui décrit dans le chapitre 3.

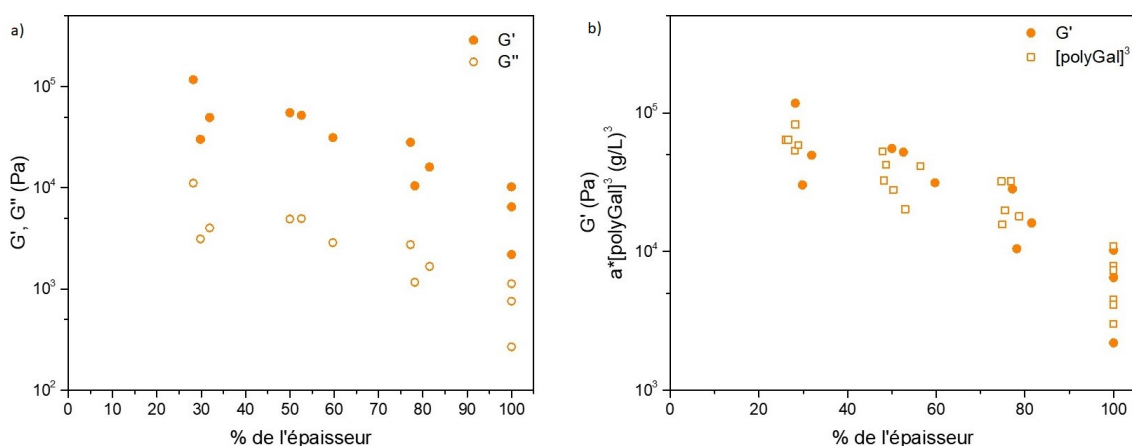


FIGURE 5.11 – a) Évolution des modules G' (ronds pleins) et G'' (ronds vides) mesurés à une fréquence de 1 Hz et un taux de cisaillement de 0,1% en fonction de la position dans le gel (exprimée en % de l'épaisseur). b) Évolution du module G' (ronds pleins) mesuré à une fréquence de 1 Hz et un taux de cisaillement de 0,1% et du cube de la concentration en polyGalA en fonction de la position dans le gel (exprimée en % de l'épaisseur). a est un préfacteur de normalisation et est égal à 4.

La Figure 5.11 a) présente l'évolution des modules G' et G'' le long des gels Fe^{3+} -polyGalA.

À l'instar de la distribution des chaînes, les modules G' et G'' évoluent de manière différente que dans le cas des cations divalents. En effet, ils diminuent sur une seule décade, ce qui signifie que le gradient induit par le phénomène de gélification est moins important. Le rapport des deux modules est cependant toujours égal à 0,1 comme observé pour les gels formulés à partir des cations divalents.

La partie b) de la Figure 5.11 présente la comparaison des évolutions du module G' et de la concentration en polyGalA. Ici la relation correspond à $G' \sim [\text{polyGalA}]^3$. Cette relation signifie que le module est uniquement fonction de la concentration en chaînes dans le réseau tridimensionnel, ce qui nous fait supposer qu'il existe des zones très denses en chaînes qui vont être responsable de la rigidité des gels. Ces zones denses pourraient correspondre à ce que nous observons aux petits vecteurs de diffusion sur les spectres DNPA quand nous avons fait le constat que la loi de puissance de cette partie des spectres tend vers une loi de Porod.

5.2.3 Mécanismes de formation des hydrogels

Notre protocole de gélification permet l'obtention d'hydrogels parfaitement reproductibles quel que soit le cation utilisé pour la gélification du polyGalA. Les cations divalents, quel que soit leur mode d'association, induisent les mêmes gradients de concentration et de propriétés mécaniques mais mènent cependant à la formation d'une structure mésoscopique des hydrogels différente. La valence du cation semble modifier les phénomènes de diffusion des chaînes, car les gradients de concentration et de fait, de propriétés mécaniques sont différents. À partir de l'ensemble des mesures que nous avons présenté dans ce chapitre, nous avons proposé un mécanisme de gélification pour chaque type de gel formulé.

Formation d'hydrogels à partir de cations divalents

Les résultats obtenus sur les gels Fe^{2+} -polyGalA, i.e. les résultats obtenus sur les systèmes dilués (chapitre 2) et ceux que nous présentons dans ce chapitre sont presque identiques à ceux obtenus pour les ions Zn^{2+} . Sachant que les ions Fe^{2+} et Zn^{2+} s'associent tous les deux aux unités GalA en suivant le modèle "egg-box", nous supposons que le mécanisme de gélification du polyGalA par les ions Zn^{2+} est identique à celui présenté pour les ions Fe^{2+} dans le chapitre 3. Cependant, les gels Zn^{2+} -polyGalA apparaissant moins turbides que les gels Fe^{2+} -polyGalA (Figure 5.1), nous pensons donc que les hétérogénéités mésoscopiques induites par le processus de gélification sont moins grandes et/ou moins nombreuses (Figure 5.12). Cette hypothèse est validée par la comparaison de l'évolution des modules G' et du carré de la concentration en polyGalA car la relation $G' \sim [\text{polyGalA}]^2$ diverge moins dans les zones turbides des gels Zn^{2+} -polyGalA que dans les zones turbides des gels Fe^{2+} -polyGalA (Figure 5.8). Le fait que les gels Zn^{2+} -polyGalA soient globalement moins hétérogènes pourrait venir du fait que la vitesse avec laquelle les cations Zn^{2+} peuvent se désolvater est plus grande que celle des ions Fe^{2+} [59]. De fait, l'association des ions Zn^{2+} pourrait être plus rapide, ce qui figerait le système plus vite et diminuerait donc l'hétérogénéité globale du gel car la répartition des chaînes dans le gel serait plus proche de leur répartition initiale en solution.

Nous avons décrit dans le chapitre 1, d'après Assifaoui *et al.* 2015[20], que l'augmentation légère de la viscosité des solutions Zn^{2+} -polyGalA en système dilué lorsque R augmente était

due à la formation d'un réseau hétérogène composé de zones très denses et de zones très diluées dont la viscosité serait proche de l'eau ce qui permettrait l'écoulement de la solution. Lorsque nous avons comparé les mélanges Fe^{2+} -polyGalA et Zn^{2+} -polyGalA en régime dilué dans le chapitre 2, nous avons observé que la viscosité du mélange Fe^{2+} -polyGalA augmentait avec R mais de façon plus limitée que dans le cas du mélange Zn^{2+} -polyGalA. Ainsi, nous pouvons supposer que les hétérogénéités formées dans les mélanges Zn^{2+} -polyGalA sont moins nombreuses et/ou moins grandes que dans le cas des mélanges Fe^{2+} -polyGalA .

Il est donc probable que le mécanisme de gélification propage les hétérogénéités formés aux toutes premières étapes de l'association des chaînes de polyGalA avec le cation divalent. Dans la partie du gel en contact avec la membrane de dialyse, la concentration en chaînes est telle que la mobilité des chaînes est très limitée ce qui induit la formation d'un réseau relativement homogène. Mais dans les parties des gels les plus éloignées de la membrane de dialyse, le système est dilué et on retrouve alors les structures observées dans le cas des systèmes dilués avec des hétérogénéités mésoscopiques plus grandes pour les gels Fe^{2+} -polyGalA que pour les gels Zn^{2+} . Cette hypothèse est confortée par les résultats présentés concernant les gels Ca^{2+} -polyGalA.

L'association des cations calcium avec les unités GalA suit, d'après des simulations de dynamique moléculaire, un mode d'association bidentate qui est donc différent du mode d'association des ions Fe^{2+} (Chapitre 4) et Zn^{2+} avec les unités GalA [20]. Du fait de la capacité des ions calcium à se désolvater facilement [3], le réseau de chaînes de polymère formé à l'issue de ces associations (formation de dimères et de multimères) semble plus homogène que celui formé avec les ions Zn^{2+} [20] et Fe^{2+} ¹² car le système est capable de se réorganiser. La concentration en chaînes de polymère augmentant à proximité de la membrane de dialyse (Figure 5.2), la formation de dimères et de multimères est limitée¹³, donc on retrouve globalement la même taille de maille que pour les gels Fe^{2+} -polyGalA (Figure 5.6 a). Cette formation plus importante de dimères et de multimères que dans le cas des autres cations pourrait expliquer la déformation macroscopique des hydrogels Ca^{2+} -polyGalA observée dans la partie du gel proche de la membrane de dialyse (Figure 5.1) car elle serait corrélée à une contraction du réseau plus importante[39] (Figure 5.12).

Plus le front de gélification s'éloigne de la membrane de dialyse, plus la concentration en chaînes libres est faible. De ce fait, les associations GalA- Ca^{2+} -GalA peuvent se réorganiser car, comme nous l'avons présenté dans le chapitre 1, elles sont transitoires. Ainsi, l'association des ions Ca^{2+} avec les chaînes de polyGalA forme un réseau continu et homogène avec une taille de maille caractéristique globalement plus grande. Cette hypothèse pourrait expliquer les spectres neutrons mesurés dans les parties des gels Ca^{2+} -polyGalA les plus éloignées de la membrane de dialyse (Figure 5.6 b) en supposant que la formation des dimères et des multimères ne modifie par le facteur de forme du polyGalA. Par conséquent, le signal de la maille du réseau formé, qui a une intensité de diffusion faible¹⁴, est masqué. La propagation d'un réseau de polyGalA homogène tout le long du gel pendant le processus de gélification est cohérent avec le fait que les gels Ca^{2+} -polyGalA ne sont pas turbides macroscopiquement (Figure 5.1).

12. Si l'on se réfère aux résultats présentés dans le chapitre 2.

13. Leur mobilité est réduite par la diminution de volume libre.

14. L'intensité de diffusion du signal de la maille est faible car le nombre de mailles par chaîne est plus petit car leur taille est plus grande.

Les gels Fe^{3+} -polyGalA

Les gels Fe^{3+} -polyGalA ont des caractéristiques macroscopiques, mésoscopiques et locales très différentes de celles que nous avons décrites pour les gels formulés avec des cations divalents. Ce résultat pouvait être attendu du fait de la trivalence du cation. Nous ne connaissons pas le mode d'association local de ces cations mais nous avons mesuré que le rapport molaire R était égal à 0,25 dans toutes les tranches. Il est alors possible que l'association des cations Fe^{3+} avec les chaînes de polyGalA induise la formation de dimères et que la charge positive restante joue le rôle de point de réticulation de charges pouvant lier des dimères les uns avec les autres, ce qui pourrait expliquer la formation de zones très denses et donc la turbidité importante de ces hydrogels.

Macroscopiquement, nous avons observé que ces hydrogels étaient très turbides (Figure 5.1), ce qui signifie qu'ils possèdent des fluctuations de densité qui diffusent la lumière. Malgré cette importante hétérogénéité apparente, la distribution des chaînes le long des hydrogels est plus homogène que pour les gels issus des cations divalents (Figure 5.3). Ce résultat nous laisse supposer que les chaînes de polyGalA s'agrègent et ne réticulent peut être que ponctuellement (Figure 5.12). Les phénomènes de diffusion des chaînes en direction de la membrane de dialyse induits par la formation progressive du réseau sont donc moins importants. Les chaînes agrégées sont observables à l'échelle d'observation des neutrons car nous observons des remontées aux petits vecteurs de diffusion qui suivent des lois de puissance se reprochant d'une loi de Porod qui caractérise classiquement les intensités de diffusion d'interfaces (Figure 5.9). Dans ces gammes de q , il est possible que nous mesurions des interfaces entre des zones très denses formées par les chaînes agrégées et des zones de "vide". Nous avons pu calculer des tailles de mailles moyennes dans les différentes tranches des gels Fe^{3+} -polyGalA et avons remarqué que la taille caractéristique du réseau augmentait de la partie du gel proche de la membrane de dialyse à la partie la plus éloignée. Nous pensons cependant que ces tailles caractéristiques correspondent juste au fait que la concentration en chaînes diminue d'une partie à l'autre et donc que les agrégats formés sont en moyenne plus éloignés les uns des autres. Ces hydrogels seraient donc hétérogènes à plusieurs échelles d'observations et pas seulement à l'échelle mésoscopique comme les cations Fe^{2+} et Zn^{2+} .

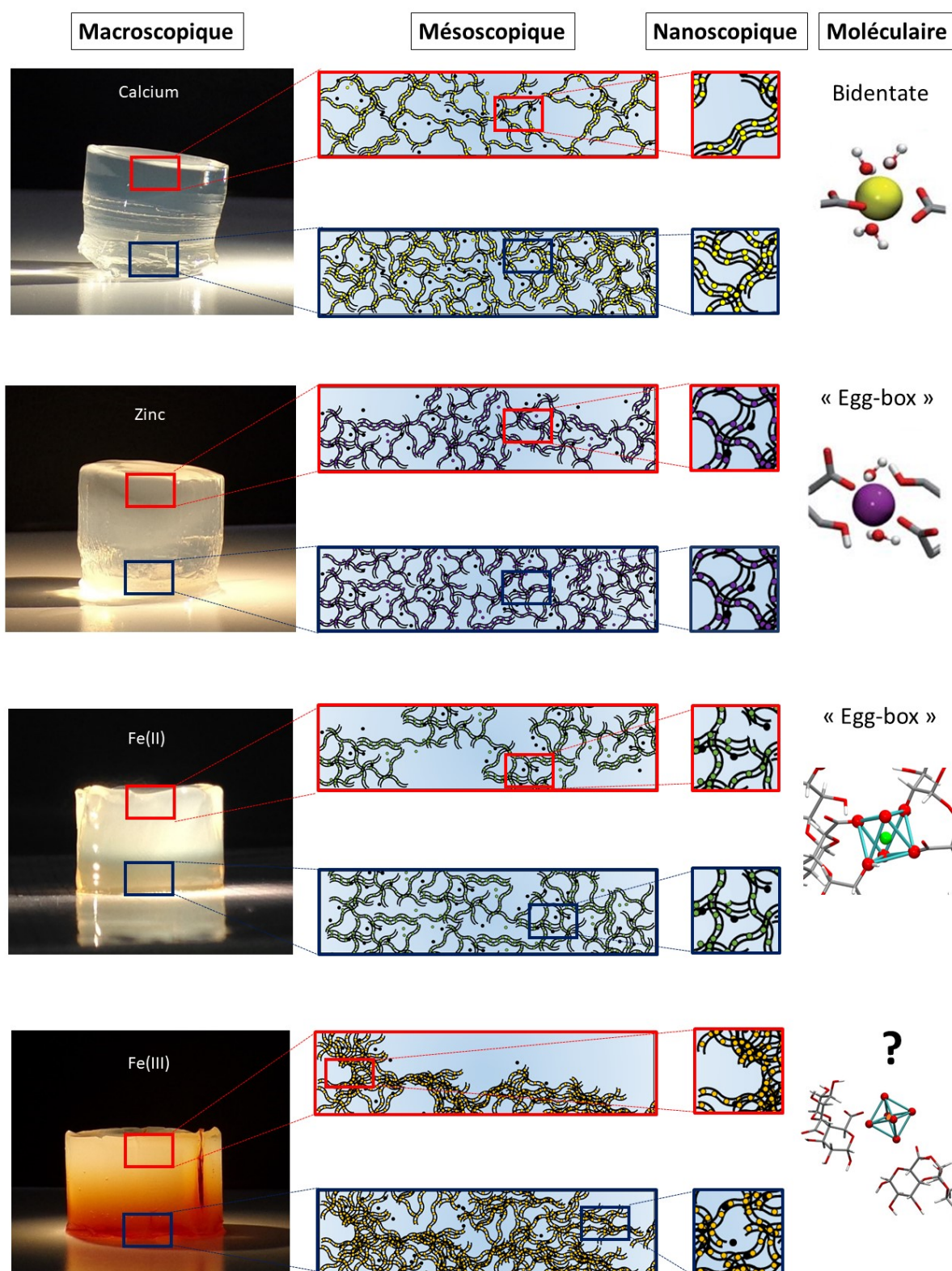


FIGURE 5.12 – Bilan des structures des gels Ca^{2+} -polyGalA, Zn^{2+} -polyGalA, Fe^{2+} -polyGalA et Fe^{3+} -polyGalA des échelles macroscopiques à moléculaires. La légende de ces schémas est la même que pour le schéma présenté dans le chapitre 3 et les ronds jaunes correspondent aux ions Ca^{2+} , les ronds violets correspondent aux ions Zn^{2+} et, les ronds oranges correspondent aux ions Fe^{3+} .

Conclusion

L'étude de la formation d'hydrogels de polyGalA à partir de différents cations divalents nous a permis d'établir le lien existant entre le mode d'association local entre le cation et les unités Gal et la structure macroscopique des hydrogels formés. Un mode d'association donné va en effet induire la formation d'un réseau de polyGalA plus ou moins hétérogène. Si la concentration en polyGalA est élevée¹⁵ la structure du réseau formé est globalement homogène quel que soit le mode d'association. Cependant, lors du processus de gélification, la diffusion des chaînes vers la membrane de dialyse entraîne la dilution de la concentration en chaînes qui devient inférieure ou proche de C^* . La structure locale du réseau se propage dans la partie la plus éloignée de la membrane de dialyse et la présence d'hétérogénéités mésoscopiques plus ou moins grandes sera fonction de l'homogénéité du réseau formé intimement près de cette membrane de dialyse, et sera fonction du cation qui réticule.

Ainsi, en connaissant le mode d'association entre un cation divalent et les unités GalA, nous sommes capables de prédire la structure des hydrogels formés de l'échelle du réseau de polyGalA aux échelles macroscopiques. La connaissance fine de ces mécanismes de gélification mis en jeu nous permettrait ainsi d'adapter les propriétés macroscopiques des hydrogels à une problématique donnée (relargage d'une molécule active, administration d'une quantité contrôlée d'un principe actif...).

15. Très supérieure à C^* .

Conclusion générale

L'objectif initial de ma thèse était de proposer une nouvelle stratégie permettant la vectorisation de fer jusqu'à l'intestin, et ce afin de proposer une alternative aux traitements actuels permettant de lutter contre l'anémie. En nous basant sur l'important corpus de connaissances existant concernant la gélification des polyuronates en présence de cations divalents, nous avons proposé de former des hydrogels à base de polygalacturonate réticulé par des cations Fe^{2+} , et ce afin de protéger ces cations divalents contre l'oxydation via leur association à des chaînes de polygalacturonate pour qu'ils puissent être vectorisés sous cette forme réduite, qui est la forme biodisponible du fer jusqu'à l'intestin.

Nous avons donc dans un premier temps étudié des mélanges Fe^{2+} -polyGalA en système dilué afin d'identifier les associations locales mises en jeu, et avons comparé nos résultats avec des études antérieures dédiées à l'étude des systèmes Ca^{2+} -polyGalA et Zn^{2+} -polyGalA [3]. Nous avons alors pu montrer que les mélanges Fe^{2+} -polyGalA et Zn^{2+} -polyGalA présentent des comportements similaires, ce qui suggère que l'association locale des ions Fe^{2+} avec les unités GalA entraîne la formation d'un réseau hétérogène, comme observé dans le cas des ions Zn^{2+} , alors que le mode d'interaction des cations Ca^{2+} avec les unités Gal induit la formation d'un réseau globalement plus homogène [20]. Nous avons également montré que l'association Fe^{2+} -polyGalA était fortement influencée par le rapport molaire $R = [\text{Fe}^{2+}]/[\text{unités GalA}]$ et qu'il existe une transition brutale des propriétés physico-chimiques (viscosité, turbidité et enthalpie d'association) lorsque le rapport molaire atteint 0,25.

Nous avons ensuite mis en place un protocole de gélification externe en milieu concentré permettant la formulation d'hydrogels Fe^{2+} -polyGalA parfaitement reproductibles malgré la présence d'importants gradients de concentrations en polyGalA et en fer qui modulent les propriétés mécaniques. La détermination des conditions de gélification et de la structure de ces hydrogels depuis les échelles moléculaires jusqu'aux échelles macroscopiques nous a permis d'identifier les paramètres clés de la gélification du polyGalA en présence des cations Fe^{2+} et donc de maîtriser la mise en place de ces hétérogénéités. De plus, nous avons prouvé que l'association de ces ions divalents aux unités GalA mettait en jeu 1 cation pour 4 unités GalA ($R=0,25$) et permettait la protection des cations Fe^{2+} contre l'oxydation, et ce même dans des conditions oxydatives. Ainsi, nous avons pu proposer une description du mécanisme de gélification, ce qui permet de le contrôler pour des applications potentielles. Ce mécanisme nous permet d'ajuster les propriétés mécaniques des hydrogels et/ou de moduler la quantité de fer qu'il contient pour un besoin spécifique en sélectionnant une partie de gel donnée.

Afin d'affiner la description que nous avons proposée pour expliquer la mise en place du réseau de chaînes de polyGalA, nous avons sondé l'environnement local des ions Fe^{2+} au sein

des hydrogels. L'utilisation de la spectroscopie XAS, couplée avec des simulations de dynamique moléculaire, nous a permis de décrire finement les interactions des unités GalA avec les ions Fe^{2+} . Ceci nous a permis de conclure que le mode d'association modélisant le mieux la liaison GalA- Fe^{2+} -GalA est le modèle "egg-box". C'est à notre connaissance la première preuve expérimentale à l'échelle moléculaire de l'existence dans des hydrogels de ce mode d'association, qui a été historiquement proposé pour décrire l'association des cations divalents avec les polyuronates.

L'ensemble des résultats obtenus sur le système Fe^{2+} nous a incité à décrire de façon plus générale comment un mode d'association local entre un cation donné et les unités GalA influençait la structure de l'hydrogel formé et ses propriétés. Nous avons donc utilisé notre protocole de gélification pour formuler des hydrogels à partir d'ions Ca^{2+} , qui s'associent aux unités GalA de façon bidentate, d'ions Zn^{2+} qui s'associent selon le même mode d'association que les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} -polyGalA afin de déterminer si un ion trivalent permet de former le même type d'hydrogel. La comparaison macroscopique des hydrogels formulés à partir des 3 cations divalents montre que les systèmes Zn^{2+} -polyGalA et Fe^{2+} -polyGalA sont plus hétérogènes que le système Ca^{2+} -polyGalA qui apparaît macroscopiquement très homogène. Lorsque nous avons sondé plus en détail les réseaux formés et les propriétés de ces hydrogels, nous avons montré que les mécanismes de gélification induisant la formation des gradients macroscopiques de concentrations du fait de la diffusion des cations, et ce faisant des propriétés mécaniques, étaient identiques pour tous ces cations. Cependant, nous avons observé que l'évolution de la structure du réseau de chaînes formé le long des gels différait d'un cation à l'autre, ce qui nous a permis de conclure que cette structure est modulée par les hétérogénéités qui se créent lors des toutes premières étapes de l'association des cations divalents avec les unités GalA et se propagent ensuite lors de la formation du gel. Dans le cas des ions Fe^{3+} , les modes d'association sont différents et induisent la formation de gels très hétérogènes et nous n'avons pas pu proposer de description détaillée du mécanisme de gélification.

Nous avons ainsi acquis une connaissance suffisamment fine des mécanismes de formation des hydrogels de polyGalA pour pouvoir prédire les propriétés macroscopiques d'hydrogels formés à partir de n'importe quel cation divalent lorsque le mode d'association local du cation avec les unités GalA est connu. Ce mode d'association dépend essentiellement de la capacité d'un cation divalent à se "débarrasser" plus ou moins rapidement de sa couche d'hydratation.

La maîtrise de la structure des hydrogels de polyGalA nous permet de proposer notre système comme outil pour l'encapsulation de molécules actives et pour leur relargage contrôlé. Nous en avons d'ailleurs testé le principe sur des hydrogels à base de Ca^{2+} , en suivant notre protocole de gélification, et en partant d'un mélange de polyGalA et d'une molécule active "modèle", la β -lactoglobuline, une protéine globulaire issue de lactosérum. Nous avons ainsi montré que la protéine, qui n'interagit pas spécifiquement avec le polyGalA, décore l'hydrogel et se localise soit dans les mailles du réseau, soit dans les zones peu denses constituées majoritairement d'eau. Ceci permet de contrôler le taux de relargage de la protéine en fonction de la partie du gel choisie. Le choix de l'utilisation d'un cation divalent donné pour formuler des gels pourrait donc être un moyen d'ajuster une vitesse de relargage ou une quantité de protéine relarguée données. Ces résultats sont présentés en annexe F sous la forme d'un manuscrit en cours d'écriture.

À plus long terme, les perspectives de ce travail pourraient être les suivantes : d'un point de vue fondamental, il serait intéressant de modifier chimiquement le polyGalA afin de maîtriser son degré de méthylation. Ainsi, nous pourrions déterminer dans quelle mesure le nombre de sites de fixation disponibles influence la structure du réseau formé et les propriétés macroscopiques des hydrogels. Nous pourrions alors étendre nos modèles d'associations à toute sorte de pectines. D'un point de vue plus appliqué, il serait intéressant de tester si les hydrogels Fe^{2+} -polyGalA permettent réellement la protection des ions Fe^{2+} pendant la digestion et si leur libération a lieu au niveau intestinal en réalisant des tests *in vitro* dans un premier temps puis *in vivo* dans un second. Nous avons en effet fait le choix lors de ma thèse de nous concentrer davantage sur les mécanismes de gélification, ce qui a motivé le fait d'étendre les études initiées sur Fe^{2+} à d'autres cations, plutôt que sur ces aspects appliqués qui n'ont pu être abordés par manque de temps.

Annexe A

Diffusion de neutrons aux petits angles

La diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) est une technique de choix pour étudier la structure locale d'un réseau de polymère au sein d'hydrogels car les échelles spatiales sondées (de quelques dizaines à une centaine de nm) sont pertinentes pour caractériser la structure globale des chaînes et leur structure locale, comme par exemple leur longueur de persistance. [41]

Les principaux avantages de l'utilisation de la DNPA pour la caractérisation de la structure locale des hydrogels Fe^{2+} sont les suivant :

- La technique met en jeu des énergies faibles, ce qui rend la mesure non-destructive vis-à-vis des échantillons.

- Les neutrons étant par définition des particules neutres, ils interagissent directement avec les noyaux des atomes ce qui rend possible la caractérisation directe de la structure des chaînes. En effet, si nous avons choisi d'utiliser la DXPA, nous aurions sondé le cortège électronique de notre système et les cations Fe^{2+} auraient un bien meilleur contraste que celui des chaînes. La mesure aurait ainsi essentiellement sondée la structure des ces ions, et non celle des chaînes.

- Elle permet d'effectuer des variations de contraste, grâce à l'utilisation de D_2O , qui rend possible par exemple la détermination de la structure des chaînes de polyGalA dans l'eau. En effet, la longueur de diffusion du deutérium est très inférieure à la densité de longueur de diffusion de l'hydrogène qui est un des composants important des chaînes de polyGalA et le diffuseur majoritaire. Cependant, il est importante de noter que dans le cas de systèmes concentrés, la détermination de la structure d'une chaîne individuelle, comme son rayon de giration, n'est pas triviale. En effet, elle nécessite la deutération des chaînes pour faire des mélanges avec des pourcentages chaînes hydrogénées/chaînes deutérées variables.

Théorie rapide de la DNPA

D'après le cours Didier Lairez et l'HDR de Fabrice Cousin [60, 61].

Comme précisé dans le corps de texte, la DNPA consiste à envoyer un faisceau monochromatique de neutrons (de longueur d'onde λ) considéré comme une onde plane de fonction d'onde définie (Équation A.1) sur les atomes d'un échantillon qui diffuseront l'onde en des ondelettes sphériques (Figure A.1).

$$\psi = \psi_0 \cdot e^{i(\omega t - k_i x)} \quad (\text{A.1})$$

où ω est la pulsation et $||\vec{k}_i|| = 2\pi/\lambda$ est la norme du vecteur d'onde.

La probabilité qu'un atome de l'échantillon étudié diffuse l'onde plane incidente est proportionnelle à l'aire σ de la surface de l'interaction entre l'atome en question et le rayonnement neutron. On définit σ comme la section efficace de diffusion et peut s'écrire sous la forme $\sigma = b^2$ où b est la longueur de diffusion d'un atome qui caractérise la portée des interactions entre les neutrons et l'atome considéré.

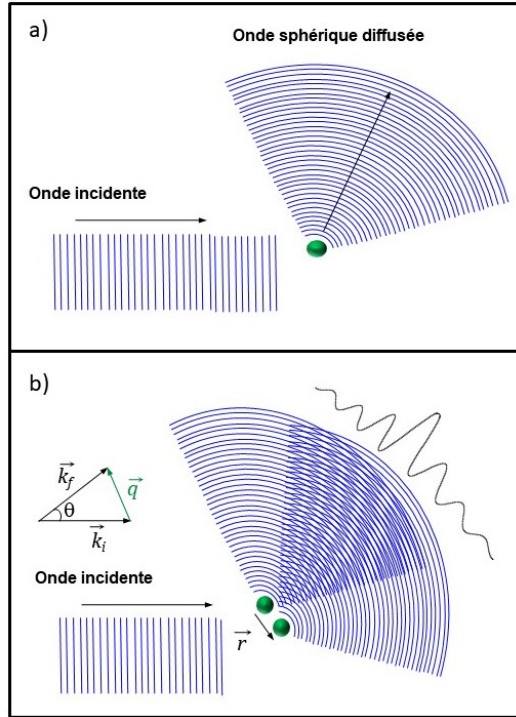


FIGURE A.1 – Schéma illustrant la diffusion de l'onde incidente plane par a) 1 atome diffusant une ondelette sphérique b) 2 atomes se trouvant à une distance définie par le vecteur $\vec{r}$ diffusant chacun une ondelette sphérique qui interfèrent l'une avec l'autre.

L'intensité I de l'onde diffusée est égale au produit de σ et du flux incident ϕ et, lorsqu'elle recueille par un détecteur de surface s situé à une distance D de l'échantillon, elle est proportionnelle au rapport des aires $\Omega = s/D^2$. On peut alors définir :

$$I = \sigma \times \phi = \phi \left(\frac{b}{D}\right)^2 s \quad (\text{A.2})$$

I est égale au carré de la fonction d'onde défini par l'équation :

$$\psi = \psi_0 \left(\frac{b}{D}\right) e^{i(\omega t - k_i D)} \quad (\text{A.3})$$

Comme présenté sur la Figure A.1 b), les ondes diffusées par les atomes qui composent l'échantillon interfèrent plus ou moins en fonction de la phase de ces dernières. Une onde de vecteur $\vec{k}_i$ d'un atome séparé d'un vecteur $\vec{r}$ d'un atome voisin est déphasé de $\vec{r} \cdot (\vec{k}_f - \vec{k}_i) = \vec{r} \cdot \vec{q}$

où $\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i$ est le vecteur de diffusion dont la norme est $q = \sin(\theta/2)4\pi/\lambda$.

L'onde ψ diffusée par n atomes d'un échantillon est donc la somme des ondes $i\psi_i$ diffusées par chaque atome.

$$\psi = \frac{\psi_0}{D} \times \sum_{i=1}^n b_i e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_i} \quad (\text{A.4})$$

Sachant que $I = \psi^2$, on peut définir la section efficace différentielle de diffusion $d\sigma/d\Omega(q)$ comme :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \sum_{i,j} b_i b_j e^{(-i\vec{q} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j))} \quad (\text{A.5})$$

La Figure A.2 présente le schéma du principe d'une expérience de diffusion de neutrons aux petits angles.

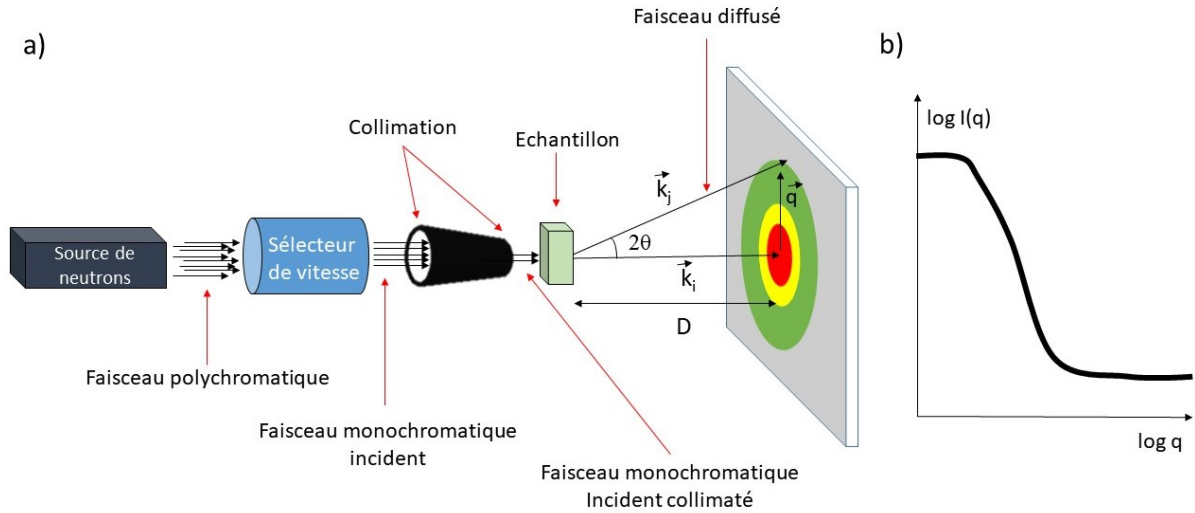


FIGURE A.2 – Schéma décrivant une expérience de diffusion de neutrons aux petits angles. Les couleurs sur le détecteur présentent l'image des intensités diffusées recueillies, le rouge représente l'endroit où le plus grand nombre de neutrons est enregistré et le vert, l'endroit où le nombre est le plus faible. b) Spectre caractéristique obtenu après intégration angulaire du signal.

Traitement d'un signal mesuré par DNPA et configurations utilisées pour les expériences

L'intensité de diffusion d'un échantillon I_{dif} est fonction de I_ϕ l'intensité du flux incident ϕ mais également de l'angle solide $\Delta\Omega$ formé par le détecteur depuis les atomes diffuseurs de l'échantillon, de la section efficace de diffusion $d\Sigma(\theta)/d\Omega$ et du nombre de neutrons absorbé par l'échantillon.

$$I_{dif} = I_\phi \Delta\Omega \left(\frac{d\Sigma(\theta)}{d\Omega} \right) T_{ech} e_{ech} \quad (\text{A.6})$$

où :

- T_{ech} est la transmission de l'échantillon et e_{ech} est l'épaisseur de l'échantillon.
- $I_{FV} = J_O(\lambda)A_{diaph}\epsilon_{det}(\lambda)$ où $J_O(\lambda)$ est le flux incident, A_{diaph} à l'aire du diaphragme permettant sa collimation et $\epsilon_{det}(\lambda)$ est l'efficacité de détecteur. L'efficacité du détecteur correspond au rapport du nombre de neutrons détecté sur le nombre de neutrons émis.
- La section efficace de diffusion de l'échantillon correspond à la section efficace différentielle de diffusion $d\sigma/d\Omega(q)$ divisé pour le volume d'échantillon sondé (V) où $V = e_{ech} \times A_{diaph}$.

L'intensité de diffusion présentée ici est une intensité brute et ne correspond pas à l'intensité absolue de l'échantillon. Il faut alors soustraire du signal les intensités de diffusion ne provenant pas de la diffusion seule de l'échantillon et normaliser le signal d'un échantillon dont le signal est plat, et ce afin de tenir compte des hétérogénéités de comptage du détecteur (on utilise de l'eau légère).

On pourrait décomposer l'intensité de diffusion brute I_{diff} de la manière suivante :

$$I_{diff} = I_{ech} + I_{solvant} + I_{cell} + I_{envir} \quad (A.7)$$

où I_{ech} est l'intensité de diffusion que l'on veut extraire, $I_{solvant}$ est l'intensité de diffusion du solvant dans lequel se trouve l'échantillon, I_{cell} est l'intensité de diffusion de la cellule dans laquelle est mis l'échantillon et I_{envir} est l'intensité de diffusion de l'environnement que l'on définit comme un bruit de fond (bdf).

Pour traiter un signal DNPA, il faudra donc mesurer la transmission et la diffusion du solvant, de la cellule de mesure vide et du bruit de fond (en utilisant un matériau absorbant les neutrons). Il est à noter que dans notre cas, le solvant utilisé était de l'eau lourde, ce qui nous a permis de déterminer la structure de nos chaînes de polyGalA. L'intensité de diffusion absolue est donc obtenue en appliquant la formule :

$$I(q)(cm^{-1}) = I(q) \times \frac{\frac{1}{e} \frac{I_{ech} - I_{bdf}}{T_{ech}} - \frac{I_{CV} - I_{bdf}}{T_{CV}}}{\frac{1}{e} \frac{I_{H_2O} - I_{bdf}}{T_{H_2O}} - \frac{I_{CV_{H_2O}} - I_{bdf}}{T_{CV_{H_2O}}}} \times \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{1mmH_2O} \quad (A.8)$$

où T sont des valeurs de transmission de l'échantillon (ech), de la cellule vide (CV) et de l'eau (H_2O), I sont les intensités diffusées de l'échantillon (ech), de la cellule vide (CV), de l'eau (H_2O) et du bruit de fond (bdf), e sont les épaisseurs des échantillons et $(d\sigma/d\Omega)_{1mmH_2O}$ est la section efficace différentielle de diffusion d'1 mm d'eau légère.

L'intensité de diffusion de l'échantillon est donc égale à $I_{chaines}$ (intensité de diffusion des chaînes) + $I_{solvant}$ (intensité de diffusion du solvant), nous avons donc soustrait la contribution du solvant en utilisant la méthode du point loin.

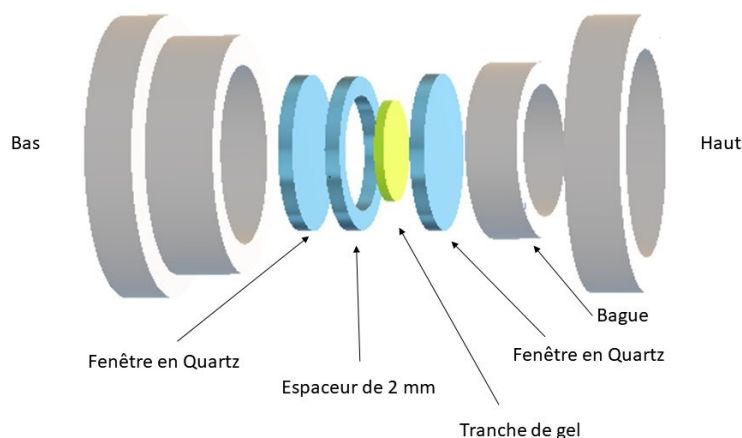


FIGURE A.3 – Schéma illustrant la cellule de mesure que nous avons utilisé pour mettre nos tranches de gel sous faisceau.

La Figure A.3 présente le schéma de la cellule que nous avons utilisée pour obtenir les spectres DNPA sur les hydrogels. Nous avons donc placé une tranche de gel à l'intérieur d'un espaceur de 2 mm qui permet d'avoir une épaisseur contrôlée des tranches malgré une découpe manuelle. Dans le cas des mesures DNPA présentées dans les sections 3.2.1 et 3.2.2 nous avons précisé que l'épaisseur de certains gels formés était inférieure à 2 mm. Pour ces gels, l'intensité de diffusion du spectre n'est donc pas réelle par rapport à la concentration en polyGalA dans le gel car l'épaisseur de gel sondée par le faisceau est inférieure à 2 mm.

L'échantillon dans l'espaceur est ensuite placé entre deux fenêtres de quartz et l'ensemble est mis à l'intérieur de la cellule. Ces cellules sont composées de trois parties (*i*) La partie basse qui permet de disposer l'échantillon dans les fenêtres de quartz, (*ii*) Une partie haute qui vient se visser sur la partie basse et (*iii*) une bague qui vient appuyer sur les fenêtres de quartz lorsque l'on visse (*i*) et (*ii*) ensemble, ce qui permet de prévenir le séchage de l'échantillon.

Les différentes expériences DNPA présentées dans cette thèse ont été effectuées en utilisant 4 configurations de longueur d'onde et de distance échantillon-détecteur suivantes ($\lambda = 13 \text{ \AA}$, $D = 4,7 \text{ m}$; $\lambda = 13 \text{ \AA}$, $D = 3 \text{ m}$; $\lambda = 4,5 \text{ \AA}$, $D = 3 \text{ m}$; $\lambda = 4,5 \text{ \AA}$, $D = 1 \text{ m}$), ce qui nous a permis de sonder une gamme de vecteurs de diffusion allant de $0,0032$ à $0,5 \text{ \AA}^{-1}$.

Annexe B

Mesures de la distribution de tailles des chaînes de polyGalA

La mesure de la distribution de tailles des chaînes de polyGalA a été faite par des mesures de chromatographie d'exclusion de taille (SEC-HPLC). Comme son nom l'indique cette technique de chromatographie permet la séparation de molécules en fonction de leur masse moléculaire. Plus une molécule est grande plus elle aura un temps de rétention court et sortira de la colonne rapidement. À l'inverse, plus une molécule sera petite, plus elle sera retenue par la colonne qui est composée d'un matériau poreux et aura donc un temps de rétention long.

Pour nos mesures, nous avons tout d'abord procédé à la préparation de standards. Nous avons donc préparé une gamme d'étalonnage à partir de trois solutions de dextran de trois masses moléculaires distinctes (5 kDa, 50 kDa et 150 kDa). Chaque macromolécule standard sort de la colonne de chromatographie après un certain temps de rétention (t_R) et plus la masse moléculaire est grande plus le temps de rétention est court. À partir de ce t_R , nous avons pu calculer un volume de rétention (v_R) en utilisant l'équation B.1.

$$v_R = t_R * D \tag{B.1}$$

où D correspond au débit de la phase mobile au travers de la colonne (ici, 0,7 mL/min).

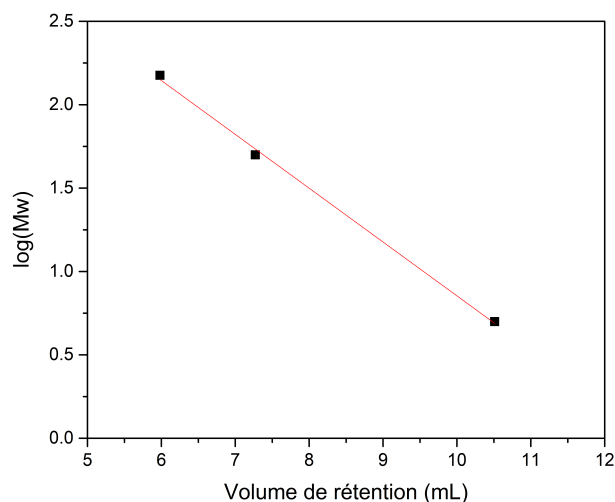


FIGURE B.1 – Courbe d'étalonnage présentant le logarithme décimal de la masse moléculaire (Mw) des chaînes de polyGalA en fonction du volume de rétention v_R .

La phase mobile qui a permis l'élution des macromolécules était une solution de nitrate de sodium (NaNO_3) préparée à une concentration de 8,5 g/L (ou 0,1 M). Cet éluant est classiquement utilisé pour la séparation des polyosides et permet d'être dans des conditions salines proches de celles que nous avons définies pour notre étude.[62]

En traçant le logarithme de la masse moléculaire en fonction de v_R , nous avons obtenu une droite étalon dont l'équation nous a permis de calculer la masse moléculaire (Mw) des populations présentes en solution (Figure B.1).

Le modélisation des courbes obtenues par SEC-HPLC par deux gaussiennes est convaincante en comparaison avec les résultats expérimentaux. Ces modélisations ont été faites pour les trois répétitions et les temps de rétention obtenus sont représentés dans le tableau B.1.

Echantillon	t_R premier pic (min)	t_R deuxième pic (min)
polyGalA 1 g/L 1	8,161	9,536
polyGalA 1 g/L 2	8,176	9,576
polyGalA 1 g/L 3	8,159	9,546

TABLE B.1 – Présentation des temps de rétention obtenus après modélisation des deux populations identifiées sur les trois répétitions

Annexe C

Titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme (ITC) mesure la variation de chaleur induite par le mélange de deux molécules susceptibles d'interagir. Lors de la formation d'un lien non-covalent entre deux molécules, i.e. lorsqu'elles passent d'un état libre à un état lié, de la chaleur est dégagée ou absorbée. L'appareil d'ITC enregistre ces changements de chaleur en mesurant l'énergie nécessaire à appliquer pour que la différence de température entre la cellule de mesure et la cellule de référence soit maintenue constante tout le long du mélange des molécules étudiées.

La cellule de référence est en général remplie d'eau ou de solution tampon. La cellule qui contient l'échantillon contient la molécule possédant les sites de fixation du ligand et la seringue, qui joue également le rôle d'agitateur, contient le ligand en question. Le ligand est injecté par petits volumes dans la cellule de mesure jusqu'à une concentration en ligand dans l'échantillon choisie. Chaque injection induit une variation de chaleur¹ qui est ensuite intégrée en prenant en compte le temps et la concentration en ligand dans la cellule de mesure pour cette injection donnée. Une courbe de titration présentant l'évolution de chaleur par rapport à la quantité de ligand en kcal/mol de ligand vs le rapport molaire (ligand/échantillon) est alors générée. L'isotherme résultante peut ensuite être modélisée afin d'obtenir les paramètres d'affinité (K_D), de stœchiométrie (N) et d'enthalpie (ΔH) de l'interaction [63]. Pour nos expériences, nous avons travaillé avec des solutions en cations et en fer très diluées afin de travailler avec un système homogène tout le long de l'acquisition (pas de formation de micro-gels) et pour que la chaleur dégagée soit représentative d'un nombre minimal d'interaction Fe^{2+} -unités GalA.

1. La variation de chaleur peut simplement être due à la perte de chaleur induite par la dilution des solutions lors du mélange

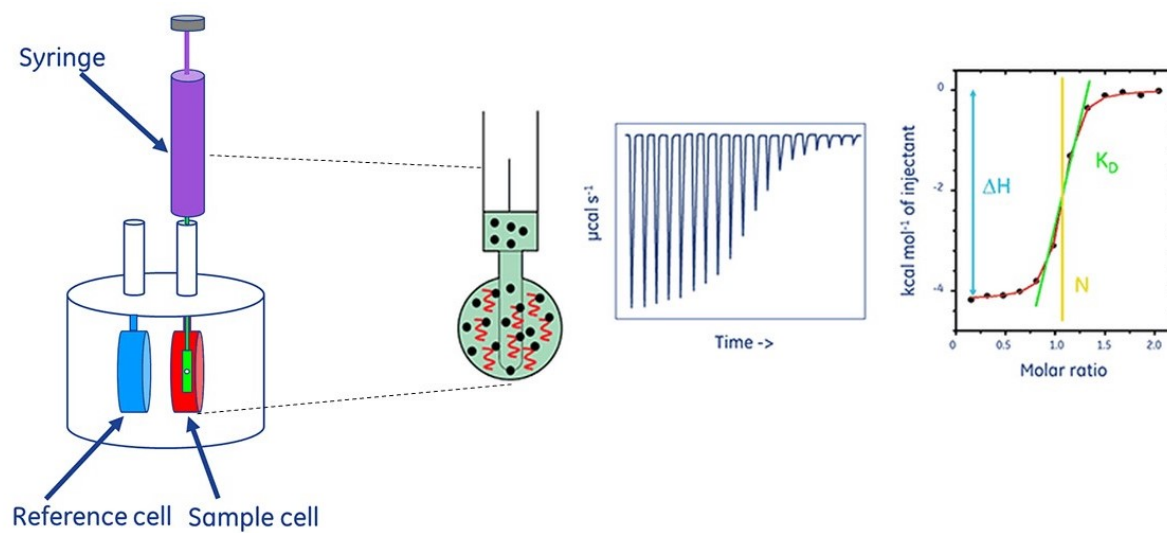


FIGURE C.1 – Schémas expliquant le principe de l'ITC d'après Malvern[63]

Annexe D

Mesures des propriétés mécaniques

Les hydrogels sont des matériaux visco-élastiques dont les propriétés mécaniques peuvent être déterminées par des mesures de rhéologies dites de grandes déformations ou de petites déformations [64]. Ces notions de déformations dépendent du pourcentage de déformation appliqué à l'échantillon pendant la mesure et de la modification définitive de la structure du matériau.

Rhéologie grandes déformations

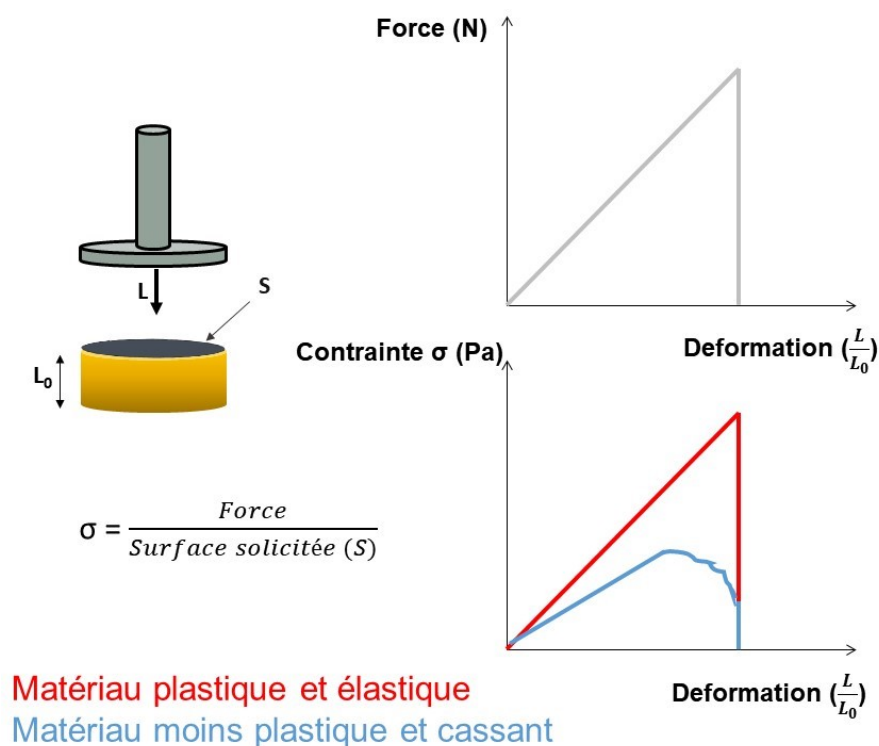


FIGURE D.1 – Principe d'une expérience de mesure de compression pour déterminer le module de Young d'un échantillon

La rhéologie grandes déformations consiste à appliquer une importante déformation, en comprimant ou en tirant sur un échantillon. Cette importante déformation permet le plus souvent de caractériser le module de Young, i.e. le module élastique, et la force à la rupture d'un échantillon.

Dans le cas des tranches de gel que nous avons sondées, nous avons comprimé les échantillons jusqu'à une déformation de 30 % de leur épaisseur initiale L_0 ($L/L_0 = 30\%$) (Figure D.1). Lors de cette déformation, le module qui comprime l'échantillon sur une surface S enregistre une force F . On déterminera alors une contrainte correspondant au rapport de la force enregistrée par le module sur la surface S sollicitée. Le module de Young est ensuite défini par la pente à l'origine de la courbe $\sigma = f(\text{Déformation})$ dans la zone de plasticité. Plus un matériau est rigide, plus son module de Young sera important. Dans le cas d'un gel, on pourra obtenir une courbe similaire à la courbe bleue de la Figure D.1. On pourra alors déterminer la module de Young en déterminant la pente à l'origine de la courbe puis la contrainte à la rupture au changement de pente.

Rhéologie petites déformations

La rhéologie petites déformations ou rhéologie dynamique consiste à appliquer une faible déformation de manière cyclique, en cisillant ou en tirant sur un échantillon. Dans le cas des hydrogels, elle permet de sonder les modules élastiques G' et visqueux G'' des échantillons.

Nous avons utilisé une géométrie plan-plan qui nous a permis de solliciter l'échantillon pour une fréquence et une déformation données. Dans la zone de linéarité visco-élastique, i.e. quand la fréquence et la déformation fixées n'engendrent pas l'écoulement de l'échantillon, nous avons effectué des déformations à des périodes définies (Balayage en fréquence présenté dans le chapitre 3). Lorsque qu'un matériau est totalement élastique, la contrainte σ résultante du cisaillement γ est en phase avec cette dernière. On définira alors le déphasage δ comme nul. A l'inverse, lorsqu'un échantillon est totalement visqueux, on observe un déphasage total de la contrainte mesurée par rapport à la déformation initiale et donc $\delta = \pi/2$. Dans le cas d'un matériaux visco-élastique, on définit la contrainte :

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (\text{D.1})$$

où σ_0 est l'amplitude de l'oscillation correspondante à la contrainte, ω est la pulsation en rad/s et t le temps.

On détermine ensuite les modules G' et G'' à partir de l'équation complexe :

$$\sigma = [G' + iG'']\gamma \quad (\text{D.2})$$

et

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (\text{D.3})$$

où $\tan \delta$ est le facteur de perte .

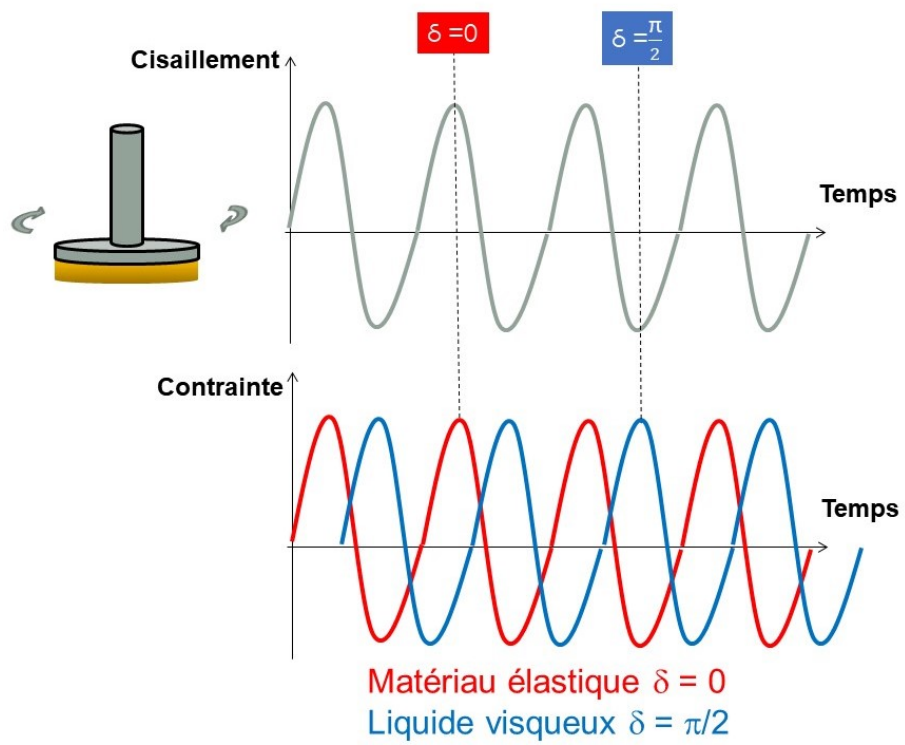


FIGURE D.2 – Principe d’une expérience de rhéologie dynamique

Annexe E

Spectroscopie d'Absorption X

Illustration du phénomène d'absorption

Nous avons présenté rapidement la théorie de la spectroscopie XAS dans le chapitre 4. Nous souhaitons illustrer plus en détail le phénomène photoélectrique qui a lieu lors de l'excitation des électrons de niveaux de cœur d'un atome donné par l'absorption d'un photon possédant une énergie $h\nu$ (Figure E.1).

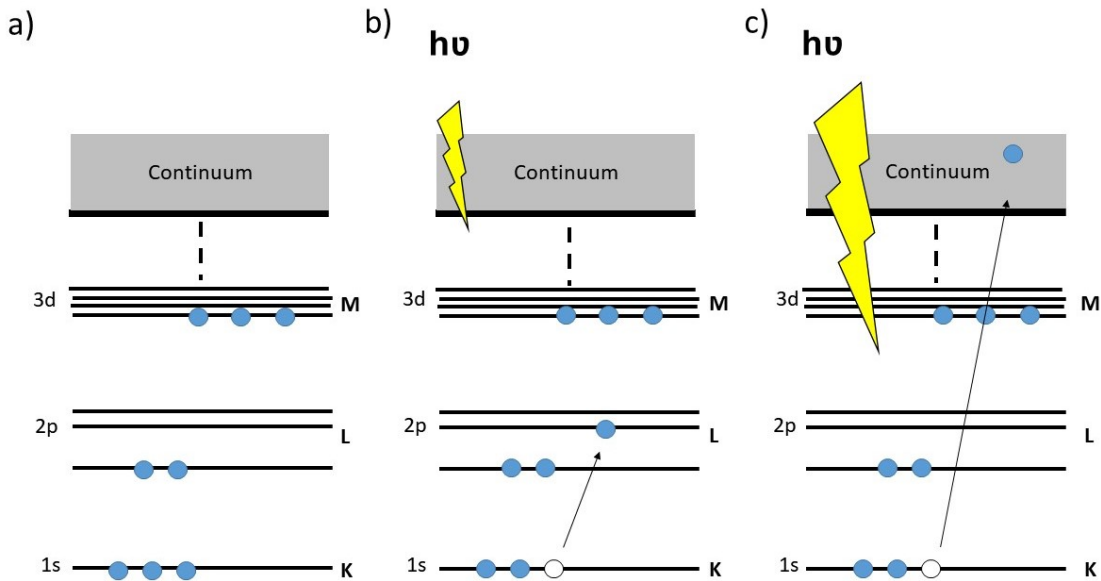


FIGURE E.1 – Principe de l'excitation des électrons de cœur d'un atome par des photons d'énergie $h\nu$. a) présente l'organisation des niveaux de cœur d'un atome donné dans son état fondamental. b) présente l'éjection d'un électron de niveau 1s par absorption d'un photon de faible énergie. c) présente l'éjection d'un électron de niveau 1s par absorption d'un photon de haute énergie.

La Figure E.1 a) présente la configuration électronique des niveaux de cœur d'un atome donné. La Figure E.1 b) illustre l'excitation du niveau 1s, correspondant au seuil d'absorption K, d'un atome donné par l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ inférieure à l'énergie du seuil d'absorption.

La Figure E.1 c) illustre les phénomènes que l'on mesure au delà du seuil d'absorption E_0 où l'on suit l'éjection d'un photon dans le continuum et la création d'un trou de niveau de cœur. L'énergie cinétique E_c du photoélectron émis est alors définie par l'équation :

$$E_c = h\nu - E_0 \quad (\text{E.1})$$

Ligne de lumière

Nous avons effectué nos mesures sur la ligne de lumière SAMBA (Spectroscopy Applied to Material Based on Absorption) du synchrotron SOLEIL. La Figure E.2 présente le fonctionnement de la ligne.

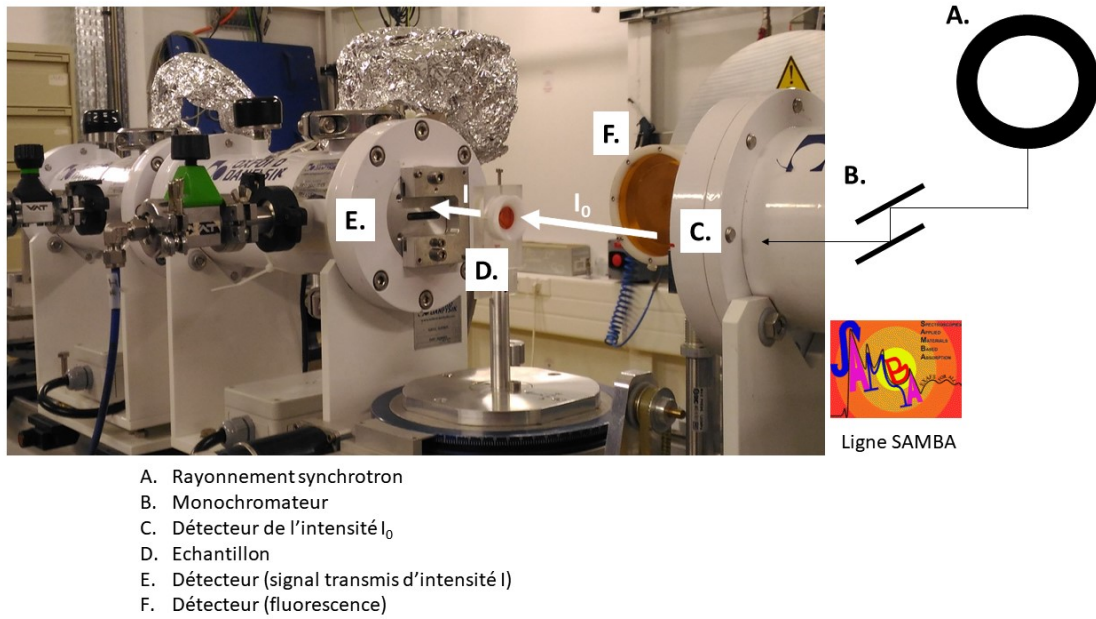


FIGURE E.2 – Schéma de fonctionnement de la ligne SAMBA du Synchrotron SOLEIL

Le faisceau de lumière provient de l'anneau du synchrotron (A. Figure E.2) [65] et arrive sur la ligne en rencontrant un monochromateur (B. Figure E.2) qui va permettre de sélectionner les énergies souhaitées pour les mesures. Une fois l'énergie souhaitée sélectionnée, le faisceau possède une intensité I_0 et est envoyé sur l'échantillon (D. Figure E.2). Dans le cas d'une mesure classique en transmission, le signal transmis, correspondant aux photons non absorbés, a une intensité I et est recueilli au niveau du détecteur (E. Figure E.2).

$$I = I_0 e^{-\mu(E)x} \quad (\text{E.2})$$

Loi de Beer-Lambert où : x est l'épaisseur de l'échantillon et $\mu(E)$ est le coefficient d'absorption fonction de l'énergie des photons incident.

Les mesures en transmission sont réalisées lorsque la concentration en photoabsorbeurs est suffisamment importante ($\sim 0,05$ M) pour avoir un bon rapport signal/bruit. Lorsque la concentration en photoabsorbeurs est faible, on mesurera l'absorption des photons par la mesure du signal de fluorescence émis (F. Figure E.2)

Cellule de mesure

Les mesures des signaux XAS sur les différentes tranches de gel ont été possibles grâce à l'utilisation de cellules fabriquées au Laboratoire Léon Brillouin. Le montage est illustré par la Figure E.3.

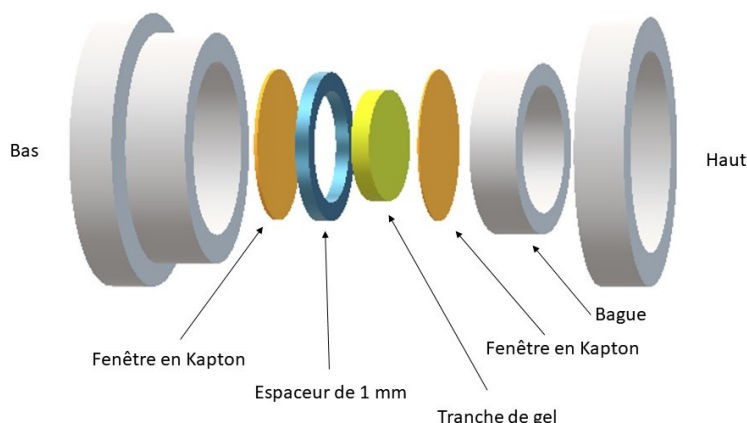


FIGURE E.3 – Schéma des cellules de mesures et de la disposition de la tranche de gel à l'intérieur de cette dernière.

La Figure E.3 présente le schéma de la cellule que nous avons utilisé pour obtenir les spectres XAS sur les hydrogels. Nous avons donc placé une tranche de gel à l'intérieur d'un espaceur de 1 mm qui permet d'avoir une épaisseur contrôlée des tranches malgré une découpe manuelle.

L'échantillon dans l'espaceur est ensuite placé entre deux fenêtres de Kapton, n'absorbant pas les photons, et l'ensemble est mis à l'intérieur de la cellule. Ces cellules sont composées de trois parties (i) La partie basse qui permet de disposer l'échantillon dans les fenêtres de kapton, (ii) Une partie haute qui vient se visser sur la partie basse et (iii) une bague qui vient appuyer sur les fenêtres de kapton lorsque l'on visse (i) et (ii) ensemble, ce qui permet de prévenir le séchage de l'échantillon.

Traitement de données

Les données expérimentales et les données issues des simulations de dynamique moléculaire ont été analysées à l'aide du logiciel GNXAS développé par A. Filipponi et A. Di Cicco [66].

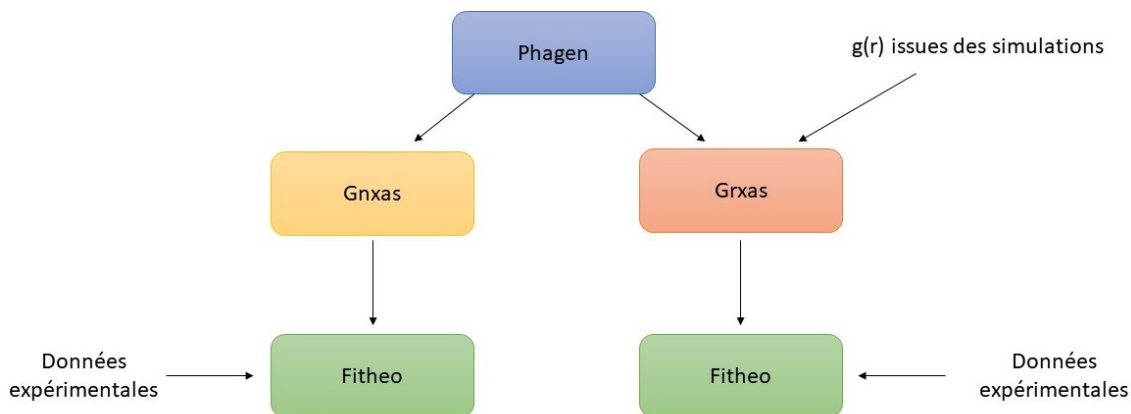


FIGURE E.4 – Schéma décrivant les étapes de l'analyse des données EXAFS.

La Figure E.4 présente les différentes sous-unités qui composent le logiciel :

- Phagen : C'est la première étape du traitement des données que ce soit pour l'analyse des données expérimentales ou pour celles des données issues des simulations. Cette sous-unité du logiciel permet de déterminer les différences de phases du système étudié à partir de données structurales de l'atome étudié. Dans notre cas, nous avons déterminé la phase du fer, celle des oxygènes et celle des hydrogènes, en considérant d'une part tous les oxygènes comme équivalents et d'autre par tous les hydrogènes comme équivalents.
- Gnxas : Cette étape de l'analyse des données expérimentales permet de calculer les signaux EXAFS théoriques.
- Grxas : Cette étape est utilisée pour calculer les signaux EXAFS théoriques à partir des $g(r)$ obtenues d'après les simulations de dynamique moléculaire
- Fitheo : La dernière étape de l'analyse des données expérimentales permet soit de faire une modélisation des données expérimentales soit de comparer le spectre théorique, calculé à partir des $g(r)$ des simulations, avec le spectre EXAFS expérimental.

Détermination du meilleur potentiel d'interaction décrivant la géométrie du fer dans l'eau à partir des mesures EXAFS

Nous avons comparé les potentiels des différents champs de force existants (comme présentés dans la chapitre 4) pour modéliser les interactions Fe-Oxygènes de l'eau.

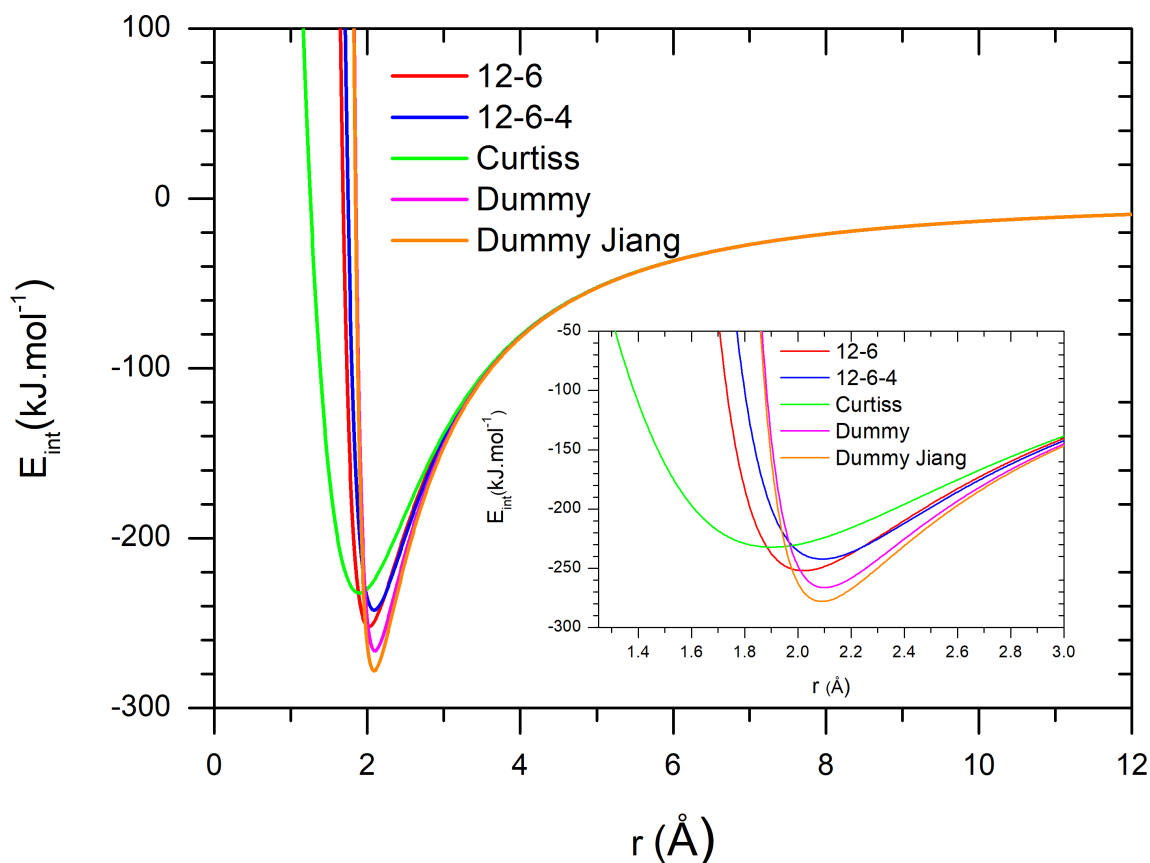


FIGURE E.5 – Potentiels d'interaction en fonction de la distance Fe-Oxygène de l'eau pour les champs de force Curtiss, 12-6, 12-6-4, Dummy et Dummy Jiang.

La Figure E.5 présente les 5 potentiels utilisés dans la littérature pour décrire le fer dans l'eau et qui nous ont servi de base pour l'étude du mode d'association Fe-GalA (dans le chapitre 4 Curtiss devient Curtiss/12-6-4 et Curtiss/12-6). La confrontation des expériences avec les 6 potentiels (sans contrainte) montrent que les champs de force 12-6 et Dummy-Jiang permettent potentiellement de modéliser les interactions Fe-GalA. Nous avons voulu identifier les potentiels pouvant modéliser à la fois le fer dans le gel et le fer dans l'eau car, comme nous l'avons présenté dans le chapitre 4, un certain nombre de molécules d'eau peuvent rester associées au fer dans le gel.

Le signal EXAFS calculé à partir du champ de force Dummy-Jiang n'est pas en accord avec le signal expérimental du fer dans l'eau comme le montre la Figure E.6 a) alors qu'il présentait un accord correct pour le fer dans le gel. La Figure E.6 b) compare le signal EXAFS calculé pour le champ de force 12-6 avec le spectre expérimental du fer dans l'eau. Ce champ de force présente un meilleur accord que le champ de force précédent mais n'est cependant pas totalement satisfaisant. Ces résultats indiquent qu'aucun de ces champs de force n'est capable de reproduire de manière satisfaisante l'interaction du fer à la fois avec l'eau et avec le polyGalA. C'est la raison pour laquelle nous avons dû les modifier.

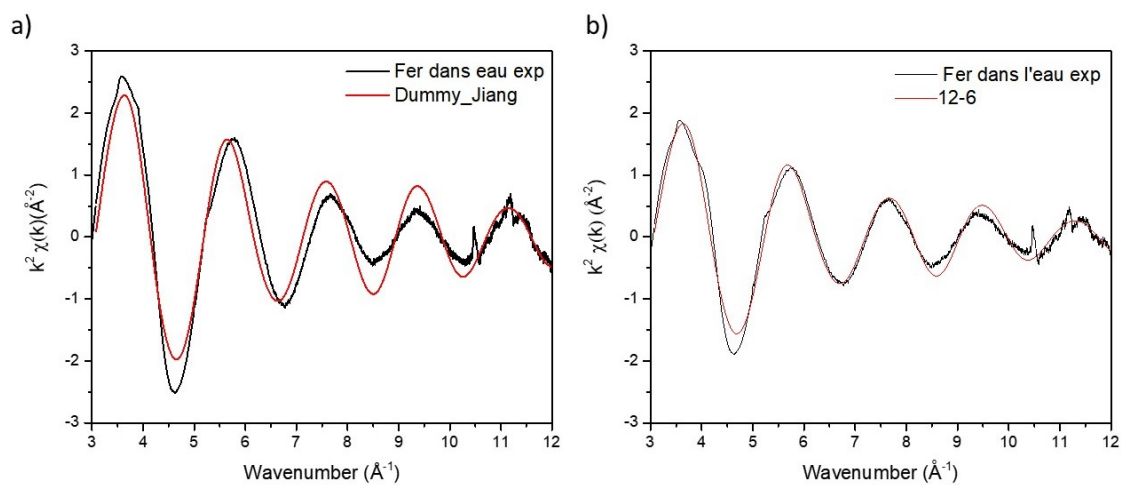


FIGURE E.6 – Comparaison des spectres EXAFS du fer dans l'eau simulés à partir des champs de force a) Dummy Jiang et b) 12-6 (courbes rouges) avec le signal EXAFS expérimental (courbe noire).

Annexe F

Draft de l'étude sur l'incorporation d'une protéine modèle dans les hydrogels Ca^{2+} -polyGalA

Suite aux résultats présentés dans le chapitre 5, nous avons souhaité simuler l'incorporation d'une molécule active au sein des hydrogels Ca^{2+} -polyGalA afin de comprendre comment ces hydrogels peuvent être utilisés comme matrice d'encapsulation. Pour ce faire, nous avons utilisé une protéine globulaire (14 - 22 Å de diamètre¹), la β -lactoglobuline (BLG) souvent utilisée comme protéine modèle. Nous avons fixé des conditions physico-chimiques pour lesquelles les protéines et les chaînes de polyGalA sont chargées négativement et n'agrègent donc pas² (Figure 4). Nous avons ensuite placé le mélange polyGalA/protéine dans le tube en verre nous permettant la formulation des hydrogels et avons fait diffuser les ions calcium au travers cette solution en utilisant le même protocole que celui décrit dans le chapitre 3.

Les gels obtenus ont été découpés en tranches (S1 est la tranche la plus proche de la membrane de dialyse et S4 la plus éloignée), comme nous l'avons décrit dans le chapitre 3 et nous avons caractérisé les propriétés mécaniques des différentes parties du gel (Figure 1), déterminé la structure des hydrogels aux échelles locales sondées par DNPA (Figure 5) et mesuré la capacité des différentes parties du gel à relarguer la protéine (Figure 3).

Les mesures des propriétés mécaniques ont montré qu'en présence ou en absence de protéines, les modules de Young des différentes tranches de gel sont identiques ce qui prouve que la BLG ne perturbe pas la formation du réseau de polyGalA. Les mesures de DNPA ont vérifié que la présence des protéines ne modifiait pas la structure locale du réseau et qu'elles décoorent le réseau en se plaçant soit dans les mailles du réseau, qui voient leur taille augmenter de S1 vers S4, soit dans les zones moins denses en chaînes du gel. Cette hypothèse a pu être validée par la mesure du taux de relargage de la protéine au cours du temps dans les différentes tranches de gel. Les tranches S1 relarguent moins de protéines au cours du temps que les tranches S4, comme le montre la Figure 3. Ce résultat indique que la protéine est relarguée plus rapidement

1. Le diamètre de la protéine est plus petit que la taille maille du réseau dans la partie du gel proche de la membrane de dialyse ($\xi \sim 75$ Å)

2. La force ionique choisie permet également un écrantage des charges suffisant pour que les macromolécules n'interagissent pas.

par la partie du gel où les tailles de maille sont les plus grandes et où les hétérogénéités mésoscopiques sont présentes. Nous avons schématisé la répartition probable des protéines pour les tranches S1 et S4 à $t = 0$ et à $t = 3$ h de dissolution dans du NaCl et donc du relargage des protéines (Figure F.1).

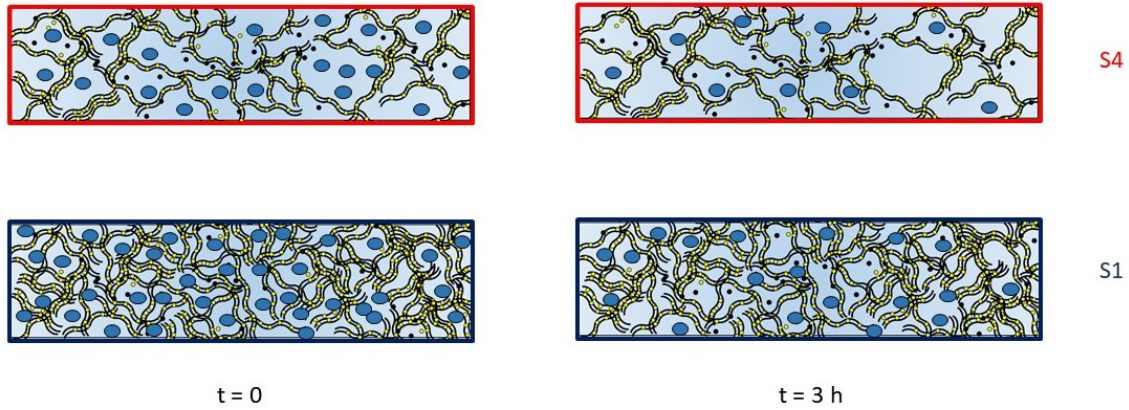


FIGURE F.1 – Schémas présentant la répartition des protéines dans les tranches S1 (en bleu) et les tranches S4 (en rouge) à $t = 0$ et $t = 3$ h de dissolution

Journal propose dans l'ordre (Biomaterials, Soft matter, J. Phys. Chem B, Carbohydrate Polymers)

Controlled structure of Ca-polyGal hydrogels to control the release of bêta-lactoglobulin

Authors : Aline Maire du Poset, Fabrice Cousin*, Céline Rameau, Mikaela Börjesson, Claire-Madeleine Perdrillat, Camille Loupiac, Ali Assifaoui*

Abstract

The aim of this study is to design a mixed hydrogel by the diffusion of Ca^{2+} through a dialysis membrane, into an aqueous mixture containing both an anionic polysaccharide (sodium polygalacturonate, polyGal) and a native protein (betalactoglobuline, BLG). The mixed hydrogel obtained (Ca-polyGal-BLG) by this method (external gelation) is anisotropic. We have found that the Young modulus of the mixed hydrogel was less affected by the presence of the BLG indicating that the network was mainly governed by the structure of the Ca-polyGal gel. A progressive decrease of the polyGal and the BLG concentrations was observed from the nearest part from the dialysis membrane to the furthest part of the gel. Small angle neutron scattering (SANS) showed that the BLG remained native at the different part of the mixed hydrogel. In the nearest part of the gel, the release of the protein was delayed in comparison to the furthest part. Moreover, the mesh size of the network in the mixed hydrogel determined by SANS remained identical ($\xi_{\text{SANS}} = 70 \text{ \AA}$) all along the gel. We concluded that the BLG ($R_g = 14\text{-}22 \text{ \AA}$) decorated the Ca-polyGal gel. It was located in this mesh size where the protein release was slow (nearest part) but also in the mesoscopic heterogeneities where the protein release was faster (furthest part). Moreover, it was demonstrated that the presence of the protein allowed to reveal the mesh size of the network.

Such mixed hydrogel allowed us to control both the amount of the protein and the release profile its release and how. There is a gradient of the protein concentration which can be used to control the rate of the release of the protein.

Introduction

Polysaccharide hydrogels have received considerable attention in the biomaterials science because of their large applications in the drug delivery, tissue engineering, and biosensor fields due to their low toxicity, biocompatibility, availability and abundance in nature (Lin and Metters 2006; Vashist, Vashist et al. 2014; Li and Mooney 2016). Hydrogels have the ability to imbibe large amounts of water and to swell without dissolving due to chemical or physical crosslinking of individual polymer chains (Lin and Metters 2006; Vashist, Vashist et al. 2014). The multiscale structural properties of hydrogels are important for their function which are to protect, target and locally deliver drugs (proteins, vitamins...) in a controlled manner. Hydrogels can possess a wide range of mechanical properties (the stiffness can vary from 0.5 kPa to 5 MPa) which can be tuned to be matched with different soft tissues in the human body (Li, Illeperuma et al. 2014; Shin and Kim 2015). Hydrogels can be described as a network containing a crosslinked polymer and open spaces (meshes) between polymers chains which allow the diffusion of liquid and small molecules. Mesh size (ranged from 5 to 100 nm) is important in determining the physical properties of the hydrogels including mechanical strength, degradability, and diffusivity of the releasing molecule (Peppas, Keys et al. 1999; Peppas, Huang et al. 2000; Lin and Metters 2006). The mesh size (ξ) depends on polymer and crosslinker concentration as well as external stimuli such as temperature, pH and ionic strength (Ende and Peppas 1997). The mesh size determines how drugs diffuse: for large mesh size, the drug release process is dominated by diffusion with various kinetics; while for an extremely small mesh size (or large drug molecule), drugs remain physically entrapped inside the network unless the network degrades or the mesh size become larger (Singh, Chauhan et al. 2011; Li

and Mooney 2016). Relevant mechanical tests based on the theory of rubber elasticity and swelling tests provide indirect characterization of the hydrogel network (Tiziana and A. 1989; Branco, Pochan et al. 2009; Pescosolido, Feruglio et al. 2012; Li and Mooney 2016). To directly characterize the mesh size, there exist techniques such as microscopy (confocal, electron, atomic force), small-angle X-ray scattering (SAXS) and small-angle neutron scattering (SANS) (Singh, Chauhan et al. 2011; Bertz, Wöhl-Bruhn et al. 2013; Maire du Poset, Lerbret et al. 2018).

In this framework, we study here the structure of hydrogels composed by sodium polygalacturonate (polyGal) in the presence of native betalactoglobuline (BLG) (model protein). The incorporation of the protein into hydrogel delivery matrices can be performed via one of the following manners: (i) post-loading (absorption of proteins will occur after the hydrogel networks are formed or (ii) in-situ loading (proteins are mixed with polymer solution and hydrogel network formation and protein encapsulation are achieved simultaneously). In this study we were interested in the in-situ loading protein procedure. PolyGal is an anionic polysaccharide that is the main backbone chains of pectin, which is widely used in food and pharmaceutical science due to its ability to make a three-dimensional network in presence of various divalent cations (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} ...) (Lofgren, Walkenstrom et al. 2002; Ström, Ribelles et al. 2007; Ventura, Jammal et al. 2013; Huynh, Assifaoui et al. 2017; Maire du Poset, Lerbret et al. 2018). The ionotropic gelation of polyGal originates from the creation of ionic bridges between the carboxylate groups of galacturonate (Gal) units mediated by specific divalent cations. For its part, Beta-lactoglobulin (BLG) is a model close-packed and well-ordered protein that is one of the major components of whey protein from bovine milk which is known for its specific transporter activity (Kontopidis, Holt et al. 2004). This globular protein, which is easily isolated from raw milk (Fox, Holsinger et al. 1967), exhibits 162 residues, has a molecular weight of 18.3 kDa. The radius of gyration (R_g) is about 14 Å and 22

Å for the BLG under its monomeric and dimeric form, respectively (Renard, Axelos et al. 1996; Marleen, Skov et al. 1999).

In this study, Ca-polyGal-BLG gel was obtained by the diffusion of calcium ions through a dialysis membrane to a mixture of BLG-polyGal (external gelation). Both BLG and polyGal solutions were prepared in NaCl (10 mM) and at neutral pH where the two macromolecules are negatively charged. This mode of gelation induces the formation on an anisotropic gel accompanied with a gradient in the polymer concentration and in the Young modulus (Skjåk-Bræk, Grasdalen et al. 1989; Thu, Gåserød et al. 2000; Maire du Poset, Lerbret et al. 2018). We have shown previously that the structure of the Fe(II)-polyGal network determined by SANS was identical ($\xi = 75 \pm 5$ Å) all along the gel despite this significant gradient of polysaccharide concentration (Maire du Poset, Lerbret et al. 2018). The progressive decrease of chains concentration can be explained by the existence of heterogeneities at the mesoscopic scale with the presence of regions of low density within the gel. The main objective of this study is to understand (i) the impact of the BLG on the mechanical properties and the local structure of the mixed hydrogel (Ca-polyGal-BLG) and (ii) the impact of the properties of the polysaccharide network on the structure and the distribution of the protein along the mixed hydrogel as well as its release. Different parts of the mixed hydrogel (from the nearest part from the dialysis membrane to the furthest part) were characterized by various techniques: The Young modulus by stress-strain measurements, the local structure by SANS measurements, and the drug release profile by the assay of the released BLG by using UV spectroscopy.

Materials and Methods:

Materials:

Betalactoglobulin (BLG) was purified from (Lactoserum powder Bipro) according to the Fox method {Fox, 1967 #954}. After the purification step, the solution was dialyzed against NaCl solution (100 mM, pH = 7), freeze-dried and the powder was stored at 4 °C. Polygalacturonic

acid (PolyGal) (95% of purity, $M_w = 80$ kDa, $pK_a = 3.5$) was obtained from Sigma (St Louis, MO). Calcium chloride dehydrate and sodium chloride were purchased from Sigma Aldrich.

Methods:

Preparation of biopolymer solutions and mixtures:

BLG and polyGal powders were suspended separately in 10 mM of NaCl solution ($pH=7\pm0.3$) until a complete dissolution. The obtained solutions were dialyzed 3 times against NaCl solution (10 mM, $pH=7$) by using a dialysis membrane (MW cut-off 3.5 kDa). The initial concentrations of BLG and polyGal were 50 g/L and 30 g/L, respectively. After the dialysis steps, the pH was adjusted if necessary to $pH=7$. The final concentration of the BLG was determined by UV-visible spectrometer (at 280 nm). The mass extinction coefficient for the BLG used was equal to $\epsilon = 0.96$ (Kontopidis, Holt et al. 2004). The final concentration of the polyGal was obtained by the determination of dry matter (for 24 h at $100^\circ C$). Calcium chloride solution (100 mM) was prepared in NaCl (10 mM) at a fixed $pH=7$. Both BLG and polyGal solutions were mixed at various volumes in order to obtain specific mass ratios ($R_m = \text{BLG/polyGal}$) as shown in Table 1. For the mixture preparation, it must be noted that no phase separation was observed. All experiments were performed at room temperature.

Hydrogel preparation:

The gelation protocol was performed as previously described in the ref (Maire du Poset, Lerbret et al. 2018). Briefly, 5 mL polyGal alone or polyGal-BLG mixture was set up in cylindrical glass tube (21 mm diameter and 150 mm height) and with one end covered by a dialysis membrane (M_w cut-off= 3.5 kDa). The lower part of this tube was immersed into the calcium chloride solution for 24 hours which allow a complete gelation (Huynh, Chambin et al. 2018). All obtained gels were cut into 4 slices (noted S1 to S4) parallel to the cation diffusion front migration where S1 and S4 are the nearest and furthest slice, respectively.

		BLG (g/L)		
		5	10	20
polyGal (g/L)	10	P10B05	P10B10	P10B16
	20	P20B05	P20B10	P20B16

Table 1: Different polyGal-BLG mixtures tested.

Determination of both polyGal and BLG contents in the hydrogels:

After the gelation time (24 h), the obtained mixed hydrogel (Ca-polyGal-BLG) was cut into 4 slices (about 4 mm). For each slice, the exact thickness and weigh were determined. Each slice was then immersed in 50 mL of a NaCl solution (10 mM, pH=7.4) at 37°C until a full dissolution of the hydrogel. The final dispersion was then filtered (0.22 µm) and the amount of BLG in the slice was determined by UV-visible spectrometer (at 280 nm). In addition, each hydrogel slice was placed in an oven for 24 h at 105°C. The dry matter which is due to the difference of weigh between wet and dried hydrogel slice will correspond to the amount of (BLG, polyGal and minerals).

Mechanical properties:

For each hydrogel slice, the Young modulus (E) was determined by using a Stable Micro Systems TA-XT2 texture analyser equipped with a plate geometry (diameter 25 mm) and a 25 kg load cell. The stress was recorded while the sample was compressed at a constant rate of 0.2 mm/s until a final strain of 30%. The Young modulus (E) is then determined in the linear regime by the equation ($E = \text{stress} / \text{strain}$). All measurements were performed just after the gel formation in order to avoid the drying and syneresis of the samples.

In-vitro dissolution tests:

The protein release from the different hydrogel formulations was studied by using a dissolution Vankel VK6010 apparatus (VanKel Industries, Edison, NJ). An accurate gel slice or whole gel was placed into 50 mL of NaCl solution (10 mM, pH=7.0). The dissolution test was performed at fixed temperature (37°C) and under stirring (100 rpm). During the dissolution test, a fraction of the liquid (~3mL) was collected, filtered (pore size = 0.22 μm) and analyzed by using an UV-visible spectrometer ($\lambda=280\text{ nm}$). After each sample collection, the volume of the dissolution media was adjusted to 50 mL by a fresh NaCl solution (10 mM).

Small angle neutron scattering:

Small Angle Neutron Scattering (SANS) measurements were performed on the PACE spectrometer at Laboratory Léon Brillouin (CEA, Saclay France). Four configurations were used with two different neutron wavelengths and three sample-detector distances ($\lambda=13\text{Å}$, $D=4.7\text{m}$; $\lambda=13\text{Å}$, $D=3\text{m}$; $\lambda=4.5\text{Å}$, $D=3\text{m}$; $\lambda=4.5\text{Å}$, $D=1\text{m}$) that cover 0.0032-0.5 Å^{-1} wave vector range. The polyGal and BLG solutions as well as the mixed hydrogels were prepared in D_2O in order to obtain a good contrast and to minimize as much as possible the incoherent scattering. For the solutions (polyGal and BLG alone as well as the mixtures BLG-polyGal), quartz cells with a thickness of 2 mm were used. After the gelation process, cylindrical slices of 10 mm diameter and of 2 mm thickness corresponding to the different layers of the gels were placed between two quartz windows separated by a 2 mm spacer. Then, we trapped the gel in a home-made measurement cell in order to keep the sample away from air and water. During measurements, the incoming neutron beam was perpendicular to the faces of the cylinder. We applied standard corrections for sample volume, neutron beam transmission, empty cell signal,

and detector efficiency to the raw signal to obtain scattering in absolute units, and then removed the signal from the buffer.

Results:

Mechanical properties of the hydrogels:

All the hydrogel formulations presented in Table 1 was cut into 4 slices and the Young modulus (E) for each slice was determined (Figure 1). It must be noted that for BLG alone, no gel was formed in the studied conditions. For all the formulated hydrogels, a strong decrease of the gel rigidity was observed as a function of the thickness of the hydrogel. The Young modulus was almost 6 times higher for the slice 1 (nearest part of the dialysis membrane) than for the slice 4 (furthest part of the dialysis membrane). This tendency was observed previously in Fe(II)-polyGal gels (Maire du Poset, Lerbret et al. 2018) and was attributed to the external gelation method used which leads to anisotropic structures (Skjåk-Bræk, Grasdalen et al. 1989; Thu, Gåserød et al. 2000; Caccavo, Ström et al. 2016). The decrease of the rigidity seems to be more pronounced when the hydrogel was formulated with polyGal at high concentration (20 g/L) (Figure 1b). Moreover, the presence of the BLG inside the mixed hydrogel didn't affect significantly the evolution of the Young modulus, whatever the concentration of polygalacturonate (10 g/L or 20 g/L). We can thus suppose that the mechanical properties are mainly governed by the 3D-network created by the crosslinking polysaccharide (Ca-polyGal).

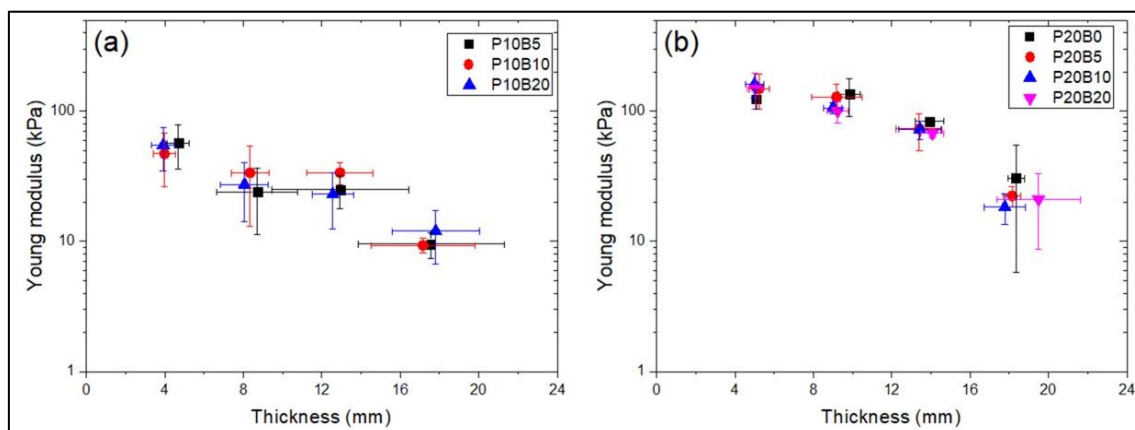


Figure 1: Evolution of the Young modulus as a function of the thickness of the Ca- hydrogel for (a) polyGal (10 g/L) and (b) polyGal (20 g/L). The initial concentration of the BLG inside the whole gel was changed from 5 g/L to 16 g/L. For each formulation, the hydrogel was prepared three times and was cut into 4 slices. Bar errors correspond to the variability due to the thickness and the Young modulus determinations.

Determination of the amount of dry matter in mixed hydrogels

Figure 2 showed the evolution of dry matter normalized by the volume of the slice (gel density) and the BLG concentration as a function of the thickness of the gel. Both the hydrogel density and the BLG concentration inside the mixed gel decreased from slice 1 to slice 4. The gel density was higher for the hydrogel prepared with the high concentration of the polyGal (20 g/L) which may explain the high Young modulus observed for Ca-P20B16 (Figure 1). The observed decrease of the amount of dry matter can be due to the gradient of the polyGal concentration (Thu, Gåserød et al. 2000; Maire du Poset, Lerbret et al. 2018). It must be noted that all the introduced BLG was not entrapped in the hydrogel. After 24h of gelation, we have observed a liquid on the top of the gel (syneresis) which contained a certain amount of BLG. We can thus calculate the loading capacity (LC) which correspond to the amount of BLG in the whole hydrogel divided by the nominal amount of BLG. The LC was equal to 70 ± 5 % and 75 ± 3 % for Ca-P10B10 and Ca-P20B16, respectively. The decrease of the BLG concentration

in the mixed gel is more marked for Ca-P20B16 than for Ca-P10B10 (Figure 2b). In order to compare the BLG concentration in both mixed hydrogel, we have multiplied the BLG concentration by 1.6 for Ca-P10B10 (insert in Figure 2b). The amount of the BLG in first slices (S1 and S2) was slightly higher in P20B16. The BLG concentration determined by SANS showed the same trend (supporting information).

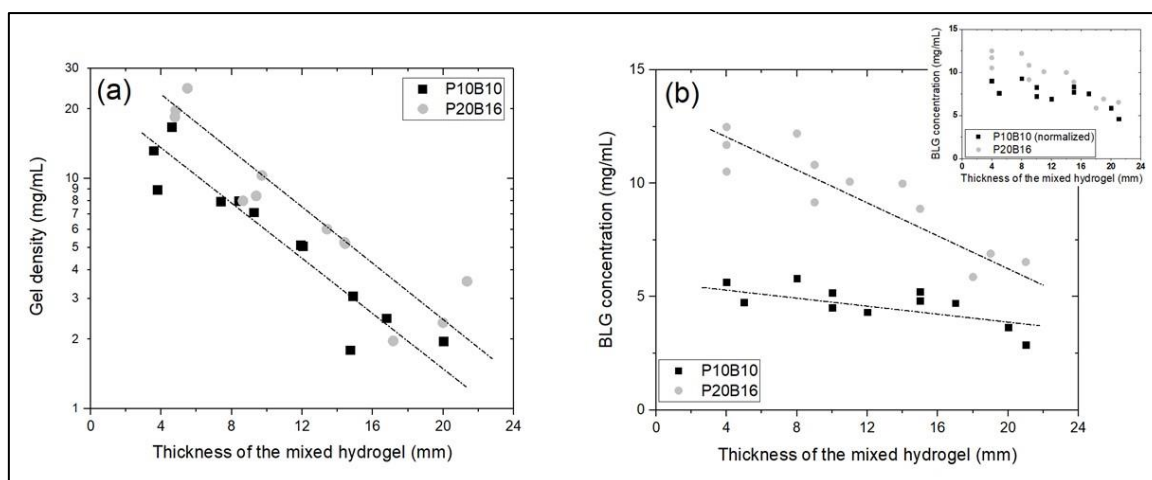


Figure 2: Evolution of the dry matter normalized by the volume of the slice (gel density) (a) and the amount of BLG determined by UV-visible (b) for Ca-P10B10 and Ca-P20B16. It was difficult to extract the amount of polyGal since the thickness of the slices for these two experiments was not the same. Note that the amount of minerals (calcium and sodium) can be neglected. Insert: the amount of BLG in Ca-P10B10 was multiplied by 1.6 in order to compare to Ca-P20B16.

In-vitro dissolution tests

Figure 3a showed the profile of the BLG release from the two mixed hydrogels Ca-P10B10 and Ca-P20B16. It was observed that the BLG release was delayed for Ca-P20B16 which could be correlated to the highest Young modulus observed previously (Figure 1). The release profiles curves were fitted by using the equation $(Q_t/Q_\infty = k(t)^n)$ where Q_t is the mass of protein released

at time t , Q_{∞} is the total mass of released drug, k is a release rate and n is the diffusional exponent (Ritger and Peppas 1987). We have determined both release rate (k) and the exponent (n) for all the 6 formulated mixed gels presented in Table 1 (Table xx, Figure xx supporting information). For all the mixed hydrogels, the protein release seems to be driven by the Fickian diffusion. Data showed that there are no significant differences in the release rate (1.3 – 2 % /min). It must be noted that the time required for the complete release of the BLG from the mixed hydrogel was around 24 hours. Lin et al. have shown that the release of bovine serum albumin from alginate–chitosan beads of 3 mm diameter was completed within 6 hours (Lin, Liang et al. 2005). The high diffusion time of the BLG out of the hydrogel could be explained by the effect of steric hindrance on drug diffusion which becomes prominent. This occurred when the gel mesh size approaches the drug size ($r_{\text{mesh}}/r_{\text{drug}} \approx 1$) (Li and Mooney 2016).

	k	n	R ²	K %/min (n=0.5)	R ²
Ca-P10B05	1.44±0.52	0.52±0.08		1.51±0.01	
Ca-P10B10	1.81±0.05	0.48±0.01		1.69±0.12	
Ca-P10B16	1.76±0.44	0.46±0.02		1.43±0.21	
Ca-P20B05	1.55±0.22	0.52±0.08		1.38±0.03	
Ca-P20B10	3.06±0.33	0.41±0.01		2.07±0.37	
Ca-P20B16	1.70±0.33	0.45±0.04		1.34±0.05	

A mettre en Supp Info.

The protein release profiles for each hydrogel slice for Ca-P10B10 and Ca-P20B16 were presented in Figure 3b and 3c, respectively. For P10B10, the release time of 30% of BLG was delayed as the thickness of the gel was increased (it was about 15, 27, 40 and 50 minutes for S1, S2, S3 and S4, respectively). For Ca-P20B16, the release time of 30% of BLG was more delayed than Ca-P10B10. It was about 30, 70, 80 and 100 minutes for S1, S2, S3 and S4, respectively. For all the gel slices, the power n was close to 0.5. The release rate (k) was constant in the nearest slices and increased for the furthest slices for both hydrogels (Table 2). Moreover,

the release rates for slices (5 and 3 % / minute for the slice 1 of Ca-P10B10 and Ca-P20B20, respectively) were significantly higher than those calculated for the release of the full mixed hydrogel (1.3 – 2 % /min).

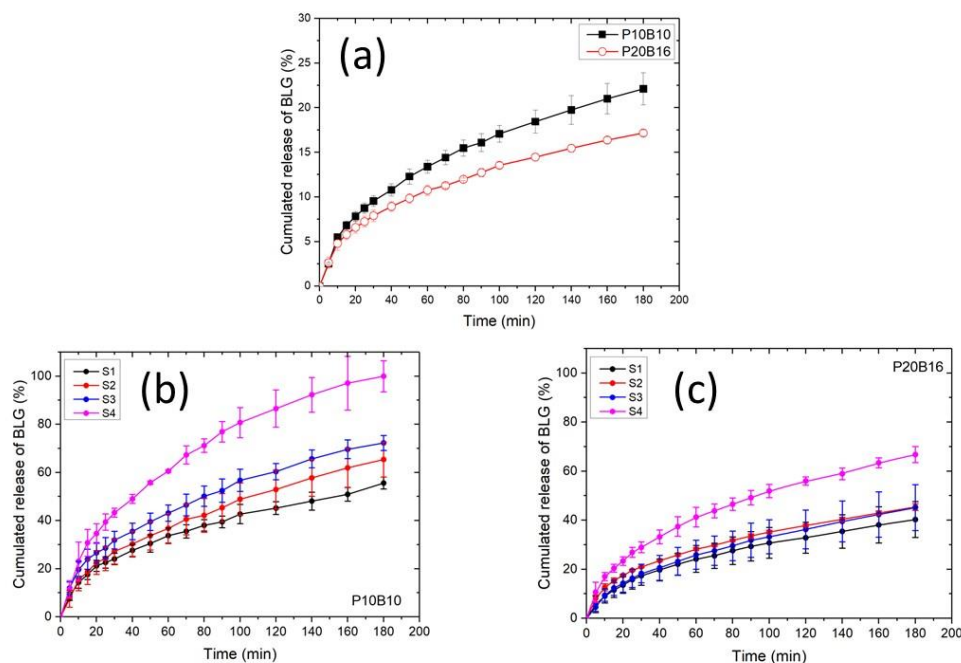


Figure 3: BLG release profiles of the full hydrogels P10B10 and P20B16 (a) and of 4 hydrogels slices: Ca-P10B10 (b) and Ca-P20B16 (c). The dissolution tests were performed at $T=37^{\circ}\text{C}$ and by using NaCl (10 mM) as dissolution media.

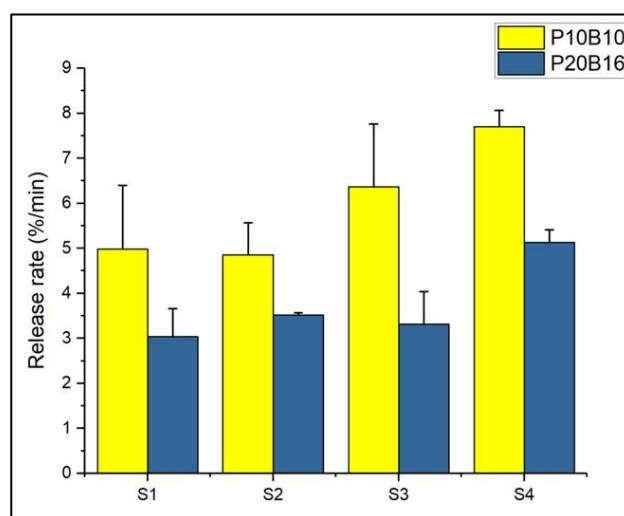


Figure 4: Evolution of the release rate (k) obtained by fitting the release profiles curves (Figures 3b and 3c) by the equation $Q_t/Q_{\infty}=k(t)^n$

	S1	S2	S3	S4
P10B10	5.0±1.4	4.8±0.7	6.4±1.4	7.7±0.4
P20B16	3.0±0.6	3.5±0.1	3.3±0.7	5.1±0.3

Table 2: Release rate (k) evolution (in %/min) for each hydrogel slices determined by fitting the release profiles curves (Figures 3b and 3c) by the equation $Q_t/Q_\infty = k(t)^n$.

SANS measurements:

Solution state:

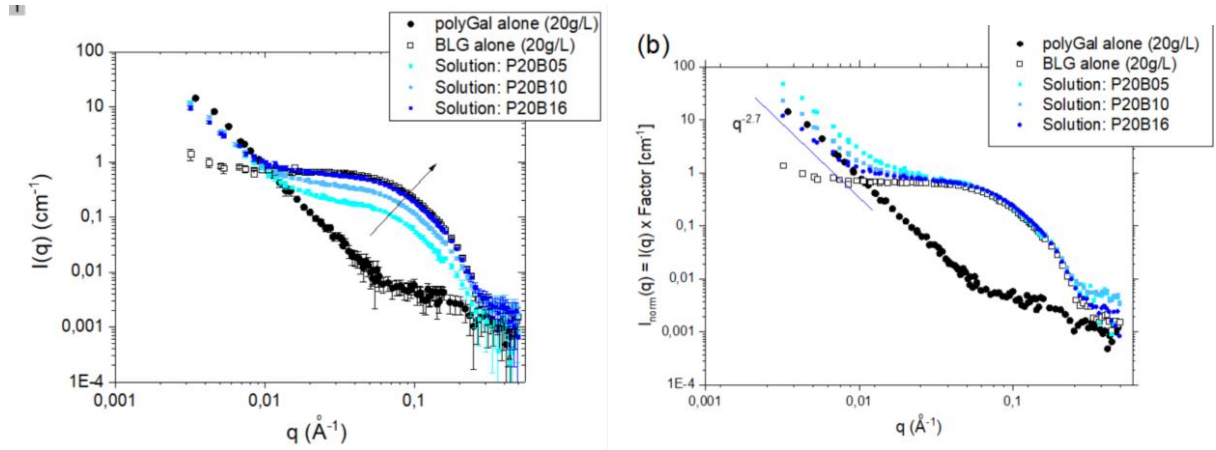


Figure 4: SANS spectra of polyGal, BLG and polyGal-BLG mixtures in solution state (a). For the mixtures P20B05, P20B10 and P20B16, the scattered intensity was multiplied by 4, 2 and 1.25, respectively (b).

Small angle neutron scattering (SANS) measurements were performed of polyGal and BLG solution and various mixtures (P20B05, P20B10 and P20B16) (Figure 4). For polyGal alone, the SANS spectrum showed two distinct regimes: the q^{-1} dependence which is characteristic of the rod-like behaviour and $q^{-2.7}$ scattering decay (at low q) indicating the presence of a limited aggregation of the polyGal chains. The persistence length (L_p) was obtained from the crossover of these two regimes and was estimated to be 70 Å (Maire du Poset, Lerbret et al. 2018). For the BLG alone, at large q ($q \sim 0.2 \text{ Å}^{-1}$), the scattering varies like q^{-4} (Porod scattering associated with the sharp interface between the compact globular protein and the surrounding medium). At low q , the curve flattens which corresponds to the Guinier regime $qR_g < 1$ (R_g radius of

gyration of the protein). We highlighted the absence of large protein aggregation. Between 0.1 and 0.006 Å⁻¹, data was fitted by using the Guinier equation (Equation xx) (Figure in supporting information) and the obtained R_g was equal to 17.7 Å. It must be noted that at pH=7, the BLG is in dimer form.

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

At large q, SANS spectra for all polyGal-BLG mixtures has similar trend as the free BLG (Figure 4a). However, the scattered intensity decreased as the concentration of the BLG decreased. In order to compare the scattered intensity of the mixtures to the free BLG (20 g/L), we have multiplied the scattered intensity (I_{mixture}) by the dilution factors (4, 2 and 1.25 for P20B05, P20B10 and P20B16, respectively). The results showed a perfect overlap between the normalized I_{mixture} and the I_{BLG} (Figure 4b). At this q-range, we probe the form factor of the objects and since the polyGal scattering is negligible, we can conclude that the scattered intensity comes only from the protein and that its form is the same in the mixture. Moreover, the normalized intensity is similar to the free BLG indicates that there is no phase separation or precipitation of the protein in the mixture. Schmidt et al. (Schmidt, Cousin et al. 2009) have observed the same trend in low methoxy pectin and lysozyme mixture. They have demonstrated for pectin-lysozyme and hyaluronan-lysozyme that matching the scattering of the two species (protein or polysaccharide) in a proper H₂O/D₂O would result in relatively small contrast for the other (Schmidt, Cousin et al. 2009; Morfin, Buhler et al. 2011). In this study, we didn't attempt matching experiments.

At low q, a slight decrease of the slope related to the free polyGal was observed as the amount of the BLG was increased (Figure 4a). This may indicate the presence of electrostatic repulsion between the polyGal and the BLG since they are both negatively charged at pH 7.

Gel state:

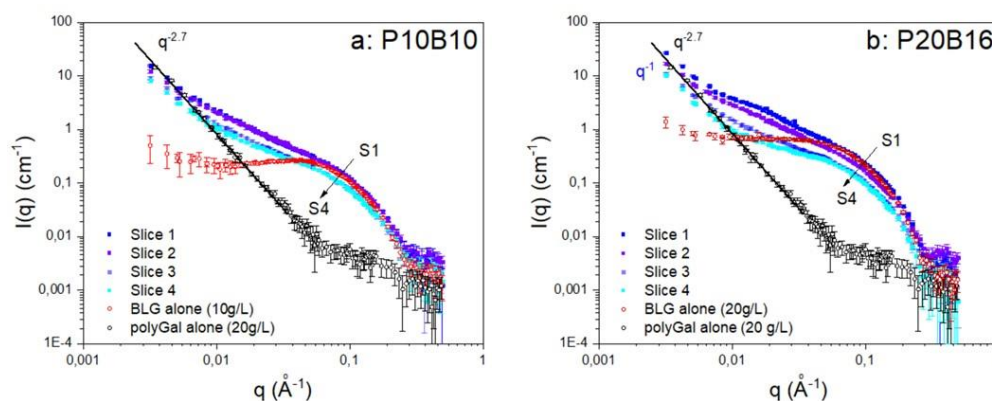


Figure 5: SANS spectra for both P10B10 (a) and P20B16 (b) gels at different slices from S1 (the nearest part) to S4 (the furthest part)

At large q , the scattered intensity of all hydrogels slices for both P10B10 and P20B16 has similar trend as the free BLG. Since the scattering intensity comes mainly from the protein, it indicates that the form factor of the protein is the same whatever the hydrogel slice. As the thickness of the gel was increased (from slice 1 to slice 4), a decrease of the scattered intensity was observed for both P10B10 and P20B16 hydrogels. This indicated the presence of a gradient of concentration which is in accordance with the results obtained in the determination of dry matter and the protein release (Figure 2). Since the scattered intensity is related to the concentration of the protein, we were able to determine precisely the amount of BLG inside the hydrogel. Thus, we have determined the factor where the spectra of each slice overlap perfectly the spectra of the free BLG (Figure in Supporting information). A decrease of the BLG concentration was observed as the thickness of the gel was increased (Table 3). The concentrations of the BLG determined by SANS was higher than those determined after the release of the protein from each slice (Figure 2b). This difference is probably due to the filtration step (0.22 μm) before the determination of the absorbance. Indeed, a certain amount of the BLG inside the hydrogel could be entrapped into the filter and thus the value was underestimated.

	S1	S2	S3	S4
P10B10	12	11	7	7
P20B16	22	16	10	9

Table 2: The concentration of BLG (g/L) inside both P10B10 and P20B16 hydrogel determined by SANS measurements.

- Bertz, A., S. Wöhl-Bruhn, et al. (2013). "Encapsulation of proteins in hydrogel carrier systems for controlled drug delivery: Influence of network structure and drug size on release rate." Journal of Biotechnology **163**(2): 243-249.
- Branco, M. C., D. J. Pochan, et al. (2009). "Macromolecular diffusion and release from self-assembled β -hairpin peptide hydrogels." Biomaterials **30**(7): 1339-1347.
- Caccavo, D., A. Ström, et al. (2016). "Modeling capillary formation in calcium and copper alginate gels." Materials Science and Engineering: C **58**: 442-449.
- Ende, M. T. and N. A. Peppas (1997). "Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. II. Diffusion and release studies." J. Control. Release **48**(1): 47-56.
- Fox, K. K., V. H. Holsinger, et al. (1967). "Separation of β -Lactoglobulin from Other Milk Serum Proteins by Trichloroacetic Acid." Journal of Dairy Science **50**(9): 1363-1367.
- Huynh, U. T. D., A. Assifaoui, et al. (2017). "Pellets based on polyuronates: Relationship between gelation and release properties." Journal of Food Engineering **199**: 27-35.
- Huynh, U. T. D., O. Chambin, et al. (2018). "Insights into gelation kinetics and gel front migration in cation-induced polysaccharide hydrogels by viscoelastic and turbidity measurements: Effect of the nature of divalent cations." Carbohydrate Polymers.
- Kontopidis, G., C. Holt, et al. (2004). "Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function." Journal of Dairy Science **87**(4): 785-796.
- Li, J., W. R. K. Illeperuma, et al. (2014). "Hybrid Hydrogels with Extremely High Stiffness and Toughness." ACS Macro Letters **3**(6): 520-523.
- Li, J. and D. J. Mooney (2016). "Designing hydrogels for controlled drug delivery." Nature Reviews **1**: 16071.
- Lin, C.-C. and A. T. Metters (2006). "Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling." Advanced Drug Delivery Reviews **58**(12): 1379-1408.
- Lin, Y.-H., H.-F. Liang, et al. (2005). "Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs." Biomaterials **26**(14): 2105-2113.
- Lofgren, C., P. Walkenstrom, et al. (2002). "Microstructure and Rheological Behavior of Pure and Mixed Pectin Gels." Biomacromolecules **3**(6): 1144-1153.
- Maire du Poset, A., A. Lerbret, et al. (2018). "Design of polygalacturonate hydrogels using iron(II) as crosslinkers: A promising route to protect bioavailable iron against oxidation." Carbohydrate Polymers: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.1002.1007>.
- Marleen, V., P. J. Skov, et al. (1999). "Association behavior of native β -lactoglobulin." Biopolymers **49**(1): 11-20.
- Morfin, I., E. Buhler, et al. (2011). "Rodlike Complexes of a Polyelectrolyte (Hyaluronan) and a Protein (Lysozyme) Observed by SANS." Biomacromolecules **12**(4): 859-870.
- Peppas, N. A., Y. Huang, et al. (2000). "Physicochemical Foundations and Structural Design of Hydrogels in Medicine and Biology." Annual Review of Biomedical Engineering **2**(1): 9-29.
- Peppas, N. A., K. B. Keys, et al. (1999). "Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery." Journal of Controlled Release **62**(1): 81-87.
- Pescosolido, L., L. Feruglio, et al. (2012). "Mesh size distribution determination of interpenetrating polymer network hydrogels." Soft Matter **8**(29): 7708-7715.

- Renard, D., M. A. V. Axelos, et al. (1996). "“Ordered” structure in solutions and gels of a globular protein as studied by small angle neutron scattering." Biopolymers **39**(2): 149-159.
- Ritger, P. L. and N. A. Peppas (1987). "A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices." Journal of Controlled Release **5**(1): 37-42.
- Schmidt, I., F. Cousin, et al. (2009). "Spatial Structure and Composition of Polysaccharide–Protein Complexes from Small Angle Neutron Scattering." Biomacromolecules **10**(6): 1346-1357.
- Shin, B. Y. and J. Kim (2015). "Controlled Remodeling of Hydrogel Networks and Subsequent Crosslinking: A Strategy for Preparation of Alginate Hydrogels with Ultrahigh Density and Enhanced Mechanical Properties." Macromolecular Chemistry and Physics **216**(8): 914-921.
- Singh, B., N. Chauhan, et al. (2011). "Design of Molecular Imprinted Hydrogels for Controlled Release of Cisplatin: Evaluation of Network Density of Hydrogels." Ind. Eng. Chem. Res. **50**(24): 13742-13751.
- Skjåk-Bræk, G., H. Grasdalen, et al. (1989). "Inhomogeneous polysaccharide ionic gels." Carbohydrate Polymers **10**(1): 31-54.
- Ström, A., P. Ribelles, et al. (2007). "Influence of pectin fine structure on the mechanical properties of calcium-pectin and acid-pectin gels." Biomacromolecules **8**(9): 2668-2674.
- Thu, B., O. Gåserød, et al. (2000). "Inhomogeneous alginate gel spheres: An assessment of the polymer gradients by synchrotron radiation-induced x-ray emission, magnetic resonance microimaging, and mathematical modeling." Biopolymers **53**(1): 60-71.
- Tiziana, C. and P. N. A. (1989). "Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks." Journal of Biomedical Materials Research **23**(10): 1183-1193.
- Vashist, A., A. Vashist, et al. (2014). "Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body." Journal of Materials Chemistry B **2**(2): 147-166.
- Ventura, I., J. Jammal, et al. (2013). "Insights into the nanostructure of low-methoxyl pectin–calcium gels." Carbohydrate Polymers **97**(2): 650-658.
- Voo, W.-P., C.-W. Ooi, et al. (2016). "Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour." Euro. Polym. J. **75**: 343-353.

Bibliographie

- [1] WHO, “Guideline : Iron supplementation in postpartum women,” 2016.
- [2] A. Maire du Poset, A. Lerbret, A. Zitolo, F. Cousin, and A. Assifaoui, “Design of polygalacturonate hydrogels using iron(ii) as cross-linkers : A promising route to protect bioavailable iron against photo-oxidation,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 188, pp. 276–283, 2018.
- [3] U. T. D. Huynh, A. Lerbret, F. Neiers, O. Chambin, and A. Assifaoui, “Binding of divalent cations to polygalacturonate : A mechanism driven by the hydration water,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 120, pp. 1021–1032, 2016.
- [4] P. Delahay, M. Pourbaix, and V. Rysselberghe, “Potential-ph diagrams,” *Journal of Chemical Education*, pp. 683–688, 1950.
- [5] N. Abbaspour, R. Hurrell, and R. Kelishadi, “Review on iron and its importance for human health,” *Journal of Research in Medical Sciences*, vol. 19, no. 2, pp. 164–174, 2014.
- [6] T. Wu, X. Wang, B. Cohen, and H. Ge, “Molecular modeling of normal and sickle hemoglobins,” *International Journal for Multiscale Computational Engineering*, vol. 8, pp. 237–244, 01 2010.
- [7] G. Barragán-Ibañez, A. Santoyo-Sánchez, and C. O. Ramos-Peñafiel, “Iron deficiency anaemia,” *Revista Medica Del Hospital General de Mexico*, vol. 79, no. 2, pp. 88–97, 2016.
- [8] P. Benito and D. Miller, “Iron absorption and bioavailability : An update review,” *Nutrition Research*, vol. 18, no. 3, pp. 581–603, 1998.
- [9] S. U. Rehman, N. Huma, O. M. Tarar, and W. H. Shah, “Efficacy of non-heme iron fortified diets : A review,” *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 50, no. 5, pp. 403–413, 2010.
- [10] I. Donati and S. Paoletti, “Material properties of alginates,” in *Alginates : Biology and Applications* (B. H. A. Rehm, ed.), pp. 1–53, Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [11] H. Arne and L. Bjorn, “A study on the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis,” in *Proceedings of the Fifth International Seaweed Symposium, Halifax* (E. G. YOUNG and J. McLACHLAN, eds.), pp. 271 – 277, Pergamon, 1966.
- [12] O. Smidsrod, “Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state,” *Faraday Discussions of the Chemical Society*, vol. 57, pp. 263–274, 1974.
- [13] M. Chaplin, “Alginate,” *Water Structure and Science*, no. dernière mise à jour le 5 novembre 2017, p. <http://www1.lsbu.ac.uk/water/alginate.html>, 2002.
- [14] I. Braccini and S. Pérez, “Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins : The egg-box model revisited,” *Biomacromolecules*, vol. 2, pp. 1089–1096, 2001.

-
- [15] P. Agulhon, M. Robitzer, L. David, and F. Quignard, "Structural regime identification in ionotropic alginate gels : Influence of the cation nature and alginate structure," *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 1, pp. 215–220, 2012.
- [16] C. Menakbi, F. Quignard, and T. Mineva, "Complexation of trivalent metal cations to mannuronate type alginate models from a density functional study," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 120, no. 15, pp. 3615–3623, 2016.
- [17] J. Harholt, A. Suttangkakul, and H. Vibe Scheller, "Biosynthesis of pectin," *Plant Physiology*, vol. 153, no. 2, pp. 384–395, 2010.
- [18] V. Kral, Z. Oktabec, J. Jampilek, T. Pekarek, B. Proksa, J. Dohnal, A. Malovikova, A. Ebringerova, and A. Rezacova, "Pectin complexes of sartans and pharmaceutical compositions based thereon," 2012.
- [19] I. Ventura, J. Jammal, and H. Bianco-Peled, "Insights into the nanostructure of low-methoxyl pectin-calcium gels," *Carbohydrate Polymers*, vol. 97, pp. 650–658, 2013.
- [20] A. Assifaoui, A. Lerbret, U. T. D. Huynh, F. Neiers, O. Chambin, C. Loupiac, and F. Cousin, "Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in the presence of divalent cations (Ca^{2+} and Zn^{2+}) : a process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit," *Soft Matter*, vol. 11, pp. 551–560, 2015.
- [21] U. T. Huynh, O. Chambin, A. Maire du Poset, and A. Assifaoui, "Insights into gelation kinetics and gel front migration in cation-induced polysaccharide hydrogels by viscoelastic and turbidity measurements : Effect of the nature of divalent cations," *Carbohydrate Polymers*, vol. 190, pp. 121 – 128, 2018.
- [22] D. Rees, "Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks," in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (M. L. Wolfrom, R. S. Tipson, and D. Horton, eds.), vol. 24 of *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, pp. 267 – 332, Academic Press, 1969.
- [23] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. Smith, and D. Thom, "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations : the egg-box model," *North-Holland Publishing Company*, vol. 32, pp. 195–198, 1973.
- [24] S. Angyal, "Complex formation between sugars and metal ions," *School of chemistry. The University of New South Wales Kensington, Australia*, pp. 131–146, 1973.
- [25] M. L. Dheu-Andries and S. Pérez, "Geometrical features of calcium-carbohydrate interactions," *Carbohydrate Research*, vol. 124, pp. 321–332, 1983.
- [26] W. Mackie, S. Perez, R. Rizzo, F. Taravel, and M. Vignon, "Aspects of the conformation of polyguluronate in the solid state and in solution," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 5, no. 6, pp. 329 – 341, 1983.
- [27] M. Anna, R. Marguerite, and M. Michel, "Comparative interactions of magnesium and calcium counterions with polygalacturonic acid," *Biopolymers*, vol. 34, no. 8, pp. 1059–1064, 1994.
- [28] E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom, and J. Boyd, "Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation," *Carbohydrate Research*, vol. 66, no. 1, pp. 145 – 154, 1978.
- [29] Y. Fang, S. Al-Assaf, G. O. Phillips, K. Nishinari, T. Funami, P. A. Williams, and L. Li, "Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 2007, pp. 2456–2462, 2007.
-

-
- [30] C. Kyomugasho, S. Christiaens, D. Van de Walle, A. M. Van Loey, K. Dewettinck, and M. E. Hendrickx, "Evaluation of cation-facilitated pectin-gel properties : Cryo-SEM visualisation and rheological properties," *Food Hydrocolloids*, vol. 61, pp. 172–182, 2016.
- [31] P. Hernandez-Cerdan, B. W. Mansel, A. Leis, L. Lundin, and M. A. Williams, "Structural analysis of polysaccharide networks by transmission electron microscopy : Comparison with small-angle x-ray scattering," *Biomacromolecules*, vol. 19, no. 3, pp. 989–995, 2018.
- [32] G. Skjak-Braek, H. Grasdalen, and O. Smidsrod, "Inhomogeneous polysaccharide ionic gels," *Carbohydrate Polymers*, vol. 10, pp. 31–54, 1989.
- [33] O. Smidsrod and A. Haug, "Properties of poly(1,4-hexauronates) in the gel state : II. comparison of gels of different chemical composition," *Acta Chemica Scandinavica*, vol. 26, pp. 79–88, 1972.
- [34] D. Caccavo, A. Ström, A. Larsson, and G. Lamberti, "Modeling capillary formation in calcium and copper alginate gels," *Materials Science and Engineering C*, vol. 58, pp. 442–449, 2016.
- [35] B. Thu, O. Gaserod, D. Paus, A. Mikkelsen, G. Skjak-Braek, R. Toffanin, F. Vittur, and R. Rizzo, "Inhomogeneous alginate gel spheres : an assessment of the polymer gradients by synchrotron radiation-induced x-ray emission, magnetic resonance microimaging, and mathematical modeling," *Biopolymers*, vol. 53, no. 1, pp. 60–71, 2000.
- [36] K. Potter, T. A. Carpentier, and L. D. Hall, "Mapping of the spatial variation in alginate concentration in calcium alginate gels by magnetic resonance imaging (MRI)," *Carbohydrate Research*, vol. 246, pp. 43–49, 1993.
- [37] Y. A. Morch, I. Donati, B. L. Strand, and G. Skjak-Braek, "Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads," *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 1471–1480, 2006.
- [38] T. Braschler, A. Valero, L. Colella, K. Pataky, J. Brugger, and P. Renaud, "Link between alginate reaction front propagation and general reaction diffusion theory," *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 6, pp. 2234–2242, 2011.
- [39] A. Martinsen, G. Skjak-Braek, and O. Smidsrod, "Alginate as immobilization material : I. correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 33, pp. 79–89, 1987.
- [40] I. Teraoka, "Models of polymer chains," in *Polymer Solutions*, pp. 1–67, John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [41] I. Schmidt, F. Cousin, C. Huchon, F. Boué, and M. A. Axelos, "Spatial structure and composition of polysaccharide-protein complexes from small angle neutron scattering," *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 1346–1357, 2009.
- [42] M. Borgogna, G. Skjåk-Bræk, S. Paoletti, and I. Donati, "On the initial binding of alginate by calcium ions. the tilted egg-box hypothesis," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 117, pp. 7277–7282, 2013.
- [43] P. Sikorski, F. Mo, G. Skjåk-Bræk, and B. T. Stokke, "Evidence for egg-box-compatible interactions in calciumalginate gels from fiber x-ray diffraction," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 7, pp. 2098–2103, 2007.
- [44] P. Agulhon, M. Robitzer, J.-P. Habas, and F. Quignard, "Influence of both cation and alginate nature on the rheological behavior of transition metal alginate gels," *Carbohydrate Polymers*, vol. 112, pp. 525–531, 2014.
-

-
- [45] O. Aarstad, B. L. Strand, L. M. Klepp-Andersen, and G. Skjåk-Braek, "Analysis of g-block distributions and their impact on gel properties of in vitro epimerized mannuronan," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 10, pp. 3409–3416, 2013.
- [46] S. Förster, M. Schmidt, and M. Antonietti, "Static and dynamic light scattering by aqueous polyelectrolyte solutions : effect of molecular weight, charge density and added salt," *Polymer*, vol. 31, no. 5, pp. 781 – 792, 1990.
- [47] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrod, P. Soon-Shiong, and G. Skjak-Braek, "Alginate polycation microcapsules : I. intercation between alginate and polycation," *Biomaterials*, vol. 17, pp. 1031–1040, 1996.
- [48] P. J. Flory, *Principle of polymer chemistry*. Cornell University Press, 1953.
- [49] P. J. Flory, *Principle of polymer chemistry*. Cornell University Press, 1953.
- [50] V. Briois, C. Cartier Dit Moulin, and M. Verdaguer, "Seuils d'absorption des rayons x : un outil de caractérisation indispensable en chimie de coordination.," *Actualite Chimique*, vol. 3, pp. 31–40, 2000.
- [51] P. D'Angelo and M. Benfatto, "Effect of multielectric configurations on the XAFS analysis at the fe k edge," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, pp. 4505–4514, 2004.
- [52] I. Newton, *Principes mathématiques de la philosophie naturelle, Tome second*. Librairie scientifique et technique Albert Blanchard, 1966.
- [53] P. Li and K. M. Merz, "Metal ion modeling using classical mechanics," *Chemical Reviews*, vol. 117, no. 3, pp. 1564–1686, 2017.
- [54] C. S. Babu and C. Lim, "Empirical force fields for biologically active divalent metal cations in water," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 110, no. 2, pp. 691–699, 2006.
- [55] P. Li and K. M. Merz, "Taking into account the ion-induced dipole interaction in the nonbonded model of ions," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 10, no. 1, pp. 289–297, 2014. PMID : 24659926.
- [56] L. A. Curtiss, J. W. Halley, J. Hautman, and A. Rahman, "Nonadditivity of ab initio pair potentials for molecular dynamics of multivalent transition metal ions in water," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 86, no. 4, pp. 2319–2327, 1987.
- [57] F. Duarte, P. Bauer, A. Barrozo, B. A. Amrein, M. Purg, J. Åqvist, and S. C. L. Kamerlin, "Force field independent metal parameters using a nonbonded dummy model," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, no. 16, pp. 4351–4362, 2014.
- [58] Y. Jiang, H. Zhang, and T. Tan, "Rational design of methodology-independent metal parameters using a nonbonded dummy model," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 12, no. 7, pp. 3250–3260, 2016.
- [59] L. StephenF., "Mechanistic studies of metal aqua ions : A semihistorical perspective," *Helvetica Chimica Acta*, vol. 88, no. 3, pp. 523–545, 2005.
- [60] F. Cousin, "Matière molle et diffusion de neutrons : Quelques variations sur le contraste," *Laboratoire Léon Brillouin, CEA Saclay*, 2016.
- [61] D. Lairez, *JDN*, vol. 11, ch. Bonnes pratiques de la diffusion de neutrons aux petits angles, pp. 43–69. Société Française de Neutronique, 2010.
- [62] M. Corredig, W. Kerr, and L. Wicker, "Molecular characterization of commercial pectins by separation with linear mix gel permeation columns in-line with multi-angle light scattering detection," *Food Hydrocolloids*, vol. 14, no. 1, pp. 41 – 47, 2000.

-
- [63] Malvern, “Isothermal titration calorimetry,” <https://www.malvernpanalytical.com/fr/products/technologies/isothermal-titration-calorimetry>, 2018.
- [64] G. M. Kavanagh and S. B. Ross-Murphy, “Rheological characterisation of polymer gels,” *Progress in Polymer Science*, vol. 23, no. 3, pp. 533 – 562, 1998.
- [65] S. SOLEIL, “Description du synchrotron soleil,” <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/qui-sommes-nous/quest-ce-que-soleil/soleil-en-3-questions3>, 2017.
- [66] A. Filipponi and A. Di Cicco, “Gnxas : A software package for advances exafs multiple-scattering calculations and data-analysis,” *Task Quarterly*, vol. 4, no. 4, pp. 575–669, 2000.

Titre : Hydrogels de polygalacturonate réticulés par les ions Fe^{2+} : Impact du mode d'association local sur les mécanismes de gélification, contrôle de la structure à différentes échelles et modulation des propriétés mécaniques

Mots clés : Hydrogels, Polygalacturonate, Fer, Propriétés mécaniques, Diffusion de neutrons aux petits angles

Résumé : Ce travail de thèse décrit la formulation d'hydrogels de polygalacturonate (polyGalA) réticulés par les cations Fe^{2+} , ainsi que leur caractérisation expérimentale depuis les échelles moléculaires jusqu'aux échelles macroscopiques, en utilisant notamment la spectroscopie d'absorption X (EXAFS), la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) ainsi que des mesures de rhéologie. Nous avons élaboré un protocole de gélification robuste permettant d'obtenir des gels cylindriques reproductibles qui présentent des gradients de concentration contrôlés depuis leur partie basale jusqu'à leur partie apicale. Le rapport $R = [\text{Fe}]/[\text{GalA}]$ a une valeur constante de 0,25 tout au long du gel, ce qui prouve que les cations Fe^{2+} s'associent avec 4 unités galacturonates. La confrontation des résultats d'EXAFS et de dynamique moléculaire a démontré que ces associations se font via le modèle "egg-box". Les mécanismes de réticulation qui contrôlent la structure du réseau formé par les chaînes aux échelles locales sont donc les mêmes dans l'ensemble du gel, ce qui est confirmé par les mesures de DNPA. La formation des gradients de concentration macroscopiques provient des mécanismes de diffusion des cations à travers le gel lors de sa formation.

Ces gradients de concentration contrôlent les propriétés mécaniques des gels. En outre, nous avons prouvé que le mode d'association "egg-box" permettait la protection des ions Fe^{2+} contre l'oxydation, ce qui confère à ces hydrogels un potentiel applicatif pour soigner l'anémie car ils pourraient permettre la vectorisation du fer sous cette forme réduite biodisponible jusqu'à l'intestin. Nous avons étendu notre étude à la formulation d'hydrogels avec d'autres cations (Ca^{2+} et Zn^{2+}). Ces hydrogels présentent des propriétés macroscopiques proches de celles des hydrogels Fe^{2+} -polyGalA car les mécanismes de diffusion des cations régissant la formation des gradients macroscopiques lors de la formation des gels sont similaires. Les hydrogels présentent cependant des structures locales différentes car les modes d'associations locaux varient d'un cation à l'autre. L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer un mécanisme généralisé permettant de décrire les mécanismes de formation d'hydrogels de polygalacturonate pour les cations divalents, et ainsi de moduler finement leur structure sur plusieurs échelles. Ces hydrogels pourraient donc être des outils de choix pour la vectorisation de molécules actives et le contrôle de leur relargage.

Title : Polygalacturonate hydrogels crosslinked by Fe^{2+} ions: Impact of the local association mode on the gelation mechanisms, control of the structure at different length scales and tuning of the mechanical properties

Keywords : Hydrogels, Polygalacturonate, Iron, Mechanical properties, Small Angle Neutron Scattering

Abstract : This Ph.D. thesis describes the design of polygalacturonate hydrogels (polyGalA) cross-linked by the Fe^{2+} cations, and their experimental characterization from the molecular scales up to the macroscopic scales, by combining EXAFS spectroscopy, Small Angle Neutron Scattering (SANS) and rheological measurements. We designed a robust gelling protocol that allowed to obtain reproducible cylindrical gels with controlled concentration gradients from the lower side to the upper side of the gel. The ratio $[\text{Fe}]/[\text{GalA}]$ has a constant value of 0.25 all along the gel, which suggests that the Fe^{2+} cations are associated with 4 galacturonate units. The comparison of EXAFS measurements and molecular dynamics simulation has shown that these associations followed the "egg-box" model. The crosslinking mechanisms that control the structure of the network made by the chains at local scale is therefore the same throughout the whole gel, which is confirmed by SANS measurements. The formation of the macroscopic concentration gradients comes from the mechanisms that drive the cations diffusion through the gel during the gelation process.

These gradients control the gels mechanical properties. Besides, we proved that the "egg-box" association enables to protect Fe^{2+} against oxidation, which gives to these hydrogels an applicative potential to cure anemia as they could allow to target iron under its bioavailable form up to the gut. We have extended the study to the design of hydrogels with other cations (Ca^{2+} et Zn^{2+}). The macroscopic properties of these hydrogels are very close to that of the Fe^{2+} -polyGalA hydrogels because the cation diffusion mechanisms that govern the formation of macroscopic gradients during the gelation process are similar. The hydrogels have however different local structures because the cation-polyGalA local association varies from one cation to another. All these results allowed us to propose a generalized mechanism that describes the polygalacturonate hydrogels formation for divalent cations, and thus to tune their structure over several scales. These hydrogels could therefore be promising tools for the vectorization of active molecules and the control of their release.