

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MÉCANISME DE GÉLIFICATION PAR
AUGMENTATION DE LA TEMPÉRATURE DU MÉLANGE
CHITOSANE/GLYCÉROL-PHOSPHATE

DOMINIC FILION

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

NOVEMBRE 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-16994-0

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-16994-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

MÉCANISME DE GÉLIFICATION PAR
AUGMENTATION DE LA TEMPÉRATURE DU MÉLANGE
CHITOSANE/GLYCÉROL-PHOSPHATE

présentée par : FILION Dominic

en vue de l'obtention du diplôme de Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme HEUZEY Marie-Claude, Ph.D., présidente

M. BUSCHMANN Michael D., Ph.D., membre et directeur de recherche

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre

Mme ALLEN Christine, Ph.D., membre

À Julie, Anaïs, Jeanne et Mathilde

REMERCIEMENTS

Pour avoir inspiré le sujet de la thèse et m'avoir fourni le chitosane nécessaire à la réalisation des expérimentations, je remercie la compagnie BioSyntech. Merci également aux organismes qui m'ont accordé des bourses, le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (anciennement le Fonds pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche, FCAR), Bechtel Canada, la Banque Nationale ainsi que l'École Polytechnique.

Plusieurs personnes ont contribué à l'accomplissement de ce travail. Mes collègues de travail et amis, Jun, Josée-Christine, Julie, Marc T. et Marc L., Anik, Nic, Éric, Martin, Anne, Caroline et Michael vous êtes vraiment fantastiques. Un merci tout particulier à Marc Lavertu pour toutes nos discussions sur les modèles théoriques du chitosane et les mesures de RMN présentée au chapitre 5. Micheal, c'est grâce à toi si j'ai complété ma thèse et tu m'as toujours soutenu, je te remercie sincèrement.

Sans eux, je n'aurais jamais pu réaliser ce projet. Mes beaux-parents, Jacqueline et Pierre, merci de votre grande disponibilité et générosité. Ma sœur Josée, un merci immense pour tes précieux commentaires et pour la correction. Mes parents, Nicole et André-Jean, merci pour votre support continu au cours de mes 23 années d'études, vous avez toujours été là pour moi. Merci. Enfin ma conjointe, Julie, merci pour ton support moral et ta grande générosité. Je t'aime beaucoup!

RÉSUMÉ

Une formulation composée d'un mélange de chitosane et de disodium glycérol-phosphate a été mise au point par la compagnie BioSyntech. La formulation se présente sous la forme d'une solution à une température donnée (généralement entre 4 et 25 °C) et possède la propriété de former un gel lorsqu'on élève sa température (au-dessus de 25 °C environ). Dans certains cas, un mélange thermoréversible peut être obtenu. Pour certaines formulations, un agent de liaison chimique est utilisé pour augmenter sa résistance (gel non réversible). La formulation à base de chitosane/glycérol-phosphate présente un très grand potentiel pour l'industrie biomédicale puisqu'elle est biocompatible et également biodégradable. L'objectif principal de la thèse est de déterminer le mécanisme de gélification du mélange de chitosane/glycérol-phosphate afin de pouvoir contrôler de façon optimale les paramètres impliqués dans la préparation et l'utilisation de ce mélange. Nous présentons initialement le chitosane et ses propriétés physico-chimiques telles que sa fraction de désacétylation, f_D , sa masse monomérique et moléculaire moyenne, son degré d'ionisation et l'équilibre associé à son ionisation ainsi que son caractère hydrophobique, c'est-à-dire sa séparation de phase en milieu basique. Nous présentons d'autres gels à base de chitosane et nous détaillons le gel de BioSyntech et les limites pour l'utilisation du mélange chitosane/glycérol-phosphate qui mène à une gélification.

La première séquence d'expérimentations a comme objectifs de déterminer si le gel conserve des charges fixes une fois sa formation effective et de déterminer l'influence du pH de la solution en contact avec le gel et l'influence de la température. Nous montrons que le gel de chitosane possède des charges fixes positives variant d'une concentration nulle jusqu'à une concentration d'environ 86 mM de sites glucosamine ionisés selon la condition d'équilibration. Nous montrons également que l'augmentation du pH diminue la concentration de charges fixes et que l'augmentation de la température diminue la constante de dissociation apparente (pK_{ap}) du chitosane.

La deuxième série d'expérimentations a pour but de déterminer si le glycérol-phosphate (GP) demeure fixé au chitosane après que le gel soit formé. Afin de valider l'hypothèse qu'il n'est pas fixé, nous utilisons une formulation non réversible que nous laissons en équilibre avec une solution aqueuse afin d'y faire diffuser le glycérol-phosphate. Nous validons que le GP diffuse dans la solution de rinçage et que sa concentration finale dans le gel, après 6 rinçages, se réduit à environ 1 mM. Nous validons également que la diffusion du GP est libre puisqu'elle répond à l'équation de diffusion libre. Nous déterminons une valeur pour le coefficient de diffusion, soit de $0.153 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ à l'intérieur d'un gel formé avec l'agent de liaison. Nous validons aussi que le profil de diffusion est modifié par la contraction du gel lors de son équilibration avec la solution utilisée pour faire diffuser le GP.

Nous présentons ensuite un article soumis au journal *Biomacromolecules*. Dans cet article, nous caractérisons la valeur de la constante de dissociation du chitosane en fonction de son degré d'ionisation et la valeur du degré d'ionisation pour laquelle le chitosane se sépare de phase. Nous faisons varier la température (5 à 40 °C) et la force ionique (par l'ajout de 0 à 150 mM de NaCl) pour trois chitosanes de degré de désacétylation différents à une concentration d'environ 3 mM. Tel que prévu, la dissociation est plus importante (pK_{ap} est diminué) lorsque le degré d'ionisation est élevé dans le cas du chitosane tandis que la glucosamine ne présente pas de variation importante de la constante de dissociation lorsqu'on modifie son degré d'ionisation. Nous déterminons que la température agit considérablement sur la dissociation de la glucosamine du chitosane et du monomère en diminuant le pK_{ap} d'environ une unité pour une variation de température entre 5 et 40 °C. Ainsi, nous concluons que cet effet n'est pas associé à la partie électrostatique mais à la dissociation intrinsèque du proton du groupement amine. Quant à l'effet de la force ionique, son augmentation fait hausser la valeur du pK_{ap} . Nous montrons que la séparation de phase se produit à un degré d'ionisation plus élevé avec l'ajout de NaCl (environ 15 % plus de charges entre les cas de 0 et 150 mM NaCl). Une réduction du degré de désacétylation entraîne une séparation de phase avec environ 25 % moins de charges pour des valeurs de $f_D = 0.72$ vs $f_D = 1.00$. Nous appliquons un modèle cylindrique au chitosane afin de résoudre l'équation de Poisson-Boltzmann pour déterminer la valeur du potentiel électrostatique en surface d'un cylindre représentant la chaîne de chitosane. La valeur du potentiel électrostatique nous permet de déterminer une valeur de pK_{ap} théorique. La théorie s'applique bien à

toutes les données expérimentales et permet de mieux comprendre les effets électrostatiques attribués à la force ionique et à une densité de charge plus élevée pour les chitosanes avec un f_D plus élevé. Des mesures de la variation du pK_a du glycérol-phosphate en fonction de la température nous permettent de proposer une hypothèse pour le mécanisme de gélification du mélange chitosane/glycérol-phosphate.

Nous prouvons théoriquement et expérimentalement le transfert de protons du chitosane au glycérol-phosphate permettant aux chaînes de chitosane de se neutraliser suffisamment pour que des interactions hydrophobiques les lient de façon à former un réseau uniforme constituant le gel. À partir du développement théorique, nous concluons que la condition nécessaire et suffisante pour obtenir un transfert de protons du chitosane à un électrolyte faible est que la différence de leur variation de pK_a en fonction de la température soit négative, $\frac{\partial pK_{ap}^{chi}}{\partial T} < \frac{\partial pK_a^{elec}}{\partial T}$. Le transfert de protons est démontré par le biais de deux expérimentations, soient par le déplacement chimique du phosphore par la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) et par la mesure du pH du mélange en fonction de la température. Nous notons une diminution d'environ 15 % de la capacité totale de chargement du chitosane pour une variation de 5 à 40 °C.

Nous terminons en démontrant théoriquement qu'une diminution du degré d'ionisation du chitosane permet aux interactions hydrophobiques d'être favorables énergétiquement. Ainsi, le chitosane se sépare de la phase aqueuse et le mélange se

transforme en gel lorsque la concentration de chitosane est suffisante. Nous déterminons des valeurs pour l'énergie d'interaction variant entre 0.8 et 2.2 kT .

ABSTRACT

A formulation made up of a mixture of chitosan and disodium glycerol-phosphate was discovered by BioSyntech. The formulation is a homogeneous solution at a given temperature (generally between 4 and 25 °C) and has the property of forming a gel when its temperature is raised (approximately above 25 °C). In some cases, a thermo reversible mixture can be obtained. For some formulations, a chemical cross-linking agent is used to increase its resistance (non reversible gelation). The formulation containing chitosan/glycerol-phosphate has great potential for biomedical industry since it is biocompatible and also biodegradable. The principal objective of the thesis is to determine the gelation mechanism of the chitosan/glycerol-phosphate mixture in order to control, in an optimal way, the parameters implicated in the preparation and the use of this mixture. We initially present the physicochemical properties of chitosan such as its fraction of deacetylation, f_D , its monomeric and molecular mass average, its ionization level and equilibrium associated with its ionization like its hydrophobic character, i.e. its phase separation in basic medium. We present other gels containing chitosan and we detail the gel of BioSyntech and the limits for the use of the chitosan/glycerol-phosphate mixture that allow for gelation.

The objectives of the first sequence of experiments are to determine if the gel preserves its fixed charges following formation and to determine the influence of the pH of the solution in contact with the gel and the influence of the temperature. We show that

the gel of chitosan has positive fixed charges varying from a null concentration to a concentration of approximately 86 mM of glucosamine ionized sites depending on the solution conditions. We also show that the increase of pH decreases the concentration of fixed charges and that the increase of temperature decreases the dissociation constant (pK_{ap}) of chitosan.

The purpose of the second series of experiments is to determine if glycerol-phosphate (GP) remains bound to chitosan after the gel forms. In order to validate the hypothesis that it is not bound, we use a non reversible formulation which we leave in equilibrium with an aqueous solution in order to allow for diffusion of the glycerol-phosphate. We validate that GP diffuses into the rinse solution and that its final concentration in the gel, after 6 rinsing procedures, is reduced to approximately 1 mM. We also demonstrate that GP diffusion is free since it is modeled well by the equation of free diffusion. We further determined a value for the coefficient of diffusion of $0.153 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ inside the gel formed with the cross-linking agent. Our results also suggest that the profile of diffusion is modified by the contraction of the gel during equilibration with external aqueous bath.

Following the above is an article submitted to the journal *Biomacromolecules*. In this article, we characterize the value of the dissociation constant of the chitosan according to its ionization level and the value of the ionization level for which the chitosan phase separates. We vary the temperature (5 to 40 °C) and the ionic force (by the addition of 0 to 150 mM of NaCl) for three samples of chitosan that vary in terms of degree of

deacetylation to a concentration of approximately 3 mM. As expected, dissociation is higher (pK_{ap} is decreased) when the ionization level is high in the case of the chitosan while glucosamine does not present detectable variations of its ionization constant when its degree of ionization is varied. We determined that the temperature influences considerably the dissociation of glucosamine of chitosan and of the monomer by decreasing the pK_{ap} by approximately a full pK unit for a variation in temperature between 5 and 40 °C. Thus, we conclude that this effect is not associated to the electrostatic but to the intrinsic dissociation of the proton of the amine group on glucosamine. As for the effect of the ionic strength, its increase makes the pK_{ap} increase. We show that the phase separation occurs with a higher ionization level with NaCl addition (approximately 15 % more charges between the cases of 0 and 150 mM NaCl). A reduction of the degree of deacetylation involves a phase separation with approximately 25 % less charge for values of $f_D = 0.72$ vs $f_D = 1.00$. We apply a cylindrical cell model to the chitosan in order to solve the Poisson-Boltzmann equation to determine the value of the electrostatic potential on the surface of a cylinder representing the chitosan chain. The value of the electrostatic potential enables us to determine a theoretical value for pK_{ap} . The theory applies well to all of our experimental data and allows us to better understand the electrostatic effects attributed to the ionic strength and to a density of higher charge for the chitosan with a higher f_D . Measurements of the variation of the pK_a of glycerol-phosphate with temperature allowed us to further propose a hypothesis for the mechanism of gelation of the chitosan/glycerol-phosphate mixture.

We prove theoretically and experimentally that the proton transfer from chitosan to glycerol-phosphate allows chitosan chains to be sufficiently neutralized so that hydrophobic interactions bind them in order to form a uniform network constituting the gel. From the theoretical development, we conclude that the necessary and sufficient condition to obtain proton transfer from chitosan to the weak electrolyte is that the difference in their pK_a variation with temperature is negative, $\frac{\partial pK_{ap}^{chi}}{\partial T} < \frac{\partial pK_a^{elec}}{\partial T}$. The proton transfer is shown by means of two experiments. The first is by the chemical shift of phosphorus through the technique of nuclear magnetic resonance (NMR) and the second one is through the measurement of the pH of the mixture according to the temperature. We note a reduction of approximately 15 % of the total charge of chitosan for a temperature variation from 5 to 40 °C.

We finish by proposing that a reduction in the degree of ionization of the chitosan allows the hydrophobic interactions to be favorable when compared to dissolution in aqueous solution. Thus, chitosan separates from the aqueous phase and the mixture is transformed into gel when the concentration of chitosan is sufficient. We also determined values for the energy of hydrophobic interaction varying between 0.8 and $2.2 kT$.

TABLE DES MATIÈRES

Dédicace	iv
Remerciements	v
Résumé	vi
Abstract	xi
Table des matières	xv
Liste des tableaux	xx
Liste des figures	xxii
Liste des sigles et abréviations	xxviii
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	1
1.1 Le chitosane et ses propriétés physico-chimiques	2
1.1.1 Fraction de désacétylation et masse monomérique moyenne	4
1.1.2 Masse moléculaire moyenne	5
1.1.3 Degré d'ionisation	8
1.1.4 Équilibre de dissociation	9
1.1.5 Séparation de phase du chitosane	11
1.2 Les diverses applications du chitosane	11
1.2.1 Applications médicales	12
1.2.2 Applications alimentaires	14
1.2.3 Applications industrielles	16
1.3 Les hydrogels de chitosane	18
1.4 Le gel thermo sensible de BioSyntech	20
1.5 Objectifs de la thèse	22
CHAPITRE 2 - Charges fixes dans le gel de chitosane	25
2.1 Introduction	25
2.2 Théorie du potentiel de Donnan	27
2.2.1 Calcul de la concentration de charges fixes	29
2.3 Méthodologie expérimentale	32
2.3.1 Réactifs	32

2.3.1 a)	Préparation des disques de gel de chitosane.....	32
2.3.1 b)	Préparation des disques de cartilage.....	33
2.3.1 c)	Préparation des disques d'agarose.....	34
2.3.1 d)	Solutions tampons non radioactives	34
2.3.1 e)	Solutions tampons radioactives	35
2.3.2	Montage particulier pour les radionucléides	36
2.3.3	Déroulement des expérimentations	38
2.3.4	Calculs pour la détermination de la concentration de charges fixes	40
2.3.4 a)	Méthode 2.1 – Utilisation d'un seul marqueur Cl^{36}	41
2.3.4 b)	Méthode 2.2 – Courbes de calibration pour distinguer les marqueurs Na^{22} et Cl^{36}	42
2.3.4 c)	Méthode 2.2 – Détermination directe de ρ à l'aide du Na^{22} et du Cl^{36}	44
2.3.5	Détermination du degré d'ionisation.....	46
2.4	Résultats	47
2.4.1	Concentration de charges fixes.....	47
2.4.1 a)	Potentiel de Donnan	47
2.4.1 b)	Méthode directe – courbes de calibration.....	48
2.4.1 c)	Méthode directe – concentration de charges fixes	51
2.4.2	Effet du pH	52
2.4.3	Effet de la température	53
2.5	Discussion	55
2.6	Conclusion	59
CHAPITRE 3	- Diffusion du disodium glycérol-phosphate.....	60
3.1	Introduction	60
3.2	Théorie de la diffusion libre	62
3.3	Méthodologie expérimentale.....	67
3.3.1	Préparation du gel de chitosane.....	67
3.3.2	Expérience 3.1 – Évidence de diffusion du phosphore	69

3.3.3	Expérience 3.2 – Caractérisation du profil de diffusion du phosphore	70
3.3.4	Analyse du contenu de phosphore – préparation des solutions.....	72
3.3.5	Analyse du contenu de phosphore – quantification.....	73
3.3.6	Calculs de la concentration de phosphore	75
3.4	Résultats	75
3.4.1	Expérience 3.1	75
3.4.2	Expérience 3.2	76
3.5	Discussion	81
3.6	Conclusion	84
CHAPITRE 4 - Titration and Phase-Separation of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphate System		85
4.1	ABSTRACT.....	87
4.2	INTRODUCTION	89
4.3	THEORY	92
4.3.1	Structural Parameters of the Cylindrical Cell Model	92
4.3.2	Counter-ion and Co-ion Concentration Molecular Scale Profiles and Average Macroscopic Values.....	95
4.3.3	Theoretical Dependence of pH on pK_0 , α and $\psi \big _{r=a}$	96
4.3.4	The Poisson–Boltzmann Equation	97
4.3.5	Electroneutrality and the Poisson-Boltzmann Equation Determine α and $\psi \big _{r=a}$	99
4.3.6	Determination of $pK_0(T)$ and of the Temperature-induced Change in pK_{ap}	100
4.4	EXPERIMENTAL METHODS.....	102
4.4.1	Reagents and Solutions	102
4.4.2	Experimental Apparatus	104
4.5	RESULTS	107

4.5.1	Influence of Temperature on pK_a of Glycerol-phosphate and Glucosamine and on pK_{ap} and α_{ps} of Chitosan	107
4.5.2	Influence of Ionic Strength on pK_a of Glucosamine and on pK_{ap} and α_{ps} of Chitosan.....	112
4.5.3	Influence of Fraction of Deacetylation (f_D) on pK_{ap} and α_{ps} of Chitosan.....	115
4.6	DISCUSSION	115
4.7	ACKNOWLEDGEMENTS	120
4.8	APPENDIX I.....	121
4.8.1	Titration of a Cationic Polyelectrolyte	121
4.9	APPENDIX II	125
4.9.1	Derivation of $dpK_{ap}/dpH \cong 1$	125
CHAPITRE 5	- Transfert de protons du chitosane	129
5.1	Introduction.....	129
5.2	Théorie	131
5.2.1	Variation du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température.....	131
5.2.2	Détermination théorique du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température et détermination de la température de séparation de phase.....	147
5.2.3	Détermination des paramètres de l'équation simplifiée (eq 5.43) du pK_{ap} du chitosane	148
5.2.4	Relation entre le déplacement chimique du phosphore et le degré d'ionisation du glycérol-phosphate	148
5.3	Méthodologie expérimentale.....	150
5.3.1	Préparation des solutions de glycérol-phosphate	151
5.3.2	Tests des solutions de glycérol-phosphate pour la détermination de δ_a et δ_b	154
5.3.3	Préparation des mélanges de chitosane et de glycérol-phosphate..	154

5.3.4	Tests de RMN pour la détermination du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température	156
5.3.5	Tests de pH pour la détermination du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température et de la température de formation du gel	157
5.4	Résultats	158
5.4.1	Détermination de δ_a et δ_b par les déplacements chimiques du GP et des valeurs de pH.....	158
5.4.2	Variation du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température par la technique de RMN	160
5.4.3	Variation du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température par la mesure du pH	162
5.4.4	Température de formation des gels	163
5.5	Discussion	165
5.6	Conclusion	170
CHAPITRE 6	- Modèle théorique de la séparation de phase du chitosane	172
6.1	Introduction	172
6.2	Théorie	174
6.3	Résultats	181
6.4	Discussion	184
6.5	Conclusion	185
CHAPITRE 7	- Discussion générale	187
7.1	Interactions électrostatiques et hydrophobiques	187
7.2	Transfert de protons et équilibre de dissociation	193
CHAPITRE 8	- Conclusion	195
8.1	Avancement des connaissances du comportement du chitosane en solution.....	196
8.2	Contributions d'ordre général.....	199
8.3	Nouvelles voies de recherche.....	201
Références		204

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Conditions de tests selon l'Expérience.....	39
Tableau 2.2 Concentrations et volumes d'aliquotes des échantillons utilisés pour identifier les comptes relatifs au Na^{22} et Cl^{36} dans chacun des compteurs β et γ	43
Tableau 2.3 Concentration de charges fixes obtenue par la méthode utilisant la théorie de l'équilibre de Donnan.....	48
Tableau 2.4 Résultats de l'Expérience 2.3 par la méthode du double marquage.....	52
Tableau 2.5 Valeurs du degré d'ionisation α et du pK_a apparent (pK_{ap}) obtenues à partir des mesures de densité de charges fixes ρ (Tableau 2.3 et Tableau 2.4) et des équations 2.17 et 2.18.....	55
Tableau 3.1 Composition des solutions utilisées pour la préparation du Gel Protosan Endothermic Gel. La masse du soluté m_a est dissoute dans le solvant de volume V_b . Le volume V_s correspond à la quantité de solution utilisée pour la préparation.	68
Tableau 3.2 Concentration de phosphore contenu dans le substrat considéré.	76
Tableau 3.3 Détermination de la concentration totale de phosphore dans une aliquote de volume V_e et concentration équivalente de l'échantillon, c_e	77
Tableau 3.4 Résultats de l'analyse de phosphore total et concentration correspondante de l'échantillon.	78
Tableau 3.5 Coefficient d'ajustement de la courbe aux données expérimentales.....	80
Table 4.1 Characteristics of Chitosans.	103
Table 4.2 Degree of ionization of chitosan at phase separation, α_{ps} , and pK_0 , measured at 25 °C for chitosans with different deacetylation fraction f_D and in solutions of different ionic strength, I_c	111
Tableau 5.1 Titrage du glycérol-phosphate par ajout de HCl 1,008 M.....	152
Tableau 5.2 Titrage du glycérol-phosphate par le mélange de solutions Na_2GP et $\text{Na}_2\text{GP-HCl}$	153

Tableau 5.3 Solutions de chitosane et de glycérol-phosphate avant le mélange 1:1.	155
Tableau 5.4 Valeurs des paramètres δ_a et δ_b , déterminées à partir d'un ajustement des valeurs expérimentales avec l'équation 5.47.	159
Tableau 5.5 Déplacements chimiques du ^{31}P des mélanges chitosane/GP à différentes températures et degrés d'ionisation du GP divalent et du monomère glucosamine du chitosane.	160
Tableau 6.1 Valeurs de $\frac{\varepsilon_{AA}}{kT}$ obtenues en utilisant les valeurs $\text{dp}K_{\text{ap}}/\text{d}\alpha$ correspondantes aux valeurs de α_{ps} du Table 4.2.....	182
Tableau 6.2 Valeurs de α_{ps} obtenues en utilisant les valeurs $\text{dp}K_{\text{ap}}/\text{d}\alpha$ correspondantes du Table 4.2 et des valeurs respectives de $\frac{\varepsilon_{AA}}{kT}(f_D)$ égales à 0,7, 0,82 et 1,0 pour des valeurs respectives de $f_D = 0,72, 0,87$ et 1,00.....	183

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1** Gel de chitosane/glycérol-phosphate (voir la description du mélange à la section 5.3.1, Tableau 5.3, no. de mélange 3c). A) Solution liquide à la température de 22 °C. B) La fiole est inclinée à l'intérieur du bécher puis chauffée. C) Le gel est formé à une température de 68 °C. La fiole est replacée à la position verticale et on remarque que le gel maintient sa forme inclinée à l'intérieur de la fiole.....2
- Figure 1.2** Molécule de chitosane. Les premier (1) et dernier (4) monomères sont des glucosamines ionisées. La glucosamine en deuxième position (2) est sous la forme neutre et le monomère *N*-acétyl-glucosamine est en troisième position (3). 3
- Figure 1.3** Exemple de distribution de masse moléculaire et valeur de masse moléculaire moyenne. La pondération $p_i = n_i, w_i$ ou z_i est en fonction de la masse moléculaire M_i . L'exemple a été généré à partir de données fictives. 8
- Figure 1.4** Molécule de disodium glycerol 2-phosphate. 21
- Figure 2.1** (A) Gel dans la solution d'équilibration de concentration de NaCl déterminée. (B) Plan contenant l'interface entre le gel et la solution d'équilibration. Le choix de la position de l'interface solution-gel est arbitraire et démontre l'applicabilité unidimensionnelle de la théorie du potentiel de Donnan. (C) Plan montrant l'interface entre la solution (côté gauche, blanc) et le gel (côté droit, ombragé). Le gel est constitué d'un polycation (représenté par des lignes) auquel sont fixées des charges positives (signe + en gris foncé). Les ions mobiles (+ et – en blanc) sont libres de diffuser dans la solution et à l'intérieur du gel. Le sens de la dérive et de la diffusion est indiqué par les flèches pour les 2 types d'ions mobiles. La variation du potentiel électrostatique correspondant à la position x est montrée sous le plan montrant l'interface solution-gel (située en $x = 0$). Le potentiel est nul dans la région de la solution jusqu'à la valeur de $x = -\delta/2$ où il augmente jusqu'à atteindre le potentiel de Donnan ($\Delta\Psi$) à la valeur de $x = \delta/2$ (δ est la longueur de Debye). 28
- Figure 2.2** Montage pour la manipulation du radionucléide Na^{22} afin de protéger l'expérimentateur du rayonnement γ de 1,83 MeV. Des briques de plomb recouvrent une

partie de la table tandis que les autres sont montées en muraille de façon à minimiser l'exposition de l'expérimentateur placé derrière. Un garde de bois solidement fixé à la table empêche ce dernier de faire tomber les briques de plomb sur l'échantillon au cours des manipulations. Toute la surface de manipulation est recouverte de papier absorbant (non illustré pour faciliter la visualisation). La source principale est gardée à l'intérieur d'une cavité formée de huit briques. Une seule brique est déplacée pour ouvrir ou fermer la cavité. 37

Figure 2.3 Nombre de comptes obtenus pour les différentes solutions radioactives, NaCl^{36} , Na^{22}Cl et $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$. La dose correspond à la valeur individuelle de l'isotope Na^{22} ou Cl^{36} présent dans la solution considérée. A) Compteur γ et B) Compteur β 50

Figure 2.4 Efficacité du compteur γ en comparaison avec le compteur β . On présente ici le nombre de comptes par minutes (cpm) obtenus pour la même solution de Na^{22}Cl avec variation de dose, effectuée en prélevant un volume différent pour chaque échantillon ($n = 2$). 51

Figure 2.5 Densité de charges fixes en fonction du pH de la solution d'équilibration. Le nombre total d'échantillon est de 19 et le coefficient de corrélation obtenu est de $R = 0.931$. La courbe pleine est la courbe linéaire ajustée aux valeurs de densités de charges fixes en fonction du pH. Les courbes en pointillés représentent les limites supérieures et inférieures de l'ajustement linéaire pour un intervalle de confiance de 0.95. 53

Figure 2.6 Variation de la constante de dissociation apparente ($\text{p}K_{\text{ap}}$) en fonction de la température ($n = 12$). 54

Figure 3.1 Référentiel de position du gel et de la solution d'équilibration dans un pétri. Le fond du pétri est défini comme position $x = 0$. L'axe de x positif pointe en direction du couvercle du pétri. 63

Figure 3.2 Fonction de simulation de contraction du gel en fonction du temps. Le temps $t_{0.5}$ caractérise le temps nécessaire pour que le gel réalise la moitié de sa contraction totale. Le temps τ détermine la durée nécessaire pour que le gel obtienne 90,5 % du total de sa contraction. Les variables h_g^i et h_g^c sont la hauteur initiale du gel et la hauteur de ce dernier une fois la contraction terminée, respectivement. 65

Figure 3.3 Profil de la concentration de GP dans la solution d'équilibration au cours du temps. Les points représentent les résultats expérimentaux (erreur égale à $\pm$ déviation standard). La ligne en trait continu (—) considère la contraction du gel selon l'équation 3.3 pour les conditions aux frontières présentées aux équations 3.6 et 3.7. La ligne en pointillés fins ($\cdots$) montre les résultats de la courbe obtenue en négligeant l'effet de rétrécissement mais en considérant le gel contracté dès le temps zéro. La ligne en traits pointillés ($---$) montre les résultats théoriques obtenus en considérant le système tel qu'il est au temps zéro.....79

Figure 3.4 Profil de concentration de GP à différents temps dans le pétri selon la position x définie à la Figure 3.1.....81

Figure 4.1 A) A four monomer segment of chitosan is represented with two protonated monomers, a neutral monomer, and an unprotonable *N*-acetyl-glucosamine monomer where each monomer has a length l . The smaller cylinder with radius a , corresponds to the chitosan molecule that is contained in its electrolyte envelope extending to radius b . Representative profiles of electrostatic potential $\psi(r)$, counterion concentration, c_- , and co-ion concentration, c_+ , are shown in a case of $I_c = 15$ mM NaCl at $\alpha = 0.75$ and $f_D = 1.00$. The circle indicates the electrostatic potential at the surface of the polyelectrolyte, $\psi|_{r=a}$ 94

Figure 4.2 Custom experimental apparatus that performs temperature-controlled titrations, while recording temperature, pH and relative light transmittance (L_T) of chitosan solutions. The temperature of the solution is controlled via the circulating bath and a titrator adds 0.01M NaOH to the solution. A photodetector assesses laser light transmittance through the beaker and solution to detect phase separation. 105

Figure 4.3 Relative light transmittance is shown along with volume of added titrant V_T , both recorded as a function of time, to illustrate the sharp decrease in L_T (circle) occurring at a volume of 3mL injected titrant, in this case. The α_{ps} value is calculated from eq 4.15, using the Na^+ , Cl^- and c_p concentrations at the corresponding injection volume, neglecting the proton concentration. 106

Figure 4.4 Variation of pK_a or pK_{ap} with temperature (eq 4.17 with reference temperature 5 °C) for D(+)-glucosamine, glycerol 2-phosphate, and chitosan with $f_D = 1.00$ in $I_c = 0$ obtained from temperature ramp tests (open symbols). The solid down triangles are $\Delta pK_{ap} = pK_0^{\text{lin}}(T) - pK_0^{\text{lin}}(T_{\text{ref}})$ where pK_0 values are y-axis intercepts obtained from linear fits of the pK_{ap} vs α from the titration measurements in the non phase separated region and with $\alpha \leq 0.85$. Both D(+)-glucosamine and chitosan experience a significant decrease in pK_{ap} upon heating while the pK_{ap} of glycerol 2-phosphate remained constant. Mean $\pm$ SD ($n = 3$) are shown. D(+)-glucosamine and glycerol 2-phosphate preparations are described in Section *Reagents and Solutions* from *Experimental Methods*. Chitosan solutions were prepared as described in that section with $f_D = 1.00$ and without added salt. The open up triangles are chitosan solutions to which 1.5 mL of NaOH 0.01 N was added to achieve $\alpha = 0.75$ and equilibrated overnight before the temperature ramp tests.....109

Figure 4.5 The electrostatic potential profile $\psi(r)$ calculated from the Poisson-Boltzmann cylindrical cell model from the surface of chitosan ($r = a = 0.8$ nm for our calculations) out to the midpoint ($r = b$ according to eq 4.2 above) between two adjacent chitosan molecules in solution. Note that this radius b varies with f_D due to glucosamine monomer initial concentration kept to 3.0 mM and with α due to titrant dilution. Model parameters were taken to represent chitosan solutions described in the experimental methods section such that the effects on the potential profile of changing the following parameters could be observed (A) temperature, (B) ionic strength, (C) fraction of deacetylation, and (D) degree of ionization. $\psi(r)$ increases when α or f_D , increase and when I_c decreases while no significant change in potential occurs as a function of temperature under these solution conditions.....110

Figure 4.6 Influence of chitosan degree of ionization on pK_{ap} (left-hand scale) and relative light transmittance (right-hand scale) for different (A) temperatures, (B) ionic strengths I_c and (C) fractions of deacetylation f_D . Dark symbols represent experimental data obtained in the single phase region (mean $\pm$ SD; $n = 3$), while lighter grey symbols are data obtained after phase separation. Solid lines are the model fit to the data (eqs 4.4,

4.9, 4.12 and 4.15) in the single phase region while dashed lines are the continuation of the model into the phase separated region. Finely dotted lines are used to link normalized light transmittance (L_T^N) data to show the occurrence of phase separation where L_T^N starts to decrease.....114

Figure 5.1 Titration du GP en fonction de la température (solutions du Tableau 5.1).

.....159

Figure 5.2 Comparaison entre le déchargement obtenu par la méthode de RMN et la prédiction du modèle.....161

Figure 5.3 Variation du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température pour différents mélanges chitosane/glycérol-phosphate (Tableau 5.3) par la méthode de la mesure du pH (Section 5.3.5).....163

Figure 5.4 A) Détermination de la température de séparation de phase en utilisant la valeur de la transmittance normalisée et la valeur de pH correspondante montrant de façon indirecte le déchargement du chitosane. B) Variation du pH en fonction de la température.....165

Figure 5.5 Variation du degré d'ionisation selon la valeur de la constante de dissociation de l'électrolyte faible mélangé avec le chitosane à différentes températures (5, 15, 25 et 35 °C). Dans le cas présenté ici, $\beta = \gamma = 1$ et la valeur du pK_{ap} du chitosane est donnée par l'équation 5.43 avec les valeurs $C_T = 0.032$ et $C_{lc} = 1.00$ et la température T donnée. Les lignes pointillées représentent la région de pK_a où la variation de α en fonction de la température est la plus importante. 169

Figure 6.1 Site aggloméré dans le champ électrostatique d'une autre macromolécule de chitosane. 178

Figure 6.2 Potentiel chimique en fonction de α pour différentes valeurs de λ . On constate qu'à partir d'une valeur critique de α_{ps} , les courbes $\lambda > 0$ présentent des valeurs de potentiels chimiques inférieurs.....184

Figure 7.1 Montage pour la séparation par masses moléculaires d'un échantillon de chitosane. Une solution acide circule à un flux constant dans un conduit qui contient une anode et une cathode. Une solution contenant du chitosane est injectée au point C. Les

chaînes de chitosane chargées (puisqu'elles sont dans une solution acide) sont entraînées vers la cathode sous l'action du champ électrique $\vec{E}$ ainsi que perpendiculairement par le flux constant de la solution acide. Les petites chaînes de chitosane circulent plus rapidement vers la cathode puisqu'elles subissent une friction inférieure. Les chaînes de chitosane devraient se répartir selon les faibles masses moléculaires jusqu'aux plus élevées, c'est-à-dire du point A au point B, respectivement. 192

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

α : degré d'ionisation

α_{ps} : degré d'ionisation à la séparation de phase

a : rayon impénétrable du cylindre représentant le chitosane

a_{H^+} : activité du proton

$\bar{a}_H$: activité moyenne du proton

A : paramètre fonction de β et γ

β : rapport de la concentration de glycérol-phosphate et de monomère de glucosamine

b : rayon de la cellule cylindrique représentant le chitosane

B : paramètre fonction de β et γ

χ : fraction de glycérol-phosphate sous la forme divalente

c : nombre de voisins immédiats à un site d'interaction

c_+ : concentration des co-ions

c_- : concentration des contrions

$c_{\pm}^0$: concentration des cations (+) et des anions (-) mobiles dans la solution ionique où le potentiel électrostatique est nul

$\bar{c}_{\pm}$: concentration moyenne des cations (+) et des anions (-) mobiles

c_c^{g-f} : concentration finale de monomère de glucosamine

c_D : concentration ionique d'un disque de gel

c_e : concentration de phosphore de l'échantillon

c_g : concentration de monomères de glucosamine

c_g^+ : concentration de monomères de glucosamine protonés

$c_{\pm}^g$: concentration des cations (+) et des anions (-) mobiles dans le gel

$\bar{c}_H$: concentration moyenne du proton

c_i : concentration de l'espèce i

$c_{\pm}^i$: concentration des cations (+) et des anions(-) mobiles monovalents d'espèce i

c_l^i : concentration ionique de l'espèce i de la solution inconnue

c_p : concentration monomérique moyenne du polymère

c_p^g : concentration de phosphore dans le gel

c_p^m : concentration de phosphore mesurée

c_p^s : concentration de phosphore dans la solution

c_R : concentration ionique de la solution de référence

C_{lc} : paramètre d'ajustement linéaire du pK_{ap} dépendant de la force ionique

C_T : paramètre d'ajustement linéaire du pK_{ap} dépendant de la température

δ : longueur de Debye

δ_a : déplacement chimique du phosphore sous la forme monovalente

δ_b : déplacement chimique du phosphore sous la forme divalente

δ_C : déplacement chimique

δ_i : position de l'interface solution-air

$\Delta\Psi$: potentiel de Donnan

ΔE_a : variation d'énergie d'association

Δm : variation de masse

D_g : constante de diffusion dans le gel

D_s : constante de diffusion dans la solution

DMEM : milieu de culture, Dubecco's Modified Essential Medium

ε : permittivité du milieu considéré

ε_0 : permittivité du vide

ε_m : paramètre de mélange

ε_{AA} : énergie d'interaction hydrophobiques

$\bar{\varepsilon}_{AA}$: énergie d'interaction hydrophobiques normalisée par kT

ε_{pp} : énergie d'interaction polymère-polymère

ε_{ps} : énergie d'interaction polymère-solvant

ε_r : efficacité relative des compteurs radioactifs

ε_{ss} : énergie d'interaction solvant-solvant

e : charge électrique

E_e : énergie électrostatique

f_A : fraction de monomères *N*-acétyl-glucosamines

f_D : fraction de monomères glucosamines (désacétylés)

F : énergie libre d'Helmholtz

F_a : énergie libre associée au gain d'énergie entraîné par l'association de région agrégée

F_c : énergie libre associée à la conformation de la chaîne de polycation

F_e : énergie libre associée à l'énergie électrostatique

F_r : énergie libre associée à la redistribution des ions mobiles

F_T : énergie libre totale

$\bar{F}_T$: énergie libre totale normalisée par kT

γ : différence de la concentration des cations et des anions à forte dissociation normalisé par la concentration de monomère de glucosamine

γ_i : coefficient d'activité de l'ion d'espèce i

$\gamma_{\pm}^c$: coefficient d'activité des cations (+) et des anions (-) dans la cellule cylindrique

$\gamma_{\pm}^0$: coefficient d'activité moyen des ions mobiles dans la solution ionique

$\gamma_{\pm}^g$: coefficient d'activité moyen des ions mobiles dans le gel

GlcNH_2 : monomère de glucosamine sous la forme neutre

GlcNH_3^+ : monomère de glucosamine ionisé

GP : glycérol-phosphate (neutre, monovalent et divalent)

GPO_4 : glycérol-phosphate neutre

GPO_4^- : glycérol-phosphate monovalent

GPO_4^{2-} : glycérol-phosphate divalent

h_g : hauteur du gel

h_g^c : hauteur du gel après sa contraction

h_g^i : hauteur initiale du gel

H_2O_{dd} : eau distillée et déionisée

I_c : force ionique (concentration volumique)

κ : inverse de la longueur de Debye

k : constante de Boltzmann

K_0 : constante de dissociation (acide) à un degré d'ionisation nul (intrinsèque)

K_a : constante de dissociation (acide)

K_{ap} : constante de dissociation apparente (acide)

K_w : constante de dissociation de l'eau

λ : fraction de sites de chitosane dont la phase est séparée de la solution

l : longueur structurale d'un monomère de chitosane

L_D : perte à la dessiccation (loss on drying)

L_T : transmittance normalisée du faisceau laser

μ_i^0 : potentiel chimique standard de l'espèce i

μ_H^F : potentiel chimique du proton dans la phase fluide

μ_H^P : potentiel chimique du proton sur le polycation

$\bar{\mu}_m$: potentiel chimique d'un monomère du polycation normalisé par kT

μ_R : moles d'ions par comptes radioactifs obtenus d'un volume donné de la solution de référence

μ_R^β : moles d'ions par comptes radioactifs obtenus d'un volume donné de la solution de référence pour le compteur à rayons β

μ_R^γ : moles d'ions par comptes radioactifs obtenus d'un volume donné de la solution de référence pour le compteur à rayons γ

m : nombre de sites monomériques sur la chaîne polycationique

m_a : masse de soluté

m_c^s : masse du chitosane sec

m_c^{TPN} : masse du chitosane sous des conditions de température et de pression normales

m_e : masse de l'échantillon après équilibration

$\bar{m}_e$: masse moyenne après équilibration

m_g : masse du gel

m_i : masse initiale

$\bar{m}_m$: masse monomérique moyenne

M_n : masse moléculaire moyenne pondérée par le nombre de molécules

M_w : masse moléculaire moyenne pondérée par la masse

ν : fréquence de résonance magnétique nucléaire

ν_0 : fréquence de résonance magnétique nucléaire de la référence

η_D : viscosité dynamique

n : nombre d'échantillons

n_β^i : nombre de comptes obtenus du compteur à particules β pour l'espèce i

n_γ^i : nombre de comptes obtenus du compteur à rayons γ pour l'espèce i

n_{AA} : nombre de monomères agglomérés

n_H^p : nombre de protons sur le polycation

n_i : nombre de comptes radioactifs obtenus de la solution inconnue

$n_i^{\beta_T}$: nombre total de comptes obtenus du compteur à particules β de la solution inconnue

n_R : nombre de comptes radioactifs obtenus de la solution de référence

n_R^γ : nombre de comptes obtenus du compteur à rayons γ de la solution de référence

$n_R^{\beta_T}$: nombre total de comptes obtenus du compteur à particules β de la solution de référence

$n_R^{\beta_{Cl}}$: nombre de comptes obtenus du compteur à particules β correspondant au Cl^{36}

n_1^γ : nombre de comptes obtenus du compteur à rayons γ de la solution inconnue

N : nombre de molécules

N_A : nombre d'Avogadro

PB : Poisson-Boltzmann

PDI : indice de polydispersité

pH_e : pH après l'équilibre

pH_i : pH initial

pK_0^{lin} : valeur de pK_0 obtenue après un ajustement linéaire de la courbe de titrage

pK_0^{PB} : valeur de pK_0 obtenue par la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann

ψ : potentiel électrostatique

ρ : concentration de charges fixes

ρ_0 : densité de charges fixes

ρ_g : densité volumique du disque de gel

σ : densité surfacique uniforme de charge

σ_α : fonction de minimisation de l'écart entre la valeur du degré de dissociation théorique et expérimental

R : rapport des constante de dissociation des monomères de glucosamine et du glycérol-phosphate

RMN : résonance magnétique nucléaire

φ_s : fraction volumique du solvant

φ_p : fraction volumique du polymère

S_m : entropie de mélange des sites monomérique protonés et non protonés

SD : déviation standard

TPN : température et pression normales

r_p : rayon du pétri

$t_{0.5}$: temps de demi contraction du gel

t_p : temps de prélèvement pré déterminé

T : température

T_{ref} : température de référence arbitraire

τ : temps spécifique de contraction

V_{b} : volume de solvant

V_{d} : volume de la solution de désabsorption

V_{e} : volume de l'échantillon

V_{I} : volume de la solution inconnue

V_{r} : volume de la solution de rinçage

V_{R} : volume de la solution de référence

V_{s} : volume de la solution après la dissolution du soluté

$z_{\pm}^i$: valence des ions positifs (+) et négatifs (-) d'espèce i

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, plusieurs découvertes se sont faites dans différents domaines et particulièrement au niveau des soins de la santé. De nouveaux appareils sont apparus pour diverses applications et des découvertes importantes se sont faites au plan pharmacologique, tant au niveau des molécules que dans la façon d'administrer les médicaments. Dans cette optique, la compagnie BioSyntech a mis au point un gel thermosensible (Chenite, Chaput, Combes, Jalal et Selmani 1998) dont les applications sont nombreuses. Il peut être utilisé comme système de dispensation de médicaments, comme échafaudage de cellules ou encore pour la régénération de tissus (Hoemann et al, 2005). Ce gel est constitué d'un mélange de chitosane et de glycérol-phosphate. Il présente la propriété particulière d'être en réalité une solution visqueuse à basse température, soit environ entre 4 et 25 °C, et de se transformer en gel solide sous l'action de la chaleur à une température supérieure, soit environ 37 °C (voir Figure 1.1). Ce processus peut également être thermo réversible, c'est-à-dire que lorsque la température est abaissée, le gel se liquéfie tel qu'initialement. Plusieurs variantes du gel ont déjà été testées en modifiant les proportions chitosane/glycérol-phosphate ou en ajoutant des agents de liaison chimique. Évidemment, tous les mélanges ne présentent pas les mêmes caractéristiques (température de gélification, thermo réversibilité, etc.) mais la majeure partie d'entre eux peuvent, néanmoins, avoir cette caractéristique de se gélifier sous une augmentation de la température. Cette transition fait encore l'objet de questionnement et l'identification du mécanisme de gélification apportera sans doute une meilleure connaissance du produit et permettra de contrôler de façon plus efficace tous les

paramètres qui entrent en ligne de compte dans la fabrication et l'utilisation de ce gel thermosensible.

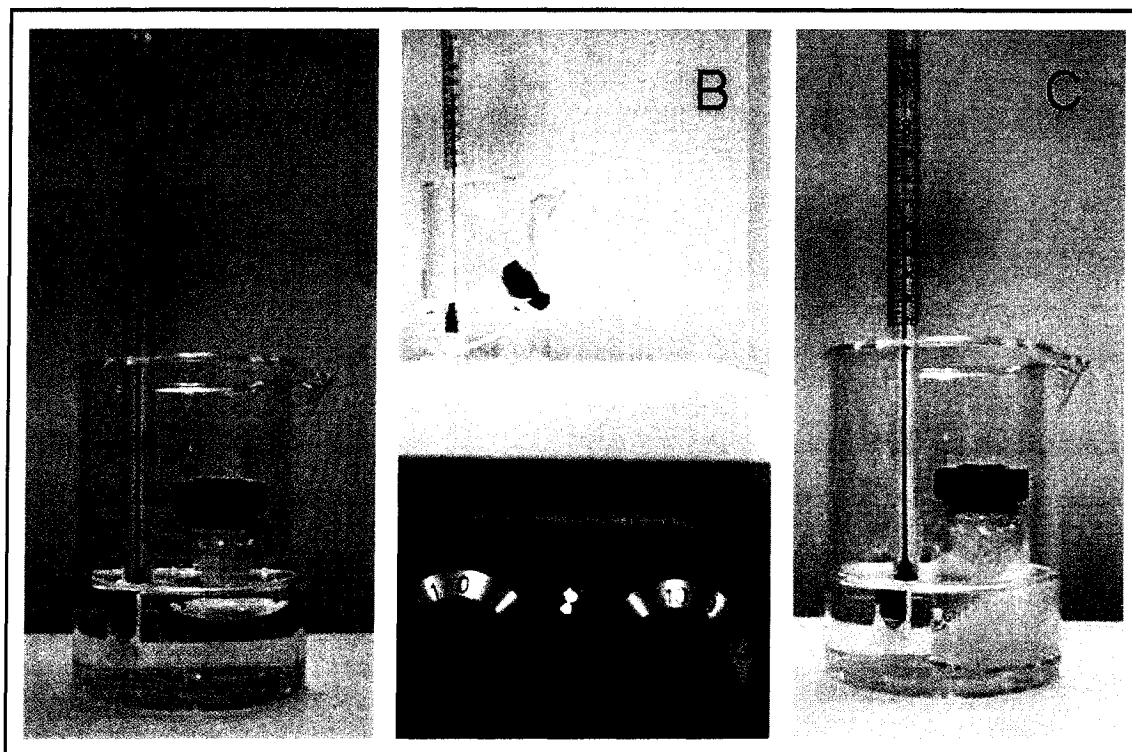


Figure 1.1 Gel de chitosane/glycérol-phosphate (voir la description du mélange à la section 5.3.1, Tableau 5.3, no. de mélange 3c). A) Solution liquide à la température de 22 °C. B) La fiole est inclinée à l'intérieur du bécher puis chauffée. C) Le gel est formé à une température de 68 °C. La fiole est replacée à la position verticale et on remarque que le gel maintient sa forme inclinée à l'intérieur de la fiole.

1.1 Le chitosane et ses propriétés physico-chimiques

La principale composante du gel de BioSyntech est le chitosane dont la structure chimique est présentée à la Figure 1.2. Le chitosane est un polysaccharide linéaire

constitué de deux monomères, soient le glucosamine et le *N*-acétyl-glucosamine. Ces monomères sont liés l'un à la suite de l'autre par leurs groupements glycoliques β -1 $\rightarrow$ 4 et on peut retrouver plus de 100 monomères par molécule de chitosane. Le chitosane est obtenu à partir de la désacétylation de la chitine (Hoppe-Seyler 1894). On retrouve naturellement la chitine dans la carapace des crustacés et des insectes à carapace rigide (Skjak-Braek, Anthonsen et Sandford 1989). On obtient donc du chitosane par l'extrait de la chitine suivi d'une désacétylation qui consiste à retirer le groupement acétyl des monomères *N*-acétyl-glucosamine. La chitine naturelle possède, tout comme le chitosane, les deux monomères glucosamine et le *N*-acétyl-glucosamine mais ce dernier est présent en plus grande quantité dans la chitine. Le chitosane est donc le résultat d'une manipulation chimique de la chitine et il existe plusieurs procédés permettant de retirer ce groupement acétyl (Tolaimate, Desbrieres, Rhazi et Alagui 2003).

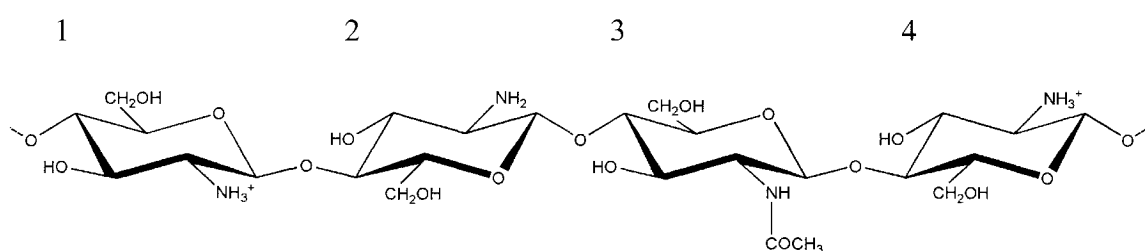


Figure 1.2 Molécule de chitosane. Les premier (1) et dernier (4) monomères sont des glucosamines ionisées. La glucosamine en deuxième position (2) est sous la forme neutre et le monomère *N*-acétyl-glucosamine est en troisième position (3).

1.1.1 Fraction de désacétylation et masse monomérique moyenne

Une importante caractéristique permettant de définir partiellement le chitosane est le rapport du nombre de monomères de glucosamine sur le nombre total de monomères qui constituent les chaînes de chitosane. Nous notons cette fraction par f_D pour *fraction de désacétylation*. Évidemment, la fraction de monomères *N*-acétyl-glucosamine, f_A , peut être obtenue par la relation suivante

$$f_A = 1 - f_D \quad (1.1)$$

Les techniques utilisées pour déterminer cette fraction de monomères acétylés vs désacétylés sont également nombreuses (Curotto et Aros 1993, Jiang, Chen et Zhong 2003). La technique de titrage conductimétrique et la détermination par résonance magnétique nucléaire (Lavertu, Xia, Serreqi, Berrada, Rodrigues, Wang et al. 2003) sont deux techniques fréquemment utilisées, l'une pour sa simplicité et l'autre pour sa précision. Notons ici que ce paramètre f_D ne nous renseigne pas sur la façon dont les monomères *N*-acétyl-glucosamine et glucosamine sont disposés l'un à la suite des autres. Certaines études (Smidsrod, Ottoy, Anthonsen et Varum 1997, Varum, Anthonsen, Grasdalen et Smidsrod 1991) ont montré que suite à la réaction de désacétylation, les monomères glucosamine et *N*-acétyl-glucosamine sont généralement regroupés en blocs, c'est-à-dire que l'on retrouve principalement une série de monomères glucosamine suivie d'une autre série de monomères *N*-acétyl-glucosamine. La façon actuelle d'obtenir du chitosane uniformément désacétylé consiste à désacétyler

totalelement la chitine pour obtenir un chitosane avec $f_D = 1$, puis de ré-acétyler ce dernier par une réaction chimique (Berger, Reist, Chenite, Felt-Baeyens, Mayer et Gurny 2005).

Le monomère de glucosamine du chitosane possède une masse moléculaire de 161,1 g/mol tandis que celle de son monomère *N*-acétyle-glucosamine est de 203,1 g/mol. Le calcul de la masse monomérique moyenne $\bar{m}_m$ est donné par

$$\bar{m}_m = 161,1f_D + 203,1(1 - f_D) \quad (1.2)$$

Le chitosane s'hydrate (Okuyama, Noguchi, Miyazawa, Yui et Ogawa 1997) lorsqu'il est en équilibre avec l'environnement normal. Ainsi, on peut également caractériser sa perte à la dessiccation L_D (loss on drying) en mesurant sa masse sous des conditions de température et pression normale (TPN) et en la comparant avec celle après séchage. Ainsi, la relation entre la masse séchée, m_c^s et la masse mesurée sous des conditions TPN, m_c^{TPN} , nous est donnée par

$$m_c^s = m_c^{TPN} (1 - L_D) \quad (1.3)$$

1.1.2 Masse moléculaire moyenne

Une autre caractéristique importante du chitosane est sa masse moléculaire moyenne. Celle-ci correspond au nombre de monomères qui constituent chacune des chaînes de chitosane multiplié par la masse monomérique moyenne. Il va sans dire que la nature ne

fournit malheureusement pas des molécules de chitine possédant le même nombre de monomères. Ainsi, les molécules de chitosane obtenues après désacétylation ne comportent pas le même nombre de monomères. Dans un échantillon de N molécules, on a donc N_i molécules possédant la masse moléculaire M_i . De façon générale, les distributions de masses moléculaires des polymères sont caractérisées par les valeurs moyennes M_n , M_w , et M_z qui sont respectivement définies par les relations suivantes

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} = \sum_i n_i M_i \quad (1.4)$$

$$M_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} = \sum_i w_i M_i \quad (1.5)$$

$$M_z = \frac{\sum_i n_i M_i^3}{\sum_i n_i M_i^2} = \sum_i z_i M_i \quad (1.6)$$

On constate facilement que les pondérations sont données par

$$n_i = \frac{N_i}{\sum_i N_i}, \quad w_i = \frac{n_i M_i}{\sum_i n_i M_i} \quad \text{et} \quad z_i = \frac{n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i^2} \quad (1.7)$$

et que n_i représente la fraction molaire.

La première relation (eq 1.4) indique la masse moléculaire moyenne des chaînes de polymères pondérée par le nombre de molécules N_i possédant la masse moléculaire M_i . La valeur de M_w (eq 1.5) est pondérée par la masse des N_i molécules possédant la masse moléculaire M_i , c'est-à-dire qu'une molécule possédant une plus grande masse contribuera plus fortement dans le calcul de la masse moléculaire moyenne. Quant à la valeur de M_z , elle nous donnera une meilleure indication sur la valeur des masses moléculaires encore plus élevées des molécules qui composent notre échantillon test. On observe que $M_z \geq M_w \geq M_n$. Ainsi, si un échantillon de chitosane est constitué de plusieurs longues chaînes et de plusieurs chaînes très courtes (Figure 1.3), la valeur de M_n nous indique une masse moléculaire située entre les deux valeurs majoritaires de la distribution. Les équations 1.5 et 1.6, quant à elles, nous donnent une meilleure approximation de la valeur de la masse moléculaire la plus élevée. Le rapport M_w/M_n nous donne une indication de l'étendue de la distribution de masses moléculaires. On appelle ce rapport l'indice de polydispersité (PDI). Ainsi, pour un rapport qui se rapproche de l'unité, on aura une distribution étroite alors que pour un rapport de plus de deux, on aura une distribution assez large. Parmi les diverses techniques qui sont utilisées pour la détermination de ces paramètres pour le chitosane, mentionnons les études rhéologiques (Desbrieres, Martinez et Rinaudo 1996), de diffusion de la lumière en régime statique (Errington, Harding, Varum et Illum 1993, Sorlier, Rochas, Morfin, Viton et Domard 2003) ou dynamique ainsi que de chromatographie à travers des gels perméables (Brugnerotto, Desbrières, Roberts et Rinaudo 2001, Muzzarelli, Ilari et Petrarulo 1994).

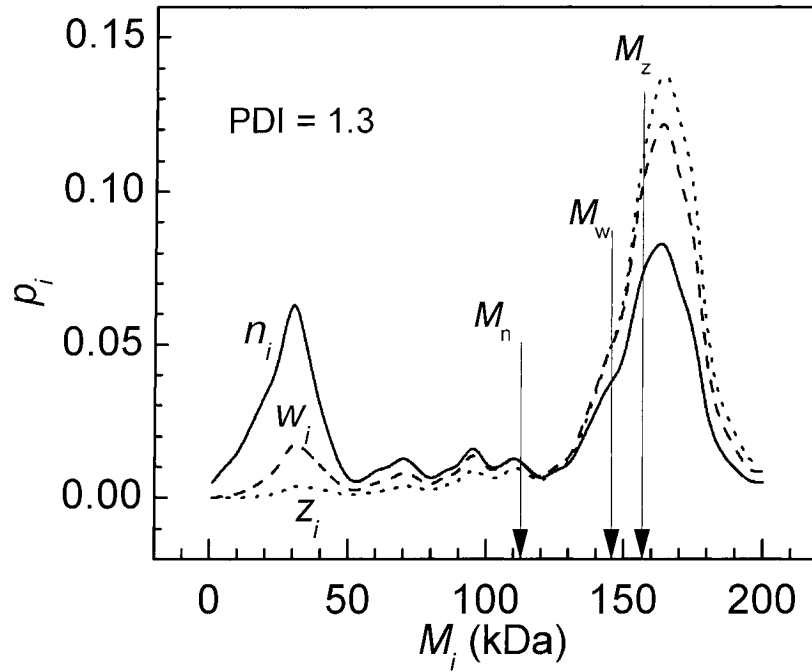


Figure 1.3 Exemple de distribution de masse moléculaire et valeur de masse moléculaire moyenne. La pondération $p_i = n_i, w_i$ ou z_i est en fonction de la masse moléculaire M_i . L'exemple a été généré à partir de données fictives.

1.1.3 Degré d'ionisation

Lorsqu'un chitosane de concentration monomérique moyenne c_p est mis en solution, ses monomères de glucosamine participent à une réaction de dissociation avec les protons de la solution dans laquelle ils sont dissous. Nous serons intéressés à quantifier la concentration de monomères de glucosamine qui portent un proton c_g^+ versus la concentration totale des monomères de glucosamine disponibles à l'interaction avec le

proton $f_D c_p$. Le paramètre défini par le rapport de ces deux concentrations constitue le degré d'ionisation du chitosane que nous indiquerons par α

$$\alpha = \frac{c_g^+}{f_D c_p} \quad (1.8)$$

1.1.4 Équilibre de dissociation

L'équilibre de dissociation du chitosane peut être schématisé par la réaction suivante



où GlcNH_2 et GlcNH_3^+ représentent les monomères de glucosamine sous la forme neutre et ionisée, respectivement. Cet équilibre de dissociation est caractérisé par l'équation suivante

$$K_a = \frac{c_{\text{GlcNH}_2} c_{\text{H}^+}}{c_{\text{GlcNH}_3^+}} = \frac{(1-\alpha) c_{\text{H}^+}}{\alpha} \quad (1.10)$$

où K_a est appelée constante de dissociation et c_i est la concentration de l'espèce ionique i . Il est plus commun d'utiliser l'équation 1.10 sous la forme suivante

$$\text{p}K_a = -\log K_a = \text{pH} - \log \frac{(1-\alpha)}{\alpha} \quad (1.11)$$

Notons que la valeur pH est donnée par l'équation

$$\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+} = -\log \gamma_{\text{H}^+} c_{\text{H}^+} \quad (1.12)$$

où a_{H^+} est l'activité du proton et γ_{H^+} est appelé coefficient d'activité. Pour l'équation 1.11, nous supposons que le coefficient d'activité $\gamma_{\text{H}^+} = 1$, ce qui est valide dans le cas de solutions idéales. Une solution idéale se forme sans absorption ni dégagement d'énergie (Beaudoin et Julien 1980).

Dans le cas d'un électrolyte simple, la valeur du $\text{p}K_{\text{a}}$ est constante pour n'importe quel degré d'ionisation α à une température donnée. Par contre, dans le cas d'une solution de polyélectrolytes, cette valeur est modifiée en fonction du degré d'ionisation. On parle en général d'un $\text{p}K_{\text{a}}$ apparent que nous noterons dorénavant $\text{p}K_{\text{ap}}$ dans le cas des polyélectrolytes. On retrouve, dans la littérature, des études de titrage portant sur la dissociation d'oligosaccharides de chitosane (Tsukada et Inoue 1981) et du chitosane (Park, Choi et Park 1983, Strand, Tommeraas, Varum et Ostgaard 2001) en fonction du degré d'ionisation du monomère de glucosamine. Les effets du paramètre f_{D} et de l'ajout de sel ont été étudiés dans certaines publications (Domard 1987, Sorlier, Denuzière, Viton et Domard 2001). Dans ces dernières, la majorité des valeurs de $\text{p}K_{\text{a}}$ se situent entre 3.5 et 7 dépendamment du degré d'ionisation α , du paramètre f_{D} et de l'ajout de sel. À notre connaissance, aucun modèle théorique n'est utilisé dans la littérature pour discuter des différents effets observés sur le $\text{p}K_{\text{ap}}$ du chitosane.

1.1.5 Séparation de phase du chitosane

Lorsqu'on révise les diverses expériences de titrage effectuées dans le passé, on note qu'il est souvent mentionné que la courbe n'a pu être complétée jusqu'à un degré d'ionisation nul puisque le chitosane se sépare de la phase aqueuse avant d'être totalement neutralisé (Domard 1987). Cette séparation de phase est peu caractérisée dans la littérature. Rinaudo (Rinaudo, Pavlov et Desbrieres 1999) spécifie un degré d'ionisation $\alpha = 0.5$ pour la séparation de phase d'un chitosane possédant un $f_D = 0.88$ et Varum (Varum, Ottoy et Smidsrod 1994) montre des mesures de turbidité en fonction du pH pour 4 chitosanes de f_D différents. Aucune étude ne présente, à notre connaissance, une caractérisation détaillée de la séparation de phase de chitosane possédant différentes valeurs de f_D et sous diverses conditions de forces ioniques.

1.2 Les diverses applications du chitosane

La chitine se classe au deuxième rang des polysaccharides après la cellulose en terme d'abondance sur la terre (Muzzarelli, 1977). Tel que mentionné précédemment, on retrouve naturellement la chitine dans la carapace des crustacés et des insectes à carapace rigide (Skjak-Braek, Anthonsen et Sandford 1989). En plus d'être facilement obtenu par désacétylation de la chitine (Tolaimate, Desbrieres, Rhazi et Alagui 2003), le chitosane présente plusieurs caractéristiques permettant un usage diversifié. Nous présentons ici certaines applications du chitosane que nous classifions en trois catégories, soient les applications médicales, alimentaires et industrielles.

1.2.1 Applications médicales

Le chitosane est grandement utilisé pour des applications médicales puisque toutes les études montrent des résultats de toxicité négligeable (Illum, 1998) et plusieurs études démontrent sa biocompatibilité et son immunogénicité (Rao et Sharma, 1997, Lee, Ha et Park, 1995, VandeVord et al., 2002). Le chitosane est utilisé pour les applications cutanées telles que les crèmes et les émulsions. Il est une des composantes du produit allemand ChitoGel. Le chitosane y joue le rôle d'émulsifiant, c'est-à-dire qu'il permet de mélanger de façon homogène des composantes hydrophobiques à l'eau. La crème gélatineuse ChitoGel a fait l'objet d'une étude pour déterminer la cinétique de délivrance de l'acide kojique et pour mesurer l'irritation cutanée occasionnée par différentes crèmes (Yu, Park et Choi, 1998). L'acide kojique est un agent qui a pour effet de blanchir la peau. Bien que le ChitoGel présente de bons résultats concernant l'irritation cutanée, celui-ci relâche l'acide kojique plutôt rapidement en comparaison des autres crèmes testées à base de pluronique (PluGel) et de carbopolymère (CarboGel).

La chitine et le chitosane sont reconnus pour améliorer la guérison de plaies chez les animaux (Kojima et al., 1998). Afin de traiter les blessures causées par des brûlures sévères, une membrane asymétrique composée principalement de chitosane a été préparée et utilisée comme pansement (Valenta et Auner, 2004, Mi et al., 2001). Cette membrane est également composée de sulfadiazine d'argent agissant comme antibiotique. L'argent soulève toutefois une inquiétude au sujet de sa toxicité potentielle. La membrane de chitosane agit comme un élément régulateur du relargage du

sulfadiazine d'argent. Elle permet de prolonger l'activité antibactérienne du sulfadiazine d'argent en ralentissant le relargage et elle permet de décroître la toxicité potentielle de l'argent par une utilisation mieux contrôlée.

Le chitosane est aussi reconnu pour être une molécule mucoadhésive. Lorsqu'il est protoné, il est capable d'augmenter la perméabilité paracellulaire des médicaments hydrophiles peptidiques ou protéiques (Thanou, Verhoef et Junginger, 2001) à travers les muqueuses épithéliales (intestinale et nasale). De plus, il ne montre aucune toxicité aigue (Junginger et Verhoef, 2004) lorsqu'il est en contact avec ces muqueuses. Le chitosane peut ainsi être utilisé comme enveloppe de médicaments utilisant la voie orale et permettre d'augmenter l'efficacité des traitements. Le fait d'être mucoadhésif présente l'avantage d'augmenter le temps de résidence du médicament incorporé au chitosane (Lehr, Bouwstra, Schacht et Junginger, 1992, Alpar, Somavarapu, Atuah et Bramwell, 2005).

D'autres systèmes de dispensation de médicaments sont faits de micro et nano particules de chitosane (Agnihotri et al., 2004). Mentionnons parmi ces différents systèmes la formation d'un complexe de nanoparticules chitosane/acide gadopentétique pour la thérapie contre le cancer par capture de neutrons (Tokumitsu, Ichikawa et Fukumori, 1999). Ces nanoparticules sont injectés dans la tumeur et le chitosane permet la rétention de l'acide gadopentétique afin de restreindre l'effet toxique du médicament à la tumeur. Une revue élaborée des systèmes médicamentés à relargage contrôlé est présentée par Lisbeth Illum (1998).

Le chitosane étant un polyélectrolyte cationique, il peut former des complexes avec les acides nucléiques qui sont anioniques (Il'ina et Varlamov, 2004). L'utilisation de ces vecteurs non-viraux transportant les molécules d'ADN à des fins thérapeutiques est perçue comme étant une approche très prometteuse. Les deux polyélectrolytes (chitosane et ADN) de charge opposée forment des nano particules très denses. Ces particules peuvent ensuite pénétrer dans la cellule et l'ADN est ainsi transfecté.

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, on utilise le chitosane pour la construction d'échafaudages tridimensionnels (Ang et al., 2002). Ces échafaudages ont pour but de promouvoir l'adhérence, la prolifération et la différenciation des cellules. Les échafaudages de chitosane peuvent présenter les avantages suivants de biocompatibilité, de non toxicité, de biodégradabilité, de porosité et de support mécanique. Barbara Krajewska (2005) présente une section de revue littéraire concernant l'ingénierie tissulaire du chitosane tandis qu'une seconde revue (Di Martino, Sittering et Risbud, 2005) se concentre à l'ingénierie tissulaire du cartilage, des disques intervertébraux et des os.

1.2.2 Applications alimentaires

Le chitosane est utilisé dans l'industrie alimentaire sous forme d'oligomères ou sous la forme de monomères de glucosamine après une hydrolyse partielle ou complète, respectivement (Shahidi, Arachchi et Jeon, 1999). Contrairement aux autres aliments, les fibres ne sont pas attaquées par les enzymes de l'estomac et du petit intestin. En ce sens,

le chitosane est une fibre d'origine animale (Borderias, Sanchez-Alonso et Pérez-Mateos, 2005). En effet, le corps humain ne possède pas les enzymes nécessaires (la chitinase et la chitosanase) pour dégrader ces longues chaînes de polymère. Lorsque le chitosane est utilisé comme supplément alimentaire, il permet de réduire le cholestérol et les triglycérides du plasma sanguin et améliore le rapport HDL-cholestérol/cholestérol total.

Le chitosane présente des propriétés antimicrobiennes contre les microorganismes tels que les bactéries, les levures et les champignons (Shahidi, Arachchi et Jeon, 1999). Étant donné les charges positives sur son groupement aminé lorsqu'il est dans une solution de pH inférieur à 6, le chitosane est plus soluble et présente une meilleure activité antimicrobienne que la chitine. Les mécanismes proposés de son action antimicrobienne sont que les charges positives du chitosane neutralisent les charges négatives des membranes cellulaires des microbes et conduisent à une fuite des constituants intracellulaires (Chen, Liao et Tsai, 1998). Le chitosane agit également comme agent chélateur qui lie les métaux et inhibe la production de toxines et réduit la croissance microbienne. D'autres études montrent également que le chitosane inactive la croissance bactérienne telle que *Escherichia coli* (Simpson et al. 1997).

Bien qu'aucune étude ne montre des effets néfastes du chitosane, des études cliniques devront toutefois être menées pour s'assurer que le chitosane n'altère pas la flore intestinale (puisque la croissance de pathogènes résistants pourraient survenir avec une

ingestion prolongée) et qu'il n'interfère pas avec l'absorption de micronutriments, particulièrement les vitamines liposolubles et les minéraux (Koide, 1998).

1.2.3 Applications industrielles

L'une des applications courantes du chitosane est son utilisation pour le traitement des eaux usées (Krajewska, 2005, Crini, 2005). Ses propriétés pour la coagulation, la floculation et la chélation qui originent de sa grande densité de groupements aminés font de lui un candidat idéal pour cette application. Ainsi, les contaminants tels que les suspensions solides provenant de procédés alimentaires, les colorants utilisés pour les produits textiles, les biphényles polychlorinés et plusieurs autres produits toxiques peuvent être récupérés à la suite de coagulation/floculation et de mécanismes d'absorption. Le chitosane possède également une grande affinité avec les métaux lourds (Guibal, 2004) et peut alors être utilisé pour leur élimination. En dehors des eaux usées mais dans la même lignée d'utilisation, le chitosane sert parfois d'agent clarifiant dans la production de jus de fruits (Imeri et Knorr, 1988) et permet de contrôler l'acidité des jus. Le chitosane y est alors utilisé comme coagulant.

Dans le même ordre d'idée, le chitosane est également utilisé comme immobilisateur d'enzymes (Krajewska, 2004). En effet, plusieurs procédés chimiques utilisent maintenant des enzymes comme catalyseur puisque les enzymes sont souvent plus efficaces que des catalyseurs chimiques et elles offrent un haut degré de spécificité éliminant ainsi la génération de produits non désirés. De plus, les réactions utilisant ces

enzymes se produisent dans des conditions de température, de pression ou de pH moins extrémistes que les catalyseurs chimiques, réduisant ainsi les coûts de production. Les enzymes sont toutefois difficiles à isoler et à purifier. Elles sont également instables lorsqu'elles sont isolées de leur environnement naturel (généralement attachées aux membranes cellulaires). C'est pour cette raison qu'il est préférable de les immobiliser ou de les fixer sur un support plus robuste. Le chitosane est alors tout à fait indiqué pour ce genre d'applications puisqu'il est cationique et il offre une très grande affinité pour les protéines. Il est biocompatible, non toxique et peut être biodégradé par la chitinase ou la chitosinase, donc très sûre d'un point de vue environnemental.

Cette habileté à immobiliser les enzymes peut également être employée pour la production de biosenseurs (Krajewska, 2005). En effet, Luo, Xu, Du et Chen (2004) ont fabriqué un biosenseur de glucose permettant de déterminer sa concentration pouvant varier entre 5,0 μM et 2,4 mM en moins de 7 secondes. D'autres systèmes de biosenseurs sont discutés dans la revue de littérature de Yi et al. (2005). Des procédés électrochimiques pour la formation d'hydrogels déposés sur des électrodes ont faits l'objet de certaines études (Wu et al., 2002, Fernandes et al., 2003) dans le but de produire des dispositifs miniaturisés.

Dans le domaine des applications de biotechnologies, plusieurs microorganismes sont produits et utilisés pour la production de ferments, d'antibiotiques, de protéines, etc. Le recours aux polymères cationiques tel que le chitosane peut s'avérer utile pour permettre la floculation de suspensions cellulaires (Barany et Szepesszentgyörgyi, 2004). Le

chitosane permet, avec ses charges positives, de réduire la charge effective en surface des cellules et de créer des ponts entre elles. De cette façon, il permet de concentrer les suspensions cellulaires pour séparer la biomasse de la solution.

Le chitosane est également utilisé suite à des modifications chimiques. Nous citons ici des revues littéraires présentant diverses modifications du chitosane qui apportent de multiples autres applications. Ces revues littéraires ont été écrites par Sashiwa et Aiba (2004), Macquarrie et Hardy (2005) et Guibal (2005).

1.3 Les hydrogels de chitosane

Selon l'office de la langue française (1983), un hydrogel *est un type rare de colloïde dans lequel l'eau contient un solide formant un fin réseau qui s'étend dans tout le système. Les phases solides et liquides y sont continues*. Nous utilisons une classification simplifiée inspirée de celle de Berger (2004) pour identifier les types d'hydrogels de chitosane. Nous citerons quelques exemples pour les types présentés.

Les hydrogels peuvent être séparés en deux classes principales selon leur type de réticulations, soient chimiques ou physiques. Les hydrogels à réticulation chimique sont formés de liens covalents irréversibles tandis que les hydrogels à réticulation physique forment des liens réversibles, (ponts hydrogènes, liaisons ioniques ou interactions hydrophobiques). Ces réticulations peuvent avoir lieu avec le chitosane lui-même, avec un autre polymère (ou polyélectrolytes) ou encore avec un agent réticulant dont la masse

moléculaire est nettement inférieure à celle du chitosane. Certaines formulations d'hydrogels de chitosane peuvent présenter les deux types de réticulations chimique et physique (considérées comme des hydrogels chimiques puisqu'ils ne sont pas complètement irréversibles) et être formées avec un autre polymère ainsi qu'un agent réticulant.

Les hydrogels à réticulations chimiques présentent les meilleures propriétés mécaniques et résistent à la dissolution même dans des conditions de pH éloigné d'un pH neutre. Toutefois, les agents réticulants utilisés pour former les liens covalents sont connus pour être toxiques. Parmi les agents réticulants formant une réticulation covalente, notons la glutaraldéhyde, le formaldéhyde, l'acide oxalique et le glyoxal. Monteiro et Airoidi (1999) ont étudié la réticulation impliquant l'interaction chitosane–glutaraldéhyde et leurs données de spectroscopie par RMN du ^{13}C , par infrarouge et Raman montrent la formation d'un double lien éthylénique. Ces données suggèrent que les groupes amines libres du chitosane interagissent avec le groupe aldéhydique du glutaraldéhyde pour former des liens stables.

Un autre système donne des résultats similaires au gel de BioSyntech (Aebischer et Zielinski 1999) puisqu'il s'agit d'un gel formé de chitosane dont la réticulation est physique et implique le chitosane. Une membrane perméable contenant une solution de chitosane est plongée dans une solution dont le pH est plus élevé. Par l'augmentation du pH, le chitosane à l'intérieur de la membrane se sépare de la phase aqueuse et forme ainsi un gel par des interactions chitosane–chitosane.

D'autres hydrogels ont été élaborés à partir de mélanges alginate/chitosane. L'alginate est un polyélectrolyte anionique alors que le chitosane est un polyélectrolyte cationique (Zielinski et Aebischer 1994). Lorsqu'on mélange ces deux polyélectrolytes, ceux-ci se neutralisent mutuellement pour former un complexe gélatineux. Ce gel est donc formé par des interactions ioniques polymère-polymère.

Des gels de chitosane ont également été obtenus à partir de mélanges de chitosane et de sodium tri-polyphosphate (Kumar, Muzzarelli, Muzzarelli, Sashiwa et Domb 2004) ainsi que des mélanges de glycérol et de chitosane en milieu acide (Jackson et David S. 1984). Certains gels obtenus avec des contre ions forment des microsphères (Sinha et al., 2004) et sont utilisés comme vecteurs pour la livraison de médicaments.

1.4 Le gel thermo sensible de BioSyntech

Le gel de chitosane de BioSyntech (Chenite, Chaput, Combes, Jalal et Selmani 1998) est dissout dans un acide qui est généralement l'acide acétique (CH_3COOH) ou encore l'acide chlorhydrique (HCl). Les concentrations de chitosane généralement utilisées sont de 0,1 à 0,2 g/L. Des solutions de concentrations inférieures à 0,1 g/L forment des gels trop faibles mécaniquement, ou encore, elles ne parviennent pas à se gélifier. Pour des solutions de concentrations supérieures à 2 g/100mL, il est souvent difficile de solubiliser le chitosane. Une fois la dissolution achevée, cette solution est amenée à 4 °C sur la glace et on y ajoute entre 0,2 à 0,8 g/L de disodium β -glycerol 2-phosphate (voir la structure à la Figure 1.4). La solution est ensuite chauffée pour lui permettre de se

gélifier. En fonction des proportions des constituants, les mélanges vont effectuer la séparation de phase à des températures différentes. Ceci constitue la gamme de proportions des mélanges contenant les composantes essentielles pour obtenir le gel thermo gélifiant et parfois réversible. Certaines variantes ont été obtenues en ajoutant d'autres composants en faible concentration par rapport aux concentrations de chitosane et de disodium β -glycerol 2-phosphate. Parmi ces variantes, nous retenons la cellulose qui permettait d'obtenir un gel irréversible mécaniquement plus résistant. Il est à noter que des études parallèles ont démontré par la suite qu'une impureté de la cellulose était à l'origine d'une réticulation chimique qui donnait au gel son caractère irréversible et plus résistant (Hoemann, Sun, Legare, McKee et Buschmann 2005). Dans le cas des autres variantes, les composants ajoutés étaient destinés à être mélangés dans la solution liquide à basse température pour ensuite être distribués uniformément dans la matrice du gel pour diverses applications.

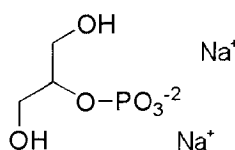


Figure 1.4 Molécule de disodium glycerol 2-phosphate.

1.5 Objectifs de la thèse

L'objectif principal de la thèse est de déterminer le mécanisme qui donne lieu à la gélification du mélange chitosane/glycérol-phosphate induite par chauffage. Le caractère réversible de ce système combiné au caractère électrolyte du chitosane nous suggère l'hypothèse que des interactions électrostatiques peuvent être à l'origine d'un tel mécanisme. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons fixé quelques objectifs secondaires qui ont orienté le cours des expérimentations suivantes.

En premier lieu, nous nous sommes demandé si, une fois sous la forme d'un gel, le chitosane possédait toujours ses propriétés de polyélectrolyte ou s'il s'était neutralisé par une réaction quelconque au cours de sa formation. Nous avons donc déterminé le degré d'ionisation du chitosane sous la forme de gel, ce qui constitue le sujet du Chapitre 2 permettant de répondre à la première interrogation en utilisant la théorie du potentiel de Donnan.

Par la suite, nous devons déterminer le rôle du glycérol-phosphate (GP). De quelle façon interagit-il avec le chitosane? Est-il lié au gel ou libre de diffuser dans la matrice? Dans le Chapitre 3, nous présenterons les expérimentations qui ont permis de valider que le GP n'est pas fixé au chitosane et que sa diffusion répond aux équations théoriques de diffusion libre.

À la suite de ces réponses à nos interrogations, nous nous sommes concentrés sur les caractéristiques du chitosane en solution. Un montage permettant l'acquisition simultanée du pH, de la température et de la lumière transmise a été conçu. Ce montage est entièrement automatisé et permet le contrôle de la température ainsi que l'ajout d'une solution de titrage. Les mesures acquises à l'aide de ce montage nous ont permis d'étudier et de corréler les effets des paramètres tels que la température, la force ionique (contrôlée par l'ajout de NaCl) et le degré de désacétylation f_D sur le pK_{ap} du chitosane en solution. Les mesures de lumière transmise nous ont permis de déterminer la valeur du degré d'ionisation à laquelle le chitosane testé se sépare de la phase aqueuse. Un modèle cylindrique utilisant l'équation de Poisson-Boltzmann nous a permis de prédire les valeurs de pK_{ap} du chitosane en fonction des paramètres énumérés précédemment. Les mesures et le modèle ont fait l'objet d'un article présenté au Chapitre 4. On propose également dans cet article un mécanisme expliquant la gélification du mélange chitosane/GP.

Afin de valider théoriquement le mécanisme proposé, nous avons inclus l'effet de la température aux équations acide-base du mélange chitosane/GP. Ainsi, le Chapitre 5 explique le mécanisme qui permet au chitosane de réduire son état de charge. On y démontre que la réduction de l'état de charge est fonction de la variation avec la température de la constante de dissociation des constituants du mélange. Une expérience utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de montrer que le chitosane réduit effectivement son état de charge au profit du GP qui accepte le proton et modifie également son état de charge. Les mêmes solutions sont également testées avec le

montage utilisé dans le cadre des mesures du Chapitre 4 pour valider les mesures de RMN. Le Chapitre 6 propose un modèle pour expliquer que la réduction de l'état de charge permet aux interactions faibles hydrophobiques de dominer et de faire geler le mélange chitosane/GP.

Le dernier chapitre discute des contributions de la thèse à la connaissance du mélange chitosane/GP. Un autre mélange inspiré du mécanisme élucidé et constitué d'un polyélectrolyte anionique, l'alginate, est également présenté afin de montrer qu'il est possible d'obtenir d'autres gels thermo sensibles semblables au gel de chitosane/GP. Nous soulignons également qu'il est possible d'obtenir un gel induit par chauffage avec du phosphate montrant ainsi que le glycérol-phosphate n'est pas la seule molécule qui conduit à un mélange thermo gélifiant avec le chitosane.

CHAPITRE 2 - CHARGES FIXES DANS LE GEL DE CHITOSANE

2.1 Introduction

L'utilisation du gel de chitosane pour les systèmes vivants exige une caractérisation globale des paramètres pouvant influencer son interaction avec des molécules ou des cellules vivantes avec lesquelles il peut être en contact (Illum, 1998). Un des paramètres importants est la densité de charges fixes pouvant être situées sur la partie aminée du monomère glucosamine. La présence de charges fixes positives peut avoir plusieurs répercussions sur l'utilisation du gel avec les systèmes biologiques. S'il possède des charges positives fixes, il peut facilement adhérer à la plupart des tissus puisque ceux-ci comportent généralement des charges négatives. Notre objectif principal est donc de déterminer si, au cours du processus de gélification, une partie des monomères de glucosamine conserve des groupements ionisés.

L'étude doit être menée avec un mélange de composants du gel bien déterminé et relativement stable. Le mélange étant le plus utilisé est celui menant à une gélification irréversible. Ce mélange comporte également l'avantage de pouvoir être plongé dans une solution liquide et de s'équilibrer avec cette solution tout en restant sous la forme d'un gel.

L'étude a également comme objectif secondaire de déterminer l'effet de certains paramètres étant susceptibles d'influencer la densité de charges du gel. Les paramètres

identifiés sont le pH et la température de la solution avec laquelle il est en équilibre. L'hypothèse avancée concernant le pH est qu'une augmentation de celui-ci entraîne une diminution de la densité de charges. Nous anticipons ce comportement puisque l'équilibre de dissociation du chitosane (eq 1.9) prédit une diminution de la concentration de monomères de glucosamine protonés lorsque l'on diminue la concentration de protons dans la solution. Quant à l'augmentation de la température, nous croyons qu'elle mène à une réduction de la densité de charges qui diminue l'énergie électrostatique et permet aux chaînes de chitosane de se rapprocher. Nous fondons notre hypothèse sur le fait que le système forme un gel en chauffant. Une réduction de l'énergie électrostatique et ainsi, de la répulsion électrostatique entre les chaînes de chitosane, pourrait être à l'origine du mécanisme de gélification.

Les échantillons testés sont des disques de gel de chitosane dont on détermine la concentration de charges positives fixées aux monomères de glucosamine. Des disques de cartilage et d'agarose sont utilisés comme contrôles positif et négatif respectivement. En effet, le cartilage est composé d'une matrice extracellulaire qui contient une grande quantité de protéoglycans dont les ramifications sont composées de glycoaminoglycans portant des charges négatives. Des études de même nature que celles présentées dans ce chapitre ont été effectuées sur des échantillons de cartilage (Maroudas et Evans 1972) et ont montré une concentration de charges fixes négatives d'environ 100 mM. Quant au gel d'agarose, il est neutre puisqu'il est constitué de monomères de D-galactose et de 3,6-anhydro-L-galactose (Voet et Voet 1998) qui ne contiennent aucun groupement

chimique ionisable. Pour déterminer la concentration de charges fixes, nous pouvons utiliser la condition d'électroneutralité avec des ions mobiles monovalents d'espèce i ,

$$\rho + c_+^i - c_-^i = 0 \quad (2.1)$$

où ρ représente la concentration de charges fixes et $c_{\pm}^i$, la concentration des cations (+) et des anions (-) mobiles monovalents d'espèce i .

Pour déterminer la valeur de ρ , nous pouvons utiliser les deux ions mobiles avec une fraction sous la forme de radioisotopes Na^{22} et Cl^{36} ou utiliser la théorie du potentiel de Donnan et déterminer la concentration d'un seul des deux ions mobiles radioactifs Na^{22} ou Cl^{36} .

2.2 Théorie du potentiel de Donnan

Nous considérons ici le cas d'un gel qui porte des charges fixes positives (ou négatives) à l'intérieur de sa matrice. Celui-ci est en équilibre avec un bain de solution ionique constituée principalement de NaCl et d'un tampon de concentration négligeable devant la concentration de NaCl qui permet de maintenir le pH constant. Le volume de la solution est de beaucoup supérieur à celui du gel (Figure 2.1A).

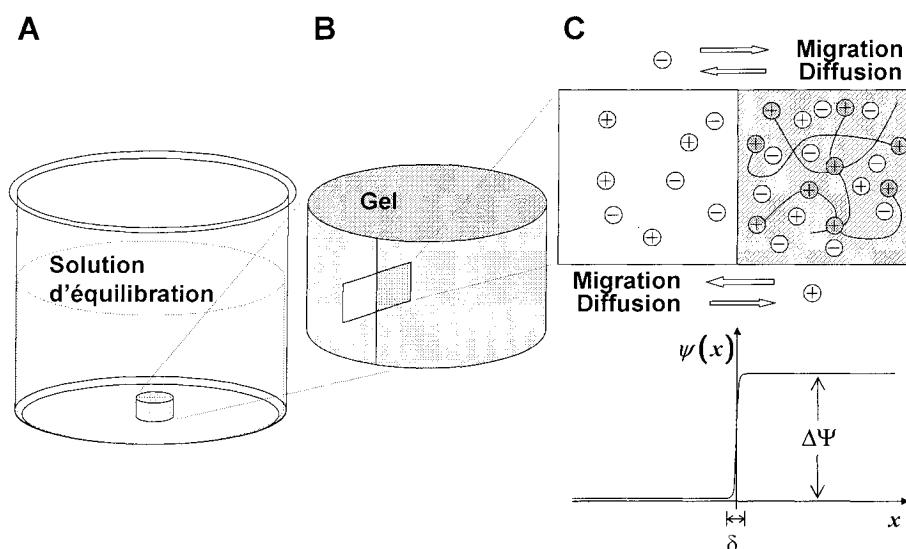


Figure 2.1 (A) Gel dans la solution d'équilibration de concentration de NaCl déterminée. (B) Plan contenant l'interface entre le gel et la solution d'équilibration. Le choix de la position de l'interface solution-gel est arbitraire et démontre l'applicabilité unidimensionnelle de la théorie du potentiel de Donnan. (C) Plan montrant l'interface entre la solution (côté gauche, blanc) et le gel (côté droit, ombragé). Le gel est constitué d'un polycation (représenté par des lignes) auquel sont fixées des charges positives (signe + en gris foncé). Les ions mobiles (+ et – en blanc) sont libres de diffuser dans la solution et à l'intérieur du gel. Le sens de la dérive et de la diffusion est indiqué par les flèches pour les 2 types d'ions mobiles. La variation du potentiel électrostatique correspondant à la position x est montrée sous le plan montrant l'interface solution-gel (située en $x = 0$). Le potentiel est nul dans la région de la solution jusqu'à la valeur de $x = -\delta/2$ où il augmente jusqu'à atteindre le potentiel de Donnan ($\Delta\Psi$) à la valeur de $x = \delta/2$ (δ est la longueur de Debye).

La présence de charges fixes à l'intérieur du gel fait migrer les charges mobiles de signe opposé (contrions) vers l'intérieur du gel tandis qu'elle repousse les charges mobiles de même signe (co-ions) vers la solution. Cette migration est compensée par la

diffusion des ions mobiles qui tentent de rétablir les gradients de concentration. Les contreions diffusent vers la solution externe tandis que les co-ions diffusent vers l'intérieur du gel. Une fois l'équilibre atteint entre la diffusion et la migration, il existe une différence de potentiel $\Delta\Psi$ à la frontière qui sépare le gel de la solution dans laquelle il est plongé (Figure 2.1B et C). C'est Frederick George Donnan (Donnan 1911) qui fut le premier à proposer l'existence de cette différence de potentiel. Le potentiel à l'intérieur du gel est supérieur ou inférieur à celui du bain dépendamment que les charges fixes sur les macromolécules qui composent le gel sont positives ou négatives, respectivement.

2.2.1 Calcul de la concentration de charges fixes

Nous traitons le problème de façon unidimensionnelle étant donné qu'il est toujours possible de déterminer une interface qui contienne d'un côté la solution et de l'autre le gel. Nous considérons que la solution se situe du côté des $x < 0$ tandis que le gel se situe du côté des $x > 0$ (Figure 2.1C). Le traitement du problème s'effectue à l'échelle macroscopique. De cette façon, nous pouvons supposer que les charges fixes sont distribuées d'une façon homogène à l'intérieur du gel. Aussi, le potentiel est nul dans la solution et continu à l'interface mais sa variation se restreint pratiquement à l'interface entre $-\delta/2 < x < \delta/2$ où δ (longueur de Debye) est beaucoup plus petit que la dimension d'une molécule du gel. La longueur de Debye est donnée par

$$\delta = \frac{1}{\kappa} \quad \text{avec} \quad \kappa^2 = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 k T}{e^2 \rho_0} \quad (2.2)$$

où κ est l'inverse de la longueur de Debye, ε_0 est la permittivité du vide, ε est la permittivité du milieu considéré, k est la constante de Boltzmann, T est la température, e est la charge électrique et ρ_0 la densité de charges fixes. Nous considérons que le profil de concentration des ions mobiles présents dans la solution et dans le gel peut être décrit par la distribution de Boltzmann. L'équation décrivant la concentration des ions positifs c_+ et négatifs c_- selon la position en x est alors donnée par

$$\gamma_{\pm} c_{\pm}(x) = \gamma_{\pm}^0 c_{\pm}^0 e^{\mp |z_{\pm}| e \psi(x) / k T} \quad (2.3)$$

Où z_+ et z_- sont les valences des ions positifs et négatifs, respectivement. Le potentiel électrostatique est donné par $\psi(x)$. Considérant que le sel est monovalent et que seuls les ions mobiles provenant du sel sont présents dans la solution ionique entourant le gel, l'électroneutralité dans cette phase implique que

$$c_+(x < 0) = c_-(x < 0) = c^0 \quad (2.4)$$

Notons ici que nous faisons l'approximation que les coefficients d'activité $\gamma_{\pm}$ et $\gamma_{\pm}^0$ sont égaux à un, ce qui est valide dans le cas d'une solution idéale. Avec $c_{\pm}^g$ représentant la concentration des ions mobiles dans le gel ($x > 0$) et puisque $\psi(x) = \Delta\Psi$, l'on peut

établir la relation suivante pour la concentration des ions situés à l'intérieur du gel $c_{\pm}^g$, à partir de la distribution des ions mobiles (eq 2.3)

$$c_{\pm}^g(x > \delta) = c^0 e^{\mp e\Delta\Psi/kT} \quad (2.5)$$

À partir des deux dernières équations, nous obtenons la relation suivante entre les concentrations dans la solution ionique et dans le gel

$$\frac{c^0}{c_+^g} = \frac{c_-^g}{c^0} \quad (2.6)$$

Ainsi, en ayant une mesure de la concentration des ions positifs ou négatifs à l'intérieur du gel, nous pouvons déterminer ρ , la densité de charges fixes qui composent le gel. Pour ce faire, nous utilisons le marqueur radioactif Cl^{36} (Expériences 2.1 et 2.2) et nous calculons la densité de charges fixes en utilisant la relation suivante (qui combine les eqs 2.1 et 2.6)

$$\rho = c_-^g - \frac{(c^0)^2}{c_-^g} \quad (2.7)$$

L'utilisation de deux marqueurs radioactifs (Expérience 2.3), le Na^{22} et le Cl^{36} , nous permet de calculer directement la concentration de charges fixes de notre gel de chitosane en utilisant directement l'équation 2.1 avec $c_+^g = c(\text{Na}^{22})$ et $c_-^g = c(\text{Cl}^{36})$.

Dans le cas où l'on ne fait pas l'approximation que les coefficients d'activités sont égaux à 1, l'équation 2.6 devient

$$\frac{\gamma_{\pm}^0 c^0}{\gamma_{\pm}^g c_{+}^g} = \frac{\gamma_{\pm}^g c_{-}^g}{\gamma_{\pm}^0 c^0} \quad (2.8)$$

$$\frac{(\gamma_{\pm}^g)^2}{(\gamma_{\pm}^0)^2} = \frac{(c^0)^2}{c_{+}^g c_{-}^g} \quad (2.9)$$

À l'aide de la dernière équation, nous pouvons donc déterminer le coefficient d'activité moyen du NaCl dans le gel en connaissant son coefficient d'activité dans la solution externe pour une concentration donnée c^0 .

2.3 Méthodologie expérimentale

2.3.1 Réactifs

2.3.1 a) Préparation des disques de gel de chitosane

Chaque gel de chitosane est fait à partir d'une solution de 0,1g de chitosane (Aldrich Chemical, Cat. No. 44887 – 7, medium molecular weight, $f_D = 0,836$, $L_D = 0,061$) dans 5 mL d'acide acétique 0,1 M dont le pH final est de 3,98. Cette solution est ensuite autoclavée pendant 30 minutes, puis refroidie et agitée dans un bain de glace. Une fois la solution refroidie, on ajoute 0,5 mL à 0,388 g/mL de disodium glycérol-phosphate (Cat.

No. G9891, Disodium Salt, Hydrate, H₂O content 4,5 mol/mol) de façon progressive. Tout en continuant d'agiter le mélange froid, nous ajoutons 1,5 mL à 0,167 g/mL d'hydroxyethyl-cellulose (Fluka, Cat. No. G9891, medium viscosity). L'ajout de ce dernier composant permet d'obtenir un gel irréversible. Après avoir obtenu un mélange homogène d'un volume total de 7 mL, celui-ci est versé dans un pétri de 6 cm de diamètre. Le pétri est incubé à 37 °C pendant 30 minutes. On ajoute ensuite 6 mL de DMEM (pH = 7,4)¹ sur le dessus du gel. On remplace la préparation par une nouvelle solution à deux reprises, avec un intervalle de 15 minutes entre chaque changement, puis on laisse reposer dans l'incubateur. Le DMEM est retiré le lendemain avant de découper des disques de 4 mm de diamètre à l'aide d'un poinçon de biopsie (Miltex, Disposable Biopsy Punch, No. Cat. 33-34). Les disques dont l'épaisseur varie entre 1 et 1,5 mm sont sélectionnés. Un soin particulier est porté afin de choisir des disques qui ne présentent aucune déchirure ou irrégularité dans la forme, puisque des disques qui se déchirent entraîneront de faux résultats.

2.3.1 b) Préparation des disques de cartilage

Les disques proviennent d'une épaule de bœuf adolescent (environ 1 ½ an, provenant de l'Abattoir de St-Louis de Gonzaille). Des disques de cartilage sont prélevés de

¹ Le DMEM (Dubecco's Modified Essential Medium) est une solution tampon constituée de nutriments essentiels à maintenir des cellules vivantes. Cette solution est également adaptée pour maintenir un pH et une osmolarité qui sont adéquats pour les cellules sous une atmosphère de 5 % de CO₂.

l'épaule à l'aide d'une perceuse électrique munie d'une mèche circulaire creuse. Une fois la carotte de cartilage et d'os prélevée, l'os est enlevé à l'aide d'une scie dentelée vibrante pour ne conserver que la partie du cartilage. Une fois les disques obtenus, ils sont congelés dans l'azote liquide jusqu'à l'utilisation pour l'expérimentation.

2.3.1 c) Préparation des disques d'agarose

Les disques d'agarose sont préparés avec une solution TBS de 10 mM. Le TBS (Tris Buffer Saline) est une solution tampon utilisée pour maintenir les cellules sous les bonnes conditions de pH (neutre) et d'osmolarité (environ 350 mOsm). On ajoute ensuite 0,5 g d'agarose (Fisher, low melting temperature, No. Cat. BP-1360-100) dans 25 mL de TBS dans un Erlenmeyer. Cette solution est ensuite chauffée au four à micro-ondes tout en l'observant attentivement. Il est à noter que l'ébullition débute subitement et que les bouillons peuvent éclabousser dans les secondes qui suivent. Ainsi, lorsque la solution commence à bouillonner, on arrête le four immédiatement, on agite la solution et répète la procédure jusqu'à dissolution complète. Une petite quantité (environ 3 mL) du mélange est ensuite versée dans un pétri de 6 cm de diamètre pour obtenir un gel d'une épaisseur variant entre 1 et 1,5 mm. Les disques sont découpés de la même façon que pour les disques de gel de chitosane.

2.3.1 d) Solutions tampons non radioactives

Les solutions tampons sont préparées soit à partir du Hepes Free Acid (Sigma, Cat. No. H3375) ou du NaHCO_3 (Sigma, Cat. No. S8875) dont la masse dissoute dans l'eau

distillée et dé ionisée est la masse nécessaire pour obtenir une concentration finale de 10 mM. Le pH est ajusté avec du NaOH 1 N (ou du HCl 1N) à la valeur de 6,0, 6,5, 7,0 ou 7,5. La valeur de ce pH est notée pH_i en référence au pH initial. À la solution, on ajoute la quantité nécessaire de NaCl (Fisher Scientific, Cat No. S271-1) de façon à obtenir une concentration finale de 50 ou 150 mM.

2.3.1 e) *Solutions tampons radioactives*

Les produits radioactifs utilisés sont le $NaCl^{36}$ en solution aqueuse (Amersham, Cat. No. CIS3–100UCI) et le $Na^{22}Cl$ en solution aqueuse également (Amersham, Cat. No. SKS1–100UCI). Les sources ont chacune 100 $\mu Ci/mL$ et la concentration nécessaire pour produire un nombre de comptes supérieur à 500 comptes (< 0.05 d'erreur) par échantillon est de 0,5 $\mu Ci/mL$. On ajoute ainsi une aliquote représentant 0,5 % du volume aux solutions tampons non radioactives (contenant le Hepes ou le $NaHCO_3$) en les diluant également d'un facteur de 0.5%, négligeable. Une aliquote de 25 à 150 μL est prélevée de chacune des solutions tampons radioactives afin de pouvoir établir la relation entre le nombre de comptes et les concentrations de Na^+ et Cl^- de cette solution (voir les équations 2.12 et 2.16 dans la section 2.3.4 suivante).

Dans le cas de la solution $Na^{22}Cl^{36}$, on prépare deux solutions distinctes des marqueurs $Na^{22}Cl$ et $NaCl^{36}$ en ajoutant une aliquote représentant 1,0 % du volume à la solution tampon non-radioactive. Nous mélangeons ces deux solutions dans un rapport 1:1 pour obtenir une solution finale contenant 0,5 $\mu Ci/mL$ de Na^{22} et Cl^{36} .

2.3.2 Montage particulier pour les radionucléides

Le radionucléide Cl^{36} comporte certains risques à l'utilisation. Tout d'abord, il émet des particules β^- d'une énergie de 0,710 MeV. Un écran (Fisher Scientific, Beta Radiation Safety Shield, No. Cat. FB-BT2FIS) de 1 cm d'épaisseur, en acrylique, est donc utilisé pour la manipulation de la source. La demi-vie radioactive du Cl^{36} est de 301 000 ans et sa demi-vie biologique, c'est-à-dire la durée nécessaire pour qu'un processus de biodégradation se départisse de la moitié de la dose initiale, est de 10 jours (ICRP Publication 30, Part 2, 1980).

Le Na^{22} n'est pas moins risqué. Il émet des particules β^+ d'une énergie maximale de 1,83 MeV et des rayonnements γ de 1.28 MeV. On doit donc utiliser un écran de plomb pour bloquer la majorité des rayonnements. Pour la manipulation de la source ($< 100 \mu\text{Ci}$) il est recommandé de réduire l'émission de 10 % ce qui correspond à bloquer la source à l'aide de briques de plomb d'environ 4 cm d'épaisseur. Nous avons donc construit un support en bois qui a pour but d'empêcher l'expérimentateur de faire tomber les briques de plomb montées en muraille (voir Figure 2.2) lors des manipulations. Nous avons également disposé des briques de plomb sur la table pour éviter le passage des rayonnements par le dessous. La source principale est manipulée de façon à minimiser le temps d'exposition. Aussitôt que sa manipulation est terminée, celle-ci est rangée dans un endroit entouré de briques de plomb complètement fermé (6 côtés). La demi-vie radioactive du Na^{22} est de 2,6 ans alors que sa demi-vie biologique est d'environ 10 jours mais 1 % de la quantité absorbée a une demi-vie biologique est de 500 jours (ICRP

Publication 30 1980). Notons ici que la durée de la demi-vie radioactive du Na^{22} , comparée à la durée des expérimentations (maximum de 7 jours), est bien assez longue pour pouvoir être négligée dans les calculs.

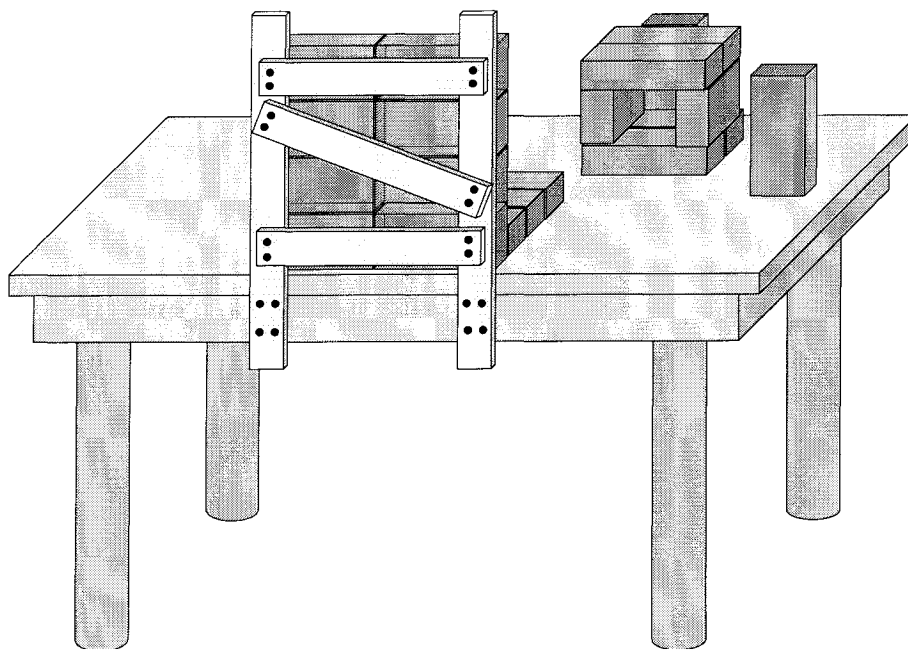


Figure 2.2 Montage pour la manipulation du radionucléide Na^{22} afin de protéger l'expérimentateur du rayonnement γ de 1,83 MeV. Des briques de plomb recouvrent une partie de la table tandis que les autres sont montées en muraille de façon à minimiser l'exposition de l'expérimentateur placé derrière. Un garde de bois solidement fixé à la table empêche ce dernier de faire tomber les briques de plomb sur l'échantillon au cours des manipulations. Toute la surface de manipulation est recouverte de papier absorbant (non illustré pour faciliter la visualisation). La source principale est gardée à l'intérieur d'une cavité formée de huit briques. Une seule brique est déplacée pour ouvrir ou fermer la cavité.

Les règles de sécurité concernant le port des gants, du sarrau et des lunettes de sécurité ont été respectées. Tous les déchets radioactifs ont été conservés dans un contenant approprié jusqu'au ramassage de ces déchets par une compagnie spécialisée.

2.3.3 *Déroulement des expérimentations*

En premier lieu, nous mesurons la masse initiale m_i des disques sélectionnés de gel de chitosane. Nous les déposons ensuite individuellement dans un puits d'une plaque de culture de 48 puits et nous ajoutons 1,3 mL d'une solution tampon de la condition à tester (voir le Tableau 2.1 concernant les conditions de tests). Les disques sont laissés dans la solution d'équilibration pour la nuit. Cette période de pré équilibration permet au disque de gonfler ou de rétrécir selon qu'il absorbe une partie de la solution d'équilibration ou qu'il rejette une partie de son contenu vers la solution d'équilibration. Le lendemain, on retire chacun des disques de leur solution et on essuie le surplus de liquide à l'aide d'un essuie-tout (Kimwipes, Kimberly-Clark, Cat. No. 34120). Nous mesurons à nouveau leur masse après équilibration que nous notons m_e . La mesure de cette masse est utilisée ultérieurement pour estimer le volume du disque en déterminant approximativement que sa densité est égale à celle de l'eau, soit 1 g/mL. Nous utilisons également la masse m_e afin de la comparer à la masse m_i dans le but de quantifier le gonflement ou le rejet de solution. La variation de masse est donnée par Δm selon l'équation suivante

$$\Delta m = \left(\frac{m_e - m_i}{m_i} \right) \quad (2.10)$$

Tableau 2.1 Conditions de tests selon l'Expérience

Cond.	pH initial	c_{NaCl} mM	Tampon	T °C	Échantillons (n)	Marqueurs
2.1a	6,0	50	Hepes	4	Gels (2), Cart. (1)	Cl^{36}
2.1b	7,0	50	Hepes	4	Gels (2), Cart. (1), Aga. (1)	Cl^{36}
2.2a	6,0	50	Hepes	4	Gels (3), Cart. (1), Aga. (1)	Cl^{36}
2.2b	6,0	150	NaHCO_3	4	Gels (3)	Cl^{36}
2.2c	7,0	50	Hepes	4	Gels (3), Cart. (1), Aga. (1)	Cl^{36}
2.2d	7,0	50	Hepes	37	Gels (3)	Cl^{36}
2.3a	7,0	50	Hepes	RT	Gels (3), Cart. (1), Aga. (1)	$\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$

On mesure le pH des solutions dans lesquelles les disques ont été pré équilibrés, noté pH_e (pH après l'équilibre). On ajoute l'isotope radioactif aux solutions tampons selon la méthode décrite à la section 2.3.1. Dans des fioles à scintillation identifiées, on réserve, pour fin de comptage de référence, une aliquote de volume $V_R = 100 \mu\text{L}$ pour chacune de ces solutions tampons radioactives. Les disques sont ensuite déposés dans un nouveau puits et on leur ajoute 1,3 mL de la solution tampon radioactive correspondante lors de la période de pré équilibration. Ce deuxième équilibre est également laissé pour la nuit. Le lendemain, nous retirons chacun des disques de leur solution et nous essuyons le surplus de liquide à l'aide d'un essuie-tout puis nous les déposons dans un nouveau

puits. Nous ajoutons 1,3 mL d'une solution de 150 mM NaCl non radioactive. Cette solution est utilisée pour permettre aux ions radioactifs de quitter le disque pour se répartir dans la solution. L'utilisation d'une solution de désabsorption, dont le volume total V_d est égal à 1,3mL, est nécessaire puisque le disque ne peut pas être mélangé au liquide de scintillation utilisé avec le compteur de particules β . On dispose, dans une fiole à scintillation, une aliquote de volume $V_I = 100 \mu\text{L}$ de la solution de désabsorption de chacun des échantillons.

2.3.4 *Calculs pour la détermination de la concentration de charges fixes*

Les sections 2.3.4 a) et 2.3.4 b) suivantes montrent les équations utilisées dans le calcul de la concentration de charges fixes pour les 2 méthodes soient la Méthode 2.1 utilisant un seul marqueur et la théorie du potentiel de Donnan et la Méthode 2.2 utilisant le calcul direct de la concentration de charges fixes. Chacune de ces méthodes utilise le comptage de la solution tampon radioactive d'équilibration comme référence. On peut définir une variable pratique μ_R qui représente le nombre de moles d'ions Na^+ ou Cl^- par comptes obtenus n_R du volume d'aliquote V_R dont la concentration c_R est définie par la préparation servant de référence (voir c_{NaCl} dans le Tableau 2.1). Cette variable peut être exprimée en $\text{mM} \cdot \mu\text{L}/\text{comptes}$ et sa formule est donnée par

$$\mu_R = \frac{c_R V_R}{n_R} \quad (2.11)$$

2.3.4 a) Méthode 2.1 – Utilisation d'un seul marqueur Cl^{36}

Un appareil de détection des particules β (Packard, 1900 TR Liquid Scintillation Analyzer, TR1-CARB dont la référence est le Br^{133} à 20.0 μCi) est utilisé pour compter les événements radioactifs produits par le Cl^{36} . Les aliquotes testées sont d'abord mélangées à 5 mL de liquide de scintillation (Scintisafe, Fisher Scientific, No. Cat. SX23-5). On procède ensuite au comptage des solutions tampon radioactives (section 2.3.1) et des échantillons de concentration inconnue c_I . Nous avons fixé le temps de comptage à 1 minute par échantillon. Ce temps est suffisant pour obtenir un minimum de 500 comptes par échantillon ($< 5\%$ d'erreur) à la concentration de $\mu Ci/mL$ utilisée. La concentration inconnue c_I est finalement déterminée en utilisant la variable μ_R définie par l'équation 2.11 et le nombre de comptes de l'échantillon de concentration inconnue, noté n_I , par la relation suivante

$$c_I = \frac{n_I}{V_I} \mu_R \quad (2.12)$$

Une fois que la concentration d'ions Cl^- de la solution de désabsorption est établie, nous déterminons la concentration des ions Cl^- contenus à l'intérieur du disque, notée c_D , par l'équation suivante

$$c_D = c_I \left(1 + \frac{V_d \rho_g}{m_e} \right) \quad (2.13)$$

où nous rappelons que V_d est le volume total de la solution de désabsorption, m_e est la masse de l'échantillon et ρ_g est la densité volumique approximative du gel ($\rho_g \cong 1 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$). Nous pouvons ensuite déterminer la concentration de charges fixes ρ en utilisant l'équation 2.7 où $c^0 = c_R$ et $c_-^g = c_D$.

2.3.4 b) Méthode 2.2 – Courbes de calibration pour distinguer les marqueurs Na^{22} et Cl^{36}

La détermination de la concentration des ions Na^{22} et Cl^{36} exige des courbes de calibration pour différencier les comptes provenant du Na^{22} de ceux provenant du Cl^{36} . En effet, le Na^{22} , tout comme le Cl^{36} , produit des particules β dont les comptes ne sont pas différenciés par l'appareil. Toutefois, le Na^{22} produit des rayonnements γ que le Cl^{36} n'en émet pas. Ainsi, en utilisant un compteur de particules γ (Beckmann, Gamma 5500), on peut distinguer le nombre de comptes provenant du Na^{22} en effectuant des doubles comptages.

Nous préparons, pour les courbes de calibration, une solution de Na^{22}Cl et une autre de NaCl^{36} à $1,0 \mu\text{Ci/mL}$ chacune avec 50 mM de NaCl , un tampon Hepes à 10 mM et un pH de 7.0 de la façon décrite à la section 2.3.1 e). À partir de ces deux solutions, nous en préparons une troisième (rapport 1:1) de $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$. Ceci donne une solution finale à $0,5 \mu\text{Ci/mL}$ pour chacun des radionucléides. Cette solution sert également aux tests pour déterminer la concentration de charges fixes de façon directe.

Nous prélevons ensuite les aliquotes décrites dans le Tableau 2.2 et effectuons un décompte de celles-ci à l'aide du compteur de particules γ . Nous mélangeons les mêmes aliquotes au liquide de scintillation puis faisons la lecture au compteur de particules β . Les trois volumes d'aliquotes différents (voir le Tableau 2.2) nous permettent de tester la linéarité du décompte de particules (et de la technique de pipetage) pour les deux appareils.

Tableau 2.2 Concentrations et volumes d'aliquotes des échantillons utilisés pour identifier les comptes relatifs au Na^{22} et Cl^{36} dans chacun des compteurs β et γ .

Solution radioactive	Concentration de l'isotope présent Na^{22} et/ou Cl^{36}	Volumes d'aliquotes
	$\mu\text{Ci/mL}$	μL
Na^{22}Cl	1,0	25, 50, 75
NaCl^{36}	1,0	25, 50, 75
$\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$	0,5*	50, 100, 150

* Cette concentration représente la concentration individuelle de l'isotope Na^{22} et Cl^{36} .

Les courbes de calibration sont nécessaires pour valider que (1) seul le radionucléide Na^{22} produit des comptes perçus par le compteur à rayon γ et que (2) la lecture des comptes perçus par le compteur à particules β correspond à la somme des comptes provenant du Na^{22} et du Cl^{36} . De plus, ces courbes permettent de quantifier l'efficacité relative, c'est-à-dire de déterminer le nombre de comptes détectés par le compteur à

rayon γ , n_{γ}^{Na} , par rapport au nombre de comptes détectés par le compteur à particules β , n_{β}^{Na} , pour le même échantillon de Na^{22}Cl (n'oublions pas que le Na^{22} produit, pour chaque désintégration, une particule β et un rayon γ). L'efficacité relative est définie par

$$\varepsilon_r = \frac{n_{\gamma}^{\text{Na}}}{n_{\beta}^{\text{Na}}} \quad (2.14)$$

2.3.4 c) Méthode 2.2 – Détermination directe de ρ à l'aide du Na^{22} et du Cl^{36}

Après avoir obtenu les courbes de calibration et déterminé l'efficacité relative des deux compteurs, nous utilisons comme solution de référence la solution $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$ dont la concentration de NaCl est connue. Nous effectuons un comptage des rayons γ dont le nombre obtenu est noté n_{R}^{γ} . Nous utilisons cette valeur n_{R}^{γ} dans l'équation 2.11 pour déterminer la valeur de μ_{R}^{γ} . Nous procédons ensuite au comptage des rayons γ , n_{I}^{γ} de la solution inconnue de $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$. L'équation 2.12 est utilisée pour déterminer la concentration inconnue de Na^{+} , c_{I}^{Na} dans la solution de $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$ en utilisant les comptes provenant du compteur n_{I}^{γ} et la valeur de μ_{R}^{γ} .

Nous ajoutons la solution de scintillation à la solution de référence de $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$ pour déterminer le nombre total de comptes de particules β noté $n_{\text{R}}^{\beta_{\text{T}}}$. Quant au calcul de la valeur de μ_{R}^{β} , nous devons initialement déterminer le nombre de comptes $n_{\text{R}}^{\beta_{\text{Cl}}}$ correspondant au Cl^{36} de la solution de référence par l'équation suivante

$$n_R^{\beta_{Cl}} = n_R^{\beta_T} - \frac{n_R^\gamma}{\varepsilon_T} \quad (2.15)$$

où $n_R^{\beta_T}$ et n_R^γ sont les nombres de comptes de la solution tampon de référence $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$ détectés respectivement par les compteurs β et γ . Ce nombre de compte $n_R^{\beta_{Cl}}$ remplace la valeur de n_R dans l'équation 2.11 pour le calcul de μ_R^β . Nous pouvons ensuite procéder au comptage des particules β , $n_I^{\beta_T}$, de la solution de concentration inconnue de $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$ et déterminer la concentration d'ions Cl^- , notée c_I^{Cl} , dans la solution d'équilibration avec

$$c_I^{\text{Cl}} = \left(n_I^{\beta_T} - \frac{n_I^\gamma}{\varepsilon_T} \right) \frac{\mu_R^\gamma}{V_I} \quad (2.16)$$

où $n_I^{\beta_T}$ et n_I^γ sont les nombres de comptes de la solution de concentration inconnue détectés respectivement par les compteurs β et γ .

Les concentrations de Cl^- et de Na^+ dans le disque sont déterminées en utilisant l'équation 2.13 avec la concentration c_I égale à c_I^{Cl} et c_I^{Na} , respectivement. Nous utilisons finalement ces dernières valeurs dans l'équation 2.1 pour déterminer la concentration de charges fixes.

2.3.5 Détermination du degré d'ionisation

Pour déterminer le degré d'ionisation, nous devons d'abord déterminer la concentration monomérique de glucosamine c_g . Nous pouvons calculer la masse moléculaire du chitosane utilisé ($f_D = 0,836$) avec l'équation 1.2. Ce calcul nous donne une masse moléculaire de 168,0 g/mol. Le chitosane utilisé pour cette partie n'a pas été séché au préalable. Sa masse a donc été mesurée sous des conditions de pression et de température normales. En tenant compte de la perte à la dessiccation, $L_D = 0,061$ (voir eq 1.3) et en utilisant $f_D = 0,836$, on peut déterminer la concentration initiale de monomères glucosamine dans le gel de chitosane comme

$$c_g = \frac{0,1g}{\left(168,0 \frac{g}{mol}\right)} (1 - 0,061) \cdot \frac{1}{0,007L} 0,836 = 66,8 \text{ mM} \quad (2.17)$$

La valeur du degré d'ionisation peut ensuite être déterminée à partir de la variation de masse Δm (eq 2.10), de la concentration de charges fixes (eq 2.1 ou 2.7, en fonction de la méthode utilisée) et de la concentration c_g avec l'équation suivante

$$\alpha = \frac{\rho(1 + \Delta m)}{c_g} \quad (2.18)$$

On peut ensuite utiliser l'équation 1.11, sujet à l'hypothèse d'une solution idéale ($\gamma_{H^+} \cong 1$), pour déterminer la valeur du pK_a apparent, pK_{ap} .

2.4 Résultats

2.4.1 Concentration de charges fixes

2.4.1 a) Potentiel de Donnan

Le Tableau 2.3 présente les résultats obtenus des Expériences 2.1 et 2.2 en utilisant les comptes radioactifs du Cl^{36} seul (conditions 2.1 et 2.2 du Tableau 2.1) ainsi que la théorie du potentiel de Donnan. Les valeurs de concentration de charges fixes sont obtenues par la méthode 2.1 présentée à la section 2.3.4 a). On constate que tous les gels de chitosane montrent une concentration de charges fixes positives de plus de 25 mM sauf dans le cas de la condition 2.2b où la moyenne donne 1 mM de signe négatif. Par contre, le domaine d'erreur sur cette valeur donne une valeur maximale de 10 mM de signe positif. Les cartilages présentent une concentration de charges négatives d'environ 60 mM tandis que les gels d'agarose présentent une concentration de charges fixes à peu près nulle (entre -1 et 2 mM).

Tableau 2.3 Concentration de charges fixes obtenue par la méthode utilisant la théorie de l'équilibre de Donnan.

Cond.*	Échantillons	pH _e	$\bar{m}_e$	Δm	n_R	n_I	ρ	n
	type		mg				mM	
2.1a	Chitosane	*	15.8	*	96963	2430	78 ± 6	2
2.1a	Cartilage	*	21.0	*	98139	964	-52	1
2.1b	Chitosane	*	11.0	*	96335	1105	31 ± 8	2
2.1b	Cartilage	*	22.8	*	94129	920	-61	1
2.1b	Agarose	*	10.0	*	97155	757	-1	1
2.2a	Chitosane	6.9		$0,22 \pm 0,04$	95569	1280	31 ± 2	3
2.2a	Cartilage	*		*	96377	647	-63	1
2.2a	Agarose	*		*	95984	953	2	1
2.2b	Chitosane	7.5		$-0,06 \pm 0,03$	94316	735	-1 ± 11	3
2.2c	Chitosane	7.0		$0,05 \pm 0,005$	96185	1170	29 ± 9	3
2.2c	Cartilage	*		*	96500	616	-65	1
2.2c	Agarose	*		*	96562	926	2	1
2.2d	Chitosane	6.6		$-0,07 \pm 0,02$	96738	1180	28 ± 16	3

* Ces mesures ont été omises pour le gel de chitosane dans le cas de l'expérience 2.1 et n'ont pas été considérées pour le cartilage et le gel d'agarose dans les expériences 2.1 et 2.2.

2.4.1 b) Méthode directe – courbes de calibration

Les nombres de comptes obtenus par les compteurs β et γ des solutions utilisées pour obtenir les courbes de calibration des compteurs (Tableau 2.2) sont présentés à la Figure 2.3. Dans le cas du compteur γ , le nombre de comptes du NaCl³⁶ donne un très faible

signal comparativement à celui du Na^{22}Cl . Dans le cas du compteur β , on constate que le nombre de comptes des solutions Na^{22}Cl et NaCl^{36} est pratiquement superposé et qu'il correspond à la moitié des comptes obtenus par le $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$.

L'efficacité relative des 2 compteurs est représentée à la Figure 2.4. On constate que le nombre de comptes détectés par le compteur γ est inférieur à celui rapporté par le compteur β pour la même solution. Le rapport des valeurs de ces deux courbes nous donne une valeur de $\varepsilon_r = 0,71$ du compteur γ versus le compteur β .

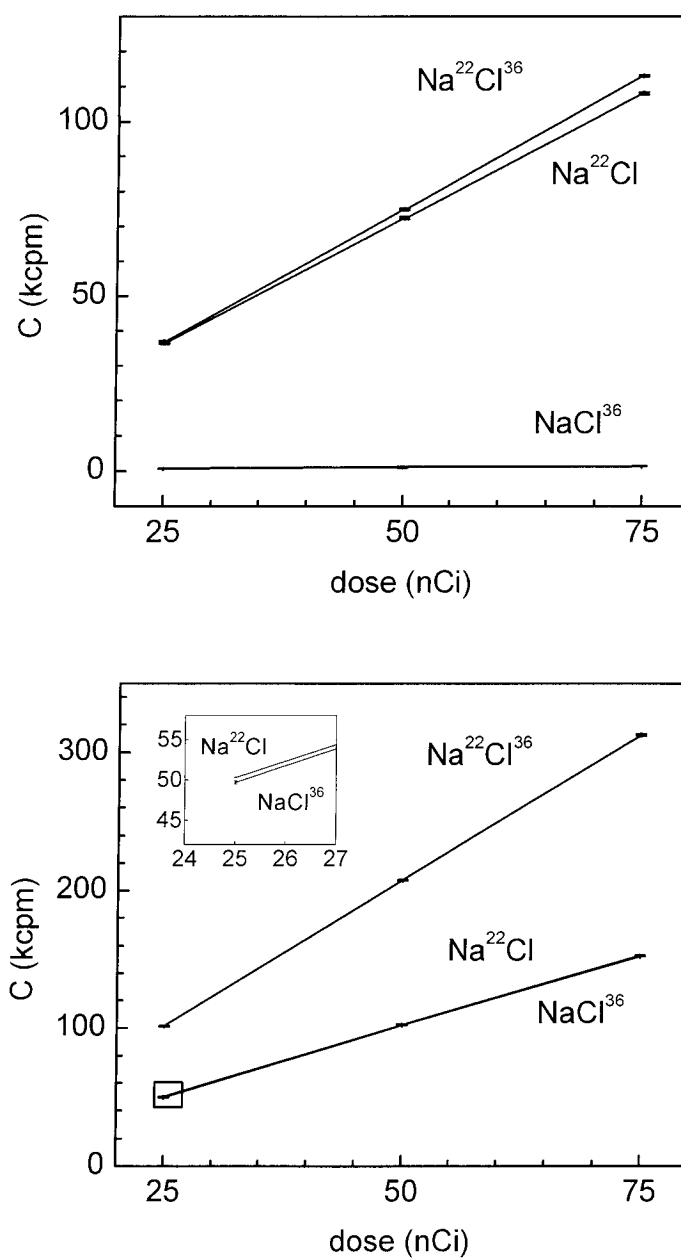


Figure 2.3 Nombre de comptes obtenus pour les différentes solutions radioactives, NaCl^{36} , Na^{22}Cl et $\text{Na}^{22}\text{Cl}^{36}$. La dose correspond à la valeur individuelle de l'isotope Na^{22} ou Cl^{36} présent dans la solution considérée. A) Compteur γ et B) Compteur β .

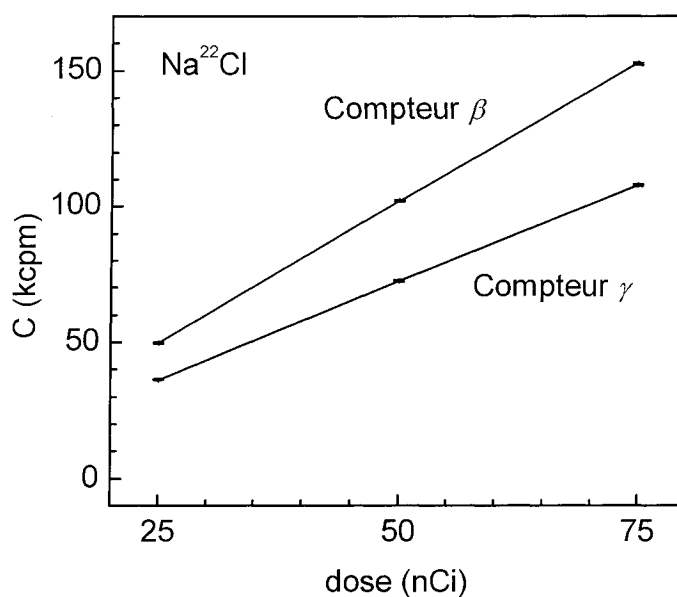


Figure 2.4 Efficacité du compteur γ en comparaison avec le compteur β . On présente ici le nombre de comptes par minutes (cpm) obtenus pour la même solution de Na^{22}Cl avec variation de dose, effectuée en prélevant un volume différent pour chaque échantillon ($n = 2$).

2.4.1 c) Méthode directe – concentration de charges fixes

Le Tableau 2.4 présente les résultats de l'Expérience 2.3. La mesure de la concentration de charges fixes a été obtenue à l'aide de la méthode 2.2 décrite dans la section 2.3.4 b) et des résultats de la section précédente. Les valeurs des coefficients d'activité ont été obtenues à l'aide des équations 2.8 et 2.9.

Tableau 2.4 Résultats de l'Expérience 2.3 par la méthode du double marquage.

Condition	Échantillon	Δm	c_-	c_+	ρ	$\gamma_{\pm}^0$ *	$\gamma_{\pm}^g$
					mM		
2.3a	Chitosane	$-0,19 \pm 0,03$	43,8	60,8	$17,0 \pm 0,8$	0,81	0,79
2.3a	Cartilage	0,65	109,4	32,7	-76,7	0,81	0,68
2.3a	Agarose	0,24	41,8	44,1	2,3	0,81	0,94

* Valeur obtenue de Maroudas (1972).

On obtient à nouveau une concentration de charge positive dans le cas des gels de chitosane, une valeur négative dans le cas du cartilage et une valeur pratiquement neutre (2.3 mM) pour le gel d'agarose.

2.4.2 Effet du pH

La Figure 2.5 montre l'effet du pH sur la densité de charges fixes pour les échantillons de chitosane. Les valeurs de pH_e ont été utilisées comme valeur de pH. Dans les cas où cette valeur n'avait pas été mesurée, nous avons utilisé la valeur pH_j .

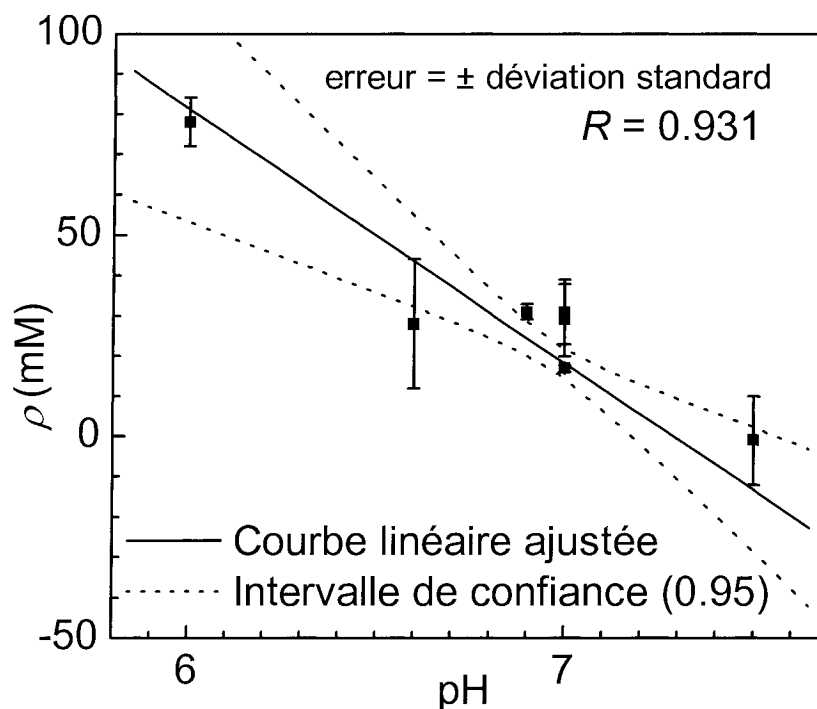


Figure 2.5 Densité de charges fixes en fonction du pH de la solution d'équilibration. Le nombre total d'échantillon est de 19 et le coefficient de corrélation obtenu est de $R = 0.931$. La courbe pleine est la courbe linéaire ajustée aux valeurs de densités de charges fixes en fonction du pH. Les courbes en pointillés représentent les limites supérieures et inférieures de l'ajustement linéaire pour un intervalle de confiance de 0.95.

2.4.3 Effet de la température

La Figure 2.6 montre les mesures de pK_{ap} en fonction de la température. Les mesures du degré d'ionisation α , présentées au Tableau 2.5, sont d'abord obtenues par l'équation 2.18 et les valeurs de pK_{ap} sont ensuite obtenues par l'équation 1.11. Seuls les échantillons où la variation de masse a été mesurée sont inclus dans cette analyse. Aussi,

l'échantillon présentant une mesure de charges fixes négative a été retiré de l'analyse. Toutefois, l'incertitude sur sa mesure donne une valeur maximale de $pK_{ap} = 6,74$ qui fait partie du domaine de confiance de 0.95 à 4 °C. On a donc conservé un total de 12 échantillons de chitosane pour cette analyse.

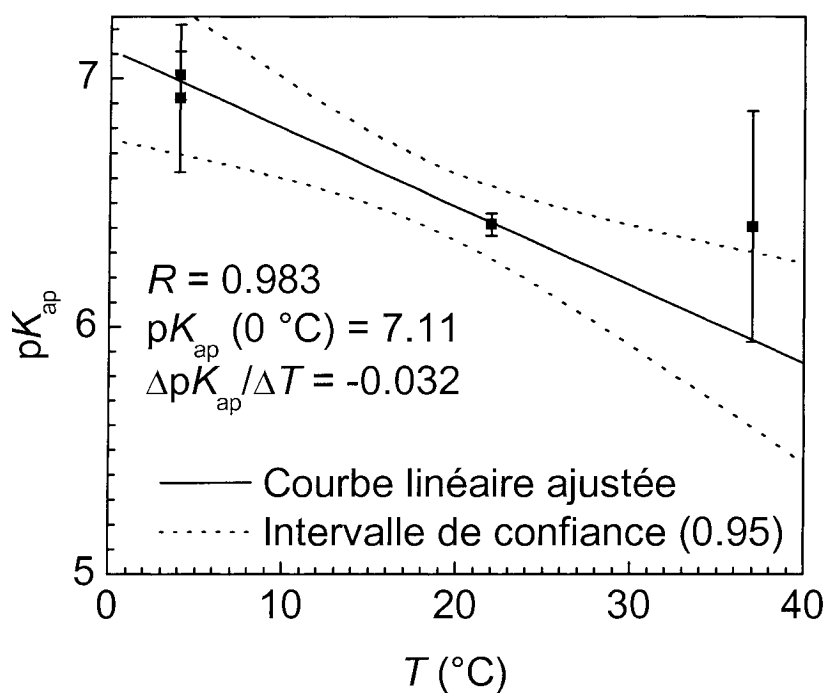


Figure 2.6 Variation de la constante de dissociation apparente (pK_{ap}) en fonction de la température ($n = 12$).

Tableau 2.5 Valeurs du degré d'ionisation α et du pK_a apparent (pK_{ap}) obtenues à partir des mesures de densité de charges fixes ρ (Tableau 2.3 et Tableau 2.4) et des équations 2.17 et 2.18.

Condition	T °C	pH	ρ mM	Δm	α	pK_{ap}
2.2a	4	6,9	31 ± 2	$0,22 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,11$	$7,0 \pm 0,1$
2.2c	4	7,0	29 ± 9	$0,05 \pm 0,005$	$0,45 \pm 0,33$	$6,9 \pm 0,3$
2.2b	4	7,5	-1 ± 11	$-0,06 \pm 0,03$	$0 + 0,31$	max = 6,73
2.3a	22	7,0	$17,0 \pm 0,8$	$-0,19 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,03$	$6,41 \pm 0,05$
2.2d	37	6,6	28 ± 16	$-0,07 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,46$	$6,4 \pm 0,5$

L'ajustement d'une courbe linéaire aux données expérimentales nous donne une valeur de pK_{ap} à 0 °C de 7.11 et une variation du pK_{ap} en fonction de la température de -0.032 unité de $pK/^\circ C$.

2.5 Discussion

Notre objectif principal était de déterminer si le gel, une fois formé, conservait toujours des charges fixes positives. Toutes les expériences nous ont permis de vérifier qu'une certaine proportion des monomères de glucosamine conserve en effet leur état ionisé. Nous obtenons des résultats similaires dans le cas du marquage simple et du marquage double. Nous observons dans tous les cas (Tableau 2.3 et Tableau 2.4) une densité de charges fixes positives pour les gels de chitosane, négatives pour les disques

de cartilage et pratiquement neutre pour les gels d'agarose. Dans un des cas (Tableau 2.3, condition 2.2b) nous obtenons une densité de charges fixes moyenne négative pour les gels de chitosane. Parmi les 3 échantillons testés, un seul contribue à donner cette densité négative. En effet, pour ces 3 échantillons, les valeurs obtenues étaient 3.2, 6.1 et -13.7. Nous croyons qu'une erreur au niveau des manipulations est à l'origine de cette valeur négative. Les charges fixes négatives dans un hydrogel de *N*-Isopropylacrylamide ont donné des valeurs entre 10 et 90 mM (Makino, Suzuki, Sakurai, Okano et Ohshima 1995, Makino, Yamamoto, Fujimoto, Kawaguchi et Ohshima 1994).

Quant aux valeurs de charges fixes négatives pour le cartilage (voir Tableau 2.3 et Tableau 2.4), les valeurs obtenues (entre 52 et 77) se comparent à celles obtenues dans la littérature, soient entre 40 et 160 mM. Ces mesures avaient été obtenues par une méthode de potentiels d'écoulements (Maroudas 1968, Maroudas, Muir et Wingham 1969) ainsi que par la même méthode de marquage radioactif que nous avons utilisée dans nos expérimentations (Maroudas et Evans 1972).

La valeur calculée pour le coefficient d'activité du cartilage, $\gamma_{\pm}^g = 0.68$ (voir le Tableau 2.4), correspond aux valeurs observées dans la littérature qui varient entre 0.63 et 0.88 (Maroudas et Evans 1972).

Nous avons vérifié notre hypothèse selon laquelle une augmentation du pH entraîne une réduction de la densité de charges fixes. Cette hypothèse était basée sur la réaction d'équilibre de dissociation de la glucosamine. Une augmentation du pH est équivalent à

une réduction de la concentration de protons présents en solution. Ainsi, selon le principe de LeChâtelier, la réaction (eq 1.9) force la glucosamine ionisée à se dissocier pour produire un proton en solution. Le même phénomène est observé lorsque le pH de tampons est modifié afin de faire varier la migration des molécules biologiques dans des gels par électrophorèse (Voet et Voet 1998). La modification du pH est également utilisée pour faciliter la formation de complexe polymère/ADN (Rungsardthong, Ehtezazi, Bailey, Armes, Garnett et Stolnik 2003).

En ce qui concerne l'effet de la température, la diminution de la valeur du pK_a apparent (Figure 2.6), pK_{ap} , nous indique que le chitosane a tendance à se décharger lorsqu'on augmente la température. Nous notons également une diminution de la masse pour les conditions dont la température est égale ou supérieure à la température de la pièce (Tableau 2.5) alors que le gonflement n'est observé que pour les échantillons dont la température est descendue à 4 °C. Selon les théories de changement de volume des gels constitués de polyélectrolytes (Hill 1986), un gonflement nous indique une augmentation de l'état de charge alors qu'une diminution du volume indique une perte de charges fixes. La diminution de la masse des échantillons de la condition 2.2b dont la température a été abaissée à 4 °C s'explique par le haut pH de la solution tampon (pH = 7,5).

En ce qui concerne les approximations qui ont été faites dans les calculs de concentration de charges fixes, notons que la concentration du Hepes (ou du NaHCO_3 pour une seule condition) n'a jamais été considérée. Nous pouvons dans ce cas nous

attendre à une erreur d'au plus 20 % advenant le cas où le Hepes est totalement ionisé puisque celui-ci représentait une concentration égale ou inférieure à 20 % de la concentration de NaCl des échantillons testés. Toutefois, le Hepes est un composé zwitterionique ayant des valeurs de $pK_{a1} = 3$ et $pK_{a2} = 7,55$ à 20 °C (Medzon et Gedies 1971). Ainsi, la valeur de son pH neutre est d'environ 5,3 (Devlin 1997) et il ne devrait donc pas influencer de façon considérable l'équilibre de Donnan, étant peu chargé pour des valeurs de pH variant entre 6,5 et 7,5. En effet, pour ces valeurs de pH, la partie anionique correspondant au pK_{a1} est totalement ionisée alors que la partie cationique (pK_{a2}) est ionisée entre 50 et 90 %. Ainsi, il y a entre 1 et 5 mM de charges anioniques et la concentration de Hepes devrait donc être sensiblement la même dans la solution ou à l'intérieur des disques. L'erreur sur le calcul de la concentration de charges fixes est donc diminuée entre 2 à 10 %.

La méthode du marquage double présente l'avantage de donner des résultats dont l'erreur statistique est plus fiable puisqu'aucune théorie n'intervient dans les calculs. Toutefois, celle-ci implique des manipulations plus abondantes et également plus risquées. Dans la mesure où nous recherchons à mettre en évidence une tendance quant à l'influence de certains paramètres sur la densité de charges fixes, la méthode du marquage simple s'avère la plus indiquée.

2.6 Conclusion

Nous avons validé l'hypothèse que le gel de chitosane possède des charges fixes qui peuvent potentiellement participer à la dissociation par l'intermédiaire de la solution avec laquelle il est en équilibre. Il est donc possible que les charges des monomères de glucosamine ionisés soient impliquées dans la transition de la solution liquide à la phase de gel du mélange chitosane/glycérol-phosphate. Le prochain chapitre traitera du rôle du glycérol-phosphate.

CHAPITRE 3 - DIFFUSION DU DISODIUM GLYCÉROL-PHOSPHATE

3.1 Introduction

Plusieurs expériences menées par des chercheurs de BioSyntech ont conduit à la conclusion que le disodium glycérol-phosphate est un ingrédient essentiel dans la composition du gel (Chenite, Chaput, Combes, Jalal et Selmani 1998). Plusieurs autres essais ont été tentés avec d'autres sels de phosphate, sulphate, etc. mais aucun gel thermo sensible n'a été obtenu parmi ces essais. Nous avons vu au chapitre précédent que le gel de chitosane porte des charges fixes positives. Or, le disodium glycérol-phosphate est divalent lorsqu'il est dissout. Quel est donc le rôle de ce dernier dans la formation du gel ? Est-il lié au chitosane ? Est-il impliqué dans une interaction hydrophobique quelconque ? A-t-il un rôle direct ou agit-il de manière indirecte ?

Notre objectif principal est de déterminer si le glycérol-phosphate est lié ou non au chitosane après la transition en gel. Étant donné le caractère parfois réversible du gel, notre hypothèse est que le glycérol-phosphate n'est pas lié au chitosane. Nous croyons que celui-ci agit seulement d'une manière indirecte et occasionne un changement de phase pour le chitosane sous l'action de la chaleur. Pour démontrer que le glycérol-phosphate est libre (ou lié) après sa transition en gel, nous préparons des gels de chitosane que nous laissons en équilibre avec une solution dans laquelle le glycérol-phosphate est libre de diffuser s'il n'est pas retenu par le chitosane. Nous mesurons,

après un temps donné, la concentration de glycérol-phosphate dans la solution d'équilibration.

Afin de détecter la présence du glycérol-phosphate dans la solution d'équilibration, nous avons choisi d'utiliser une méthode élémentaire de détection du phosphore. Comme le glycérol-phosphate contient un atome de phosphore par molécule et que le chitosane n'en contient pas, il suffit d'utiliser une solution d'équilibration ne contenant pas de phosphore. Bien que le DMEM contienne du phosphore, la concentration de celui-ci est négligeable (0,9 mM) devant celle du gel (87 mM). Le DMEM peut alors être utilisé comme solution de lavage. Ceci fait en sorte que nous pouvons tester la diffusion du GP dans les mêmes conditions que le protocole de formation de gel établi.

Pour doser le GP, nous utilisons une méthode de dosage élémentaire, soit la digestion Kjeldahl (Liao 1993) pour obtenir le contenu total de phosphore d'un échantillon donné. Après une digestion des échantillons dans l'acide sulfurique, cette méthode est basée sur l'absorption à 880 nm du complexe formé de l'ion PO_4^{3-} avec le molybdate d'ammonium et du tartrate potassique d'antimoine. La quantité de phosphore total est déterminée à partir de l'absorption du complexe formé relativement à une courbe de calibrage standard.

La première expérience consiste à déterminer que le GP peut effectivement diffuser. Advenant un résultat positif, nous avons comme objectif secondaire de déterminer si le glycérol-phosphate est impliqué dans une diffusion libre ou dans une diffusion limitée

par une réaction quelconque avec le chitosane. Une diffusion limitée peut occasionner un changement dans le profil de diffusion du GP. Dans la seconde expérience, nous mesurons la diffusion du GP dans le temps et nous comparons ces mesures à un modèle de diffusion libre. La caractérisation de la diffusion est également utile pour les diverses applications du gel de chitosane. En effet, par exemple, lors d'une injection dans les organismes vivants, il peut s'avérer que le glycérol-phosphate réagisse avec l'organisme. C'est pourquoi une meilleure connaissance de sa diffusion est primordiale.

3.2 Théorie de la diffusion libre

Nous présentons ici la théorie utilisée pour modéliser la diffusion du glycérol-phosphate du gel de chitosane vers une solution liquide. La Figure 3.1 présente le système que nous avons à modéliser. Nous utilisons l'axe passant par le centre du pétri pour indiquer la position dans le pétri dont le fond est situé à $x = 0$ et dont le côté positif pointe vers le couvercle de la boîte de pétri. Nous avons choisi d'utiliser une représentation unidimensionnelle qui simplifie les calculs. Nous faisons l'approximation que la largeur du pétri est beaucoup plus grande que la hauteur du gel et de la solution et que la surface du gel est complètement parallèle au fond du pétri. Nous pouvons calculer que le rapport de la hauteur de l'échantillon (gel et solution) sur la largeur du pétri est plus petit que 0.2. Ainsi, les effets de bords sont négligeables et la symétrie du système nous permet de présenter le problème en utilisant seulement l'axe des x .

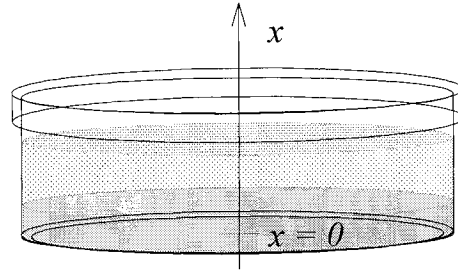


Figure 3.1 Référentiel de position du gel et de la solution d'équilibration dans un pétri. Le fond du pétri est défini comme position $x = 0$. L'axe de x positif pointe en direction du couvercle du pétri.

Le but de notre modélisation est de déterminer le profil de concentration du glycérol-phosphate dans la solution de lavage en fonction du temps. Pour déterminer cette concentration, nous devons d'abord définir une fonction $c(x,t)$ qui donne la valeur de la concentration à la position x à un temps t . Nous devons également définir la position de l'interface gel-solution de rinçage qui est située à la position $x = h_g$ et la position de l'interface solution-air δ_i . La valeur h_g est la hauteur du gel déterminée à partir du rayon du pétri r_p et du volume du gel. Ce volume est déterminé en faisant l'approximation que la densité volumique du gel ρ_g est de 1 g/mL et par une mesure de sa masse m_g

$$h_g = \frac{m_g}{\rho_g \pi r_p^2} \quad (3.1)$$

Quant à la valeur de δ_i , elle correspond à la somme de la hauteur du gel h_g et de la solution h_s . Cette dernière valeur est déterminée par le volume de la solution V_r de rinçage et du rayon r_p . La valeur de δ_i est donc donnée par

$$\delta_i = h_g + \frac{V_r}{\pi r_p^2} \quad (3.2)$$

Notons toutefois que lors du processus d'équilibration, on observe une contraction du gel de chitosane. Afin de simuler cette contraction, nous utilisons une fonction telle que

$$h_g(t) = h_g^c + \frac{h_g^i - h_g^c}{1 + e^{\frac{(t-t_{0,5})}{\tau}}} \quad (3.3)$$

Où h_g^i représente la hauteur initiale du gel et h_g^c la hauteur du gel une fois contracté.

Nous devons avoir $\tau \gg t_{0,5}$ et la variable $t_{0,5}$ représente le temps écoulé pour que le gel obtienne la moitié de sa contraction totale. Notons que 6τ équivaut à la durée pendant laquelle le gel réalise 90,5 % de sa contraction. La Figure 3.2 illustre la fonction $h_g(t)$ et les différents paramètres qui la composent.

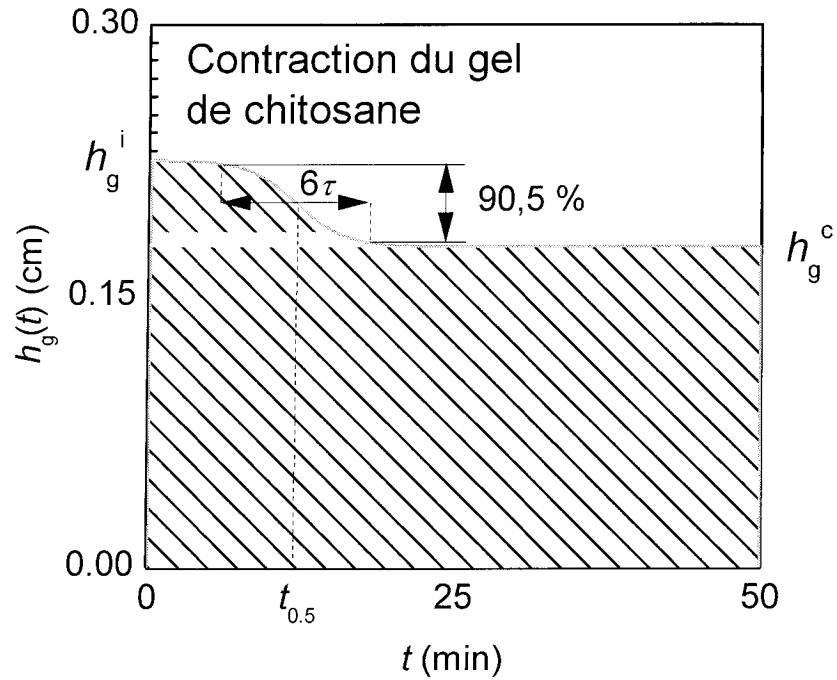


Figure 3.2 Fonction de simulation de contraction du gel en fonction du temps. Le temps $t_{0.5}$ caractérise le temps nécessaire pour que le gel réalise la moitié de sa contraction totale. Le temps τ détermine la durée nécessaire pour que le gel obtienne 90,5 % du total de sa contraction. Les variables h_g^i et h_g^c sont la hauteur initiale du gel et la hauteur de ce dernier une fois la contraction terminée, respectivement.

Notre fonction $c(x,t)$ doit être une solution de l'équation de diffusion donnée par

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D(x,t) \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial^2 x} \quad (3.4)$$

Nous supposons qu'il n'y a pas de convection occasionnée par l'agitation du pétri et nous ajustons la valeur du coefficient de diffusion dans la solution pour tenir compte de l'agitation. Puisqu'il ne peut y avoir un gradient de concentration au fond du pétri et à la surface du liquide, nous avons les conditions suivantes aux frontières

$$\frac{\partial c(0,t)}{\partial x} = \frac{\partial c(\delta,t)}{\partial x} = 0 \quad (3.5)$$

Puisque la diffusion dans le gel n'est pas la même que dans la solution, nous avons

$$\begin{aligned} D(x,t) &= D_g & \text{pour } x < h_g(t) \\ &= D_s & \text{pour } x > h_g(t) \end{aligned} \quad (3.6)$$

Où D_g et D_s sont les constantes de diffusion dans le gel et dans la solution, respectivement. De plus, les conditions initiales sont

$$\begin{aligned} c(x,0) &= c_p^g & \text{pour } x < h_g(0) \\ &= c_p^s & \text{pour } x > h_g(0) \end{aligned} \quad (3.7)$$

Où c_p^g et c_p^s sont les valeurs de la concentration de phosphore dans le gel et dans la solution, respectivement.

La résolution de l'équation de diffusion (eq 3.4) avec les conditions spécifiées (eqs 3.5 à 3.7) se fait à l'aide de la fonction *pdepe* de MatLab.

3.3 Méthodologie expérimentale

3.3.1 Préparation du gel de chitosane

Le Tableau 3.1 présente les solutions préparées avant de débiter la procédure de préparation du gel de chitosane décrite ici. Cette procédure consiste à agiter rapidement les 7,5 mL de la solution de chitosane Protosan UP CL 213 (2,93 % w/v) sur un bain de glace pour obtenir une température d'environ 4 °C. À cette solution, on ajoute 2,25 mL de glucosamine (2,16 % w/v) goutte à goutte toutes les 15 secondes. On ajoute ensuite 1 mL de GP (33,3 % w/v) de la même façon. Deux millilitres d'hydroxyethyl cellulose (2,5 % w/v) sont enfin ajoutés sans précaution particulière. On verse ensuite 2 mL du mélange dans chacun des 3 pétris de 3 cm de diamètre. Les pétris sont ensuite placés 30 minutes dans un incubateur à 37 °C et à 5 % de CO₂ sous 100% d'humidité relative.

Tableau 3.1 Composition des solutions utilisées pour la préparation du Gel Protosan Endothermic Gel. La masse du soluté m_a est dissoute dans le solvant de volume V_b . Le volume V_s correspond à la quantité de solution utilisée pour la préparation.

Soluté	Compagnie	No. Cat.	m_a mg	Solvant	V_b mL	V_s mL
Protosan UP*	Pronova	CL 213	220,0	ddH ₂ O	7,5	7,5
Glucosamine	Sigma	G-1514	53,9	0,1 N NaOH	2,5	2,25
Na ₂ -Glycérol-phosphate	Sigma	G-9891	800,0	ddH ₂ O	2**	1
				DMEM		
Hydroxyethyl cellulose	Fluka	54290	75,0	(pH = 7,4)	3	2

* Ce chitosane est sous la forme d'un sel acide, c'est-à-dire qu'une grande proportion de ses monomères glucosamine sont sous la forme glucosamine·HCl. Ainsi, sa dissolution dans l'eau est possible puisque son acide lui est couplé.

** Il faut noter que le volume final de cette solution est de 2,4 mL puisque les 800,0 mg de Na₂-Glycérol-phosphate dissout occasionne une augmentation de volume de 0,4 mL.

Les ions phosphore se retrouvent dans le GP et dans le DMEM (pH = 7,4). Dans le cas du GP, une mole de GP nous donne une mole de phosphore tandis qu'on retrouve l'équivalent de 1 mM de phosphore dans le DMEM. La concentration totale de phosphore dans le gel devrait donc être de

$$\frac{800 \text{ mg} \cdot 1 \text{ mL}}{297 \text{ g/mol} \cdot 12,75 \text{ mL}} + 0,001 \text{ mol/L} \cdot \frac{2,0 \text{ mL}}{12,75 \text{ mL}} = 8,81 \text{ mM} \quad (3.8)$$

La concentration d'ions phosphore dans la solution de GP seule donne

$$\frac{800 \text{ mg}}{297 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,0024 \text{ L}} = 1122,3 \text{ mM} \quad (3.9)$$

3.3.2 Expérience 3.1 – Évidence de diffusion du phosphore

L'objectif de cette expérience est de montrer que le glycérol-phosphate peut diffuser dans une solution d'équilibration en contact avec lui (voir la Figure 3.1 qui illustre le gel en contact avec la solution d'équilibration dans un pétri). Cette section décrit en détail les étapes de constitution des échantillons qui ont été analysés afin de déterminer leur contenu en phosphore.

Après avoir procédé à la préparation des gels de chitosane (2 mL) et avoir attendu les 30 minutes d'incubation, nous avons ajouté 2 mL de DMEM (pH = 7,4) dans 2 des 3 pétris et nous les avons replacés à l'intérieur de l'incubateur pour 30 autres minutes.

Avec le pétri restant, nous avons prélevé 2 disques de 4 mm de diamètre. Nous avons mesuré la masse de deux fioles à scintillation et disposé ces 2 disques dans chacune des fioles. Nous avons à nouveau mesuré la masse de ces fioles et de leur contenu pour obtenir la masse de chacun des disques afin d'en obtenir le volume approximatif (en supposant leur densité égale à celle de l'eau, soit 1 g/mL). Ces deux échantillons ont été réservés pour l'analyse du contenu en phosphore.

Nous avons ensuite prélevé une aliquote de 200 μL de chacune des solutions de DMEM que nous avons disposée dans une fiole à scintillation puis nous avons enlevé le DMEM restant à l'aide d'une pipette. Nous avons ajouté 2 mL de DMEM ($\text{pH} = 7,4$) frais pour procéder à une deuxième équilibration.

Cette séquence de prélèvement d'aliquotes, de changement de solutions de rinçage et d'équilibration de 30 minutes, a été répétée jusqu'à une quatrième équilibration que nous avons laissée pour la nuit. Le lendemain, nous avons prélevé 2 aliquotes de chacune des solutions recouvrant le gel avant de les retirer. Deux disques de chacun des gels lavés ont été prélevés. Nous avons mesuré la masse de chacun des disques que nous avons déposés dans des fioles à scintillation pour l'analyse du contenu en phosphore.

Les échantillons ont ensuite été testés pour leur contenu en phosphore. Les principales étapes de la méthode de digestion Kjeldahl pour quantifier le contenu total de phosphore seront présentées à la section 3.3.5. La procédure détaillée est décrite dans un document préparé par Lachat Instruments (Liao 1993), fabricant de l'appareil utilisé pour la quantification. Nous présentons d'abord la description de l'expérience de caractérisation de la diffusion du phosphore.

3.3.3 Expérience 3.2 – Caractérisation du profil de diffusion du phosphore

Pour caractériser le profil de diffusion du phosphore, nous avons utilisé des pétris de 5,3 cm de diamètre intérieur (Corning, No. Cat. 430166) pour y déposer ultérieurement

les gels. La masse des pétris vides a été mesurée. Des fioles de verre identifiées au type d'échantillon et au temps de prélèvement ont été préparées pour l'analyse en contenu de phosphore total (décrite à la section 3.3.4).

Les solutions individuelles pour la fabrication du gel ont été préparées puis une aliquote de 50 μL a été prélevée de chacune de ces solutions ($n = 1$) et mise dans les fioles de verre. Nous avons ensuite préparé la solution de gel selon la méthode décrite à la section 3.3.1 puis versé environ 5 g de solution dans chacun des pétris de 5,3 cm de diamètre pré mesurés. Cette procédure doit être exécutée assez rapidement pour éviter que la solution ne devienne un gel avant que la surface soit parallèle au fond du pétri. Le reste de la solution est versée dans un pétri de 3 cm de diamètre. Les pétris sont placés pendant 30 minutes dans un incubateur à 37 °C, sous 100 % d'humidité relative et 5 % de CO_2 . Nous avons vérifié que les pétris n'étaient pas inclinés afin d'obtenir une surface de gel bien parallèle au fond du pétri.

Après avoir laissé les gels pendant 30 minutes, nous avons prélevé un échantillon de gel du pétri de 3 cm de diamètre. Nous avons mesuré sa masse pour l'approximation de son volume.

Aux deux pétris de 5,3 cm de diamètre, nous avons rapidement ajouté 15,5 mL de DMEM (pH = 7,4) (1^{er} rinçage) et enclenché le chronomètre pour déterminer le temps 0

et pour effectuer les prélèvements d'aliquotes de 50 μL à des temps de prélèvements t_p pré déterminés¹ (2.5, 6.5, 14.5, 28.0, 46.5, 79.0, 240.0 et 1080.0 min.). La solution a ensuite été retirée puis une nouvelle mesure des masses des pétris et de leur contenu a été prise afin de déterminer si le gel avait rétréci ou gonflé. Nous avons repris deux fois la même procédure avec 15,5 mL de DMEM (pH = 7,4) frais pour un 2^e (5.5, 20.5, 53.0 et 240.0 min.) et 3^e (3.0, 20.5 et 72.0 min.) lavage. Notons que pour les 2^e et 3^e lavages, un temps de plus de 240 minutes et de 72 minutes, respectivement, ne permettrait pas d'obtenir un résultat dont la variation de concentration avec l'échantillon précédent serait significative.

Un échantillon de gel d'un des 2 pétris a été prélevé après le 3^e lavage. Sa masse a été mesurée et il a été déposé pour l'analyse du contenu en phosphore. Le gel du second pétri a subi 3 autres lavages d'une durée de 60 minutes puis on a prélevé un échantillon, mesuré sa masse et envoyé à l'analyse.

3.3.4 Analyse du contenu de phosphore – préparation des solutions

Nous soulignons tout d'abord que les étapes de la procédure de l'analyse du contenu de phosphore (Liao 1993, Maher, Krikowa, Wruck, Louie, Nguyen et Huang 2002) ont

¹ Pour déterminer ces temps, nous avons d'abord supposé, à l'aide des résultats de l'expérience 3.1, que 18 h (1080 min) est le temps requis pour obtenir l'équilibre de diffusion entre le gel et la solution. Nous avons ensuite utilisé le modèle théorique pour sélectionner des intervalles de temps qui donne une variation constante de la concentration dans la solution en considérant l'équilibre atteint après 18h.

été effectuées par des techniciens du laboratoire d'environnement du département des génies civil, géologique et des mines.

Solution de sulfate de mercure : Dans un ballon jaugé de 100 mL, on ajoute environ 40 mL d'eau distillée et déionisée (H_2O_{dd}) puis 10 mL d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) ainsi que 8 g d'oxyde mercurique rouge (HgO). On agite le tout à l'aide d'une barre magnétique en chauffant légèrement jusqu'à dissolution. On dilue ensuite avec l' H_2O_{dd} jusqu'à la jauge et on agite légèrement pour obtenir une solution homogène.

Solution de digestion : Dans un ballon jaugé de 1 L, on ajoute environ 700 mL d' H_2O_{dd} puis 200 mL d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). On ajoute ensuite 133 g de sulfate de potassium (K_2SO_4) puis 25 mL de la solution de sulfate de mercure préparée précédemment. On agite le tout à l'aide d'une barre magnétique puis on laisse refroidir la solution (le mélange est exothermique). Une fois la solution refroidie, on la dilue jusqu'à la jauge avec de l' H_2O_{dd} . Cette solution est stable pendant un mois.

3.3.5 Analyse du contenu de phosphore – quantification

Les fioles de verre des échantillons préparés (voir sections 3.3.2 et 3.3.3) sont d'abord rincées avec de l' H_2O_{dd} pour placer leur contenu dans de grandes éprouvettes en verre spécialement conçues pour être placées dans l'unité chauffante de digestion (Lachat, No. Cat. 1800-000). On leur ajoute 5 mL de la solution de digestion (voir section 3.3.4) que l'on mélange à l'aide d'une pipette résistante à l'acide (EM Science,

No. Cat. 108033-1) en effectuant une série de retraits et d'ajouts dans l'éprouvette. On laisse reposer les échantillons environ 30 minutes.

On ajoute 2 à 4 granules Hengar (Alundum, LACHAT Instrument) à chaque éprouvette pour réduire les éclaboussures puis on dispose les éprouvettes sur l'unité chauffante préchauffée à 160 °C jusqu'à ce que l'eau soit complètement évaporée. Il ne devrait rester qu'un millilitre d'acide sulfurique concentré. On porte les échantillons à 380 °C pendant 2.5 h. Ce temps inclut le temps requis à l'unité de chauffage pour atteindre cette température. On laisse ensuite les échantillons refroidir pendant 10 minutes. Cette étape permet de convertir le phosphore en ion orthophosphate (PO_4^{3-}).

On ajoute 20.0 mL d' H_2O à chacun des tubes et on vortex pour mélanger. Le volume final devrait être de 21 mL. Les échantillons sont ensuite mis dans des contenants spécifiques à l'appareil Lachat pour être analysés. Lors de l'analyse, des solutions de molybdate d'ammonium et de tartrate d'antimoine de potassium sont injectées dans l'échantillon. Sous des conditions acides, l'ion orthophosphate de l'échantillon réagit avec les solutions injectées pour former un complexe qui absorbe la lumière à 880 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration d'ion orthophosphate contenue dans l'échantillon. La comparaison avec des échantillons standards permet de déterminer la concentration de phosphore contenue dans les échantillons.

3.3.6 *Calculs de la concentration de phosphore*

Nous présentons ici les formules nous permettant de déterminer la concentration de phosphore d'un échantillon c_e (mM) d'une solution dont on a prélevé une aliquote de volume V_e (en μL), ce qui nous a donné un résultat dont la concentration mesurée c_p^m est en mg/L

$$c_e = \frac{21 \cdot 1000 \cdot c_p^m}{V_e \cdot 30,97} \quad (3.10)$$

La multiplication par 21 provient de l'étape de dilution de la méthode Kjeldahl et la division par 30,97 est la masse moléculaire du phosphore en g/mol.

3.4 **Résultats**

3.4.1 *Expérience 3.1*

Le Tableau 3.2 présente la concentration de phosphore contenue dans les substrats considérés (voir eq 3.10). On remarque que la concentration des échantillons de gel après 4 lavages représente 22 % de leur concentration initiale. De plus, la concentration de la solution après le dernier lavage est la même que dans celle du gel lavé. Il est à noter que la concentration initiale du gel est de 10,2 % supérieure à la valeur attendue.

Tableau 3.2 Concentration de phosphore contenu dans le substrat considéré.

Substrat considéré	n	t	c_p^m	V_{ϵ}	c_{ϵ}
		min	mg/L	μL	mM
Gel initial	2	NA	2.95	20.52*	97 ± 2
DMEM 1 ^{er} lavage	2	30	5.05	200	17.1 ± 0.7
DMEM 2 ^e lavage	2	30	4.65	200	15.8 ± 0.7
DMEM 3 ^e lavage	1	30	3.90	200	13.2
DMEM 4 ^e lavage	2	1080	6.15	200	20.9 ± 0.7
Gel lavé	2	NA	0.57	18.56	21 ± 1

* Le volume approximatif est obtenu par une mesure de la masse en considérant une densité de 1 g/mL.

3.4.2 Expérience 3.2

La modélisation de la diffusion nous permet de dresser le profil de concentration du phosphore (GP) dans la solution de lavage. Le Tableau 3.3 présente les concentrations de phosphore obtenues (eq 3.10) pour des échantillons aux conditions initiales et finales (voir section 3.3.3). Ces valeurs ont été obtenues par la méthode Kjeldahl décrite aux sections 3.3.4 et 3.3.5. Le Tableau 3.4 montre les résultats obtenus pour les solutions prélevées à des intervalles de temps déterminés. La Figure 3.3 montre l'évolution de la concentration de phosphore dans la solution de rinçage au cours du premier lavage. La courbe théorique ajustée aux valeurs expérimentales est superposée. Les deux autres courbes théoriques présentées sont la comparaison avec un chitosane dont la modélisation ne tient pas compte de la contraction et un autre qui considère le chitosane

contracté dès le départ. Les valeurs des coefficients de diffusion et de temps de demi-vie de contraction du gel sont présentées au Tableau 3.5. Les valeurs h_g^i et h_g^c sont obtenues à partir des équations 3.1 et 3.3, respectivement et les valeurs de D_g et D_s sont obtenues par un ajustement aux valeurs expérimentales.

Tableau 3.3 Détermination de la concentration totale de phosphore dans une aliquote de volume V_e et concentration équivalente de l'échantillon, c_e .

Échantillon	c_p^m mgP/L	V_e μ L	C_e mM
Chitosane	0.09	40	1.53
Glucosamine	< 0.01	50	0.14
GP	92.32	50	1252
Cellulose + DMEM (pH = 7,4)	4.31	50	58.5**
Gel initial	26.41	207.9*	86.1
DMEM (pH = 7,4)	0.16	50	2.16
Gel après 3 lavages	0.10	22.8*	2.97
Gel après 6 lavages	0.05	21.7*	1.56

* Le volume approximatif est obtenu par une mesure de la masse en considérant une densité de 1 g/mL.

** La valeur obtenue pour le mélange "Cellulose + DMEM" est très élevée. Cette valeur est sans doute faussée par la lecture de l'échantillon précédent de GP qui montre un résultat très élevé. Selon le technicien du laboratoire d'environnement du département des génies civil, géologique et des mines, cette valeur surestimée serait occasionnée par

un élargissement de la courbe d'absorption de la lecture précédente qui s'additionne à la mesure de l'échantillon "Cellulose + DMEM (pH = 7,4)".

Tableau 3.4 Résultats de l'analyse de phosphore total et concentration correspondante de l'échantillon.

Échantillon*	t_P	c_P^m	c_e
	min	mg/L	mM
1 ^{er} lavage – 1	2.5	0.19 ± 0.03	2.58
1 ^{er} lavage – 2	6.5	0.21 ± 0.02	2.78
1 ^{er} lavage – 3	14.5	0.24 ± 0.02	3.19
1 ^{er} lavage – 4	28.0	0.38 ± 0.02	5.09
1 ^{er} lavage – 5	46.5	0.68 ± 0.14	9.22
1 ^{er} lavage – 6	79.0	1.02 ± 0.11	13.83
1 ^{er} lavage – 7	240.0	1.72 ± 0.02	23.26
1 ^{er} lavage – 8	1080.0	1.91 ± 0.01	25.90
2 ^e lavage – 1	5.5	0.24 ± 0.01	3.25
2 ^e lavage – 2	20.5	0.27 ± 0.03	3.66
2 ^e lavage – 3	53.0	0.36 ± 0.04	4.81
2 ^e lavage – 4	240.0	0.46 ± 0.01	6.17
3 ^e lavage – 1	3.0	0.14 ± 0.01	1.89
3 ^e lavage – 2	20.5	0.14 ± 0.01	1.83
3 ^e lavage – 3	72.0	0.17 ± 0.01	2.31

* Tous les échantillons ($n = 2$) ont un volume V_e utilisé de 50 μ L.

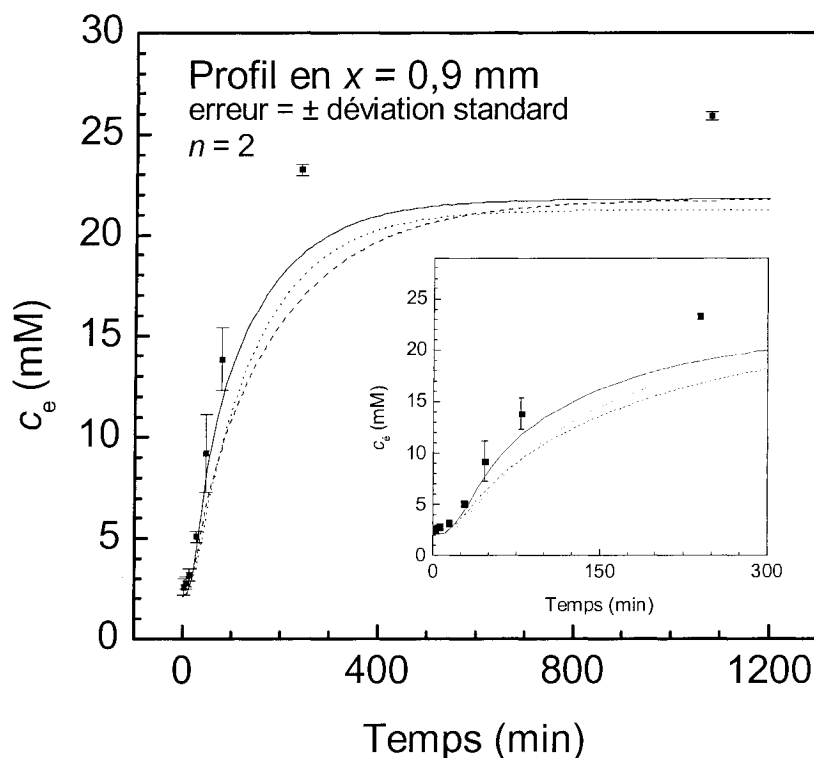


Figure 3.3 Profil de la concentration de GP dans la solution d'équilibration au cours du temps. Les points représentent les résultats expérimentaux (erreur égale à $\pm$ déviation standard). La ligne en trait continu (—) considère la contraction du gel selon l'équation 3.3 pour les conditions aux frontières présentées aux équations 3.6 et 3.7. La ligne en pointillés fins ($\cdots$) montre les résultats de la courbe obtenue en négligeant l'effet de rétrécissement mais en considérant le gel contracté dès le temps zéro. La ligne en traits pointillés ($-\cdots-$) montre les résultats théoriques obtenus en considérant le système tel qu'il est au temps zéro.

Tableau 3.5 Coefficient d'ajustement de la courbe aux données expérimentales.

Type de modèle	h_g^i	h_g^c	D_g	D_s	$t_{0.5}$	τ
	cm	cm	cm ² /s	cm ² /s	min	Min
Avec contraction (—)	0.22	0.17	$0.153 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	12	2
Contracté (···)	0.17	0.17	$0.153 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	-	-
Non contracté (---)	0.22	0.22	$0.153 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	-	-

* Ce facteur multiplie la valeur de concentration initiale théorique afin d'obtenir la correspondance avec les valeurs expérimentales.

La Figure 3.4 présente le profil de la concentration de GP à différents temps dans le gel et dans la solution de rinçage.

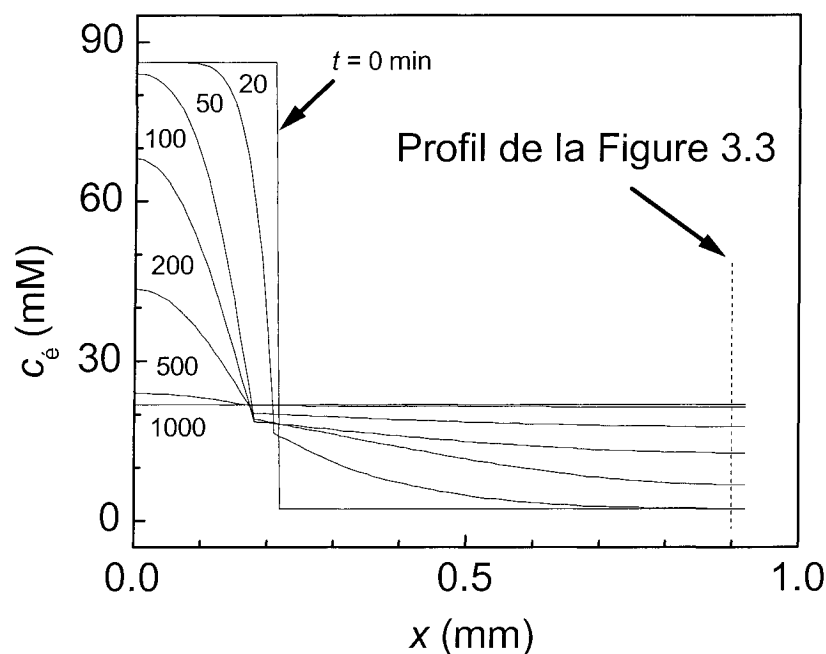


Figure 3.4 Profil de concentration de GP à différents temps dans le pétri selon la position x définie à la Figure 3.1.

3.5 Discussion

Notre objectif principal était de déterminer si le glycérol-phosphate est lié ou non au chitosane une fois sous la forme d'un gel. L'expérience 3.1 nous a permis de montrer que le glycérol-phosphate diffuse complètement du gel vers une solution dont sa concentration est inférieure.

L'expérience 3.2 nous a permis de montrer que le glycérol-phosphate est libre de diffuser lorsque le gel est mis en contact avec une solution dont la concentration en

glycérol-phosphate est inférieure à celle du gel. En effet, les données expérimentales concordent très bien avec un modèle de diffusion libre (voir Figure 3.3). De plus, nous avons montré que le modèle peut tenir compte de la contraction du chitosane.

L'effet des charges fixes n'a pas été considéré sur la rétention du GP étant donné que le pH de la solution d'équilibration (le DMEM) est de 7,4. Comme nous avons vu au chapitre précédent (Tableau 2.3, condition 2.2b), la concentration de charges fixes à ce pH est pratiquement nulle. De plus, les échantillons ont été placés dans un incubateur à 37 °C favorisant encore une fois la perte de charges fixes (voir Figure 2.6). Si le gel avait été chargé positivement, le profil de concentration du GP aurait été affecté par le potentiel de Donnan créé à la surface entre le gel et la solution de rinçage.

La différence entre la courbe théorique d'ajustement du profil de diffusion aux données expérimentales peut s'expliquer soit par une erreur systématique sur le prélèvement de l'aliquote de 50 μ L ou par une erreur systématique sur le volume de DMEM ajouté sur le gel de chitosane (volume inférieur au volume prévu). Il pourrait également s'agir d'une erreur (surestimation) dans la mesure du phosphore, comme on observe pour la valeur de l'échantillon cellulose+DMEM au Tableau 3.3. La concentration initiale mesurée dans le gel est de 86,1 mM ce qui nous donne une concentration finale à l'équilibre (concentrations égales dans la solution de rinçage et dans le gel) de 21,3 mM alors qu'on a mesuré 25,9 mM (voir Tableau 3.3).

Le modèle nous a aussi permis de déterminer une valeur pour la constante de diffusion du glycérol-phosphate dans le gel. Cette valeur de $0,153 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ se compare à d'autres valeurs de coefficients de diffusion obtenus pour des molécules de taille comparable dans des gels. Une valeur de $5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a été utilisée dans la phase aqueuse (solution de rinçage). Notons que cette valeur est surestimée puisqu'elle inclut un facteur dont la contribution est apportée par l'agitation. Des valeurs de $0,38\text{--}0,51 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ont été déterminées pour le sucrose dans des gels de gellan (Bayarri, Rivas, Costell et Duran 2001) à 37°C et une valeur de $0,11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ pour le KNO_3 dans un gel de polyacrylamide de 1 g/100mL (Shavit, Shaviv et Zaslavsky 1995) à 20°C . À titre de comparaison, la valeur du coefficient de diffusion du KNO_3 dans l'eau est de $1,85 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Des valeurs de $0,14\text{--}0,23 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ont été obtenues pour le glucose dans du cartilage (Maroudas 1968). Ces valeurs représentent environ 30 % ($0,46\text{--}0,77 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) de la valeur du coefficient de diffusion du glucose dans l'eau.

Les valeurs de concentration de glycérol-phosphate dans les gels ayant subi 3 et 6 lavages sont suffisamment faibles (3.0 et 1.6 mM) pour supporter l'hypothèse que le glycérol n'est pas lié au chitosane puisqu'il subsiste moins de 2 % de la concentration initiale après 6 lavages. Aussi, la concentration de 1.6 mM correspond sensiblement à la concentration de phosphore que l'on retrouve dans le DMEM, la solution de rinçage.

3.6 Conclusion

Les résultats de l'expérience 3.1 ont permis de montrer qu'il y avait bel et bien une diffusion du GP vers la solution de concentration nulle en GP. Nous pouvons alors conclure que le GP n'est que partiellement ou encore, non lié au chitosane sous la forme de gel. L'expérience 3.2 détermine que le GP est totalement libre de diffuser une fois la formation du gel effective.

L'utilisation d'une seconde méthode de quantification du glycérol-phosphate par chromatographie pourrait être envisagée. Une technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) pourrait également être utilisée pour mesurer la concentration de phosphore et corroborer les résultats obtenus. Ayant démontré que le rôle du GP est indirect et qu'il n'est pas impliqué dans une liaison avec le chitosane, il nous faut donc rechercher du côté des propriétés intrinsèques au chitosane et au glycérol-phosphate afin d'identifier le mécanisme de gélification thermo sensible.

CHAPITRE 4 - TITRATION AND PHASE-SEPARATION OF CHITOSAN SOLUTIONS RELATED TO THERMOSENSITIVE CHITOSAN/GLYCEROL-PHOSPHATE SYSTEM

Ce chapitre présente l'article soumis au journal *Biomacromolecules*. Dans cet article, nous présentons les mesures effectuées pour connaître les propriétés acide-base du chitosane en fonction de 3 paramètres considérés comme ayant une influence majeure sur son comportement en solution. Ces 3 paramètres sont la température T , la fraction de monomères glucosamine désacétylés f_D et la force ionique de la solution basée sur la concentration des ions en solution I_c . La propriété acide-base la plus souvent caractérisée est évidemment la constante de dissociation en fonction du degré d'ionisation. Les polyélectrolytes sont connus pour avoir une *constante* de dissociation variable en fonction de leur degré d'ionisation.

La seconde propriété est moins commune et elle est directement impliquée dans le mécanisme de gélification du chitosane. Cette propriété est sa solubilité en fonction de son degré d'ionisation. En effet, le chitosane est un polyélectrolyte hydrophobique, c'est-à-dire qu'il n'est pas soluble s'il n'est pas assez chargé. Nous cherchons donc à caractériser à la fois sa constante de dissociation et sa solubilité dans une solution aqueuse en fonction de son degré d'ionisation.

Pour obtenir toutes les informations que nous souhaitons, nous avons besoin d'un appareil pouvant mesurer simultanément le pH et l'état de solubilité du chitosan, tout en contrôlant la température et l'injection de volume de solution de titrage. Or, un tel appareil combinant toutes ces caractéristiques n'existe pas sur le marché. Nous avons donc conçu ce système en couplant divers appareils branchés par des ports de communication à un ordinateur. Un programme conçu à l'aide du logiciel de programmation LabView peut contrôler tous ces appareils et faire les acquisitions nécessaires.

Nous avons également mesuré les propriétés acide-base du glycérol-phosphate et nous avons alors réalisé que la variation de la valeur des *constantes* de dissociation du chitosane et du glycérol-phosphate permet un transfert de protons du chitosane vers le GP sous l'action de la chaleur. C'est donc grâce à ces mesures que nous sommes en mesure de proposer un mécanisme de gélification du mélange chitosane/GP.

Dominic Fillion, Marc Lavertu, Michael D. Buschmann*
Institute of Biomedical Engineering
Department of Chemical Engineering
Ecole Polytechnique de Montreal
PO 6079, Station Centre-Ville
Montréal, Québec, Canada H3C 3A7

Running Title : Chitosan Solution Properties and Gelation

*Author to whom correspondence should be addressed. Tel. No.: (514) 340-4711 ext. 4931. Fax No.: (514) 340-2980. E-mail: michael.buschmann@polymtl.ca.

4.1 ABSTRACT

Chitosan is a linear cationic biopolymer composed of glucosamine and *N*-acetylglucosamine that has been examined extensively for biomedical applications due to its biodegradability and low toxicity. The fraction of glucosamine monomers in chitosan is referred to as the fraction of deacetylated monomers (f_D). This polyelectrolyte is only soluble in acidic aqueous solutions and phase separates (precipitates) when neutralized by the addition of base. Recently, chitosan dissolved in glycerol-phosphate containing solutions were found to undergo a sol-gel transition upon heating. Further investigation and understanding of this unique thermogelling system required improved characterization of ionization and phase separation behavior of chitosan, in particular their dependencies on temperature, added salt, and f_D . Towards this end, we performed

temperature-controlled titrations on chitosan solutions at finite concentration (equivalent to 3.0 mM concentration of glucosamine monomers) with f_D of 0.72, 0.87, and 1.00, and with 0 to 150 mM added monovalent salt. Light transmittance measurements were performed simultaneously with titration to identify phase separation. Additional pH measurements during temperature ramp tests were performed on chitosan, glycerol-phosphate and monomeric glucosamine solutions. We found that the apparent dissociation constant (pK_a) of chitosan amine groups decreased strongly when temperature increased, by more than a full point between 5 °C and 40 °C. In contrast, the dissociation constant of glycerol-phosphate did not change significantly with temperature. As expected, when ionic strength increased, the apparent dissociation constant (pK_a) of chitosan increased and phase separation occurred at a higher degree of ionization. The most important influence of the level of deacetylation (f_D) was a very significant increase in the degree of ionization at phase separation when f_D increased, suggesting that steric hindrance of acetyl groups impeded phase separation. A mean-field Poisson–Boltzmann (PB) cylindrical cell model was used to ascertain the degree of ionization during titration and was able to predict titration curves at finite dilution. This study led us to propose a mechanism of gelation of chitosan solutions containing glycerol-phosphate whereby heating induces transfer of protons from chitosan to glycerol-phosphate thereby neutralizing chitosan and allowing attractive inter-chain forces to form a physically cross-linked gel.

4.2 INTRODUCTION

Chitosan is a cationic polysaccharide prepared by alkaline deacetylation of chitin that is found in the shells of crustaceans (Hoppe-Seyler 1894). It is a linear polyelectrolyte composed of glucosamine and *N*-acetyl-glucosamine monomers linked by β -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic bonds, where the fraction of monomers that are glucosamine is defined as f_D (fraction of deacetylated monomers). Chitosan has attracted attention in the pharmaceutical and biomedical fields since it possesses well known beneficial biological properties including biodegradability (Chenite, Chaput, Wang, Combes, Buschmann, Hoemann et al. 2000) and low toxicity (Hirano, Seino H., Akiyama et I. Nonaka 1990, Knapczyk, Krowczynski, Pawlik et Liber 1989) and can be used in drug delivery, gene delivery (Lavertu, Methot, Tran-Khanh et Buschmann M D 2005, Liu, Zhang, Sun, Sun, Yao, Liang et al. 2003, MacLaughlin, Mumper, Wang, Tagliaferri, Gill, Hinchcliffe et al. 1998), and wound healing (Muzzarelli, Mattioli-Belmonte, Pugnaroni et Biagini 1999, Ueno, Yamada, Tanaka, Kaba, Matsuura, Okumura et al. 1999). Recently, a thermo-sensitive gelling system based on chitosan solutions buffered with glycerol-phosphate (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput et Kandani 2001) has been discovered for use in regenerative medicine and has been successfully applied to improve repair of lesions in articular cartilage (Hoemann, Hurtig, Rossamacha E., Sun, Chevrier, Shive Matthew et al. 2005). Nonetheless, a complete understanding of the solution properties and thermo-sensitive characteristics of these chitosan/glycerol-phosphate (chitosan/GP) solutions is lacking. In order to fill this void, studies revealing chitosan ionization (Domard 1987, Park, Choi et Park 1983, Skjak-Braek, Anthonsen et Sandford 1989,

Sorlier, Denuzière, Viton et Domard 2001, Strand, Tommeraas, Varum et Ostgaard 2001, Tsukada et Inoue 1981) and phase separation behavior (Rinaudo M, Milas M et Le Dung P 1993, Rinaudo, Pavlov et Desbrieres 1999, Shu, Zhu et Song 2001, Terayama 1952, Toei et Sawada 1977, Varum, Ottoy et Smidsrod 1994), that include dependence on temperature, ionic strength, and degree of deacetylation are required.

Potentiometric titration is one of the most widely used techniques for investigating polyelectrolyte behavior in solution. Previous studies have examined titration and phase separation behavior of chitosan during neutralization. However, no molecular scale theoretical model has been proposed or tested to predict chitosan titration nor has work to date investigated the influence of temperature on chitosan ionisation. The objective of the current study was therefore to examine chitosan titration and phase separation behavior as a function of temperature, ionic strength, and f_D , for improved understanding of chitosan solution properties and of the thermo-gelling mechanism of chitosan/GP solutions. A second objective was to assess the ability of the nonlinear Poisson-Boltzmann cylindrical cell model to determine solution properties of chitosan at finite concentration and to predict chitosan apparent pK_a and its dependence on polymer ionization, level of deacetylation, and ionic strength. We performed titration experiments and simultaneously measured laser light transmittance (L_T), the latter to detect phase separation of chitosan solutions, at controlled temperatures ranging from 5 to 40 °C. Solutions of chitosan with f_D ranging from 0.72 to 1.00 and with mono-monovalent salt concentration ranging from 0 to 150 mM were titrated and resulting data was analysed using a nonlinear Poisson Boltzmann cylindrical cell model. We hypothesized that i)

increasing temperature would increase proton dissociation from chitosan (i.e. reduce apparent pK_a) ii) that increased ionic strength (I_c) would dampen ionization-dependent behavior via electrostatic screening and decrease chitosan solubility and iii) that f_D would not strongly influence phase separation but that increasing f_D would reduce apparent pK_a via increased electrostatic repulsion.

We also performed temperature ramp experiments with simultaneous pH measurement on solutions of simple electrolytes including glucosamine (the ionisable subunit of chitosan) and glycerol-phosphate (GP), the anionic buffer present in chitosan/glycerol-phosphate solutions. The goal here was to evaluate the contribution of temperature dependent ionization behavior of the monomer (glucosamine) towards behavior of the polymeric form (chitosan) and to examine the influence of temperature on GP ionization. We hypothesized here that GP ionization may be relatively insensitive to temperature such that GP may act as an efficient acceptor of protons released from chitosan when chitosan/GP solutions are heated. Such a heat-induced transfer of protons from chitosan to GP would reduce the degree of ionization of chitosan and therefore, chitosan intermolecular electrostatic repulsion, allowing attractive hydrophobic and hydrogen bonding interchain forces to initiate phase separation and result in the formation of a gel in sufficiently concentrated solutions. Our data and theoretical analysis support this latter heat-induced proton transfer from the polycation to the anionic buffer as the principle mechanism of gel formation in chitosan/glycerol-phosphate solutions.

4.3 THEORY

A cylindrical cell model representation of chitosan in solution was used to obtain a molecular electrostatic potential by solving the nonlinear Poisson-Boltzmann equation within the cylindrical cell (Marcus 1955). The model was developed for solutions that contain the cationic polyelectrolyte, its anionic counterion (Cl^-), a strong base titrant (NaOH), and a monovalent salt (NaCl). The molecular electrostatic potential was then used to theoretically predict titration pH curves as described below.

4.3.1 Structural Parameters of the Cylindrical Cell Model

Chitosan is composed of two distinct monomers: a fraction f_D of ionizable glucosamine and a fraction $1 - f_D$ of nonionizable *N*-acetyl-glucosamine (Figure 4.1A). The chitosan is represented as an infinite impenetrable cylinder of radius a where discrete charge sites are smeared out to form a uniform surface charge density σ (Figure 4.1B),

$$\sigma = \frac{e\alpha f_D}{2\pi al} \quad (4.1)$$

where e is the elementary charge, α is the degree of ionization of the polycation ($\alpha = 0$ is neutral and $\alpha = 1$ is fully ionized) and l is the structural length of the monomer that is set to $l = 0.52$ nm following structural data (Mazeau, Winter et Chanzy 1994, Okuyama, Noguchi, Miyazawa, Yui et Ogawa 1997). The radius of the inner cylinder

representing chitosan is taken as $a = 0.8$ nm, even though this value is greater than what structural data suggest (0.42 nm) (Mazeau, Winter et Chanzy 1994), an assumption that is elaborated upon below in the Discussion. Each polymer chain is located at the center of a cylindrical cell whose radius b (Figure 4.1A) is determined from the monomer concentration c_p (including both glucosamine and *N*-acetyl-glucosamine) and monomer length l , according to

$$b = \left(\frac{1}{\pi l c_p N_A} \right)^{1/2} \quad (4.2)$$

where N_A is Avogadro's number.

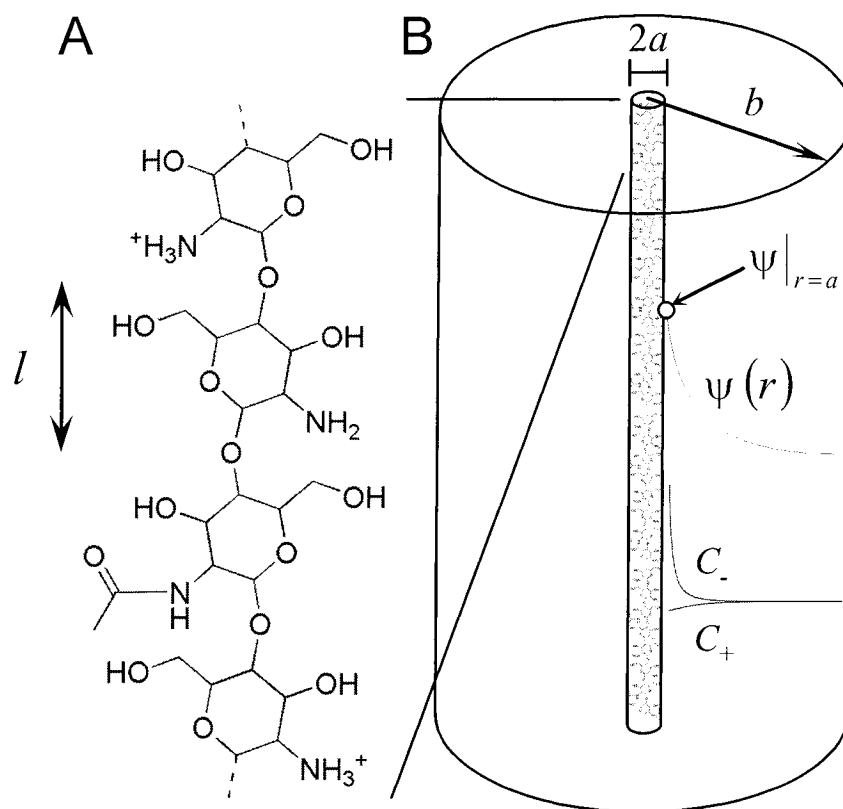


Figure 4.1 A) A four monomer segment of chitosan is represented with two protonated monomers, a neutral monomer, and an unprotonable *N*-acetyl-glucosamine monomer where each monomer has a length l . The smaller cylinder with radius a , corresponds to the chitosan molecule that is contained in its electrolyte envelope extending to radius b . Representative profiles of electrostatic potential $\psi(r)$, counterion concentration, c_- , and co-ion concentration, c_+ , are shown in a case of $I_c = 15$ mM NaCl at $\alpha = 0.75$ and $f_D = 1.00$. The circle indicates the electrostatic potential at the surface of the polyelectrolyte, $\psi|_{r=a}$.

4.3.2 Counter-ion and Co-ion Concentration Molecular Scale Profiles and Average Macroscopic Values

The polycation is surrounded by mobile ions in the region $a < r < b$. Using the mean field approximation (Marcus 1955), these ions are assumed to follow a Boltzmann distribution at equilibrium, resulting in a concentration profile $c_i(r)$ about the polyion that is a function of radial position r and electrostatic potential $\psi(r)$,

$$c_i(r) = c_i^0 e^{-z_i e \psi(r) / kT} \quad (4.3)$$

where z_i is the valence of the mobile species i , T is the temperature, and k is Boltzmann's constant. The position where the electrostatic potential is zero, and therefore where c_i^0 would be the concentration of ionic species i , always exist in a solution where the polymer is infinitely dilute or when the solution is in equilibrium across a semipermeable membrane (permeable to salt but not to the polyelectrolyte). When these conditions do not apply, as in the case of a closed polyelectrolyte solution at finite concentration in the present study where $\psi > 0$ can occur throughout the solution, then the value of c_i^0 can be found from the known mean concentration of positive or negative electrolyte ions, $\bar{c}_\pm$, in the volume of the cylindrical cell that are given by

$$\bar{c}_\pm = c_\pm^0 \frac{\int_a^b 2r e^{\pm \frac{e\psi(r)}{kT}} dr}{b^2} = \frac{c_\pm^0}{\gamma_\pm^c} \quad (4.4)$$

where a mono-monovalent electrolyte, $z_i = 1+$ or $1-$, is considered and

$\gamma_{\pm}^c = b^2 \int_a^b 2re^{\mp \frac{e\psi(r)}{kT}} dr$ are the mobile ion activity coefficients in the cylindrical cell,

particular to this mean-field theory.

4.3.3 Theoretical Dependence of pH on pK_0 , α and $\psi|_{r=a}$

A theoretical relationship describing pH dependence on pK_0 , α and $\psi|_{r=a}$ where $\psi|_{r=a}$ is the electrostatic potential at the surface of the polyelectrolyte from the Poisson–Boltzmann cylindrical cell model is derived in the Appendix (eq 4.30 in the Appendix, see also Marcus (Marcus 1955) for a similar derivation) and is given by

$$\text{pH} = -\log_{10} \gamma_+ \bar{c}_H = pK_0(T) + \log_{10} \frac{1-\alpha}{\alpha} - \frac{e\psi|_{r=a}}{\ln 10 kT} \quad (4.5)$$

where

$$pK_0(T) = \frac{\mu_H^0 + \mu_A^0 - \mu_{AH^+}^0}{\ln 10 kT} \quad (4.6)$$

and μ_H^0 is the standard proton chemical potential in the solution phase, and $\mu_{AH^+}^0$ and μ_A^0 are the standard chemical potentials of a protonated and a neutral site on the polycation, respectively. A useful expression to compare with experiments is the apparent pK_a , or pK_{ap}

$$\text{p}K_{\text{ap}}(T) = \text{pH}(T) - \log_{10} \frac{1-\alpha}{\alpha} = \text{p}K_0(T) - \frac{e\psi|_{r=a}}{\ln 10 kT} \quad (4.7)$$

that includes two contributions, the first representing the intrinsic monomeric dissociation constant $\text{p}K_0(T)$, and the second depending on polyelectrolyte surface potential $\psi|_{r=a}$, the latter found by solving the Poisson-Boltzmann equation. Note that for simple acid/base electrolytes $\psi|_{r=a} = 0$ in the current model and therefore the apparent $\text{p}K_{\text{a}}$ ($\text{p}K_{\text{ap}}$) and $\text{p}K_{\text{a}}$ become identical $\text{p}K_{\text{ap}}(T) = \text{p}K_0(T) = \text{p}K_{\text{a}}(T)$.

4.3.4 The Poisson–Boltzmann Equation

The use of eq 4.5 to determine pH requires knowledge of $\psi|_{r=a}$, α , and $\text{p}K_0$ for a given temperature, T . The electrostatic potential, $\psi(a < r < b)$, is the solution to the Poisson–Boltzmann equation (Buschmann M D et Grodzinsky A J 1995, Carnie et Torrie 1984, Fixman 1979) in cylindrical coordinates,

$$\frac{d^2\psi(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\psi(r)}{dr} = -\frac{\rho(r)}{\epsilon} = -\frac{\sum_i z_i e c_i^0 e^{-z_i e \psi(r)/kT}}{\epsilon} \quad (4.8)$$

subject to boundary conditions from Gauss' law

$$\left. \frac{d\psi(r)}{dr} \right|_{r=a} = -\frac{\sigma}{\epsilon} = -\frac{e\alpha f_D}{2\pi a l \epsilon} \quad \text{and} \quad \left. \frac{d\psi(r)}{dr} \right|_{r=b} = 0 \quad (4.9)$$

where ε is the permittivity of water and $\rho(r)$ is the spatially varying charge density. In a region where the electrostatic potential and derivatives are zero (i.e. a real or virtual ground) we have from eq 4.8

$$\sum_{i=\text{mobile ions}} z_i e c_i^0 = 0 \quad (4.10)$$

In the context of this study, the mobile ions considered are the counterion Cl^- (from the solvent HCl and NaCl salt added), the co-ion Na^+ (from the dissociation of NaOH and NaCl) and protons (H^+). Hydroxyl ion (OH^-) concentration is negligible since only acidic solutions are considered. Then equation 4.10 can be used to define a concentration of total cationic or total anionic species, c^0 , at the virtual or real ground as

$$c_{\text{Na}}^0 + c_{\text{H}}^0 = c_{\text{Cl}}^0 = c^0 \quad (4.11)$$

Since both cations follow the same Boltzmann distribution, the summation on the right side of eq 4.8 can be written in terms of c_{Cl}^0 alone, using eq 4.11, to obtain

$$\frac{d^2\psi(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\psi(r)}{dr} = \frac{2ec_{\text{Cl}}^0}{\varepsilon} \sinh\left(\frac{e\psi(r)}{kT}\right) \quad (4.12)$$

The experimentally known average Cl^- concentration $\bar{c}_{\text{Cl}}$ (the sum of HCl and NaCl concentrations) is then directly related to c_{Cl}^0 via eq 4.4. Thus, for polycations

containing monovalent salt at acidic pH, the electrostatic potential for a known degree of ionisation α is found by numerically solving eq 4.12 such that the boundary conditions of eq 4.9 are satisfied, using an initial guess for c_{Cl}^0 that is iterated until the right-hand side of eq 4.4 converges to the known concentration, $\bar{c}_{\text{Cl}}$. In this way the Poisson-Boltzmann equation may be solved for a closed solution at finite polyelectrolyte concentration that is not in equilibrium with an external bath.

4.3.5 Electroneutrality and the Poisson-Boltzmann Equation Determine α and $\psi|_{r=a}$

The degree of ionization, α , is required to calculate pH from eq 4.5. To determine α , we use the condition of macroscopic electroneutrality, again assuming negligible amounts of hydroxyl ions,

$$\bar{c}_{\text{Cl}} - \bar{c}_{\text{Na}} - \bar{c}_{\text{H}} - c_{\text{g}}^+ = 0 \quad (4.13)$$

where c_{g}^+ is the concentration of ionized glucosamine monomers,

$$c_{\text{g}}^+ = \alpha f_{\text{D}} c_{\text{p}} \quad (4.14)$$

Substituting eqs 4.5 and 4.14 into eq 4.13 we find

$$\alpha = \frac{\bar{c}_{\text{Cl}} - \bar{c}_{\text{Na}} - \frac{10^{-\text{pH}}}{\gamma_+}}{f_{\text{D}} c_{\text{p}}} \quad (4.15)$$

The value of α and the corresponding $\psi|_{r=a}$ are determined for each particular experimental pH. In most cases, the proton concentration is negligible and α is simply determined from the known ion and monomer concentrations (taking into account any dilution from the cumulative titrant addition). For cases where proton concentration must be considered (i.e. the term $\frac{10^{-\text{pH}}}{\gamma_+}$ in eq 4.15), the degree of ionization α can be determined by using the pH experimental value and assuming an activity coefficient equal to one. For low ionic strength and low pH values, the approximation $\gamma_+ = 1$ is not valid, in which case, after having solved the Poisson-Boltzmann equation (eq 4.12) as described in the previous section, the potential profile $\psi(r)$ is used to calculate γ_+ with eq 4.4 that is subsequently inserted into eq 4.15 to obtain a new α and the process is iterated until α converges to a unique value.

4.3.6 Determination of $pK_0(T)$ and of the Temperature-induced Change in pK_{ap}

Once the values of $\psi|_{r=a}$ and α for each pH value in a given titration curve are found as described above (for pH values in the soluble range), we subsequently insert these $\psi|_{r=a}$ and α into eq 4.5 and fit eq 4.5 to pH data by adjusting $pK_0(T)$ to find the best fit value of $pK_0(T)$.

In order to test temperature-induced changes in pK_{ap} , we use the relationship

$$\frac{dpK_{\text{ap}}}{dpH} \cong 1 \quad \text{if} \quad (c_{\text{H}^+} + c_{\text{OH}^-}) \left(\frac{1}{c_{\text{AH}^+}} + \frac{1}{c_{\text{A}}} \right) \ll 1 \quad (4.16)$$

where a weak electrolyte ($\text{AH}^+ \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}$) is in solution with a strong acid and/or base (see Appendix II for proof). Thus, the variation in pK_{ap} with temperature will be assessed by measuring changes in pH as long as the polyelectrolyte is not totally in dissociated or associated form and if the proton and hydroxyl ion concentrations are low compared to the polyelectrolyte monomer concentration. For our system that is only soluble for acidic pH, these conditions are satisfied when the $\text{pH} \gtrsim 4$ and $\alpha \lesssim 0.95$. Then the temperature induced change in pK_{ap} with respect to that of a reference temperature, $\Delta pK_{\text{ap}}(T)$, can be determined from the corresponding pH difference via

$$\Delta pK_{\text{ap}}(T) = pK_{\text{ap}}(T) - pK_{\text{ap}}(T_{\text{ref}}) = \text{pH}(T) - \text{pH}(T_{\text{ref}}) \quad (4.17)$$

where T_{ref} is an arbitrary reference temperature.

4.4 EXPERIMENTAL METHODS

4.4.1 Reagents and Solutions

Monomeric glucosamine (non-polyelectrolyte) solutions were prepared by adding 12.9 mg D(+)-glucosamine hydrochloride (Sigma, Cat. No. G1514) to 20 mL distilled and de-ionized water to obtain 3.00 mM D(+)-glucosamine with 3.00 mM Cl^- counterion. Further addition of 0.3 mL of 0.1 N NaOH solution produces a solution with $\alpha = 0.95$ that was used for temperature ramp tests described below (eq 4.16 is satisfied since $\text{pH} > 5.8$, and $\text{dp}K_a/\text{dpH} = 1.00 \pm 0.01$). Glycerol-phosphate (GP) solutions at 50 mM concentration with $\alpha = 0.5$ were then prepared by adding 297 mg GP (Sigma, Cat. No. G9891) to 20 mL distilled and de-ionized water followed by addition of 0.5 mL of 1 N HCl. (eq 4.16 condition is satisfied since $\text{pH} = 6.2$, and $\text{dp}K_a/\text{dpH} = 1.00 \pm 0.01$).

Ultrapure chitosans with f_D ranging from 0.72 to 1.00 were provided by BioSyntech (Table 4.1). These polymers have number average molecular weight (M_n) ranging from 65 to 220 kDa and a polydispersity index ($\text{PDI} = M_w/M_n$) of 1.5 to 1.7. A 1 N NaOH (Aldrich, Cat No. 31,951-1) and 1 N HCl (Aldrich, Cat No. 31,894-9) were used to prepare the titrant solution and to dissolve chitosan, respectively. NaCl (Fisher Scientific, Cat No. S271-1) was used to adjust ionic strength (I_c) of chitosan solutions.

Table 4.1 Characteristics of Chitosans.

f_D (batch number)	η_D^a	M_n^b	PDI ^c
	mPa-s	kDa	
0.72 (PCCH00023)	3355	220	1.5
0.87 (PCCH00022)	543	114	1.6
1.00 (PCCH00014)	120	65	1.7

^a Dynamic viscosity of 10.0 g/L chitosan solutions in 0.1 N HCl at 25 °C. ^b Number average molecular weight (M_n) by triple detector gel permeation chromatography (Brugnerotto, Desbrières, Roberts et Rinaudo 2001) (GPC) and ^c polydispersity index ($PDI = M_w/M_n$) using weight average molecular weight (M_w) obtained by GPC.

In order to prepare chitosan solutions with precise concentration, chitosan powder was dried at 60 °C for 2 days using a heated centrifugal vacuum concentrator (Savant Speedvac, model SS11) and kept in a desiccator until use. Chitosan was dissolved in dilute HCl at a glucosamine monomer to HCl molar ratio of 1:1 so that ionizable sites on the polymer and their counterions (Cl⁻) were present in equal concentrations in the solution, each at 3 mM. To prepare solutions, dried chitosan was first added to de-ionized water and stirred to disperse the powder prior to adding HCl. The solution was then stirred overnight to ensure complete dissolution of chitosan. The NaCl concentration (I_c) of the solution was adjusted by adding appropriate amounts of 5 M NaCl. At the highest level of added salt used in our study, i.e. $I_c = 150$ mM, the glucosamine monomer and HCl concentrations were diluted to 2.91 mM.

4.4.2 *Experimental Apparatus*

A custom apparatus (Figure 4.2) allowed simultaneous titration and laser light relative transmittance (L_T) measurements to detect phase separation of chitosan solutions. We also used this apparatus to characterize the temperature dependence of pK_a of D(+)-glucosamine and of glycerol 2-phosphate by measuring pH during temperature ramp tests while respecting the condition stated in eq 4.16. Solution temperature was controlled using a 50 mL reaction jacketed beaker (Kontes, Cat. No. 317000-0050) coupled to a circulating bath (Neslab, model RT-111) with continuous stirring during the titration. The pH electrode was calibrated with NIST standards at the particular temperature of constant temperature tests (5, 20, 25 or 37 °C) and at 5 °C for the temperature ramp test, where the automatic temperature compensation probe corrected for the temperature dependence of the pH electrode. Measurements were performed with one of the following two pH/temperature probes: 1) pH electrode (Accumet, Cat. No. 13-620-287), temperature probe (Accumet, Cat. No. 13-620-16) and pH meter (Accumet, Model 20) or 2) combined pH electrode and temperature probe (Orion, Cat. No. 617500) and pH meter (Orion, Model 555A). The addition of 0.01 N NaOH titrant was controlled by an automatic titrator (Schott, Titronic Universal 20 mL). To detect phase separation, laser light relative transmittance, L_T , was measured throughout titration using a 635-nm diode laser beam (Coherent, 5 mW, 31-0128) passing through the solution and walls of the beaker with detection by a photo detector (Coherent, Laser-Q VIS, 33-0241) that produces a current (proportional to light intensity) that was read by a multimeter (Fluke, model 45 Dual display). The point of phase separation was

characterized by a sharp decrease of L_T following injection of titrant (see Figure 4.3). The value of α at which these L_T values decreased and indicated phase separation is called α_{ps} . A computer controlled the titration burette and bath temperature in addition to acquiring pH, temperature and L_T data.

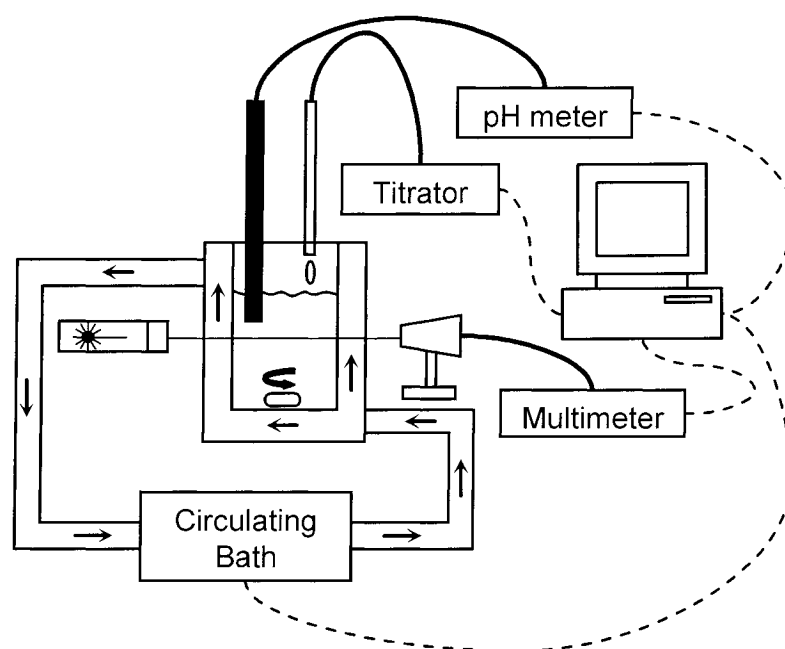


Figure 4.2 Custom experimental apparatus that performs temperature-controlled titrations, while recording temperature, pH and relative light transmittance (L_T) of chitosan solutions. The temperature of the solution is controlled via the circulating bath and a titrator adds 0.01M NaOH to the solution. A photodetector assesses laser light transmittance through the beaker and solution to detect phase separation.

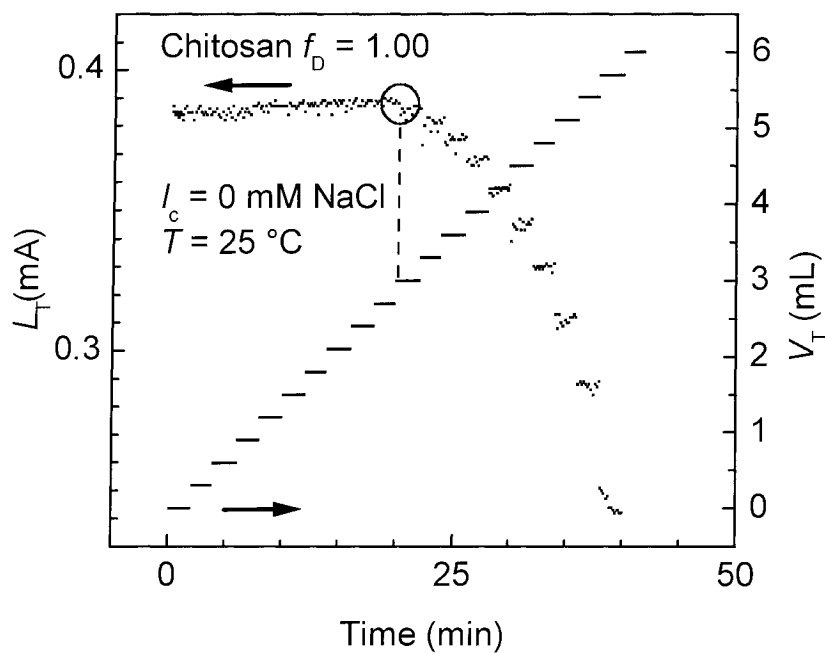


Figure 4.3 Relative light transmittance is shown along with volume of added titrant V_T , both recorded as a function of time, to illustrate the sharp decrease in L_T (circle) occurring at a volume of 3mL injected titrant, in this case. The α_{ps} value is calculated from eq 4.15, using the Na^+ , Cl^- and c_p concentrations at the corresponding injection volume, neglecting the proton concentration.

4.5 RESULTS

4.5.1 *Influence of Temperature on pK_a of Glycerol-phosphate and Glucosamine and on pK_{ap} and α_{ps} of Chitosan*

Temperature ramps from 5 to 40 °C were imposed on two simple electrolyte solutions, D(+)-glucosamine and glycerol 2-phosphate, as well as on chitosan solutions. ΔpK_{ap} was calculated from the measured pH according to eq 4.17 with 5 °C as reference temperature (Figure 4.4). D(+)-glucosamine exhibited a pK_a variation with temperature of -0.027 ± 0.001 pK unit/°C (mean $\pm$ SD; $n = 3$), which represents nearly a full unit decrease from 5 to 40 °C, while glycerol 2-phosphate was almost invariant in the same temperature range. A similar variation in pK_a for D(+)-glucosamine was observed by Neuberger (Neuberger et Fletcher 1971) while a similar lack of effect of temperature on glycerol 2-phosphate pK_a was found by Fukada (Fukada et Takahashi 1998). Titration of similar solutions of D(+)-glucosamine and glycerol 2-phosphate provided pK_a values at 25 °C of 7.4 ± 0.1 (mean $\pm$ SD; $n = 3$) and 6.2 ± 0.1 (mean $\pm$ SD; $n = 3$), respectively (data not shown).

The temperature dependence of ΔpK_{ap} for chitosan closely resembled that of glucosamine (Figure 4.4) with a value of -0.030 ± 0.001 pK unit/°C (mean $\pm$ SD; $n = 3$) suggesting that this effect arises from the temperature dependence of the intrinsic dissociation constant $pK_0(T)$ shown in eqs 4.6 and 4.7. This origin of the temperature dependent ΔpK_{ap} for chitosan was further confirmed by the lack of effect of temperature

on the potential profile in the cylindrical cell (Figure 4.5A) essentially eliminating any temperature dependent contribution of the rightmost term in eq 4.7. The effect of temperature on pK_{ap} also appears similar for different α as it can be seen from the parallel curves in Figure 4.6A. The pK_0^{lin} values obtained from these measurements by a linear fit of the pK_{ap} in the non phase separated region and with $\alpha \leq 0.85$ are plotted in Figure 4.4 as $\Delta pK_{\text{ap}} = pK_0(T) - pK_0(T_{\text{ref}})$ with $T_{\text{ref}} = 5^\circ\text{C}$. The degree of ionization at phase separation, α_{ps} , did not appear to depend on temperature according to experiments performed at 5°C , 25°C , and 37°C with f_D of either 0.72 or 1.00 (Table 4.2).

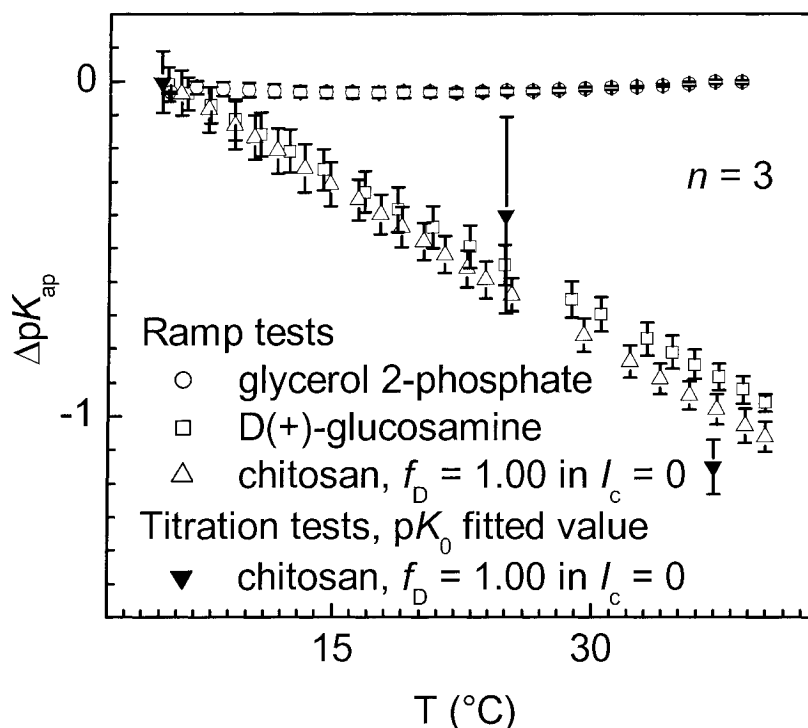


Figure 4.4 Variation of pK_a or pK_{ap} with temperature (eq 4.17 with reference temperature 5 °C) for D(+)-glucosamine, glycerol 2-phosphate, and chitosan with $f_D = 1.00$ in $I_c = 0$ obtained from temperature ramp tests (open symbols). The solid down triangles are $\Delta pK_{ap} = pK_0^{\text{lin}}(T) - pK_0^{\text{lin}}(T_{\text{ref}})$ where pK_0 values are y-axis intercepts obtained from linear fits of the pK_{ap} vs α from the titration measurements in the non phase separated region and with $\alpha \leq 0.85$. Both D(+)-glucosamine and chitosan experience a significant decrease in pK_{ap} upon heating while the pK_{ap} of glycerol 2-phosphate remained constant. Mean $\pm$ SD ($n = 3$) are shown. D(+)-glucosamine and glycerol 2-phosphate preparations are described in Section *Reagents and Solutions* from *Experimental Methods*. Chitosan solutions were prepared as described in that section with $f_D = 1.00$ and without added salt. The open up triangles are chitosan solutions to which 1.5 mL of NaOH 0.01 N was added to achieve $\alpha = 0.75$ and equilibrated overnight before the temperature ramp tests.

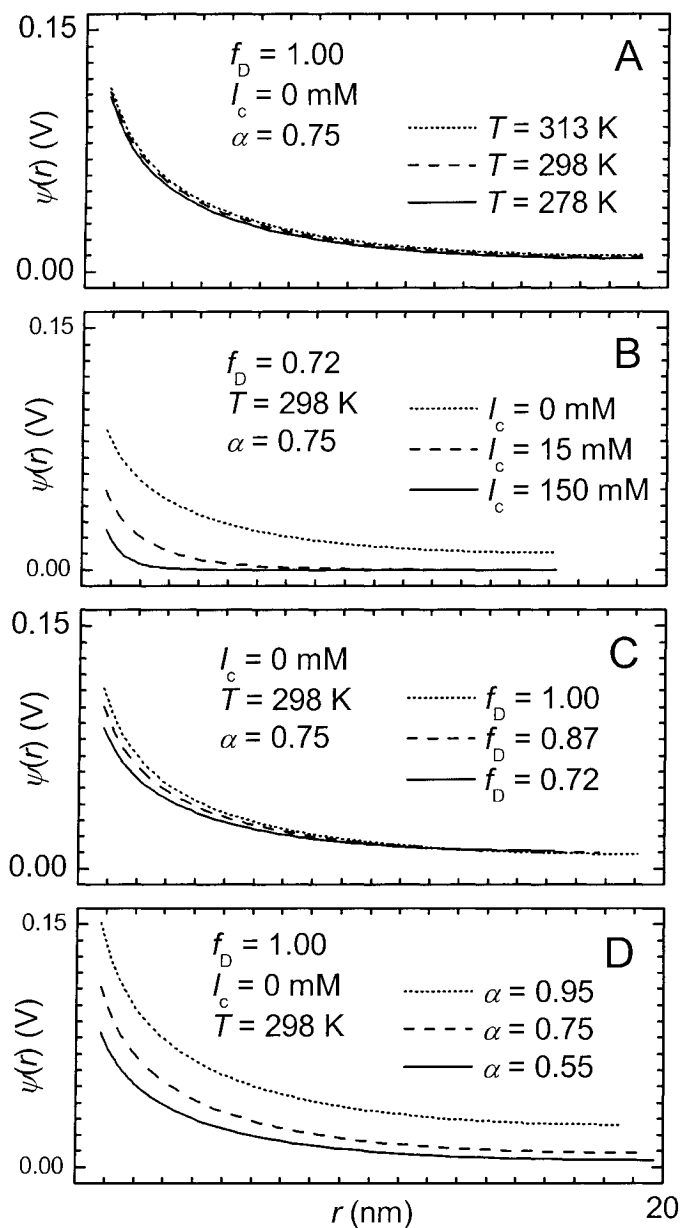


Figure 4.5 The electrostatic potential profile $\psi(r)$ calculated from the Poisson-Boltzmann cylindrical cell model from the surface of chitosan ($r = a = 0.8$ nm for our calculations) out to the midpoint ($r = b$ according to eq 4.2 above) between two adjacent chitosan molecules in solution. Note that this radius b varies with f_D due to glucosamine monomer initial concentration kept to 3.0 mM and with α due to titrant dilution. Model

parameters were taken to represent chitosan solutions described in the experimental methods section such that the effects on the potential profile of changing the following parameters could be observed (A) temperature, (B) ionic strength, (C) fraction of deacetylation, and (D) degree of ionization. $\psi(r)$ increases when α or f_D increase and when I_c decreases while no significant change in potential occurs as a function of temperature under these solution conditions.

Table 4.2 Degree of ionization of chitosan at phase separation, α_{ps} , and pK_0 , measured at 25 °C for chitosans with different deacetylation fraction f_D and in solutions of different ionic strength, I_c .

	I_c (mM)	f_D		
		0.72	0.87	1.00
$\alpha_{ps}^a (\pm 0.05)$	0	0.25 ^b	0.35	0.50 ^b
	15	0.30	0.40	0.55
	150	0.35	0.50	0.65
$pK_0^{PB\ c}$	0	6.9 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 0.2
	15	6.7 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1
	150	6.8 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1
$pK_0^{lin\ d}$	0	6.7 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1
	15	6.6 $\pm$ 0.1	6.4 $\pm$ 0.1	6.5 $\pm$ 0.1
	150	6.8 $\pm$ 0.1	6.4 $\pm$ 0.1	6.2 $\pm$ 0.2
$-\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha^{PB\ e}$ (C_{lc}^{PB})	0	2.0 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.2
	15	1.1 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2
	150	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1
$-\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha^{lin\ f}$ (C_{lc}^{lin})	0	1.8 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1
	15	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2
	150	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2

^a Calculation of α_{ps} from experimental measurements ($n = 3$ with error of ± 0.05 due to measurement accuracy).

^b Similar values were obtained at 5°C and 37°C with $n = 3$.

^c pK_0^{PB} are values of pK_0 obtained via the PB fit with the error represented as half the difference of pK_0 obtained with an inner cell radius a set to 0.6 nm versus 1.0 nm

$$\left(\text{error} = \frac{pK_0^{a=0.6 \text{ nm}} - pK_0^{a=1.0 \text{ nm}}}{2} \right).$$

^d pK_0^{lin} are y-axis intercepts obtained from a linear fit of the pK_{ap} in the non phase separated region and with $\alpha \leq 0.85$ ($n = 3$).

^e $\Delta pK_{ap}/\Delta \alpha^{PB}$ is obtained from pK_{ap} at $\alpha = 0.85$ and the pK_0 obtained via the PB fit with the error represented as half the difference obtained with an inner cell radius a set to 0.6

$$\text{nm versus 1.0 nm} \left(\text{error} = \frac{\left(pK_{ap}^{a=1.0 \text{ nm}} \Big|_{\alpha=0.85} - pK_0^{a=1.0 \text{ nm}} \right) - \left(pK_{ap}^{a=0.6 \text{ nm}} \Big|_{\alpha=0.85} - pK_0^{a=0.6 \text{ nm}} \right)}{2 \cdot 0.85} \right).$$

^f $\Delta pK_{ap}/\Delta \alpha^{lin}$ are slope values obtained by a linear fit of the pK_{ap} in the non phase separated region and with $\alpha \leq 0.85$ ($n = 3$).

4.5.2 Influence of Ionic Strength on pK_a of Glucosamine and on pK_{ap} and α_{ps} of Chitosan

Increasing ionic strength strongly increased chitosan pK_{ap} by nearly a full unit upon addition of 150mM salt (Figure 4.6B) in regions where chitosan ionization state is relatively high ($\alpha > 0.5$). On the contrary, similar measurements of monomeric glucosamine displayed only a minimal increase in pK_a of ~ 0.03 units (data not shown). These results suggest that the salt dependence of pK_{ap} of chitosan is due to the polyelectrolyte term, $e\psi|_{r=a}/\ln 10kT$, in eq 4.7, a conclusion that is also supported by the strong dependence of potential profile on ionic strength revealed by the Poisson-

Boltzmann cylindrical cell model calculation (Figure 4.5B). The degree of ionization of chitosan at phase separation increased with increasing ionic strength (α_{ps} in Table 4.2), evidently due to increased electrostatic screening (Figure 4.5B) allowing for readier inter-chain association. Pearson correlation analysis did not allow us to conclude any significant relation between pK_0 and I_c ($p > 0.3$ for pK_0^{PB} and pK_0^{lin} in Table 4.2).

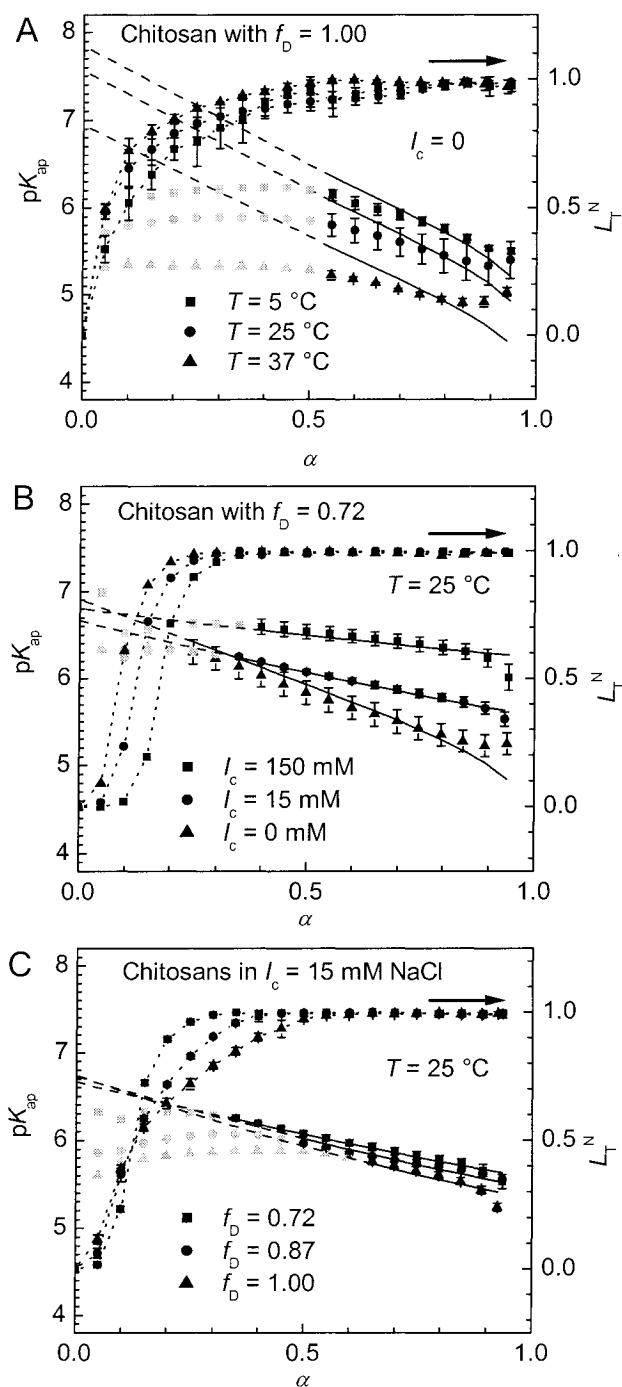


Figure 4.6 Influence of chitosan degree of ionization on pK_{ap} (left-hand scale) and relative light transmittance (right-hand scale) for different (A) temperatures, (B) ionic strengths I_c and (C) fractions of deacetylation f_D . Dark symbols represent experimental

data obtained in the single phase region (mean $\pm$ SD; $n = 3$), while lighter grey symbols are data obtained after phase separation. Solid lines are the model fit to the data (eqs 4.4, 4.9, 4.12 and 4.15) in the single phase region while dashed lines are the continuation of the model into the phase separated region. Finely dotted lines are used to link normalized light transmittance (L_T^N) data to show the occurrence of phase separation where L_T^N starts to decrease.

4.5.3 Influence of Fraction of Deacetylation (f_D) on pK_{ap} and α_{ps} of Chitosan

Increasing f_D produced a slight reduction in pK_{ap} (Figure 4.6B) consistent with the PB-model calculation revealing a slight increase in the electrostatic potential for higher f_D (Figure 4.5C). pK_0 obtained from PB-model fits to titration data also do not reveal any particular dependence on f_D as Pearson correlation analysis gave $p > 0.15$ for pK_0^{PB} and pK_0^{lin} in Table 4.2. In contrast, a very significant influence of f_D on the degree of ionization at phase separation, α_{ps} , was observed where chitosan with higher levels of deacetylation would phase separate at much higher degrees of ionization (Table 4.2). For example, fully deacetylated chitosan with $f_D = 1.00$ phase separated at $\alpha_{ps} = 0.65$ versus $\alpha_{ps} = 0.35$ for an acetylated chitosan with $f_D = 0.72$.

4.6 DISCUSSION

The primary objective of the current study was to examine chitosan titration and phase separation behavior as a function of temperature, ionic strength, and fraction of deacetylation (f_D) and to assess the ability of the nonlinear Poisson-Boltzmann cylindrical cell model to determine solution properties of chitosan at finite

concentration. We found that increasing temperature strongly reduced the apparent pK_a (pK_{ap}) of chitosan in a manner similar to the monomeric glucosamine pK_a (Figure 4.4), strongly suggesting this effect to be directly related to the intrinsic dissociation constant $pK_0(T)$ rather than to the polyelectrolyte term (rightmost term in eq 4.7 containing $\psi|_{r=a}$). Increasing ionic strength also had a strong effect of increasing pK_{ap} (Figure 4.6A) however this effect was ascribed to the polyelectrolyte term in eq 4.7 and is readily accounted for by increased electrostatic screening as salt is added, thereby facilitating chain protonation. And, as expected, chitosans with higher levels of deacetylation (higher f_D) possessed slightly lower pK_{ap} (Figure 4.6B) due to slightly increased surface charge density on this polyelectrolyte. Both the level of deacetylation (f_D) and ionic strength (I_c) were found to strongly influence the degree of ionization at which phase separation occurs (α_{ps}), increasing α_{ps} for either an increase in f_D or I_c (Table 4.2) while the effect of temperature was negligible. The latter finding where increasing deacetylation increases the degree of ionization at which phase separation occurs ran counter to our initially proposed hypothesis where we expected a higher charge density along the chain to provide increased repulsive electrostatic forces to impede inter-chain association and thereby inhibit phase separation. Apparently increasing the amount of acetyl groups is effective at blocking inter-chain associations, possibly due to steric hindrance of these relatively bulky side groups (Varum, Ottoy et Smidsrod 1994).

Previous studies examining titration behavior of chitosan (Domard 1987), (Sorlier, Denuzière, Viton et Domard 2001) found pK_{ap} similar to ours when similar f_D and I_c are compared for the region $\alpha_{ps} < \alpha < 0.85$. When $\alpha > 0.85$ we found that pK_{ap} differed somewhat probably since $dpK_{ap}/d\alpha \neq 0$ (see eq 4.7) such that a slight error in determining α considerably changes the pK_{ap} . Dilution along the titration does not seem to greatly affect measured pK_{ap} values since our results are comparable with previous studies (Domard 1987, Park, Choi et Park 1983, Skjak-Braek, Anthonsen et Sandford 1989, Sorlier, Denuzière, Viton et Domard 2001, Strand, Tommeraas, Varum et Ostgaard 2001, Tsukada et Inoue 1981) that used lower chitosan concentration (0.5 mM vs 3 mM) and higher titrant concentration (0.1 N vs 0.01 N). Data presented in Table 4.2 for the degree of ionization at phase separation also agrees with the few previous measurements, i.e. for a chitosan/HCl solution with $f_D = 0.88$, where phase separation occurred at $\alpha_{ps} = 0.5$ (Rinaudo M, Milas M et Le Dung P 1993, Rinaudo, Pavlov et Desbrieres 1999). When comparing pH at the point of phase separation we find similar values as those by Varum (Varum, Ottoy et Smidsrod 1994) for solutions with similar f_D and I_c . However, we propose that α is a more appropriate variable than pH to identify phase separation, as suggested by Siegel (Siegel et Cornejo-Bravo 1992), since this parameter is directly related to the state of the polyelectrolyte while pH is influenced by temperature and the presence and dissociation state of other solution components. The α_{ps} values obtained in this study and from literature suggest that this parameter is not strongly dependant on M_w in the range tested since different molecular weights provided similar dependance with f_D (Table 4.1 and Table 4.2). Other parameters that are expected

to affect α_{ps} value are the distribution of acetyl groups and the use of particularly low molecular weight. A more random acetyl versus block distribution should phase separate at lower α_{ps} value as would sufficiently low molecular weights.

The Poisson-Boltzmann cylindrical cell model provided molecular level insights and interpretations of the above findings. While polyelectrolytes titrations have been modeled using several approaches (Borukhov, Andelman, Borrega, Cloitre, Leibler et Orland 2000, Nishio 1994, Smits, Koper et Mandel 1993, Ullner, Joensson, Soederberg et Peterson 1996) (see Ullner (Ullner 2002) for a review of these approaches), we used the mean-field Poisson-Boltzmann cylindrical cell model, since, chitosan persistence length is about 10–15 nm (Anthonsen, Varum et Smidsrod 1993, Berth, Dautzenberg et Peter 1998, Brugnerotto, Desbrières, Roberts et Rinaudo 2001, Rinaudo M, Milas M et Le Dung P 1993, Schatz, Viton, Delair, Pichot et Domard 2003) suggesting that the chain is stiff enough (Mandel 1992) to apply this model. We set the radius of the impenetrable inner cylinder to $a = 0.8$ nm, which is greater than the crystallographic structural parameter (0.42 nm) (Mazeau, Winter et Chanzy 1994), yet appears most appropriate since all pK_{ap} curves obtained at 25 °C could be described well using $a = 0.8$ nm. In addition it is typical to use a value of the rod radius in the cylindrical PB model that is greater than the structural value to describe polyelectrolyte data (Cleland, Wang et Detweiler 1982, Kotin et Nagasawa 1962, Nitta et Sugai 1974, Zhang, Takematsu et Norisuye 1987). It should be noted that fits in low I_c conditions were more sensitive to the choice of a value since much higher electrostatic potentials occur. Even though the PB model is generally non-linear, a useful simplification is

$pK_{ap} = pK_0(T_{ref}) - C_T(T - T_{ref}) - C_{lc}(I_c, f_D)\alpha$ where we found $C_T = 0.03$ for all chitosans while I_c and f_D dependent parameters $C_{lc}(I_c, f_D)$ and $pK_0(T_{ref})$ are shown in Table 4.2. The pK_{ap} versus pH relationship contained in equation 4.16 can be adapted for many polyelectrolytes to allow direct assessment of C_T and C_{lc} by measuring pH while changing parameters such as temperature (C_T) and added salt (C_{lc}). For temperature-dependent measurements, the ability of the pH probe to compensate for temperature is important and care should be taken to test pH accuracy versus temperature.

The marked influence of temperature on chitosan pK_{ap} and the corresponding temperature insensitivity of the pK_a of glycerol-phosphate (Figure 4.4) sheds light on the molecular mechanism of heat-induced gelation of these systems observed previously (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput et Kandani 2001). Heating of chitosan significantly reduces its pK_a thus producing a tendency for chitosan amine groups to release protons and become neutralized, however, the latter can only occur if a proton acceptor is present in solution. Glycerol-phosphate can act as that proton acceptor because its proton equilibrium is not affected by heating. We therefore expect a net transfer of protons from chitosan to glycerol-phosphate to occur with heating, thereby neutralizing chitosan in solution in a spatially uniform manner that allows for bulk gelation in sufficiently concentrated solutions. One would expect various parameters to influence this process including the amount of HCl present (lower amounts will gel at lower temperature as observed in (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput et Kandani 2001) and the amount of glycerol-phosphate (higher amounts will gel at lower

temperature as observed in (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput et Kandani 2001)). An additional critical factor expected from our results is the degree of deacetylation that strongly influences phase separation (Table 4.2). Future studies where the current model is elaborated to account for other titratable species in solution, such as glycerol-phosphate, and for the critical value of degree of ionization of chitosan for phase separation that depends on ionic strength and degree of deacetylation, may allow for the predictive design of specific systems with desired thermosensitive parameters.

4.7 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

4.8 APPENDIX I

4.8.1 Titration of a Cationic Polyelectrolyte

The protonation of ionisable sites of the polycation is described at equilibrium by $AH^+ \rightleftharpoons H^+ + A$, where A is the protonatable group on the polycation ($A = NH_2$ for chitosan). This equilibrium with regard to proton transfer from the polycation to the solution phase requires that the proton chemical potential be equal in the two phases,

$$\mu_H^F = \mu_H^P \quad (4.18)$$

where μ_H^F is the proton chemical potential in the fluid electrolyte phase ($a < r < b$) and μ_H^P is the proton chemical potential on the polycation at $r = a$. In the fluid phase,

$$\mu_H^F = \mu_H^0 + kT \ln \bar{a}_H = \mu_H^0 + kT \ln \gamma_H \bar{c}_H \quad (4.19)$$

where μ_H^0 is the proton standard chemical potential, $\bar{a}_H$ is the proton electrochemical activity, $\gamma_H = \gamma_+$ is the proton activity coefficient (also given by eq 4.4), and $\bar{c}_H$ is the average proton concentration in the fluid electrolyte phase of the polycation solution. The pH of the polycation solution is defined by the proton activity in the fluid electrolyte phase via

$$\text{pH} = -\log \bar{a}_H = -\log \gamma_+ \bar{c}_H \quad (4.20)$$

Since the pH depends on proton activity that in turn depends on eq 4.18 describing proton equilibrium between the two phases, we require an expression for the proton chemical potential on the polycation that can be derived from the Helmholtz free energy, F , of the polycation chain as

$$\mu_{\text{H}}^{\text{p}} = \left. \frac{\partial F}{\partial n_{\text{H}}^{\text{p}}} \right|_T \quad (4.21)$$

where n_{H}^{p} is the number of protonated sites on the polycation. The Helmholtz free energy of the polycation chain in V_{c} is taken as

$$F = E_{\text{e}} - TS_{\text{m}} + n_{\text{H}}^{\text{p}} \mu_{\text{AH}^+}^0 + (m - n_{\text{H}}^{\text{p}}) \mu_{\text{A}}^0 \quad (4.22)$$

where E_{e} is the electrostatic energy, T is the temperature, S_{m} is the entropy of mixing of protonated and unprotonated monomeric sites on the polycation, m is the number of monomers on the chain, and $\mu_{\text{AH}^+}^0$ and μ_{A}^0 are standard chemical potentials of a protonated site and a non-protonated site on the polycation, respectively. The electrostatic energy of the polycation

$$E_{\text{e}} = n_{\text{H}}^{\text{p}} e \psi \Big|_{r=a} \quad (4.23)$$

varies with proton number according to

$$\left. \frac{\partial E_{\epsilon}}{\partial n_{\text{H}}^{\text{P}}} \right|_{m,T} = e\psi \Big|_{r=a} \quad (4.24)$$

The entropy of mixing of protonated and unprotonated sites on the polycation, S_{m} , is identical to that of any two state system with non-correlated sites and is given by

$$S_{\text{m}} = k \ln \frac{m!}{(n_{\text{H}}^{\text{P}})!(m - n_{\text{H}}^{\text{P}})!} = -km [\alpha \ln \alpha + (1 - \alpha) \ln (1 - \alpha)] \quad (4.25)$$

where $n_{\text{H}}^{\text{P}} = m\alpha$ has been used. The entropy variation with proton number on the polycation is then

$$\left. \frac{\partial S_{\text{m}}}{\partial n_{\text{H}}^{\text{P}}} \right|_{m,T} = \frac{1}{m} \left. \frac{\partial S_{\text{m}}}{\partial \alpha} \right|_{m,T} = -k [\ln \alpha + 1 - \ln (1 - \alpha) - 1] = -k \ln \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (4.26)$$

Differentiating the last two terms of the Helmholtz free energy (eq 4.22) provides

$$\frac{\partial (n_{\text{H}}^{\text{P}} \mu_{\text{AH}^+}^0 + (m - n_{\text{H}}^{\text{P}}) \mu_{\text{A}}^0)}{\partial n_{\text{H}}^{\text{P}}} = \mu_{\text{AH}^+}^0 - \mu_{\text{A}}^0 \quad (4.27)$$

We find the proton chemical potential on the polycation by substituting eqs 4.27, 4.26, 4.24 and 4.22 into eq 4.21

$$\mu_{\text{H}}^{\text{p}} = e\psi|_{r=a} + kT \ln \frac{\alpha}{1-\alpha} + \mu_{\text{AH}^+}^0 - \mu_{\text{A}}^0 \quad (4.28)$$

Substitution of eq 4.28 and eq 4.19 into eq 4.18 we find

$$e\psi|_{r=a} + kT \ln \frac{\alpha}{1-\alpha} + \mu_{\text{AH}^+}^0 - \mu_{\text{A}}^0 = \mu_{\text{H}}^0 + kT \ln \bar{a}_{\text{H}} \quad (4.29)$$

Substituting the proton activity from eq 4.29 into the definition of pH in eq 4.20 provides

$$\text{pH} = -\log \bar{a}_{\text{H}} = \frac{\Delta\mu^0}{\ln 10 kT} + \log_{10} \frac{1-\alpha}{\alpha} - \frac{e\psi|_{r=a}}{\ln 10 kT} \quad (4.30)$$

where

$$\frac{\Delta\mu^0}{\ln 10 kT} = \frac{\mu_{\text{H}}^0 + \mu_{\text{A}}^0 - \mu_{\text{AH}^+}^0}{\ln 10 kT} = \text{p}K_0 \quad (4.31)$$

4.9 APPENDIX II

4.9.1 Derivation of $dpK_{ap}/dpH \cong 1$

Consider the cationic polyelectrolyte dissociation $AH^+ \rightleftharpoons H^+ + A$ with equilibrium constant

$$K_a = \frac{c_{H^+} c_A}{c_{AH^+}} \quad (4.32)$$

and water dissociation to protons and hydroxyl ions related by

$$K_w = c_{H^+} c_{OH^-} \quad (4.33)$$

Conservation of the total number of ionisable sites requires

$$c_{HA}^{\text{total}} = c_{HA^+} + c_A \quad (4.34)$$

Solution electroneutrality in the presence of a strong base and/or acid like NaOH or HCl is

$$\sum_i z_i c_i = c_{Na^+} + c_{HA^+} + c_{H^+} - c_{Cl^-} - c_{OH^-} = 0 \quad (4.35)$$

where z_i is the valence of species i and c_i is its concentration.

The degree of ionisation

$$\alpha = \frac{c_{\text{HA}^+}}{c_{\text{HA}}^{\text{total}}} \quad (4.36)$$

combined with eq 4.34 provides

$$\frac{c_{\text{A}}}{c_{\text{HA}}^{\text{total}}} = 1 - \alpha \quad (4.37)$$

The pH is as eq 4.20 in which we assume an activity $\gamma_{\text{H}^+} = 1$. Therefore, with $\text{p}K_{\text{a}} = -\log_{10} K_{\text{a}}$ eq 4.32 combined with eqs 4.36 and 4.37 provides

$$\text{p}K_{\text{a}} = \text{pH} - \log_{10} \frac{1 - \alpha}{\alpha} \quad (4.38)$$

Differentiating the last equation we have

$$\frac{\text{d}\text{p}K_{\text{a}}}{\text{d}\text{pH}} = 1 + \frac{1}{\ln 10} \cdot \frac{1}{\alpha(1 - \alpha)} \cdot \frac{\text{d}\alpha}{\text{d}\text{pH}} \quad (4.39)$$

While eq 4.36 and eq 4.20 provide

$$\text{d}\alpha = \frac{\text{d}c_{\text{HA}^+}}{c_{\text{HA}}^{\text{total}}} \quad \text{and} \quad \text{d}\text{pH} = -\frac{1}{c_{\text{H}^+}} \cdot \frac{\text{d}c_{\text{H}^+}}{\ln 10} \quad (4.40)$$

Taking into account that the strong base and/or acid are entirely dissociated such that

$$\frac{dc_{\text{Na}^+}}{dc_{\text{H}^+}} = \frac{dc_{\text{Cl}^-}}{dc_{\text{H}^+}} = 0 \quad (4.41)$$

we find by differentiating electroneutrality eq 4.35 with respect to c_{H^+} that

$$\frac{dc_{\text{OH}^-} - dc_{\text{HA}^+}}{dc_{\text{H}^+}} = 1 \quad (4.42)$$

Differentiating water dissociation eq 4.33 similarly provides

$$\frac{dc_{\text{OH}^-}}{dc_{\text{H}^+}} = -\frac{c_{\text{OH}^-}}{c_{\text{H}^+}} \quad (4.43)$$

Inserting equations 4.40 to 4.43 into equation 4.39 results in

$$\begin{aligned} \frac{dpK_a}{dpH} &= 1 + \frac{1}{\alpha(1-\alpha)} \frac{c_{\text{H}^+}}{c_{\text{HA}}^{\text{total}}} \left(1 + \frac{c_{\text{OH}^-}}{c_{\text{H}^+}} \right) \\ &= 1 + \frac{1}{\alpha(1-\alpha)} \frac{c_{\text{H}^+} + c_{\text{OH}^-}}{c_{\text{HA}}^{\text{total}}} \end{aligned} \quad (4.44)$$

where use of eq 4.34, 4.36 and 4.37, reveals

$$\begin{aligned}
\frac{dpK_a}{dpH} &= 1 + \frac{c_{HA}^{\text{total}} c_{H^+}}{c_{HA^+} c_A} \left(1 + \frac{c_{OH^-}}{c_{H^+}} \right) \\
&= 1 + (c_{H^+} + c_{OH^-}) \left(\frac{1}{c_{HA^+}} + \frac{1}{c_A} \right)
\end{aligned}
\tag{4.45}$$

Finally we find that

$$\frac{dpK_a}{dpH} \cong 1
\tag{4.46}$$

if

$$(c_{H^+} + c_{OH^-}) \left(\frac{1}{c_{HA^+}} + \frac{1}{c_A} \right) \ll 1
\tag{4.47}$$

CHAPITRE 5 - TRANSFERT DE PROTONS DU CHITOSANE

5.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons émis l'hypothèse que la variation de la constante de dissociation du chitosane et du glycérol-phosphate en fonction de la température permet un échange de protons qui entraîne une réduction de l'énergie électrostatique du polyélectrolyte et permet aux interactions hydrophobiques de faire précipiter le macroion. Dans ce chapitre, nous investiguons cette hypothèse et nos objectifs sont : 1) d'obtenir une condition théorique pour qu'une élévation de la température induise une diminution du degré d'ionisation du chitosane lorsqu'il est mélangé avec un électrolyte faible et 2) de vérifier expérimentalement la diminution du degré d'ionisation suite à une augmentation de la température. Des objectifs importants découlant de ces deux objectifs principaux sont de déterminer les conditions nécessaires pour avoir un transfert de charges efficace et de décrire qualitativement la séquence de séparation de phase de divers mélanges en ce qui a trait à leur température critique.

Dans la partie théorique, nous déterminons, à l'aide des équations acide-base, que la variation du degré d'ionisation en fonction de la température, $\frac{\partial \alpha}{\partial T}$, d'un polyélectrolyte mélangé avec un électrolyte simple, est directement proportionnelle à la différence des variations des pK_a en fonction de la température du polyélectrolyte et de l'électrolyte,

$\frac{\partial pK_{ap}}{\partial T} - \frac{\partial pK_a}{\partial T}$. De plus, cette condition sur les pK_{ap} et pK_a donne le signe de la variation du degré d'ionisation α .

Dans la partie expérimentale, nous montrons que le degré d'ionisation du glycérol-phosphate change considérablement lorsqu'il est mélangé au chitosane. La démonstration de ce changement du degré d'ionisation se fait par l'utilisation de deux techniques différentes. La première se fait à l'aide du déplacement chimique du signal obtenu par résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore. Les méthodes de titrage par RMN sont bien documentées (Consonni, Arosio, Belloni, Fogolari, Fusi, Shehi et al. 2003, Malon, Wagner, Bulska et Maj-Zurawska 2002) et l'utilisation d'une telle technique permet de connaître la valeur du degré d'ionisation du GP à l'aide de références obtenues par des courbes de titrage à différentes températures. La valeur du déplacement chimique du glycérol-phosphate peut donc être déterminée à une température donnée. Nous faisons toutefois l'approximation que la valeur du déplacement chimique n'est pas influencée par la présence du chitosane en solution. La deuxième technique utilise les mesures de pH en fonction de la température. La diminution du pH implique un changement du degré d'ionisation du glycérol-phosphate qui peut être déterminé par la connaissance de la valeur de sa constante d'ionisation en fonction de la température.

5.2 Théorie

5.2.1 Variation du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température

Pour déterminer une condition qui implique une réduction du degré d'ionisation du chitosane et du glycérol-phosphate lors d'une élévation de la température, nous utilisons les trois types d'équations qui permettent de résoudre les systèmes impliquant les électrolytes (ou polyélectrolytes) faibles. Ces trois types d'équations sont les équations de dissociations, de conservation d'espèces chimiques et d'électroneutralité.

Tel que nous avons vu au Chapitre 1, seul le monomère de glucosamine du chitosane est impliqué dans la dissociation avec le proton de l'eau. Nous faisons donc abstraction du monomère *N*-acétyl-glucosamine et nous n'incluons pas le terme f_D dans les calculs. Nous écrivons GlcNH_2 lorsque nous parlons du glucosamine sous sa forme neutre et GlcNH_3^+ pour le glucosamine sous sa forme ionisée. L'emploi de Glc seul implique tous les monomères de glucosamines (neutres et ionisés). De même, pour le glycérol-phosphate, nous utilisons la notation suivante : GPO_4^{2-} pour l'ion divalent, GPO_4^- pour l'ion monovalent et GPO_4 pour la forme neutre. L'emploi de GP seul implique toutes les espèces du glycérol-phosphate (neutre, monovalent et divalent). Nous restreignons le problème au cas du mélange du chitosane dissout dans du HCl et mélangé avec le disodium glycérol-phosphate. Nous établissons deux contraintes aux mélanges, c'est-à-dire 1) que le système présente des valeurs de pH variant entre 5 et 8 et 2) que les concentrations respectives du monomère glucosamine du chitosane et du glycérol-phosphate soient supérieures à une millimole. Notons que les mesures de pH et les

concentrations du monomère glucosamine du chitosane et du glycérol-phosphate correspondent aux mélanges couramment utilisés.

Les équations de dissociation (premier type d'équation) du glucosamine et du glycérol-phosphate sont

$$K_{ap}^{Glc} = \frac{c_{H^+} c_{GlcNH_2}}{c_{GlcNH_3^+}} \quad (5.1)$$

$$K_{a1}^{GP} = \frac{c_{H^+} c_{GPO_4^-}}{c_{GPO_4}} \quad (5.2)$$

$$K_{a2}^{GP} = \frac{c_{H^+} c_{GPO_4^{2-}}}{c_{GPO_4^-}} \quad (5.3)$$

La valeur de la constante K_{ap}^{Glc} a été caractérisée dans le Chapitre 4 en fonction de la température, de la fraction de déacétylation (f_D) et de la force ionique (I_c). En ce qui concerne les deux valeurs de K_a du GP, la valeur de K_{a2} a également été caractérisée au Chapitre 4. Quant à sa valeur K_{a1} , la littérature nous donne des valeurs variant entre 1.3 et 2.3. En utilisant ces valeurs de K_{a1} et la contrainte appliquée aux valeurs de pH, ceci implique que selon l'équation 5.2

$$\frac{K_{a1}^{GP}}{c_{H^+}} = \frac{c_{GPO_4^-}}{c_{GPO_4}} \geq \frac{10^{-1.3}}{10^{-5}} \cong 500 \quad (5.4)$$

La concentration de GPO_4 est donc négligeable devant celle du GPO_4^- et l'équation de conservation des espèces chimiques (deuxième type d'équation) du GP nous donne

$$c_{GP} \cong c_{GPO_4^-} + c_{GPO_4^{2-}} \quad (5.5)$$

La conservation des espèces chimiques du Glc nous donne

$$c_{Glc} = c_{GlcNH_2} + c_{GlcNH_3^+} \quad (5.6)$$

L'équation d'électroneutralité (troisième type d'équation) de ce système nous donne

$$c_{Na^+} + c_{GlcNH_3^+} - c_{Cl^-} - c_{GPO_4^-} - 2c_{GPO_4^{2-}} = 0 \quad (5.7)$$

Il est à noter que les concentrations des ions H^+ et OH^- ont été négligées dans cette équation. En effet, la première contrainte que le pH soit entre 5 et 8 implique que leur concentration (H^+ et OH^-) est inférieure à 10^{-5} M tandis la deuxième contrainte, soit que la concentration de Glc et GP atteigne au moins 1 mM impose que la concentration des espèces ioniques impliquées dans l'équation 5.7 soit supérieure à 10^{-3} M.

Dans un premier temps, nous cherchons à déterminer la valeur du degré d'ionisation du chitosane en fonction de quantités définies par la composition du mélange, soient les concentrations de chitosane, de glycérol-phosphate, des ions de sodium et des ions chlorure, ainsi que les constantes de dissociation du chitosane et du glycérol-phosphate. Afin de résoudre le système composé des cinq équations 5.1, 5.3, 5.5, 5.6 et 5.7 et des cinq inconnues c_{H^+} , c_{GlcNH_2} , $c_{GlcNH_3^+}$, $c_{GPO_4^-}$ et $c_{GPO_4^{2-}}$, nous définissons deux variables α et χ et deux paramètres, β et γ , respectivement

$$\alpha = \frac{c_{GlcNH_3^+}}{c_{Glc}}, \chi = \frac{c_{GPO_4^{2-}}}{c_{GP}}, \beta = \frac{c_{GP}}{c_{Glc}} \text{ et } \gamma = \frac{c_{Na^+} - c_{Cl^-}}{c_{Glc}} \quad (5.8)$$

Parmi les deux variables, notons que α représente le degré d'ionisation du chitosane (plus spécifiquement du monomère de glucosamine) déjà défini au Chapitre 4. Quant à la variable χ , elle représente la fraction de glycérol-phosphate sous sa forme bivalente. Les valeurs β et γ sont des paramètres constants puisque c_{GP} et c_{Glc} sont des concentrations totales et les concentrations des ions Na^+ et Cl^- demeurent constantes puisque leur dissociation est complète.

En utilisant les équations 5.5 et 5.7, et en divisant par c_{GP} , on obtient la relation suivante, qui exprime l'électroneutralité

$$\alpha + \gamma = \beta(1 + \chi) \quad (5.9)$$

Puisque α et χ sont des variables variant entre 0 et 1 et que β est nécessairement positif, l'équation 5.9 implique les conditions suivantes sur la valeur de γ

$$\beta - 1 < \gamma < 2\beta \quad (5.10)$$

Nous allons maintenant remplacer la variable χ par une fonction de K_a^{Glc} , K_{a2}^{GP} et α .
 Tout d'abord, en utilisant les équations de conservation des espèces chimiques 5.5 et 5.6 et les paramètres définis en 5.8, les équations de dissociation 5.1 et 5.3 peuvent s'écrire

$$K_{\text{ap}}^{\text{Glc}} = \frac{c_{\text{H}^+}(1-\alpha)}{\alpha} \quad (5.11)$$

$$K_{a2}^{\text{GP}} = \frac{c_{\text{H}^+}\chi}{1-\chi} \quad (5.12)$$

On a donc éliminé les inconnues c_{GlcNH_2} et $c_{\text{GPO}_4^-}$.

On pose

$$R = \frac{K_a^{\text{Glc}}}{K_a^{\text{GP}}} \quad (5.13)$$

En divisant l'équation 5.11 avec les équations 5.12 et 5.13, on élimine l'inconnue c_{H^+} et on obtient

$$\begin{aligned}
 \frac{(1-\chi)(1-\alpha)}{\chi\alpha} &= R \\
 \Leftrightarrow \\
 \frac{1}{\chi} &= \frac{\alpha R}{(1-\alpha)} + 1 \\
 \Leftrightarrow \\
 \chi + 1 &= \frac{2(1-\alpha) + \alpha R}{(1-\alpha) + \alpha R}
 \end{aligned} \tag{5.14}$$

Le terme $\chi + 1$ peut maintenant être substitué dans l'équation 5.9 en utilisant l'équation 5.14 précédente. On élimine ainsi l'inconnue $c_{GPO_4^{2-}}$ et on peut obtenir une équation du second degré impliquant seulement l'inconnue α

$$\begin{aligned}
 \alpha + \gamma &= \beta \frac{2(1-\alpha) + \alpha R}{(1-\alpha) + \alpha R} \\
 \Leftrightarrow \\
 \alpha - \alpha^2 + \alpha^2 R + \gamma - \alpha\gamma + \alpha\gamma R &= 2\beta - 2\alpha\beta + \alpha\beta R \\
 \Leftrightarrow \\
 \alpha^2 (R-1) + \alpha (2\beta - \gamma + 1 + R(\gamma - \beta)) - (2\beta - \gamma + 1 - 1) &= 0
 \end{aligned} \tag{5.15}$$

Dans le but de simplifier les prochains calculs, nous posons deux nouveaux paramètres

$$A = 2\beta - \gamma + 1 \quad (5.16)$$

$$B = \gamma - \beta \quad (5.17)$$

Le choix de ces paramètres A et B est brièvement examiné dans la discussion. L'équation 5.15 devient donc

$$\alpha^2 (R-1) + \alpha (A + B \cdot R) - (A-1) = 0 \quad (5.18)$$

On trouve, avec cette dernière équation (5.18), que la valeur de α est donnée par

$$\alpha = \frac{-(A + B \cdot R) \pm \sqrt{(A + B \cdot R)^2 + 4(R-1)(A-1)}}{2(R-1)} \quad (5.19)$$

Afin de déterminer une valeur unique pour α , nous devons connaître le signe de l'équation 5.19 nous donnant une valeur de α physiquement possible. Notons d'abord que A et B sont des paramètres constants puisqu'ils sont des fonctions de β et γ . Les conditions sur la valeur de γ (eq 5.10) impliquent que

$$1 < A < \beta + 2 \quad (5.20)$$

$$-1 < B < \beta \quad (5.21)$$

Et puisque $A + B = \beta + 1$ nous avons également la condition

$$A + B > 1 \quad (5.22)$$

On peut montrer que selon la condition 5.22, le terme sous la racine de l'équation 5.19 est toujours positif. En effet, on peut réécrire ce terme comme

$$\begin{aligned} (A + B \cdot R)^2 + 4(R - 1)(A - 1) &= A^2 + 2A \cdot B \cdot R + B^2 R^2 + 4A \cdot R - 4A - 4R + 4 \\ &= (A - 2)^2 + B^2 R^2 + 2R(A \cdot B + 2A - 2) \\ &= (A - 2 + B \cdot R)^2 - 2(A - 2)B \cdot R \\ &\quad + 2R(A \cdot B + 2A - 2) \\ &= (A - 2 + B \cdot R)^2 + 4R(A + B - 1) > 0 \end{aligned} \quad (5.23)$$

À partir de l'équation 5.18 et de la condition $A > 1$ (eq 5.20) et $\alpha > 0$, on a que

$$\alpha(R - 1) + (A + B \cdot R) > 0 \quad (5.24)$$

Selon cette dernière équation, on remarque que si $R < 1$, on a que $(A + B \cdot R)$ est nécessairement plus grand que 0 et donc plus grand que $\alpha(1 - R)$. Ainsi, en examinant l'équation 5.19, on constate qu'on doit conserver la racine positive puisqu'on ne respecte pas la condition 5.24 si on garde la racine négative. De plus, si $R > 1$, on sait que la racine de l'équation 5.19 est plus grande que $A + B \cdot R$ (puisque $A > 1$) et il est

facile de voir que l'on doit toujours garder la racine positive pour obtenir une valeur de $\alpha > 0$. La valeur de α est donc donnée en utilisant la racine positive de l'équation 5.19.

Dans un deuxième temps, nous cherchons la dérivée partielle de la fonction 5.19 par rapport à la température T . Puisque cette équation contient plusieurs termes, nous ferons cette différentiation en plusieurs étapes.

On pose d'abord

$$x = A + BR \quad (5.25)$$

$$\begin{aligned} y &= (A + B \cdot R)^2 + 4(R - 1)(A - 1) \\ &= (A - 2)^2 + B^2 R^2 + 2(AB + 2A - 2)R \end{aligned} \quad (5.26)$$

$$z = (R - 1) \quad (5.27)$$

On a alors

$$\alpha = \frac{-x + \sqrt{y}}{2z} \quad (5.28)$$

La dérivée partielle de cette dernière équation par rapport à la température donne

$$\begin{aligned}
\frac{\partial \alpha}{\partial T} &= \frac{1}{2z^2} \left(-z \frac{\partial x}{\partial T} + \frac{z}{2\sqrt{y}} \frac{\partial y}{\partial T} + (x - \sqrt{y}) \frac{\partial z}{\partial T} \right) \\
&= \frac{1}{2z^2 \sqrt{y}} \left(-z \sqrt{y} \frac{\partial x}{\partial T} + \frac{z}{2} \frac{\partial y}{\partial T} + (x \sqrt{y} - y) \frac{\partial z}{\partial T} \right) \\
&= \frac{1}{2z^2 \sqrt{y}} \left(\sqrt{y} \left(x \frac{\partial z}{\partial T} - z \frac{\partial x}{\partial T} \right) + \frac{z}{2} \frac{\partial y}{\partial T} - y \frac{\partial z}{\partial T} \right)
\end{aligned} \tag{5.29}$$

Pour les dérivées de x , y et z , on a

$$\frac{\partial x}{\partial T} = B \cdot \frac{\partial R}{\partial T} \tag{5.30}$$

$$\frac{\partial y}{\partial T} = 2(B^2 R + AB + 2A - 2) \frac{\partial R}{\partial T} \tag{5.31}$$

$$\frac{\partial z}{\partial T} = \frac{\partial R}{\partial T} \tag{5.32}$$

En utilisant les équations 5.25, 5.27, 5.30 et 5.32, le terme impliquant les dérivées de x et z dans l'équation 5.29 nous donne

$$\begin{aligned}
x \frac{\partial z}{\partial T} - z \frac{\partial x}{\partial T} &= (A + B \cdot R) \frac{\partial R}{\partial T} - (R - 1) B \frac{\partial R}{\partial T} \\
&= (A + B) \frac{\partial R}{\partial T}
\end{aligned} \tag{5.33}$$

En utilisant les équations 5.26, 5.27, 5.31 et 5.32, le terme impliquant les dérivées de y et z dans l'équation 5.29 nous donne

$$\begin{aligned}
 \frac{z}{2} \frac{\partial y}{\partial T} - y \frac{\partial z}{\partial T} &= (R-1)(B^2R + AB + 2A - 2) \frac{\partial R}{\partial T} \\
 &\quad - \left((A-2)^2 + B^2R^2 + 2(AB + 2A - 2)R \right) \frac{\partial R}{\partial T} \\
 &= \left(\begin{aligned} &B^2R^2 + ABR + 2AR - 2R - B^2R - AB - 2A + 2 \\ &-A^2 + 4A - 4 - B^2R^2 - 2ABR - 4AR + 4R \end{aligned} \right) \frac{\partial R}{\partial T} \\
 &= - \left(R(B^2 + AB + 2A - 2) + A^2 + AB - 2A + 2 \right) \frac{\partial R}{\partial T}
 \end{aligned} \tag{5.34}$$

On pose le coefficient de $-\frac{\partial R}{\partial T}$ du membre droit de cette dernière équation égale à f .

On peut réécrire ce terme comme

$$\begin{aligned}
 f &= (A^2 + AB - 2A + 2) + R(B^2 + AB + 2A - 2) \\
 &= (A + B - 1)(A - 1) + (B + 1) \\
 &\quad + R(A + B - 1)(B + 1) + R(A - 1) \\
 &= (A - 1)[(A + B) + (R - 1)] + (B + 1)[R(A + B) - (R - 1)]
 \end{aligned} \tag{5.35}$$

À partir de l'équation 5.29 et des relations 5.33, 5.34 et 5.35 on a que la dérivée de α par rapport à la température T est donnée par

$$\frac{\partial \alpha}{\partial T} = \frac{1}{2z^2\sqrt{y}} \left((A + B)\sqrt{y} - f \right) \frac{\partial R}{\partial T} \tag{5.36}$$

D'autre part, on a que

$$-\log R = -\log \frac{K_{ap}^{\text{Glc}}}{K_{a2}^{\text{GP}}} = \text{p}K_{ap}^{\text{Glc}} - \text{p}K_{a2}^{\text{GP}} \quad (5.37)$$

$$\frac{\partial(-\log R)}{\partial T} = -\frac{1}{\ln 10 R} \frac{\partial R}{\partial T} \quad (5.38)$$

À partir de cette relation, on peut réécrire l'équation 5.36 pour obtenir

$$\frac{\partial \alpha}{\partial T} = \frac{\ln 10 K_a^{\text{Glc}}}{2z^2 \sqrt{y} K_{a2}^{\text{GP}}} \left(f - (A+B)\sqrt{y} \right) \left(\frac{\partial \text{p}K_a^{\text{Glc}}}{\partial T} - \frac{\partial \text{p}K_{a2}^{\text{GP}}}{\partial T} \right) \quad (5.39)$$

Afin d'obtenir une réduction du degré d'ionisation du monomère de glucosamine du chitosane, nous devons déterminer la condition pour que $\frac{\partial \alpha}{\partial T} < 0$. Nous chercherons d'abord à déterminer le signe du coefficient devant la différence de variation des $\text{p}K_a$ avec la température de l'équation 5.39. Nous avons déjà montré que y est positif avec l'équation 5.23, nous voulons maintenant savoir si $f - (A+B)\sqrt{y} > 0$. Cela est équivalent à montrer que $f^2 - (A+B)^2 y > 0$ puisque $(A+B)\sqrt{y} > 0$ (voir la condition 5.22). Nous avons donc pour f^2 , à partir de 5.35, que

$$\begin{aligned}
f^2 &= (A-1)^2 [(A+B)+(R-1)]^2 \\
&\quad + 2(A-1)(B+1) [(A+B)+(R-1)] [R(A+B)-(R-1)] \\
&\quad + (B+1)^2 [R(A+B)-(R-1)]^2 \\
&= (A-1)^2 [(A+B)^2 + 2(A+B)(R-1) + (R-1)^2] \\
&\quad + 2(A-1)(B+1) \left[\begin{array}{l} R(A+B)^2 - (R-1)(A+B) \\ + R(R-1)(A+B) + (R-1)^2 \end{array} \right] \\
&\quad + (B+1)^2 [R^2(A+B)^2 - 2R(A+B)(R-1) + (R-1)^2] \\
&= (A-1)^2 [(A+B)^2 + 2(A+B)(R-1) + (R-1)^2] \\
&\quad + 2(A-1)(B+1) [R(A+B)^2 + (A+B-1)(R-1)^2] \\
&\quad + (B+1)^2 [R^2(A+B)^2 - 2R(A+B)(R-1) + (R-1)^2] \\
&= (A+B)^2 [(A-1)^2 + 2R(A-1)(B+1) + R^2(B+1)^2] \\
&\quad + (R-1)^2 [(A-1)^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B-1) + (B+1)^2] \\
&\quad + 2(A+B)(R-1) [(A-1)^2 - R(B+1)^2] \tag{5.40} \\
&= (A+B)^2 [(A-1) + R(B+1)]^2 \\
&\quad + (R-1)^2 [((A-1) - (B+1))^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B)] \\
&\quad + 2(A+B)(R-1) [(A-1)^2 - R(B+1)^2]
\end{aligned}$$

On a maintenant que

$$\begin{aligned}
f^2 - (A+B)^2 y &= (A+B)^2 [(A-1) + R(B+1)]^2 \\
&\quad + (R-1)^2 [((A-1) - (B+1))^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B)] \\
&\quad + 2(A+B)(R-1)(A-1)^2 \\
&\quad - 2R(A+B)(R-1)(B+1)^2 \\
&\quad - (A+B)^2 [(A+B \cdot R)^2 + 4(R-1)(A-1)] \\
\\
&= (A+B)^2 [((A+RB) + (R-1))^2 - (A+RB)^2] \\
&\quad + (R-1)^2 [((A-1) - (B+1))^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B)] \\
&\quad + (R-1)(A-1)(A+B)[2(A-1) - 4(A+B)] \\
&\quad - 2R(A+B)(R-1)(B+1)^2 \\
\\
&= (A+B)^2 [2(A+RB)(R-1) + (R-1)^2] \\
&\quad + (R-1)^2 [((A-1) - (B+1))^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B)] \\
&\quad - 2(R-1)(A-1)(A+B)(A+2B+1) \\
&\quad - 2R(A+B)(R-1)(B+1)^2 \\
\\
&= 2(R-1)(A+B) [(A+RB)(A+B) - (A-1)(A+2B+1) - R(B+1)^2] \\
&\quad + (R-1)^2 [((A-1) - (B+1))^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B) + (A+B)^2] \\
\\
&= 2(R-1)(A+B) \left[\begin{aligned} &(A^2 + RAB + AB + RB^2) - (A^2 + 2AB - 2B - 1) \\ &- R(B^2 + 2B + 1) \end{aligned} \right] \\
&\quad + (R-1)^2 [((A-1) - (B+1))^2 + (A+B)^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B)]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= 2(R-1)(A+B) \left[RAB - (AB - 2B - 1) - R(2B+1) \right] \\
&\quad + (R-1)^2 \left[((A-1) - (B+1))^2 + (A+B)^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B) \right] \\
&= 2(R-1)^2 (A+B)(AB - 2B - 1) \\
&\quad + (R-1)^2 \left[(A-1)^2 - 2(A-1)(B+1) + (B+1)^2 \right. \\
&\quad \left. + (A+B)^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B) \right] \\
&= 2(R-1)^2 (A+B) \left[(AB + A - B - 1) - (A+B) \right] \\
&\quad + (R-1)^2 \left[(A-1)^2 - 2(A-1)(B+1) + (B+1)^2 \right. \\
&\quad \left. + (A+B)^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B) \right] \\
&= 2(R-1)^2 (A-1)(B+1)(A+B) \\
&\quad + (R-1)^2 \left[(A-1)^2 - 2(A-1)(B+1) + (B+1)^2 - 2(A+B)^2 \right. \\
&\quad \left. + (A+B)^2 + 2(A-1)(B+1)(A+B) \right] \\
&= (R-1)^2 \left[(A-1)^2 - 2(A-1)(B+1) + (B+1)^2 - (A+B)^2 \right. \\
&\quad \left. + 4(A-1)(B+1)(A+B) \right] \\
&= (R-1)^2 \left[[(A-1) - (B+1)]^2 - (A+B)^2 \right. \\
&\quad \left. + 4(A-1)(B+1)(A+B) \right] \\
&= (R-1)^2 \left[[A - B - 2]^2 - (A+B)^2 \right. \\
&\quad \left. + 4(A-1)(B+1)(A+B) \right]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= (R-1)^2 \left[\frac{[(A-B-2)+(A+B)][(A-B-2)-(A+B)]}{+4(A-1)(B+1)(A+B)} \right] \\
&= (R-1)^2 \left[\frac{(2A-2)(-2B-2)}{+4(A-1)(B+1)(A+B)} \right] \\
&= 4(R-1)^2 (A-1)(B+1)(A+B-1)
\end{aligned}$$

Ainsi,

$$f > (A+B)\sqrt{y} > 0 \quad (5.41)$$

Et la condition équivalente à $\frac{\partial \alpha}{\partial T} < 0$ devient

$$\left(\frac{\partial p K_{ap}^{\text{Glc}}}{\partial T} - \frac{\partial p K_{a2}^{\text{GP}}}{\partial T} \right) < 0 \quad (5.42)$$

puisque $\frac{\ln 10 K_a^{\text{Glc}}}{2z^2 \sqrt{y} K_{a2}^{\text{GP}}} (f - (A+B)\sqrt{y}) > 0$.

5.2.2 Détermination théorique du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température et détermination de la température de séparation de phase

À la section précédente, nous avons montré une équation pour déterminer la valeur de α en fonction de 2 paramètres A et B (eq 5.19) ainsi que de $R = \frac{K_{\text{ap}}^{\text{Glc}}}{K_{\text{a}}^{\text{GP}}}$ (eq 5.13). Or, parmi ces paramètres, seuls A et B sont fixes sous toutes conditions alors que $K_{\text{a2}}^{\text{GP}}$ et $K_{\text{ap}}^{\text{Glc}}$ sont des fonctions de la température T . Cependant, nous pouvons approximativement poser $K_{\text{a2}}^{\text{GP}}$ comme une constante qui ne varie pas en fonction de la température, tel que décrit au Chapitre 4 (voir la section 4.5.1 et la Figure 4.4). De plus, dans le même chapitre, nous avons démontré que la variation du $\text{p}K_{\text{ap}}^{\text{Glc}}$ est approximativement linéaire en fonction de α et de la température. Nous utiliserons donc la forme de $\text{p}K_{\text{ap}}^{\text{Glc}}$ proposée

$$\text{p}K_{\text{ap}}^{\text{Glc}} = \text{p}K_0(T_{\text{ref}}) - C_T(T - T_{\text{ref}}) - C_{\text{Ic}}(I_{\text{c}}, f_{\text{D}})\alpha \quad (5.43)$$

En utilisant l'équation 5.19, les valeurs des paramètres A et B correspondant à un mélange donné, la définition de R dans laquelle on remplace $\text{p}K_{\text{ap}}^{\text{Glc}}$ par l'équation 5.43 et une valeur de $10^{-6.2}$ comme valeur de $K_{\text{a2}}^{\text{GP}}$ (voir la section 4.5.1), on peut déterminer la valeur de α théorique à une température donnée ou déterminer la valeur de T à une valeur de α_{ps} donnée en ayant les valeurs de $\text{p}K_0(T_{\text{ref}})$, C_T et C_{Ic} .

5.2.3 Détermination des paramètres de l'équation simplifiée (eq 5.43) du pK_{ap} du chitosane

On peut procéder à un ajustement des paramètres $pK_0(T_{ref})$, C_T et C_{lc} (eq 5.43) en utilisant les données expérimentales du degré d'ionisation α en fonction de la température T . Ces valeurs expérimentales du degré d'ionisation α_{ex} sont déterminées à partir des valeurs expérimentales de χ (voir les prochaines sections 5.4.2 et 5.4.3) et de l'équation 5.9 pour les valeurs de β et γ déterminées. On utilise trois valeurs initiales pour $pK_0(T_{ref})$, C_T et C_{lc} avec lesquelles on utilise la technique présentée à la section précédente (Section 5.2.2) pour déterminer une valeur théorique du degré d'ionisation α_{th} à la température testée via l'équation 5.19. On modifie ensuite les valeurs des paramètres $pK_0(T_{ref})$, C_T et C_{lc} pour minimiser la fonction σ_α suivante

$$\sigma_\alpha = \sum_i (\alpha_{th}^i - \alpha_{ex}^i)^2 \quad (5.44)$$

La fonction *fsolve* de MatLab permet d'optimiser simultanément ces trois paramètres $pK_0(T_{ref})$, C_T et C_{lc} .

5.2.4 Relation entre le déplacement chimique du phosphore et le degré d'ionisation du glycérol-phosphate

La technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de déterminer la fréquence de résonance d'un atome. Dans le cas du phosphore, sa fréquence de

résonance est de 161,826 MHz. Cette fréquence est légèrement modifiée en fonction de l'environnement chimique de l'atome. En RMN unidimensionnelle, on détermine le déplacement chimique de cette fréquence de résonance généralement exprimée en ppm (partie par million) qui est donné par la formule suivante

$$\delta_c = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} 10^6 \quad (5.45)$$

Où ν_0 correspond à la fréquence de résonance de la référence, ici 161,826 MHz. La caractérisation du déplacement chimique du phosphore par la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de quantifier le degré d'ionisation du glycérol-phosphate. En effet, la mesure du déplacement chimique est une mesure moyenne de l'environnement chimique du phosphore. Comme celui-ci est différent sous sa forme divalente en comparaison à sa forme monovalente, il en résulte un déplacement chimique différent. Ainsi, lorsque tout le GP est sous la forme divalente, on aura un déplacement chimique caractérisant sa forme basique, noté δ_b , tandis que lorsque le GP sera sous la forme monovalente, on notera ce déplacement chimique δ_a . On observera que $\delta_b > \delta_a$ et la fraction de GP sous la forme divalente sera donnée par

$$\chi = \frac{\delta_c - \delta_a}{\delta_b - \delta_a} \quad (5.46)$$

Afin de déterminer précisément les deux valeurs δ_a et δ_b dépendantes de la température, nous effectuons des titrages du GP à différentes températures en mesurant le pH de la solution et le déplacement chimique δ_C du phosphore. Nous pourrions ensuite déterminer les trois valeurs pK_{a2}^{GP} , δ_a et δ_b qui ajustent le mieux les valeurs de δ_C et de pH déterminées expérimentalement pour chaque température à l'aide de la relation suivante (déterminée à partir des équations 5.12 et 5.46)

$$pH = pK_{a2}^{GP} + \log \left(\frac{\delta_C - \delta_a}{\delta_b - \delta_C} \right) \quad (5.47)$$

Cette dernière équation est valide pour le cas d'une solution idéale en supposant le coefficient d'activité du proton $\gamma_{H^+} = 1$.

5.3 Méthodologie expérimentale

La variation du degré d'ionisation du chitosane est montrée par deux techniques soient la mesure du degré d'ionisation de glycérol-phosphate par résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore et la mesure du pH en fonction de la température avec le système de titrage décrit au chapitre 4. Pour chacune de ces deux techniques, on utilise les mêmes solutions. La RMN exige cependant la préparation de solutions de glycérol-phosphate qu'on utilise pour déterminer les valeurs de δ_a et δ_b . Ces solutions sont préparées par deux méthodes différentes. Ces deux méthodes permettent de déterminer

que de faibles variations de concentration de GP n'ont pas d'influence sur les valeurs de δ_a et δ_b .

5.3.1 Préparation des solutions de glycérol-phosphate

(Méthode 1, $n = 1$) : On dissout 0,594 g de disodium glycérol-phosphate (Sigma, No. Cat. G-9891, 297 g/mol incluant 4.5 moles H_2O par mole de GP) dans 18 mL H_2O et 2 mL D_2O (Aldrich, No. Cat. 15,188-2-250G) dans un cylindre gradué. La présence de D_2O dans les échantillons permet à l'appareil d'obtenir une mesure de la fréquence de résonance de ce solvant sur un canal indépendant. La fréquence de résonance du D_2O est loin de la référence de résonance du phosphore et permet à l'appareil de stabiliser la valeur du champ magnétique (qui est d'environ 9,4 T). Le mélange équivaut à une concentration c_{GP} de 100 mM $\left(\frac{0.594 \text{ g}}{297 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{0,018 \text{ L} + 0,002 \text{ L}} = 100 \text{ mM} \right)$. Un total de 11 solutions avec différents degrés d'ionisation χ_{GP} sont préparées à partir de cette solution de base. Nous prélevons d'abord 0,75 mL de la solution de base pour tester son déplacement chimique à la RMN et 0,75 mL pour mesurer le pH (pH mètre Accumet, model 20 et l'électrode 9803BN d'Orion). Nous ajoutons le volume V_{HCl} de concentration 1,008 M indiqué dans le Tableau 5.1 à la solution de base puis nous prélevons 2 nouvelles aliquotes de 0,75 mL pour les mêmes tests. Cette procédure est répétée pour les 9 autres solutions à tester. Le calcul de c_{GP} supposé se fait à partir de l'équation 5.9 en posant $\alpha = 0$ (puisque'il n'y a pas de chitosane). On trouve alors

$$\chi = \frac{\gamma}{\beta} - 1 = \frac{c_{\text{Na}^+} - c_{\text{Cl}^-}}{c_{\text{GP}}} - 1 = 1 - \frac{c_{\text{Cl}^-}}{c_{\text{GP}}} \quad (5.48)$$

Tableau 5.1 Titrage du glycérol-phosphate par ajout de HCl 1,008 M.

No. de solution	V_{HCl} à 1,008 M	V_{T}	c_{Cl^-}	c_{GP}	χ_{GP} supposé
	μL	mL		mM	
1a	0	20,00	0,00	100	1,00
1b	18,35	18,52	1,00	99,90	0,99
1c	67,47	17,09	4,98	99,51	0,95
1d	153,9	15,74	14,78	98,53	0,85
1e	278,4	14,52	33,83	96,64	0,65
1f	187,2	13,21	47,64	95,27	0,50
1g	166,0	11,87	61,07	93,94	0,35
1h	193,3	10,56	78,39	92,22	0,15
1i	41,47	9,11	82,63	91,80	0,10
1j	34,64	7,64	86,82	91,39	0,05
1k	27,84	6,17	90,98	90,97	0,00

(Méthode 2, $n = 1$) : Nous préparons initialement une quantité suffisante (220 mL) de mélange H_2O et D_2O (Aldrich, No. Cat. 15,188-2-250G) avec un rapport 220:40 respectivement. Cette solution sera également utilisée pour la préparation des solutions de chitosane et de glycérol-phosphate présentée à la section suivante. Dans 2 fioles jaugées de 5 mL, nous avons déposé 44,55 mg de disodium glycérol-phosphate (Sigma, No. Cat. G-9891) et ajouté environ 3 mL du mélange H_2O - D_2O . Dans une des 2

fioles, nous avons ajouté 145 μL de HCl (Aldrich, 1,037 M) et agité les solutions pour dissoudre la poudre. Nous avons ajusté les volumes de chacune des solutions (solution GP et solution GP-HCl) à 5 mL. Les deux solutions contiennent 30 mM de GP $\left(\frac{44,45 \text{ mg}}{297 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{0,005 \text{ L}} = 30 \text{ mM} \right)$ et la solution de GP-HCl contient également 30 mM de HCl $\left(\frac{0,145 \text{ mL}}{0,005 \text{ L}} \times 1,037 \text{ M} = 30 \text{ mM} \right)$. Nous avons ensuite mélangé ces deux solutions selon les proportions du Tableau 5.2. L'équation 5.48 demeure valide et devient

$$\chi = 1 - \frac{c_{\text{Cl}^-}}{c_{\text{GP}}} = 1 - \frac{V_{\text{GP-HCl}}}{V_{\text{GP}} + V_{\text{GP-HCl}}} \quad (5.49)$$

Tableau 5.2 Titrage du glycérol-phosphate par le mélange de solutions Na_2GP et $\text{Na}_2\text{GP-HCl}$.

No. de solution	c_{GP} mM	$V_{\text{GP-HCl}}$ μL	V_{GP} μL	χ_{GP} supposé
2a	30	0	1000	1,00
2b	30	50	950	0,95
2c	30	500	500	0,50
2d	30	950	50	0,05
2e	30	1000	0	0,00

5.3.2 Tests des solutions de glycérol-phosphate pour la détermination de δ_a et δ_b

Nous avons d'abord mesuré les pH des 12 solutions de glycérol-phosphate titrées à 5, 15, 25 et 37 °C en effectuant un calibrage à chacune de ces températures. Pour les mesures de déplacements chimiques, nous avons utilisé un spectromètre à RMN Varian Mercury 400 MHz. L'échantillon a d'abord été placé dans un tube spécialement conçu pour l'appareil puis déposé à l'intérieur de l'instrument. Une période de 3 minutes a été laissée à l'échantillon pour se stabiliser à la température de 5, 15, 25 ou 37 °C, en fonction du test à effectuer.

La séquence d'acquisition du spectre de RMN débute par une période de préparation de 2 secondes permettant aux noyaux excités d'atteindre leur état d'équilibre. Cette période de préparation est suivie de l'impulsion électromagnétique à une fréquence de 161,826 MHz (fréquence de résonance du ^{31}P) d'une durée de 10 μs . On fait ensuite l'acquisition du signal pendant 0,8 secondes. Cette séquence est répétée 8 fois pour chaque échantillon dans une condition donnée. Après l'acquisition du spectre de résonance, l'appareil nous donne la mesure du déplacement chimique relativement à une fréquence de résonance interne. Cette valeur est calculée en utilisant l'équation 5.45.

5.3.3 Préparation des mélanges de chitosane et de glycérol-phosphate

Nous utilisons pour nos analyses, le chitosane PCCH00022 ($f_D = 0.866$) qui avait été testé au Chapitre 4. Le Tableau 5.3 présente les quantités utilisées pour procéder à la préparation des 4 solutions de mélange de chitosane et de glycérol-phosphate. Le choix

des concentrations de chitosane et de GP a été établi de façon à obtenir des valeurs de β et γ comparables entre elles.

Lorsque le chitosane est conservé dans des conditions atmosphériques stables, la quantification de sa perte à la dessiccation, $L_D = 0.1329$, peut être utilisée comme correction pour le calcul de la masse moléculaire. Le chitosane à notre disposition répondant à ces conditions, on calcule la masse de chitosane de façon à obtenir une concentration finale de monomère de glucosamine $c_c^{g-f} = 30$ mM dans un volume total V_T de 50 mL à partir des équations 1.2 et 1.3 selon

$$m_c^{\text{TPN}} = \frac{[161.1 \cdot f_D + 203.1 \cdot (1 - f_D)] \cdot c_c^{g-f} \cdot V_T}{1 - L_D} \cdot \frac{1}{f_D} \quad (5.50)$$

Tableau 5.3 Solutions de chitosane et de glycérol-phosphate avant le mélange 1:1.

No. de mélange	m_c	c_c^{g-f}	V_{HCl}	c_{HCl}^f	m_{GP}	c_{GP}^f	β^*	γ^*
	mg	mM	mL	mM	mg	mM		
3a	333,05	30	1,446	30	0,4455	30	1,0	1,0
3b	333,05	30	1,157	24	0,4455	30	1,0	1,2
3c	333,05	30	1,446	30	0,5346	36	1,2	1,4
3d	333,05	30	1,736	36	0,5346	36	1,2	1,2

* Les valeurs de β et γ ont été calculées à partir de l'équation 5.8. Il est à noter que dans le calcul de γ , nous devons tenir compte du fait que l'ajout de glycérol-phosphate sous la forme d'un sel disodium libère 2 moles de Na^+ par mole de GP.

Étape 1 : Dans une fiole jaugée de 25 mL, nous ajoutons la masse m_c de chitosane à environ 20 mL du mélange $H_2O_{dd}-D_2O$ puis dispersons la poudre en agitant la solution. Nous ajoutons le volume V_{HCl} de HCl de concentration 1,037 M et complétons le volume jusqu'à la jauge avec le mélange $H_2O_{dd}-D_2O$. Nous ajoutons une barre magnétique pour agiter la solution jusqu'au jour suivant. Le mélange est alors de $2 \times c_c^{g-f}$ et de $2 \times c_{HCl}^f$.

Étape 2 : Dans une fiole jaugée de 25 mL, nous dissolvons la masse m_{GP} de glycérol-phosphate à environ 20 mL du mélange $H_2O_{dd}-D_2O$. Nous agitons la solution jusqu'à dissolution complète puis complétons le volume jusqu'à la jauge avec le mélange $H_2O_{dd}-D_2O$. Le mélange est alors de $2 \times c_{GP}^f$.

Étape 3 : Dans un cylindre gradué de 50 mL, nous ajoutons 20 mL du mélange de chitosane préparé à l'étape 1 puis nous complétons le volume à 40 mL avec la solution de GP préparée à l'étape 2. Les deux solutions sont donc mélangées dans un rapport 1 :1 diluant leur concentration de moitié. Nous ajoutons une barre magnétique et agitons la solution pendant 10 minutes.

5.3.4 Tests de RMN pour la détermination du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température

Nous effectuons les mesures de déplacements chimiques du ^{31}P de la même façon que pour les échantillons de glycérol-phosphate seul (voir section 5.3.2) aux mêmes températures, soient 5, 15, 25 et 37 °C. Pour établir la valeur du degré d'ionisation du

chitosane, nous utilisons la valeur du déplacement chimique δ_c et les valeurs de δ_a et δ_b déterminée à une température donnée (voir la section 5.3.2) pour obtenir χ en utilisant l'équation 5.46. La valeur du degré d'ionisation α est ensuite déterminée par l'équation 5.9 en utilisant les valeurs de β et γ du Tableau 5.3.

5.3.5 Tests de pH pour la détermination du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température et de la température de formation du gel

Nous avons également procédé à l'acquisition du pH et de la transmittance des mêmes solutions en variant la température de 5 à 40 °C. Nous avons utilisé le montage expérimental présenté à la section 4.4.2. Pour les numéros de mélange 3b et 3c nous avons procédé à une seconde acquisition de 5 à 60 °C et de 50 à 80 °C respectivement. En ce qui concerne les mélanges 3a et 3d, nous les avons placés dans le four pasteur aux températures de 85, 90 et 95 °C et avons procédé à une inspection visuelle à un intervalle de temps de 30 minutes entre chacune des températures afin de déterminer si le mélange présente une transition de phase. Les échantillons sont laissés à 95 °C jusqu'au lendemain pour déterminer s'ils présentent une transition de phase suite à une exposition prolongée à 95 °C. Nous utilisons l'équation 5.12 et l'équation 4.20 avec $\gamma_{H^+} = 1$ pour obtenir la valeur de χ à partir des valeurs expérimentales du pH et de la valeur de $K_{a2}^{GP} = 10^{-6.2}$. La valeur du degré d'ionisation α est ensuite déterminée par l'équation 5.9 en utilisant les valeurs de β et γ du Tableau 5.3.

5.4 Résultats

5.4.1 Détermination de δ_a et δ_b par les déplacements chimiques du GP et des valeurs de pH

Les valeurs de déplacements chimiques du GP titrés (voir les solution au Tableau 5.1) combinées aux valeurs de pH en fonction de la température, nous ont permis d'obtenir les points expérimentaux présentés à la Figure 5.1. En utilisant l'équation 5.47 et les valeurs expérimentales, nous avons pu déterminer la valeur des 3 paramètres, pK_{a2}^{GP} , δ_a et δ_b qui ajuste le mieux la courbe théorique aux données expérimentales. Le Tableau 5.4 présente les valeurs obtenues aux 4 différentes températures.

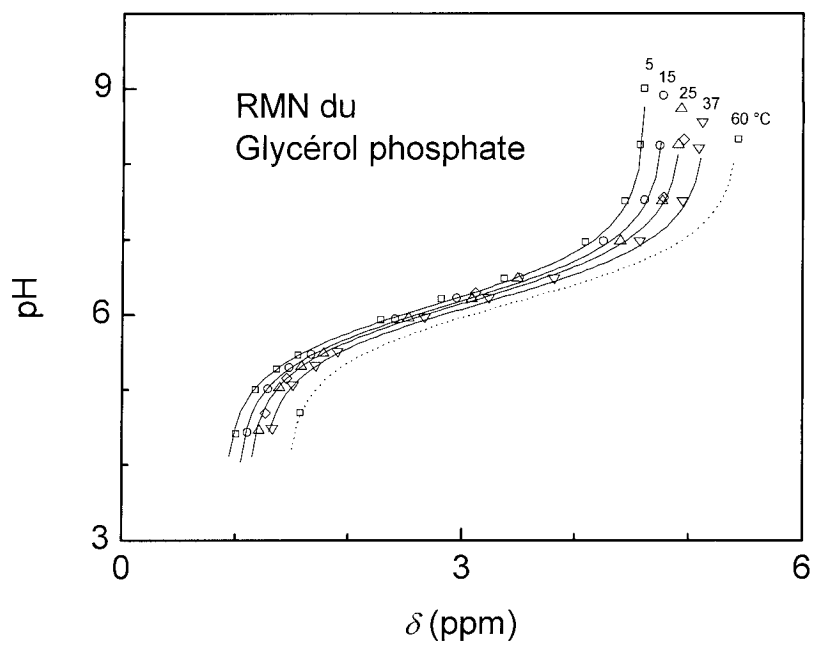


Figure 5.1 Titrage du GP en fonction de la température (solutions du Tableau 5.1).

Tableau 5.4 Valeurs des paramètres δ_a et δ_b , déterminées à partir d'un ajustement des valeurs expérimentales avec l'équation 5.47.

T	δ_a	δ_b	pK_a
°C	ppm	ppm	
5	0.9154	4.6089	6.13
15	1.0202	4.7769	6.14
25	1.1166	4.9410	6.16
37	1.2272	5.1464	6.16

5.4.2 Variation du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température par la technique de RMN

Les valeurs de déplacement chimique du ^{31}P dans le mélange de chitosane/GP sont présentées au Tableau 5.5. Ces mesures permettent de déterminer la valeur de χ par l'équation 5.46. À l'aide de l'équation 5.9 et des valeurs de β et γ du Tableau 5.3, la valeur de α est déterminée pour chaque mélange en fonction de la température. La variation du degré d'ionisation du monomère de glucosamine du chitosane est illustrée à la Figure 5.2.

Tableau 5.5 Déplacements chimiques du ^{31}P des mélanges chitosane/GP à différentes températures et degrés d'ionisation du GP divalent et du monomère glucosamine du chitosane.

T	No. de mélange – $c_c^{\text{g-f}} - c_{\text{HCl}}^{\text{f}} - c_{\text{GP}}^{\text{f}}$											
°C	3a – 30-30-30			3b – 30-24-30			3c – 30-30-36			3d – 30-36-36		
	δ	χ	α	δ	χ	α	δ	χ	α	δ	χ	α
	ppm			ppm			ppm			ppm		
5	3.50	0.70	0.70	3.76	0.77	0.57	3.57	0.72	0.66	3.27	0.64	0.76
15	3.39	0.63	0.63	3.62	0.69	0.49	3.49	0.66	0.59	3.19	0.58	0.69
25	3.24	0.55	0.55	3.44	0.61	0.41	3.37	0.59	0.51	3.08	0.51	0.62
37	3.05	0.46	0.46	3.20	0.50	0.30	3.19	0.50	0.40	2.93	0.43	0.52

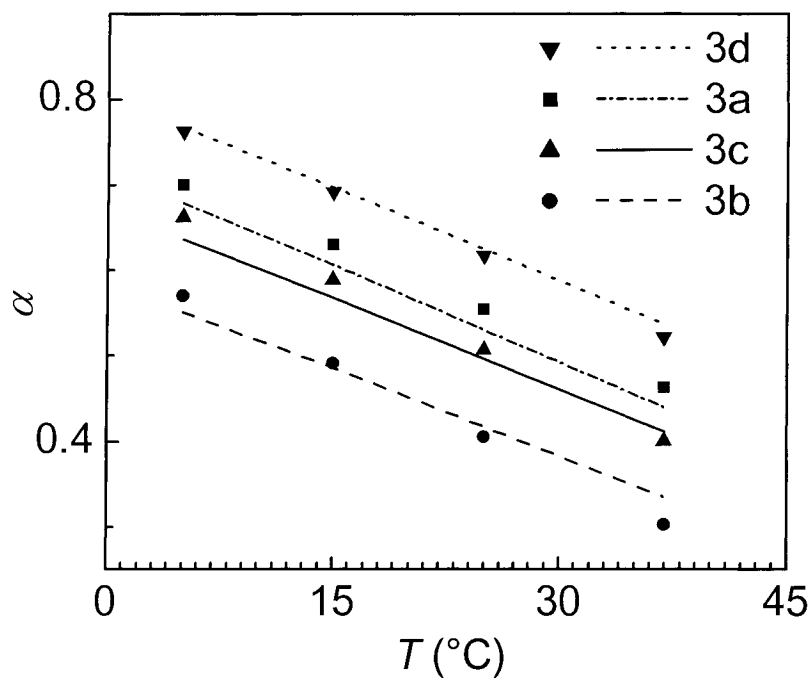


Figure 5.2 Comparaison entre le déchargement obtenu par la méthode de RMN et la prédiction du modèle.

On utilise la technique décrite dans la section 5.2.3 pour déterminer la valeur des paramètres qui ajustent le mieux les courbes théoriques (eq 5.43) aux données expérimentales présentées au Tableau 5.5. Les valeurs ainsi trouvées sont : $C_T = 0.032 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, $C_{lc} = 0.99$ et $pK_0(T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}) = 7.51$.

5.4.3 *Variation du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température par la mesure du pH*

À partir de l'équation 5.12 et des valeurs de pH obtenues en fonction de la température, on détermine la valeur de χ . On obtient la valeur de α selon la méthode décrite à la section 5.3.5. La variation du degré d'ionisation du monomère de glucosamine du chitosane est illustrée à la Figure 5.3. On utilise la technique décrite dans la section 5.2.3 pour déterminer la valeur des paramètres qui ajuste le mieux les courbes théoriques aux données expérimentales. Ces valeurs sont de $C_T = 0.016 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, $C_{lc} = 0.98$ et $\text{p}K_0(T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}) = 7.34$ (voir eq 5.43).

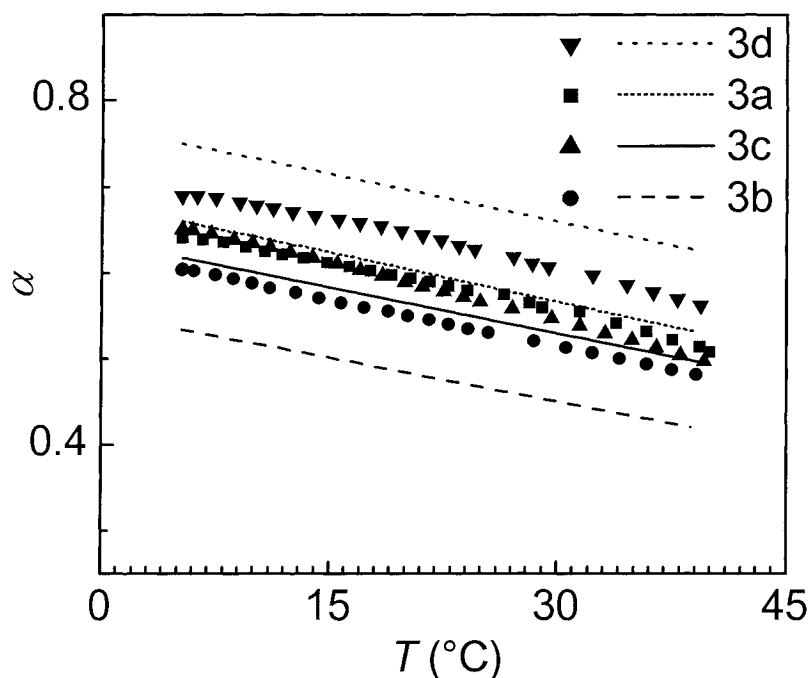


Figure 5.3 Variation du degré d'ionisation du chitosane en fonction de la température pour différents mélanges chitosane/glycérol-phosphate (Tableau 5.3) par la méthode de la mesure du pH (Section 5.3.5).

5.4.4 Température de formation des gels

Dans cette section, nous présentons les résultats de transmittance et de pH obtenus pour deux des échantillons (Figure 5.4 pour les solutions b et c du Tableau 5.3). Les deux autres échantillons ont été mis dans un four pasteur et portés à une température de 85 $^{\circ}\text{C}$ dans un premier temps. À cette température, le mélange 3a (Tableau 5.3) a présenté une transition de phase (formation d'un nuage blanchâtre) sans former un gel tandis que le mélange 3d était encore sous la forme d'une solution. La température a

ensuite été portée à 90 °C puis à 95 °C. À cette dernière température, le mélange 3d a présenté une transition de phase le lendemain. La phase de chitosane séparée présentait une couleur jaunâtre dans les cas 3a et 3d. Les mesures de pH de ces échantillons n'ont pas été effectuées jusqu'à cette température pour éviter d'atteindre les limites d'opération du système de régulation de la température.

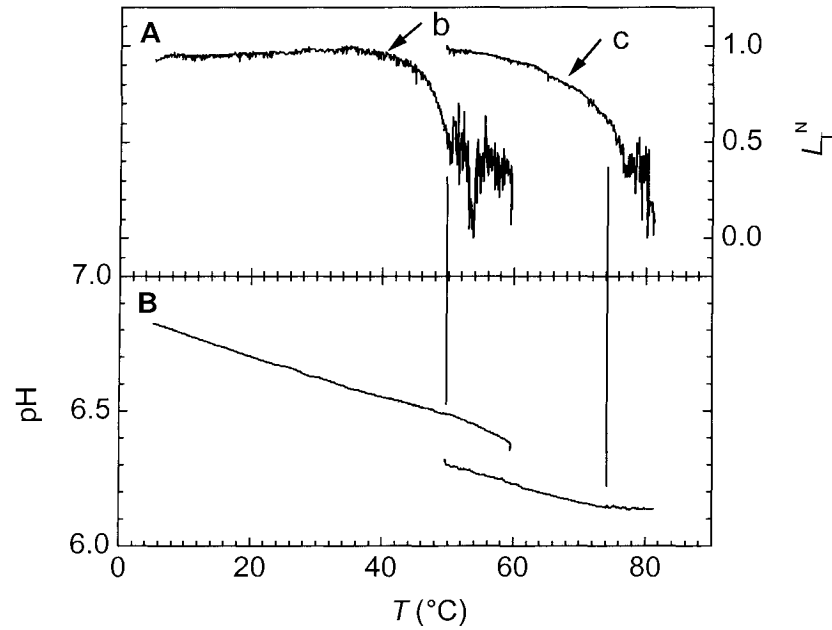


Figure 5.4 A) Détermination de la température de séparation de phase en utilisant la valeur de la transmittance normalisée et la valeur de pH correspondante montrant de façon indirecte le déchargement du chitosane. B) Variation du pH en fonction de la température.

5.5 Discussion

Notre objectif principal était d'obtenir une condition théorique pour que l'augmentation de la température induise une réduction du degré d'ionisation du chitosane. Cette condition de déchargement est imposée par la différence de la variation du pK_{ap} du chitosane et du pK_a du glycérol-phosphate en fonction de la température qui

doit être négative, $\left(\frac{\partial pK_{ap}^{Glc}}{\partial T} - \frac{\partial pK_{a2}^{GP}}{\partial T} \right) < 0$. Cette condition était attendue puisque

l'hypothèse d'un transfert de proton nécessite une différence de la variation des constantes de dissociation des deux espèces mélangées. Le développement mathématique permet d'obtenir un résultat quantitatif de la variation du degré d'ionisation du mélange chitosane/GP sous une variation de la température. De plus, le déchargement du chitosane a été vérifié expérimentalement par l'utilisation de deux techniques différentes.

Un hydrogel formé de poly(*N*-isopropylacrylamide) montre un chargement de 8 mM à 25 °C et de 30 mM à 40°C (Makino, Suzuki, Sakurai, Okano et Ohshima 1995, Makino, Yamamoto, Fujimoto, Kawaguchi et Ohshima 1994). Cet hydrogel se dissocie (comme le chitosane) également sous l'effet d'une augmentation de la température. Dans ce cas toutefois, la concentration de charges fixes augmente puisqu'il s'agit d'un polyanion. Deux techniques ont été utilisées pour déterminer la concentration de charges fixes : par un titrage potentiométrique couplé à des mesures de gonflement du gel et par des mesures d'électro-osmose. Il est à noter cependant que ces techniques n'ont pas été clairement détaillées.

Les résultats de chacune des méthodes de mesure que nous avons utilisées, montrent bien que le chitosane mélangé avec le glycérol-phosphate se décharge (perd ses protons) lorsque le mélange est chauffé. Dans le cas de la RMN, on calcule un déchargement plus important qu'avec la méthode de mesure du pH. L'hypothèse que le chitosane n'affecte pas la résonance du ^{31}P du GP est probablement valide puisque les valeurs théoriques

s'ajustent bien aux valeurs expérimentales (voir Figure 5.2). Le potentiel électrostatique généré par les protons sur la chaîne de chitosane ne semble pas modifier l'environnement chimique du glycérol-phosphate. La valeur $C_T = 0.032 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ à la section 5.4.2 correspond à $C_T = 0.03 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ déterminée au chapitre 4, section 4.5.1. La valeur de $C_{lc} = 0,99$ correspond quant à elle aux valeurs de $C_{lc} = 0,9\text{--}1,5$ obtenues au chapitre 4 pour les cas de forces ioniques d'environ 15 mM de NaCl (voir Table 4.2). La valeur de $pK_0(T=25 \text{ } ^\circ\text{C}) = 7,51$ est plus élevée que la valeur trouvée au chapitre 4 d'environ 7,0.

En ce qui concerne les mesures de pH, il faut noter qu'elles ont été exécutées de 2 à 5 jours suivant les tests de RMN. Les tests de RMN ont été effectués le lendemain de la préparation des solutions. Des solutions à des concentrations de 30 mM de monomères de glucosamine mettent beaucoup plus de temps à atteindre un état d'équilibre que celles à 3 mM. Des mesures avec une concentration plus petite de chitosane auraient nécessité un temps d'acquisition de spectre de RMN beaucoup plus long que celui des tests présentés ici. Nous pouvons faire l'hypothèse qu'au cours du temps, certains sites glucosamine du chitosane présentent une transition de phase et ainsi, une certaine quantité des sites ionisés ne participe plus à la dissociation. De cette façon la variation réelle du degré d'ionisation du chitosane est peut-être plus importante que la variation mesurée apparente. Aucun précipité apparent n'a été dénoté mais des mesures de diffusion de la lumière permettraient de corroborer cette hypothèse.

Concernant également les mesures de pH, la correction de la mesure du pH de l'électrode en fonction de la température n'est pas toujours exacte. Afin de s'assurer que

sa réponse en fonction de la température est fiable, nous recommandons de prendre des mesures de pH pour des températures fixes auxquelles on calibre aussi l'électrode (tel que nous avons fait au chapitre 4). Toutefois, pour chaque mesure dont on change la calibration, on obtiendra des mesures avec une incertitude assez grande occasionnée par le recalibrage de l'électrode. Dans le cas suivant, des mesures préalables sur d'autres échantillons n'ont présenté aucune anomalie. Des mesures à une température donnée précédées d'une calibration à cette même température auraient pu confirmer l'hypothèse d'une défectuosité de la sonde mais dans le cadre de nos objectifs, la précision obtenue était suffisante pour montrer le déchargement et noter les différences de séparation de phase entre les quatre mélanges.

La valeur absolue de la constante de dissociation de l'électrolyte faible mélangé avec le chitosane a une certaine importance sur le déchargement du chitosane. La Figure 5.5 montre la variation de la valeur du degré d'ionisation du chitosane en fonction la valeur du pK_a pour différentes températures. Ainsi, on constate que la valeur de la constante de dissociation du glycérol-phosphate ($pK_{a2} = 6.2$, voir section 4.5.1) est bien adaptée pour favoriser une réduction du degré d'ionisation du chitosane.

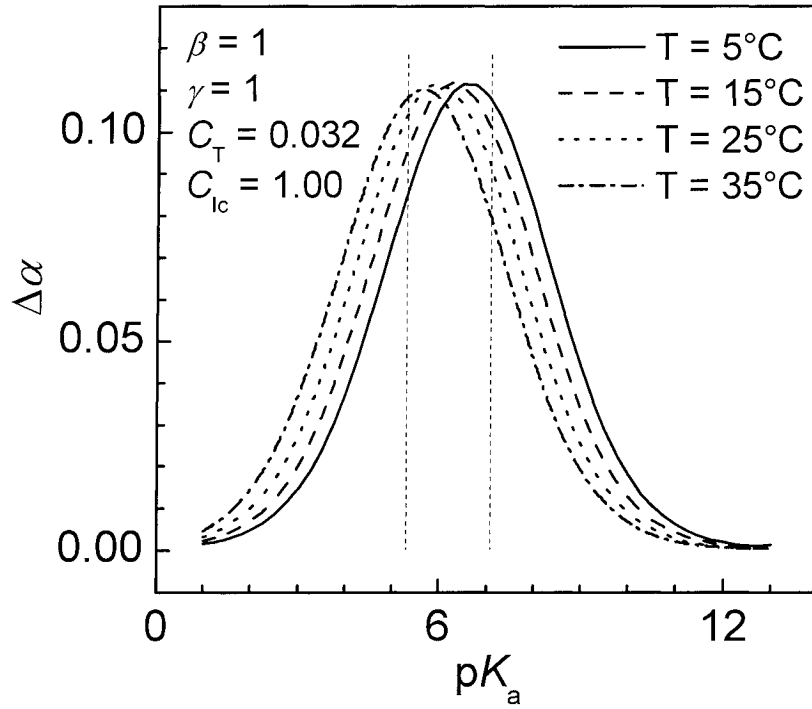


Figure 5.5 Variation du degré d'ionisation selon la valeur de la constante de dissociation de l'électrolyte faible mélangé avec le chitosane à différentes températures (5, 15, 25 et 35 °C). Dans le cas présenté ici, $\beta = \gamma = 1$ et la valeur du pK_{ap} du chitosane est donnée par l'équation 5.43 avec les valeurs $C_T = 0.032$ et $C_{lc} = 1.00$ et la température T donnée. Les lignes pointillées représentent la région de pK_a où la variation de α en fonction de la température est la plus importante.

Le choix des paramètres A et B a été influencé par l'équation 5.9. Lorsque $\alpha = \chi = 1$, l'équation 5.9 devient $\gamma + 1 = 2\beta$, ce qui s'apparente au paramètre $A = 2\beta - \gamma + 1$ et lorsque $\alpha = \chi = 1$, l'équation 5.9 devient $\gamma = \beta$, ce qui s'apparente au paramètre $B = \gamma - \beta$. Ainsi, les paramètres A et B sont en quelque sorte les limites de

l'électroneutralité lorsque le chitosane et le GP sont complètement ionisés ou totalement associés.

Le paramètre β permet de déterminer la quantité de GP disponible pour le transfert de protons. Ainsi, une concentration plus élevée de GP par rapport à celle de monomères de glucosamine (valeur de β très élevée) est moins favorable à un taux de transfert de charges élevé (voir les pentes légèrement moins négatives des cas 3c et 3d de la Figure 5.2). Ceci s'explique par le fait que le GP présent en plus grande quantité que le glucosamine offre un meilleur effet tampon pour la solution globale en maintenant le pH stable. D'autre part, une concentration plus élevée de GP est synonyme d'une valeur γ plus élevée puisque le GP est ajouté sous la forme d'un sel disodium. En ce qui a trait à la valeur de γ , celle-ci favorise le déchargement à mesure qu'elle augmente. Il semble évident que plus on introduit de charges positives dont la dissociation est totale, plus on force les charges positives dissociables à se dissocier pour être neutralisées par un ion hydroxyle.

5.6 Conclusion

Nous avons établi théoriquement que le transfert de charges d'un électrolyte à un autre, en fonction de la température, est uniquement déterminé par la différence de la variation de leur pK_a par rapport à la température. Nous avons également vérifié par le biais de 2 techniques expérimentales que le mélange chitosane-glycérol-phosphate présente un transfert de charge important. La technique de mesure du pH a cependant

montré un transfert de charge probablement sous-estimé, occasionné par le fait que l'électrode à pH ne faisait pas la correction adéquate pour la variation de température.

La mesure par RMN présente un transfert de charge qui correspond bien à la variation prédite par la théorie. Ces mesures confirment le mécanisme de gélification du mélange chitosane-glycérol-phosphate. Ce type de système pourrait donc être appliqué à d'autres mélanges de polyélectrolytes hydrophobiques auxquels un électrolyte faible neutralisant le polyélectrolyte par un changement de la température est ajouté.

CHAPITRE 6 - MODÈLE THÉORIQUE DE LA SÉPARATION DE PHASE DU CHITOSANE

6.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons validé le fait que la température induit une réduction de l'état de charge par un transfert de proton du chitosane vers le glycérol-phosphate. Notre objectif principal dans ce chapitre est de proposer un modèle théorique expliquant que la réduction du degré d'ionisation du chitosane induit une séparation de phase. Nos objectifs secondaires avec ce modèle sont de prédire une valeur approximative du degré d'ionisation critique de séparation de phase, α_{ps} , et de prédire l'effet de la force ionique et du degré de désacétylation sur cette valeur. Notre première hypothèse est que l'énergie d'attraction hydrophobique chitosane-chitosane devient supérieure à l'énergie de répulsion électrostatique lorsque l'on réduit le degré d'ionisation du chitosane. Il existe alors un degré d'ionisation critique, α_{ps} , où le chitosane se sépare de la phase aqueuse. Notre seconde hypothèse est que l'énergie d'attraction hydrophobique chitosane-chitosane diminue lorsqu'on diminue f_D puisque les chaînes de chitosane ayant un f_D moins élevé contiennent plus de groupements acétyle les empêchant de se rapprocher adéquatement. Enfin, nous faisons également l'hypothèse que l'hydrophobicité ne dépend pas de la température.

La littérature concernant les transitions de phase de polymères est assez exhaustive et se retrouve dans la plupart des livres traitant des polymères (Hill 1986, Painter et

Coleman 1997, Reichl 1998, Tanaka et Sahiko 1995). La théorie la plus commune des transitions de phase de macromolécules est celle de Flory-Huggins où le calcul de la variation d'énergie de mélange est une généralisation de la théorie de Bragg-Williams appliquée aux solutions binaires. Dans la théorie de Bragg-Williams, on fait l'approximation que les molécules sont distribuées dans des sites de façon aléatoire, sans égard aux interactions inter molécules (Hill 1986). L'énergie libre de mélange d'Helmholtz comprend deux termes principaux dans la théorie de Flory-Huggins : (1) la variation d'énergie associée aux interactions solvant-solvant, polymère-polymère et solvant-polymère et (2) la variation d'énergie associée à l'entropie de mélange de la macromolécule avec le solvant. Le développement conduisant à l'expression de l'énergie libre de mélange d'Helmholtz est présenté au chapitre 21 du livre *An Introduction to Statistical Thermodynamics*, de Hill (Hill 1986). L'expression de l'énergie libre est présentée à la section 6.2.

La littérature traitant des transitions de phase des polyélectrolytes est moins prolifique. Potemkin (Potemkin, Andreenko et Khokhlov 2001) a étudié ce sujet et il utilise quatre termes pour composer l'énergie libre totale

$$F_T = F_a + F_c + F_e + F_r \quad (6.1)$$

où F_T est l'énergie libre totale, F_a est la perte d'énergie entraînée par l'association de région agrégée, F_c est l'énergie libre associée à la conformation de la chaîne, F_e est

l'énergie libre associée à l'énergie électrostatique E_e et F_r est l'énergie libre associée à la redistribution des ions mobiles.

L'élément nouveau que nous apportons dans le modèle proposé est l'emploi d'un paramètre qui vient modifier l'interaction polymère-polymère. Notre hypothèse est que la séparation de phase n'est pas entraînée par une variation de la concentration de polymère mais par la diminution du degré d'ionisation α qui entraîne une modification de l'interaction polymère-polymère. Ainsi, nous nous attarderons principalement aux termes d'énergie impliquant les interactions ioniques. Nous modifierons l'équation utilisée au Chapitre 4, soit l'équation représentant l'énergie libre d'une chaîne de chitosane en solution (eq 4.22). À cette équation, nous ajouterons une énergie d'interaction attractive et une énergie de répulsion associées à la fraction de la chaîne séparée de la solution.

6.2 Théorie

Nous devons d'abord souligner que le développement théorique proposé ici ne s'applique qu'à une seule cellule de chitosane tel que le modèle présenté au chapitre 4 (voir Figure 4.1). Nous utilisons le développement de la théorie de Flory-Huggins pour décrire le terme présentant l'énergie d'interaction entre le solvant et le polymère qui est présenté comme F_a dans les termes suggérés par Potemkin et al. (2001). L'équation suivante est obtenue pour l'énergie libre d'association par la théorie de Flory-Huggins

pour une chaîne de chitosane constituée de m monomères de glucosamine et entourée de n_s molécules de solvant

$$\frac{F_a}{kT} = \frac{\Delta E_a}{kT} - \frac{\Delta S_m}{k} = \varepsilon_m (n_s + m) \varphi_s \varphi_p + n_s \ln \varphi_s + \ln \varphi_p \quad (6.2)$$

où ΔE_a est la variation d'énergie d'association, ΔS_m est la variation d'entropie occasionnée par le mélange du solvant et du polymère, $\varepsilon_m = -\frac{c(\varepsilon_{ss} + \varepsilon_{pp} - 2\varepsilon_{sp})}{2kT}$ est appelé le paramètre de mélange avec c représentant le nombre de voisins immédiats à un site, ε_{ss} représentant l'énergie d'interaction solvant-solvant, ε_{pp} représentant l'énergie d'interaction polymère-polymère et ε_{sp} représentant l'énergie d'interaction solvant-polymère. Enfin, φ_s et φ_p sont respectivement la fraction volumique de solvant et la fraction volumique de polymère.

Notre hypothèse étant que des interactions d'attraction entre les sites de glucosamine neutres sont à l'origine de la séparation de phase, nous définissons ε_{AA} , un paramètre lié à l'énergie d'interaction entre ces sites (qu'on peut associer au paramètre de mélange ε_m de la théorie de Flory-Huggins). Ce paramètre d'interaction devra être une fonction de f_D puisque nous faisons l'hypothèse que les groupements acétyles empêchent un rapprochement adéquat pour que cette interaction soit totalement efficace.

C'est avec le terme d'énergie ε_{AA} que nous introduisons le paramètre λ qui module les interactions polymère-polymère. Nous définissons λ comme étant la fraction de chitosane dont la phase est séparée de la solution. L'énergie d'attraction est alors donné par le nombre de monomères agglomérés $n_{AA} = m\lambda$ multiplié par l'énergie d'attraction par monomère ε_{AA}

$$E_a = m\lambda\varepsilon_{AA} \quad (6.1)$$

Notons que nous négligeons la variation d'entropie de mélange puisque nous considérons une seule chaîne de chitosane.

En ce qui a trait au terme d'énergie relié à l'entropie de configuration de la macromolécule (F_c) dans la phase aqueuse, nous le négligeons également puisque le chitosane est une macromolécule rigide (Anthonsen, Varum et Smidsrod 1993, Brugnerotto, Desbrières, Roberts et Rinaudo 2001). Nous faisons l'hypothèse que la rigidité de la chaîne varie peu lors des modifications du degré d'ionisation du chitosane. Ainsi, l'énergie associée à la configuration de la chaîne sera la même au cours de la diminution du degré d'ionisation α .

Pour le terme d'énergie électrostatique, nous rappelons l'équation 4.22

$$F_e = E_e - TS_m \quad (6.3)$$

où nous avons omis les termes $n_H^p \mu_{AH^+}^0 + (m - n_H^p) \mu_A^0$ qui demeurent inchangés lors d'une variation de degré d'ionisation α . Dans cette expression de l'énergie libre, nous aurons deux modifications à apporter. Nous faisons l'hypothèse que les sites dont la phase est séparée de la phase aqueuse ne permettent pas d'interaction avec le proton. Ainsi, l'entropie de mélange s'écrit

$$\begin{aligned}
 S_m &= k \ln \frac{(m - n_{AA})!}{(n_H^p)!((m - n_{AA}) - n_H^p)!} \\
 &= -k(m - n_{AA})[\alpha \ln \alpha + (1 - \alpha) \ln (1 - \alpha)] \\
 &= -km(1 - \lambda)[\alpha \ln \alpha + (1 - \alpha) \ln (1 - \alpha)]
 \end{aligned} \tag{6.2}$$

Pour ce qui est de l'énergie électrostatique, elle est constituée de deux contributions. La première est celle associée à l'énergie du proton sur la chaîne dans un potentiel de $\psi|_{r=a}$ tel que vu au Chapitre 4. La deuxième est celle des molécules présentant un site aggloméré contre une macromolécule dans un champ de potentiel électrostatique $\psi|_{r=a}$ (Figure 6.1). Ainsi, il s'ajoute une contribution d'énergie de répulsion électrostatique d'une proportion α de la chaîne dont on augmente l'énergie potentielle en la soumettant à ce potentiel électrostatique $\psi|_{r=a}$. Pour cette contribution, nous faisons l'hypothèse que les monomères adjacents au monomère aggloméré ne modifient pas le potentiel électrostatique de la région considérée. On a alors

$$E_e = m(1 + \lambda) \frac{e}{kT} \alpha \psi|_{r=a} \tag{6.3}$$

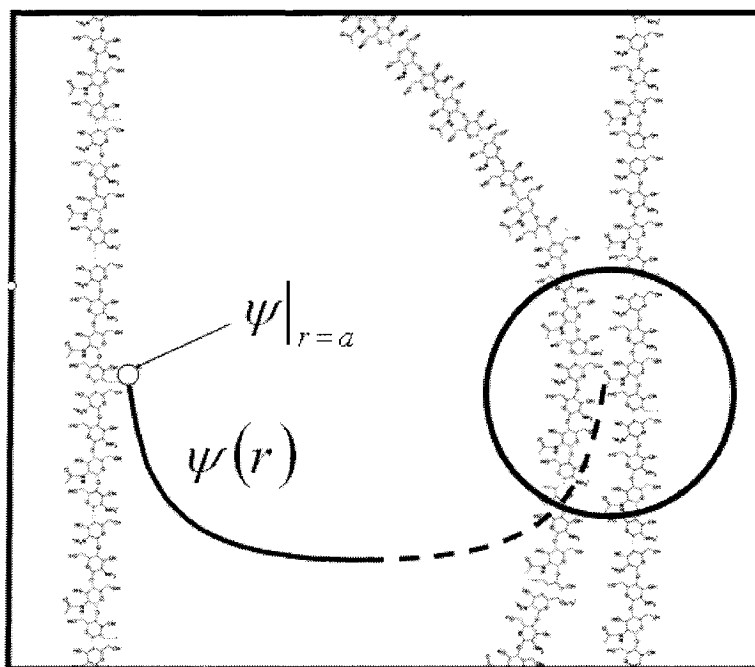


Figure 6.1 Site aggloméré dans le champ électrostatique d'une autre macromolécule de chitosane.

Le terme d'énergie libre associé à la redistribution des ions mobiles F_r est aussi négligé pour déterminer la séparation de phase. Ceci implique l'hypothèse que la distribution des ions mobiles dans une solution composée d'une seule phase (une phase soluble) diffère très peu de la distribution des ions mobiles dans la solution constituée d'une phase soluble et d'une phase séparée. Cette hypothèse est d'autant plus valide que la force ionique est élevée puisque le potentiel électrostatique est diminué et affecte moins la redistribution des ions mobiles.

De cette façon, l'énergie libre totale normalisée par kT d'une chaîne de chitosane, notée $\bar{F}_T$, de la solution de chitosane est donnée par

$$\bar{F}_T = m \left[\begin{aligned} & \frac{e}{kT} \alpha \psi \Big|_{r=a} + (1-\lambda) [\alpha \ln \alpha + (1-\alpha) \ln (1-\alpha)] \\ & - \lambda \left(\frac{\varepsilon_{AA}}{kT} - \frac{e}{kT} \alpha \psi \Big|_{r=a} \right) \end{aligned} \right] \quad (6.4)$$

Le potentiel chimique $\bar{\mu}_m$ normalisé par kT est l'énergie par monomère de glucosamine. Cette valeur est facilement trouvée par la dérivée

$$\frac{\partial \bar{F}}{\partial m} = \bar{\mu}_m = (1+\lambda) \frac{e}{kT} \alpha \psi \Big|_{r=a} + (1-\lambda) [\alpha \ln \alpha + (1-\alpha) \ln (1-\alpha)] - \lambda \frac{\varepsilon_{AA}}{kT} \quad (6.5)$$

Avant de passer au calcul nous permettant de déterminer une séparation de phase, nous notons que le potentiel électrostatique $\psi|_{r=a}$, dans l'expression du potentiel chimique du monomère de glucosamine, n'est pas une fonction explicite de α . Toutefois, nous pouvons déterminer approximativement le pK_{ap} comme une fonction linéaire de α dont le coefficient $C_{lc}(f_D, I_c)$ est modifié selon f_D et I_c tel que présenté dans le Chapitre 4. On a alors

$$\psi|_{r=a} = C_{lc}(f_D, I_c) \frac{\ln 10 kT \alpha}{e} \quad (6.6)$$

Concernant l'énergie d'interaction ε_{AA} , nous pouvons supposer que ce terme est une fonction de f_D qui diminue la probabilité occasionnée par l'encombrement. De cette façon, on a

$$\varepsilon_{AA} = kT\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D) \quad (6.7)$$

Où $C_{lc}(f_D, I_c)$ et $\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D)$ sont des constantes à définir. Nous pouvons donc écrire

$$\bar{\mu}_m = \ln 10(1 + \lambda)C_{lc}(f_D, I_c)\alpha^2 + (1 - \lambda)[\alpha \ln \alpha + (1 - \alpha) \ln (1 - \alpha)] - \lambda\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D) \quad (6.8)$$

La séparation de phase est donnée par la dérivée partielle du potentiel chimique par rapport à λ . En effet, la dérivée de $\bar{\mu}_m$ par rapport à λ nous indique si l'augmentation de la proportion de phase séparée entraîne un accroissement ou une diminution du potentiel chimique du monomère de glucosamine du chitosane. Nous cherchons ainsi à déterminer à quelle valeur de α l'augmentation de la proportion de phase séparée entraîne un passage d'un accroissement à une diminution du potentiel chimique. La dérivée du potentiel chimique du glucosamine, à la transition de phase, donne

$$\frac{\partial \bar{\mu}_m}{\partial \lambda} = C_{lc}(f_D, I_c)\alpha^2 - [\alpha \ln \alpha + (1 - \alpha) \ln (1 - \alpha)] - \bar{\varepsilon}_{AA}(f_D) = 0 \quad (6.9)$$

Pour obtenir la valeur critique de la séparation de phase α_{ps} , nous devons déterminer pour quelle valeur de α l'équation 6.9 donne une valeur nulle. On pourra donc établir numériquement la valeur de α_{ps} en connaissant les valeurs de $C_{lc}(f_D, I_c)$ et $\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D)$. On utilise généralement la dérivée seconde du potentiel chimique pour déterminer un point critique de transition de phase. Dans le cas présent, la dérivée de l'équation 6.9 par rapport à λ donne une valeur nulle. La valeur de α_{ps} obtenue par la résolution de l'équation 6.9 donne un résultat nul et correspond donc à une valeur critique de transition de phase.

Puisque nous connaissons les valeurs de $C_{lc}(f_D, I_c)$ et α_{ps} obtenues dans le Tableau 4.1, nous pouvons obtenir des valeurs de $\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D)$ et vérifier que la dépendance est seulement en fonction de f_D .

6.3 Résultats

En utilisant les valeurs de α_{ps} et de $C_{lc}(f_D, I_c)$ présentées dans le Table 4.2, nous déterminons les valeurs de $\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D)$. Les valeurs obtenues en utilisant les valeurs théoriques et expérimentales retrouvées au chapitre 4 de $C_{lc}(f_D, I_c)$ (voir Table 4.2) sont présentées au Tableau 6.1 suivant.

Tableau 6.1 Valeurs de $\frac{\varepsilon_{AA}}{kT}$ obtenues en utilisant les valeurs $dpK_{ap}/d\alpha$ correspondantes aux valeurs de α_{ps} du Table 4.2.

		$\frac{\varepsilon_{AA}}{kT}$		
		f_D		
I_c		0.72	0.87	1.00
(mM)				
$\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha^{PB}$ (C_{lc}^{MF})	0	0.9	1.3	2.2
	15	0.8	1.2	1.7
	150	0.8	1.1	1.4
$\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha^{lin}$ (C_{lc}^{Exp})	0	0.8	1.0	1.5
	15	0.8	1.0	1.5
	150	0.8	1.0	1.3

Le Tableau 6.2 compare les valeurs du degré d'ionisation critique de séparation de phase obtenues au chapitre 4 et les valeurs prédites par le modèle en utilisant des valeurs de $\frac{\varepsilon_{AA}}{kT}(f_D)$ égales à 0,7, 0,82 et 1,0 pour des valeurs respectives de $f_D = 0,72, 0,87$ et 1,00. La Figure 6.1 illustre la variation du potentiel chimique du monomère de glucosamine en fonction de son degré d'ionisation α pour différentes valeurs de proportion de phase séparée λ . Nous constatons que toutes les courbes se rencontrent à un point critique correspondant à la valeur de α_{ps} .

Tableau 6.2 Valeurs de α_{ps} obtenues en utilisant les valeurs $dpK_{ap}/d\alpha$ correspondantes du Table 4.2 et des valeurs respectives de $\frac{\varepsilon_{AA}}{kT}(f_D)$ égales à 0,7, 0,82 et 1,0 pour des valeurs respectives de $f_D = 0,72, 0,87$ et 1,00..

		α_{ps} (prédiction)			α_{ps} (mesuré)		
I_c (mM)		f_D			f_D		
		0.72	0.87	1.00	0.72	0.87	1.00
$\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha^{PB}$ (C_{lc}^{MF})	0	0,26	0.30	0.36	0.25	0.35	0.50
	15	0.29	0.36	0.46	0.30	0.40	0.55
	150	0.33	0.44	0.60	0.35	0.50	0.65
$\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha^{lin}$ (C_{lc}^{Exp})	0	0.26	0.35	0.47			
	15	0.30	0.40	0.51			
	150	0.33	0.46	–			

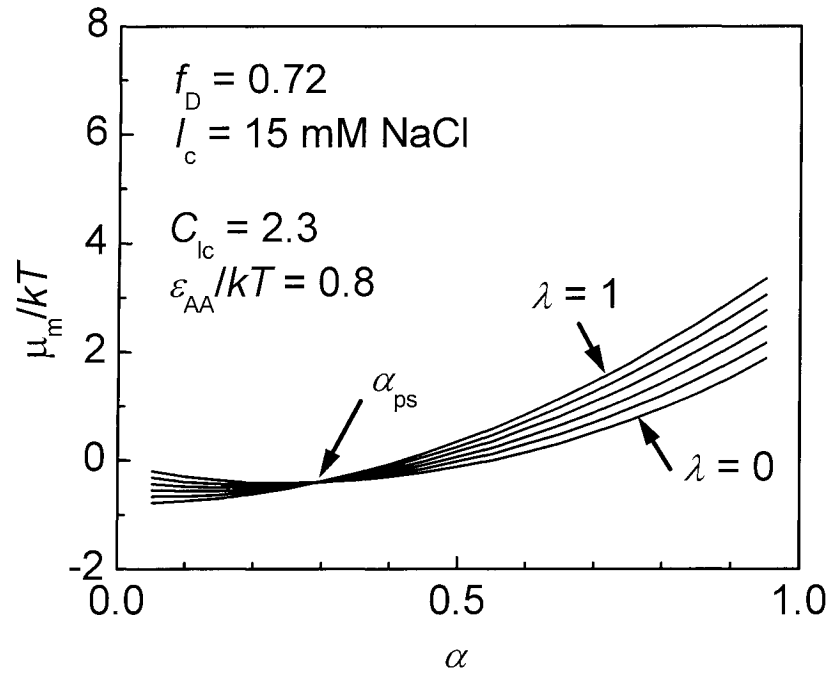


Figure 6.2 Potentiel chimique en fonction de α pour différentes valeurs de λ . On constate qu'à partir d'une valeur critique de α_{ps} , les courbes $\lambda > 0$ présentent des valeurs de potentiels chimiques inférieurs.

6.4 Discussion

Notre modèle proposé indique que la séparation de phase du chitosane peut s'expliquer par une réduction de l'énergie électrostatique (occasionnée par une réduction du degré d'ionisation) permettant aux interactions hydrophobiques de dominer et de séparer le chitosane de la phase aqueuse. Notons que la formation de ponts d'hydrogène pourrait aussi être la cause d'une agglomération des chaînes de chitosane. Notre

hypothèse que la séparation de phase peut s'expliquer par une compétition entre l'énergie de répulsion électrostatique et l'énergie d'attraction hydrophobique (ou ponts d'hydrogène) est donc soutenue par ce modèle. De plus, les valeurs de $\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D)$ obtenues (Tableau 6.1) en utilisant les valeurs expérimentales de α_{ps} et de $C_{lc}(I_c, f_D)$ sont identiques pour une même valeur de f_D du chitosane (à l'exception du cas $f_D = 1.00$ et $I_c = 150$ mM NaCl). Ceci supporte l'hypothèse que le changement de la valeur de α_{ps} en fonction de f_D est attribué à une réduction de l'énergie d'attraction hydrophobique occasionnée par un encombrement des groupements acétyles. Bien que le modèle présenté ici soit très simplifié et contienne plusieurs approximations, l'ordre de grandeur de l'énergie d'interaction ($\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D) = 0,8-1,5$ kT) correspond à des valeurs de la littérature (entre 0,5 et 2,0 kT) pour des interactions hydrophobiques entre deux hydrocarbures solubilisés dans l'eau (Widom, Bhimalapuram et Koga 2003).

6.5 Conclusion

Le modèle prédit adéquatement les valeurs du degré d'ionisation à la séparation de phase, α_{ps} . Par contre, il devrait être confronté à d'autres chitosanes et, par la suite, à d'autres polyélectrolytes hydrophobiques tels que le polyméthylmétacrylate et le polyélectrolyte alterné de Siegel et Cornejo-Bravo (1992). L'application de ce modèle présente l'avantage d'être simple et n'implique pas beaucoup de calculs. Dans le cas des chaînes de chitosanes de masses moléculaires relativement élevées, la valeur de $\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D)$ pourrait être extrapolée en fonction de f_D et ainsi permettre de déterminer la

valeur de α_{ps} pour une valeur donnée de f_D sous différentes conditions de force ionique. Le modèle devrait également être soumis à des chitosanes de masses moléculaires plus faibles et utiliser la théorie de Flory-Huggins pour déterminer la valeur de $\bar{\varepsilon}_{AA}(f_D)$ en fonction de la masse moléculaire.

CHAPITRE 7 - DISCUSSION GÉNÉRALE

7.1 Interactions électrostatiques et hydrophobiques

L'ensemble des résultats obtenus ainsi que les méthodes de caractérisation de concentration de charges fixes, de diffusion et de variation de pK_{ap} seront utiles pour différents travaux portant sur le chitosane ou différents polyélectrolytes. Bien évidemment, les résultats obtenus s'appliquent spécifiquement à la préparation de gels de chitosane/glycérol-phosphate ou encore de chitosane avec un substituant au glycérol-phosphate tel que le mono phosphate. Notons que les résultats les plus utiles à d'autres applications impliquant le chitosane sont les calculs de concentration de charges portées par le chitosane et la détermination de son état de charge correspondant à sa séparation de phase en milieu aqueux puisque les interactions électrostatiques sont fortes et que l'état du chitosane en phase aqueuse peut avoir un impact déterminant pour son utilisation.

Le gel de chitosane/glycérol-phosphate pourra être utilisé comme échafaudage pour maintenir des cellules dans un environnement tridimensionnel et leur permettre de se diviser, de se différencier et de produire de la matrice extracellulaire tout en ayant un apport de nutriments. Ces nutriments peuvent diffuser librement dans la phase aqueuse du gel. Il est donc possible de mettre le gel en contact avec une solution contenant des nutriments pour que ceux-ci diffusent à l'intérieur du gel. Il s'agit du procédé inverse à

celui observé au Chapitre 3 puisque le gradient de concentration est également inversé (il n'y a aucun nutriment dans le gel initialement).

Le mélange chitosane/glycérol-phosphate présente l'aspect pratique d'être liquide initialement puisqu'on le conserve à une basse température (la température peut varier entre 5 et 20°C). Ceci permet de mélanger facilement et de façon homogène des cellules à cette solution. Il suffit de mélanger la suspension de cellules à la solution faiblement refroidie. La basse température n'est pas idéale pour les cellules mais elle permet, malgré tout, de maintenir un bon taux de viabilité cellulaire. Le mélange chitosane/glycérol-phosphate/cellules est ensuite chauffé à la température optimale, soit environ 37°C pour former le gel qui devient l'échafaudage des cellules. Ce type d'échafaudage est donc facilement obtenu et ne nécessite pas d'appareillage complexe contrairement aux échafaudages présentés par Ang et al. (2002). De plus, il est facile de le préparer de façon stérile.

La concentration de charges fixes portées par le chitosane à l'intérieur de l'échafaudage peut avoir un effet considérable sur la division, la différenciation et la production de matrice extracellulaire des cellules. La description détaillée de la méthode de caractérisation de la concentration de charges fixes, présentée au Chapitre 2, permet de quantifier cette concentration pour une préparation donnée. Il serait donc possible d'en déterminer l'effet afin d'optimiser les paramètres variables de l'échafaudage. Une analyse semblable à celle faite au Chapitre 3 permettrait de caractériser la diffusion de nutriments ou de médicaments à l'intérieur de l'échafaudage de chitosane. De plus, une

combinaison des analyses des chapitres 2 et 3 permettrait de caractériser l'effet des charges fixes sur la diffusion des nutriments ou des médicaments.

La modélisation permettant d'obtenir le profil du potentiel électrostatique au Chapitre 4 peut s'avérer utile pour comprendre les interactions du chitosane avec des protéines, des cellules, des tissus, etc. En effet, la charge électrostatique qui demeure sur les groupements aminés protonés du glucosamine est certainement la principale source d'interactions possibles avec les électrolytes qui pénètrent à l'intérieur du gel. À ce type d'interaction, nous pouvons également ajouter des interactions hydrophobiques dont nous avons présenté un modèle préliminaire au Chapitre 6.

La combinaison des deux types d'interactions peut être utile pour comprendre la cinétique de formation des gels chitosane/glycérol-phosphate et la formation des complexes ADN-chitosane (Il'ina et Varlamov, 2004). Une augmentation rapide de la température favorise un rapprochement rapide des chaînes de chitosane puisque celles-ci seront moins chargées. Elles exerceront une faible répulsion entre elles et leurs interactions hydrophobiques seront favorisées. Dans le cas des complexes ADN-chitosane, il peut être souhaitable d'avoir une préparation dont la concentration de charges fixes soit élevée. Une concentration élevée de charges positives attirerait plus fortement les charges négatives de l'ADN. Ceci permettrait la formation de complexes plus compacts facilitant ainsi leur pénétration à l'intérieur de la cellule.

Les cellules incorporées dans un échafaudage ou l'ADN complexé au chitosane restreignent toutefois la préparation des mélanges à base de chitosane. L'ADN isolé et principalement les cellules isolées, ne supportent pas n'importe quelle condition de pH et d'osmolarité. Il serait donc possible d'optimiser la préparation pour obtenir des conditions de pH à peu près neutre ($\text{pH} = 7$) et une osmolarité d'environ 325 mOsm. Ces valeurs varient selon le type de cellules utilisées.

Lorsque l'on calcule la concentration de charges portées par le chitosane, il faut tenir compte du type d'environnement dans lequel il est placé. Dans une solution de volume déterminé, les concentrations des constituants, la valeur de leur constante de dissociation respective et la température de la solution fixeront l'état de charge du chitosane. Dans un organisme vivant, c'est le pH environnant et la température qui seront déterminants pour la concentration de charges portées par le chitosane injecté.

Les chapitres 4 à 6 peuvent également être utiles pour comprendre les propriétés de mucoadhésion du chitosane (Lehr, Bouwstra, Schacht et Junginger, 1992, Alpar et al. 2005), pour optimiser les conditions dans le but d'effectuer une immobilisation d'enzymes (Krajewska, 2004), pour améliorer le rendement des processus impliquant le chitosane pour le traitement des eaux usées (Krajewska, 2005, Crini, 2005), pour valider les hypothèses du rôle de la charge électrostatique des groupements amines du chitosane pour ses propriétés anti-microbienne (à trouver Chen, Liao et Tsai, 1998), pour optimiser la floculation de suspensions cellulaires (Barany et Szepesszentgyörgyi, 2004) et

finalement pour faciliter la préparation d'autres hydrogels (Monteiro et Airoidi, 1999, Berger, 2004).

Les données du Chapitre 4 pourraient être utilisées afin d'optimiser les dépôts électrochimiques de chitosane dans l'optique de construire des dispositifs miniaturisés pour des applications biologiques (Wu et al., 2002, Fernandes et al., 2003). Le calcul du potentiel électrostatique du chitosane peut être utilisé pour calculer la force appliquée sur une chaîne de chitosane lorsqu'il est soumis à un champ électrique donné. Nous suggérons ici un procédé électrochimique qui permettrait de séparer un échantillon de chitosane selon différentes masses moléculaires ou d'étudier la mobilité du chitosane en solution. Le montage suggéré est présenté à la Figure 7.1. Nous faisons l'hypothèse qu'une chaîne de chitosane de masse moléculaire inférieure devrait avoir une mobilité supérieure à une chaîne de masse moléculaire élevée. La différence de mobilité serait occasionnée par une force de friction différente selon la masse moléculaire. En soumettant les chaînes de chitosane à un flux de solution constant et un champ électrique perpendiculaire, la déposition des petites chaînes devrait avoir lieu à un endroit plus rapproché du point d'injection de l'échantillon. L'utilisation d'oligomères de chitosane permettrait sans doute de faire l'étalonnage de ce procédé pour déterminer le nombre de monomères qui constituent les chaînes de chitosane ainsi séparées.

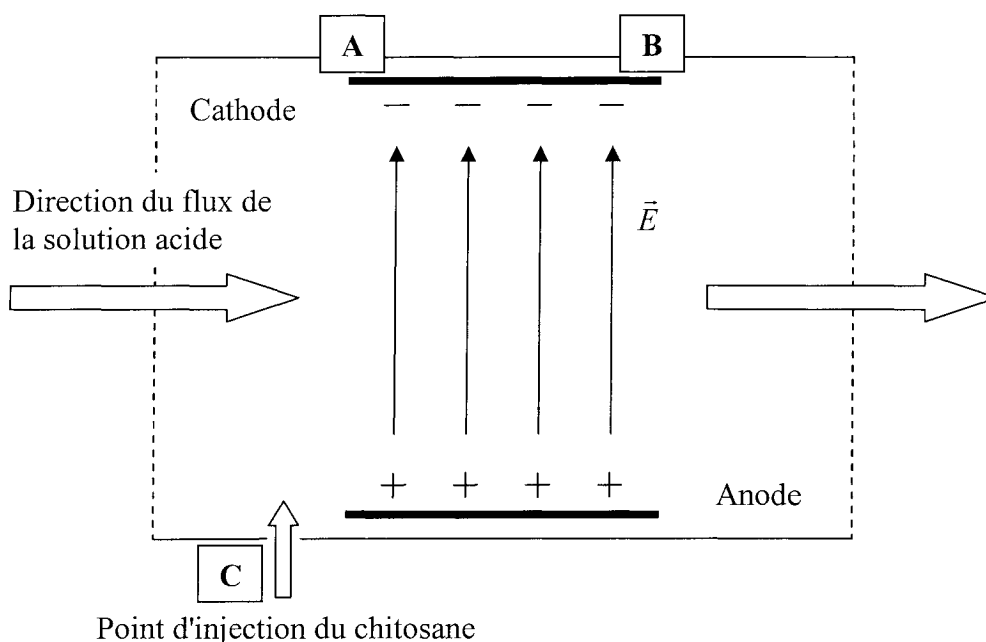


Figure 7.1 Montage pour la séparation par masses moléculaires d'un échantillon de chitosane. Une solution acide circule à un flux constant dans un conduit qui contient une anode et une cathode. Une solution contenant du chitosane est injectée au point C. Les chaînes de chitosane chargées (puisque'elles sont dans une solution acide) sont entraînées vers la cathode sous l'action du champ électrique $\vec{E}$ ainsi que perpendiculairement par le flux constant de la solution acide. Les petites chaînes de chitosane circulent plus rapidement vers la cathode puisqu'elles subissent une friction inférieure. Les chaînes de chitosane devraient se répartir selon les faibles masses moléculaires jusqu'aux plus élevées, c'est-à-dire du point A au point B, respectivement.

La modélisation du Chapitre 6 a été écrite dans l'intention d'expliquer de façon théorique, la transition de phase observée du chitosane lorsque son état de charge est diminué. La plupart des modèles théoriques cherche à déterminer une concentration critique de polymère qui occasionnera une transition de phase. Dans le cas du chitosane,

c'est la variation de son état de charge α qui occasionne la transition de phase. Il serait intéressant de valider cette théorie avec d'autres polymères hydrophobiques tels que ceux présentés par Siegel (1992) ou encore d'utiliser des chitosanes d'hydrophobicité modifiée tel que présenté par Nyström (1999).

7.2 Transfert de protons et équilibre de dissociation

Les données du Chapitre 5 montrent qu'il y a un transfert de protons du chitosane vers le glycérol-phosphate sous une élévation de la température. Ce transfert de protons pourrait survenir dans d'autres types de mélanges et pourrait être occasionné par le changement d'une autre variable telle que la pression, par exemple. Il faudrait cependant tester la variation de la valeur de la constante de dissociation de l'électrolyte en fonction d'une variation de la pression (Kumar, 2005). Une fois les valeurs de variation de la constante de dissociation obtenues, il serait possible de prédire un échange de charges électrostatiques entre deux molécules données.

La résolution du système d'équations du Chapitre 5 (équations 5.1, 5.3, et 5.5, à 5.7) permet de comprendre les équations d'équilibres et l'implication de l'électroneutralité dans le contrôle de cet équilibre. Notons également l'implication des ions à forte dissociation tel que le Na^+ et le Cl^- dans l'équation d'électroneutralité présentée à nouveau ci-dessous

$$c_{\text{Na}^+} + c_{\text{GlcNH}_3^+} - c_{\text{Cl}^-} - c_{\text{GPO}_4^-} - 2c_{\text{GPO}_4^{2-}} = 0 \quad (\text{répétition de 5.7})$$

Ces ions ont une valeur fixée par la préparation de la solution et n'interviennent aucunement dans les autres équations. Ainsi, leur différence dicte la différence entre la concentration de charges négatives et positives des ions à faible dissociation. Lorsque leur différence est trop importante, la concentration des ions du solvant (des ions H^+ ou OH^-) n'est plus négligeable et l'équation 5.7 n'est plus valide. On a alors une solution fortement acide ou basique. Il est à noter que dans ce cas, la condition spécifiée par l'équation 4.47 n'est pas respectée et $\frac{dpK_a}{dpH} \cong 1$ n'est également plus valide.

Enfin, le mélange chitosane/glycérol-phosphate se prêterait bien à l'étude de la cinétique de formation de gels ou à l'étude des interactions hydrophobiques puisqu'il est facile de former plusieurs gels de différentes façons. Le taux de variation de l'élévation de température peut être modifié, la concentration des constituants du gel, les caractéristiques du chitosane tel que son degré de désacétylation (f_D), la distribution des groupements acétyles, la masse moléculaire, etc. De plus, le transfert de protons est beaucoup plus rapide que le déplacement des chaînes de chitosane en solution et il est le précurseur de la manifestation des interactions hydrophobiques.

CHAPITRE 8 - CONCLUSION

L'objectif principal de la thèse était de déterminer le mécanisme de gélification par une augmentation de la température du mélange chitosane/glycérol-phosphate. L'étude du mélange chitosane/glycérol-phosphate nous a apporté une meilleure compréhension du comportement du chitosane en solution. Les principales caractéristiques du chitosane, présentées dans le premier chapitre, peuvent être modifiées pour obtenir différentes solutions et sont susceptibles d'altérer l'équilibre final du mélange (pH et phases en solution). Les caractéristiques propres au chitosane sont la fraction de désacétylation et la distribution des groupements acétyles (par bloc ou de façon aléatoire), la distribution de masse moléculaire et le degré d'ionisation. Le degré d'ionisation se manifeste lorsque le chitosane est mis en solution. Ce degré est déterminé par l'équilibre de dissociation régi par la *constante* de dissociation. Pour modifier le comportement du chitosane en solution, nous pouvons varier la température de la solution, sa force ionique et sa composition en ajoutant des acides ou des bases, fortes ou faibles. Nous avons défini chacun de ces aspects en présentant des résultats concluants et avons apporté des outils pour comprendre et prédire le comportement du chitosane en fonction du chitosane utilisé et de la condition du solvant. Nous avons également présenté le caractère hydrophobique du chitosane à l'origine de la transition sol-gel de son mélange avec le glycérol-phosphate. Cette séparation de phase du chitosane survient généralement lorsque celui-ci est dans une solution dont le pH est près d'un pH neutre.

8.1 Avancement des connaissances du comportement du chitosane en solution

Tel que nous avons vu au chapitre 4, la littérature nous renseigne sur la valeur du pK_{ap} du chitosane en fonction du degré de désacétylation et de la force ionique (Sorlier, Denuzière, Viton et Domard 2001) et sur le phénomène de séparation de phase lors d'une neutralisation (Varum, Ottoy et Smidsrod 1994) mais, à notre connaissance, aucune étude n'avait encore déterminé l'effet de la température sur le pK_{ap} . De plus, aucune étude n'avait fait une analyse globale de toutes ces composantes. L'étude de l'effet de la température, de la force ionique et du degré de désacétylation sur le comportement du chitosane en solution apporte une nouvelle compréhension des solutions aqueuses composée de chitosane. Le modèle cylindrique, également présenté au chapitre 4, contribue aussi à l'avancement de la compréhension du comportement du chitosane en solution et permet d'expliquer la plupart des observations présentées tout au long de cette thèse. Le modèle présenté au chapitre 6 propose une explication de la séparation de phase et les valeurs prédites du degré d'ionisation à la séparation de phase concordent avec les mesures expérimentales. Le couplage des différentes mesures au modèle cylindrique permettant d'obtenir le profil du potentiel électrostatique est un outil analytique prédictif et qui se révélera fort utile pour l'analyse des différentes combinaisons de solutions aqueuses de chitosane. Ce couplage constitue, à notre avis, le point central de la thèse.

Pour déterminer l'effet de la température, nous avons établi au chapitre 4, les conditions permettant de vérifier la variation de la constante de dissociation en mesurant

la variation du pH. Ce test est facile à exécuter et peut être appliqué à différentes solutions. L'effet de la température sur le pK_{ap} des solutions de chitosane n'avait pas encore été rapporté à notre connaissance. Sa très grande variation (plus d'une unité de pK pour une variation de 35 °C) nécessite que la température soit rapportée lorsqu'une valeur de pK_{ap} est publiée. Il est important de se rappeler que la variation du pK_{ap} n'implique pas le potentiel électrostatique (comme nous avons observé au chapitre 4 avec le modèle cylindrique) mais qu'il s'agit plutôt du même effet que pour la variation du pK_a du monomère seul de la glucosamine (voir Figure 4.4).

Le troisième chapitre nous a permis de déterminer que le glycérol-phosphate n'est pas lié au chitosane après la formation du gel. Cette conclusion implique que le gel de chitosane utilisé dans un système en contact avec un milieu aqueux externe peut, à la suite d'une diffusion dans le milieu externe, être exempt de glycérol-phosphate et ainsi être uniquement composé de chitosane en équilibre avec le milieu aqueux externe. Ceci présente l'avantage que le seul élément ajouté à notre système est le chitosane déjà caractérisé comme un polyélectrolyte biocompatible (Lee, Ha et Park, 1995). La valeur de la constante de diffusion obtenue peut aussi être utilisée pour faire l'approximation de la constante de diffusion d'un médicament ou de toute autre molécule dont on souhaiterait faire le mélange avec le gel de chitosane/glycérol-phosphate pour ensuite libérer cette molécule dans notre système test.

La caractérisation des trois chitosanes de degrés de désacétylation différents sous des conditions de température et de force ionique différentes, présentée au quatrième

chapitre, présente une contribution majeure dans la connaissance des caractéristiques du chitosane en solution. Pour la première fois dans la littérature, nous avons réuni les caractéristiques de séparation de phase et de quantification de la constante de dissociation pour différentes températures et forces ioniques. Cette caractérisation aura sans doute un impact majeur pour la recherche qui se fait avec des systèmes utilisant le chitosane.

Au deuxième chapitre, nous avons montré que le gel de chitosane conserve des sites de monomères de glucosamine ionisés pouvant varier de quelques millimoles à un degré d'ionisation très élevé (plus de 0.5). Ce résultat implique que les gels formés de chitosane peuvent facilement adhérer à des molécules anioniques suite à une attraction électrostatique. De plus, nous avons montré que la densité de charges fixes varie en fonction du pH de la solution avec laquelle le gel de chitosane est à l'équilibre. Cette variation est liée à l'équilibre de dissociation du proton situé sur le monomère de glucosamine. Nous pouvons ainsi prévoir qu'une certaine quantité de charges fixes peut être présente à l'intérieur du gel qui peut être utilisé comme matrice de culture *in vitro* ou pour la réparation de tissu par injection *in vivo* (Hoemann, Hurtig, Rossamacha E., Sun, Chevrier, Shive Matthew et al. 2005, Hoemann, Sun, Legare, McKee et Buschmann 2005). Nous pourrions dorénavant faire l'approximation de la quantité de charges fixes en connaissant la valeur de la constante de dissociation du chitosane (voir le Chapitre 4 pour la caractérisation de la constante de dissociation du chitosane) utilisé dans les conditions de pH et de force ionique du système *in vitro* ou *in vivo*.

Évidemment, nous pouvons maintenant expliquer le mécanisme de gélification du mélange chitosane/glycérol-phosphate et comprendre les résultats obtenus dans la littérature (Chenite, Chaput, Combes, Jalal et Selmani 1998, Chenite, Buschmann, Wang, Chaput et Kandani 2001). Des études concernant l'effet de la distribution de masse moléculaire et de la distribution des groupements acétyles restent à être effectuées pour compléter nos connaissances du comportement du chitosane en solution.

8.2 Contributions d'ordre général

Sur le plan du développement des technologies, le système d'acquisition des mesures de pH, de conductivité (non présenté au cours de l'ouvrage), de température et de transmittance dont on contrôle l'ajout d'une solution et la température s'est avéré essentiel pour la caractérisation simultanée de tous ces paramètres du chitosane. La facilité d'utilisation des logiciels d'acquisition, de contrôle et d'analyse des résultats, fait de cet ensemble un outil d'analyse unique pour la caractérisation des polyélectrolytes ou des polymères présentant une séparation de phase. Il permet une réduction du temps de travail à l'acquisition puisqu'il est entièrement automatisé. Il présente également l'avantage d'enregistrer (dans le même fichier que les résultats d'acquisition) toutes les caractéristiques que l'utilisateur souhaite retenir comme informations sur la solution testée. Ceci facilite l'analyse qui est parfois faite longtemps après l'acquisition des résultats.

La résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann à l'aide du modèle cylindrique nous a permis de mieux comprendre les effets électrostatiques à l'origine de la variation de la constante de dissociation du chitosane en fonction des divers paramètres, soient le degré d'ionisation, la température, la force ionique ainsi que le degré de désacétylation du chitosane. Nous avons clairement établi les conditions permettant l'utilisation du modèle pour un système clos dont la concentration totale des espèces en solution est déterminée. Le travail des équations permettant d'obtenir la relation entre le pH et le potentiel électrostatique a également été utile pour le modèle présenté au Chapitre 6. Le couplage de la caractérisation du chitosane et de la modélisation fut la clé de l'identification du mécanisme de gélification du mélange de chitosane. Notons que la théorie pourrait permettre d'expliquer la plupart des systèmes présentant un échange de charges en solution occasionné par la variation d'un paramètre de la solution qui n'est pas nécessairement la température mais qui pourrait être la pression à laquelle est soumise la solution ou tout autre paramètre.

Nous avons montré théoriquement que la condition nécessaire et suffisante d'une diminution du degré d'ionisation du chitosane était que la différence entre la variation du pK_{ap} du chitosane et le pK_a du glycérol-phosphate avec la température soit négative (voir eq 5.42). Cette condition nous a permis de déterminer d'autres électrolytes pouvant potentiellement présenter une transition sol-gel par l'élévation de la température. Parmi ces électrolytes, notons que certaines formulations avec le chitosane/phosphate ont présenté les mêmes caractéristiques que le mélange chitosane/glycérol-phosphate. De

plus, cette condition permettrait de déterminer rapidement les systèmes polyélectrolyte/électrolyte pouvant présenter une transition de phase similaire.

8.3 Nouvelles voies de recherche

Le modèle de la séparation de phase montre bien la compétition entre l'énergie électrostatique de répulsion des monomères de glucosamine ionisés et l'énergie d'attraction hydrophobique entre les chaînes de chitosane. Le modèle pourrait sans doute être appliqué à d'autres polyélectrolytes hydrophobiques pour expliquer leur transition de phase en fonction de leur degré d'ionisation. Il serait intéressant de déterminer l'effet de la variation du paramètre d'interaction pour les faibles masses moléculaires avec le modèle de Flory-Huggins.

Nous avons utilisé les résultats du système chitosane/glycérol-phosphate pour suggérer un nouveau système présentant également une transition de phase par l'élévation de la température. Un système antérieur (Draget, Oestgaard et Smidsroed 1990, Skjaak-Braek, Grasdalen et Smidsroed 1989) dissolvait du gaz carbonique CO_2 dans le mélange alginate/ CaCO_3 afin de diminuer le pH par la production d'acide carbonique lors de l'évaporation du CO_2 de la solution. Notre système testé est composé du polyélectrolyte anionique alginate (Kelco Compagny, Food grade, Lot # 8L0824A, 10 g/L) auquel on ajoute du carbonate de calcium (CaCO_3 , Sigma, No. Cat. C-4830, 3 g/L) ainsi que de la glucosamine (Sigma, No. Cat. G-1514, 10,7 g/L). L'alginate est d'abord refroidi puis on ajoute le carbonate de calcium dont une partie demeure

insoluble. On ajoute la glucosamine et on chauffe le mélange. Sous l'action de la chaleur, la glucosamine diminue le pH et permet au carbonate de calcium de se solubiliser (le carbonate de calcium se dissout plus facilement à pH acide et à température élevée). Une fois les ions Ca^{2+} dissout, ceux-ci permettent l'attraction des chaînes polyanioniques.

Nous avons aussi déterminé que le tampon phosphate peut, lui aussi, être mélangé au chitosane pour obtenir une solution qui forme un gel lorsqu'on élève la température du mélange. Voici une brève description d'un essai effectué. Le chitosane utilisé (Natural Biopolymer) a un degré de désacétylation $f_D = 0,85$ avec une concentration monomérique initiale de 141 mM dissout avec du HCl à 120 mM. Nous préparons une solution de Na_2HPO_4 à 0,815 M avec du HCl à 0,288 M. Nous ajoutons d'abord 200 μL de cette solution à 2,0 mL de la solution de chitosane. Nous plaçons ce mélange à 60 °C afin de dissoudre les quelques précipités qui se sont formés lors de l'ajout de la solution de phosphate-HCl. Le mélange est sorti du four et refroidi pendant 5 minutes. Nous ajoutons à nouveau 200 μL de la même solution de phosphate-HCl. Nous plaçons à nouveau le mélange à 60 °C et il forme un gel après 25 minutes. Le phosphate présente une variation de $\text{p}K_a$ très faible comme le GP mais son $\text{p}K_a$ est légèrement supérieur d'environ une unité de $\text{p}K$ à celle du GP. Il est donc plus difficile d'ajouter le phosphate au chitosane sans faire de précipité local.

Enfin, nous avons atteint notre objectif principal de déterminer le mécanisme de gélification du mélange chitosane/glycérol-phosphate par une augmentation de la

température. L'ensemble des résultats expérimentaux et théoriques permettent de mieux contrôler les paramètres pour la fabrication et l'utilisation des mélanges chitosane/glycérol-phosphate et apportent une meilleure connaissance des polyélectrolytes hydrophobiques et de l'influence de la température et de la force ionique sur leur comportement en solution.

RÉFÉRENCES

- AEBISCHER, P. et ZIELINSKI, B. A. (1999). *Particulate non cross-linked chitosan core matrices for encapsulated cells*. Brevet
- AGNIHOTRI, Sunil A., MALLIKARJUNA, Nadagouda N., AMINABHAVI, Tejjraj M. (2004). "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery" *Journal of Controlled Release*. 100. 5-28.
- ALPAR, H. Oya, SOMAVARAPU, S., ATUAH, K. N., BRAMWELL, V. W. (2005). "Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery" *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57. 411-430.
- ANG, T. H., SULTANA, F. S. A., HUTMACHER, D. W., WONG, Y. S., FUH, J. Y. H., MO, X. M., LOH, H. T., BURDET, E., TEOH, S. H. (2002). "Fabrication of 3D chitosan-hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system" *Materials Science & Engineering C*. 20. 35-42.
- ANTHONSEN, Marit W., VARUM, Kjell M. et SMIDSROD, Olav. (1993). "Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation" *Carbohydrate Polymers*. 22. 193-201.
- BARANY, Sandor, SZEPESSZENTGYÖRGYI, Adam. (2004). "Flocculation of cellular suspensions by polyelectrolytes" *Advances in Colloid and Interface Science*. 111. 117-129.
- BAYARRI, S., RIVAS, I., COSTELL, E. et DURAN, L. (2001). "Diffusion of sucrose and aspartame in kappa-carrageenan and gellan gum gels" *Food Hydrocolloids*. 15:1. 67-73.
- BEAUDOIN, Gaston J. et JULIEN, Marius. (1980). *Chimie des solutions, précis*. Le Griffon d'argile. Sainte-Foy. 223 p.
- BERGER, J., REIST, M., MAYER, J. M., FELT, O., PEPPAS, N. A., GURNY, R. (2004). "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 57. 19-34.
- BERGER, J., REIST, M., CHENITE, A., FELT-BAEYENS, O., MAYER, J. M. et GURNY, R. (2005). "Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application" *International Journal of Pharmaceutics*. 288:1. 17-25.

- BERTH, Gisela, DAUTZENBERG, Herbert et PETER, Martin G. (1998). "Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation" *Carbohydrate Polymers*. 36. 205-216.
- BORDERIAS, A. J., SANCHEZ-ALONSO, I., PEREZ-MATEOS, M. (2005). "New applications of fibres in foods: Addition to fishery products" *Food Science & Technology*. 16. 458-465.
- BORUKHOV, Itamar, ANDELMAN, David, BORREGA, Regis, CLOITRE, Michel, LEIBLER, Ludwik et ORLAND, Henri. (2000). "Polyelectrolyte titration: theory and experiment" *J Physical Chem B*. 104:47. 11027-11034.
- BRUGNEROTTO, Joel, DESBRIÈRES, Jacques, ROBERTS, George et RINAUDO, Marguerite. (2001). "Characterization of Chitosan by Steric Exclusion Chromatography" *Polymer*. 4:9921-9927.
- BUSCHMANN M D et GRODZINSKY A J. (1995). "A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics" *Journal of biomechanical engineering*. 117:2. 179-92.
- CARNIE, Steven L. et TORRIE, Glenn M. (1984). "The statistical mechanics of the electrical double layer" *Advances in Chemical Physics*. 56:141-253.
- CHEN, C., LIAU, W., TSAI, G. (1998). "Antibacterial Effects of N-Sulfonated and N-Sulfobenzoyl Chitosan and Application to Oyster Preservation" *Journal of Food Protection*. 61. 1124-1128.
- CHENITE, A., BUSCHMANN, M., WANG, D., CHAPUT, C. et KANDANI, N. (2001). "Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions" *Carbohydrate Polymers*. 46:1. 39-47.
- CHENITE, A., CHAPUT, C., WANG, D., COMBES, C., BUSCHMANN, M. D., HOEMANN, C. D., LEROUX, J. C., ATKINSON, B. L., BINETTE, F. et SELMANI, A. (2000). "Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ" *Biomaterials*. 21:21. 2155-2161.
- CHENITE, Abdellatif, CHAPUT, Cyril, COMBES, Christele, JALAL, Fayrouz et SELMANI, Amine. (1998). *Temperature-controlled pH-dependant formation of ionic polysaccharide gels*. 53 p. Int. Cl. Brevet WO.
- CLELAND, Robert L., WANG, John L. et DETWEILER, David M. (1982). "Polyelectrolyte properties of sodium hyaluronate. 2. Potentiometric titration of hyaluronic acid" *Macromolecules*. 15:2. 386-95.

- CONSONNI, R., AROSIO, I., BELLONI, B., FOGOLARI, F., FUSI, P., SHEHI, E. et ZETTA, L. (2003). "Investigations of Sso7d catalytic residues by NMR titration shifts and electrostatic calculations" *Biochemistry*. 42:6. 1421-1429.
- CRINI, Grégorio. (2005). "Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment" *Progress in Polymer Science*. 30. 38-70.
- CUROTTO, E et AROS, F. (1993). "Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups" *Analytical biochemistry*. 211:2. 240-1.
- DESBRIERES, J., MARTINEZ, C. et RINAUDO, M. (1996). "Hydrophobic derivatives of chitosan: characterization and rheological behavior" *International journal of biological macromolecules*. 19:1. 21-28.
- DEVLIN, Thomas M. (1997). *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Wiley-Liss. New York. Wiley-Liss. 1186 p.
- DI MARTINO, Alberto, SITTINGER, Michael, RISBUD, Makarand V. (2005). "Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering" *Biomaterials*. 26. 5983-5990.
- DOMARD, A. (1987). "pH and CD measurements on a fully deacetylated chitosan: application to copper(II)-polymer interactions" *International journal of biological macromolecules*. 9:2. 98-104.
- DONNAN, F. G. (1911). *Z.Elektrochem*. 17:572-581.
- DRAGET, Kurt Ingar, OESTGAARD, Kjetill et SMIDSROED, Olav. (1990). "Homogeneous alginate gels: a technical approach" *Carbohydrate Polymers*. 14:2. 159-178.
- ERRINGTON, N., HARDING, S. E., VARUM, K. M. et ILLUM, L. (1993). "Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation" *International journal of biological macromolecules*. 15:2. 113-17.
- FERNANDES, Rohan, WU, Li-Qun, CHEN, Tianhong, YI, Hyunmin, RUBLOFF, Gary W., GHODSSI, Reza, BENTLEY, William E., PAYNE, Gregory F. (2003). "Electrochemically Induced Deposition of a Polysaccharide Hydrogel onto a Patterned Surface" *Langmuir*. 19. 4058-4062.
- FIXMAN, Marshall. (1979). "The Poisson-Boltzmann equation and its application to polyelectrolytes" *Journal Of Chemical Physics*. 70:11. 4995-5005.
- FUKADA, Harumi et TAKAHASHI, Katsutada. (1998). "Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride" *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 33:2. 159-166.

- GUIBAL, Eric. (2004). "Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review" *Separation and Purification Technology*. 38. 43-74.
- GUIBAL, Eric. (2005). "Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review" *Progress in Polymer Science*. 30. 71-109.
- HILL, Terrell L. (1986). *An introduction to statistical thermodynamics*. New York. Dover Publications. 508 p.
- HIRANO, S., SEINO H., AKIYAMA, Y. et I.NONAKA. (1990). "Chitosan : a biocompatible material for oral and intravenous administrations" *Progress in Biomedical Polymers*. 283-290.
- HOEMANN, C. D., HURTIG, M., ROSSAMACHA E., SUN, Jun, CHEVRIER, Anik, SHIVE MATTHEW et BUSCHMANN M. D. (2005). "Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants Significantly Improve Cartilage Repair in Microfractured Ovine Defects" *Journal of Bone and Joint Surgery*.
- HOEMANN, C. D., SUN, J., LEGARE, A., MCKEE, M. D. et BUSCHMANN, M. D. (2005). "Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle" *Osteoarthritis. Cartilage*. 13:4. 318-329.
- HOPPE-SEYLER, F. (1894). "Ueber Chitin und Cellulose" *Berichte*. 3329-3331.
- IL'INA, A. V., VARLAMOV, V. P. (2005). "Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes: A Review" *Applied Biochemistry and Microbiology*. 41:1. 5-11.
- ILLUM, Lisbeth, (1998). "Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient" *Pharmaceutical research*, 15:9. 1326-1331.
- IMERI, A. G., KNORR, E. (1988). "Effect of Chitosan on Yield and Compositional Data of Carrot and Apple Juice" *Journal of Food Sciences*. 53. 1707-1709.
- IRCP PUBLICATION 30, Part 2. (1980). *Limits for Intakes of Radionuclides by Workers*. Oxford. Pergamon Press.
- JACKSON et DAVID S. (1984). *Chitosan-glycerol-water gel*. 4,659,700 Brevet États-Unis.
- JIANG, Xuan, CHEN, Lirong et ZHONG, Wei. (2003). "A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan" *Carbohydrate Polymers*. 54:4. 457-463.
- JUNGINGER, Hans E., VERHOEF, J. Coos. (1998). "Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs – a fiction?" *Research Focus*. 1:9. 370-376.

- KNAPCZYK, Jan, KROWCZYNSKI, Leszek, PAWLIK, Boleslaw et LIBER, Zbigniew. (1989). *Pharmaceutical dosage forms with chitosan*. Brevet
- KOIDE, S. S. (1998). "Chitin-Chitosan Properties, Benefits and Risks" *Nutrition Research*. 18:6. 1091-1101.
- KOJIMA, Kazuo, OKAMOTO, Yoshiharu, MIYATAKE, Katsuyuki, KITAMURA, Yukisato, MINAMI, Saburo. (1998). "Collagen typing of granulation tissue induced by chitin and chitosan" *Carbohydrate Polymers*. 37. 109-113.
- KOTIN, Leonard et NAGASAWA, Mitsuru. (1962). "Chain Model for Polyelectrolytes. VII. Potentiometric Titration and Ion Binding in Solutions of Linear Polyelectrolytes" *The Journal of Chemical Physics*. 36:4. 873-879.
- KRAJEWSKA, Barbara. (2004). "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review" *Enzyme and Microbial Technology*. 35. 126-139.
- KRAJEWSKA, Barbara. (2005). "Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials" *Separation and Purification Technology*. 41. 305-312.
- KUMAR, Anil. (2005). "Pressure dependence of the dissociation of acetic, benzoic, mandelic and succinic acids at 298.15K" *Thermochimica acta*. 439. 154-157.
- KUMAR, M. N., MUZZARELLI, R. A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H. et DOMB, A. J. (2004). "Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives" *Chem.Rev.* 104:12. 6017-6084.
- LAVERTU, M., XIA, Z., SERREQUI, A. N., BERRADA, M., RODRIGUES, A., WANG, D., BUSCHMANN, M. D. et GUPTA, Ajay. (2003). "A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32:6. 1149-1158.
- LAVERTU, Marc, METHOT, Stephane, TRAN-KHANH, Nicolas et BUSCHMANN M D. (2005). "Achievement of high efficiency gene transfer using chitosan/dna nonoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation" *Journal of Controlled Release*.
- LEE, K. Y., HA, W. S., PARK W. H. (1995). "Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives" *Biomaterials*. 16. 1211-1216.
- LEHR, Claus-Michael, BOUWSTRA, Joke A., SCHACHT, Etienne H., JUNGINGER, Hans E. (1992). "In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers" *International Journal of Pharmaceutics*. 78:1. 43-48.

- LIAO, N. (1993). *Total Phosphorus in Kjeldahl Digests*. Milwaukee, WI : LACHAT Instruments. 25 p. QuikChem Method 10-115-01-1-C.
- LIU, Wen Guang, ZHANG, Xin, SUN, Shu Jun, SUN, Guang Jie, YAO, Kang De, LIANG, Dong Chun, GUO, Gang et ZHANG, Jing Yu. (2003). "N-Alkylated Chitosan as a Potential Nonviral Vector for Gene Transfection" *Bioconjugate Chemistry*. 14:4. 782-789.
- LUO, Xi-Liang, XU, Jing-Juan, DU, Ying, CHEN, Hong-Yuan. (2004). "A glucose biosensor based on chitosan–glucose oxidase–gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition" *Analytical Biochemistry*. 334. 284-289.
- MACLAUGHLIN, Fiona C., MUMPER, Russell J., WANG, Jijun, TAGLIAFERRI, Jenna M., GILL, Inder, HINCHCLIFFE, Mike et ROLLAND, Alain P. (1998). "Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery" *Journal of Controlled Release*. 56:1-3. 259-272.
- MACQUARRIE, Duncan J., HARDY, Jeff J. E. (2005). "Applications of Functionalized Chitosan in Catalysis" *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 44. 8499-8520.
- MAHER, W., KRIKOWA, F., WRUCK, D., LOUIE, H., NGUYEN, T. et HUANG, W. Y. (2002). "Determination of total phosphorus and nitrogen in turbid waters by oxidation with alkaline potassium peroxodisulfate and low pressure microwave digestion, autoclave heating or the use of closed vessels in a hot water bath: comparison with Kjeldahl digestion" *Analytica Chimica Acta*. 463:2. 283-293.
- MAKINO, Kimiko, SUZUKI, Ken, SAKURAI, Yasuhisa, OKANO, Teruo et OHSHIMA, Hiroyuki. (1995). "Electro-osmosis on a Thermosensitive-Hydrogel Surface" *Journal Of Colloid And Interface Science*. 174:2. 400-404.
- MAKINO, Kimiko, YAMAMOTO, Satoshi, FUJIMOTO, Keiji, KAWAGUCHI, Haruma et OHSHIMA, Hiroyuki. (1994). "Surface Structure of Latex Particles Covered with Temperature-Sensitive Hydrogel Layers" *Journal Of Colloid And Interface Science*. 166:1. 251-258.
- MALON, A., WAGNER, B., BULSKA, E. et MAJ-ZURAWSKA, M. (2002). "Comparison of the potentiometric, (31)P NMR, and zero-point titration methods of determining ionized magnesium in erythrocytes" *Anal.Biochem*. 302:2. 220-223.
- MANDEL, M. (1992). "The poisson-boltzmann equation for aqueous-solutions of strong polyelectrolytes without added salt - the cell model revisited" *Journal Of Physical Chemistry*. 96:10. 3934-3942.

- MARCUS, R. A. (1955). "Calculation of thermodynamic properties of polyelectrolytes" *Journal Of Chemical Physics*. 23:1057-68.
- MAROUDAS, A. (1968). "Physicochemical properties of cartilage in the light of ion exchange theory" *Biophys.J.* 8:5. 575-595.
- MAROUDAS, A. et EVANS, H. (1972). "A study of ionic equilibria in cartilage" *Connective Tissue Research*. 1:69-77.
- MAROUDAS, A., MUIR, H. et WINGHAM, J. (1969). "The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage" *Biochim.Biophys.Acta*. 177:3. 492-500.
- MAZEAU, K., WINTER, W. T. et CHANZY, H. (1994). "Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data" *Macromolecules*. 27:7606-7612.
- MEDZON, E. L. et GEDIES, A. (1971). "Substitution of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES) for bicarbonate in protein-free animal cell culture medium: application to vaccinia virus quantitation and fluorogenic acetylerase assay in living LM cells" *Can.J.Microbiol.* 17:5. 651-653.
- MI Fwu-Long, WU, Yu-Bey, SHYU, Shin-Shing, CHAO, An-Chong, LAI, Juin-Yih, SU, Chia-Ching. (2003). "Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release" *Journal of Membrane Science*. 212. 237-254.
- MONTEIRO Jr., Oyrton A. C., AIROLDI, Claudio. (1999). "Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system" *Biological Macromolecules*. 26. 119-128.
- MUZZARELLI, R. A., (1977). *Chitin*. Oxford. Pergamon Press, Toronto. 309 p.
- MUZZARELLI, R. A., ILARI, P. et PETRARULO, M. (1994). "Solubility and structure of N-carboxymethylchitosan" *Int J Biol Macromol.* 16:4. 177-80.
- MUZZARELLI, R. A., MATTIOLI-BELMONTE, M., PUGNALONI, A. et BIAGINI, G. (1999). "Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing" *EXS*. 87:251-64.
- NEUBERGER, Albert et FLETCHER, A. P. (1971). "Ionization constants of 2-amino-2-deoxy-D-glucose and the anomeric effect" *Carbohydrate Research*. 17:1. 79-88.
- NISHIO, Takuhiro. (1994). "Monte Carlo simulations on potentiometric titration of cylindrical polyelectrolytes: introduction of a method and its application to model systems without added salt" *Biophysical Chemistry*. 49:3. 201-14.

- NITTA, Katsutoshi et SUGAI, Shintaro. (1974). "Polymer concentration dependence of surface electric potential of cylindrical polyelectrolyte in aqueous salt solutions" *Journal Of Physical Chemistry*. 78:12. 1189-93.
- NYSTRÖM, Bo, KJONIKSEN, Anna-Lena, IVERSEN, Christian. (1999). "Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity" *Advances in Colloid and Interface Science*. 79. 81-103.
- OKUYAMA, K., NOGUCHI, K., MIYAZAWA, T., YUI, T. et OGAWA, K. (1997). "Molecular and crystal structure of hydrated chitosan" *Macromolecules*. 30:19. 5849-5855.
- PAINTER, Paul C. et COLEMAN, Michael M. (1997). *Fundamentals of polymer science : an introductory text*. 2nd. Pennsylvanie. Technomic. 478 p.
- PARK, Joon Woo, CHOI, Kyung Hee et PARK, Kwanghee Koh. (1983). "Acid-base equilibriums and related properties of chitosan" *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 4:2. 68-72.
- POTEMKIN, Igor I., ANDREENKO, Stepan A. et KHOKHLOV, Alexei R. (2001). "Associating polyelectrolyte solutions: Normal and anomalous reversible gelation" *Journal Of Chemical Physics*. 115:10. 4862-4872.
- RAO, S. B., Sharma, C. P. (1997). "Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential" *Journal of Biomedical Materials Research*. 34. 21-28.
- REICHL, L. E. (1998). *A Modern Course in Statistical Physics, 2nd edition*. New York. John Wiley & Sons, Inc. 822 p.
- RINAUDO M, MILAS M et LE DUNG P. (1993). "Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion" *International journal of biological macromolecules*. 15:5. 281-5.
- RINAUDO, M., PAVLOV, G. et DESBRIERES, J. (1999). "Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan" *Polymer*. 40:25. 7029-7032.
- RUNGSARDTHONG, U., EHTEZAZI, T., BAILEY, L., ARMES, S. P., GARNETT, M. C. et STOLNIK, S. (2003). "Effect of polymer ionization on the interaction with DNA in nonviral gene delivery systems" *Biomacromolecules*. 4:3. 683-690.
- SASHIWA, Hitoshi, AIBA, Sei-ichi. (2004). "Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials" *Progress in Polymer Science*. 29. 887-908.
- SCHATZ, Christophe, VITON, Christophe, DELAIR, Thierry, PICHOT, Christian et DOMARD, Alain. (2003). "Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution" *Biomacromolecules*. 4:3. 641-648.

- SHAHIDI, Fereidoon, ARACHCHI, Janak Kamil Vidana, JEON, You-Jin. (1999). "Food applications of chitin and chitosans" *Food Science & Technology*. 10. 37-51.
- SHAVIT, Uri, SHAVIV, Avi et ZASLAVSKY, Dan. (1995). "Solute diffusion coefficient in the internal medium of a new gel based controlled release fertilizer" *Journal of Controlled Release*. 37:1-2. 21-32.
- SHU, X. Z., ZHU, K. J. et SONG, W. (2001). "Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release" *Int J Pharm*. 212:1. 19-28.
- SIEGEL, Ronald A. et CORNEJO-BRAVO, Jose M. (1992). "Hydrophobic polyelectrolytes. Effect of hydrophobicity on buffering and colloid osmotic pressure" *ACS Symposium Series*. 480: Polyelectrolyte Gels. 131-45.
- SIMPSON, B. K., GAGNE, N., ASHIE, I. N. A., NOROOZI, E. (1997). "Utilization of Chitosan for Preservation of Raw Shrimp (*Pandalus Borealis*) " *Food Biotechnologies*. 11. 24-44.
- SINHA, V. R., SINGLA, A. K., WADHAWAN, R. Kaushik, KUMRIA, R., BANSAL, K., DHAWAN, S. (2004). "Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs" *International Journal of Pharmaceutics*. 274. 1-33.
- SKJAAK-BRAEK, Gudmund, GRASDALEN, Hans et SMIDSROED, Olav. (1989). "Inhomogeneous polysaccharide ionic gels" *Carbohydrate Polymers*. 10:1. 31-54.
- SKJAK-BRAEK, Gudmund, ANTHONSEN, Thorleif et SANDFORD, Paul. (1989). *Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties, and Applications*.
- SMIDSROD, Olay, OTTOY, Mette H., ANTHONSEN, Marit W. et VARUM, Kjell M. (1997). "Solution properties of chitosan" *Advances in Chitin Science*. 2:402-409.
- SMITS, R. G., KOPER, G. J. M. et MANDEL, M. (1993). "The influence of nearest- and next-nearest-neighbor interactions on the potentiometric titration of linear poly(ethylenimine)" *Journal Of Physical Chemistry*. 97:21. 5745-51.
- SORLIER, Pierre, DENUZIÈRE, Anne, VITON, Christophe et DOMARD, Alain. (2001). "Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan" *Biomacromolecules*. 2:765-772.
- SORLIER, Pierre, ROCHAS, Cyrille, MORFIN, Isabelle, VITON, Christophe et DOMARD, Alain. (2003). "Light scattering studies of the solution properties of chitosans of varying degrees of acetylation" *Biomacromolecules*. 4:4. 1034-1040.

- STRAND, S. P., TOMMERAAS, K., VARUM, K. M. et OSTGAARD, K. (2001). "Electrophoretic light scattering studies of chitosans with different degrees of N-acetylation" *Biomacromolecules*. 2:4. 1310-4.
- TANAKA, Fumihiko et SAHIKO, Masahiko. (1995). "Thermoreversible gelation of hydrated polymers" *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 91:16. 2663-2670.
- TERAYAMA, Hiroshi. (1952). "Method of colloid titration (a new titration between polymer ions)" *Journal of Polymer Science*. 8:243-53.
- THANOU, M., VERHOEF, J. C., JUNGINGER, H. E. (2001). "Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives" *Advanced Drug Delivery Reviews*. 52. 117-126.
- TOEI, Kyoji et SAWADA, Miho. (1977). "A turbidimetric method for colloid titrations" *Analytica Chimica Acta*. 89:2. 383-9.
- TOKUMITSU, Hiroyuki, ICHIKAWA, Hideki, FUKUMORI, Yoshinobu. (1999). "Chitosan-Gadopentetic Acid Complex Nanoparticles for Gadolinium Neutron-Capture Therapy of Cancer: Preparation by Novel Emulsion-Droplet Coalescence Technique and Characterization" *Pharmaceutical Research*. 16:12. 1830-1835.
- TOLAIMATE, A., DESBRIERES, J., RHAZI, M. et ALAGUI, A. (2003). "Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties" *Polymer*. 44:26. 7939-7952.
- TSUKADA, Satoshi et INOUE, Yasuo. (1981). "Conformational properties of chitooligosaccharides: titration, optical rotation, and carbon-13 NMR studies of chitooligosaccharides" *Carbohydrate Research*. 88:1. 19-38.
- UENO, H., YAMADA, H., TANAKA, I., KABA, N., MATSUURA, M., OKUMURA, M., KADOSAWA, T. et FUJINAGA, T. (1999). "Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs" *Biomaterials*. 20:15. 1407-14.
- ULLNER, Magnus. (2002). "Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications, Vol. 3 , Chapter 10". *Polyelectrolyte Models in Theory and Simulation*.
- ULLNER, Magnus, JOENSSON, Bo, SOEDERBERG, Bo et PETERSON, Carsten. (1996). "A Monte Carlo study of titrating polyelectrolytes" *Journal Of Chemical Physics*. 104:8. 3048-57.

- VALANTA, Claudia, AUNER, Barbara G. (2004). "The use of polymers for dermal and transdermal delivery" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58. 279-289.
- VANDEVORD P. J., MATTHEW H. W., DESILVA, S. P., MAYTON, L., WU, B., WOOLEY, P. H. (2002). "Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice" *Journal of Biomedical Materials Research*. 59. 585-590.
- VARUM, K. M., ANTHONSEN, M. W., GRASDALEN, H. et SMIDSROD, O. (1991). "Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy" *Carbohydrate Research*. 211:1. 17-23.
- VARUM, Kjell M., OTTOY, Mette H. et SMIDSROD, Olav. (1994). "Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation" *Carbohydrate Polymers*. 25:65-70.
- VOET, Donald et VOET, Judith G. (1998). *Biochimie 2e édition*. De Boeck. Italie. John Wiley & Sons. 1361 p.
- WIDOM, B., BHIMALAPURAM, P. et KOGA, Kenichiro. (2003). "The hydrophobic effect" *Physical chemistry chemical physics*. 5:3085-3093.
- WU, Li-Qun, GADRE, Anand P., YI, Hyunmin, KASTANTIN, Mark J., RUBLOFF, Gary W., BENTLEY, William E., PAYNE, Gregory F., GHODSSI, Reza. (2002). "Voltage-Dependent Assembly of the Polysaccharide Chitosan onto an Electrode Surface" *Langmuir*. 18. 8620-8625.
- YI, Hyunmin, WU, Li-Qun, BENTLEY, William E., GHODSSI, Reza, RUBLOFF, Gary W., CULVER, James N., PAYNE, Gregory F. (2005). "Biofabrication with Chitosan" *Biomacromolecules*, 6:6. 2881-2894.
- YU, S. U., PARK, E. W., CHOI, Y. W. (1998). "Drug release characteristics and skin irritancies of topical gels and multiple emulsion creams containing kojic acid" *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*. 28. 87-92.
- ZHANG, Lina, TAKEMATSU, Toshiyuki et NORISUYE, Takashi. (1987). "Potentiometric titration of xanthan" *Macromolecules*. 20:11. 2882-7.
- ZIELINSKI, B. A. et AEBISCHER, P. (1994). "Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation" *Biomaterials*. 15:13. 1049-1056.