

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

FABRICATION DE SUBSTRATS ULTRA-POREUX À PARTIR
DE MÉLANGES DE POLYMÈRES

XAVIER ROY

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

AOÛT 2004



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: 978-0-494-47685-7
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-47685-7

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

Ce mémoire intitulé:

FABRICATION DE SUBSTRATS ULTRA-POREUX À PARTIR
DE MÉLANGES DE POLYMÈRES

présenté par: ROY Xavier

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès Sciences Appliquées

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

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., président

M. FAVIS Basil D., Ph.D., membre et directeur de recherche

M. BERTRAND François, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Ces remerciements s'adressent à :

Monsieur Basil D. Favis pour l'encadrement qu'il m'a fourni tout au long de ma maîtrise et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée dans un projet aussi ambitieux.

Pierre Sarazin pour les innombrables heures qu'il m'a consacrées, les conseils qu'il m'a donnés et les idées de génie qu'il m'a généreusement proposées.

Nick Virgilio pour toutes les discussions à tenter de comprendre les phénomènes observés. Je le remercie aussi de m'avoir énormément aidé dans la préparation des échantillons au FIB.

Monsieur Mario Jolicoeur et Monsieur Michael D. Buschmann pour m'avoir permis d'utiliser leurs équipements.

L'équipe de techniciens, principalement Gino Robin, Jacques Beausoleil et Carol Painchaud qui m'ont aidé et conseillé dans la réalisation de montages peu conventionnels.

Le personnel du CRASP et du département de génie chimique, ainsi que tous les étudiants au baccalauréat et aux études supérieures que j'ai côtoyés. Je tiens particulièrement à remercier pêle mèle Nicolas Hudon, Philippe Micone, Frédérick Marescot, Sébastien Roldàn, Marylène Dussault, Mathieu Cloutier, Tommy Désilets, Sarah Amar, Maxime St-Pierre et Nicolas Dufaure.

Je tiens finalement à remercier mes parents Christian et Manon qui m'ont toujours appuyés, Alain et Paulyne et avec toute mon affection Sofie.

RÉSUMÉ

Le génie tissulaire est un domaine de recherche multidisciplinaire en émergence qui vise à développer des substituts biologiques capables de rétablir, maintenir et améliorer les fonctions biologiques d'un organe malade. La technique proposée consiste à faire croître dans une structure tridimensionnelle des cellules susceptibles d'initier la régénération de tissus endommagés. La colonisation cellulaire du substrat, qui peut être pré- ou post-implantation, est habituellement stimulée à l'aide de molécules messagères (facteurs de croissance). Le choix du substrat est d'une importance capitale puisque celui-ci procure au système une stabilité mécanique, supporte la croissance tissulaire en favorisant l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire et aide à la formation de la structure tridimensionnelle du tissu régénéré. La structure idéale doit donc être tridimensionnel et hautement poreuse, posséder un réseau de pores uniformément distribués et totalement interconnectés, présenter une grande aire de surface interne et finalement offrir une rigidité mécanique suffisante.

L'objectif de ce projet était de développer une méthode permettant de fabriquer des structures répondant le plus adéquatement possible aux critères énumérés. Les substrats ultra-poreux ont été produits à partir de structures poreuses co-continues fabriquées à l'aide d'une méthode de mélanges de polymères à l'état fondu. Ces structures co-continues possèdent des caractéristiques particulièrement intéressantes pour la croissance tissulaire, mais leur fraction de vide est limitée à 60%. L'idée était donc de déposer un mince film à l'intérieur de leur porosité pour ensuite éliminer la matrice structurelle. La technique de déposition de films auto-assemblés couche-par-couche a été employée parce qu'elle offrait la possibilité de contrôler l'épaisseur du dépôt et d'y incorporer des molécules bioactives.

La méthode de fabrication de substrat ultra-poreux développée dans le cadre de cette étude est nommée méthode de réplique de structures co-continues par déposition

CPC – dissolution de la matrice structurelle. Les systèmes à répliquer sont produits via l'extraction de la phase porogène (PCL) d'un mélange PLLA/PCL 50/50. Par la suite, la surface interne des structures est recouverte d'un film multicouche auto-assemblé PDADMAC/PSS/BSA à l'aide de la méthode de déposition CPC. Finalement, la matrice structurelle est extraite et le substrat résultant est lyophilisé. À chaque étape du procédé, la porosité des échantillons a été calculée, leur aire de surface interne a été mesurée à l'aide de la technique BET et leur microstructure a été analysée au SEM.

Des structures possédant des porosités réelles de 98,7% et 99,6% et des aires de surface interne de $140 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ et $62,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ont été fabriquées. Tel que souhaité, le procédé de réplication a permis de préserver la morphologie co-continue des systèmes initiaux. Des pores d'environ $1,4 \mu\text{m}$ et $6,3 \mu\text{m}$ ont été générés. La comparaison des aires de surface volumique (avant et après l'extraction de la matrice structurelle) a démontré que la totalité de la surface des pores a été recouverte d'un mince film organique. Le recouvrement de la surface de PLLA lors de la déposition du BSA a été estimé à 2,1 et $2,7 \text{ mg m}^{-2}$ pour des tailles de pores de $1,4 \mu\text{m}$ et $6,3 \mu\text{m}$ respectivement. Parallèlement au développement de la méthode de réplication, une technique de préparation des échantillons ultra-poreux au faisceau ionique focalisé (FIB) a été mise au point. Cette technique a été employée pour minimiser la déformation des structures lors de l'analyse au SEM.

Il existe actuellement plusieurs techniques de fabrication de substrats biomédicaux poreux : immobilisation d'un réseau de fibres non-tissées, évaporation de solvant/lixiviation de particules, moussage, séparation de phases, émulsion, lyophilisation, etc. Les substrats fabriqués selon la méthode développée dans ce projet se comparent avantageusement à ceux produits à l'aide des techniques « classiques ». Les fractions de vide et les aires de surface interne obtenues sont parmi les plus élevées jusqu'ici rapportées en génie tissulaire. La méthode offre un bon contrôle de la porosité puisqu'elle permet de faire varier efficacement le diamètre des pores sur une gamme

allant du micron au dixième de millimètre. De plus, la morphologie co-continue du réseau poreux garantit à la structure une taille d'interconnexion comparable au diamètre des pores, ce qui facilite la colonisation cellulaire. La méthode a l'avantage de ne pas être limitée à un seul type de système polymère; des substrats composés de différents polymères et biopolymères pourraient effectivement être fabriqués selon la méthode de réplique de structure co-continue par déposition CPC – dissolution de la matrice structurelle.

ABSTRACT

Tissue engineering is a growing multidisciplinary field of research which aims at developing biological substitutes able to restore, maintain and improve the biological functions of a damaged organ. The technique consists in growing in a three-dimensional structure cells capable of initiating the regeneration of the tissue. The cellular invasion of the scaffold, which can be pre- or post-implantation, is usually activated using messenger molecules (growth factors). The choice of the substrate to be used is very important because the scaffold provides mechanical stability to the system encourages cellular growth by supporting adhesion, migration and differentiation of the cells and helps in the determination of the extra-cellular matrix of the regenerated tissue. The ideal structure should be three-dimensional and highly porous, have a uniformly distributed and totally interconnected pore network, exhibit a large internal surface area and present a sufficient mechanical strength.

The objective of this project was to develop a method to fabricate scaffolds answering those criteria. The ultra-porous substrates were produced from co-continuous porous structures produced using a polymer melt-blending technique. Those co-continuous structures possessed particularly interesting characteristics for cellular culture, but their void fraction was limited to 60%. The idea was to deposit a thin film inside their porosity and then remove the template. The layer-by-layer self-assembling deposition technique was used because of its potential to control the coating thickness and to incorporate bioactive molecules in the process.

The fabrication method developed in this study is named replication of co-continuous structures by layer-by-layer deposition – removal of the template. The systems to be replicated were produced by extracting the porogen phase (PCL) from a PLLA/PCL 50/50 blend. Using the LBL deposition method, the internal surface of the structures was coated with a self-assembled multilayered PDADMAC/PSS/BSA film. Finally, the

template matrix was extracted and the resulting substrate was freeze-dried. The internal surface area of the samples was measured using the BET technique and their microstructure was examined using the SEM.

Scaffolds with porosities as high as 98.7% and 99.6% and internal surface areas of $140 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ and $62.5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ were fabricated. As envisaged, the replication process preserved the co-continuous morphology of the initial systems. Pores around $1.4 \text{ }\mu\text{m}$ and $6.3 \text{ }\mu\text{m}$ were generated. By comparing the internal surface areas measured before and after the extraction of the template, it was shown that the totality of the pore surface was coated with a thin organic film. The PLLA surface coverage for the deposition of BSA was estimated at 2.1 mg m^{-2} and 2.7 mg m^{-2} for pore size of $1.4 \text{ }\mu\text{m}$ and $6.3 \text{ }\mu\text{m}$ respectively. Also, a new technique for the preparation of the ultra-porous scaffolds using the FIB was developed and was used to minimize the deformation of the structures before the SEM analyzes.

Several techniques of fabrication of porous biomedical scaffolds have already been developed: fiber bonding of unwoven meshes, solvent casting, particular leaching, gas foaming, phase separation, emulsification, supercritical fluid technology, freeze-drying, etc. The structures prepared using our replication method compare themselves advantageously with those produced using the “classic” techniques. The void fractions and the internal surface areas obtained are in the highest ever reported in this field of research. The attainable pore size range from microns to tenths of millimeters. Moreover, the co-continuous morphology of the porous network guarantees an interconnection size comparable to the pore diameter, which should facilitate the cellular invasion of the scaffold. The method also has the advantage not to be limited to one type of polymer system. Scaffolds made of different polymers and biopolymers could indeed be fabricated using the replication technique by deposition CPC – removal of the template.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	viii
TABLE DES MATIÈRES	x
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES FIGURES	xv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
2.1 Substrats poreux en génie tissulaire	4
2.1.1 Le génie tissulaire	4
2.1.2 Critères de conception des substrats poreux pour la croissance tissulaire	5
2.1.3 Techniques classiques de fabrication de substrats poreux pour la croissance tissulaire	9
2.1.3.1 Matériaux textiles	9
2.1.3.2 Lixiviation de particules	10
2.1.3.3 Séparation de phase et émulsion	10
2.1.3.4 Moussage	11
2.2 La structure co-continue et les paramètres de contrôle	13
2.2.1 Généralités	13
2.2.2 Contrôle de la morphologie co-continue	15
2.2.2.1 Viscosité des phases et ratio de viscosité	15

2.2.2.2 Tension interfaciale et compatibilisation de l'interface	16
2.2.2.3 Recuit statique.....	16
2.3 Polyélectrolytes	18
2.3.1 Introduction aux polyélectrolytes	18
2.3.2 Théorie des polyélectrolytes en solution	19
2.3.2.1 La chaîne polyélectrolyte	19
2.3.2.2 Environnement électrolytique	20
2.3.2.3 Condensation des contreions.....	23
2.3.2.4 Conformation des chaînes électrolytiques	26
2.3.2.4.1 Solutions diluées	26
2.3.2.4.2 Solutions semi-diluées et concentrées	28
2.3.3 Complexes polyélectrolytes.....	29
2.3.4 Dépôt auto-assemblée couche-par-couche de polyélectrolytes	30
2.3.4.1 Contribution des différentes interactions (électrostatiques, entropiques et hydrophobes)	31
2.3.4.2 Surcompensation et distribution des charges, force ionique de la solution et structure des multicouches	33
2.3.4.3 Irréversibilité du processus d'adsorption et temps de dépôt	40
2.3.4.4 Qualité du solvant	42
2.3.4.5 Influence de la densité de charge des polyélectrolytes	44
2.3.5 Dépôt auto-assemblée couche-par-couche de films composites sur des surfaces planes et complexes.....	47
2.3.5.1 Multicouches auto-assemblées polyélectrolytes/protéines	47
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE	51
3.1 Matériaux.....	51
3.2 Fabrication des structures modèles de PLLA.....	52

3.3 Dépôt des multicouches auto-assemblées polyélectrolytes/protéines à l'intérieur des structures poreuses de PLLA.....	52
3.4 Extraction de la structure modèle de PLLA recouvertes et lyophilisation des substrats ultra-poreux	53
3.5 Caractérisation des structures modèles de PLLA avant et après le dépôt des multicouches auto-assemblées polyélectrolytes/protéines et des substrats ultra-poreux	54
3.5.1 Continuité des mélanges PLLA/PCL.....	54
3.5.2 Fraction de vide	54
3.5.3 Aire de surface interne et diamètre des pores	55
3.5.4 Morphologie des substrats	56
 CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION	59
4.1 Méthode de réplique de structures co-continues par dépôt auto-assemblée couche-par-couche de films polyélectrolytes/protéines – dissolution de la matrice structurale.....	59
4.2 Structures poreuses co-continues	61
4.3 Dépôt auto-assemblée des multicouches composites PDADMAC/PSS/BSA	62
4.4 Extraction de la structure modèle de PLLA	65
4.5 Séchage de la structure par lyophilisation	67
4.6 Évolution des structures au cours du procédé	69
4.7 Morphologie des structures	75
4.7.1 Préparation des surfaces des substrats ultra-poreux au FIB	75
4.7.2 Morphologie des structures poreuses au cours du procédé	76
4.7.3 Évaluation de l'épaisseur des parois et de l'état de contrainte de la structure	81
4.8 Paramètres de contrôle de la morphologie, avantages et limitation de la méthode de réplique et perspectives.....	82

4.8.1 Paramètres de contrôle de la morphologie, du diamètre de pore et de la fraction de vide.....	83
4.8.2 Avantages de la méthode de réplique	84
4.8.3 Limitations de la méthode de réplique.....	86
4.8.4 Perspectives	87
 CHAPITRE 5 CONCLUSION	89
 RÉFÉRENCES	91
 ANNEXE 1 – LIBÉRATION CONTRÔLÉE DE BSA	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Revue des essais de régénération de tissus avec les tailles de pores associés (tiré de Sarazin et al., 2004).....	6
Tableau 3.1 Propriétés caractéristiques des polymères employés (tiré de Sarazin et al., 2004)	51
Tableau 4.1 Caractéristiques des structures modèles de PLLA	62

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Structure co-continue pour un mélange binaire A/B. À gauche, la phase A est conservée et la phase B est extraite, alors qu'à droite, la situation inverse est présentée (Gergen, 1996).	14
Figure 2.2 Pourcentage de continuité en fonction de la fraction volumique du polymère A dans un mélange de polymère fictif A/B préparé à l'état fondu.	14
Figure 2.3 Représentation schématique du modèle à deux phases (modèle de Manning) pour une distribution de contreions près d'une charge linéaire représentant une chaîne de polyélectrolyte (adaptée de Manning, 1972).	24
Figure 2.4 Relation de la densité de charge effective en fonction de la densité de charge linéaire fixe selon la théorie de la condensation des contreions (adaptée de Manning, 1972).	25
Figure 2.5 Effet de la concentration d'électrolyte BPM, c_s , sur le rayon de giration, R_g , pour une chaîne de poly(2-vinyle pyridine) 55-58 % d'éthyle quaternaire de 1000 nm de longueur dans l'eau. Les différents symboles correspondent aux différents contreions : F^- (carrés), Cl^- (cercles), Br^- (triangles) et I^- (triangles inversés). Le coion pour chaque contreion est le Na^+ (Beer et al., 1997).	27
Figure 2.6 Représentation schématique de la méthode de déposition auto-assemblée CPC de polyélectrolytes (adaptée de Bertrand et al., 2000).	30
L'équation 2.14 présente la réaction en jeu	31

Figure 2.7 Potentiel zeta en fonction du nombre de couches pour des particules colloïdales de polystyrène sulfate ($\varnothing = 640$ nm) sur lesquelles sont déposés différentes paires de polyélectrolytes à l'aide du procédé de déposition auto-assemblée CPC : poly(diallyldiméthylammonium chloré)/poly(sodium de 4-styrenesulfonate) (PDADMAC/PSS) (carrés), poly(allylamine hydrochloré)/poly(sodium de 4-styrenesulfonate) (PAH/PSS) (cercles), PDADMAC/ADN (triangles). Force ionique 1mM KNO₃, pH = 6,2 ± 0,2, déposition des polyélectrolytes PDADMAC/PSS et PDADMAC/ADN dans l'eau et PAH/PSS dans une solution 0,5 M NaCl. (Sukhorukov et al., 1998).....34

Figure 2.8 Adsorption schématisée de polycations sur une surface négative a) dans une solution peu concentrée en électrolytes BPM et b) dans une solution concentrée en électrolytes BPM (adaptée de Fleer et al., 1993).....35

Figure 2.9 Épaisseur du film déposé sur une surface de silicium en fonction du nombre de couches de PDADMAC/PSS à partir de solutions 10 mM polyélectrolytes et 0,1 M NaCl (Schlenoff et Dubas, 2001).....36

Figure 2.10 (a) Densité surfacique de charges pour la déposition auto-assemblée CPC de 15 (PDADMAC en surface; carrés) ou 14 (PSS en surface; triangle) couches de PDADMAC/PSS sur une surface originellement négative à partir de solutions 1 mM de polyélectrolytes et différentes concentrations de NaCl. (Schlenoff et Dubas, 2001); (b) Épaisseur totale d'un dépôt de 10 bicouches de PDADMAC/PSS sur une surface de mica à partir de solutions 1 nM de polyélectrolytes et différentes concentrations de NaCl. (Dubas et Schlenoff, 1999). 37

Figure 2.11 Images topographique AFM de la morphologie d'un film composé de 10 bicouches de PDADMAC/PSS déposées à partir de solutions (a) 0,1 M, (b) 0,3

M et (c) 1,0 M NaCl, 1 mg/ml polyélectrolytes. Les dimensions des images sont 5 μm X 5 μm et la dimension z est représentée sur l'échelle (McAloney et al., 2001). 38

Figure 2.12 Représentation schématique d'un film auto-assemblé de 10 couches de deux polyélectrolytes de charges opposées, chacun étant représenté par un profil de concentration arbitrairement choisi sinusoïdal. Les courbes de cercles représentent les profils de concentration mesurées d'un polyélectrolyte marqué au deutérium introduit toutes les quatre couches (Decher, 1997). 40

Figure 2.13 Épaisseur d'un film composé de 10 couches de PDADMAC/PSS en fonction du temps de déposition de chaque couche. Solution 1,0 M NaCl, 1 mM polyélectrolyte (Dubas et Schlenoff, 1999). 42

Figure 2.14 Représentation schématique d'une conformation de type collier caractéristique d'un polyélectrolyte solubilisé dans un mauvais solvant (Dobrynin et al., 1996). 43

Figure 2.15 Épaisseur d'un film de PAH/PSS déposé sur une surface d'or en fonction du nombre de couches pour différentes compositions du mélange eau/éthanol. Solution 0,5 M NaCl, 1 mg/ml polyélectrolyte dans l'eau pure (Poptoshev et al., 2004). 44

Figure 2.16 Épaisseur d'un film de 10 bicouches de (PDADMAC(f)-NMVA(1-f))/PSS) sur une surface de silicium en fonction du degré de charge (f) du polycation. Solution 0,1 M NaCl, 10^{-2} mono M polyélectrolytes. Le P(DADMAC(f)-NMVA(1-f)) est un copolymère statistique de DADMAC (segments chargés) et de NMVA (N-méthyle-N-vinylacetamide) (segments

neutres) dont la composition correspond au degré de charge ou à la densité de charge (Steitz et al., 2001). 45

Figure 2.17 Illustration schématique de la configuration de polyélectrolytes (a) de faible densité de charge et (b) de forte densité de charge, adsorbés à l'interface (Rojas et al., 2002). 46

Figure 2.18 Représentation de la structure de la protéine BSA à l'aide du modèle « *space filling* », avec les groupements basiques en gris, acides en rouge et neutre en jaune (Carter et Ho, 1994). 48

Figure 2.19 Illustration schématique simplifiée d'un film auto-assemblé de PSS/lysozyme/PSS/myoglobine (Lvov et al., 1995). 49

Figure 2.20 Épaisseur d'un film de PDADMAC/PSS/FITC-BSA déposé sur une particule de PS latex en fonction du nombre de couches pour différents pH de solution (H₂O : pH = 5,8 ; PBS : pH = 7,0) (Caruso et Möhwald, 1999b). 50

Figure 3.1 Méthode de préparation des substrats ultra-poreux pour l'observation au SEM de la morphologie interne à l'aide du faisceau ionique focalisé de Gallium (FIB) (d'après la méthode développée par Virgilio (2004) pour les mélanges massifs de polymères). 57

Figure 4.1. Illustration étape par étape de la méthode de réplcation de structures co-continues par déposition auto-assemblée couche-par-couche de films polyélectrolytes/protéines – dissolution de la matrice structurale. 60

Figure 4.2 Masse déposée en fonction du nombre de couches pour des multicouches PDADMAC/PSS/BSA assemblées sur la surface interne de

structures poreuses modèles produites à partir de mélanges PLLA/PCL 50/50 sans recuit (Système α) et recuits pendant 2 heures (Système β).....64

Figure 4.3 (a) Photographie d'un substrat de 10 couches de PDADMAC/PSS/BSA (4 bicouches PDADMAC/BSA) fabriqué à partir du Système β durant l'extraction de la matrice de PLLA dans du dichlorométhane; (b) Micrographie par balayage électronique d'une structure composée de 10 couches de PDADMAC/PSS/BSA fabriquée à partir du Système α après extraction dans du dichlorométhane pur. 66

Figure 4.4 Micrographie par balayage électronique (a) d'un substrat composée de 10 couches de PDADMAC/PSS/BSA (4 bicouches PDADMAC/BSA) fabriqué à partir du Système α extrait dans un mélange dichlorométhane/éthanol 95/5 et exposé à l'air humide lorsque encore froide et (b) de sa microstructure. 68

Figure 4.5 Micrographie par balayage électronique de la macrostructure et caractéristiques des structures produites après chaque étape du procédé. Uniquement les micrographies illustrant l'évolution du Système β sont présentées ici étant donné que des résultats très similaires ont été obtenus pour le Système α 70

Figure 4.6 Image FIB d'une anfractuosité générée dans une Structure ultra-poreuse α à l'aide d'un faisceau de Ga^+ de 30 kV et 0,8 nA (Faisceau I), avant l'affaissement de la structure attenante à l'aide du faisceau II. 76

Figure 4.7 Micrographies par balayage électronique de la morphologie interne des (colonne α) Structures α et (colonne β) β ; (a) et (b) avant la déposition; (c) et (d) après la déposition de 4 bicouches PDADMAC/BSA et (e) et (f) après l'extraction de la matrice structurelle de PLLA. 78

Figure 4.8 Micrographies par balayage électronique de la morphologie interne des Structures α partiellement extraite (a) vue oblique et (b) vue de face.....80

Figure 4.9 Micrographie par balayage électronique d'une paroi d'un substrat ultra-poreux β composée de 4 bicouches PDADMAC/BSA (a) à faible grossissement (X5000) et (b) à fort grossissement (X50000). 81

Figure 4.10 Micrographie par balayage électronique de la microstructure partiellement sectionnée d'un Substrat ultra-poreux β . L'état de contrainte du réseau est visible. 82

Figure A.1 Courbe de calibration de la diffusion du BSA dans l'eau étudiée à 280 nm. 107

Figure A.2 Courbe de calibration de la diffusion du BSA dans le PBS étudiée à 280 nm. 107

Figure A.3 Libération du BSA se trouvant dans une matrice de PLLA poreux (les caractéristiques morphologiques de la structures sont les même que le Système α décrit dans ce mémoire) dans du PBS à 37 °C. 108

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Il est généralement admis que plusieurs organes et tissus sont incapables de se régénérer adéquatement. Lorsque endommagés, leurs fonctions peuvent être temporairement substituées mécaniquement (dialyse et appareil de déviation cœur-poumons) ou ils peuvent être remplacés chirurgicalement par des organes de donneurs ou des implants synthétiques (vaisseaux sanguins artificiels et cartilages). Malheureusement, en raison du manque de donneurs et de substituts efficaces et durables, des milliers de patients meurent chaque année en attente d'une transplantation (Thomson et al., 1995). Même après la transplantation, le patient est loin d'être complètement hors de danger : réactions immunitaires, infections et rejets des implants sont des dangers communs pour le convalescent. En réponse à ces problèmes, les scientifiques sont maintenant à développer des traitements révolutionnaires basés sur la thérapie cellulaire.

Une des stratégies envisagées repose sur la création d'un dispositif hybride dans lequel des tissus biologiques sont combinés à un biomatériau et à des facteurs bioactifs dans le but de stimuler la régénération tissulaire (Langer et Vacanti, 1993). Ce dispositif peut être implanté seul pour induire la migration des cellules hôtes au niveau de la lésion ou être employé comme porteur de cellules dans le cadre de thérapies de remplacement cellulaire (Sharma et Elisseff, 2004). Le biomatériau doit procurer la stabilité mécanique nécessaire en début de croissance, supporter la croissance tissulaire en favorisant l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire, aider à la formation de la structure tridimensionnelle du tissu et ultimement être remplacé par une matrice extracellulaire régénérée (Babensee et al., 1998). Pour ce faire, le substrat idéal doit être tridimensionnel et hautement poreux, posséder un réseau de pores uniformément distribué et totalement interconnecté, et présenter une grande aire de surface interne (Maquet et Jerome, 1997; Agrawal et Ray, 2001; Hutmacher, 2001; Ma et Choi, 2001;

Mikos et Temenoff, 2000; Hou et al., 2003). Au cours des dernières années, de nombreuses techniques de fabrication de ces structures ont été développées : immobilisation d'un réseau de fibres non-tissées, évaporation de solvant/lixiviation de particules, moussage, séparation de phases, émulsion, et lyophilisation (pour un résumé, voir Hutmacher, 2000; Mikos et Temenoff, 2000). Ces techniques « classiques » sont généralement capables de produire des structures possédant une partie des qualités requises, mais aucune n'a été en mesure de toutes les obtenir. La présente étude fait donc partie d'un projet plus global dont l'objectif est le développement d'une méthode alternative de fabrication de substrats poreux pour la régénération tissulaire.

Récemment, une nouvelle méthode de fabrication basée sur le mélange à l'état fondu de deux polymères immiscibles a été décrite (Sarazin et Favis, 2003; Yuan et Favis, 2004; Sarazin et al., 2004). Le principe fondamental à la base de cette approche est de générer une microstructure co-continue pour ensuite enlever une des deux phases. Sarazin et Favis (2003) et Yuan et Favis (2004) ont démontré que la morphologie co-continue des systèmes poly(lactide)/polystyrène (PLLA/PS) et poly(lactide)/poly(ϵ -caprolactone) (PLLA/PCL) est contrôlée par la composition du mélange et la durée du recuit statique. L'extraction de la phase porogène (PS ou PCL) engendre une porosité entièrement interconnectée avec des diamètres allant du micron au dixième de millimètre et caractérisée par une grande aire de surface interne. Cette méthode est très prometteuse en raison de son potentiel à fabriquer des substrats de formes complexes avec des morphologies bien contrôlées sur une large gamme de diamètres de pores. Cependant, la fraction de vide atteignable est limitée théoriquement à 90% en raison de la région de co-continuité qui est bornée. Expérimentalement, des porosités de 75% ont été obtenues en utilisant le système PLLA/PS (Sarazin et Favis, 2003). Généralement, pour être employés pour la régénération tissulaire, les substrats doivent posséder plus de 95% de vide. L'idée développée dans cette étude est donc d'augmenter la limite de porosité de ces substrats co-continus en conservant les caractéristiques des systèmes initiaux.

Ce mémoire est divisé en quatre parties. La première traite des propriétés des substrats poreux en génie tissulaire et des différentes techniques de fabrication. Elle discute aussi des structures co-continues et des paramètres de contrôle et résume l'état des connaissances scientifiques dans le domaine des polyélectrolytes et de leur déposition auto-assemblée couche-par-couche. La deuxième partie expose le protocole manipulateur de la méthode développée et décrit les différents produits et techniques de caractérisation utilisés. La troisième partie présente les substrats ultra-poreux fabriqués et analyse leurs caractéristiques. Une réflexion globale sur la pertinence de la méthode y est aussi effectuée. Le mémoire se termine avec une conclusion et les références employées.

CHAPITRE 2

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Substrats poreux en génie tissulaire

2.1.1 Le génie tissulaire

Le génie tissulaire est défini comme suit :

« L'application des principes et des méthodes d'ingénierie et des sciences de la vie dans le but de comprendre les relations fondamentales structure-fonction des tissus normaux et pathologiques des mammifères dans le but de développer des substituts biologiques capables de rétablir, maintenir et améliorer les fonctions tissulaires » (traduction libre de Skalak et Fox, 1998).

En génie tissulaire, trois éléments sont essentiels à la régénération des tissus : 1. les molécules messagères (facteurs de croissance), 2. les cellules et 3. une structure permettant la croissance (« *scaffold* » ou substrat) (Palsson et Bahtia, 2004). Le dernier élément est particulièrement important pour la germination des cellules *in vitro* étant donné que les cellules ne peuvent former de nouveaux tissus sans un environnement spécifique dans lequel un matériau agit comme un support. C'est donc au niveau de la fabrication de ces structures et de la culture des cellules en bioréacteur que les techniques d'ingénierie entrent en jeu. La restauration fonctionnelle de plusieurs tissus, tels que le foie, le pancréas, le nerf, la peau, le cartilage et l'os sont cours de développement.

Dans certains cas, la régénération tissulaire peut se produire par un procédé d'induction. La croissance cellulaire se fait alors à partir du tissu environnant et le

recours à la culture cellulaire *in vitro* n'est plus nécessaire. Pour être efficace, l'implant doit imiter le plus fidèlement possible la matrice extra-cellulaire naturelle (ECM) visée. Cette technique pourrait potentiellement être utilisée pour la régénération tissulaire de la peau, des nerfs et des os.

2.1.2 Critères de conception des substrats poreux pour la croissance tissulaire

Toute structure en contact avec des tissus biologiques doit évidemment être biocompatible tout comme ses produits de dégradation. Le choix des polymères entrant dans la composition du substrat est donc un paramètre de conception très important. Les poly(α -hydroxy esters) – la famille dont font partie le poly(lactide) et le poly(glycolide) – sont les polymères les plus étudiés et utilisés sur les humains, particulièrement dans les applications de sutures (Maquet et Jerome, 1997). D'autres polymères biodégradables, tels que les polyanhydrides, les polyorthoesters et les poly(acides aminés) suscitent actuellement l'intérêt des chercheurs et des cliniciens. Certains polymères non-dégradables, mais solubles dans les fluides biologiques, tels que le poly(oxyde d'éthylène) et le poly(vinyl alcool) sont aussi considérés pour certaines applications (Babensee et al., 1998).

Le contrôle de tous les paramètres du réseau poreux est la clé de la fabrication de structures en génie tissulaire. La taille des pores a une influence majeure sur la croissance cellulaire à l'intérieur de la matrice. Théoriquement, les pores doivent être plus gros que le diamètre d'une cellule en suspension (approximativement 10-20 μm) (Lu et Mikos, 1996), mais assez petit pour prévenir la croissance des cellules fibreuses. En pratique, plusieurs études ont rapporté la régénération de différents tissus dans des substrats possédant des porosités beaucoup plus grosse que la taille des cellules régénératives (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Revue des essais de régénération de tissus avec les tailles de pores associés
(tiré de Sarazin et al., 2004)

Tissu régénéré	Taille de pore des substrats (μm)	Références
Hépatocytes	~20	Maquet et Jerome, 1997
Fibroblastes	~20	Maquet et Jerome, 1997 et Whang et al., 1995
	5-15	Whang et al., 1999
Peau	20-125	Whang et al., 1995 et Whang et al., 1999
	20-150	Maquet et Jerome, 1997
Os	100-150	Maquet et Jerome, 1997
	100-250	Whang et al., 1995
	200-400	Lu et Mikos, 1996
	100-350	Whang et al., 1999
	75-150	Li et al., 2002
		Von Recum et al., 1996
	>100	Itälä et al., 2001
Ostéoides	40-100	Whang et al., 1995
Néovascularisation	5	Whang et al., 1999

Les conclusions de Itälä et al. (2001) contrastent avec celles des autres recherches. En effet, cette étude a démontré que la croissance de cellules osseuses dans des cavités cylindriques aussi petites que 50 μm était équivalente à celle obtenue avec des pores de plus de 100 μm . Ce résultat et quelques autres (Lu et al., 1999; Chouteau et al., 2003) démontrent que la taille des interconnexions est un paramètre plus important que le diamètre des pores pour la croissance cellulaire à l'intérieur du substrat. En effet, pour envahir une structure, les cellules doivent avoir la possibilité de migrer d'un pore à l'autre. Des diamètres d'interconnexions aussi petits que 15 μm sont suffisants pour la

culture des fibroblastes et des ostéoblastes (Chouteau et al., 2003). Les travaux rapportant des tailles de pores de plus de 100 μm pour la régénération des tissus osseux ne font aucune mention de la taille des interconnexions et leurs résultats doivent donc être examinés avec une certaine prudence. L'interconnexion du réseau poreux joue donc un rôle prépondérant dans la croissance cellulaire. En plus de permettre la migration cellulaire, la structure doit faciliter la diffusion des nutriments vers l'intérieur de la matrice et des déchets métaboliques vers l'extérieur (Mikos et Temenoff, 2000; Ishaug-Riley et al., 1998). Un réseau interconnecté de pores uniformément distribués est donc essentiel. La création de parois poreuses permet de diminuer encore plus la résistance à la diffusion (Zhang et Ma, 2000), bien que ce ne soit pas indispensable (Chouteau et al., 2003).

Dans le but de maximiser la régénération tissulaire, les substrats de culture doivent posséder la plus grande aire de surface interne possible. Pour croître et se différencier, les cellules ont besoin d'une surface d'attachement (Sharma et Elisseff, 2004) et pour ce faire, la taille et la forme des pores doivent être optimisées (Lu et Mikos, 1996). Il s'agit en fait de trouver la bonne combinaison taille/forme pour maximiser la surface d'adhésion sans diminuer l'interconnexion du réseau. Les structures textiles – constituées d'un enchevêtrement de fibres – présentent un réseau de pores totalement interconnectés, mais sont caractérisées par une très faible aire de surface interne. Inversement, les substrats de type mousse possèdent une aire de surface interne très élevée, mais les bulles sont généralement ségrégées les unes des autres, ce qui constitue un obstacle majeur à la colonisation cellulaire de la structure. Certains progrès ont récemment été réalisés à ce niveau en fabricant des parois poreuses, mais le problème n'est pas entièrement réglé.

La fraction de vide est aussi un paramètre important de conception des substrats. La structure doit effectivement fournir un espace suffisant aux cellules leur permettant de se diviser et croître en un réseau cohérent (Hutmacher, 2001; Frenkel et Di Cesare,

2004). De plus, pour un diamètre et une forme de pores donnés, une augmentation de la fraction de vide du substrat hausse inévitablement l'aire de surface interne (Mikos et Temenoff, 2000) et facilite la diffusion des nutriments et des déchets métaboliques (Sharma et Elisseff, 2004). Une fraction de vide maximale est particulièrement souhaitable puisqu'elle minimise la quantité de polymère implantée (Hou et al., 2003). Bien que biocompatibles, les produits de dégradation de la structure interagissent inévitablement avec les tissus biologiques (Hutmacher, 2000). En augmentant la fraction de vide, on réduit par le fait même l'inflammation causée par le substrat.

Même très poreux, le substrat doit tout de même conserver une rigidité mécanique dictée par son application (Karp et al., 2003; Mooney et al., 1996). L'implant pour la régénération du cartilage articulaire ne requiert évidemment pas les mêmes propriétés mécaniques que celui pour la culture des cellules du foie! En fait, le type de tissu à régénérer commande toute la microstructure. Étant donné que celle-ci détermine la morphologie tridimensionnelle du tissu biologique final (Babensee et al., 1998), l'objectif est de recréer le plus fidèlement possible la matrice extracellulaire originale (Whang et al., 1995). La macrostructure du substrat doit aussi être adaptable selon le contexte et des implants de formes complexes sont souvent nécessaires. Par exemple, un implant membranaire ne peut être employé pour soigner une entaille dans un os.

La matrice doit se résorber graduellement pour être remplacée par les tissus biologiques régénérés (Agrawal et Ray, 2000) et idéalement, le taux de biodégradation de la structure est contrôlé pour correspondre au taux de croissance des cellules. Les principaux paramètres de contrôles du taux de biodégradation sont la nature du polymère employé, sa masse moléculaire, la composition de la macromolécule (dans le cas de co-polymères) et la composition du mélange (dans le cas de mélanges de polymères de différents taux de dégradation). Le pH et la température du milieu ont évidemment aussi une grande influence sur la réaction de dégradation.

En plus de la microstructure du substrat, plusieurs autres paramètres influencent la régénération des tissus. Il est admis que les propriétés physiques et chimiques de la surface d'adhésion, telles la texture, la rugosité, l'hydrophobicité, la charge et la composition chimique, affectent fortement l'adhésion de la cellule et le comportement cellulaire subséquent. La modification et la fonctionnalisation de la surface du polymère sont donc particulièrement efficaces pour apporter au système une bioperformance spécifique. Parmi ces méthodes, notons la déposition de protéines, les techniques de microlithographies et les polymères composites (Maquet et Jerome, 1997).

2.1.3 Techniques classiques de fabrication de substrats poreux pour la croissance tissulaire

Les principales méthodes de fabrication de substrats poreux ont déjà été mentionnées dans le chapitre d'introduction. En pratique, elles sont de plus en plus employées en combinaison avec d'autres dans le but d'améliorer la qualité des structures obtenues. On les regroupe habituellement en quatre grandes familles : les techniques textiles, de moussage, de lixiviation de particules et de séparation de phase.

2.1.3.1 Matériaux textiles

Ces substrats sont composés d'un réseau tridimensionnel de fibres ordonnée ou non. La méthode la plus connue implique un enchevêtrement de fibres de PGA ou de PLGA non-tissées qui est immergé dans une solution de PLLA. Une fois le solvant évaporé, la structure fibrillaire de PGA ou de PLGA se retrouve immobilisée dans le PLLA pour ensuite être fusionnée à haute température au niveau des nœuds et finalement libérée du PLLA dans un non-solvant du PGA (Freed et al., 1993; Mikos et al., 1993). Les structures produites sont caractérisées par un réseau entièrement interconnecté

possédant une aire de surface interne satisfaisante sans être hors du commun, mais manquant habituellement de stabilité structurelle.

2.1.3.2 Lixiviation de particules

Cette méthode consiste en la dispersion de particules de diamètres prédéterminés dans une solution de polymère qui est évaporée. La solubilisation des particules, agissant ici comme élément porogène, engendre une porosité qui, plus haute que 70%, montre une bonne interconnexion (Mikos et al., 1994; Agrawal et al., 1997). La taille de ces interconnexions est cependant habituellement beaucoup plus petite que les pores, ce qui n'est pas souhaitable dans un contexte de colonisation de la matrice. Diverses variantes de la méthode ont donc été développées. Une de celles-ci consiste à fusionner les particules de paraffine dans le but de créer un réseau entièrement interconnecté (Ma et Choi, 2001). En lyophilisant la solution de polymère, il est aussi possible de produire des parois poreuses (Hou et al., 2003).

Le diamètre des pores peut être contrôlé par la dimension des particules alors que la fraction de vide est fonction de la quantité de porogène. Les substrats engendrés possèdent une très grande aire de surface interne en raison de l'arrangement du réseau en cellules sphériques pseudo-ségrégées. Le risque de ne pas extraire en totalité le matériau porogène freinent cependant l'essor de la méthode.

2.1.3.3 Séparation de phase et émulsion

La séparation de phase est une méthode porogène directe de production de substrats polymères bidimensionnels (membranes) et tridimensionnels (mousses). Une solution de polymères (PLLA et PLGA) est refroidie de manière à induire une séparation de phase (*TIPS* pour *Thermally induced phase separation*) (Schugens et al., 1996; Nam et Park, 1999; Maquet et Jerome, 1997; Tu et al., 2003). Le solvant est par la suite

lyophilisé, libérant un réseau polymère hautement poreux. Les paramètres de refroidissement de la solution jouent un rôle important dans la détermination de la morphologie finale. À des températures proches de la température critique (ou *cloud point*), la séparation se produit via un mécanisme de nucléation et croissance. À des températures plus basses, la séparation de phase est le résultat d'une décomposition spinodale. Ce type de séparation de phase est souhaitable puisqu'elle engendre une morphologie totalement interconnectée. La fabrication de substrats tridimensionnels ayant des microstructures uniformes est beaucoup plus difficile en raison du gradient de température apparaissant à travers l'échantillon lors du refroidissement de la solution polymère.

Whang et al (1995) ont produit une émulsion eau dans l'huile de solution de PLGA dans du chlorure de méthylène pour ensuite la lyophilisée afin de produire un matériau poreux dont la taille et l'aire spécifique dépendent des conditions expérimentales, telles que la fraction volumique de la phase dispersée, la concentration du polymère et la masse moléculaire. L'invasion cellulaire en profondeur de ces microstructures est malheureusement rendue difficile par l'interconnexion du réseau poreux qui est le résultat de la microporosité des parois.

Les trois techniques décrites jusqu'à présent offrent la possibilité de fabriquer une large gamme de substrats et de morphologies. Elles souffrent cependant toutes de la même limitation : pour être mis en forme, les polymères sont solubilisés dans des solvants toxiques. Évidemment, ces solvants sont par la suite éliminés, mais la possibilité qu'il en demeure des traces dans la structure finale fait craindre une réaction adverse de l'organisme.

2.1.3.4 Moussage

La technique de moussage a été développée dans le but d'éliminer le recours systématique aux solvants toxiques dans le procédé de fabrication des pores (Mooney et al., 1996). Ici, c'est un gaz qui joue le rôle d'agent porogène. Des disques de poly(D,L-lactide-co-glycolide), produit par moulage sous compression sont placés dans une chambre pour être exposé à du CO₂ sous haute pression (5,5 MPa) et sont rapidement ramené à pression ambiante après trois jours. Des porosités allant jusqu'à 93% et des pores de plus de 100 µm peuvent ainsi être engendrés. La haute température de mise en forme empêche cependant l'incorporation de molécules bioactives dans la structure. De plus, l'invasion cellulaire du substrat est ralentie par la très faible interconnexion du réseau et la présence d'une peau imperméable en surface.

Plusieurs des méthodes décrites ici ont été employées en combinaison. Mikos et Temenoff (2000) et Hutmacher (2000) ont effectué des revues beaucoup plus complètes de tous les résultats obtenus.

2.2 La structure co-continue et les paramètres de contrôle

2.2.1 Généralités

Les mélanges de polymères immiscibles préparés à l'état fondu se présentent sous la forme de systèmes hétérogènes qui se développent en des structures multiphasées de type *matrice/phase dispersée* ou *co-continue*.

Historiquement, les premiers mélanges de polymères à avoir été étudiés et commercialisés – le succès le plus notoire étant le *high impact polystyrene* (HIPS) – sont les mélanges binaires de type *matrice/phase dispersée*. Ce type de morphologie est généralement obtenu à des compositions asymétriques. Dans ce cas, le composant majeur forme préférentiellement la matrice, c'est-à-dire la phase continue dans laquelle est dispersé le composant mineur qui se présente sous la forme de gouttes ou de domaines allongés complètement ségrégués les uns des autres.

À des compositions de plus en plus symétriques, les domaines de phase dispersée tendent à s'interconnecter à travers la matrice jusqu'à ce que les deux phases soient entièrement continues. La zone de co-continuité, caractérisée par un enchevêtrement de canaux (Figure 2.1), est alors atteinte. La Figure 2.2 illustre l'évolution de la morphologie d'un mélange de polymères fictifs en fonction de sa composition. À partir de $\phi_{cr, A}$ – appelé seuil de percolation du polymère A – les domaines dispersés de polymère A commencent à s'interconnecter. La morphologie co-continue est jugée totalement développée lorsque le pourcentage de continuité de chacune des phases atteint 100%.

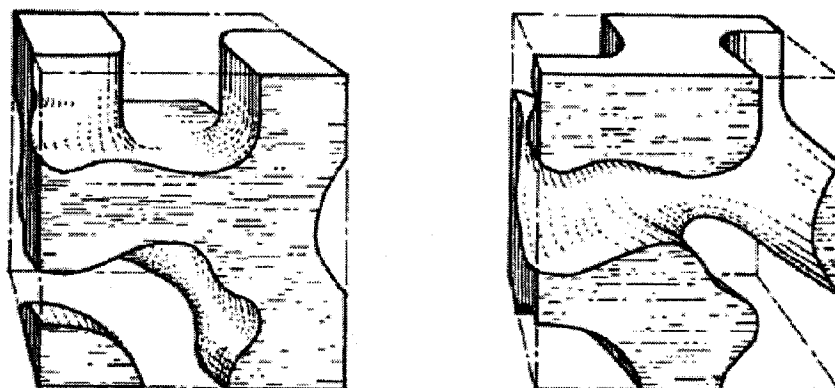


Figure 2.1 Structure co-continue pour un mélange binaire A/B. À gauche, la phase A est conservée et la phase B est extraite, alors qu'à droite, la situation inverse est présentée (Gergen, 1996).

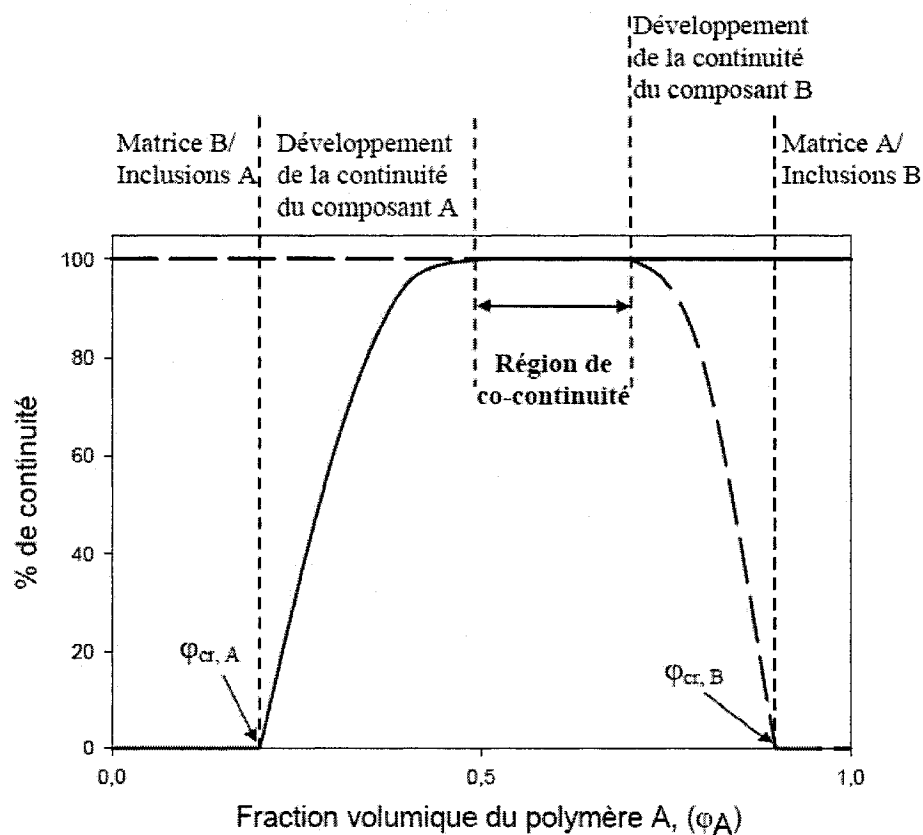


Figure 2.2 Pourcentage de continuité en fonction de la fraction volumique du polymère A dans un mélange de polymère fictif A/B préparé à l'état fondu.

Le présent projet utilise les mélanges de polymères dans la création de structures modèles poreuses qui serviront de canevas pour la fabrication des substrats ultraporeux. Le système de polymères employé dans ce travail (PLLA/PCL) a déjà fait l'objet de plusieurs études systématiques (Sarazin, 2003; Sarazin et Favis, 2003; Sarazin et al., 2004; Yuan et Favis, 2003). Plusieurs revues de littérature ont de plus traité des principes fondamentaux du développement de la morphologie co-continue (Sarazin, 2003; Li, 2001; Marin, 2001). La section qui suit se veut une section pratique et se contentera d'exposer les différents paramètres de contrôle de la microstructure co-continue.

2.2.2 Contrôle de la morphologie co-continue

Tel que discuté précédemment, la morphologie matrice/phase dispersée d'un mélange de polymères est fortement dépendante de sa composition. Cependant, dans le cas précis des structures co-continues, la composition n'est pas le paramètre de contrôle le plus efficace. Qui plus est, il est impératif de pouvoir modifier la gamme de composition sur laquelle ce type de morphologie apparaît et contrôler la dimension des phases pour une composition donnée. L'influence de certaines propriétés des systèmes sur la morphologie sera ici brièvement présentée.

2.2.2.1 Viscosité des phases et ratio de viscosité

Il est généralement admis que le rapport de viscosité agit sur la morphologie matrice/phase dispersée et la composition d'inversion de phase (Jordhamo et al., 1986; Avgeropoulos et al., 1976; Favis et Chalifoux, 1987). La structure co-continue est cependant peu susceptible aux changements de ratio viscosité. Willemse et al. (1998 et 1999) ont démontré qu'une augmentation de la viscosité de la matrice conduit à une limite inférieure de région de co-continuité déplacée vers des concentrations plus faibles. Le phénomène réciproque – c'est-à-dire en augmentant la viscosité de la phase

dispersée – n'est toutefois pas observé. Pour des rapports de viscosité constants, une diminution des viscosités absolue déplace le début de la région de co-continuité vers des concentrations beaucoup plus élevées (Willemse et al., 1998).

2.2.2.2 Tension interfaciale et compatibilisation de l'interface

La tension interfaciale d'un système influence fortement la morphologie obtenue. Les systèmes binaires de faible tension interfaciale sont généralement caractérisés par une large région de co-continuité qui a tendance à progressivement s'amincir avec l'augmentation de la tension interfaciale (Verhoogt et al., 1994; Willemse et al., 1998). La tension interfaciale a aussi un impact sur la taille des domaines qui augmente avec celle-ci.

Un copolymère ayant une forte affinité pour chacun des constituants peut par ailleurs être additionné au système. L'agent de compatibilisation se positionne alors à l'interface et réduit la tension interfaciale du système en plus de stabiliser les instabilités capillaires (Elemans et al., 1990). Cependant, l'efficacité de l'agent interfacial à diminuer et contrôler la taille des phases réside principalement en sa capacité de réduire la coalescence des domaines par une stabilisation stérique de l'interface (Sundararaj et Macosko, 1995; Favis 2000). Comparativement aux systèmes incompatibles correspondants, les mélanges compatibilisés se caractérisent par une morphologie plus fine et par une région de co-continuité plus étroite (Bourry et Favis 1998; Li et al., 2002).

2.2.2.3 Recuit statique

Le procédé de recuit statique permet d'accroître significativement la taille des domaines d'un mélange donné. Parallèlement, cet accroissement des phases par coalescence statique peut altérer la structure co-continue en une structure matrice/phase dispersée,

réduisant par le fait même la largeur de la région de co-continuité du système (Verhoogt et al., 1994). À des compositions asymétriques, la structure co-continue est généralement plus fine et est rapidement détruite alors que les mélanges de compositions symétriques, habituellement caractérisés par des structures co-continues plus grossières, conservent leur morphologie co-continue plus longtemps lorsque recuits.

2.3 Polyélectrolytes

2.3.1 Introduction aux polyélectrolytes

Le terme polyélectrolytes définit une classe de composés macromoléculaires qui, lorsque dissout dans un solvant polaire convenable (généralement dans l'eau), acquiert spontanément ou après certaines manipulations un grand nombre de charges distribuées le long de la chaîne moléculaire. (Oosawa, 1971) Plusieurs espèces électrochimiques doivent être définies ici pour bien comprendre la suite de cette section. Un polyélectrolyte puissant (ou fort) se dit d'une macromolécule dont la charge globale apparaît spontanément à sa valeur maximale. Par analogie, un polyélectrolyte faible est une molécule dont la charge maximale n'est pas acquise instantanément lors de la solubilisation. Finalement, les électrolytes de l'électrochimie classique (particulièrement les sels) sont ici renommés électrolytes de bas poids moléculaire (électrolytes BPM) ou contreions par opposition aux polyélectrolytes qui ont implicitement des hauts poids moléculaires.

Le nombre de charges élémentaires portées par une chaîne entièrement chargée est directement proportionnel au degré de polymérisation du polymère. Dans la très grande majorité des cas, toutes les charges présentes sur un polyélectrolyte sont de même signe, mais la synthèse de chaînes portant des charges de signes opposés a été rapportée à quelques reprises.

Parce qu'ils sont en premier lieu des macromolécules, les polyélectrolytes sont aussi être catégorisés de la même manière que les polymères neutres. On peut donc les classer en terme de biopolymères, de polymères synthétiques ou de biopolymères modifiés chimiquement, en terme de macromolécules linéaires, ramifiées ou réticulées et en terme d'homo- ou de copolymères. En plus de la classification des polyélectrolytes en fonction de leur puissance, il est possible de les cataloguer à partir

de la nature de leurs groupements électrochimiques. Les polyacides à l'état solide présentent des groupements électrolytiques neutres tels -COOH et $\text{-SO}_3\text{H}$ qui, une fois en solution, se dissocient partiellement en polyanions (polyions négatifs) et protons (H^+). Par analogie, les polybases possèdent des groupements électrolytiques tels -NH_2 pouvant se lier à des protons (H^+) en solution et ainsi créer des polycations (polyions positifs). Les polyampholytes sont à la fois pourvus de groupements acides et basiques, ce qui implique que les molécules sont globalement chargées positivement dans des solutions acides et négativement dans des solutions alcalines. Finalement, les polyélectrolytes salins – nécessairement des polyélectrolytes puissants – présentent à l'état solide des complexes ioniques qui se dissocient en milieu aqueux pour libérer les « contreions » monovalents et ainsi former les polyions (négatifs ou positifs, selon le groupement).

2.3.2 Théorie des polyélectrolytes en solution

2.3.2.1 La chaîne polyélectrolyte

Le concept de base qui est employé pour caractériser tous les types de polyélectrolytes est la densité de charges qui se définit comme le nombre de charges élémentaires e (1.602×10^{-19} C) par unité de longueur de chaîne linéaire. L'inverse de cette quantité, appelé b , représente l'espacement axial moyen des charges. Pour que les notions de densité de charge et d'espacement moyen soient concevables pour des chaînes moléculaires réelles ou non linéaires, trois hypothèses doivent être posées. Premièrement, les charges qui sont positionnées à une certaine distance radiale de la chaîne principale sur des ramifications ou qui sont organisées hélicoïdalement autour de la chaîne sont considérées comme des charges disposées le long de l'axe moléculaire. Deuxièmement, l'espacement axial discret des charges dans la structure chimique réelle est déformé tout le long du contour de la chaîne pour éliminer les corrélations locales des charges. Troisièmement, l'erreur engendrée par le positionnement virtuel le long de

L'axe de charges radiales nécessaires à la détermination de b implique que les propriétés diélectriques de la chaîne ainsi modélisée ne sont pas pertinentes pour décrire le comportement électrostatique du polymère réel. Ce qui ressort de ces considérations est que le paramètre b peut être employé pour décrire l'effet des charges dans les polyélectrolytes à des échelles de grandeurs assez importantes pour que la structure locale détaillée ne soit plus nécessaire. Lorsque les détails locaux ne peuvent être ignorés, d'autres méthodes de mesures plus complexes peuvent être employées.

En plus de ce paramètre b propre aux macromolécules chargées, les polyélectrolytes en solution sont également définis par les trois grandeurs propres aux polymères classiques : la longueur de persistance l_p (qui mesure la rigidité de la chaîne), la longueur de contour L (qui mesure la longueur totale de la chaîne) et le paramètre d'effet du volume d'exclusion α (qui mesure les interactions des différents segments entre eux et/ou la qualité du solvant). Ces concepts sont bien décrits dans la littérature scientifique et ne pas seront discutés en détail dans cette section.

2.3.2.2 Environnement électrolytique

La caractérisation complète d'un système polyélectrolyte ne doit pas seulement comprendre la définition de la macromolécule chargée, elle doit nécessairement inclure l'environnement électrolytique dans lequel elle est dissoute. Typiquement, en plus du solvant employé et des contreions relargués, ce milieu comprend une certaine concentration d'électrolytes BPM.

L'interaction de charges thermiquement équilibrées à travers un milieu possédant une constante diélectrique ϵ donne à la solution électrolytique une longueur fondamentale l_b , la longueur de Bjerrum, qui caractérise la distance sur laquelle deux charges nues e interagissent électrostatiquement avec une énergie égale à l'énergie thermique du milieu kT :

$$l_b = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 kT} \quad (2.5)$$

avec e , la charge élémentaire (1.602×10^{-19} C), ϵ , la permittivité du milieu, ϵ_0 , la permittivité du vide ($8,854 \times 10^{-12}$ (A² • S⁴) (kg • m³)⁻¹), k , la constante de Boltzmann ($1,4 \times 10^{-23}$ J • K⁻¹) et T , la température du milieu (en K).

À 25 °C, l_b dans l'eau ($\epsilon = 78$) est environ 0,71 nm.

L'introduction des contreions et des électrolytes BPM engendre une longueur propre aux solutions électrolytiques qui représente la décroissance des interactions électrostatiques accélérée par la présence des charges écrans. Lorsque les effets électrostatiques sont traités à l'intérieur de l'approximation de Poisson-Boltzmann (une approximation de champ moyen valide pour de faibles couplages), la longueur de Debye κ^{-1} symbolise le pouvoir écran de ces ions :

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\epsilon\epsilon_0 kT}{\sum_i c_{0,i} (ez_i)^2} \right)^{1/2} \quad (2.6)$$

avec $c_{0,i}$, la concentration de l'ion i de valence z_i .

Le dénominateur du terme entre parenthèse peut être relié à la force ionique I (mol/volume) tel que :

$$I = \frac{1}{2N_a} \sum_i c_{0,i} (z_i)^2 \quad (2.7)$$

avec N_a , le nombre d'Avogadro. L'expression de la longueur de Debye κ^{-1} peut être réécrite telle que :

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\epsilon\epsilon_0 kT}{2N_a e^2 I} \right)^{1/2} = (8\pi N_a l_b)^{-1/2} \quad (2.8)$$

avec l_b , la longueur de Bjerrum décrite précédemment (2.5).

Les paramètres l_b et κ^{-1} dépeignent approximativement l'environnement électrolytique dans lequel baignent les polyélectrolytes. Ils représentent la distance maximale de séparation entre deux charges complémentaires positionnées sur deux polyélectrolytes complémentaires dans une solution pure (pour l_b) ou dans une solution électrolytique (pour κ^{-1}) pour qu'il y ait une interaction électrostatique sensible. Dans de l'eau à 25 °C, la longueur de Debye varie de 0,3 nm pour une solution de force ionique I de 10 M à 10 nm pour une force ionique I de 0,001M.

L'équation de Poisson-Boltzmann qui décrit le nuage électrolytique diffus souffre de plusieurs problèmes bien connus. Par exemple, l'équation non-linéaire complète peut être très ardue à résoudre. Le système peut cependant être simplifié à l'aide de l'approximation de Debye-Hückel, qui suppose que le potentiel électrostatique ψ soit partout petit en comparaison de l'énergie thermique par unité de charge élémentaire kT/e . Bien que cette condition ne soit pas toujours respectée dans le cas de solutions de polyélectrolytes, cette méthode a l'avantage de grandement diminuer les calculs nécessaires à l'obtention de résultats probablement pas quantitativement exacts, mais à tout le moins qualitativement profitables. Évidemment, lorsque la rigueur est de mise, la relation de Poisson-Boltzmann doit être résolue analytiquement à l'aide de techniques sophistiquées ou numériquement à l'aide de simulations.

Dans l'approximation de Debye-Hückel, l'énergie d'interaction électrostatique de deux points de charge e séparés par une distance r dans un milieu diélectrique contenant des électrolytes BPM équilibrés est définie tel que :

$$U(r) = kT \frac{l_b}{r} \exp(-\kappa r) \quad (2.9)$$

avec l_b , la longueur de Bjerrum et κ , l'inverse de la longueur de Debye (κ^{-1}).

Le potentiel de Debye-Hückel $U(r)$ permet de calculer les termes discrets d'interaction qui peuvent par la suite être directement additionnés afin d'obtenir l'énergie électrostatique d'un système polyélectrolyte.

De toutes les considérations précédentes découle le paramètre le plus important pour caractériser les systèmes polyélectrolytes : la densité de charge adimensionnelle ξ qui, en fait, est une combinaison des paramètres b et l_b .

$$\xi = \frac{l_b}{b} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 k T b} \quad (2.10)$$

avec l_b , la longueur de Bjerrum, b , l'espacement axial moyen des charges, e , la charge élémentaire (1.602×10^{-19} C), ϵ , la permittivité du milieu, ϵ_0 , la permittivité du vide ($8,854 \times 10^{-12}$ (A² • S⁴) (kg • m³)⁻¹), k , la constante de Boltzmann ($1,4 \times 10^{-23}$ J • K⁻¹) et T , la température du milieu (en K).

2.3.2.3 Condensation des contreions

Dans le nuage électrolytique diffus, aussi appelé couche de Gouy-Chapman, les contreions sont uniformément distribués dans la solution. Cet état n'est cependant atteint que lorsque le nombre de charges et de contreions est petit. Lorsque le nombre de charges augmente (que ce soit en ajoutant plus de polyélectrolytes ou en utilisant des polyélectrolytes de densité de charge plus grande), le champ électrique s'amplifie et plus de contreions sont retenus dans le volume des macroions. De la même manière, si le nombre de contreions augmente comparativement au nombre de charges, une plus grande quantité de contreions vont être distribués à l'intérieur et à l'extérieur du volume occupé par les macroions. La présence accrue des contreions dans le voisinage immédiat des polyélectrolytes a comme conséquence de diminuer la charge apparente des macroions. Leur densité moyenne de charge effective apparaît donc plus petite que celle déterminée par le nombre d'unités chargées dans la structure chimique.

Le phénomène de condensation des contreions sur le polyélectrolyte est connu sous le nom de condensation de Manning (1972). Ce modèle suppose qu'une fois mis en solution, le complexe polyélectrolyte/contreions est dissocié. Ce faisant, les contreions prennent un volume plus important qu'avant la dissociation et l'entropie du système augmente. Cependant, au fur et à mesure que les contreions s'éloignent de la macromolécule et que l'entropie s'accroît, leur énergie électrostatique augmente aussi. Pour équilibrer les deux phénomènes, le modèle suppose qu'il y a création de deux états des contreions : une population qui se condense et ne peut se déplacer que le long ou dans le voisinage immédiat de la chaîne moléculaire et une autre qui est totalement libre de se mouvoir dans le solvant. La Figure 2.3 schématise la condensation de Manning.

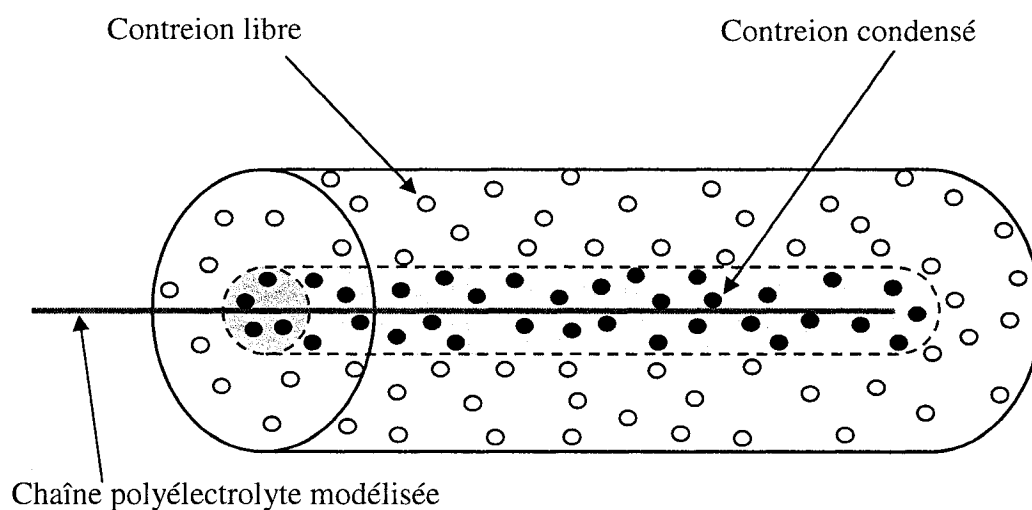


Figure 2.3 Représentation schématique du modèle à deux phases (modèle de Manning) pour une distribution de contreions près d'une charge linéaire représentant une chaîne de polyélectrolyte (adaptée de Manning, 1972).

En partant d'hypothèses différentes, Oosawa (1971) et Manning (1972) sont arrivés aux mêmes conclusions quantitatives au sujet de la charge effective d'un polyélectrolyte.

Lorsque la densité de charge $\xi < 1$, les contreions n'ont pas tendance à se condenser sur le macroion et donc le paramètre de densité de charge effective ξ_{eff} est égal au paramètre de densité de charge théorique ξ . Lorsque $\xi > 1$, une quantité suffisante de contreions vont condenser sur la chaîne pour ramener le paramètre de densité de charge effective ξ_{eff} (défini tel que $\xi_{eff} = \beta \xi$ où β est la fraction de contreions libres) à l'unité. Le point $\xi_c = 1$ est considéré comme la densité de charge critique pour qu'il y ait condensation des ions. Le même phénomène est observable pour des contreions de valence non unitaire. Cependant, le point critique ξ_c ne se trouve plus à 1, mais plutôt à $\xi_c = |z_i|^{-1}$ et pour $\xi > \xi_c$, $\beta = 1/|z_i| \xi$. La Figure 2.4 représente ces prédictions.

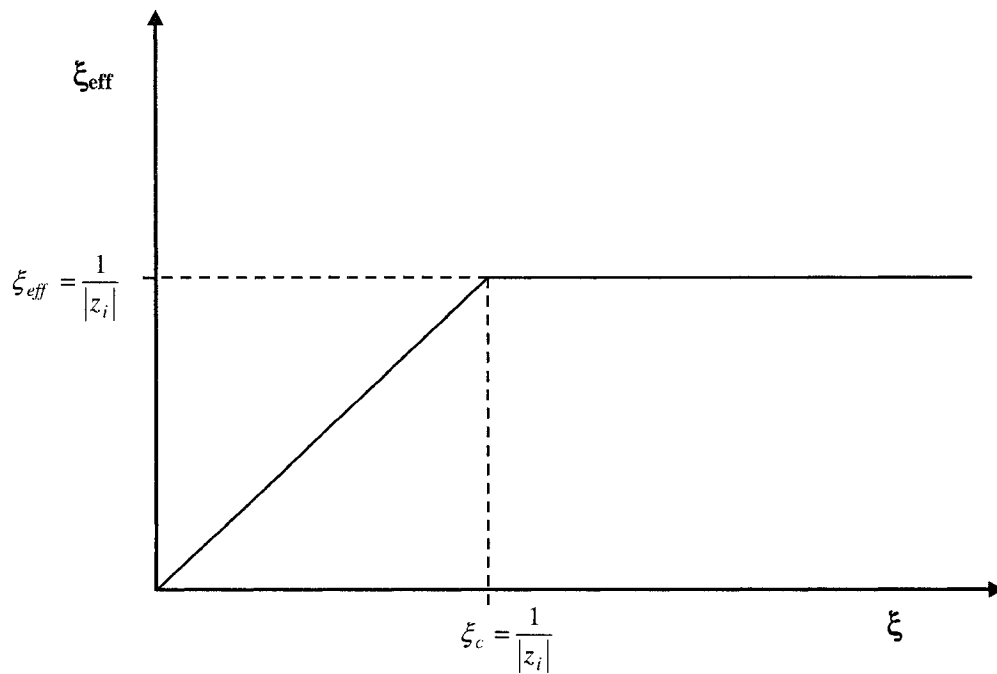


Figure 2.4 Relation de la densité de charge effective en fonction de la densité de charge linéaire fixe selon la théorie de la condensation des contreions (adaptée de Manning, 1972).

Cette subdivision des contreions en deux populations distinctes, artificiellement introduite pour le besoin des calculs, ne représente évidemment pas la réalité et introduit des erreurs dans l'approximation de Debye-Hückel pour les régions de hauts potentiels électrostatiques. Malgré ce problème et quelques autres, l'idée générale, si ce n'est des détails de la théorie de la condensation des contreions, est généralement acceptée.

2.3.2.4 Conformation des chaînes électrolytiques

2.3.2.4.1 Solutions diluées

La présence de charges de signes analogues se repoussant les unes les autres à intervalles réguliers le long de la chaîne moléculaire influence évidemment la conformation de cette dernière une fois en solution. Il a été démontré que le rayon de giration, R_g , et la distance moyenne bout à bout, $\langle R^2 \rangle^{1/2}$ – deux mesures des dimensions d'une macromolécule – d'un polyélectrolyte de masse moléculaire donnée en solution dans un solvant pur sont significativement plus grands (parfois jusqu'à un ordre de grandeur) que ceux d'un polymère neutre de masse moléculaire équivalente dans les mêmes conditions. Cet écart s'explique par la répulsion électrostatique entre les segments chargés qui force la molécule à prendre une conformation se rapprochant de la chaîne rigide. L'ajout d'électrolytes BPM réduit ces répulsions en agissant tel un écran électrostatique entre les segments ioniques. Comme l'expose la Figure 2.5, un polyélectrolyte intrinsèquement flexible aura donc tendance à se contracter graduellement avec l'augmentation de la concentration en contreions (en assumant que ces contreions ne se lient pas spécifiquement à la macromolécule). À un certain point, il est même possible d'éliminer pratiquement toutes les répulsions électrostatiques. Le polyion adopte à ce moment une configuration de pelote statistique comparable à celle décrite par Flory (1969). À des concentrations en électrolytes BPM encore plus élevées, le polymère précipite ou subit une séparation de phase. Un solvant originellement bon

pour un polyélectrolyte donné peut donc devenir marginal ou même totalement inefficace dû à la solubilité préférentielle des électrolytes BPM par rapport au polyélectrolyte.

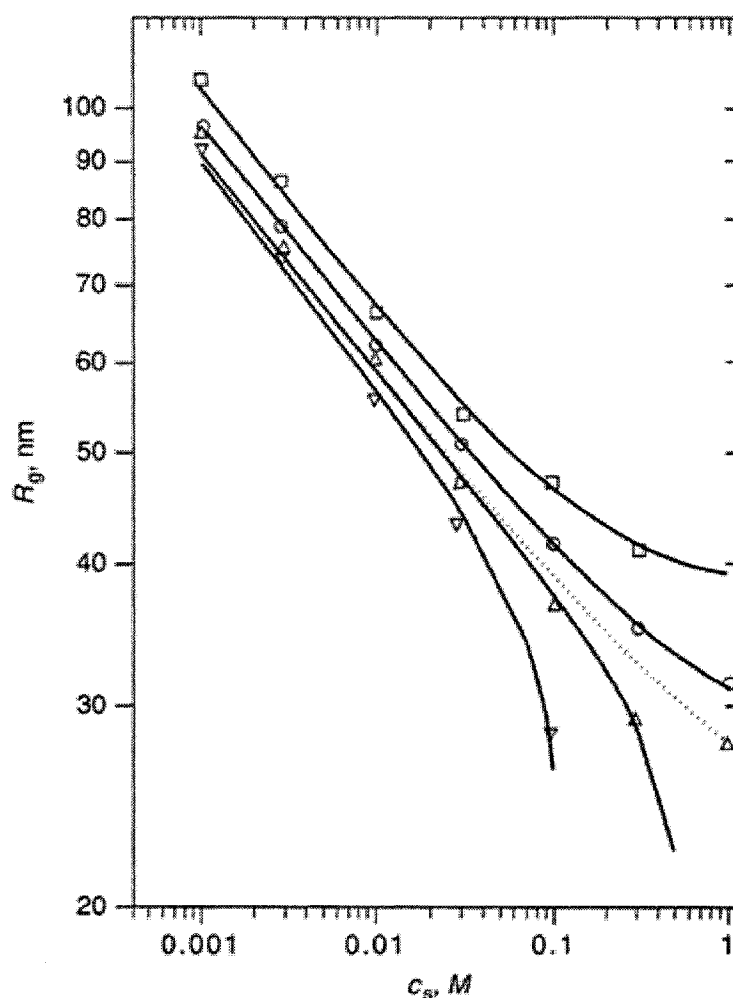


Figure 2.5 Effet de la concentration d'électrolyte BPM, c_s , sur le rayon de giration, R_g , pour une chaîne de poly(2-vinyle pyridine) 55-58 % d'éthyle quaternaire de 1000 nm de longueur dans l'eau. Les différents symboles correspondent aux différents contreions : F^- (carrés), Cl^- (cercles), Br^- (triangles) et I^- (triangles inversés). Le coion pour chaque contreion est le Na^+ (Beer et al., 1997).

2.3.2.4.2 Solutions semi-diluées et concentrées

Tel que discuté précédemment, les propriétés de configurations d'une macrochaîne ionique peuvent être étudiées en solution diluée puisqu'elle est en moyenne suffisamment isolée des autres pour ne pas subir d'interactions. La majorité des applications requièrent cependant l'usage de solutions semi-diluées et même concentrées dans lesquelles les domaines moléculaires se superposent et les chaînes s'enchevêtrent. Évidemment, les conformations estimées et mesurées pour les solutions diluées n'ont plus aucune signification puisqu'une toute autre dynamique s'établit lorsqu'on se trouve en solution semi-diluée. Au dessus d'une concentration critique appelée concentration de superposition c^* – il s'agit plutôt d'une zone de transition solution diluée/solution semi-diluée plus ou moins étendue qui est réduite en un point milieu pour les besoins des calculs – les propriétés thermodynamiques de la solution, auparavant fonction de la masse moléculaire M des polyélectrolytes solubilisés, dépendent du paramètre de dimension de maille x_s (aussi appelé la longueur de corrélation) du réseau formé par la superposition des chaînes. À c^* , $x_s = R$ – c'est-à-dire le rayon de la chaîne – et au-dessus de c^* , $x_s < R$ (de Gennes, 1979).

À ce jour, les propriétés des solutions semi-diluées et concentrées ne sont malheureusement pas très bien comprises. Il existe cependant un consensus sur l'importance de la relation 2.13 permettant d'estimer la valeur de c^* . Ignorant les coefficients de corrélation géométrique :

$$c^* = \frac{M}{N_A R^3} \quad (2.13)$$

avec c^* , la concentration critique de superposition, M , la masse moléculaire de la macromolécule, N_A , le nombre d'Avogadro et R , le rayon de la chaîne.

Étant donné que R est fortement dépendant de la concentration en électrolytes BPM ajoutés, il appert que c^* peut être contrôlée à l'aide des conditions de la solution.

Cependant, il a déjà été démontré que le calcul du R dépend beaucoup du modèle employé. c^* peut donc varier de plusieurs ordres de grandeur selon la méthode de calcul employée. Vu l'état contradictoire des recherches effectuées jusqu'à maintenant sur le sujet, nous nous contenterons du résumé présenté plus haut pour la suite de l'étude présente.

2.3.3 Complexes polyélectrolytes

Lorsqu'on permet à deux polyélectrolytes de charges opposées d'interagir en solution, il y a formation d'un complexe neutre ou quasineutre. Dépendant de certains facteurs, le système peut à ce moment se séparer en deux phases, une pauvre en polyélectrolytes complexés et une autre riche en complexes, ou peut encore former un précipité ou un gel plus ou moins compact. Il est aussi possible que les complexes restent en solution.

La configuration qu'adopte le complexe de polyélectrolytes dépend de la structure des polymères (i.e. la distance entre les charges le long de la chaîne, la forme de la molécule, etc.), de la présence d'électrolytes BPM, de la nature du solvant et de la température. Une multitude de conformations allant du modèle « œufs brouillés » – une pelote de polyélectrolytes entremêlés dans laquelle le phénomène de neutralisation est aléatoire – à la structure en échelle – les deux macromolécules sont alors complexés exclusivement l'une à l'autre et les liaisons ioniques de réticulation sont formées à intervalles réguliers le long des chaînes moléculaires – en passant par toutes leurs combinaisons ont été décrites. La formation rapide, suivie de la précipitation des complexes de polyélectrolytes engendre habituellement des structures complètement amorphes. Cette situation est particulièrement vraie dans le cas de solutions concentrées, pour lequel le pairage aléatoire des groupements ioniques des macromolécules résulte en la formation d'une structure de type « œuf brouillé ». Cependant, dans des solutions plus diluées, les complexes ont plutôt tendance à se constituer en structures échelles qui peuvent par la suite aisément se réarranger dans le

temps. Des structures plus stables et possédant un plus haut degré d'organisation découlent par le fait même de ce processus.

2.3.4 Dépôt auto-assemblée couche-par-couche de polyélectrolytes

La déposition auto-assemblée couche-par-couche (CPC) de polyélectrolytes de charges opposées est un cas spécial du phénomène général de complexation en solution. Decher (1992) fut le premier à décrire cette méthode et à mesurer tout son potentiel d'application. Ce procédé permet d'assembler de minces films uniformes de complexes polyélectrolytes sur une grande variété de surfaces en mettant successivement cette dernière en contact avec des solutions de polycations et de polyanions (voir Figure 2.6). Chaque demi-cycle (immersion dans la solution A/lavage) permet de déposer à la surface un film d'une épaisseur reproductible de polyions complexés tout en inversant la charge de surface, la laissant prête pour la prochaine étape.

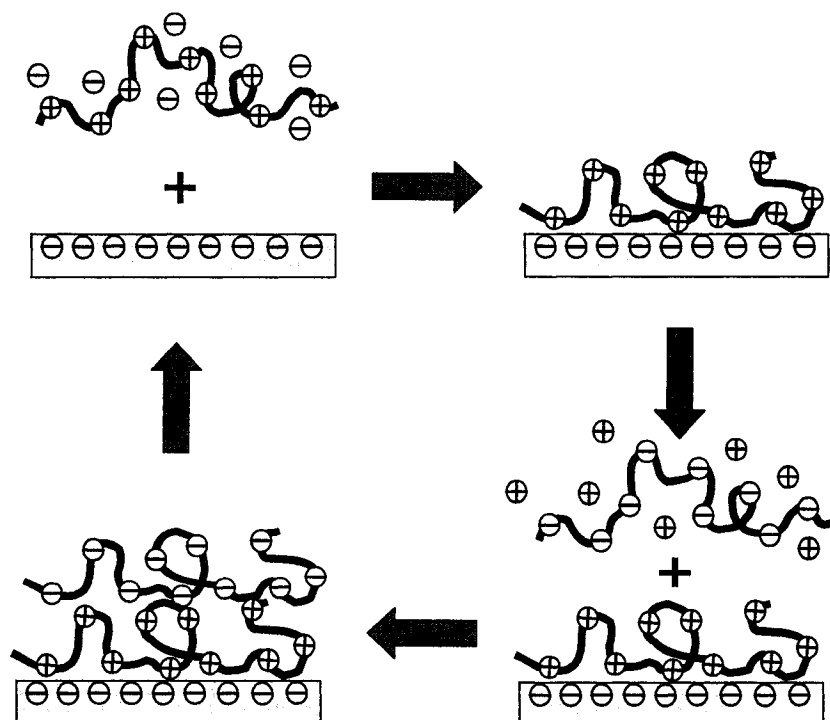
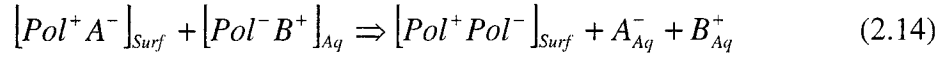


Figure 2.6 Représentation schématique de la méthode de déposition auto-assemblée CPC de polyélectrolytes (adaptée de Bertrand et al., 2000).

L'équation 2.14 présente la réaction en jeu



avec Pol^+ et Pol^- , respectivement les segments chargés des polyélectrolytes, A^- et B^+ , les contreions, $Pol^+ Pol^-$, le pairage ionique lors de la complexation et les indices « Surf » et « Aq », l'état du composé, c'est-à-dire adsorbé en surface et en solution respectivement.

La technique de déposition CPC de polyélectrolytes a été développée en tant qu'alternative viable aux méthodes classiques de fabrication de nanostructures de surface organiques ou hybrides telles que le procédé Langmuir-Blodgett, le « *spin-coating* », la polymérisation in-situ, la polymérisation plasma, etc. Son extrême simplicité, sa reproductibilité et sa stabilité, ainsi que sa versatilité en font une méthode particulièrement intéressante. Une structure résultante moins ordonnée, relativement à celles obtenues à l'aide des procédés décrits précédemment freine quelque peu son essor. Originellement développée pour la déposition de polyélectrolytes de charges opposées, elle a depuis été généralisée pour l'auto-assemblage d'une multitude de composés. Dans cette sous-section, nous ne nous concentrerons que sur les principes de base ayant trait au système modèle de polyélectrolytes de charges opposées.

2.3.4.1 Contribution des différentes interactions (électrostatiques, entropiques et hydrophobes)

Les interactions électrostatiques entre la surface et le polyélectrolyte de charges opposées sont communément – et souvent à tort – considérées comme la force motrice du phénomène d'adsorption auto-assemblée CPC. Dans la plupart des cas, la déposition successive d'espèces chargées positivement et négativement est effectivement une condition essentielle au bon fonctionnement du procédé. Il a cependant été démontré que le phénomène peut tout de même avoir lieu avec des polyélectrolytes très peu

chargés (Shimazaki et al., 1997) et même avec des polymères totalement neutres (Serizawa et al., 2002). Ces résultats forcent donc à revoir la théorie entourant la déposition auto-assemblée CPC de polyélectrolytes.

Il a été établi que le phénomène de complexion de deux polyions salins de charges opposées est pratiquement athermique, c'est-à-dire que les interactions enthalpiques ne sont pas dominantes. La force motrice de la réaction est largement entropique et se décompose en quatre contributions. (1) Les électrolytes BPM confinés au voisinage des groupements chargés sont libérés dans la solution dès que les deux macromolécules se lient et que leur charge s'équilibre, augmentant ainsi le désordre du système. De plus, les effets de coopération facilitent grandement le pairage des groupements ioniques étant donné que la formation d'une liaison de réticulation favorise l'interaction des charges adjacentes en raison de leur proximité forcée. (2) La réorientation d'une fraction des molécules d'eau formant la coquille d'hydratation du polyélectrolyte (particulièrement celles se trouvant dans le voisinage des groupements chargés) et (3) la libération pure et simple des autres molécules d'eau liées au polyion lors de l'arrimage des deux molécules s'additionnent à la première contribution pour favoriser le processus. (4) La perte de mobilité de la macromolécule une fois fixée engendre une perte de degrés de liberté – principalement associés à la rotation et à la flexion de la chaîne – qui tend à diminuer l'entropie du système. Cette dernière contribution défavorise évidemment la réaction, mais elle est largement compensée par les trois premières (Kotov, 1999).

Les interactions hydrophobes influencent fortement la stabilité thermodynamique du complexe formé et par le fait même l'irréversibilité du phénomène. La contribution entropique peut en fait être attribuée aux forces hydrophobes puisqu'il s'agit d'une déshydratation irréversible d'une partie de la macrochaîne ionique (Kotov, 1999). L'obtention de complexes stables et insolubles est primordiale pour l'auto-assemblage des couches. Si la molécule adsorbée est trop hydrophile – trop petite et trop chargée –

le solvant ne peut être efficacement repoussé hors de la couche complexée et donc, la structure tout juste formée se détruit et se solubilise lorsque vient le temps d'en déposer une autre, enrayant ainsi toute possibilité de croissance de multicouches.

2.3.4.2 Surcompensation et distribution des charges, force ionique de la solution et structure des multicouches

Avec la stabilité des complexes formés, la surcompensation des charges de surface est une condition essentielle au procédé de déposition CPC de polyélectrolytes. Chaque étape de déposition (immersion dans une solution de polyélectrolyte/lavage) doit inverser la charge de surface sans quoi l'étape suivante ne peut avoir lieu. Le nombre de segments chargés adsorbés doit donc stœchiométriquement dépasser la charge originellement présente en surface. La surcompensation des charges superficielles et l'inversion de la polarité de surface ont été observées expérimentalement à plusieurs reprises (Fig. 2.7). En mesurant à chaque étape du procédé – i.e. après chaque demi-cycle – la mobilité électrophorétique de particules colloïdales sur lesquelles deux polyélectrolytes de charges opposées sont successivement déposés, il est possible de visualiser l'inversion du potentiel de surface en calculant à partir de cette mobilité électrophorétique le potentiel zeta – qui est une mesure de la charge de surface (Sukhorukov et al., 1998).

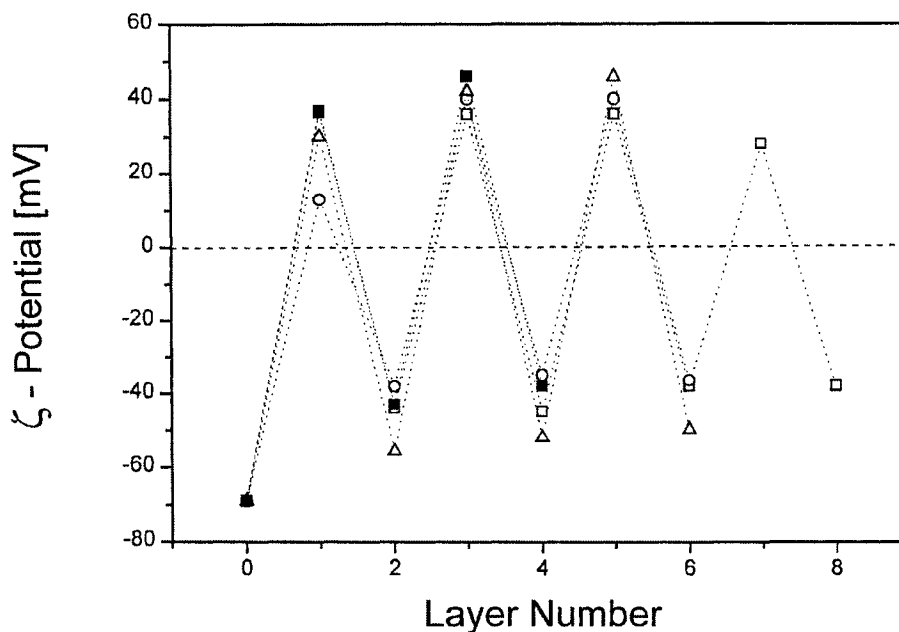


Figure 2.7 Potentiel zeta en fonction du nombre de couches pour des particules colloïdales de polystyrène sulfate ($\varnothing = 640$ nm) sur lesquelles sont déposés différentes paires de polyélectrolytes à l'aide du procédé de déposition auto-assemblée CPC : poly(diallyldiméthylammonium chloré)/poly(sodium de 4-styrenesulfonate) (PDADMAC/PSS) (carrés), poly(allylamine hydrochloré)/poly(sodium de 4-styrenesulfonate) (PAH/PSS) (cercles), PDADMAC/ADN (triangles). Force ionique 1mM KNO_3 , $\text{pH} = 6,2 \pm 0,2$, déposition des polyélectrolytes PDADMAC/PSS et PDADMAC/ADN dans l'eau et PAH/PSS dans une solution 0,5 M NaCl. (Sukhorukov et al., 1998).

La compréhension du phénomène de surcompensation des charges requiert le développement d'un mécanisme moléculaire et conformationnel de la réaction d'adsorption d'une chaîne ionique sur une surface de polarité inversée. Tel qu'illustré précédemment, un polyélectrolyte en solution dans de l'eau non ajoutée d'électrolytes BPM aura tendance à adopter une conformation de tige rigide. À l'approche de la surface de potentiel opposé, cette « tige ionique » aura tendance à se positionner de telle sorte qu'un nombre maximal de segments chargés soient neutralisés par pairage

ionique – c'est-à-dire parallèle à la surface. Évidemment, à moins d'une improbable organisation parfaite de la structure, tous les segments adsorbés ne peuvent être neutralisés, et donc une charge superficielle opposée apparaît. Celle-ci est cependant beaucoup moins dense que la précédente, ce qui explique les faibles densités de dépôt observées expérimentalement.

L'ajout d'électrolytes BPM à la solution a comme conséquence de permettre à la macromolécule de se replier sur elle-même et d'adopter une configuration de serpent ou pelote statistique. En effet, les contreions ont tendance à se positionner entre les segments chargés créant par le fait même un écran électrostatique qui diminue les répulsions intramoléculaires – et par le fait même la longueur de Debye κ^{-1} (Éq. 2.10) – et permet à la macromolécule de se comporter comme une chaîne flexible. Lors de l'adsorption à la surface, la chaîne peut conserver un certain nombre de degrés de liberté en formant des boucles dans la solution (Fig. 2.8). La réaction de pairage ionique est contrôlée par l'écran électrostatique entre les segments polymères chargés et le potentiel de surface.

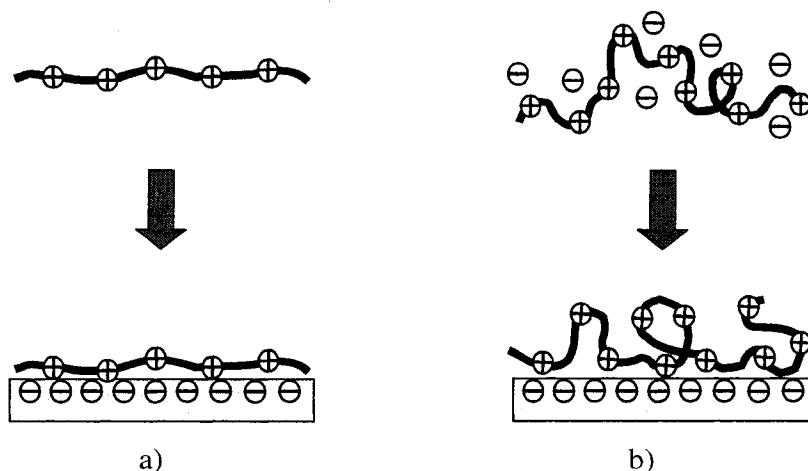


Figure 2.8 Adsorption schématisée de polycations sur une surface négative a) dans une solution peu concentrée en électrolytes BPM et b) dans une solution concentrée en électrolytes BPM (adaptée de Fleer et al., 1993).

La croissance des couches – autant l'épaisseur que la masse déposée par demi-cycle – est donc fonction de la conformation de la molécule une fois adsorbée. Autrement dit, elle dépend du degré de surcompensation des charges de surface. La Figure 2.9 montre qu'après un certain nombre de d'étapes de surcompensations asymétriques, un régime permanent d'inversion de potentiel de surface s'établit, ce qui entraîne une croissance linéaire du film. La Figure 2.10 (a) présente la croissance linéaire de la densité de charges superficielles en fonction de la concentration en électrolytes BPM, ce qui se traduit par une dépendance linéaire de l'épaisseur déposée par rapport à ce même paramètre en (b).

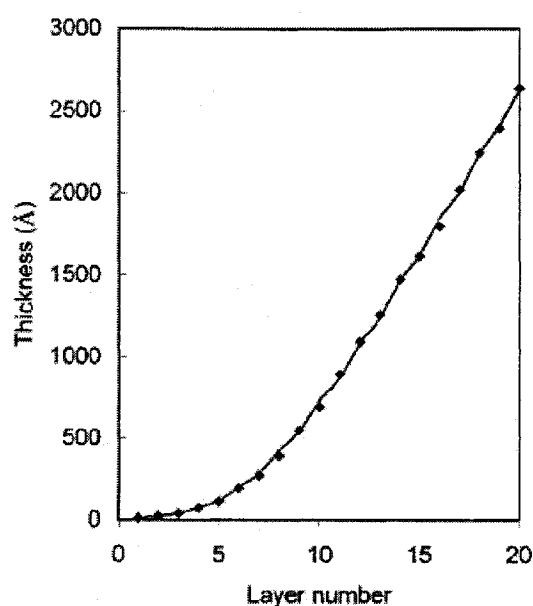


Figure 2.9 Épaisseur du film déposé sur une surface de silicium en fonction du nombre de couches de PDADMAC/PSS à partir de solutions 10 mM polyélectrolytes et 0,1 M NaCl (Schlenoff et Dubas, 2001).

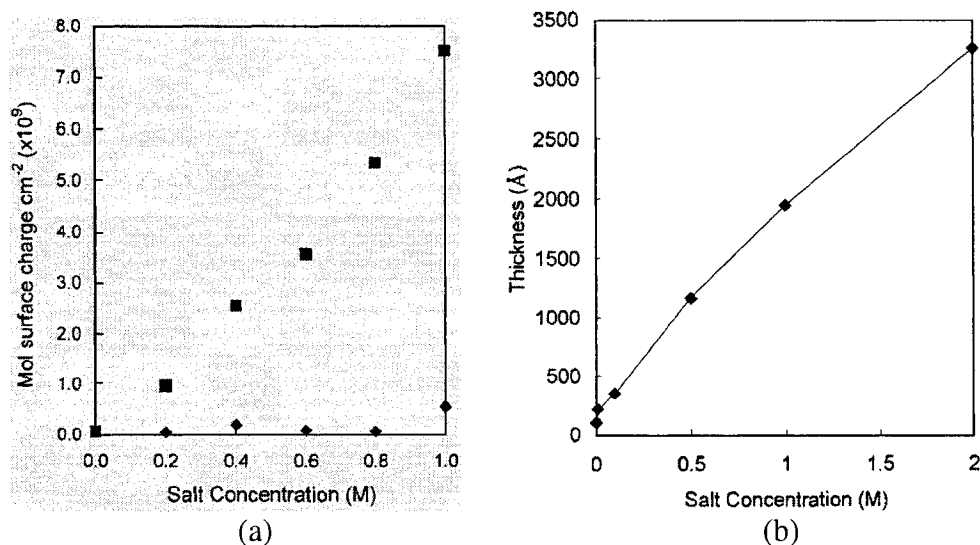


Figure 2.10 (a) Densité surfacique de charges pour la déposition auto-assemblée CPC de 15 (PDADMAC en surface; carrés) ou 14 (PSS en surface; triangle) couches de PDADMAC/PSS sur une surface originellement négative à partir de solutions 1 mM de polyélectrolytes et différentes concentrations de NaCl. (Schlenoff et Dubas, 2001); (b) Épaisseur totale d'un dépôt de 10 bicouches de PDADMAC/PSS sur une surface de mica à partir de solutions 1 nM de polyélectrolytes et différentes concentrations de NaCl. (Dubas et Schlenoff, 1999).

La topographie de surface est également influencée par la salinité de la solution de polyélectrolytes. Dans des solutions faiblement concentrées, les chaînes s'adsorbent à plat, ce qui produit des surfaces relativement lisses. La déposition de molécules repliées sur elles-mêmes, typiques de solutions salines, engendre une structure tridimensionnelle particulière qualifiée de vermiculaire (Fig. 2.11).

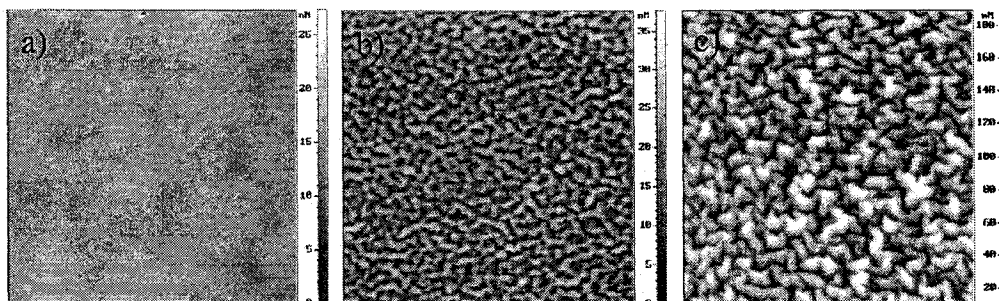


Figure 2.11 Images topographique AFM de la morphologie d'un film composé de 10 bicouches de PDADMAC/PSS déposées à partir de solutions (a) 0,1 M, (b) 0,3 M et (c) 1,0 M NaCl, 1 mg/ml polyélectrolytes. Les dimensions des images sont 5 μm X 5 μm et la dimension z est représentée sur l'échelle (McAloney et al., 2001).

La polarité de surface implique nécessairement la présence d'électrolytes BPM de charges opposées dans son voisinage rapproché. La réponse à la question subséquente, à savoir ce qu'il advient de ces contreions fixés près de la surface au moment du pairage ionique – sont-ils expulsés du complexe en même temps que le solvant ou participent-ils au balancement des charges à l'intérieur du film – est non seulement déterminante pour la compréhension fondamentale du phénomène mais aussi pour les applications envisageables. Il s'agit en fait de déterminer lequel des deux mécanismes de compensation – extrinsèque ou intrinsèque – entre en jeu. Dans le cas de la compensation intrinsèque, les charges positives se trouvant sur le polycation sont balancées par les charges négatives du polyanion. Dans le cas alternatif de la compensation extrinsèque, une fraction des charges se trouvant sur les polyélectrolytes est balancée par les électrolytes BPM provenant de la solution. En employant des sels radiomarqués pour vérifier leur présence à l'intérieur de films composés de 10 bicouches de PDADMAC/PSS ($245 \pm 20 \text{ \AA}$) déposées à partir de solutions 50 mM de polyélectrolytes et 0,1 mM CaCl_2 , Schlenoff et al. (1998) ont démontré que la compensation d'au moins 99,97 % des charges internes positives est intrinsèque. De la même façon, ils ont découvert que la compensation d'au moins 99,99 % des charges internes négatives est intrinsèque. La conclusion qui s'impose est que les contreions

sont expulsés du complexe lors de sa formation. En pratique, ces électrolytes BPM ne servent qu'à définir la conformation de la molécule et donc à contrôler l'épaisseur de polymère déposé

La formation des boucles non-adsorbées à l'interface liquide/solide génère une structure beaucoup plus complexe et surtout moins ordonnée et stratifiée que celles obtenues par les techniques de Langmuir-Blodgett ou de polymérisation in-situ. L'existence de ces boucles – ces « imperfections de surface » qui engendrent l'inversion de la polarité de surface – implique que la compensation intrinsèque ne peut s'effectuer sur un plan situé à l'interface entre les deux couches. Les strates de polyélectrolytes ont plutôt tendance à s'interpénétrer pour ainsi prolonger le balancement des charges sur une plus grande épaisseur. Nombre d'études témoignent d'ailleurs d'une interpénétration des chaînes s'accompagnant d'une distribution des charges s'étalant sur plusieurs épaisseurs de couches (Decher, 1997; Lowack et Helm, 1998; Schlenoff et al., 1998; Dubas et Schlenoff, 1999; Schlenoff et Dubas, 2001; Schoeler et al., 2003). La Figure 2.12 schématise ce phénomène. On observe par exemple la présence du polyélectrolyte déposé pour la troisième couche au niveau des couches 1 à 5, ce qui confirme l'interpénétration des différentes strates.

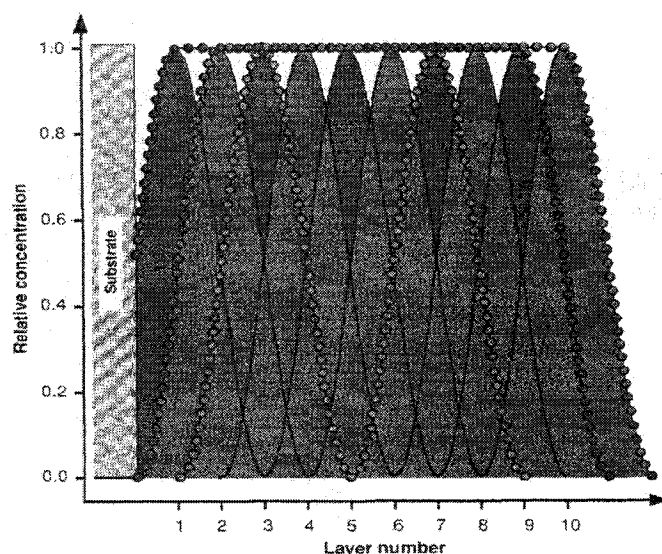


Figure 2.12 Représentation schématique d'un film auto-assemblé de 10 couches de deux polyélectrolytes de charges opposées, chacun étant représenté par un profil de concentration arbitrairement choisi sinusoïdal. Les courbes de cercles représentent les profils de concentration mesurées d'un polyélectrolyte marqué au deutérium introduit toutes les quatre couches (Decher, 1997).

2.3.4.3 Irréversibilité du processus d'adsorption et temps de déposition

Le fait que la couche déposée ne se dissolve pas pendant le lavage, ainsi que la dépendance linéaire de l'épaisseur déposée par rapport à la force ionique de la solution sont deux indices établissant l'irréversibilité probable de la réaction d'adsorption d'un polyélectrolyte sur une surface de charge opposée. Ce n'est cependant pas suffisant pour l'affirmer hors de tout doute. En adsorbant sur une surface un polyélectrolyte radiomarké et en transférant celle-ci dans une solution – saline ou non-saline – de polyélectrolytes « naturels », Dubas et Schlenoff (1999) ont pu observer l'échange de polyélectrolytes marqués et non-marqués dans la solution. Aucun échange n'a été observé après deux heures et seulement 30-40 % après plusieurs semaines. Ce résultat constitue une preuve directe de l'irréversibilité du phénomène. Irréversibilité

n'implique cependant pas immobilisme. Une couche peut facilement se réorganiser pour accommoder une plus grande quantité de polyélectrolyte, mais une fois adsorbé, les chaînes ne peuvent plus se désorber. La quantité de polymères déposés est en fait contrôlée par la solution polymère possédant la plus haute concentration en contreions – plutôt que la dernière – à laquelle la surface est exposée (Dubas et Schlenoff, 1999).

Sachant qu'une surface dispose d'un nombre fixe de sites d'adsorption – l'augmentation de la densité surfacique de déposition (g/m^2) est en fait le résultat d'une épaisseur adsorbée plus importante qui est elle-même fonction de la salinité de la solution – et dans l'optique de l'adsorption « hit-and-stick », il est légitime de s'attendre à une cinétique contrôlée par la diffusion. À ce moment, le temps de déposition n'agit qu'en début de réaction, alors que la surface n'est pas totalement recouverte. D'autres effets entrent cependant en jeu, notamment les répulsions stériques et les volumes d'exclusion. La figure 2.13 montre que le taux de croissance de l'épaisseur du film diminue effectivement avec le temps, mais que le plateau n'est pas atteint aussi rapidement que prévu.

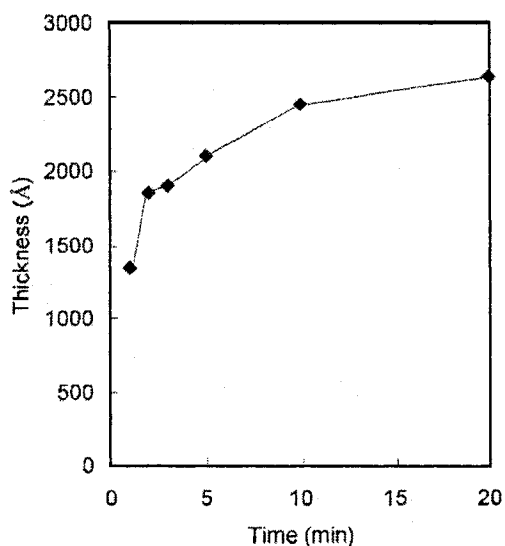


Figure 2.13 Épaisseur d'un film composé de 10 couches de PDADMAC/PSS en fonction du temps de déposition de chaque couche. Solution 1,0 M NaCl, 1 mM polyélectrolyte (Dubas et Schlenoff, 1999).

Dès les premiers instants de l'immersion, une fraction de la surface est recouverte de polyélectrolytes. En raison des interactions stériques et des effets de volumes d'exclusion, ces chaînes fixées en surface empêchent les autres se trouvant en solution d'atteindre les sites d'adsorption inoccupés. Ils ne deviennent accessibles qu'à la suite de réarrangement de surface et de modifications de la conformation des molécules, deux phénomènes relativement lents. Conséquemment, l'apparition du plateau est décalée dans le temps par rapport aux prédictions du modèle « hit-and-stick ».

2.3.4.4 Qualité du solvant

Un polyélectrolyte solubilisé dans un mauvais solvant adopte généralement une configuration de type collier caractérisée par des globules dans lesquels la chaîne est recroquevillée sur elle-même et qui sont séparés par des segments très étirés (Fig. 2.14).

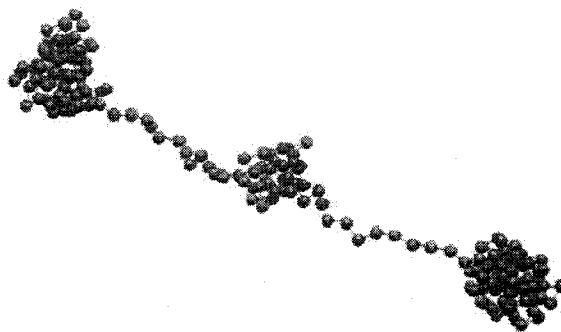


Figure 2.14 Représentation schématique d'une conformation de type collier caractéristique d'un polyelectrolyte solubilisé dans un mauvais solvant (Dobrynin et al., 1996).

La qualité d'un solvant peut être contrôlée en modifiant la composition d'un mélange solvant/non-solvant comme le système eau/éthanol. Les molécules d'éthanol, possédant une constante diélectrique différente de l'eau, font office d'écran électrostatique, ce qui a pour conséquence de diminuer les répulsions intrachâînes. En se rapprochant des conditions de solubilisation Θ , les globules se multiplient, grossissent et s'assemblent pour finalement former un seul globule ayant une configuration proche de celle observée en solution saline. Comme l'illustre la Figure 2.15, la qualité du solvant, seule ou en combinaison avec la salinité de la solution, peut être employée comme paramètre de contrôle de la structure déposée (Poptoshev et al., 2004).

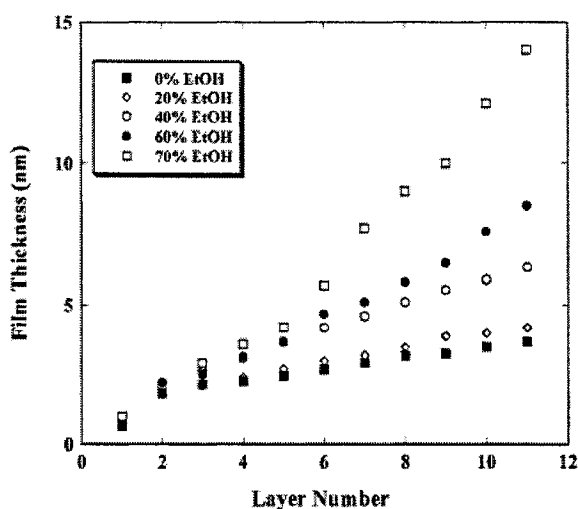


Figure 2.15 Épaisseur d'un film de PAH/PSS déposé sur une surface d'or en fonction du nombre de couches pour différentes compositions du mélange eau/éthanol. Solution 0,5 M NaCl, 1 mg/ml polyélectrolyte dans l'eau pure (Poptoshev et al., 2004).

2.3.4.5 Influence de la densité de charge des polyélectrolytes

Les systèmes polyélectrolytes fortement gouvernés par les interactions électrostatiques tels PDADMAC/PSS et PAH/PSS exhibent une densité de charge critique en dessous de laquelle la croissance des multicouches auto-assemblées est impossible. Sur la Figure 2.16 qui présente ce phénomène, on remarque que cette densité de charge critique est en fait un optimum au-dessus duquel l'épaisseur du film diminue avec l'augmentation du degré de charge.

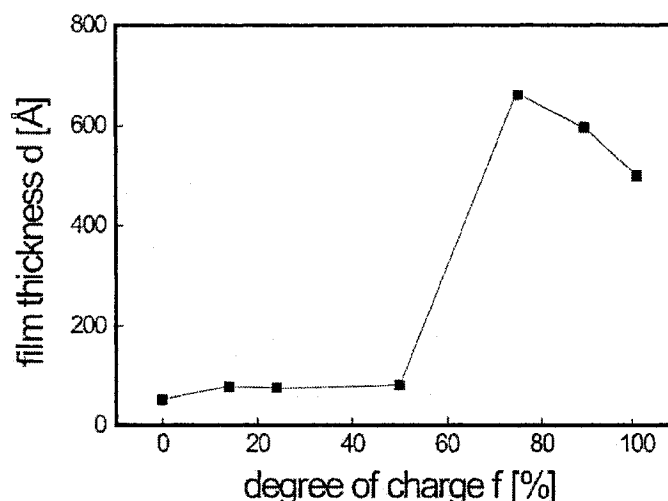


Figure 2.16 Épaisseur d'un film de 10 bicouches de (PDADMAC(f)-NMVA(1-f))/PSS) sur une surface de silicium en fonction du degré de charge (f) du polycation. Solution 0,1 M NaCl, 10^{-2} mono M polyélectrolytes. Le P(DADMAC(f)-NMVA(1-f)) est un copolymère statistique de DADMAC (segments chargés) et de NMVA (N-méthyle-N-vinylacetamide) (segments neutres) dont la composition correspond au degré de charge ou à la densité de charge (Steitz et al., 2001).

Ce comportement est expliqué par la combinaison de plusieurs effets. Avec la diminution de la densité de charge, un plus grand nombre de molécules s'adsorbent à la surface pour surcompenser la charge présente et inverser la polarité de surface (Fig. 2.17). En même temps, en raison de la plus grande distance moyenne entre les segments chargés, les répulsions électrostatiques intrachaînes s'estompent quelque peu, permettant à la chaîne d'adopter une conformation plus compacte. Le résultat final est donc une double augmentation de la quantité de polymères adsorbés qui engendre en même temps un accroissement de la rugosité de surface. Étant donné une densité de pairage ionique plus faible, un plus grand nombre de molécules d'eau peuvent rester emprisonnées à l'intérieur du film. Des films contenant jusqu'à 40 % (massique) d'eau ont été rapportés (Schoeler et al., 2002).

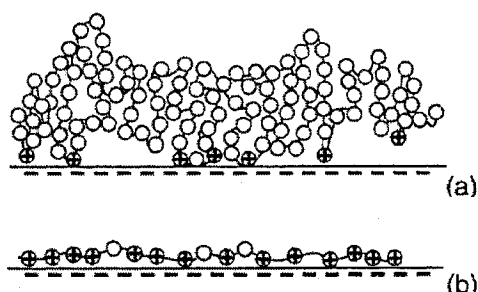


Figure 2.17 Illustration schématique de la configuration de polyélectrolytes (a) de faible densité de charge et (b) de forte densité de charge, adsorbés à l'interface (Rojas et al., 2002).

Cependant, du moment que la densité de charge est trop petite – c'est-à-dire sous la densité de charge critique – les chaînes sont trop faiblement liées à la surface et s'en détachent rapidement à l'étape suivante pour former des complexes en solution, rendant impossible une croissance soutenue des multicouches. En effet, lorsque le gain enthalpique provenant des interactions électrostatiques est petit, comme dans le cas présent de macromolécules faiblement chargées, la formation de complexes en solution est favorisée pour des considérations entropiques : les polyélectrolytes sous forme de complexes ont plus de degrés de liberté que sous la forme de multicouches (Schoeler et al., 2002).

Quelques études récentes démontrent qu'en utilisant des polyélectrolytes faibles comme des polyacides et des polybases et en contrôlant la densité de charge de la chaîne à l'aide du pH de la solution, des multicouches peuvent être déposées avec des densités de charge aussi basses que 8 % (Schoeler et al., 2002). Dans ce cas, les interactions électrostatiques ne sont plus dominantes, les polyélectrolytes ont plutôt tendance à former des ponts H, des liaisons hydrophobes et des liaisons de transfert de charge. La correspondance des charges opposées lors du pairage apparaît alors plus importante que la densité de charge – les distances axiales moyennes entre les segments réactifs pour les deux polyélectrolytes doivent en fait être semblables (Schoeler et al., 2003).

2.3.5 Dépôt auto-assemblée couche-par-couche de films composites sur des surfaces planes et complexes

La technique de dépôt CPC a été employée dans la fabrication d'une variété impressionnante de films composites. En plus des polyélectrolytes classiques (Decher et al., 1992), différents polymères neutres synthétiques (Serizawa et al., 2001 et 2002), biopolymères (protéines et acides nucléiques) (Lvov et al., 1995); Caruso et al., 1997 et 1998b), particules colloïdales minérales (Kleinfeld et Ferguson, 1994) et métalliques (Caruso et al., 1998a; Caruso et Möhwald, 1999a; Lvov et al., 1997; Kim et al., 2002), autres particules inorganiques (Kotov et al., 1995), dendrimères (Khopade et Caruso, 2003) et polymères conducteurs (Stockton et Rubner, 1997; Cheung et al., 1997; Ram et al., 1999) ont été assemblés selon cette technique.

Bien que presque exclusivement étudiée sur des surfaces modèles macroscopiquement planes, certaines études récentes ont rapporté la dépôt CPC de films multicouches sur des surfaces complexes, notamment sur des particules colloïdales (Sukhorukov et al., 1998a et 1998b; Caruso et al., 1998a; Caruso et Möhwald, 1999a et 1999b; Shi et al., 2003).

Étant donné que des multicouches polyélectrolytes/protéines ont été assemblées dans le cadre de cette étude, la section qui suit s'intéressera plus particulièrement aux résultats obtenus pour la dépôt auto-assemblée CPC de ce type de films sur des surfaces planes et complexes.

2.3.5.1 Multicouches auto-assemblées polyélectrolytes/protéines

Les protéines sont des biopolymères formés d'une séquence d'acides aminés. En solution, elles sont porteuses d'une charge qui varie selon le pH. Le point isoélectrique (pI) représente le pH pour lequel la molécule est neutre. Par exemple, le pI de

l'albumine de sérum bovin (BSA) est de 4,7 (Peters, 1996). Généralement, en deçà du point isoélectrique, la molécule est chargée positivement, alors qu'elle est chargée négativement au dessus du pI. En plus de leur charge modulable, les protéines se différencient des polyélectrolytes classiques par leur arrangement tridimensionnel. Loin d'adopter une conformation de pelote statistique, la chaîne séquencée d'acides aminés s'organise plutôt en différents domaines selon les interactions entre les monomères (Figure 2.18).



Figure 2.18 Représentation de la structure de la protéine BSA à l'aide du modèle « *space filling* », avec les groupements basiques en gris, acides en rouge et neutre en jaune (Carter et Ho, 1994).

Au contact d'une surface hydrophobe, les protéines « molles » comme le BSA ont tendance à s'adsorber rapidement pour ensuite se dénaturer en perdant une partie de leur structure tridimensionnelle (Kim et Somorjai, 2003; Krisdhasima et al., 1993; Liu et al., 1992; Cheng et al., 1987). Lorsque plongée dans une solution plus concentrée, la couche adsorbée a cependant la capacité de se réarranger pour accommoder une plus grande quantité de protéines. Les protéines « dures » comme le lysozyme s'adsorbent généralement moins fortement en surface et conservent leur structure tridimensionnelle (Kim et al., 2003).

La méthode de fabrication CPC de films composites polyélectrolytes/protéines a été développée par Lvov et al. (1995). Selon qu'un polycation ou un polyanion soit employé comme couche interstitielle, une couche de protéines chargée négativement ou positivement peut être déposée (Lvov et al., 1995; Caruso et Möhwald, 1999b). L'épaisseur de cette couche protéine est généralement de beaucoup supérieure à celle d'une couche de polyélectrolyte. Caruso et Möhwald(1999b) ont étudié le système PDADMAC/PSS/BSA déposé sur des particules colloïdales de polystyrène chargé négativement. Des couches de BSA dix fois plus épaisses que les couches intermédiaires ont été rapportées. Cet écart vient du fait que contrairement aux polyélectrolytes qui s'écrasent sur la surface sous l'effet des charges électrostatiques, les protéines conservent au moins une partie de leur structure 3D une fois adsorbées (Lvov et al., 1995). De plus, les polyélectrolytes ont tendance à enrober les globules de protéines en surface (Figure 2.19).

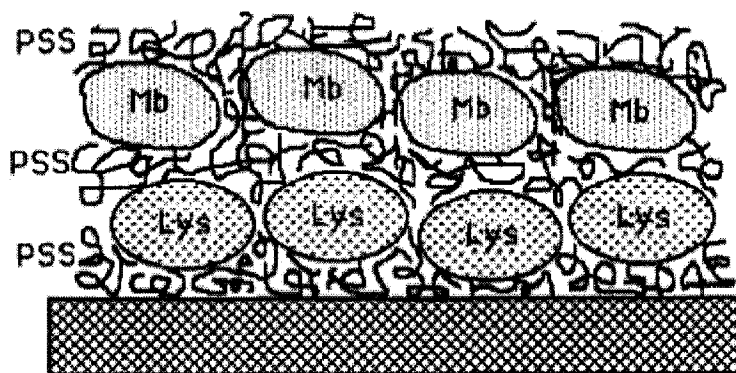


Figure 2.19 Illustration schématique simplifiée d'un film auto-assemblé de PSS/lysozyme/PSS/myoglobine (Lvov et al., 1995).

Le contrôle de l'épaisseur du dépôt peut s'effectuer à l'aide du pH de la solution qui influence la densité de charge de la protéine. Cependant, contrairement à ce qui est observé pour la déposition de polyélectrolytes – une diminution de l'épaisseur du dépôt avec l'augmentation de la densité de charge (Fig.2.16) – l'épaisseur du dépôt augmente avec la densité de charge (Figure 2.20). En s'éloignant du pI, la densité de charge de la

protéine augmente et sa capacité à s'arranger densément sur la surface – fonction des interactions électrostatiques – s'accroît par le fait même (Caruso et Möhwald, 1999b).

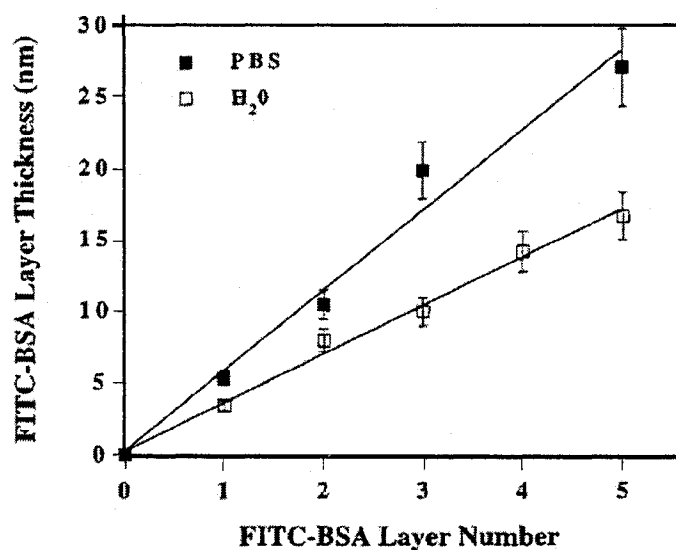


Figure 2.20 Épaisseur d'un film de PDADMAC/PSS/FITC-BSA déposé sur une particule de PS latex en fonction du nombre de couches pour différents pH de solution (H₂O : pH = 5,8 ; PBS : pH = 7,0) (Caruso et Möhwald, 1999b).

CHAPITRE 3

MÉTHODOLOGIE

3.1 Matériaux

Le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) a été obtenu de la compagnie Solvay-Interox et le poly(L-lactide) (PLLA) de la compagnie Boehringer-Ingelheim. Les caractéristiques de ces polymères employés dans la fabrication des substrats poreux modèles sont présentées au Tableau 3.1. L'albumine de sérum bovin (BSA), le poly(diallyldiméthylammonium chloré) (PDADMAC), $M_w = 100\,000 - 200\,000$, et le poly(sodium de 4-styrenesulfonate) (PSS), $M_w = 70\,000$, ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les solvants – acide acétique, cyclohexane, chloroforme, dichlorométhane et éthanol – ainsi que le chlorure de sodium (NaCl) ont été obtenus de la compagnie Laboratoire Mat. La solution tampon phosphate (PBS) a été achetée chez Fisher Scientific. Tous les polymères, polyélectrolytes, protéine, solvants et sels ont été employés tels que reçus. L'eau utilisée dans toutes les manipulations a été préparée à l'aide d'un système de microfiltration comprenant trois étages Milli-Q Biocel de Millipore et avait une résistivité d'au moins $18,2\,M\Omega\,cm$.

Tableau 3.1 Propriétés caractéristiques des polymères employés (tiré de Sarazin et al., 2004)

	M_w	M_n	Viscosité intrinsèque ($dL\,g^{-1}$)	Densité à 20°C ($g\,cm^{-3}$)	Densité à 200°C ($g\,cm^{-3}$)	Transition vitreuse (°C)	Température de fusion (°C)
PLLA	–	–	3,6	1,27	1,11	55	183
PCL	120 000	69 000	–	1,14	0,96	-60	60-62

3.2 Fabrication des structures modèles de PLLA

La technique de fabrication des structures poreuses de PLLA par voie fondue a été initialement décrite par Sarazin (Sarazin, 2003; Sarazin et Favis, 2003; Sarazin et al., 2004). Les mélanges de polymères PLLA/PCL 50/50 (volumique) ont été réalisés dans un mélangeur interne Haake à 200 °C et 50 tours par minute pour 5 minutes. À la sortie du mélangeur, les mélanges ont été trempés dans l'azote liquide pour fixer la morphologie. Les recuits ont été effectués à la température de préparation des mélanges sous une presse à plaques chauffantes sans pression appliquée. Des éprouvettes cylindriques (diamètre approximatifs de 3 et longueur variable) ont été taillées à partir des mélanges. L'extraction de la phase porogène PCL a été réalisée en bouteille dans l'acide acétique. Pour vérifier l'avancement du procédé, les échantillons ont été séchés sous vide puis pesés à intervalles réguliers. L'extraction a été jugée terminée lorsque que la masse des échantillons s'est stabilisée.

3.3 Dépôt des multicouches auto-assemblées polyélectrolytes/protéines à l'intérieur des structures poreuses de PLLA

La technique de dépôt des multicouches auto-assemblées polyélectrolytes/protéines qui a été employée est une variante de la technique originellement décrite par Caruso et Möhwald (1999b). Trois couches de précurseurs (PDADMAC/PSS/ PDADMAC) ont initialement été adsorbées sur la surface de la porosité des structures modèles de PLLA pour uniformiser la charge de surface et subséquemment faciliter l'adsorption de la protéine. Le film précurseur a été fabriqué par l'adsorption successive de PDADMAC et de PSS à partir de solutions aqueuses contenant 10 mg ml⁻¹ de polyélectrolytes et 1 M de NaCl. La solution a été forcée de pénétrer dans le substrat hydrophobe en appliquant alternativement pression ($P = 4$ MPa) et vacuum de ($V = -75$ kPa) selon l'enchaînement suivant : V(30 min.) + P(15 min.) + P(15 min.) + V(45 min.) + P(15 min.) + P(15 min.) + V(60 min.) + P(15 min.)

+ V(30 min.). En pesant les échantillons secs et imbibés, il a été déterminé qu'avec cette méthode, il est possible de remplir de solution toute la porosité des substrats. En tout, les polyélectrolytes ont été en contact avec la surface de PLLA pendant quatre heures pour chaque couche. Les échantillons saturés en solution ont par la suite été lavés dans de l'eau pendant quatre heures sous agitation constante en changeant l'eau toutes les heures pour éliminer toutes les macromolécules n'ayant pas été adsorbées. En employant le même protocole, les multicouches (BSA/PDADMAC)_n/BSA ont été déposées. La solution de BSA contenait 10 mg de protéine par ml de PBS (pH = 7). Après chaque déposition, les substrats ont été séchés sous vide à 45 °C pour 12 heures puis pesés.

3.4 Extraction de la structure de PLLA recouvertes et lyophilisation des substrats ultra-poreux

Dépendamment des caractéristiques des structures initiales, une des deux solutions d'extraction de la matrice structurale de PLLA a été employées : le dichlorométhane pur ou un mélange de dichlorométhane/éthanol 95/5 (volumique) (l'utilité de l'éthanol dans la solution d'extraction est discutée à la section 4.4). Les échantillons ont ensuite été transférés dans le chloroforme pour 48 heures afin de compléter la solubilisation de la matrice de PLLA et finalement dans le cyclohexane pour laver le chloroforme. Les constructions multicouches PDADMAC/PSS/BSA ne se dissolvent pas dans les solvants chlorés, l'éthanol ou le cyclohexane. Les substrats ultra-poreux baignant dans le cyclohexane ont été progressivement gelés pour ensuite être lyophilisés à -25 °C pendant au moins 24 heures. Une fois la lyophilisation terminée, les échantillons froids ont été ramenés à la température ambiante sous vide pour prévenir la condensation de l'humidité et ont été conservés dans un dessiccateur.

3.5 Caractérisation des structures modèles de PLLA avant et après le dépôt des multicouches auto-assemblées polyélectrolytes/protéines et des substrats ultra-poreux

3.5.1 Continuité des mélanges PLLA/PCL

Une méthode d'analyse gravimétrique a été employée pour déterminer la continuité de la phase porogène après l'extraction du PCL des mélanges PLLA/PCL 50/50. L'équation 3.1 a été utilisée :

$$\% \text{ continuité du PCL} = \left(\frac{m_{PCL \text{ initial}} - m_{PCL \text{ final}}}{m_{PCL \text{ initial}}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

3.5.2 Fraction de vide

Les fractions de vide ou porosités théoriques et expérimentales des structures ont été déterminées à l'aide des équations 3.2 à 3.4. Le volume expérimental des substrats ultra-poreux a été obtenu à partir des dimensions mesurées sur des clichés faits au microscope électronique à balayage.

$$P_{\text{structure modèle}} = \left(\frac{\left(\frac{m_{\text{mélange}} - m_{\text{structure}}}{\rho_{PCL}} \right)}{\left(\frac{m_{PLLA}}{\rho_{PLLA}} \right)_{\text{mélange}} + \left(\frac{m_{PCL}}{\rho_{PCL}} \right)_{\text{mélange}}} \right) \times 100\% \quad (3.2)$$

$$P_{\text{substrat ultraporeux}}^{\text{théorique}} = \left(1 - \frac{\left(\frac{m_{\text{substrat}} \times f_{PDADMAC / PSS}}{\rho_{PDADMAC / PSS}} \right) + \left(\frac{m_{\text{substrat}} \times (1 - f_{PDADMAC / PSS})}{\rho_{BSA}} \right)}{\left(\frac{m_{PLLA}}{\rho_{PLLA}} \right)_{\text{mélange}} + \left(\frac{m_{PCL}}{\rho_{PCL}} \right)_{\text{mélange}}} \right) \times 100\% \quad (3.3)$$

$$p_{\text{substrat ultraporeux}}^{\text{expérimental}} = \left(1 - \frac{\left(\frac{m_{\text{substrat}} \times f_{\text{PDADMAC/PSS}}}{\rho_{\text{PDADMAC/PSS}}} \right) + \left(\frac{m_{\text{substrat}} \times (1 - f_{\text{PDADMAC/PSS}})}{\rho_{\text{BSA}}} \right)}{V_{\text{substrat}}} \right) \times 100\% \quad (3.4)$$

avec $f_{\text{PDADMAC/PSS}}$, la fraction massique de PDADMAC/PSS dans les multicouches auto-assemblées PDADMAC/PSS/BSA, $\rho_{\text{PLLA}} = 1.27 \text{ g/cm}^3$ à 20°C (Sarazin et al., 2004), $\rho_{\text{PCL}} = 1.14 \text{ g/cm}^3$ à 20°C (Sarazin et al., 2004), $\rho_{\text{PDADMAC}} = \rho_{\text{PSS}} = 1.2 \text{ g/cm}^3$ à 20°C (Brandrup et al., 1999) et $\rho_{\text{BSA}} = 1.32 \text{ g/cm}^3$ à 20°C (Berlin et Pallansch., 1968).

L'écart entre les porosités théorique et expérimentale représente le changement de volume subi par les échantillons à travers le procédé – gonflement ou rétrécissement du substrat final par rapport à la structure initiale.

3.5.3 Aire de surface interne et diamètre des pores

L'aire de surface interne des différentes structures a été mesurée à l'aide de la technique d'adsorption d'azote BET. L'appareillage se compose d'un Flowsorb 2300 II Micrometrics, couplé à un régulateur de débit Cal Box de Sierra Instruments. L'utilisation de cette méthode pour les substrats poreux produits à partir de mélanges de polymères a été validée par Li et Favis (2001).

En supposant un réseau de pores composé d'une multitude de cylindres interconnectés, le diamètre moyen de la porosité peut être calculé à partir de l'équation 3.5 et du volume de polymère extrait.

$$d = \frac{4V}{S} \quad (3.5)$$

avec V , le volume de la phase extraite et S , la surface de la porosité.

3.5.4 Morphologie des substrats

Les structures poreuses de PLLA avant et après le dépôt des multicouches ont été microtomées à l'aide d'un microtome Leica RM 2165 équipé d'un couteau de verre.

Les substrats ultra-poreux ont été préparés à l'aide appareil FIB FB-2000A de la compagnie Hitachi. Une section des structures PDADMAC/PSS/BSA a été pulvérisée à l'aide d'un faisceau ionique focalisé de Gallium (FIB) de 30 kV selon le schéma décrit à la Figure 3.1 (d'après la méthode développée par Virgilio (2004) pour les mélanges massifs de polymères). Deux faisceaux de différentes puissances ont été employés. Un faisceau de faible intensité (Faisceau I, 0,8 nA) a été utilisé pour créer la surface à observer, minimisant ainsi la déformation de la structure. Étant donné que ce processus est relativement long, seulement une mince section a été pulvérisée. L'observation de la surface au microscope électronique à balayage (SEM) doit se faire perpendiculairement à la direction du faisceau ionique. Pour que la surface soit accessible au faisceau électronique du SEM, un mur de l'anfractuosité générée au FIB a été abattu à l'aide d'un faisceau ionique beaucoup plus puissant (Faisceau II, 10 nA).

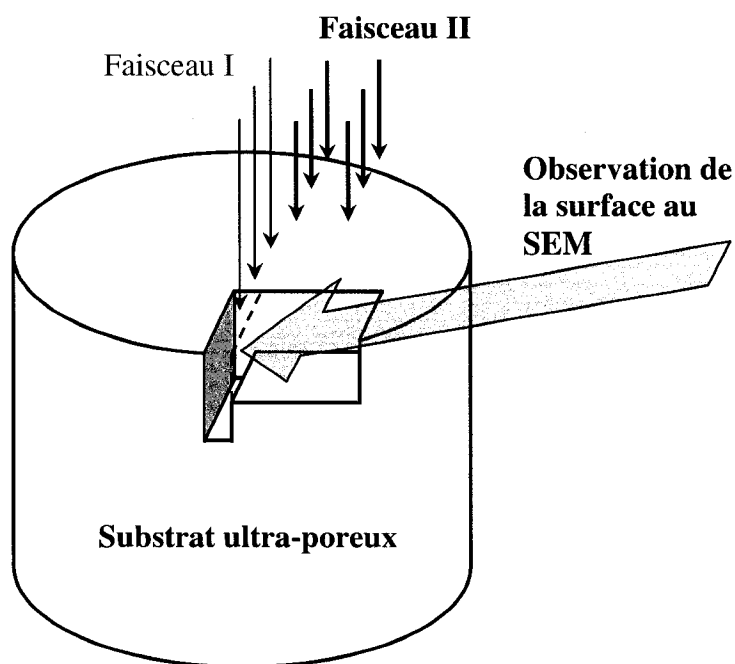


Figure 3.1 Méthode de préparation des substrats ultra-poreux pour l'observation au SEM de la morphologie interne à l'aide du faisceau ionique focalisé de Gallium (FIB) (d'après la méthode développée par Virgilio (2004) pour les mélanges massifs de polymères).

Préalablement au développement de cette technique, des échantillons recouverts de films multicouches ont été microtomés puis extraits. L'analyse de la surface créée n'a pas donnée les résultats escomptés parce que la microstructure était complètement déformée. La technique au FIB a été développée dans le but de minimiser cette déformation. Une justification plus complète de cette méthode ainsi que ses avantages et inconvénients sont discutés à la section 4.7.1.

Tous les échantillons ont été recouverts d'une fine couche d'un alliage d'or-palladium pour ensuite être analysé au microscope électronique à balayage (Jeol JSM 840) à des

tensions d'accélération de 10 kV pour les structures de PLLA et 20 ou 25 kV pour les substrats ultra-poreux de PDADMAC/PSS/BSA.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Méthode de réplique de structures co-continues par déposition auto-assemblée couche-par-couche de films polyélectrolytes/protéines – dissolution de la matrice structurelle.

La Figure 4.1 illustre la technique novatrice de fabrication de substrats ultra-poreux faits de multicouches composites polyélectrolytes/protéines (l'illustration initiale de la structure co-continue provient de Gergen (1996)). Les structures sont représentées en 3D (colonne du milieu) et l'interface modélisée est illustrée en 2D (colonne de droite).

Les structures poreuses modèles de PLLA sont produites en mélangeant à l'état fondu deux polymères immiscibles, puis en extrayant la phase porogène (PCL) (Fig. 4.1, étapes 1 et 2) (Sarazin et al., 2004). Des multicouches composites polyélectrolytes/protéines (PDADMAC/PSS/ BSA) sont par la suite assemblées sur la surface interne des structures de PLLA (Fig. 4.1, étapes 3, 4 et 5). Finalement, la matrice modèle est solubilisée pour ne conserver que le squelette de l'interface (Fig. 4.1, étape 6). Le substrat ultra-poreux ainsi créé est donc une réplique exacte de la morphologie de l'interface de la structure initiale.

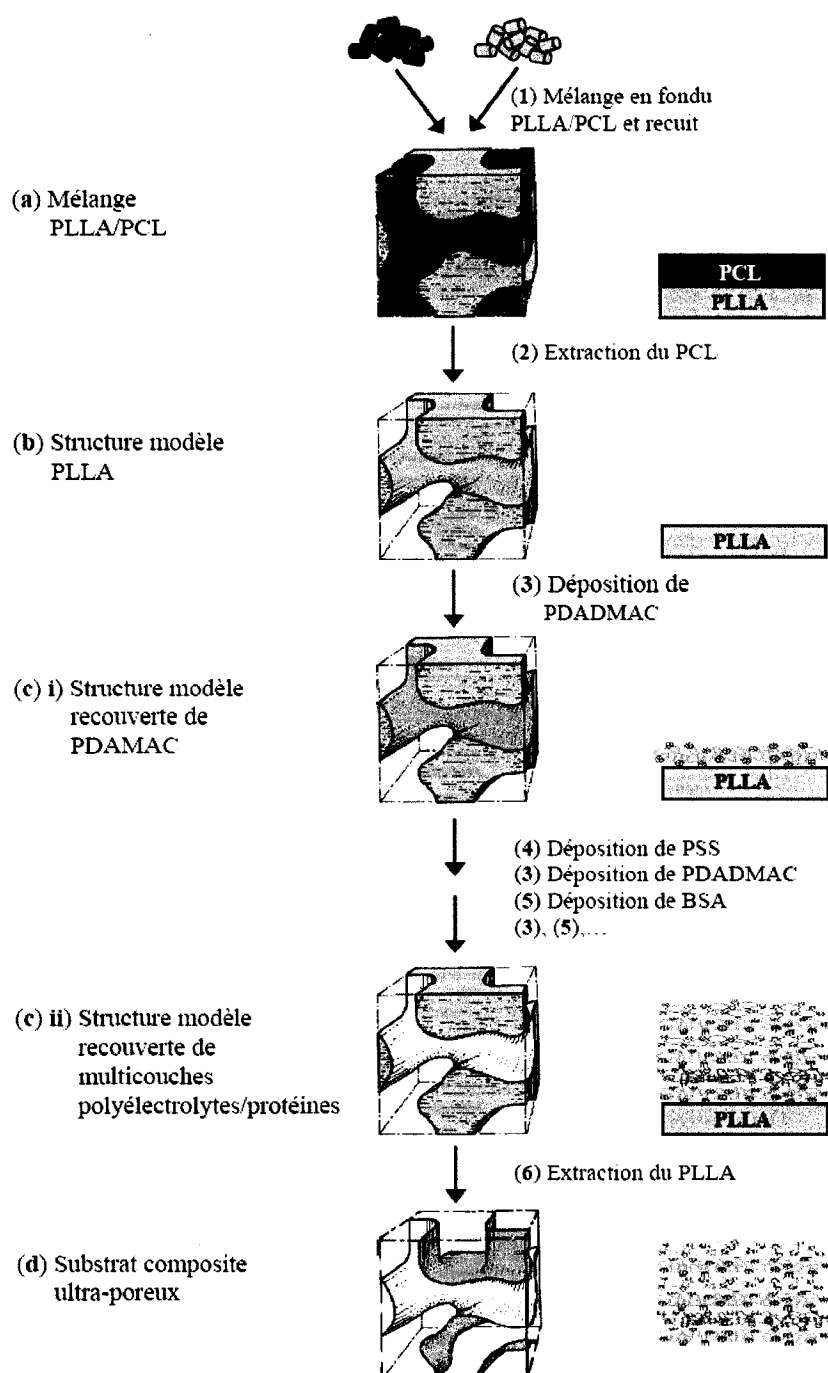


Figure 4.1. Illustration étape par étape de la méthode de réplique de structures co-continues par déposition auto-assemblée couche-par-couche de films polyélectrolytes/protéines – dissolution de la matrice structurale.

4.2 Structures poreuses co-continues

Deux types de structures modèles ont été fabriqués dans le cadre de cette étude. Le Système α (ou Structure α) a été produit à partir d'un mélange co-continu PLLA/PCL 50/50 sans recuit, alors que le Système β (ou Structure β) a été fabriqué à partir d'un mélange co-continu PLLA/PCL 50/50 recuit pendant 2 heures. Comme l'indique les valeurs de continuité de la phase PCL supérieures à 90% (Tableau 4.2), une morphologie co-continue est obtenue pour les deux Systèmes – les deux phases sont continues sur tout le volume. La création du réseau de pores par extraction de la phase porogène garantit une porosité totalement interconnectée. Une petite fraction du PCL (3,8% et 5,9% massique pour les Systèmes α et β respectivement) est tout de même resté emprisonnée dans la matrice de PLLA. Cette fraction est légèrement plus élevée pour la Structure β en raison de l'étape additionnelle de recuit. En effet, la coalescence statique engendre une augmentation de la taille des phases, mais a aussi comme conséquence secondaire une destruction partielle de la morphologie co-continue. Dans notre cas cependant, la désintégration a été minimisée (à 2% de la continuité de la phase PCL) en travaillant à des compositions symétriques (50/50). Des porosités approchant les 50% sont déterminées à l'aide des masses volumiques des polymères. Le diamètre moyen de la porosité est estimé à partir de l'aire de surface interne des échantillons. Tel qu'attendu, l'aire de surface interne est grandement diminuée par le procédé de recuit. Le diamètre des pores augmente inversement proportionnellement à la diminution de l'aire de surface.

Tableau 4.1 Caractéristiques des structures modèles de PLLA

	Système α	Système β
Continuité de la phase PCL (%)	96,2	94,1
Porosité (%)	47,1	46,1
Aire de surface interne vol. (μm^{-1})	1,32	0,29
Diamètre moyen de la porosité (μm)	1,4	6,3

Dans le cadre de cette étude, deux structures modèles possédant des tailles de pores relativement faibles ont été employées. Des pores d'une centaine de microns peuvent cependant être générées en augmentant sensiblement la durée du recuit (Sarazin et al., 2004). Si nécessaire, des pores de plusieurs centaines de microns peuvent même être créés à l'aide du système PLLA/PS (Sarazin et Favis, 2003; Yuan et Favis, 2004).

4.3 Dépôt auto-assemblée des multicouches composites PDADMAC/PSS/BSA

Contrairement au procédé décrit par Caruso et Möhwald (1999b), qui emploie des surfaces initialement chargées négativement, les multicouches PDADMAC/PSS/BSA ont été assemblées sur une surface de PLLA non-chargée. Au lieu de se fixer grâce aux interactions électrostatiques, la surface hautement hydrophobe de PLLA a plutôt induit la formation de liaisons hydrophobes avec la première couche de PDADMAC. Tel que mentionné dans la méthodologie, trois couches de précurseurs ont été initialement déposées sur la surface afin de faciliter l'adsorption subséquente des couches de BSA. Il a été rapporté que le BSA s'adsorbe aisément sur les surfaces hydrophobes telles que le PLLA via les interactions hydrophobes (Kim et Somorjai, 2003; Krisdhasima et al., 1993; Liu et al., 1992 et Cheng et al., 1987). Selon la concentration de la solution, du temps de dépôt et de la nature de la surface, il est possible d'obtenir une monocouche dense et uniforme de BSA. En se basant sur ces résultats, il est donc envisageable de produire des multicouches symétriques en adsorbant le BSA

directement sur la surface de PLLA (BSA/(PDADMAC/BSA)_n) plutôt que PDADMAC/PSS/(PDADMAC/BSA)_n).

La Figure 4.2 illustre la croissance des multicouches à l'intérieur des structures modèles. Une croissance continue de la masse est observée pour les couches de polyélectrolytes. Comparativement à la masse de polyélectrolyte déposé, une quantité plus importante de BSA a été adsorbée. Ce résultat était attendu (voir la section 2.3.5.1 et Caruso et Möhwald, 1999b). Au moment de l'adsorption, la protéine se dénature, mais conserve tout de même une partie de sa structure tridimensionnelle (Kim et Somorjai, 2003; Krisdhasima et al., 1993; Liu et al., 1992; Cheng et al., 1987), garantissant par le fait même une épaisseur de dépôt plus importante que pour un polyélectrolyte classique. Le rapport des masses déposées (Système α /Système β) est estimé à 3,7, ce qui concorde avec le rapport des aires de surface de 4,4 (Tableau 4.1). Le recouvrement de la surface est calculé en divisant l'augmentation de masse moyenne pour la déposition d'une couche de BSA par l'aire de surface interne massique des structures correspondantes. La quantité de protéine adsorbée pour chaque couche de BSA est estimée à $2,1 \text{ mg m}^{-2}$ pour le Système α et à $2,7 \text{ mg m}^{-2}$ pour le Système β . L'écart observé entre les valeurs de recouvrement de surface indique que les couches de BSA déposées à l'intérieur de la Structure β sont légèrement plus épaisses que celles du Système α . Cet écart s'explique par une diffusion facilitée en raison de pores plus gros et d'une tortuosité plus faible dans le cas des Structures β . Ces valeurs concordent bien avec celle obtenue expérimentalement par Caruso et Möhwald (1999b) ($3,0 \pm 1,3 \text{ mg m}^{-2}$) pour le même genre de manipulations sur une surface plane – dans ce cas précis, le phénomène de diffusion n'entre pas en jeu, ce qui justifie le recouvrement de surface obtenu plus élevé. – et celle calculée à partir des dimensions du globule de la protéine ($40 \times 140 \times 40 \text{ \AA}$) (Peters, 1996), en assumant une monocouche de molécule non-perturbées densément organisées selon une orientation « sur le côté » ($2,5 \text{ mg m}^{-2}$) (Peula et de las Nieves, 1993).

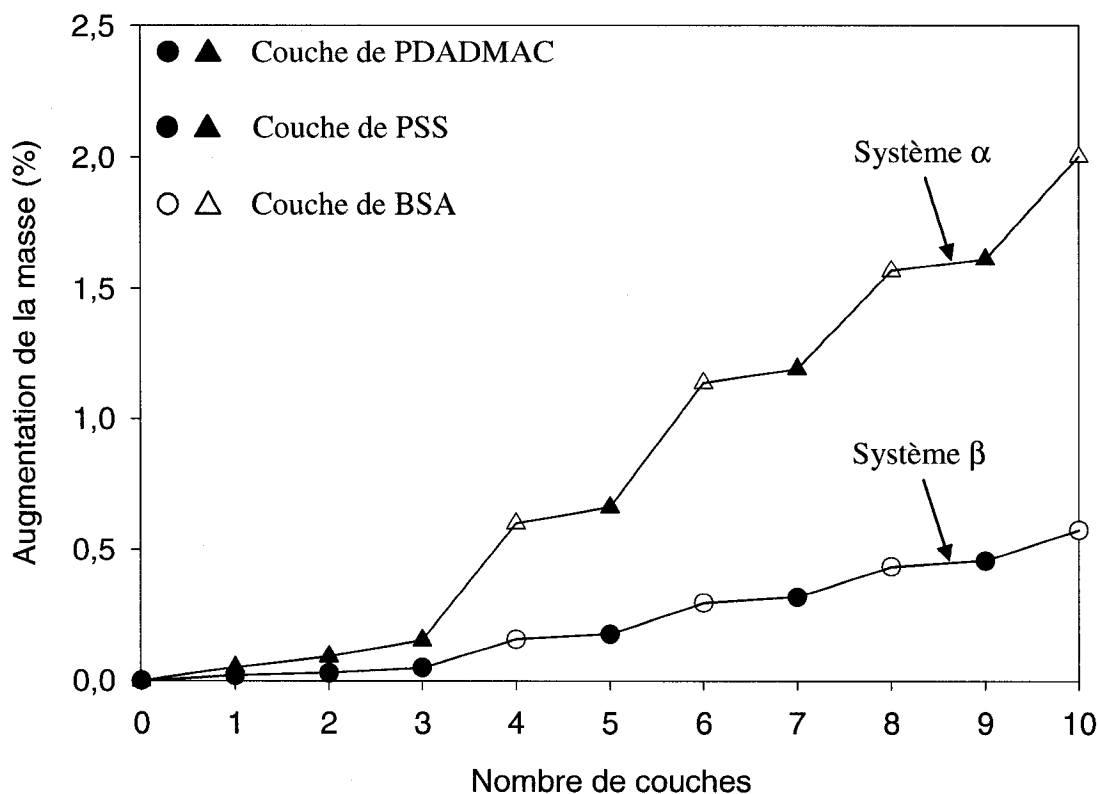


Figure 4.2 Masse déposée en fonction du nombre de couches pour des multicouches PDADMAC/PSS/BSA assemblées sur la surface interne de structures poreuses modèles produites à partir de mélanges PLLA/PCL 50/50 sans recuit (Système α) et recuits pendant 2 heures (Système β).

L'épaisseur des parois des substrats et la stabilité mécanique et la fraction de vide de la structure dépendent du nombre de couches déposées. Un nombre minimal de couches a été assemblé afin de déterminer l'épaisseur de paroi limite permettant d'obtenir une stabilité mécanique satisfaisante. Les substrats composés de 1, 2 et 3 bicouches PDADMAC/BSA ont bien résisté à l'extraction de la matrice et présentaient une bonne stabilité mécanique en solution, mais se sont par la suite contractés lors du séchage de la structure par lyophilisation. La contraction a été grandement réduite par l'ajout d'une

quatrième bicouche. La sections 4.6 discute plus en profondeur ce phénomène. Des structures beaucoup plus solides pourraient être fabriquées en augmentant l'épaisseur des dépôts et/ou le nombre de couches. Des films polyélectrolytes/protéines faits de 40 couches ont été rapportés (Lvov et al., 1995) sans qu'aucune limite ne soit observée. De plus, l'épaisseur des dépôts de protéines peut être contrôlée à l'aide du pH de la solution (voir la section 2.3.5.1 et Caruso et Möhwald, 1999b) qui pourrait donc être utilisé comme paramètre de contrôle additionnel.

4.4 Extraction de la structure modèle de PLLA

Il est admis que les films multicouches polyélectrolytes/protéines assemblés à l'aide de la technique de déposition CPC présentent une structure poreuse (Caruso et al., 1998b). Durant l'extraction de la structure modèle, cette microporosité doit en théorie permettre aux molécules de solvant et de PLLA solubilisées de traverser le film multicouche, ce qui a été confirmé dans le cas des Structures β . Des substrats ultra-poreux partiellement transparents et sans déformation ni rétrécissement, gonflement ou fissuration apparents ont été obtenus en extrayant la matrice dans le dichlorométhane (Fig. 4.3, (a)). Cependant, le même processus a entraîné la fissuration des Structures α (Fig 4.3 (b)). La taille de la phase structurale semble donc avoir une influence sur le processus d'extraction. Une structure grossière comme celle du Système β conserve probablement un squelette solide (le centre de la phase) dans les premiers instants de l'extraction, ce qui l'aide à résister aux différentes contraintes induites par la solubilisation de la matrice alors qu'une charpente plus fine est évidemment plus rapidement attaquée en son centre par le solvant, privant ainsi le substrat de tout support mécanique.

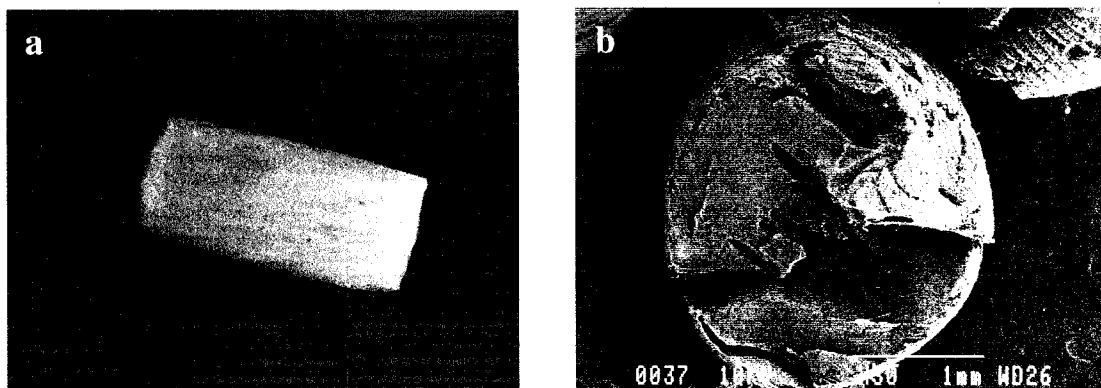


Figure 4.3 (a) Photographie d'un substrat de 10 couches de PDADMAC/PSS/BSA (4 bicouches PDADMAC/BSA) fabriqué à partir du Système β durant l'extraction de la matrice de PLLA dans du dichlorométhane; (b) Micrographie par balayage électronique d'une structure composée de 10 couches de PDADMAC/PSS/BSA fabriquée à partir du Système α après extraction dans du dichlorométhane pur.

Dans le but de prévenir les dommages structuraux, un mélange solvant/non-solvant dichlorométhane/éthanol a été employé pour extraire la matrice de PLLA du Système α . L'ajout de faibles quantités d'éthanol (3 à 10 % vol.) a vraisemblablement ralenti suffisamment le processus de solubilisation pour permettre à la structure de conserver un squelette solide assez longtemps pour résister aux forces exercées par le solvant et le polymère solubilisé en début de processus. Un léger gonflement, attribuable à l'ajout de l'éthanol dans la solution d'extraction du Système α , a été observé dans les premiers instants du processus. Cette expansion s'est partiellement résorbée par la suite. À des concentrations plus élevées en éthanol, l'extraction de la matrice a entraîné une forte dilatation de l'échantillon qui a fini par fendre en deux. Dans ce cas, le dichlorométhane et l'éthanol ont probablement pénétré dans la matrice de PLLA sans être capable de solubiliser le polymère, entraînant un gonflement incontrôlé et catastrophique de la structure.

4.5 Séchage de la structure par lyophilisation

Le cyclohexane ($T_{\text{fusion}} = 6,6\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{triple}} = 6,7\text{ }^{\circ}\text{C}$) a été employé comme solvant pour le procédé de lyophilisation en raison de sa grande volatilité et de son point triple facilement atteignable. Bien qu'aucune déformation n'ait été observée lors de l'échange de solvants, le cyclohexane n'est pas le solvant idéal à utiliser dans un contexte d'applications biomédicales puisqu'il est immiscible avec l'eau (et donc les solutions de culture) et présente en plus une certaine toxicité pour les cellules.

Afin de contourner ces problèmes, d'autres solvants ont été testés : l'hexane, l'acétone, l'éthanol et l'eau. L'hexane et l'acétone ont complètement déformé la structure et ont donc été éliminés. Les échantillons ne pouvaient pas non plus être directement transposés dans l'eau, étant donné que les solvants chlorés et l'eau ne sont pas miscibles. L'éthanol n'a occasionné aucune complication, et bien que moins toxique que le cyclohexane, il ne peut être aisément lyophilisé en raison de son point de fusion trop bas ($T_{\text{fusion}} = -114,2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{triple}} = -123\text{ }^{\circ}\text{C}$). En utilisant l'éthanol comme étape intermédiaire, il a été possible de transférer les substrats dans l'eau. Cependant, la structure s'est encore une fois affaissée lorsque placée en milieu aqueux puisque l'éthanol présent à l'intérieur a été rapidement évacué et solubilisé sans que l'eau ne puisse pénétrer dans la structure hydrophobe pour compenser le vide créé. En augmentant progressivement la concentration en eau de la solution initialement pure, il a été possible de transférer les échantillons d'un solvant organique à une solution aqueuse. Cette méthode s'est révélée particulièrement intéressante parce qu'elle permet d'éviter l'utilisation du cyclohexane dans le procédé et ainsi de réduire la toxicité des substrats en plus de les transposer directement dans le milieu de culture. L'effet de ce procédé sur la macrostructure et la microstructure n'a cependant pas été étudié jusqu'à maintenant. De plus, l'absence de lyophilisation augmente le risque retrouver certains résidus de solvants toxiques (dichlorométhane, chloroforme) dans la matrice. Le

protocole de transfert en milieu aqueux présente tout de même certains avantages et il serait donc intéressant de l'étudier plus en détail.

Une fois secs, les substrats se sont révélés très susceptibles à l'humidité. En fait, tout contact avec l'air ambiant humide doit être évité tant et aussi longtemps que les échantillons n'ont pas atteint la température ambiante, sans quoi l'humidité se condense dans les structures qui rétrécissent à une fraction de leur volume initial (Fig. 4.4, (a)) en refermant leur porosité (Fig 4.4, (b)). Les échantillons sont toutefois très résistants aux variations de température. Aucune déformation, fissuration ou autre altération (macroscopique ou microscopique) n'a été observée en refroidissant ou réchauffant brusquement les substrats pendant les mesures d'aire de surface interne (BET), les faisant passer de la température ambiante à la température de l'azote liquide ($T_{\text{azote liquide}} = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$) et vice-versa. Qui plus est, la microstructure a été en mesure de soutenir une tension d'accélération du faisceau électronique de 25 kV lors de l'analyse au SEM. À titre comparatif, l'étude de la morphologie au SEM des mélanges de polymères « classiques » s'effectue généralement à des voltages avoisinant les 10 kV.

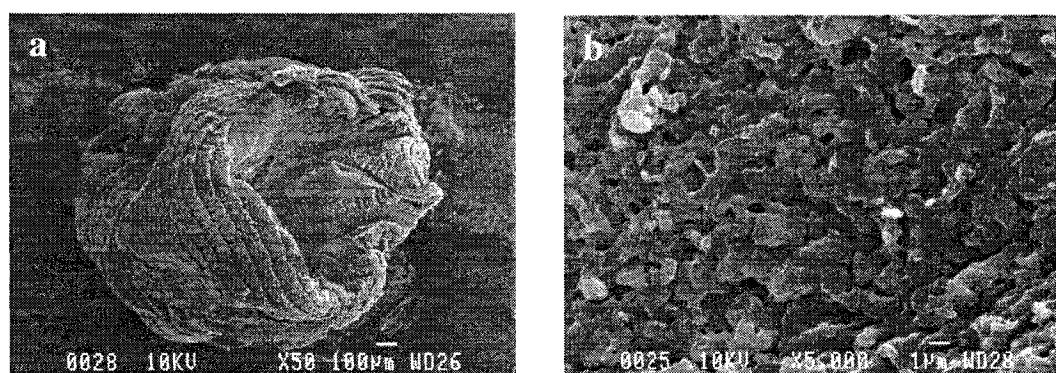
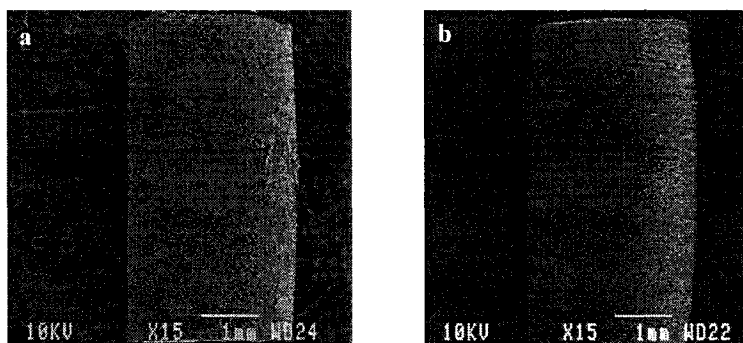


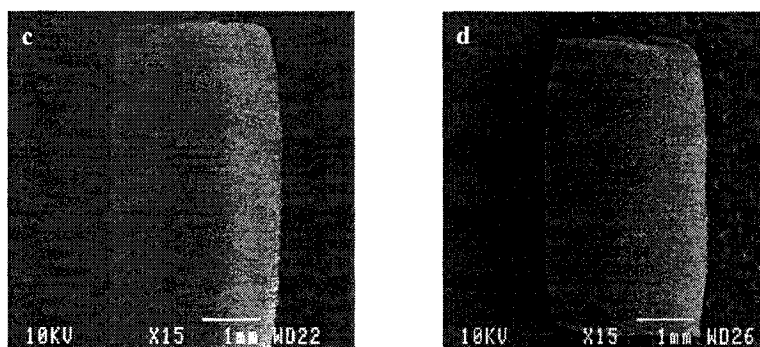
Figure 4.4 Micrographie par balayage électronique (a) d'un substrat composée de 10 couches de PDADMAC/PSS/BSA (4 bicouches PDADMAC/BSA) fabriqué à partir du Système α extrait dans un mélange dichlorométhane/éthanol 95/5 et exposé à l'air humide lorsque encore froide et (b) de sa microstructure.

4.6 Évolution des structures au cours procédé

L'évolution des structures a été étudiée en suivant certains échantillons témoins dans le but de caractériser leurs propriétés et leur macrostructure à chaque étape du procédé (Fig. 4.5).



Étape	A – Mélange PLLA/PCL 50/50		B – Structure modèle de PLLA	
Système/Structure	α	β	α	β
% de la masse initiale	100	100	55,5	56,5
Porosité (%)	0	0	47,1	46,1
Aire de surface interne vol. théo. (μm^{-1})	0	0	1,32	0,29
Aire de surface interne mass. ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	0	0	1,97	0,43



Étape	C – Structure PLLA recouverte des multicouches polyélectrolytes/protéines		D – Substrat ultra-poreux polyélectrolytes/protéines	
Système/Structure	α	β	α	β
% de la masse initiale	56,6	56,8	1,5	0,3
Porosité théorique (%)	46,1	45,8	98,6	99,7
Porosité expérimentale (%)	–	–	98,7	99,6
Aire de surface interne vol. théo. (μm^{-1})	1,17	0,27	2,46	0,47
Aire de surface interne vol. exp. (μm^{-1})	–	–	2,28	0,63
Aire de surface interne mass. ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	1,71	0,4	140	62,5

Figure 4.5 Micrographie par balayage électronique de la macrostructure et caractéristiques des structures produites après chaque étape du procédé. Uniquement les micrographies illustrant l'évolution du Système β sont présentées ici étant donné que des résultats très similaires ont été obtenus pour le Système α .

Comme le montre les micrographies de la Figure 4.5, aucune déformation ou fissuration macroscopique n'a été observée à aucune étape du procédé. Les défauts radiaux présents sur certains échantillons sont en fait des artéfacts de surface générés par le couteau lors de la mise en forme cylindrique des mélanges. Le procédé de mise en forme n'a pas affecté la morphologie interne qui est demeurée intacte (voir la section 4.7). L'utilisation d'une technique plus adaptée devrait permettre d'éliminer ce genre d'empreintes.

Les changements de masse des structures ont été mesurés à chaque point de contrôle. La masse finale des substrats ultra-poreux ne représente plus que 1,5% et 0,3% de la masse initiale des mélanges de polymères PLLA/PCL 50/50 pour les Systèmes α et β respectivement. Pour le Système β , cette masse résiduelle est égale à l'augmentation de masse observée entre les étapes b et c – elle-même équivalente à la quantité de polyélectrolytes et de protéines déposés à l'intérieur des structures – ce qui confirme que la matrice de PLLA a virtuellement été entièrement éliminée durant l'extraction. Dans le cas du Système α , une infime quantité de PLLA (0,4% de la masse du mélange initiale) est probablement demeurée dans le substrat final. Ce résultat était prévisible compte tenu de l'aire de surface interne plus importante. Une extraction plus longue (par exemple une semaine) devrait permettre d'extraire le reste du PLLA.

À partir des mesures de masses résiduelles, les porosités théoriques et expérimentales sont déterminées en tenant compte de la densité des espèces et du volume mesuré (au SEM) des échantillons. En raison de sa surface interfaciale réduite par la croissance des phases induite par le recuit, le Système β a inévitablement généré des structures plus poreuses. L'écart entre les porosités théorique et expérimentale témoigne des changements de volume du substrat ultra-poreux. Dans le cas du Système β , la porosité expérimentale (99,6%) est inférieure à la porosité théorique (99,7%). Cette différence, quoique minime, indique tout de même une réduction du volume de la structure d'environ 25% par rapport au volume initial – le rétrécissement de la structure est

estimé en calculant le volume théorique des substrats ultra-poreux à partir de leur masse, du pourcentage de masse initial correspondant et de la densité des espèces et en comparant par la suite ce volume au volume expérimental. Des parois plus épaisses devraient permettre d'éliminer ce phénomène de rétrécissement. La porosité expérimentale des Structures α (98,7%), légèrement plus élevée que la porosité théorique (98,6%), confirme le gonflement remarqué au moment de la solubilisation de la matrice structurelle. Après extraction complète de la matrice structurelle et lyophilisation, le volume des échantillons a augmenté d'un peu moins de 10%.

À ce jour, peu d'études dans le domaine du génie biomédical/tissulaire ont mesuré directement l'aire de surface interne des structures fabriquées. La plupart d'entre elles l'ont plutôt estimée à l'aide de techniques indirectes, notamment la porosimétrie au mercure (Mikos et al., 1994; Whang et al., 1995). Dans le présent travail, la technique BET a été employée. Cette méthode permet de déterminer directement l'aire de surface interne des structures produites en mesurant l'adsorption d'azote en surface. Trois calculs d'aire de surface sont effectués : le premier exprimant la valeur d'aire sur une base volumique théorique (en μm^{-1} , par rapport au volume initial de l'échantillon non-extrait (volume théorique) calculé à partir des densités des polymères), le second exprimant la valeur d'aire de surface sur une base volumique expérimentale (en μm^{-1} , par rapport au volume initial de l'échantillon mesuré au SEM) et la dernière sur une base massique (en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, par rapport à la masse des échantillons caractérisés). En raison de leur référence invariable, les données d'aires de surface volumiques théoriques illustrent le plus adéquatement le développement de l'aire de surface interne à travers le procédé. Elles sont donc utilisées comme outils de comparaison entre les différentes étapes du procédé. Les valeurs d'aire de surface interne volumique expérimentale et massique sont plutôt employées pour comparer les Systèmes entre eux et avec les résultats obtenus à l'aide des techniques classiques.

Une légère diminution de l'aire de surface interne volumique théorique des Structures α est notée à la suite de la déposition des multicouches. Cette diminution était attendue, mais la réduction du diamètre apparent de la porosité ne peut expliquer qu'une partie de ce résultat. Certains des plus petits pores et constriction de canaux ont probablement été obstrués lors de l'assemblage des couches, bloquant par conséquent une fraction du réseau poreux. En raison du diamètre de pore supérieur, cette tendance n'est pas observée dans le cas des Structures β .

La Figure 4.5 montre que le ratio des aires de surface interne volumiques théoriques (étape D/étape C) pour le Système α est $\eta^{D/C} = 2,1$. Ce résultat est particulièrement frappant étant donné que la valeur calculée dépasse légèrement le ratio théorique ($\eta_{\text{théo}} = 2$) – l'interface parfaite est constituée de deux surfaces de même aire; l'extraction de la deuxième phase (PLLA) libère la deuxième surface, ce qui double l'aire de surface interne de la structure. Quoiqu'il en soit, on peut conclure que la totalité de l'interface a été recouverte de multicouches et que le film assemblé en surface est capable de supporter l'extraction de la matrice et la lyophilisation. Une couverture incomplète de la surface, une désintégration partielle du film, une obstruction de la porosité interne (création d'une peau sur la surface de l'échantillon) ou un accolement/adhésion des cloisons adjacentes se traduirait nécessairement par une diminution de ce rapport d'aire de surface interne, ce qui n'a pas été observé.

Les résultats d'aire de surface obtenus pour le Système β sont beaucoup moins fiables que ceux obtenus pour le Système α . En effet, le Système β possède une surface interfaciale grandement diminuée par l'étape additionnelle de recuit, ce qui implique que les mesures effectuées au BET se situent très près de la limite de détection de l'appareil. Un plus grand nombre d'échantillons aurait été nécessaire pour obtenir une précision acceptable. Un ratio d'aire de surface interne volumique (étape C/étape D) peut tout de même être calculé ($\eta^{D/C} = 1,7$).

En tenant compte des porosités expérimentales, les aires de surfaces internes volumiques théoriques peuvent être recalculées en aires de surface interne volumiques expérimentales. Pour le Système α , un gonflement des échantillons a été constaté et l'aire de surface interne volumique expérimentale est donc légèrement plus faible que la valeur théorique. Inversement, une contraction des Structures β a été notée, augmentant par conséquent la valeur d'aire de surface volumique réelle. Les données d'aires de surface interne massiques ne sont pas influencées par les variations de volume des échantillons. Il s'agit plutôt d'une indication de l'épaisseur des parois. Les résultats montrent que cette épaisseur est plus élevée pour le Système β , confirmant ainsi l'hypothèse formulée plus haut (voir la section 4.3).

Mikos et al. (1994) ont rapporté avoir produit des structures possédant des aires de surface interne volumiques de l'ordre de $0,15 \mu\text{m}^{-1}$ (porosité : $>90\%$ et diamètre de pore : $<53 \mu\text{m}$) à l'aide de leur méthode de lixiviation de particules. Une autre étude, décrivant la technique de lyophilisation d'émulsion, témoigne de la production de substrats possédant des surfaces spécifiques aussi élevées que $102 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (porosité : 95% et diamètre de pore : $22 \mu\text{m}$) (Whang et al., 1995). Les substrats créés à l'aide de la méthode de réplique se comparent avantageusement à ceux produits selon les techniques citées ci-dessus. Ceux-ci possèdent effectivement des fractions de vide et des aires de surface interne significativement plus grandes. De plus, les structures fabriquées par lixiviation de particules ou lyophilisation d'émulsion sont caractérisées par une morphologie de type mousse. L'aire de surface de ce type de porosité est nécessairement plus élevée que celle d'un réseau de pores cylindriques équivalent (typique des structures co-continues). Cependant, comme le soulignent Whang et al. dans leur analyse, les pores sphériques ne sont habituellement interconnectés que par une série de minuscules pores dans la paroi. Ce type d'interconnexion permet l'échange des nutriments, mais les cellules ne peuvent migrer dans la structure (voir la section 2.1.2 et Lu et al., 1999; Chouteau et al., 2003). Les structures co-continues produites ici ne présentent pas cet inconvénient.

4.7 Morphologie des structures

4.7.1 Préparation des surfaces des substrats ultra-poreux au FIB

Aucune déformation macroscopique de l'échantillon ou effondrement de la structure n'est observé lors de la préparation des substrats ultra-poreux au FIB selon la méthode exposée à la Figure 3.1. Une coupe franche, indiquant la formation d'une surface plane est obtenue (Fig. 4.6).

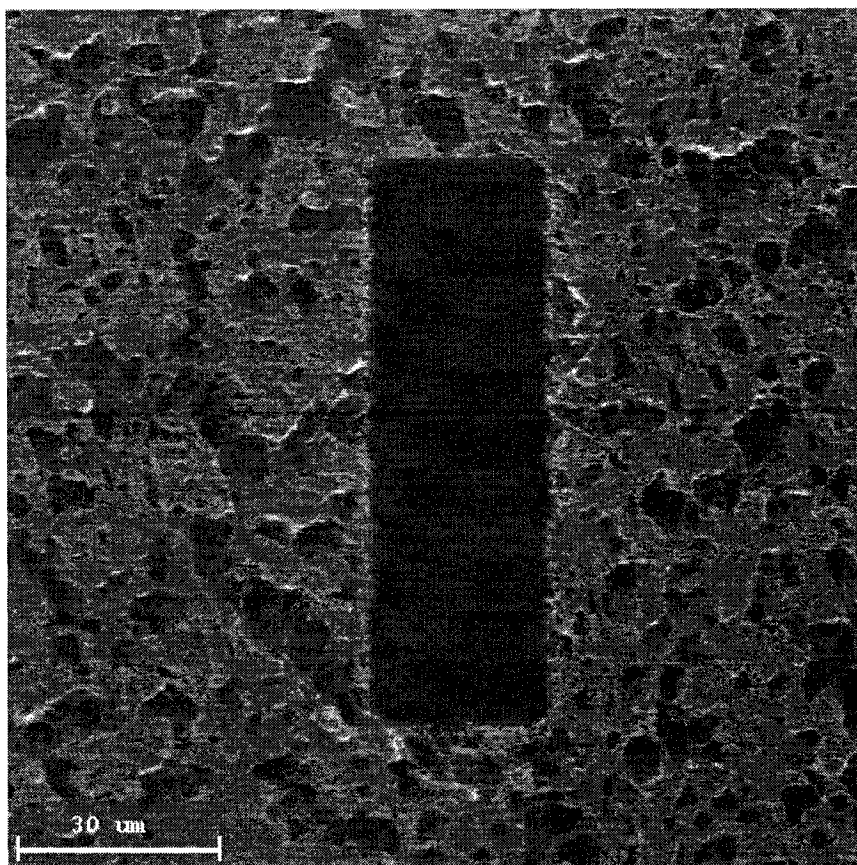


Figure 4.6 Image FIB d'une anfractuosité g n r e dans une Structure ultra-poreuse α à l'aide d'un faisceau de Ga^+ de 30 kV et 0,8 nA (Faisceau I), avant l'affaissement de la structure attenante à l'aide du faisceau II.

4.7.2 Morphologie des structures poreuses au cours du procédé

Le développement de la morphologie des structures au cours du procédé est exposé à la Figure 4.7. L'effet du recuit sur la taille des phases est appréciable en comparant les microstructures α et β . Tel qu'attendu (Sarazin et Favis, 2003; Sarazin et al., 2004; Yuan et Favis, 2004), la morphologie co-continue est pr serv e lors du recuit. La taille des pores observés au SEM concorde avec les valeurs calcul es à partir des aires de surface interne mesur e au BET pour le Système α (Section 4.2). Dans le cas du Système β , le diamètre noté sur les micrographies (Fig 4.7, micrographies (b) et (d))

semble plus élevé que celui estimé au BET. Cette incongruité s'explique par le fait que le diamètre calculé à partir de l'aire de surface interne est un diamètre moyen en nombre (d_n). Or, comme on peut le constater sur les images, la microstructure comprend un nombre important de pores significativement plus petits que le réseau poreux. Le diamètre calculé selon cette méthode ne représente donc pas la même réalité que celle illustrée par les micrographies SEM. Par ailleurs, l'analyse des micrographies (a) et (c), et (b) et (d) confirme que la déposition du film composite à l'intérieur de la porosité n'entraîne aucune modification perceptible de la morphologie.

La morphologie des substrats ultra-poreux préparés à l'aide du FIB a été quelque peu déformée (Fig. 4.7, micrographies (e) et (f)). Ce phénomène est malheureusement inévitable puisque la structure est composée d'un réseau interconnecté de parois ultra-minces et élastiques qui, lorsque frappées par le faisceau ionique, se déforment et s'enroulent sur elles-mêmes sous l'effet de la rupture. Malgré ce problème, la morphologie obtenue est reconnaissable. La porosité créée est du même ordre de grandeur que celle du Système correspondant et les variations de volume des structures – gonflement pour le Système α et rétrécissement pour le Système β – ne sont pas vraiment perceptibles. Sur la micrographie (f), la structure co-continue est facilement discernable : la déchirure dans la paroi au milieu de l'image laisse entrevoir l'intérieur de ce qu'était la deuxième phase polymère.

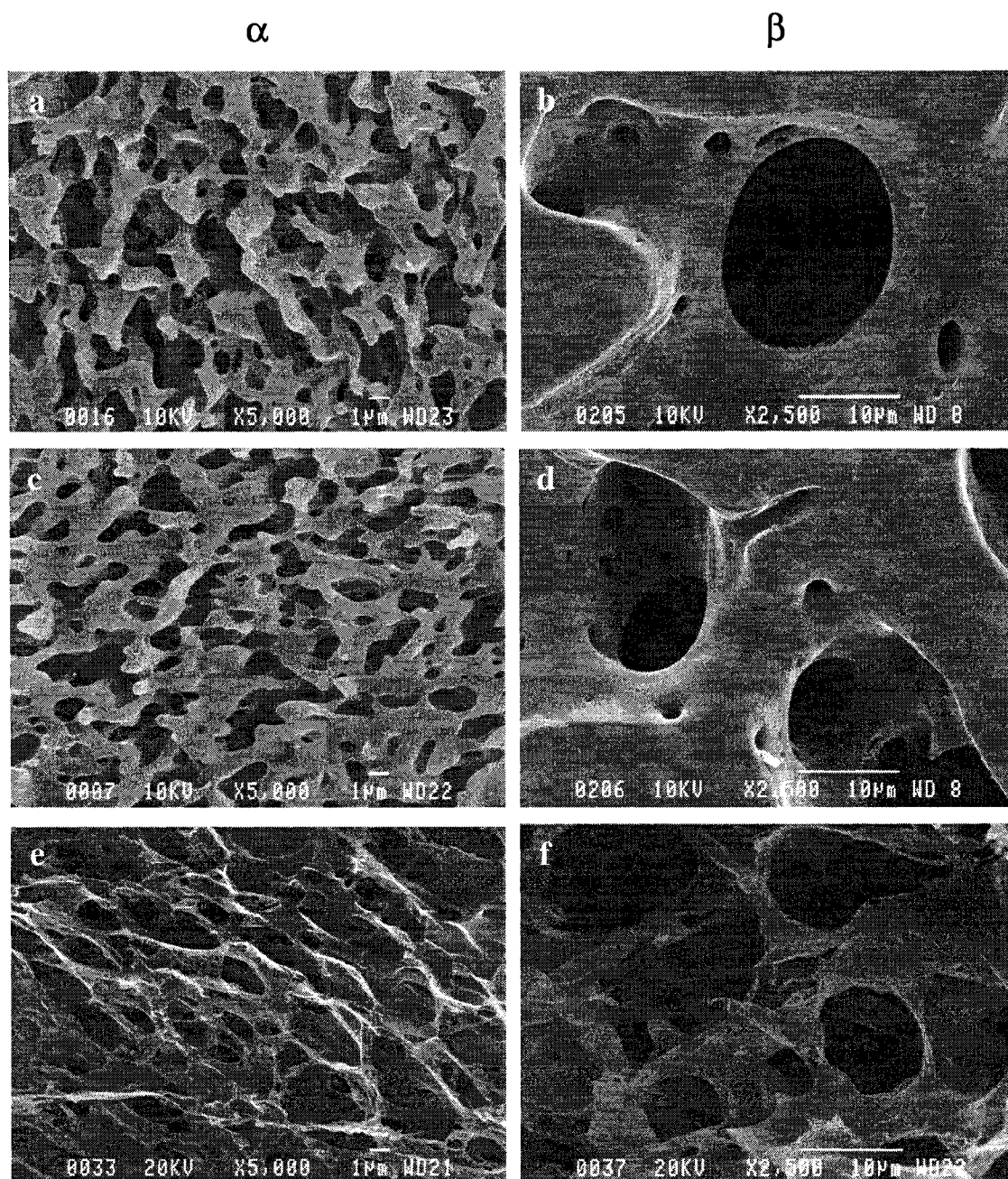


Figure 4.7 Micrographies par balayage électronique de la morphologie interne des (colonne α) Structures α et (colonne β) β ; (a) et (b) avant la déposition; (c) et (d) après la déposition de 4 bicouches PDADMAC/BSA et (e) et (f) après l'extraction de la matrice structurelle de PLLA.

Dans le but de renforcer les parois et ainsi réduire la déformation lors de la préparation de la surface au FIB, certains échantillons du Système α ont été partiellement extraits en diminuant le temps d'extraction – dans ce cas, l'extraction totale des substrats totalisait 8 heures comparativement à 48 heures pour l'extraction complète. Une mince couche de PLLA a donc été conservée dans le substrat final. La morphologie réelle apparaît alors beaucoup plus distinctivement sur les micrographies (Fig. 4.8) : la structure créée est la représentation solide de l'interface du système. On devine dans la très grande fraction de vide observée la présence antérieure des phases PLLA et PCL, sans pour autant pouvoir distinguer leurs zones respectives.

Bien que sommaires, les travaux effectués n'ont pas permis d'obtenir une fraction de vide contrôlée pour ces échantillons. L'extraction partielle de la matrice devrait par ailleurs nous permettre de fabriquer des substrats possédant des propriétés mécaniques supérieures à celles obtenues par extraction complète. Il serait donc intéressant et justifié de poursuivre les recherches au-delà du cadre de cette étude.

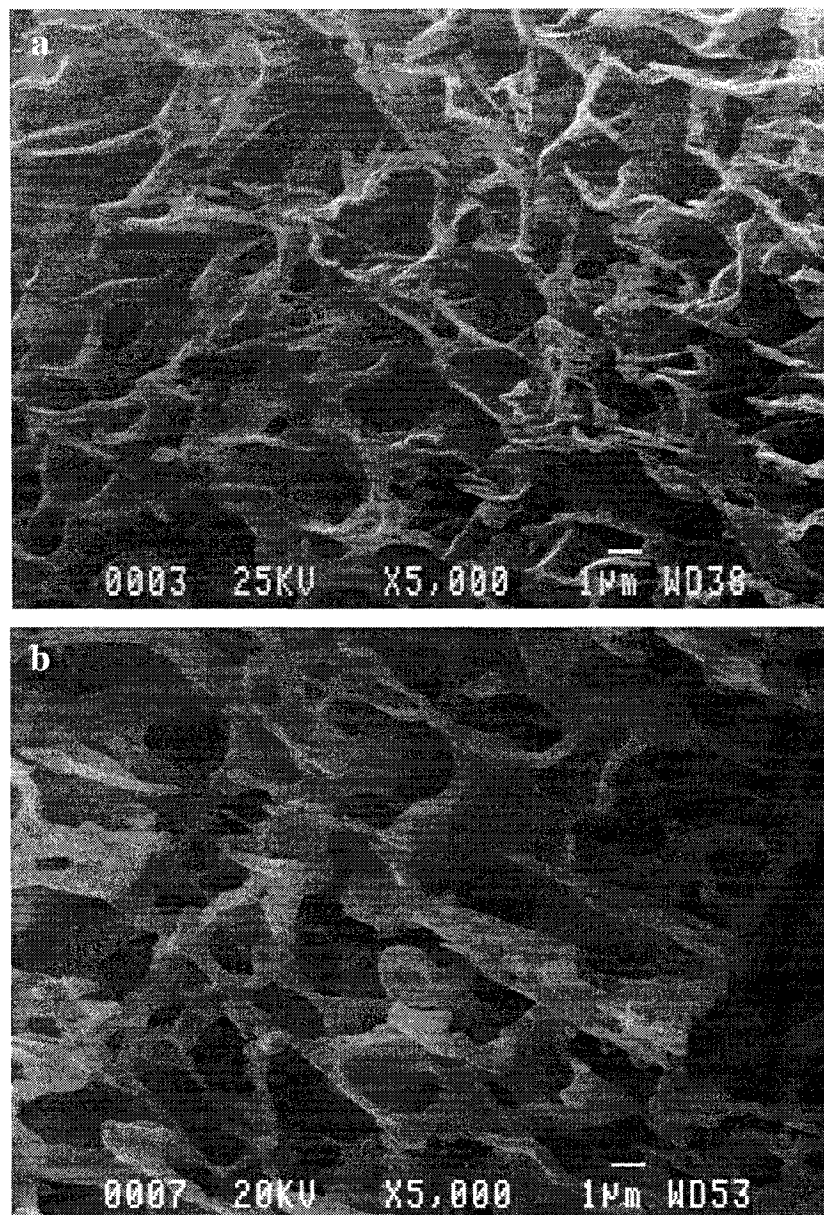


Figure 4.8 Micrographies par balayage électronique de la morphologie interne des Structures α partiellement extraite (a) vue oblique et (b) vue de face.

4.7.3 Évaluation de l'épaisseur des parois et de l'état de contrainte de la structure

Les parois ont été examinées à des grossissements très élevés (Fig. 4.9). L'épaisseur virtuelle du mur est évaluée à environ 100 nm, mais en tenant compte du phénomène d'enroulement décrit précédemment, l'épaisseur réelle du film est estimée à moins de 100 nm.

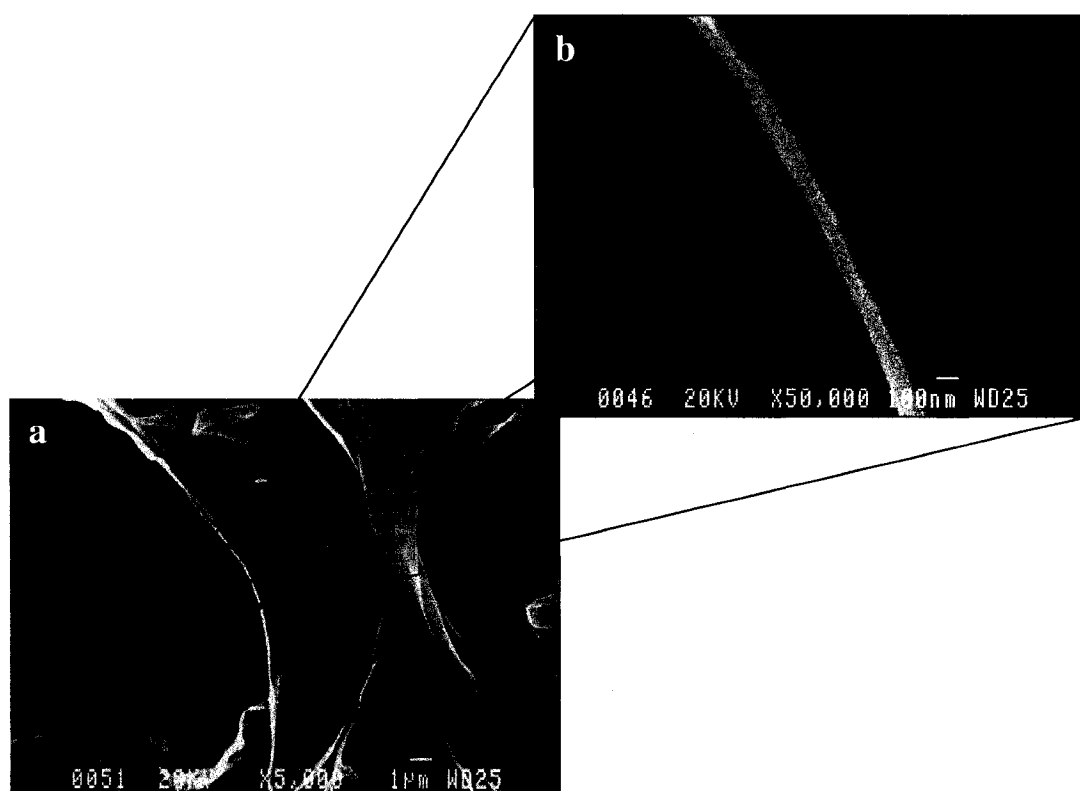


Figure 4.9 Micrographie par balayage électronique d'une paroi d'un substrat ultra-poreux β composée de 4 bicouches PDADMAC/BSA (a) à faible grossissement (X5000) et (b) à fort grossissement (X50000).

Lors de la préparation des échantillons au FIB, il nous a été donné d'observer l'état de contrainte de la structure. Lorsque sectionnés, les films composant le réseau se

détendaient très fortement. Cet état de tension explique probablement la stabilité structurelle surprenante des substrats. La Figure 4.10 illustre ce phénomène.

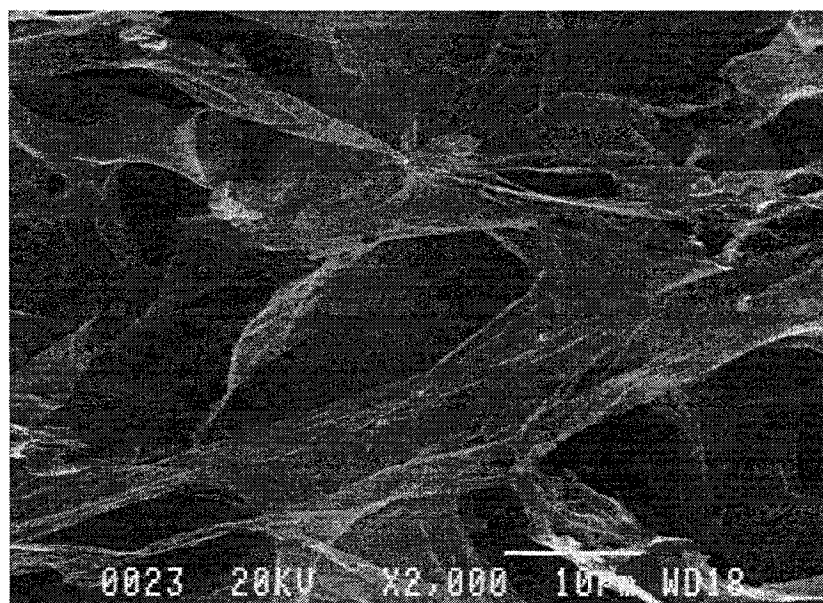


Figure 4.10 Micrographie par balayage électronique de la microstructure partiellement sectionnée d'un Substrat ultra-poreux β . L'état de contrainte du réseau est visible.

4.8 Paramètres de contrôle de la morphologie, avantages et limitation de la méthode de réplique et perspectives

La méthode de réplique de structures co-continues par déposition CPC – dissolution de la matrice structurelle est un enchaînement de trois procédés : 1) fabrication des structures co-continues modèles; 2) réplique des structures et 3) extraction de la matrice structurelle. Ces grandes étapes sont elles-mêmes une suite de manipulations qui doivent toutes être parfaitement contrôlées afin d'obtenir le substrat attendu.

4.8.1 Paramètres de contrôle de la morphologie, du diamètre de pore et de la fraction de vide

La taille et la forme des pores du substrat ultra-poreux sont d'abord contrôlées par la composition et les conditions de préparation du mélange de polymères initial ainsi que par la durée et la température de recuit (Sarazin et Favis, 2003; Sarazin et al., 2004; Yuan et Favis, 2004). Le contrôle du diamètre des pores peut ainsi s'effectuer sur une gamme de diamètres allant du micron au dixième de millimètre (Sarazin et Favis, 2003; Yuan et Favis, 2004). Des substrats ayant des porosités bimodales pourraient même être fabriqués en choisissant adéquatement les paramètres de mélange (composition asymétrique, rapport de viscosité loin de l'unité, température de mélange, etc.). Indépendamment du système polymère employé, le réseau de pores de la structure et du substrat poreux est toujours intégralement interconnecté.

Idéalement, la mise en forme des échantillons doit se faire au début du procédé, c'est-à-dire à partir des mélanges de polymères. C'est effectivement à cette étape que les structures sont les moins déformables. De cette manière, des structures tridimensionnelles (avec une morphologie uniforme sur tout le volume) ayant des formes diverses et complexes peuvent être créées. Le procédé de mise en forme ne doit cependant pas déformer démesurément la morphologie de surface sans quoi la phase porogène risque de ne plus être accessible au solvant. Dans notre cas, le problème ne s'est pas posé puisque le PCL est le polymère le plus déformable. Son extraction a révélé une morphologie de surface bien conservée, particulièrement dans le cas du Système β qui possède une phase PLLA plus solide.

La fraction de vide est contrôlée par le nombre de couches déposées, mais elle est aussi fonction de l'aire interfaciale. Pour deux structures modèles de même fraction de vide initiale, celle possédant la plus grande aire de surface accommodera évidemment la plus grande quantité d'espèces chargées. Un nombre minimal de 4 bicouches

PDADMAC/BSA est nécessaire pour diminuer le phénomène de rétrécissement qui est tout de même observé pour le Système β . Il est possible de fabriquer des structures encore plus poreuses en employant des Systèmes ayant une surface interfaciale plus faible. Une porosité maximale est cependant attendue puisqu'en diminuant la surface interfaciale, on affaiblit le réseau. Un plus grand nombre de couches est donc nécessaire pour maintenir l'intégrité physique de celui-ci. Des substrats avec aussi peu qu'une bicouche PDADMAC/BSA ont été produits et se sont révélés étonnamment résistants du moment qu'ils restaient immergés. Ils pourraient être utilisés en les transférant directement en milieu de culture sans les assécher auparavant. Cependant, le risque qu'il reste des traces de solvant toxiques est dans ce cas accentué.

4.8.2 Avantages de la méthode de réplique

Ce qui différencie la méthode de réplique de structures co-continue par déposition CPC – dissolution de la matrice structurale des autres procédés de fabrication de substrats ultra-poreux est la morphologie finale des structures. Les techniques classiques génèrent généralement deux types de microstructures : les enchevêtrements de fibres et les mousses – dans lesquels sont incluses les morphologies de domaines de vide sphériques produites par lixiviation de particules. Les structures créées dans le cadre de ce projet n'entrent dans aucune de ces deux catégories. La morphologie se présente plutôt sous la forme d'un réseau interconnecté de tubes cylindriques. Ce genre de microstructure offre plusieurs avantages pour la croissance tissulaire : la taille des interconnexions – un paramètre crucial pour la colonisation cellulaire de la structure – correspond au diamètre des pores, l'aire de surface interne obtenue est très élevée et l'intégrité mécanique et la solidité des substrats est remarquable pour une fraction de vide aussi élevée.

En contrôlant parfaitement les conditions expérimentales, particulièrement le refroidissement, la technique de séparation de phase permet également de produire des

structures totalement interconnectées (Schugens et al., 1996; Maquet et Jerome, 1997). La fabrication de structures tridimensionnelles uniformes de volumes importants est cependant difficile en raison du gradient de température qui apparaît à travers l'échantillon lors du refroidissement de la solution polymère. Le fait que la qualité des structures fabriquées soit dépendante de l'opérateur (Hutmacher, 2000) représente aussi un freins important à l'essor de la technique. La méthode de réplcation ne souffre cependant pas de ces limitations : différents manipulateurs peuvent préparer des substrats tridimensionnels de diverses tailles possédant des morphologies à la uniformes et identiques. Somme toute, la méthode développée est simple et les résultats obtenus peuvent être facilement reproduits.

Qui plus est, les substrats fabriqués se comparent avantageusement à ceux produits à l'aide des techniques « classiques ». Les fractions de vide et les aires de surface interne obtenues sont parmi les plus élevées jusqu'ici rapportées en génie tissulaire.

La grande majorité des travaux publiés jusqu'à maintenant argumentent que des pores beaucoup plus grands que ceux produits dans cette étude sont nécessaires pour la croissance tissulaire. Les travaux de Sarazin et Favis (2003) et de Yuan et Favis (2004) qui décrivent la préparation de structures co-continues dont la taille des phases peut être augmentée jusqu'à plusieurs centaines de microns par recuit statique permettent de croire que des pores beaucoup plus gros pourraient être générées. Dans ce cas, un plus grand nombre de couches ou une dissolution partielle de la matrice serait nécessaire afin de conserver la rigidité mécanique du substrat. La morphologie co-continue du système, qui se présente sous la forme d'un enchevêtrement interconnecté de canaux cylindriques, permet cependant d'espérer qu'une porosité plus fine que celles rapportées jusqu'ici pourrait permettre la colonisation cellulaire de la structure qui disposerait alors d'une surface d'adhésion beaucoup plus vaste.

4.8.3 Limitations de la méthode de réplcation

La susceptibilité des échantillons à l'humidité s'est révélée être la principale source de complications du procédé. Il s'agit en fait de l'explication première pour l'inconstance occasionnelle des résultats. De manière générale, les structures produites durant la période hivernale présentaient une stabilité mécanique supérieure à celles fabriquées en été en raison d'un taux d'humidité ambiant significativement plus faible. Plusieurs échantillons ont d'ailleurs été perdus en raison de ce problème. La solution à ce problème, bien qu'évidente, s'est avérée beaucoup plus difficile à mettre en place que prévu. Il n'existe effectivement aucun laboratoire en atmosphère contrôlée dans le département de génie chimique. Qui plus est, les tentatives de construire un système de lyophilisation totalement étanche ont donné des résultats mitigés. La solution finale a été d'utiliser un lyophilisateur commercial modifié pour les besoins du procédé (dicté par l'utilisation du cyclohexane comme solvant).

Une des limitations de la technique est le temps de fabrication des échantillons relativement long. Bien que la durée réelle des manipulations soit courte, la préparation des substrats se fait rarement en moins de 45 jours en raison des multiples délais d'attente : extraction de la phase porogène (3-4 semaines), déposition des couches (1 journée/couche), extraction de la phase matrice (3 jours), lyophilisation (1 journée). Dans un contexte éventuel d'application industrielle, ces délais sont évidemment peu souhaitables. L'efficacité du procédé pourrait être améliorée en produisant d'avance des structures poreuses co-continues qui se conservent facilement en atmosphère contrôlée.

De plus, la possibilité qu'il reste des traces de solvant résiduel dans les structures subsiste. Cette hypothèse n'a pu être vérifiée jusqu'ici, mais mérite d'être considérée. Par exemple, l'analyse spectroscopique infrarouge (FTIR) devrait permettre de détecter la présence d'un composé contaminant. Bien qu'indiscutable, ce problème est tout de même commun à la majorité des méthodes existantes, particulièrement celles qui créent

la structure à partir de polymères en solution (évaporation de solvant, séparation de phases, émulsion, lyophilisation et même immobilisation d'un réseau de fibres non-tissées). Le fait de n'employer que des solvants potentiellement toxiques pour solubiliser des polymères n'entrant pas dans la composition finale de la structure confère à la méthode développée un certain avantage sur les autres techniques

Le fait que les polyélectrolytes employés dans la construction des couches de précurseurs et interstitielles ne soit ni biodégradables ni biocompatibles représente une limite importante du système. Bien que leur quantité présente dans les substrats soit très faible, elle demeure tout de même incommodante. De plus, le mécanisme de désintégration de la structure n'a pas été étudié; le système de polyélectrolytes PDADMAC/PSS/BSA était en fait un système modèle pour le développement de la méthode de réplique.

4.8.4 Perspectives

Le but ultime est de généraliser la méthode de réplique pour différents matériaux mieux adaptés aux exigences d'une application visée. Il existe effectivement un nombre incalculable de films multicouches fabriqués à l'aide de la méthode de déposition CPC qui permettraient d'améliorer la biocompatibilité et la biodégradabilité du substrat. L'utilisation de polyélectrolytes biocompatibles a par exemple été rapportée (Shenoy et al., 2003). L'usage de polymères chargés – la charge présente sur le polymère est souvent l'origine de sa nocivité – n'est plus indispensable puisque les interactions hydrophobes (Serizawa et al., 2002) et de complexation (Serizawa et al., 2001) sont souvent suffisantes pour assurer une bonne adhésion des couches. Éventuellement, des structures ultra-poreuses entièrement composées de polymères biodégradables (PLLA/PDLA) (Serizawa et al., 2001), biocompatibles (poly(D,L lactide)/poly(vinyl alcool)) (Serizawa et al., 2002) ou conducteurs (polyaniline/polyéthylène oxyde) (Stockon et Rubner, 1997), de différentes protéines (BSA, lysozyme, hémoglobine,

catalase, glucoamylase, cytochrome, etc.) (Lvov et al., 1995) et même de nanoparticules inorganiques (SiO₂/PDADMAC) (Caruso et al., 1998a) pourraient être fabriquées selon la méthode de réplique. De la même manière, des polymères différents pourraient être employés dans la construction des structures modèles. Afin de réduire l'utilisation de solvants toxiques, du poly(oxyde d'éthylène) (PEO) – polymère soluble dans l'eau – pourrait par exemple être utilisé dans la conception de la structure poreuse co-continue. En somme, il suffit en fait de trouver la bonne combinaison de polymères de structures, de polymères de dépôt et de solvants pour développer un nouveau système. Deux autres systèmes ont d'ailleurs fait l'objet d'une étude exploratoire : PS/PCL/PVA/PDLLA et PA6/PC/PLLA/PDLA.

Des recherches supplémentaires sur les substrats fabriqués dans cette étude sont également nécessaires. En effet, une attention particulière a été portée à la morphologie des structures, mais les propriétés de surface n'ont été que sommairement abordées. Pourtant, les groupements chimiques présents à la surface de la structure, son hydrophobie, sa topographie et sa rugosité ont une influence notable sur l'adhésion et la différenciation des cellules (Palsson et Bhatia, 2004). Aussi, des parois poreuses, telles que celles obtenues par déposition CPC, peuvent faciliter l'échange des nutriments (Hou et al., 2003). La caractérisation ultérieure des propriétés de surface nécessitera l'utilisation de technique d'analyse telles la microscopie à force atomique (AFM), l'analyse chimique par spectroscopie photoélectronique rayons X (XPS ou ESCA), l'angle de contact, la spectroscopie infrarouge de surface (ATR-FTIR), etc. La finalité de cet exercice est d'optimiser les propriétés de surface ainsi que la morphologie des structures pour l'application visée. Dans la méthode de réplique, l'étape de déposition CPC est particulièrement intéressante pour la fonctionnalisation de surface et la libération d'agents actifs. À l'autre extrémité du spectre des propriétés, la rigidité mécanique des substrats devra être étudiée. Par exemple, l'influence du nombre de couches et du degré d'extraction de la matrice structurelle sur le module de compression est une question fondamentale à laquelle il faudra répondre.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Ce projet a permis de développer une nouvelle méthode de fabrication de substrat ultra-poreux par réplique de structures co-continues via la déposition CPC suivie de la dissolution de la matrice structurelle. Cette étude s'appuie sur les travaux de M. Pierre Sarazin qui portent sur la création de substrats poreux à partir de mélanges de polymères préparés à l'état fondu. Ces structures présentent des morphologies co-continues très prometteuses pour la croissance tissulaire et la méthode offre la possibilité de faire varier la taille des pores de plusieurs ordres de grandeur en plus de produire des substrats tridimensionnels de formes complexes. Malheureusement, la fraction de vide des substrats demeure limitée expérimentalement à 75% avec cette méthode. L'objectif de cette étude était donc d'augmenter la limite de porosité tout en conservant les caractéristiques des systèmes initiaux.

Les systèmes à répliquer ont été produits par extraction de la phase porogène (PCL) d'un mélange PLLA/PCL 50/50. À l'aide de la méthode de déposition couche-par-couche, la surface interne des structures a été recouverte d'un film multicouche auto-assemblé PDADMAC/PSS/BSA. La matrice structurelle a été extraite et le substrat résultant a été lyophilisé.

Des structures possédant des porosités réelles de 98,7% et 99,6% et des aires de surface interne de $140 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ et $62,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ont été fabriquées. Tel que souhaité, le procédé de réplique a permis de préserver la morphologie co-continue des systèmes initiaux. Des pores d'environ $1,4 \text{ }\mu\text{m}$ et $6,3 \text{ }\mu\text{m}$ ont été générés. La comparaison des aires de surface volumique (avant et après l'extraction de la matrice structurelle) a démontré que la totalité de la surface des pores a été recouverte d'un mince film organique. Le recouvrement de la surface de PLLA lors de la déposition du BSA a été estimé à 2,1 et $2,7 \text{ mg m}^{-2}$ pour des tailles de pores de $1,4 \text{ }\mu\text{m}$ et $6,3 \text{ }\mu\text{m}$ respectivement. Parallèlement

au développement de la méthode de réplique, une technique de préparation des échantillons ultra-poreux au FIB a été mise au point. Cette technique a été employée pour minimiser la déformation des structures lors de l'analyse au SEM.

Des pores beaucoup plus grands que ceux produits lors de cette étude sont nécessaires pour la croissance tissulaire. Différents travaux suggèrent que la fabrication de systèmes canevas possédant les diamètres de pores requis est possible en augmentant le temps de recuit statique (Sarazin et Favis, 2003; Sarazin et al., 2004; Yuan et Favis, 2004). La morphologie co-continue du système, qui se présente sous la forme d'un enchevêtrement interconnecté de canaux cylindriques, permet d'espérer que des diamètres de pores moins importants que ceux rapportés jusqu'ici pourrait permettre la colonisation cellulaire de la structure qui disposerait alors d'une surface d'adhésion beaucoup plus vaste. Par contre, l'utilisation de polymères et de solvants potentiellement toxiques rend le système PLLA/PCL/PDADMAC/PSS/BSA moins attrayant pour des applications *in vivo*, mais en raison de sa simplicité et de sa flexibilité, la méthode développée pourrait être adaptée pour d'autres systèmes répondant aux exigences biomédicales. La technique de réplique ne se limite pas seulement aux applications tissulaires; elle pourrait aussi être employée dans plusieurs autres domaines, notamment les catalyseurs, les biotechnologies et la biochimie.

RÉFÉRENCES

- AGRAWAL, C. M., ATHANASIOU, K. A., HECKMAN, J. D. (1997). "Biodegradable PLA-PGA polymers for tissue engineering in orthopaedics" *Materials Science Forum*, **250**, 115-128.
- AGRAWAL, C. M., RAY, R., B. (2001). "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering" *Journal of Biomedical Materials Research*, **55**, 141-150.
- AVGEROPOULOS, G. N., WEISSERT, F. C., BIDDISON, P. H., BOEHM, G. G. A. (1976). "Heterogeneous blends of polymers. Rheology and morphology" *Rubber Chemistry and Technology*, **49**, 104-93.
- BABENSEE, J. E., ANDERSON, J. M., MCINTIRE, L. V., MIKOS, A. G. (1998). "Host response to tissue engineered devices" *Advanced Drug Delivery Reviews*, **33**, 111-139.
- BEER, M., SCHMIDT, M., MUTHUKUMAR, M. (1997). "The electrostatic expansion of linear polyelectrolytes: Effects of gegenions, co-ions, and hydrophobicity" *Macromolecules*, **30**, 8375-8385.
- BEN-NAIM, A. (1980). *Hydrophobic Interactions*, Plenum Press, New York.
- BERLIN, E., PALLANSCH, M. J. (1968). "Densities of several proteins and L-amino acids in the dry state" *Journal of Physical Chemistry*, **72**, 1887-1889.

BERTRAND, P., JONAS, A., LASCHEWSKY, A., LEGRAS, R. (2001). "Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties" *Macromolecular Rapid Communications*, **21**, 319-348

BOURRY, D., FAVIS, B. D. (1998). "Morphology development in a polyethylene/polystyrene binary blend during twin-screw extrusion" *Polymer*, **39**, 1851-1856.

BRANDRUP, J., IMMERGUT, E. H., GRULKE, E. A. (1999). *Polymer Handbook*, Wiley, New York.

CARTER, D. C., HO, J. X. (1994). "Structure of Serum Albumin" *Advances in Protein Chemistry*, **45**, 153-203.

CARUSO, F., CARUSO, R. A., MÖHWALD, H., (1998a). "Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating" *Science*, **282**, 1111-1114.

CARUSO, F., FURLONG, D. N., ARIGA, K., ICHINOSE, I., KUNITAKE, T. (1998b). "Characterization of Polyelectrolyte-Protein Multilayer Films by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy and Fourier Transform Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy" *Langmuir*, **14**, 4559-4565.

CARUSO, F., MÖHWALD, H. (1999a). "Preparation and Characterization of Ordered Nanoparticle and Polymer Composite Multilayers on Colloids" *Langmuir*, **15**, 8276-8281.

CARUSO, F., MÖHWALD, H. (1999b). "Protein Multilayer Formation on Colloids through a Stepwise Self-Assembly Technique" *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 6039-6046.

CARUSO, F., NIKURA, K., FURLONG, D. N., OKAHATA, Y. (1997). "2. Assembly of Alternating Polyelectrolyte and Protein Multilayer Films for Immunosensing" *Langmuir*, **13**, 3427-3433.

CHENG, Y. L., DARST S. A., ROBERTSON, C. R. (1987). "Bovine Serum Albumin Adsorption and Desorption Rates on Solid Surfaces with Varying Surface Properties" *Journal of Colloid and Interface Science*, **118**, 212-223.

CHEUNG, J. H., STOCKTON, W. B., RUBNER, M. F. (1997). "Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 3. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Electrostatic Interactions" *Macromolecules*, **30**, 2712-2716.

CHOUTEAU, J., BIGNON, A., CHAVASSIEUX, P., CHEVALIER, J., MELIN, M., FANTOZZI, G., BOIVIN, G., HARTMANN, D., CARRET, J.-P. (2003). "Culture cellulaire d'ostéoblastes et de fibroblastes sur substituts osseux poreux en phosphate de calcium" *Revue de chirurgie orthopédique*, **89**, 44-52.

DE GENNES, P.-G. (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press, Ithaca.

DECHER, G. (1997). "Fuzzy Nanoassemblies: Towards Layered Polymeric Multicomposites" *Science*, **277**, 1232-1237.

DECHER, G., HONG, J. D., SCHMITT, J. (1992). "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces" *Thin Solid Films*, **210/211**, 831-835.

DOBRYNIN, A. V., RUBINSTEIN, M., OBUKHOV, S. P. (1996). "Cascade of transitions of polyelectrolytes in poor solvents" *Macromolecules*, **29**, 2974-2979.

DUBAS S. T., SCHLENOFF, J. B. (1999). "Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers" *Macromolecules*, **32**, 8153-8160.

ELEMANS, P. H. M., JANSSEN, J. M. H., MEIJER, H. E. H. (1990). "The measurement of interfacial tension in polymer/polymer systems: The breaking thread method". *Journal of Rheology*, **34**, 1311-1325.

FAVIS, B. D. (2000). "Factors influencing the morphology of immiscible polymer blends in melt processing" *Polymer Blends Volume 1: Formulation*. Sous la direction de D.R. Paul et C.B. Bucknall, John Wiley and Sons, New York, 501-538.

FAVIS, B. D., CHALIFOUX, J. P. (1987). "Effect of viscosity ratio on the morphology of polypropylene / polycarbonate blends during processing" *Polymer Engineering and Science*, **27**, 1591-1600.

FLEER, G. J., COHEN STUART, J. M., SCHEUTJENS, H. M., COSGROVE, T., VINCENT, B. (1993), *Polymers at Interfaces*, Chapman & Hall, London.

FLORY, P.J. (1969). *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Interscience

Publishers, New York.

FREED, L. E., MARQUIS, J. C., NOHRIA, A., EMMANUAL, J., MIKOS, A. G., LANGER, R. (1993). "Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers". *Journal of Biomedical Materials Research*, **27**, 11-23.

FRENKEL, S. R., DI CESARE, P. E. (2004). "Scaffolds for Articular Cartilage Repair" *Annals of Biomedical Engineering*, **32**, 26-34.

HOU, Q., GRIJPMMA, D. W., FEIJEN, J. (2003). "Preparation of Interconnected Highly Porous Polymeric Structures by a Replication and Freeze-Drying Process" *Journal of Biomedical Materials Research*, **67**, 732-740.

HUTMACHER, D. W. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage" *Biomaterials*, **21**, 2529-2543.

HUTMACHER, D. W. (2001). "Scaffolds design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspectives" *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **12**, 107-124.

ISHAUG-RILEY, S. L., CRANE-KRUGER, G. M., YASZEMSKI, M. J., MIKOS, A. G. (1998). "Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers" *Biomaterials*, **19**, 1405-1412.

ITÄLÄ, A. I., YLÄNEN, H. O., EKHOLM, C., KARLSSON, K. H., ARO, H. T. (2001). "Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in

rabbits” *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, **58**, 679-683.

JORDHAMO, G. M., MANSON, J. A., SPERLING, L. H. (1986). “Phase continuity and inversion in polymer blends and simultaneous interpenetrating networks” *Polymer Engineering and Science*, **26**, 517-524.

KARP, J. M., DALTON, P. D., SHOICHET, M. S. (2003). “Scaffolds for Tissue Engineering”, *MRS Bulletin*, **April**, 301-306.

KHOPADE, A. J., CARUSO, F. (2003). “Surface-Modification of Polyelectrolyte Multilayer-Coated Particles for Biological Applications” *Langmuir*, **19**, 6219-6225.

KIM, H. S., SOHN, B. H., LEE, W., LEE, J.-K., CHOI, S. J., KWON, S. J. (2002). “Multifunctional layer-by-layer self-assembly of conducting polymers and magnetic nanoparticles” *Thin Solid Films*, **419**, 173-177.

KIM, J., SOMORJAI, G. A. (2003). “Molecular Packing of Lysozyme, Fibrinogen and Bovine Serum Albumin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces Studied by Infrared-Visible Sum Frequency Generation and Fluorescence Microscopy” *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 3150-3158.

KLEINFELD E. R., FERGUSON, G. S. (1994). “Stepwise Formation of Multilayered Nanostructural Films from Macromolecular Precursors” *Science*, **265**, 370-373.

KOTOV, N. A. (1999). “Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions” *NanoStructured Materials*, **12**, 789-796.

KOTOV, N. A., DEKANY, I., FENDLER, J. H. (1995). "Layer-by-Layer Self-Assembly of Polyelectrolyte-Semiconductor Nanoparticle Composite Films" *Journal of Physical Chemistry*, **99**, 13065-13069.

KRISDHASIMA, V., VINARAPHONG, P., MCGUIRE, J. (1993). "Adsorption Kinetics and Elutability of α -Lactalbumin, β -Casein, β -Lactoglobulin and Bovine Serum Albumin at Hydrophobic and Hydrophilic Interfaces" *Journal of Colloid and Interface Science*, **161**, 325-334.

LANGER, R., VACANTI, J. P. (1993). "Tissue Engineering" *Science*, **260**, 920-926.

LI, J. (2001). *Co-continuous polymer blends*. Montréal: Thèse de Doctorat, École Polytechnique

LI, J., FAVIS, B. D. (2001). "Characterizing co-continuous high density polyethylene/polystyrene blends" *Polymer*, **42**, 5047-5053.

LI, J., MA, P. L., FAVIS, B. D. (2002). "The role of the blend interface type on morphology in cocontinuous polymer blends" *Macromolecules*, **35**, 2005-2016.

LI, W. J., LAURENCIN, C. T., CATERSON, E. J., TUAN, R. S., KO, F. K. (2002). "Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering" *Journal of Biomedical Materials Research*, **60**, 613-621.

LIU, S. J., PAN, Y. L., HU, D. S. G. (1992). "Modulation of albumin adsorption by chemical composition in biodegradable polylactide/polyethylene glycol copolymers" *Biomedical Engineering – Applications, Basis & Communications*, **4**, 613-617.

LOWACK, K., HELM, C. A. (1998). "Molecular Mechanisms Controlling the Self-Assembly Process of Polyelectrolyte Multilayers" *Macromolecules*, **31**, 823-833.

LU, J. X., FLAUTRE, B., ANSELME, K., HARDOUIN P., GALLUR A., DESCAMPS M. et al. (1999). "Role of interconnection in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo". *Journal of Materials Science*, **10**, 111-120.

LU, L., MIKOS, A. G. (1996). "Importance of new processing techniques in tissue engineering", *MRS Bulletin*, **21**, 28-32.

LVOV, Y., ARIGA, K., ONDA, M., ICHINOSE, I., KUNITAKE, T. (1997). Alternate Assembly of Ordered Multilayers of SiO₂ and Other Nanoparticles and Polyions" *Langmuir*, **13**, 6195-6203.

LVOV, Y., ICHINOSE, I., KUNITAKE, T. (1995). "Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption" *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 6117-6123.

LYNCH, S. E., GENCO, R. J., MARX, R. E. (1999). *Tissue Engineering, Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*, Quintessence Publishing Co. 297 p.

MA, P. X., CHOI, J.-W. (2001). "Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network" *Tissue Engineering*, **7**, 23-33.

MANNING, G. S. (1972). "Polyelectrolytes" *Annual Review of Physical Chemistry*, **23**, 117-140.

MAQUET, V., JEROME, R. (1997). "Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation" *Materials Science Forum*, **250**, 15-42.

MARIN, N. (2001). *Morphologie co-continue des mélanges de polymères immiscibles PC/PMMA et PEHD/PS/SEB S: application à la préparation de membranes microporeuses de PC et de PEHD*. Montréal. Mémoire de Maîtrise, École Polytechnique.

MCALONEY, R. A., SINYOR, M., DUDNIK, V., GOH, C. (2001). "Atomic Force Microscopy Studies of Salt Effects on Polyelectrolyte Multilayer Film Morphology" *Langmuir*, **17**, 6655-6663.

MIKOS, A. G., BAO, Y., CIMA, L.G., INGBER, D. E., VACANTI, J. P., LANGER, R. (1993). "Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation" *Journal of Biomedical Materials Research*, **27**, 183-189.

MIKOS, A. G., TEMENOFF, J. S. (2000). "Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering" *Electronic Journal of Biotechnology*, **3**, 114-119.

MIKOS, A. G., THORSEN, A. J., CZERWONKA, L. A., BAO, Y., LANGER, R., WINSLOW, D. N., VACANTI, J. P. (1994). "Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams" *Polymer*, **35**, 1068-1077.

MOONEY, D. J., BALDWIN, D. F., SUH, N. P., VACANTI, J. P., LANGER, R. (1996). "Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents" *Biomaterials*, **17**, 1417-1422.

NAM, Y. S., PARK, T. G. (1999). "Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation" *Journal of Biomedical Materials Research*, **47**, 8-17.

OOSAWA, F. (1971). *Polyelectrolytes*, Dekker, New York.

PALSSON, B. Ø., BAHTIA, S. N. (2004). *Tissue Engineering*, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.

PETERS, T. JR. (1996). *All about Albumin : Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, New York.

PEULA, J. M., DE LAS NIEVES, F. J. (1993). "Adsorption of monomeric bovine serum albumin on sulfonated polystyrene model colloids 1. adsorption isotherms and effect of the surface charge density" *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **77**, 199-208.

POPTOSHEV, E., SCHOELER, B., CARUSO, F. (2004). "Influence of Solvent Quality on the Growth of Polyelectrolyte Multilayers" *Langmuir*, **20**, 829-834.

RAM, M. K., SALERNO, M., ADAMI, M., FARACI, P. NICOLINI, C. (1999). "Physical Properties of Polyaniline Films: Assembled by the Layer-by-Layer Technique" *Langmuir*, **15**, 1252-1259.

ROJAS, O. J., ERNSTSSON, M., NEUMAN, R. D., CLAEISSON, P. M. (2002). "Effect of polyelectrolyte charge density on the adsorption and desorption behavior on mica" *Langmuir*, **18**, 1604-1612.

SARAZIN, P. (2003). *Substrats poreux biodégradables préparés à partir de phases co-continues dans les mélanges de polymères immiscibles*. Montréal: Thèse de Doctorat, École Polytechnique.

SARAZIN, P., FAVIS, B. D. (2003). "Morphology Control in Co-continuous Poly(L-lactide)/Polystyrene Blends: A Route towards Highly Structured and Interconnected Porosity in Poly(L-lactide) Materials" *Biomacromolecules*, **4**, 1669-1679.

SARAZIN, P., ROY, X., FAVIS, B. D. (2004). "Controlled preparation and properties of porous poly(L-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers" *Biomaterials*, **25**, 5965-5978.

SCHLENOFF, J. B., DUBAS, S. T. (2001). "Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution" *Macromolecules*, **34**, 592-598.

SCHLENOFF, J. B., LY, H., LI, M. (1998). "Charge and Mass Balance in Polyelectrolyte Multilayers" *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 7626-7634.

SCHOELER, B., KUMARASWAMY, G., CARUSO, F. (2002). "Investigation of the influence of Polyelectrolyte Charge Density on the Growth of Multilayer Thin Films Prepared by the Layer-by-Layer Technique" *Macromolecules*, **35**, 889-897.

SCHOELER, B., POPTOSHEV, E., CARUSO, F. (2003). "Growth of Multilayer Films of Fixed and Variable Charge Density Polyelectrolytes: Effect of Mutual Charge and Secondary Interactions" *Macromolecules*, **36**, 5258-5264.

SCHUGENS, C., MAQUET, V., GRANDFILS, C., JEROME, R., TEYSSIE, P. (1996). "Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation:

1. preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation” *Polymer*, **37**, 1027-1038.

SERIZAWA, T., KAMIMURA, S., KAWANISHI, N., AKASHI, M. (2002). “Layer-by-Layer Assembly on Poly(vinyl alcohol) and Hydrophobic Polymers Based on Their Physical Adsorption on Surfaces” *Langmuir*, **18**, 8381-8385.

SERIZAWA, T., YAMASHITA, H., FUJIWARA, T., KIMURA, Y., AKASHI, M. (2001). “Stepwise Assembly of Enantiomeric Poly(lactide)s on Surfaces” *Macromolecules*, **34**, 1996-2001.

SHARMA, B., ELISSEEFF, J. H. (2004). “Engineering Structurally Organized Cartilage and Bone Tissues” *Annals of Biomedical Engineering*, **32**, 148-159.

SHENOY, D. B., ANTIPOV, A. A., SUKHORUKOV, G. B., MÖHWALD, H. (2003). “Layer-by-Layer Engineering of Biocompatible, Decomposable Core-Shell Structures” *Biomacromolecules*, **4**, 265-272.

SHI, X., BRISENO, A. L., SANEDRIN, R. J., ZHOU, F. (2003). “Formation of Uniform Polyaniline Thin Shells and Hollow Capsules Using Polyelectrolyte-Coated Microspheres as Templates” *Macromolecules*, **36**, 4093-4098.

SHIMAZAKI, Y., MITSUISHI, M., ITO, S., YAMAMOTO, M. (1997). “Preparation of the layer-by-layer deposited ultrathin film based on the charge-transfer interaction” *Langmuir*, **13**, 1385-1387.

SKALAK, R., FOX, C. F. (1988). *Tissue Engineering*, Wiley-Liss, New York.

STEITZ, R., JAEGER, W. KLITZING, R. V. (2001). "Influence of charge density and ionic strength on the multilayer formation of strong polyelectrolytes" *Langmuir*, **17**, 4471-4474.

STOCKTON, W. B., RUBNER, M. F. (1997). "Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions" *Macromolecules*, **30**, 2717-2725.

SUKHORUKOV, G. B., DONATH, E., LICHTENFELD, H., CARUSO, F., POPOV, V. I., MÖHWALD, H. (1998a). "Stepwise Polyelectrolyte Assembly on Particle Surfaces: a Novel Approach to Colloid Design" *Polymer for Advanced Technologies*, **9**, 759-767.

SUKHORUKOV, G. B., DONATH, E., LICHTENFELD, H., KNIPPEL, E., KNIPPEL, M., BUDDE, A., MÖHWALD, H. (1998b). "Layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes on colloidal particles" *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **137**, 253-266.

SUNDARARAJ, U., MACOSKO, C.W. (1995). "Drop breakup and coalescence in polymer blends: the effects of concentration and compatibilisation" *Macromolecules*, **28**, 2647-2657.

THOMSON, R. C., WAKE, M. C., YASZEMSKI, M. J., MIKOS, A. G. (1995). "Biodegradable Polymer Scaffolds to Regenerate Organs" *Advances in Polymer Science*, **122**, 245-274.

TU, C., CAI, Q., YANG, J., WAN, Y., BEI, J., WANG, S. (2003) "The Fabrication and Characterization of Poly(lactic acid) Scaffolds for Tissue Engineering by Improved

Solid-Liquid Phase Separation” *Polymers for Advanced Technologies*, **14**, 565-573.

VERHOOGT, H., VAN DAM, J., POSTHUMA DE BOER, A. (1994). “Morphology-processing relationship in interpenetrating polymer blends” *Interpenetrating Polymer Networks*. Sous la direction de D. Klemperer, L.H. Sperling et L.A. Utracki., American Chemical Society, Washington.

VIRGILIO, N. (2004) *Vers l'analyse des interfaces dans les mélanges ternaires de polymères en utilisant une préparation au faisceau ionique focalisé et une analyse au microscope à force atomique dynamique*, Mémoire de Maîtrise. Montréal. École Polytechnique.

VOIGT, U., JAEGER, W., FINDENEGG, G. H., KLITZING, R. V. (2003). “Charge effects on the formation of multilayers containing strong polyelectrolytes” *Journal of Physical Chemistry B*, **107**, 5273-5280.

VON RECUM, A. F., SHANNON, C. E., LONG, K.J., VAN KOOTEN, T. G., MEYLE, J. (1996). “Surface Roughness, Porosity and Texture as Modifiers of Cellular Adhesion” *Tissue Engineering*, **2**, 241-253.

WHANG, K., HEALY, K. E., ELENZ, D. R., NAM, E. K., TSAI, D. C., THOMAS, C. H., NUBER, G. W., GLORIEUX, F. H., TRAVERS, R., SPRAGUE, S. M. (1992). “Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture” *Tissue Engineering*, **5**, 35-51.

WHANG, K., THOMAS, C. H., HEALY, K. E., NUBER, G. (1995). “A novel method

to fabricate bioabsorbable scaffolds” *Polymer*, **36**, 837-842.

WILLEMSE, R. C., DE BOER, A. P., VAN DAM, J., GOTSIS, A. D. (1998). “Co-continuous morphologies in polymer blends: A new model” *Polymer*, **39**, 5879-5887.

WILLEMSE, R. C., POSTHUMA DE BOER, A., VAN DAM, J., GOTSIS, A. D. (1999). “Co-continuous morphologies in polymer blends: the influence of the interfacial tension” *Polymer*, **40**, 827-834.

YUAN, Z., FAVIS, B. D. (2004). “Macroporous poly(L-lactide) of controlled pore size derived from the annealing of co-continuous polystyrene/poly(L-lactide) blends” *Biomaterials*, **25**, 2161-2170.

ZHANG, R. Y., MA, P. X. (2000). “Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures” *Journal of Biomedical Materials Research*, **52**, 430-438.

ANNEXE 1 – LIBÉRATION CONTRÔLÉE DE BSA

Des essais de diffusion à travers la matrice poreuse de PLLA ont été réalisés dans le but d'étudier la performance des échantillons dans le cadre d'applications de libération contrôlée de médicaments. Le BSA a été employé comme agent actif modèle. Plusieurs échantillons de PLLA poreux possédant des caractéristiques variées ont été employés. Les échantillons ont été chargés en BSA en forçant la pénétration d'une solution très concentrée en BSA à l'intérieur de la matrice (selon la méthode décrite dans la section 3.3) pour ensuite évaporer l'eau. En modifiant la concentration en BSA de la solution de chargement, il est possible de contrôler le chargement qui peut être aussi élevé que 30%. L'efficacité de chargement atteint 100% selon les conditions de chargement.

Le pourcentage de chargement est défini tel que :

$$\% \text{chargement} = ((\text{masse finale} - \text{masse initiale}) / \text{masse initiale}) * 100\%$$

et l'efficacité de chargement telle que :

$$\text{Efficacité de chargement} = (\text{masse finale obtenue} / \text{masse finale théorie}) * 100\%$$

La diffusion du BSA a été observée en mesurant l'évolution de la concentration en BSA d'une solution d'eau ou de PBS à l'aide de la spectroscopie infrarouge. Les essais de diffusion ont été effectués directement dans les cuvettes du spectroscope scellées hermétiquement à des longueurs d'onde de 260 et 280 nm. Les conditions expérimentales ont été modifiées (températures, agitation, solvant, etc.)

Les principaux résultats obtenus sont présentés dans les pages qui suivent.

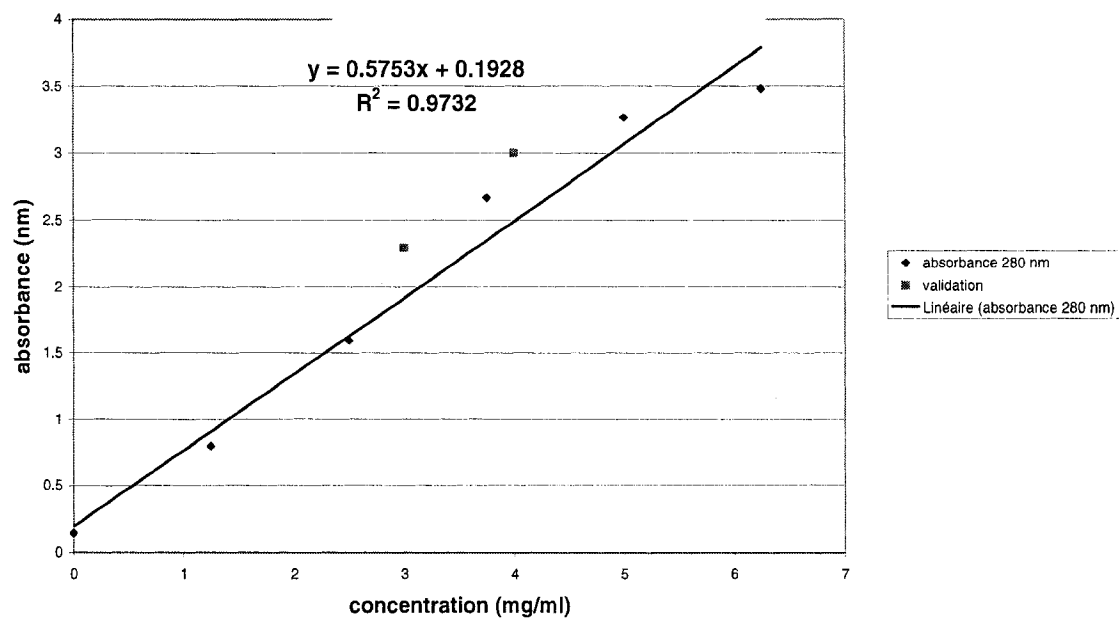


Figure A.1 Courbe de calibration de la diffusion du BSA dans l'eau étudiée à 280 nm.

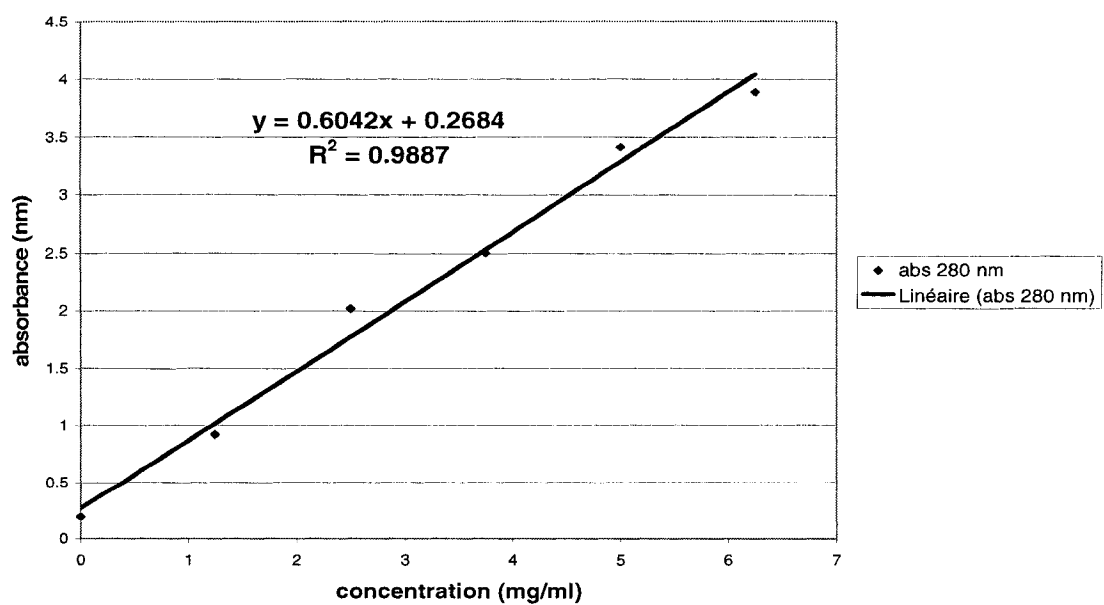


Figure A.2 Courbe de calibration de la diffusion du BSA dans le PBS étudiée à 280 nm.

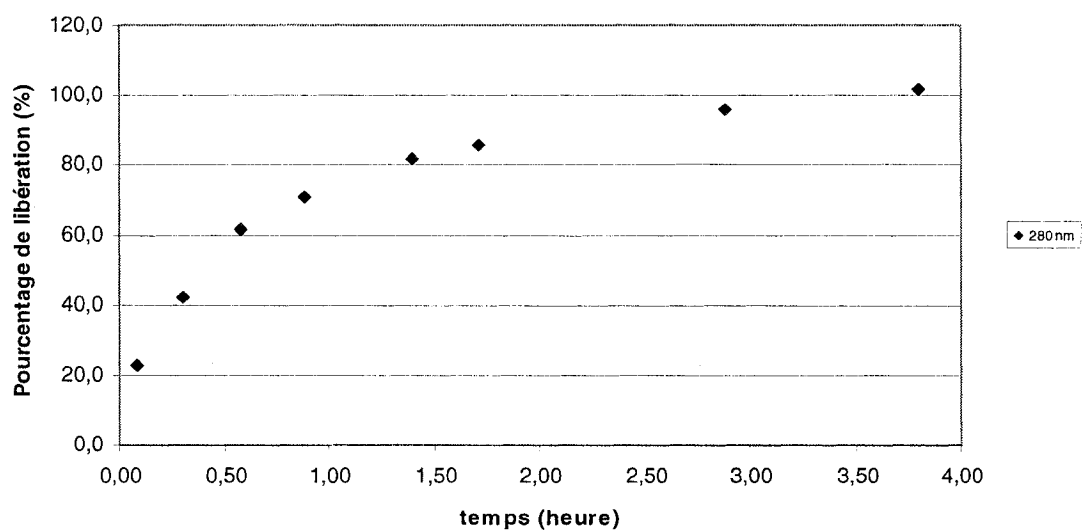


Figure A.3 Libération du BSA se trouvant dans une matrice de PLLA poreux (les caractéristiques morphologiques de la structures sont les même que le Système α décrit dans ce mémoire) dans du PBS à 37 °C.