



Formation d'hydrogels et réticulation chimique de polymères (chitosane et PAH)

Marie Fabritius

*E.1.3 Option MIDiFAB, Sujet bibliographique proposé par le Dr Jean-François Argillier
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, Av. Général Leclerc, 35700 Rennes*

Soumis le 29.1.2004 ; accepté le 16.2.2004

Résumé : les hydrogels sont obtenus à partir d'une polymérisation en présence d'eau. Ces substances sont largement utilisées dans différents domaines de la pharmacie, du biomédical, de l'alimentaire... L'hydrogel se forme *in situ*, par irradiation lumineuse, par augmentation de la température, en présence d'un enzyme et de sels divalents. Selon les conditions du milieu, il peut présenter un aspect macroscopique, microscopique ou nanoscopique. L'hydrogel en solutions aqueuses est capable s'imbiber de solvant. Ce gonflement est contrôlé par de nombreux paramètres, tels que la force ionique, le pH, la température, la porosité, la cristallinité et le degré d'acétylation. Le chitosane, polysaccharide particulièrement utilisé dans le domaine biomédical, peut être réticulé chimiquement en présence d'un enzyme ou par addition de glutaraldéhyde ou autres molécules pour devenir un hydrogel. La réticulation de ce polymère permet de rendre le gel beaucoup plus stable. Le PAH (polyallylamine hydrochloride), molécule portant les mêmes groupes ionisables que le chitosane, présente les mêmes propriétés. Avec une solution de chitosane sous forme d'hydrogel, il est possible de former des membranes pouvant servir de membranes d'osmose inverse pour le traitement des eaux ou pouvant contrôler la diffusion de médicaments dans l'organisme par encapsulation.

Les hydrogels : généralités et propriétés

Les hydrogels ont une structure tridimensionnelle, constitués de polymères hydrophiles et d'eau. La solution aqueuse remplit les espaces vides entre les chaînes des polymères, le gonflement de cette substance plus ou moins visqueuse étant contrôlé par différents paramètres. On peut noter que les hydrogels polycationiques sont largement utilisés dans le domaine biomédical, en particulier dans la délivrance de médicaments.

Il est possible de classer les hydrogels en trois catégories selon la taille des particules dispersées, déterminée par diffusion de la lumière. Il existe des hydrogels macroscopiques, microscopiques et nanoscopiques [1]. Expérimentalement, on a montré que pour une concentration de la solution inférieure à une concentration critique ($C < C^*$), une dispersion colloïdale se forme. Dans le cas contraire ($C > C^*$), on assiste à une gélification macroscopique [2], les hydrogels étant obtenus par réticulation intermoléculaire des chaînes polymériques. Les conditions de formation sont choisies de telle sorte qu'il se produise une combinaison entre les radicaux situés sur des macromolécules

séparées. Par contre, les nanogels sont formés par combinaison entre plusieurs radicaux situés sur une même macromolécule. Dans ce cas-ci, il s'agit donc d'une réticulation intramoléculaire. Et finalement, un mélange de ces deux procédés de formation conduit à la formation d'un gel composé d'agrégats de taille intermédiaire, c'est un microgel. Par ailleurs, les réticulations qui font intervenir des liaisons covalentes entre les polymères conduisent à un gel dit covalent, par opposition à un gel physique qui a été obtenu sans la formation de liaisons covalentes.

Il est également important de signaler qu'il existe des gels superporeux. Ce sont des réseaux tridimensionnels composés de polymères hydrophiles, qui absorbent une grande quantité d'eau en un temps très court. Ce phénomène est dû à la présence de pores contenus dans le gel d'une taille de l'ordre de quelques micromètres. Grâce à cette structure poreuse, les hydrogels superporeux possèdent 100 fois plus de superficie que les gels conventionnels [3]. Ces gels ont été initialement proposés dans les dispositifs de développement de rétentions gastriques et ensuite étendus dans le contrôle de délivrance de médicaments. Les dispositifs concernant les rétentions gastriques peuvent être appropriés pour les médicaments qui ont besoin d'agir localement dans l'organisme.

Les hydrogels présentent de nombreuses propriétés intéressantes. Ils se forment tout d'abord *in situ*, dans des conditions bien précises : sous irradiation lumineuse, par chauffage, par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique et en présence de sels covalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Ils sont de plus facilement dégradables, par exemple par simple hydrolyse et attaque enzymatique.

Par ailleurs, les hydrogels ont le pouvoir de gonfler en solutions aqueuses. De nombreux paramètres, tels que le pH, le degré d'acétylation, la force ionique, la cristallinité, la porosité et la température influencent le degré final de gonflement. La vitesse de gonflement, inversement proportionnelle au carré de la taille du gel, peut être augmentée facilement en augmentant la porosité du gel. Ceci revient en fait, à augmenter le rapport surface/volume. Par ailleurs, il a été démontré expérimentalement que le dégonflement se faisait plus rapidement que le gonflement, le rapport vitesse de gonflement/vitesse de dégonflement des gels très poreux variant selon les conditions de pH.

La cristallinité est un facteur déterminant pour l'absorption des molécules d'eau et donc pour la diminution de l'indice de gonflement. En effet, les molécules d'eau pénètrent plus facilement dans les

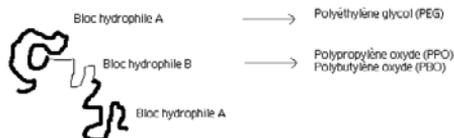


Schéma 1 : exemple de gel physique [4]

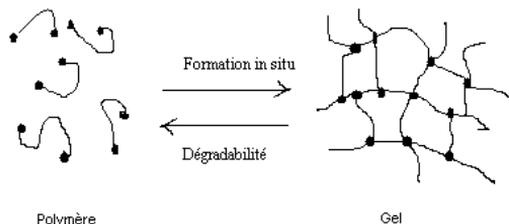


Schéma 2 : formation in situ d'un gel [4]

régions amorphes que cristallines. Des études ont montré qu'il apparaissait une baisse de cristallinité du chitosane réticulé par du glutaraldéhyde lorsque le contenu en aldéhyde augmentait. Par ailleurs, la capacité de gonflement du gel est plus importante pour des degrés d'acétylation faibles que pour des degrés d'acétylation importants.

La taille des pores dépend également du pH et de la force ionique des solutions de chitosane. Quand le pH diminue pour une concentration en gel et une force ionique constantes, la taille des pores se réduit et la résistance mécanique augmente. En effet, Muzzarelli *et al.* [6] trouvent une résistance à la tension de l'ordre de 7kg/mm^2 dans toutes les directions. Cela montre qu'à l'issue de l'extension de l'hydrogel, celui-ci ne présente pas d'élongation appréciable. Quand la force ionique augmente, le taux de diffusion diminue et la résistance mécanique est supérieure. Enfin le traitement thermique du gel permet la stabilisation de la structure poreuse et l'amélioration des propriétés mécaniques. Dans le cas des hydrogels où la perméation s'effectue *via* la structure poreuse, la réduction de prise d'eau par le gel engendre une augmentation de la réticulation du polymère et la cristallinité du gel diminue donc. La force ionique est évidemment un facteur important pour la diffusion des solutions salines et le degré de gonflement, ce dernier diminuant avec l'augmentation de la force ionique en raison d'une diminution de la pression osmotique dans l'hydrogel. Pour finir, on peut noter que l'eau entre plus facilement à haute température dans le gel, avec pour conséquence une augmentation du gonflement de l'hydrogel [15].

Réticulation chimique par voies enzymatique et physique du chitosane

Le chitosane (poly[-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopiranos]) est un biopolymère naturel produit par les mollusques et les crustacés. Il est donc biodégradable, propriété importante pour la protection de l'environnement. Ce polymère offre des propriétés chimiques, physiques et biologiques intéressantes. Il est largement utilisé dans le domaine pharmaceutique, en particulier dans les excipients apparaissant

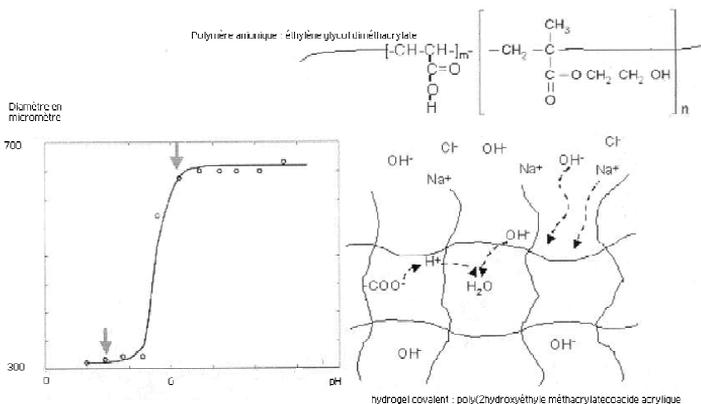


Schéma 3 : Variation du gonflement de l'hydrogel en fonction du pH [5].

dans la fabrication de systèmes de délivrance de médicaments par voie orale.

Le chitosane est obtenu par N-déacétylation de la chitine. Il comporte un nombre important de fonctions amines sur sa chaîne dépendant du degré d'acétylation. Ce nombre a un effet significatif sur la solubilité et les propriétés rhéologiques du polymère. Les groupes amines du polysaccharide ont un pK_a variant de 5.5 à 6.5 [7]. Le schéma 4 montre qu'à un pH relativement faible (< 6.3), le chitosane est protoné et le polyélectrolyte cationique résultant est soluble dans l'eau. A pH plus élevé (>7) les fonctions amines sont déprotonées, le chitosane devenant insoluble dans l'eau et essentiellement neutre. Les doublets électroniques libres sur les fonctions amines peuvent conduire à différentes réactions nucléophiles avec des molécules accepteuses d'électrons, permettant une réticulation aisée du chitosane.

Différentes études ont montré qu'il était possible de former un gel par réticulation chimique du chitosane. La réticulation chimique peut être obtenue par voie enzymatique, par exemple à l'aide de tyrosinase en présence de p-crésol ou bien par utilisation de glutaraldéhyde comme ont pu le démontrer les deux chimistes Roberts et Taylor [7bis].

Réticulation chimique en présence d'un enzyme

Comme le montre le schéma 5, la tyrosinase active le substrat phénolique et conduit à de la o-quinone. Cette dernière dispose de plusieurs sites réactifs, capables de réagir avec les fonctions aminées protonées du chitosane. La formation de gel est achevée par simple augmentation du pH de la solution de polymères, car à pH élevé, les fonctions amines du chitosane sont sous forme déprotonée ($-NH_2$), la

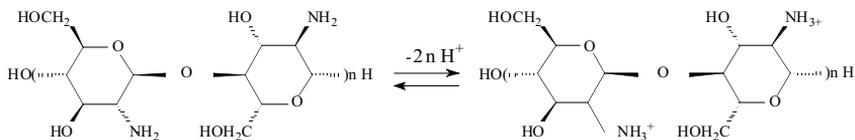


Schéma 4 : chitosane à pH acide et à pH basique [7]

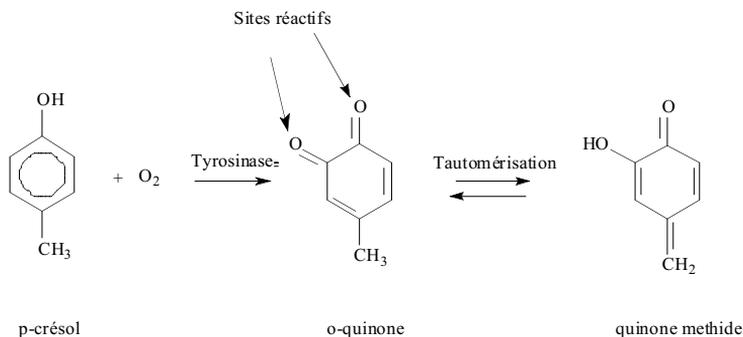


Schéma 5 : action de la tyrosinase [7]

réticulation n'étant alors plus possible. Les gels formés ont pu être caractérisés par diffraction des rayons X, les zones de jonctions présentes dans les gels résultant de la formation de régions cristallines.

Les solutions de chitosane sont préparées en dissolvant le polymère cationique dans de l'eau et de l'acide chlorhydrique pour atteindre un pH de 2-3. Le p-crésol est ensuite ajouté à la solution de chitosane et le pH est élevé à 6. Durant cette réaction, la solution se transforme en un gel visqueux. Puis, la tyrosinase est versée dans le mélange et le pH du gel de chitosane modifié est de nouveau élevé jusqu'à 13-14 par ajout de NaOH. Cette procédure permet de transformer le gel en une solution dans laquelle le chitosane modifié se dissout. Lorsqu'il est totalement dissous, le pH est ajusté à 7 pour lequel le gel n'est pas stable et forme un précipité brun. Cette procédure de dissolution du chitosane à un pH élevé conduit à la précipitation du polymère à pH neutre, qui est en fait le gel attendu.

Il est facile de mesurer la viscosité du gel et des solutions de chitosane avec un viscosimètre de Brookfield. De nombreuses mesures de la viscosité de différentes solutions de tyrosinase, de crésol et de chitosane modifiés ou non, ont été réalisées. Les conclusions suivantes ont été tirées : pour des concentrations initiales de crésol élevées, la formation de quinone se fait rapidement, ce qui entraîne une réticulation rapide du chitosane. Pour une solution de crésol et de chitosane modifié, la viscosité augmente avec l'augmentation de la concentration du chitosane.

Le chitosane est un polymère intéressant car il est obtenu à partir de ressources renouvelables. La basicité des groupes aminos du chitosane varie en solutions aqueuses tandis que la nucléophilie de ces groupes est facilement modifiée. Le chitosane est ici modifié en utilisant la tyrosinase, qui transforme un composé phénolique de faible poids moléculaire en une quinone réactive qui diffuse vers le site actif de l'enzyme et qui réagit avec le polymère. Mais l'utilisation de la tyrosinase présente un inconvénient majeur. Les réactions avec la quinone sont difficilement contrôlables et la modification du chitosane peut former des substituants oligomériques phénoliques. Notons enfin que les gels de crésol et chitosane modifié sont intéressants car ils sont biodégradables.

Réticulation chimique en présence de glutaraldéhyde ou d'autres substances

Les gels formés à partir de chitosane sont préparés par réticulation chimique des chaînes du polymère en présence de glutaraldéhyde[8], glyoxal [9] ou bien d'autres composés. La formation d'hydrogel à partir de polymères non covalents est utilisée pour réaliser des produits pharmaceutiques à base de gel. Ces substances sont biocompatibles et leur préparation ne recourt pas à des solvants organiques ou à des substances chimiques nocives.

La réticulation du gel à base de chitosane est réalisée par des liaisons hydrogènes ou par des interactions hydrophobes. Le gel est préparé en greffant sur le polymère soit des molécules à faible poids moléculaire comme de l'acide tétraacétique éthylène diamine ou palmitoïque, soit des molécules à poids moléculaire élevé comme des poly(acides lactiques) ou des poly(N-iso-polyacrylamide). Ces dernières détruisent la cristallinité du chitosane car elles forment des agglomérats irréguliers attachés sur les chaînes du polymère, donnant à ce composé un aspect amorphe. Le gel présente des propriétés rhéologiques intéressantes. En effet, Taylor et Roberts ont observé que le temps de formation de gel pour le chitosane réticulé par du glutaraldéhyde a tendance à diminuer avec l'augmentation de concentration en glutaraldéhyde [7bis].

Caractéristiques du gel [11]

Le chitosane comporte plusieurs fonctions amines. La viscosité du gel formé à partir du chitosane dépend du degré d'acétylation du polymère de départ. C'est le paramètre le plus important car il influe sur les propriétés physico-chimiques du chitosane (plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble et donc plus sa viscosité est importante). On peut rappeler que la viscosité dépend également de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente) et enfin du pH (plus il est bas et plus la viscosité est élevée).

Dans le cas du chitosane réticulé, la réticulation chimique permettant d'obtenir un hydrogel est obtenue par déshydratation. La déshydratation du polymère entraîne la réticulation, processus qui s'achève lorsqu'il n'y a plus d'eau. Les gels macroscopique et microscopique ont une structure poreuse, les pores résultant de la formation de cristaux de glace lors de la déshydratation. La taille des pores dépend également de l'hydrophilie du polymère réticulé. Plus il y aura de liaisons entre l'eau et le polymère et plus les pores seront gros. Les structures poreuses ont tendance à fortement s'hydrater, l'hydrogel grossit jusqu'à atteindre 95 fois son poids initial. Dans le cas de quelques gels, la vitesse de gonflement est rapide dans les premières minutes et est très vite limitée lorsque les pores approchent de leur taille limite.

La réticulation chimique du PAH (Polyallylamine hydrochloride)

La formation de PAH réticulé est importante et est largement utilisée dans le domaine pharmaceutique. Ces composés peuvent enlever par exemple, des phosphates dans le lumen des patients souffrant d'insuffisances rénales.

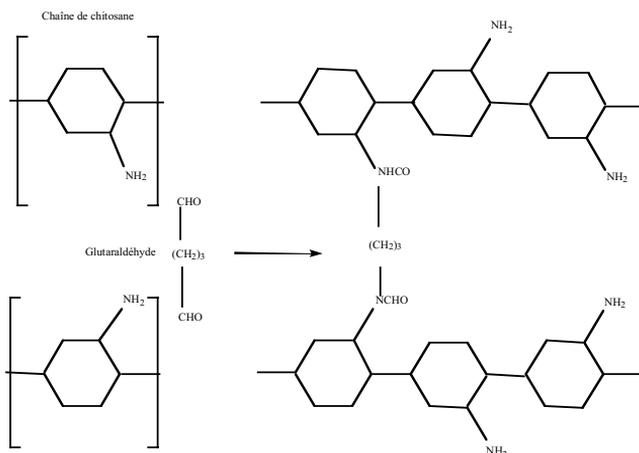


Schéma 6 : réticulation du chitosane avec du glutaraldéhyde [10]

La réticulation du PAH est possible en mélangeant du PAH avec de l'eau, un hydroxyde (de sodium, de calcium ou de potassium) et un solvant organique miscible dans l'eau (de l'acétonitrile ou de l'isopropanol). Ensuite un agent réticulant est ajouté dans la solution. Cet agent doit contenir au moins deux groupes fonctionnels capables de réagir avec les fonctions amines du PAH. Ces groupes peuvent être des groupes halogènes, époxy ou carbonyles [12].

Applications des hydrogels

Formation de membranes : hydrogels microscopiques [13]

De nombreuses recherches ont été effectuées sur la réalisation des membranes de chitosane. Il existe plusieurs méthodes pour fabriquer ces dernières, mais la plus employée est celle présentée par Muzzarelli [13]. Il s'agit de faire évaporer une solution de chitosane et d'acide formique versée sur une coupelle. Après séchage, la membrane est immergée dans une solution de soude de façon à garantir son insolubilité. Par ce passage en milieu basique, le film produit est neutralisé et ainsi une membrane d'osmose inverse est obtenue.

Ces membranes présentent différentes propriétés. L'épaisseur des membranes de chitosane est directement liée à leurs conditions de fabrication. Il est montré que les membranes séchées à température ambiante sont plus fines que celles séchées grâce à un courant d'air chaud. Cette épaisseur influe directement sur les procédés d'absorption et de filtration, une diminution de l'épaisseur entraînant une augmentation du flux de perméabilité. Elles possèdent par ailleurs, une forte résistance mécanique, si leur degré de désacétylation est élevé. Ce degré influe de plus sur la structure cristalline de la membrane. La cristallinité est un facteur déterminant pour l'absorption des molécules d'eau et par conséquent pour la diminution de l'indice de gonflement.

Cependant la réticulation des membranes de chitosane permet de leur conférer des propriétés plus intéressantes. La réticulation est possible avec du glutaraldéhyde comme vu dans le paragraphe précédent sur le chitosane. Dans le cas des hydrogels, où la perméation s'effectue *via* la structure poreuse, la réduction de la prise d'eau par la membrane accompagnant l'augmentation de la réticulation de la membrane est un facteur important.

Ces membranes de chitosane sont utilisées pour la diffusion de médicaments [14]. En effet, la distribution de médicament peut être contrôlée par le fait que la perméation de cette substance à travers une membrane de chitosane s'effectue par diffusion à travers les pores. Une autre application médicale intéressante est le pansement gastrique. Le chitosane forme un gel en entrant en contact avec les surfaces acides des muqueuses, servant ainsi de barrière aux agressions gastriques sans empêcher le fonctionnement de la muqueuse.

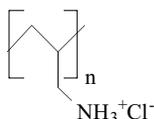


Schéma 7 : formule du PAH

Encapsulation de substances par des PEMs (polyelectrolyte multilayers) : hydrogels à l'échelle colloïdale [16]

Ce procédé est utilisé dans les domaines de la pharmacie et de la médecine essentiellement. Les PEMs sont formés par des dépositions successives de couches de polycations alternant avec des polyanions. L'ajout de ces couches successives peut être répété plusieurs fois jusqu'à ce qu'au nombre souhaité.

Les PEMs sont utilisés pour encapsuler des substances. Par exemple, l'encapsulation d'enzymes dans leur état solide est réalisée par un assemblage alternatif de charges de PAH et de poly(sodium-4-styrènesulfonate) [17]. Des données analytiques montrent que l'activité des enzymes ainsi encapsulés est complètement préservée. La membrane de la capsule est alors perméable aux substances de faible poids moléculaire et imperméable aux protéines. En fonction de la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la capsule, on peut provoquer la destruction des membranes, les macromolécules initialement piégées étant finalement relarguées.

Cette méthode d'encapsulation est utilisée dans le domaine pharmaceutique, en particulier dans la délivrance de médicaments directement à l'intérieur de l'organisme. Les hydrogels agissent comme un système distributeur de médicaments par piégeage de molécules bioactives, lesquelles sont ensuite relarguées. Lorsque l'hydrogel entre en contact avec une solution aqueuse, il commence à s'hydrater en se remplissant d'eau. Le gel gonfle, l'eau d'imprégnation solubilise les médicaments qui peuvent alors diffuser hors du polymère. La vitesse du rejet dépend de la diffusion de l'eau dans le polymère, de la relaxation des chaînes de polymère et de la dissolution des médicaments.

Une étude a été réalisée sur des microparticules de chitosane. L'utilité du contrôle de la distribution des substances médicales est basée sur le fait que la perméation d'un médicament à travers le gel s'effectue par diffusion à travers des pores. Les microparticules de chitosane ne sont pas stables et relarguent d'un coup tout leur contenu. Par contre les microparticules de chitosane réticulées par du glutaraldéhyde sont beaucoup plus stables et rejettent leurs médicaments petit à petit. Elles engendrent par conséquent une meilleure réponse immunitaire, du fait que la délivrance des médicaments est contrôlée.

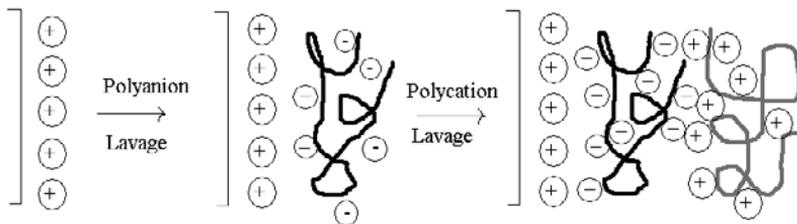


Schéma 8 : Structure des PEMs [5]

Conclusion

Les hydrogels ont un réel intérêt de nos jours. Ils présentent une importante variété d'applications dans le biomédical et les biotechnologies. Mais ils sont aussi largement présents dans de nombreux autres domaines, tels que dans l'agroalimentaire ou bien même encore dans des couches bébés par exemple.

Remerciements : je remercie Tanja Pott pour son aide et les discussions qu'elle m'a accordées.

Références

- [1] <http://mitr.p.lodz.pl/biomat/projects.html> (consulté en janvier 2004)
- [2] C. Schatz, C. Pichot, T. delair, C. Viton, A. Domard (2003) *Langmuir* 19, 9896-9903
- [3] <http://www.aapspharmscitech.org/view.asp?art=pt040451&pdf=yes> (consulté en janvier 2004)
- [4] <http://ocw.mit.edu/NR/rdonlyres/Biological-Engineering-Division/BE-462JMolecular-Principles-of-BiomaterialsSpring2003/203DCD16-580C-4C22-80C3-CAF73269A553/0/BE462lect07.pdf> (consulté en janvier 2004)
- [5] <http://ocw.mit.edu/NR/rdonlyres/Biological-Engineering-Division/BE-462JMolecular-Principles-of-BiomaterialsSpring2003/0DAD29C0-4264-4D71-A969-5579B8B6B31A/0/BE462lect09.pdf> (consulté en décembre 2003)
- [6] muzzarelli
- [7] G. Kumar, J.F. Bristow, P.J. Smith, G.F. Payne (2000) *Polymer* 41, 2157-2168
- [7bis] G.A.F. Roberts et K.E. Taylor (1989) *Macromolecule Chemistry* 190, 951-960
- [8] X. Chen, W.J. Li, W. Zhong, Y.H. Lu, T.Y. Yu (1997) *J. Appl. Polym. Sci.* 65, 2257-2262.
- [9] V.R. Patel, M.M Amiji (1996) *Pharm. Res.* 13, 588-593.
- [10] Tzu-Yang Hsien and Gregory L.Rorrer (1997) *Ind. Eng. Res.* 36, 3631-3638.
- [11] Lee Martin, Clive G. Wilson, Fariba Koosha, Laurence Tetley, Alexander I. Gray, Sevda Senel, Ijeoma F. Uchegbu (2002) *Journal of Controlled Release* 80, 87-100
- [12] <http://patft.upsto.gov/netacgi/nph-Par...> PAH (consulté en décembre 2003)
- [13] <http://www.ifrance.com/kiefer/ES.htm> (consulté en décembre 2003)
- [14] <http://www.drugdeliverytech.com> (consulté en janvier 2004)
- [15] <http://www.dfh.dk/phd/defences/annemettebeier.htm> (consulté en décembre 2003)
- [16] <http://pubs.acs.org/subscribe/journals/cen/80/i18/8018sci.html> (consulté en décembre 2003)
- [17] X. Qiu, S. Leporatti, E. Donath, H. Möhwald (2001) *Langmuir* 17, 5375-5380