

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A L'UMR PAM DE L'INSTITUT AGRO DIJON, EQUIPE PAV**

École doctorale n°554

École doctorale environnements - Santé

**Doctorat de Biotechnologies agro-alimentaires**

Par

**Monsieur Pierre Fouilloux**

« Etude d'hydrogels à base de polysaccharide par relaxométrie RMN :  
Dynamique, Structure et Quantification »

Thèse présentée et soutenue à « Dijon », le « 30/03/23 »

Composition du Jury :

Mr, Neiers, Fabrice	Professeur, Université de Bourgogne	Président
Mme, Malikova, Natalie	Chargée de recherche, CNRS, Paris	Rapporteur
Mme, Rondeau-Mouro, Corinne	Ingénieure de Recherche, INRAE, Rennes	Rapporteur
Mr Lippens, Guy	Directeur de recherche, CNRS, Toulouse	Examineur
Mr, Gougeon, Régis	Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
Mme, LeCoeur, Clémence	Maître de conférences, Université Paris Est Créteil	Examinatrice
Mr, Assifaoui, Ali	Maître de conférences, Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Mr, Bodart, Philippe	Maître de conférences, Université de Bourgogne	Codirecteur de thèse



*« The most important step a man can take. It's not the first one, is it?  
It's the next one. Always the next step, Dalinar. »*

**Dalinar Kholin dans Oathbringer par Brandon Sanderson.**



<b>Remerciements :</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>Abréviations :</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>Chapitre 1 <i>Revue bibliographique et état de l'art</i></b> .....	<b>- 9 -</b>
I. Hydrogels :.....	- 9 -
1. Définition et applications .....	- 9 -
2. Hydrogels polysaccharidiques : compositions .....	- 11 -
2.1 Polysaccharides : structure .....	- 11 -
2.2 Agent de réticulation : Cation en solution .....	- 13 -
2.3 Polysaccharides anioniques en solution .....	- 15 -
3. Hydrogels : mécanisme de formation et mode d'association .....	- 16 -
4. Hydrogels : caractérisation (Diffusion, taille de réseau, dynamiques de l'eau).....	- 20 -
4.1 Diffusion.....	- 20 -
4.2 Détermination de la taille de réseau .....	- 22 -
4.3 Dynamique de l'eau dans les hydrogels.....	- 23 -
5. Hydrogels à base de pectine : méthodes de gélification et propriétés .....	- 23 -
5.1 La gélification externe.....	- 24 -
5.2 La gélification interne .....	- 27 -
5.3 La protection du fer contre l'oxydation .....	- 28 -
II. Mesure conventionnelle et par FFC de la relaxation RMN des protons.....	- 30 -
1. Applications de la relaxométrie à bas champ.....	- 31 -
1.1 Application dans le domaine médical .....	- 31 -
1.2 Application dans le domaine alimentaire .....	- 32 -
2. Introduction aux temps de relaxation longitudinal ( $T_1$ ) et transversal ( $T_2$ ) .....	- 33 -
2.1 Définition de la relaxation.....	- 33 -
2.2 Temps de relaxation longitudinal ( $T_1$ ) .....	- 33 -
2.3 Temps de relaxation transversal ( $T_2$ ).....	- 36 -
3. Les mesures conventionnelles des temps de relaxation .....	- 37 -
3.1 La séquence d'« inversion-récupération » (mesure du $T_1$ ).....	- 37 -
3.2 La séquence CPMG (mesure du $T_2$ ) .....	- 38 -
3.3 Distribution des temps de relaxation.....	- 39 -
4. Les mesures par RMN à cycle de champs rapide (FFC-NMR) .....	- 40 -
4.1 Description de la FFC-NMR .....	- 40 -
4.2 La séquence de pré-polarisation .....	- 42 -
4.3 La séquence non-pré-polarisée .....	- 43 -
III. Conclusion : .....	- 44 -

<b>Chapitre 2 Matériels et méthodes.....</b>	<b>- 47 -</b>
I. Préparation des solutions de polyGalA et de cation de réticulation .....	- 47 -
II. Fabrication des gels à base de polyGalA.....	- 49 -
III. Caractérisation des hydrogels.....	- 52 -
IV. Dosage des cations dans les gels : Spectroscopie d'absorption atomique .....	- 54 -
V. Relaxométrie RMN .....	- 55 -

**Chapitre 3 Dynamique de l'eau dans un gel de polygalacturonate : nature et origine - 59 -**

<b>Introduction .....</b>	<b>- 59 -</b>
I. Contexte .....	- 60 -
II. Description des phénomènes de relaxation et des modèles théoriques.....	- 61 -
1. Modèle RT mouvement de rotation et de translation .....	- 61 -
1.1 Modèle théorique.....	- 61 -
1.2 Application aux gels Ca-polyGalA et Zn-polyGalA.....	- 64 -
1.3 Application aux gels partiellement séchés et gels à différentes tailles de réseau.....	- 70 -
2. Modèle BMSD : Marche de Levy.....	- 72 -
2.1 Modèle théorique.....	- 72 -
2.2 Application du modèle BMSD aux gels .....	- 74 -
3. Relaxation du deutérium ( $^2\text{H}$ ) et modèle $2\beta$ .....	- 77 -
3.1 Profil de relaxation du deutérium .....	- 77 -
3.2 Modèle $2\beta$ .....	- 78 -
III. Simulations dynamiques moléculaires .....	- 80 -
1. Système simulé.....	- 80 -
2. Résultats.....	- 82 -
3. Discussion.....	- 86 -
IV. Conclusion .....	- 87 -

**Chapitre 4 Détermination de la taille de réseau des hydrogels de polygalacturonate.- 91 -**

<b>Introduction .....</b>	<b>- 91 -</b>
I. Théorie de la diffusion et de la relaxation de l'aimantation de l'eau "libre" dans un système hydrogel .....	- 92 -
1. Solution générale de l'équation de diffusion.....	- 92 -
2. Solution particulière pour les gels.....	- 95 -
3. Accès à la taille de réseau des hydrogels .....	- 98 -
4. Comparaison entre traitements monoexponentiels et inversions des courbes de relaxation des gels.....	- 100 -
II. Résultats.....	- 102 -
1. Application aux gels externes de calcium.....	- 102 -

1.1	Mesure de la taille de réseau par RMN.....	- 102 -
1.2	Mesure de la taille de réseau par le module de Young.....	- 104 -
1.3	Comparaison des résultats : gel externe Ca-polyGalA.....	- 105 -
2.	Application au gel interne.....	- 107 -
3.	Application aux gels externes zinc.....	- 110 -
III.	Conclusion et perspectives.....	- 112 -

**Chapitre 5 Différentiation et quantification in-situ de la concentration en Fer(II) et Fer(III) des hydrogels de polygalacturonate ..... - 115 -**

**Introduction ..... - 115 -**

I.	Fer en solution.....	- 116 -
1.	Dosages colorimétriques.....	- 116 -
2.	Spectroscopie d'absorption atomique.....	- 117 -
3.	Autres techniques.....	- 117 -
II.	Paramagnétisme du fer et relaxométrie RMN.....	- 120 -
1.	L'origine du paramagnétisme du fer.....	- 120 -
2.	La relaxation paramagnétique.....	- 121 -
III.	Quantification Fe(II)/Fe(III) en solution et en gel:.....	- 124 -
1.	Structure du gel.....	- 124 -
2.	Profils de relaxation.....	- 125 -
3.	Dosage du fer en solution par relaxométrie RMN.....	- 127 -
4.	Relaxation dans des gels paramagnétiques.....	- 129 -
4.1	Distribution des temps de relaxation.....	- 129 -
4.2	Teneur en fer dans des gels Fe-polyGalA.....	- 131 -
4.3	Dosage du Fe(II) dans un gel Fe(II)-polyGalA.....	- 131 -
4.4	Dosage du Fe(III) dans un gel Fe(III)-polyGalA.....	- 134 -
5.	Fer libre et lié dans les gels Fe-polyGalA.....	- 137 -
5.1	Les gels Fe(II)-polyGalA : effet du lavage.....	- 138 -
5.2	Les gels Fe(II)-polyGalA lavés, tranchés.....	- 141 -
5.3	Les gels Fe(III)-polyGalA lavés.....	- 142 -
5.4	Les gels de Fe(III)-polyGalA lavés tranchés.....	- 145 -
6.	Discussion.....	- 147 -
IV.	Différenciation <i>in-situ</i> du Fe(II) et du Fe(III) dans un gel polysaccharidique.....	- 149 -
V.	Conclusions et perspectives.....	- 151 -

**Conclusion générale et Perspectives : ..... - 152 -**

**Bibliographie : ..... - 156 -**

## **Remerciements :**

Ce travail de thèse est le fruit d'un long travail qui a eu lieu au sein de l'institut Agro Dijon (anciennement AgroSup) à l'université de Bourgogne. J'ai effectué 90% de mes expériences au sein de l'UMR PAM et de l'équipe PCAV. C'est pourquoi je tiens tout d'abord à remercier ces institutions et leur directeur respectif, Pr Laurent Beney directeur de l'UMR PAM, Pr Thomas Karbowski directeur de l'équipe PCAV et Mr François Roche-Bruyn Directeur général de l'institut Agro Dijon. Une partie de mon expérimentation a eu lieu en Pologne à Poznań au sein de l'institut de physique moléculaire (IFMPAN) de l'académie des sciences de Pologne. C'est pourquoi je tiens à remercier le Pr Adam Rachocki, actuel directeur adjoint aux affaires scientifiques de l'IFMPAN, pour son accueil et ses conseils scientifiques avisés. Mes remerciements vont au programme FEDER (Valvigne et Probio+) qui ont participé au financement de ma thèse.

Je remercie tout autant Mme Natalie Malikova et Mme Corinne Rondeau-Mouro pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse. J'espère que votre lecture vous apportera autant d'intérêt pour ce sujet que j'en ai eu en le travaillant. Merci aussi à Mme Clémence LeCoeur, M Guy Lippens, M Fabrice Neiers et M Régis Gougeon d'avoir accepté d'être examinateurs de ces travaux.

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à l'égard de mes encadrants Ali Assifaoui et Philippe Bodart. Ali, cela fait presque 5 ans que nous avons commencé notre collaboration. En 2017 (et même avant) tu encadrais des cours d'introduction à la physico-chimie à des masters en Biologie et tu as réussi à me donner envie d'en savoir plus alors que mes études ne destinaient pas à une thèse aussi orientée « physique ». Par la suite tu as encadré le projet « Gel » en Master avec Camille Loupiac ce qui m'a donné l'opportunité d'expérimenter, pour quelques jours de science intense, aux grands instruments de Saclay. Ce projet a aussi donné lieu à mon sujet de stage de fin d'études Co-encadré par Camille Loupiac, un projet très intéressant qui a, finalement, débouché sur cette thèse 1 an plus tard. Au cours de ces 3 années de thèses, tu as toujours su te rendre disponible et notre collaboration a toujours été efficace. Nous avons toujours su garder une bonne atmosphère de travail et pour ça je t'en suis très reconnaissant. Philippe, nous n'avions jamais travaillé ensemble avant le début de cette thèse, et pourtant tu as su me faire confiance pour le concours de l'école doctorale. Malgré nos spécialités (pas si) opposées, tu as cru en un étudiant formé en biologie et a su me guider et me former aux connaissances nécessaires pour comprendre la physique mises en jeu lors d'expérimentation RMN. Je pense que ce projet nous a permis à tous les deux de progresser vers des domaines qui ne nous étai pas familiers. Je sais que tu t'intéressais plus au vin en 2019 et je suis sûr qu'aujourd'hui tu peux rajouter les hydrogels à tes centres d'intérêts et spécialités ! À tous les deux je vous remercie encore une fois pour l'atmosphère de travail qui a su être concentré, sérieux et efficace, mais aussi léger, agréable et décontracter quand l'occasion se présentait. Je m'excuse de vous avoir fait probablement stresser cette dernière année, en plus des retards liés au COVID-19 j'ai aussi cumulé mariage et bébé et cela n'a pas facilité les échéances !

Merci à Maria Nikolantonaki et Patrick Judenstein d'avoir constitué mon comité de suivi de thèse à 3 occasions. Vos remarques et conseils ont permis le bon déroulement de la thèse. Merci à Philippe Cayot, devenu directeur de l'école doctorale, pour ta compréhension sur le

statut de ma thèse et la nécessité d'une prolongation de quelques mois, merci aussi à Christelle Caillot qui a toujours été rapide dans le traitement de mon dossier.

Merci à mes collègues. Laura nous avons commencé notre thèse le même jour et grâce à toi j'ai pu avoir un partenaire de thé dans ce monde de buveurs de café ! Merci à Julie et Max qui ont toujours été de bonne humeur malgré les heures folles des doctorants, Julie tu es un modèle de rigueur et je me souviendrai longtemps des délicieux 1000 mini-hamburgers ! Max, je suis très heureux d'avoir pu partager un peu de notre passion pour l'exploration spatiale, One Piece, le bricolage, les pizzas et j'en passe. J'espère que tes étagères d'écran tiendront très longtemps ! À tous les trois et Jérémie c'est quand vous voulez pour une journée à manger des pizzas (ou des pizze, désolé Max !). Estelle, ta bonne humeur et ton enthousiasme pour animer le labo sont un vrai baume au cœur. Je n'ai pas pu être aussi souvent disponible que d'autres à cause de mon éloignement de Dijon et de ma fille, mais sache que j'ai apprécié chacune de tes invitations et chacune des pauses qu'on a partagé. Bernadette, merci d'être aussi impliqué dans le labo et dans l'organisation. Étant naturellement désorganisé avoir ton coup de main (parfois même tes coups de gueule !) pour maintenir l'ordre des labos est pour moi essentiel. Merci aussi pour ton aide quand j'ai commencé à travailler au laboratoire en 2017 et à ton aide pendant les TP que j'ai fait avec toi. Syuzanna, merci à toi, nous avons partagé un apprentissage de la RMN venant tous les deux de biologie et cela nous a permis de nous entraider avec nos propres termes, merci beaucoup, car tu es un exemple de détermination. Tiffany, Gisella, Tahitia, Melissa, Truc, Maria, Léo, Gayanne, Marie, Mathieu et aussi Maxime et Jonathan je vous remercie pour toutes les occasions où nous avons partagé ensemble quelque temps, beaucoup d'entre vous sont arrivés pendant ma rédaction et mes congés paternité, j'espère que je n'ai pas été trop reclus avec vous, je peux déjà voir que vous allez avoir une très bonne future promotion ! Camille, merci de ta passion pour l'enseignement et la science sans toi, je n'aurai probablement pas fait de la recherche, merci aussi pour les expériences de vulgarisation. Thomas, Laurent (et le PC de Sébastien) j'espère que mes bières maison vous ont plus !

Merci à toute ma Famille qui est maintenant plus grande de 3 têtes blondes en 3 ans. Notre famille est à la fois plus grande et plus petite, mais je suis sûr que ma grand-mère aurait été fière de ses 3 arrière-petits-enfants. Merci à ma mère et mon père qui n'ont jamais mis en doute mes choix d'études et qui m'ont toujours permis de progresser dans ma passion de la science. Merci à Antoine, d'avoir toujours été disponible et d'avoir pris le temps d'organiser beaucoup d'évènements (pour et) avec moi. Merci à Nael, tu as aussi toujours été là et même si tu penses le contraire tu as toujours eu le talent d'aider et de me supporter. Merci à Jess d'avoir aidé Nael (ahah) et d'avoir été une bonne amie et collègue depuis notre master. Merci à Kévin et Manon pour tous tes jeux, promis on écoute les règles. Merci à tous les Néoviciens, avoir une bande d'amies d'enfance qui ne se lâche pas comme ça, ça n'a pas de prix. Mention spéciale à la Hellfest squad. Thomas content qu'on se soit retrouvé. Merci à ma nouvelle belle-famille, de nous avoir accompagné Alicia moi et Éline durant tous ces changements.

Enfin mes derniers remerciements sont pour celle qui est devenue ma Femme pendant cette thèse. Tu m'as supporté pendant 12 ans et soutenu sans relâche pendant chaque instant. Pendant ces trois ans, tu m'as dit oui, nous avons acheté notre maison et tu m'as donné un bébé merveilleux qui est devenu notre soleil et notre motivation. Sans toi je n'aurai jamais eu le courage de postulé à cette thèse donc ce manuscrit t'est dédié à toi et à Éline.

## **Abréviations :**

amd : abscisse du maximum de la distribution

BMSD : *Bulk-mediated surface diffusion*, dynamique de surface modérée par l'eau libre

C\* : concentration de recouvrement

CN : Nombre de Coordination

DNPA : diffusion de neutron aux petits angles

Far : partie haute du gel

FRAP : « *Fluorescence Recovery After Photobleaching* », recouvrement de la fluorescence après photoblanchissement.

GalA : galacturonate

GDL : Glucono-Delta-Lactone

LVR : « *Linear Viscoelastic Region* », *Domaine Viscoélastique linéaire*

Mid : partie intermédiaire du gel

Near : partie basse du gel

polyGalA : Acide polyGalacturonique

PRE : « *Paramagnetic Relaxation Enhancement* », Augmentation de la relaxation par paramagnétisme

R\* : Ratio de seuil de réticulation polyGalA/Cation

RMN : résonance magnétique nucléaire

SA : Substances Actives

SAA : Spectroscopie d'Absorption Atomique

uGalA : unité Galacturonate

### **Définition :**

**Relaxivité** : il s'agit du taux de relaxation des protons divisé par la concentration en élément paramagnétique dans l'échantillon. Par abus de langage, l'expression "relaxivité du fer" peut être rencontrée. L'expression "relaxation du fer" est un abus de langage, elle permettra néanmoins d'alléger le propos lors de la discussion. Il convient de comprendre qu'il s'agit de la relaxation des protons résultant d'un couplage paramagnétique avec le fer.



## Introduction générale :

Les hydrogels ont une structure fibreuse qui forme un réseau tridimensionnel non uniforme, caractérisée par une capacité de contenir une quantité importante d'eau (96 – 98% d'eau). La taille du réseau (par analogie avec la cristallographie : la distance entre deux nœuds adjacents) peut être très hétérogène. Les hydrogels à base de biopolymères (polysaccharides, protéines...) ont différentes applications : agroalimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques. En agroalimentaire, on peut penser aux confitures, essentiellement des hydrogels à base de pectine naturellement extraite de certains fruits. Dans le domaine pharmaceutique, l'encapsulation de substances actives (SA) dans des hydrogels est très utilisée du fait de la présence d'une structure 3D composée de fibres de polymère liées entre elles. La maîtrise de la taille de réseau est primordiale pour pouvoir stocker/protéger/libérer les SA.

Pour formuler un hydrogel à base de polysaccharide, plusieurs procédés existent. Dans cette thèse, nous nous focaliserons sur la gélification ionique qui consiste à réticuler un polysaccharide anionique (type pectine) avec des cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) ou trivalents ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Une application directe des travaux présentés, (pour n'en citer qu'une) serait l'utilisation des ions ferreux pour former un gel comestible capable de délivrer des ions  $\text{Fe}(\text{II})$  aux personnes présentant une carence en fer. Dans ce cas, il est essentiel de connaître la quantité de fer et son degré d'oxydation dans le gel.

Cette thèse a pour objectif de développer des méthodes analytiques basées sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) et plus particulièrement sur la relaxation des protons ( $^1\text{H}$ ) pour répondre à trois problématiques bien définies :

1. Mesure de la dynamique de l'eau dans des gels polysaccharidiques
2. Détermination de la taille du réseau dans un hydrogel
3. Différencier et quantifier *in-situ* des ions  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  dans les hydrogels

Pour aborder ce sujet, il est important de définir un hydrogel polysaccharidique modèle dont les caractéristiques sont bien déterminées. Pour cela, nous avons choisi de travailler sur des hydrogels formés à partir d'acide polygalacturonique (polyGalA). Il est important de signaler que l'acide galacturonique (GalA) est l'unité majoritaire qui compose la pectine (polysaccharide anionique que l'on retrouve dans la peau de plusieurs agrumes). Ainsi dans le

**premier chapitre**, nous présenterons les hydrogels et donnerons ainsi aux lecteurs une base concernant leurs propriétés **physico-chimiques** et plus particulièrement celles des hydrogels à base de polyGalA. Ainsi, dans ce chapitre bibliographique, nous présenterons les travaux décrivant les mécanismes de gélification et la structure de ces hydrogels à différentes échelles d'observation (taille de réseau, degré d'oxydation du Fer dans le gel). Par ailleurs, nous introduirons la **RMN** et les principes physiques sous-jacents de la relaxométrie des protons, de façon élémentaire. Nous espérons que tout lecteur novice en RMN pourra se faire une idée générale et nous nous excusons auprès des lecteurs avertis de ne pas proposer une approche plus physique. Les techniques classiques de mesure des temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ) et transversale ( $T_2$ ) seront discutées, puis la relaxométrie à cycle de champs rapide (FFC-NMR) sera introduite. Pour ne pas alourdir ce chapitre bibliographique, l'état de l'art concernant les trois problématiques citées plus haut sera présenté au début de chaque chapitre résultat.

**Le deuxième chapitre** sera consacré à la partie **matériels et méthodes** dans laquelle, nous présenterons les méthodes de préparation des différentes solutions d'acide polygalacturonique (polyGalA) et des solutions de réticulation ainsi que la fabrication des hydrogels polysaccharidiques. Nous discuterons les principes de précaution et les techniques pour éviter l'oxydation du fer pendant la gélification du polyGalA. Les techniques de caractérisation telle que la rhéologie dynamique, la spectroscopie d'absorption atomique et la mesure de la matière sèche seront également présentées.

**Le troisième chapitre** s'intéressera à l'étude par FFC-NMR de la **dynamique de l'eau** dans les hydrogels à base de polysaccharide. Ce chapitre débutera par la présentation de la technique qui s'applique entre autres à l'étude de la dynamique de l'eau dans des matériaux. Les modèles utilisés pour ces types de matrice seront discutés étendus aux hydrogels. Les résultats de RMN seront confrontés à des modélisations moléculaires de la dynamique de l'eau dans des hydrogels formés à l'aide d'ion calcium.

**Le quatrième chapitre** introduira un calcul original de la **taille de réseau** à partir de la mesure du temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ). Dans un premier temps, les méthodes « directes » et « indirectes » permettant de déterminer la taille de réseau dans des hydrogels seront présentées. Ensuite, des hydrogels de différentes tailles de réseau seront formulés et étudiés. Des modèles mathématiques et physiques sont utilisés pour transformer les distributions du temps de relaxation obtenu par RMN en distributions de taille de réseau. Les résultats obtenus

seront comparés à des données issues de la littérature et plus particulièrement des mesures du module de Young et de la diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).

Le **cinquième chapitre** sera consacré à la **spéciation et quantification *in-situ* Fe(II) /Fe(III)** dans les hydrogels. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes pour quantifier le fer en solution, il est souvent difficile de quantifier et de différencier le Fe(II) et le Fe(III) dans la même matrice. La quantification et la différenciation du fer seront discutées et plusieurs méthodes seront comparées. Finalement, la relaxation des protons de l'eau issue du couplage dipolaire paramagnétique avec les ions ferriques et/ou ferreux est exploitée pour quantifier le fer dans les hydrogels. Des distributions de concentrations de fer sont obtenues et un gel contenant simultanément les deux types d'ions est analysé avec succès.

Une conclusion générale sur les différentes méthodes analytiques introduites dans ce manuscrit sera présentée.



# Chapitre 1 Revue bibliographique et état de l'art

## I. Hydrogels :

### 1. Définitions et applications

En 1960, Wichterle et Lim ont rapporté et fabriqué les premiers hydrogels polymériques à visée médicale (Wichterle and Lim, 1960). Depuis lors, deux définitions interchangeables sont principalement retenues. La première : « *Un hydrogel est un réseau de polymère réticulé et gonflé d'eau produit par la simple réaction entre polymère et agent de réticulation* ». La deuxième : « *Un hydrogel est un matériau polymérique capable de se gonfler d'eau et de retenir une grande quantité d'eau dans sa structure tridimensionnelle sans toutefois se solubiliser* » (Sharma and Tiwari, 2020). Dans les deux définitions, la principale propriété de l'hydrogel est sa capacité à contenir une quantité importante d'eau. Les hydrogels formulés par Wichterle et Lim (Wichterle and Lim, 1960) étaient basés sur un mélange de deux polymères de synthèse : glycolmonométhacrylate et de glycoldiméthacrylate. Ces auteurs ont insisté particulièrement sur le caractère « poreux » des hydrogels, une propriété physique aujourd'hui largement explorée et exploitée. Depuis, le concept de pores dans un hydrogel a évolué vers un concept plus adapté de taille de réseau. Les hydrogels sont donc des matrices relativement jeunes qui sont apparues dans le domaine de la médecine dans la période d'après-guerre. Par exemple avant 1960, les lentilles de contact étaient principalement fabriquées à partir de polymère plastique dont l'utilisation s'est démultipliée pendant la Seconde Guerre mondiale. Cependant, les polymères plastiques dérivés du pétrole présentaient de nombreux problèmes, par exemple : une faible compatibilité biologique, une imperméabilité au gaz et au liquide, révélant un inconfort conséquent lors d'une utilisation prolongée (Kopeček, 2009). L'apparition des hydrogels à base de biopolymère (les premiers polymères utilisés pour les lentilles étaient basés sur des copolymères de HEMA (HydroxyEthylène glycole MonométhAcrylate) et de EDMA (Ethylène glycol DiMéthAcrylate)) résout dès lors ces problèmes, car ils ont en général de bien meilleures compatibilités biologiques tout en conservant les propriétés physiques des lentilles.

En médecine, aujourd'hui, les principales applications des gels polysaccharidiques sont : (i) l'encapsulation et la libération contrôlée de substances actives (vitamines, protéines,

enzymes), (ii) l'élaboration de pansements hautement spécifiques à la plaie (Dragan and Dinu, 2019; Mishra et al., 2011) et (iii) l'ingénierie tissulaire qui permet, entre autres, de soigner des tissus abîmés comme des cartilages, mais aussi de développer des tissus dans une matrice 3D adaptée (Lee and Mooney, 2012).

En agriculture, plusieurs propriétés des hydrogels peuvent être exploitées. La capacité de rétention d'eau des gels va permettre une irrigation optimisée des sols. Par exemple, son utilisation en surface permet d'éviter une diffusion de l'eau en profondeur où la plupart des plantes n'ont pas accès et ainsi de réduire la consommation d'eau. Les hydrogels améliorent la santé du sol en augmentant l'aération et en entretenant la population microbienne (Ekebafé et al., 2011; Guilherme et al., 2015; Klein and Poverenov, 2020). Ils permettent une libération à long terme de nutriments et de fertilisant pour le sol tout en réduisant la diffusion dans les nappes souterraines et la pollution à l'azote (Bellemjid et al., 2021; Ekebafé et al., 2011). Par exemple, des gels de chitosane et d'alcool polyvinylique (PVA) ont montré une forte augmentation de la rétention d'eau à 30 jours et une libération de potassium sur la même durée (Jamnongkan and Kaewpirom, 2010). Les hydrogels peuvent également être exploités à des fins de dépollution et de purification de l'eau en utilisant les propriétés de chélation des hydrogels et des éventuels groupements chimiques pouvant être greffés aux polymères (Parvathy and Jyothi, 2014; Qi et al., 2018).

Dans le domaine agroalimentaire, les hydrogels ont toujours existé. Par exemple, les confitures, les crèmes desserts, et autres gelées sont des recettes qui utilisent des polysaccharides comme la pectine, les carraghénanes et l'amidon, qui sont naturellement présents dans les fruits et les algues, et créent des structures tridimensionnelles riches en eau et aux propriétés physicochimiques particulières. Plus récemment, l'accès aux polysaccharides présents dans les algues, les fruits, les produits carnés (agar-agar, alginate, pectine, gélatine, etc.) a permis de développer des hydrogels alimentaires de plus en plus complexes. Enfin, les produits laitiers, les yaourts et les fromages sont des gels formés à partir des protéines et des matières grasses du lait par plusieurs types de procédés. Que ce soit en haute gastronomie, dans le cadre de la cuisine moléculaire, ou dans le domaine de la formulation industrielle, les hydrogels sont maintenant présents dans les assiettes des consommateurs.

D'autres applications concernent les films alimentaires utilisés comme emballages comestibles. Pour ce faire, l'une des premières étapes consiste à créer un hydrogel qui est

ensuite séché. Ces films comestibles peuvent alors offrir des activités antimicrobiennes ainsi qu'un contrôle d'humidité associé aux aliments emballés. Ils contribuent ainsi à prolonger la durée de vie, à assurer la sécurité alimentaire et à réduire le gaspillage (Gregorova et al., 2015; Roy et al., 2012; Zhang et al., 2014).

## **2. Hydrogels polysaccharidiques : compositions**

Dans cette partie, nous présenterons la structure de l'acide polygalacturonique (polyGalA), son comportement en solution, la formation du gel (mode d'association et mécanisme de gélification). Nous examinerons également les interactions entre le cation de réticulation et sa couche d'hydratation car elle exerce une influence significative sur le mode d'association entre les fonctions carboxylates du polyGalA et le cation et donc la structure finale du gel.

### **2.1 Polysaccharides : structure**

Les polysaccharides sont des molécules organiques naturelles composées de plusieurs oses (ou sucres) reliés ensemble par des liaisons osidiques. Ce sont des molécules organiques présentes partout à l'échelle de la planète. Parmi les polysaccharides les plus abondants sur terre, on trouve l'amidon et la cellulose qui sont les principaux composants des plantes et légumes, et qui sont tous deux des polymères de glucose. Les polysaccharides neutres (cellulose, amidon), cationiques (chitosane) ou anioniques (alginate, pectine, carraghénane). On distingue également deux types de polysaccharides : les homopolysaccharides composés du même monomère (unité uronique) et les hétéropolysaccharides composés d'au moins deux types de monomères (carraghénane). Les polysaccharides peuvent être linéaires, comme l'alginate, l'amylose, le chitosane et les carraghénanes. Ils peuvent aussi être ramifiés, comme c'est le cas pour les pectines et l'amylopectine.

Les pectines sont extraites des parois cellulaires de nombreux végétaux mais la pectine la plus courante est toutefois issue principalement des agrumes dont le zeste en est particulièrement riche. La composition et la structure des pectines varient grandement en fonction du fruit, de la variété mais aussi des méthodes d'extraction (Harholt et al., 2010). La Figure 1.1 esquisse la structure des pectines qui se caractérise par différentes régions plus ou moins ramifiées.

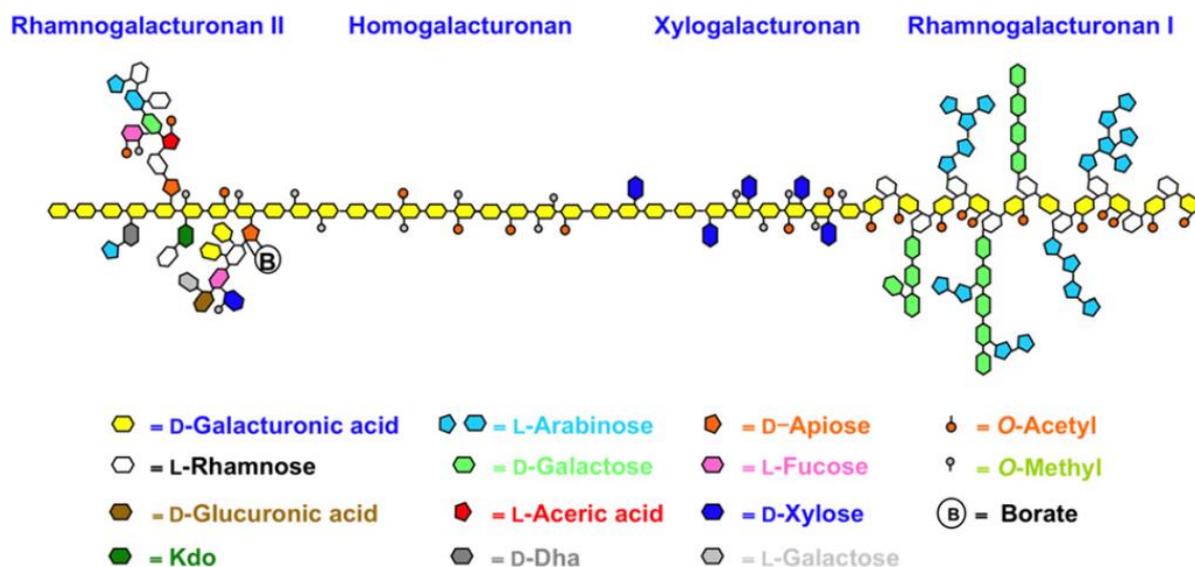


Figure 1.1 Schématisation de la structure d'une pectine d'après Harholt et al. (2010)

La partie d'intérêt pour cette thèse est l'homogalacturonane qui est une région composée d'unités galacturonate (GalA) liée en  $\alpha(1-4)$ . Ces unités possèdent des groupements carboxyles (COOH) pouvant être amidés (CONH<sub>2</sub>) ou méthylés (COOCH<sub>3</sub>) (Figure 1.2). Un degré de méthylation (DM) est défini et exprimé en nombre d'unités GalA méthylée pour 100 unités GalA totales. Une pectine ayant un taux élevé de méthylation (DM>50%) est appelée pectine hautement méthylée (HM). Cette pectine peut former un gel en présence de dépressur d'activité d'eau telle que le saccharose (~55% m/m) et nécessitera l'ajout d'un acide et une augmentation de température (85 – 90 °C). Il est important de noter que les pectines naturelles sont des pectines HM et que pour formuler des confitures avec des taux de sucre faibles, l'industrie effectue des modifications chimiques (déestérification) ou amidation. Les pectines ayant un faible taux de méthylation (LM) (c'est-à-dire DM<50%) vont former un gel en présence d'ions divalents (Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ou Fe<sup>2+</sup>) ou trivalents comme Fe<sup>3+</sup> (Assifaoui et al., 2015a; Grant et al., 1973; Huynh et al., 2018). Par conséquent, les gels formulés avec des pectines LM, se forment à température ambiante et ne nécessitent pas l'ajout de sucres.

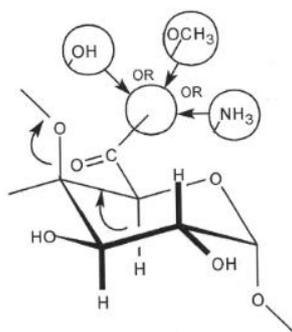


Figure 1.2 Schéma d'une unité galacturonate pouvant avoir un groupement méthyle, amine ou carboxyle.

Dans cette thèse, nous avons choisi de nous concentrer exclusivement sur la partie homogalacturonane de la pectine, en excluant les groupements esters, amides et ramifications. Nous utilisons ainsi l'acide polygalacturonic (polyGalA) pour obtenir un modèle simplifié de la pectine dont la gélification est due principalement à l'association entre les groupements carboxylates du polyGalA et les cations.

## 2.2 Agent de réticulation : Cation en solution

A l'état solide, les cations peuvent être présents sous la forme de sels, dans lesquels le cation est associé à un (ou plusieurs) contre-ion(s) anionique(s) pour assurer la neutralité du composé. Lorsque le sel est mis en solution, le cation s'hydrate et se dissocie de son contre-ion. Les molécules d'eau, dotées d'un dipôle, dans la première sphère d'hydratation s'orientent de telle manière que leur atome d'oxygène (chargé négativement) est orienté vers le cation (chargé positivement). Deux couches d'hydratation peuvent être identifiées autour des cations : La première couche, souvent considérée comme rigide, est caractérisée par une forte interaction entre les molécules d'eau et le cation (Kropman and Bakker, 2001). La seconde couche d'hydratation est plus propice à un échange constant avec les molécules d'eau libres présentes dans l'environnement de la solution (*bulk*). La Figure 1.3 présente la géométrie de la première couche d'hydratation de cinq cations divalents ainsi que quelques paramètres structuraux et énergétiques. Il convient de souligner que le nombre de coordination des ions (CN) est le principal concernant la géométrie de la couche d'hydratation primaire (Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Fe<sup>2+</sup> présentent le même CN et la même géométrie). Huynh et al. (2016) ont démontré que l'énergie de déshydratation ( $E_{int}$ ) joue un rôle essentiel dans la formation

d'hydrogel. Cette question sera abordée en détail dans la partie suivante (paragraphe Chapitre 1)3).

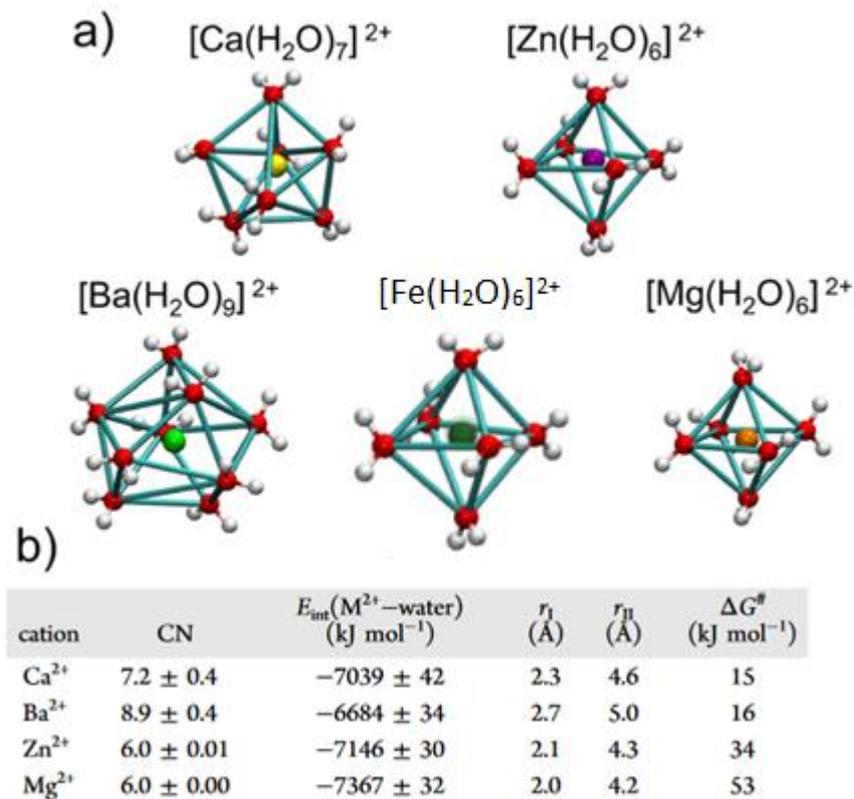


Figure 1.3 a) Exemples de structure de la couche d'hydratation primaire de plusieurs cations divalents. b) : Nombre de coordination CN, Energie d'interaction cation-eau  $E_{int}$ , distance moyenne entre eau et cation pour la couche d'hydratation primaire ( $r_I$ ) et secondaire  $r_{II}$ , et énergie d'échange pour qu'une molécule d'eau passe de la première à la seconde couche d'hydratation ( $\Delta G^\ddagger$ ) (d'après la thèse de Maire du Poset et al., 2018).

Le chapitre 5 traite exclusivement des gels dans lesquels les cations de réticulation sont ferriques et/ou ferreux. Il est important de rappeler les propriétés d'oxydo-réduction du fer dans ce contexte. Le fer existe sous deux formes ioniques en solution aqueuse : le fer(II) et le fer(III). Les potentiels de références  $E^\circ$  des couples du fer sont les suivants :  $Fe^{2+} / Fe$  :  $E^\circ = -0,44\ V$  et  $Fe^{3+} / Fe^{2+}$  :  $E^\circ = +0,77\ V$  (Atkins and De Paula, 2006). En d'autres termes, le  $Fe^{2+}$  s'oxyde toujours en  $Fe^{3+}$  lorsqu'il est en solution aqueuse et cette réaction est plus favorable (rapide) lorsque le pH est bas. De plus, le potentiel de référence de l' $O_2$  dissous ( $E^\circ(O_2 / H_2O) = 1,3\ V$ ) indique que la présence d' $O_2$  accélère encore davantage l'oxydation du  $Fe^{2+}$ .

### 2.3 Polysaccharides anioniques en solution

Dans certaines conditions, les polysaccharides anioniques peuvent être solubles dans l'eau. Par exemple, pour solubiliser l'acide polygalacturonique, l'ajout de NaOH est nécessaire pour dépasser la valeur de son pKa ( $\sim 3,4$ ). De plus, Il est important d'avoir une force ionique non nulle pour écranter les charges négatives et favoriser la solubilité du polyGalA. La viscosité intrinsèque du polyGalA et sa conformation sont étroitement liées à la force ionique, en particulier, une force ionique élevée ( $>100\text{mM}$ ) favorise l'agrégation du polyGalA (Huynh, 2016).

La viscosité de la solution de polyGalA évolue selon deux régimes distincts. A faibles concentrations de polyGalA, le premier régime se caractérise par une augmentation lente de la viscosité, ce qui est associé à un encombrement croissant de la solution (le volume se remplit progressivement en polymère qui ne se croise que peu ou pas du tout). A partir d'une concentration d'environ  $11\text{g/L}$ , un deuxième régime se manifeste, dans lesquels, l'augmentation de la viscosité en fonction de la concentration est plus prononcée. Cette augmentation traduit une solution dans laquelle les chaînes interagissent entre elles, ce qui ralentit leur mouvement. Le point de transition entre ces deux régimes correspond à une concentration spécifique appelée concentration de recouvrement ( $C^* \sim 11\text{g/L}$ , Figure 1.4) (Maire du Poset, 2018).

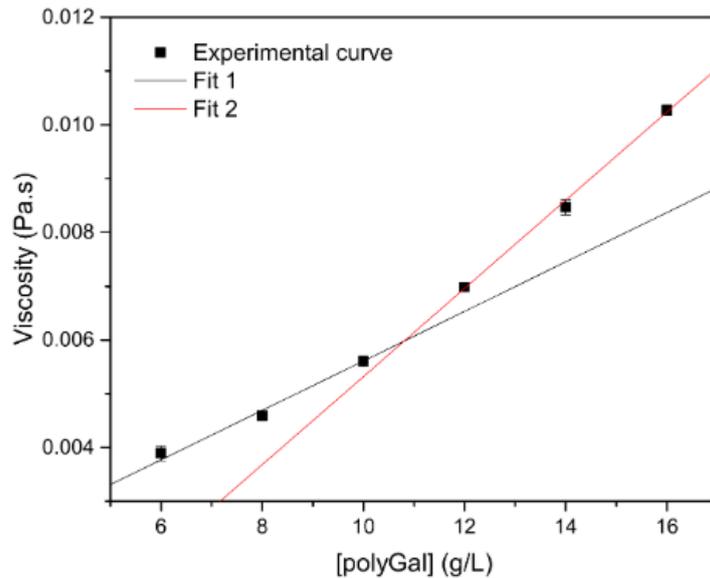


Figure 1.4 Evolution de la viscosité en fonction de la concentration en polyGalA. Les deux droites sont des ajustements des deux parties linéaires des mesures expérimentales (d'après Maire du Poset, 2018).

### 3. Hydrogels : mécanisme de formation et mode d'association

Rees, (1969) est le premier à décrire les interactions entre les chaînes de polysaccharide anionique et les cations. A partir d'une description elliptique de la structure des chaînes polysaccharidiques, il propose que des cations divalents puissent être situés dans des « nids » résultants de l'association de deux chaînes. Cette idée a été reprise par Grant et al. (1973) qui ont développé un modèle d'association entre l'alginate et le calcium appelé « eggbox » ou modèle en boîte à œufs (Figure 1.5).

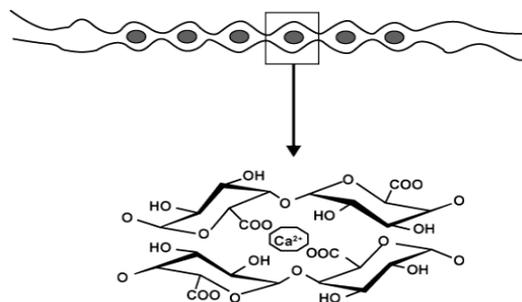


Figure 1.5 Le modèle (« eggbox ») boîte à œufs décrit par Grant et al. (1973).

En 2001 Braccini & Pérez (2001) remettent en question le modèle boîte à œufs pour les pectines et les dérivés de pectines. Ils suggèrent que les associations entre les unités GalA de

la pectine suivent plutôt un modèle en boîte à œufs décalé favorisant ainsi les interactions de type Van der Waals.

Huynh et al. (2016) ont discuté des types d'association entre quatre cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) et le polyGalA à une concentration inférieure à  $C^*$ . Bien que d'autres ions soient capables de former des gels, ces quatre ions permettent de mettre en évidence les différentes associations possibles. Ces auteurs ont montré que le type d'interaction entre les fonctions carboxylate du polymère et les cations divalents est largement dépendant de la nature du cation. Ainsi, le mode d'association est fortement influencé par les différences d'énergies entre le cation et sa première couche d'hydratation, ainsi que par la géométrie de la couche d'hydratation primaire.

Les modes d'association carboxylate-cation-carboxylate peuvent adoptés trois configurations différentes (Figure 1.6). Tout d'abord, la configuration monodentate (Figure 1.6.f gauche), qui est associée à une perte de deux molécules d'eau de la couche d'hydratation du cation. Ces deux molécules d'eau sont remplacées par les deux oxygènes des deux groupements carboxylates. Cette configuration concerne principalement les ions  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ . Ensuite, la configuration bidentate (Figure 1.6. f centre) implique la perte de quatre molécules d'eau de la couche d'hydratation du cation qui sont remplacées par les quatre atomes d'oxygènes des groupements carboxylates. Cette configuration est principalement observée avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Ba}^{2+}$ . Enfin, la configuration SSIP (*Solvent Separated Ion Pair*) (Figure 1.6.f droite) dans laquelle les molécules d'eau de la couche d'hydratation ne se dissocient pas. Cependant, deux molécules d'eau du cation sont partagées entre le cation et les deux fonctions carboxylates du polyGalA. Cette configuration concerne essentiellement les ions  $\text{Mg}^{2+}$  (Huynh et al., 2016).

En accord avec les énergies de liaison de la Figure 1.3.b, il est observé que plus l'interaction entre le cation et sa couche d'hydratation est forte, plus l'association entre ce dernier et la fonction carboxylate sera difficile. Ainsi, l'énergie de l'interaction cation-eau d'hydratation décroît dans cet ordre :  $\text{Mg}^{2+}$  (SSIP : pas de perte de molécule d'eau)  $\gg$   $\text{Fe}^{2+}$   $>$   $\text{Zn}^{2+}$  (monodentate : perte de 2 molécules d'eau)  $\gg$   $\text{Ca}^{2+}$   $>$   $\text{Ba}^{2+}$  (bidentate : perte de 4 molécules d'eau).

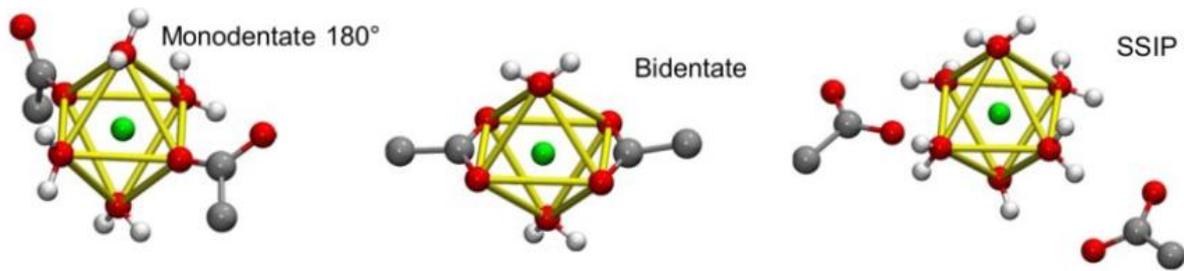


Figure 1.6 Illustration de l'interaction monodentate, bidentate et SSIP entre un cation et sa couche d'hydratation primaire et des fonctions carboxylates d'un polysaccharide anionique (d'après Maire du Poset et al., 2020b).

Quel que soit le mode d'association (SSIP, mono ou bidentate), un cation divalent est dans une cage formée de quatre unités GalA (Figure 1.5). Un ratio molaire,  $R$ , est ainsi défini comme le rapport entre la concentration molaire du cation divalent ( $M^{2+}$ ) et la concentration en unité GalA,  $R=[M^{2+}]/[GalA]$ . Ce ratio est de prime importance lors de la gélification. En effet, Grant et al. (1973) décrivent les associations de deux chaînes en tant que dimère par la présence de cations dans les cavités créées par les carboxylates (modèle boîte à œufs) et ils supposent que les dimères créés peuvent ensuite s'associer avec d'autres dimères pour former des multimères. Ces associations multimériques ont été contestées par Morris et al. (1978) en se basant sur des mesures de dichroïsme circulaire qui ont montré qu'il était peu probable d'obtenir des agrégats polymériques. Fang et al. (2008) proposent que les interactions des chaînes polymériques évoluent en fonction de la concentration en cations. En dessous de  $R < 0,25$  des monocomplexes se forment, ce qui signifie qu'une chaîne interagit avec un cation sans dimérisation. Entre  $0,25 < R < 0,55$  des dimérisations apparaissent comme le propose Rees (1969). Et enfin au-delà de  $R > 0,55$  des multimères se forment.

Ventura et al. (2013) ont apporté des nuances au modèle de Fang en étudiant les associations à l'aide de la diffusion des rayons X aux petits angles ainsi que des mesures viscoélastiques. Ils ont confirmé que le ratio  $R$  avait bien une importance, mais qu'il était possible d'avoir coexistence de monocomplexes, de dimères et de multimères. Ils ont également proposé un autre type d'association appelée réticulations ponctuelles (ou *point-like cross-link*). Plus récemment, Huynh et al. (2016) ont montré que ce ratio molaire dépend de la nature du cation. Ainsi, ils ont défini un ratio « seuil »  $R^*$  qui est lié au nombre et à la stabilité des réticulations ponctuelles (Figure 1.7). Lorsque  $R$  est inférieur à  $R^*$ , seule la monocomplexation et la formation de réticulation ponctuelles sont observées. Au-delà de ce  $R^*$ , les dimères se

forment, entraînant ainsi la création d'un réseau tridimensionnel stable. Pour  $Zn^{2+}$  et  $Ba^{2+}$ , ces auteurs ont observé que le ratio  $R^*$  élevé ( $\sim 0,3$ ) ; alors qu'il était de l'ordre de 0,01 pour les associations entre les ions  $Ca^{2+}$  et les chaînes polyGalA. De plus, dans le cas des ions zinc, la stabilité des réticulations ponctuelles est élevée mais le nombre de réticulation reste limiter. En revanche, dans le cas des ions baryum, le nombre de réticulations ponctuelles est élevé, mais la stabilité est faible (Figure 1.7). Ainsi les  $R^*$  entre  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  évoluent comme :

$$R_{Ca^{2+}}^* < R_{Ba^{2+}}^* \sim R_{Zn^{2+}}^* \quad 1.1$$

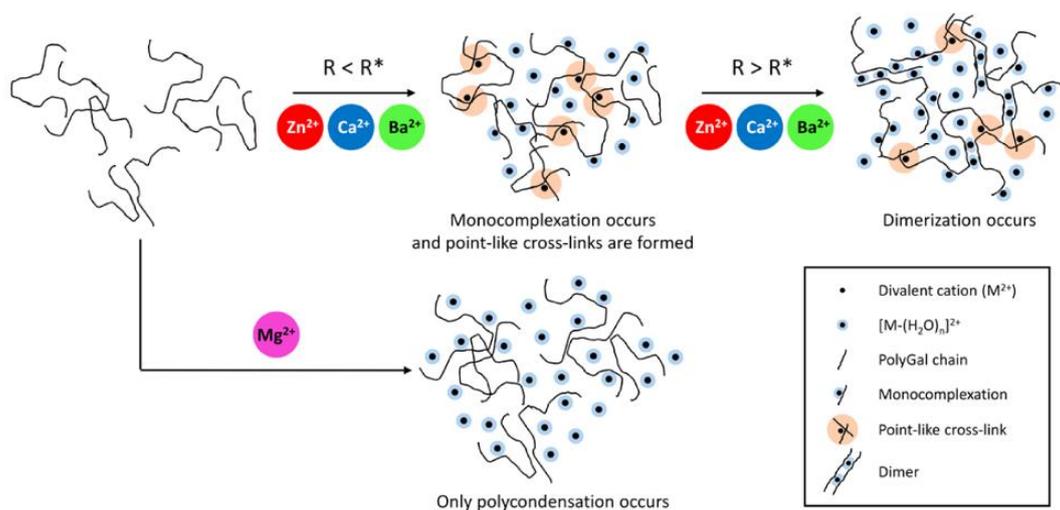


Figure 1.7 Schématisation des mécanismes d'association entre polyGalA et des cations. Les ions  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  permettent la formation de dimères, mais  $Mg^{2+}$  ne permet pas de formation de structure 3D (d'après Huynh et al., 2016).

Pour résumer, la formation d'un gel passe par plusieurs étapes. Tout d'abord, les chaînes de polyGalA doivent s'associer aux cations divalents ou multivalents, formant ainsi des monocomplexes et des réticulations ponctuelles. Lorsque le ratio  $R^*$  est atteint, un phénomène de dimérisation se produit, permettant la formation d'un réseau tridimensionnel. Cependant, certains cations ne sont pas capables de créer un réseau. C'est le cas des ions  $Mg^{2+}$ , probablement en raison de l'interaction forte entre ces cations et leur première couche d'hydratation (Figure 1.8).

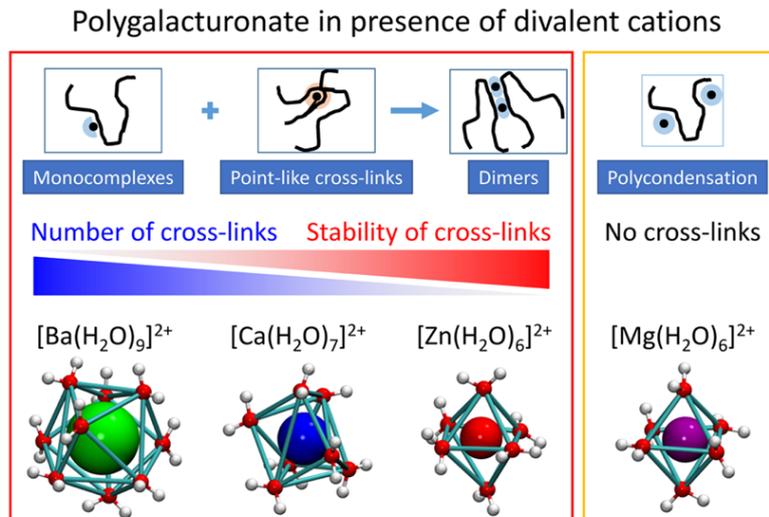


Figure 1.8 Illustration des différents types d'association entre cations et polyGalA (première ligne), et géométrie de la couche d'hydratation primaire de plusieurs cations divalent. la stabilité des cross links et le nombre de crosslinks sont fortement lié. Schéma d'après Huynh et al., (2016)

## 4. Hydrogels : caractérisation (Diffusion, taille de réseau, dynamiques de l'eau)

### 4.1 Diffusion

Dans ces travaux de thèse, nous aborderons principalement des gels dont la fonctionnalité repose sur l'encapsulation de différentes substances actives (SA). Les hydrogels offrent l'opportunité de libérer progressivement ces substances sur une période prolongée, allant de plusieurs heures à plusieurs jours, et les cibler vers un site d'action spécifique. Un exemple de cela est les gels de pectinate de calcium qui résistent à l'acidité de l'estomac et se dégradent dans le côlon grâce à la présence d'enzymes pectinolytique.

La diffusion des substances actives ou particules à encapsuler est dépendante de la taille des mailles ( $\xi$ ). Le réseau formé peut être visualisé comme une grille tridimensionnelle remplis d'eau. La taille des mailles, plus généralement appelée taille de réseau, se situe généralement entre 5 et 100 nm (Lin and Metters, 2006)), et dépend de plusieurs facteurs tels que la taille du polymère, sa concentration, la nature et la concentration en agent réticulant, ainsi que d'autres conditions telles que la température, la pression et le pH. La taille de réseau présente souvent une large distribution en raison de l'hétérogénéité de forme et de longueur des

polymères, ainsi que de l'association aléatoire des chaînes lors de la formation du gel (Dubrovskii and Rakova, 1997). Lorsque qu'une SA est encapsulée, si sa taille est nettement inférieure à la taille du réseau ( $r_{SA}/\xi \ll 1$ ) le coefficient de diffusion peut être approximé par la relation de Stokes-Einstein (diffusion libre et rapide):

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta r_{SA}} \quad 1.2$$

Avec R la constante des gaz parfaits, T la température absolue,  $\eta$  la viscosité et  $r_{SA}$  le rayon de la substance active.

Quand  $r_{SA}/\xi > 1$ , la diffusion de la SA est ralentie ou complètement bloquée par le réseau de polymère. Pour libérer la SA, il faudra soit permettre le gonflement du gel, soit le dégrader (Figure 1.9).

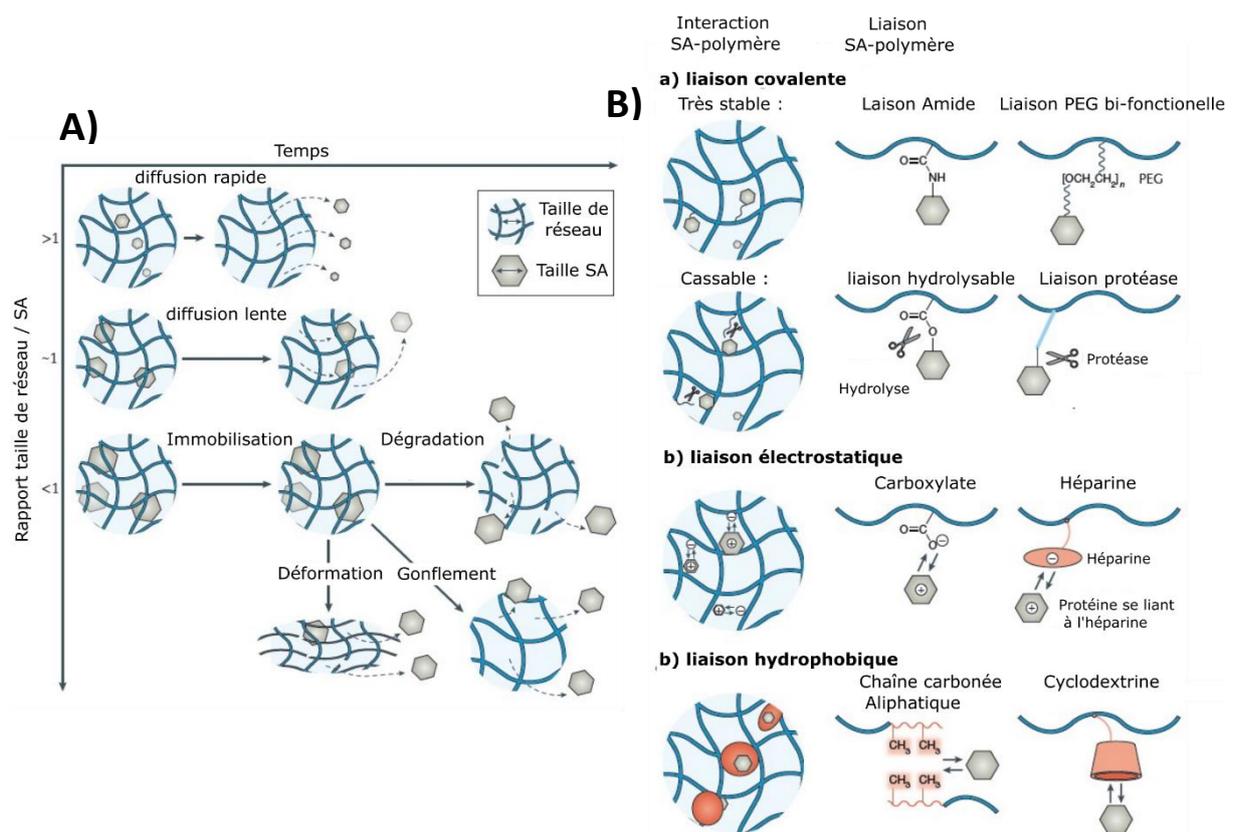


Figure 1.9 A) Illustration de la diffusion de substances actives plus ou moins ralenties par le réseau B) mécanismes pouvant être utilisés pour encapsuler des SAs de tailles inférieures à la taille du réseau (d'après Li and Mooney, 2016).

Dans le cas intermédiaire, lorsque la taille des particules est légèrement inférieure à la taille de réseau ( $r_{SA}/\xi \sim 1$ ), plusieurs types d'interactions peuvent retenir la particule dans le gel (Figure 1.9), ce qui conditionne le temps de sa libération :

- Des liaisons covalentes peuvent être mises en place, par exemple, grâce à des liaisons amides pour assurer une grande stabilité, ou à l'aide de groupes pouvant être clivés par hydrolyse ou par des enzymes.
- Des liaisons électrostatiques peuvent retenir la particule dans le réseau. Des groupements carboxylate ( $\text{COO}^-$ ) peuvent retenir une particule chargée positivement. Il est important de noter que des conditions de pH doivent être respectées pour maintenir la charge opposée.
- Des liaisons hydrophobes peuvent aussi être utilisées pour adsorber et désorber une particule. Des groupements aliphatiques et une extension de cyclodextrine peuvent par exemple, être greffés sur le polymère.

## 4.2 Détermination de la taille de réseau

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, la taille du réseau est l'un des paramètres essentiels lorsque l'hydrogel est utilisé comme matrice d'encapsulation et de libération de SA, et elle conditionne également la résistance physique du gel. Dans sa théorie « *rubber elasticity* » Flory a montré que dans une structure homogène, la taille du réseau peut être exprimée suivant la densité de point de réticulation  $\rho_{CL}$  (Flory Paul J., 1953). Il donne l'équation 1.3 où le module de Young ( $E$ ) ou module élastique  $G'$  ( $E=3G'$ ) d'un hydrogel est exprimé par rapport à la taille du réseau ( $\xi$ ), la constante des gaz parfaits  $R$ , le nombre d'Avogadro ( $N_A$ ) et la température  $T$ .

$$\rho_{CL} = \frac{G'}{R \times T} = \frac{E}{3 \times R \times T} \quad \text{et} \quad \xi = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi \times \rho_{CL} \times N_A}} = \sqrt[3]{\frac{18 \times R \times T}{\pi \times E \times N_A}} \quad 1.3$$

Il est important de noter que la taille de réseaux d'un gel est rarement homogène. Seuls quelques hydrogels d'origine synthétique sont généralement considérés comme homogènes (Lin and Metters, 2006; Sakai et al., 2008). Dans les gels polysaccharidiques d'origine naturels, les distributions de taille s'étendent en générale de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres et l'équation Il est cependant important de réaliser que la taille du

réseau d'un gel n'est que très rarement homogène. Seul quelques hydrogels d'origine synthétique sont généralement acceptés comme homogènes (Lin and Metters, 2006; Sakai et al., 2008). Dans les gels polysaccharidiques d'origine naturelle, les distributions de taille s'étendent en général de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres et l'équation 1.3 ne peut en toute rigueur être appliquée avec rigueur car les gels sont trop hétérogènes et la condition  $\rho_{CL}$  n'est plus valide.

### **4.3 Dynamique de l'eau dans les hydrogels**

Les hydrogels sont principalement constitués d'eau (95-98%) dont la dynamique est affectée par le réseau tridimensionnel. Cela peut être appréhendée par la méthode FRAP qui mesure la mobilité d'une sonde fluorescente (souvent Fluorescein isothiocyanate dextran) dans le gel (Devkota and Pilon, 2018). Des coefficients de diffusion l'ordre de  $10^{-13}$  à  $10^{-11}$   $m^2s^{-1}$  ont été observées par différents auteurs (Hadjiev and Amsden, 2015; Lopez-Sanchez et al., 2017, 2015; Lorén et al., 2015). Une des limites de cette technique est la taille des molécules utilisées comme sonde qui peut être de l'ordre de la taille de réseau. Pour pallier ce défaut, une technique alternative basée sur la perméabilité membranaire de NaCl ou du sodium tricitrate peut être utilisée (Tokuyama et al. 2020). Les ions et molécules impliqués sont beaucoup plus petits et moins susceptibles d'être ralentis par les mailles du réseau.

Cependant la relaxométrie RMN ( $^1H$ ) reste la technique de référence en termes de dynamique moléculaire de l'eau, car elle utilise l'eau elle-même comme sonde et permet d'explorer plusieurs ordres de grandeur de temps de corrélation dynamique ( $10^{-6}$  à  $10^{-12}$  s de 1 KHz à 1GHz). Elle est largement utilisée pour l'étude de la dynamique dans des matériaux poreux solides (ciments, sols, roches, sédiments etc...) (Steele et al., 2016), viscoélastiques tels que les pâtes biscuitières (Assifaoui et al., 2006) et d'autres produits.

## **5. Hydrogels à base de pectine : méthodes de gélification et propriétés**

La formation des hydrogels à base de polysaccharide anionique (pectine, alginate, polyGalA...) est assurée par l'ajout de cations divalents ou trivalents à la solution polysaccharidique. La méthode la plus couramment utilisée consiste à faire tomber goutte à goutte la solution de pectine (par exemple) dans une solution de réticulation contenant le cation divalent. Cette

technique permet de former instantanément des billes qui peuvent être utilisées pour encapsuler des substances actives (Huynh et al., 2017). Mais il est également possible de former un gel polysaccharide en séparant les deux compartiments contenant respectivement la solution polysaccharidique et la solution de réticulation par une membrane de dialyse (Figure 1.10). Cette méthode de gélification appelée « **gélification externe** » est opposée à la « **gélification interne** » qui consiste à intégrer sous forme de poudre insoluble le cation (par exemple,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ ) dans la solution polysaccharidique. La formation du gel se fera ainsi par la solubilisation ou la dissolution progressive du cation. Les gels « externes » sont caractérisés par une structure très hétérogène avec un gradient de concentration en polymère et de rigidité suivant l'axe de gélification. Alors que les gels « internes » ont une structure plus homogène.

## 5.1 La gélification externe

La gélification externe se caractérise par la présence d'un réservoir externe contenant des cations de réticulation. Ce réservoir est séparé de la solution polysaccharidique par une membrane de dialyse avec un seuil de coupure suffisamment grand pour laisser passer les cations et suffisamment petit pour empêcher les chaînes polysaccharidiques de diffuser vers la solution externe (Figure 1.10).

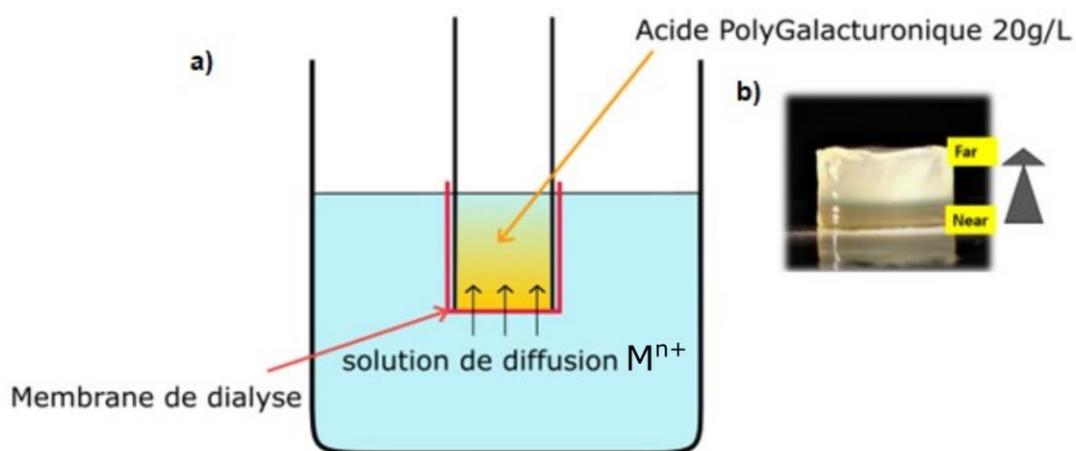


Figure 1.10 a) Schéma du principe de la gélification externe (figure originale) b) gel externe de calcium montrant une hétérogénéité par exposition à une lumière traversante (d'après Maire du Poset, 2018).

Le gel obtenu par gélification externe présente une forte hétérogénéité. Des études ont montré que la partie la plus proche de la membrane de dialyse, appelée « Near », est considérablement plus dense que la partie la plus éloignée, appelée « Far » (Huynh et al., 2018; Maire du Poset et al., 2018). Cette variation de densité s'explique principalement par les pressions osmotiques près de la membrane. En effet, la solution de polyGalA, saturée en polysaccharide, va être exposée à un réservoir vide de polysaccharide. Les polysaccharides ne pouvant pas franchir la membrane de dialyse, ils vont se concentrer aux abords de la membrane. En parallèle, un phénomène similaire se produit pour les ions réticulants qui, eux, peuvent franchir la membrane de dialyse et se lier progressivement aux groupes carboxylates de l'acide polygalacturonique. La gélification débute près de la membrane et se propagera le long de l'axe de diffusion (Skjak-Brek et al., 1989). Ce mécanisme est illustré dans la Figure 1.11.

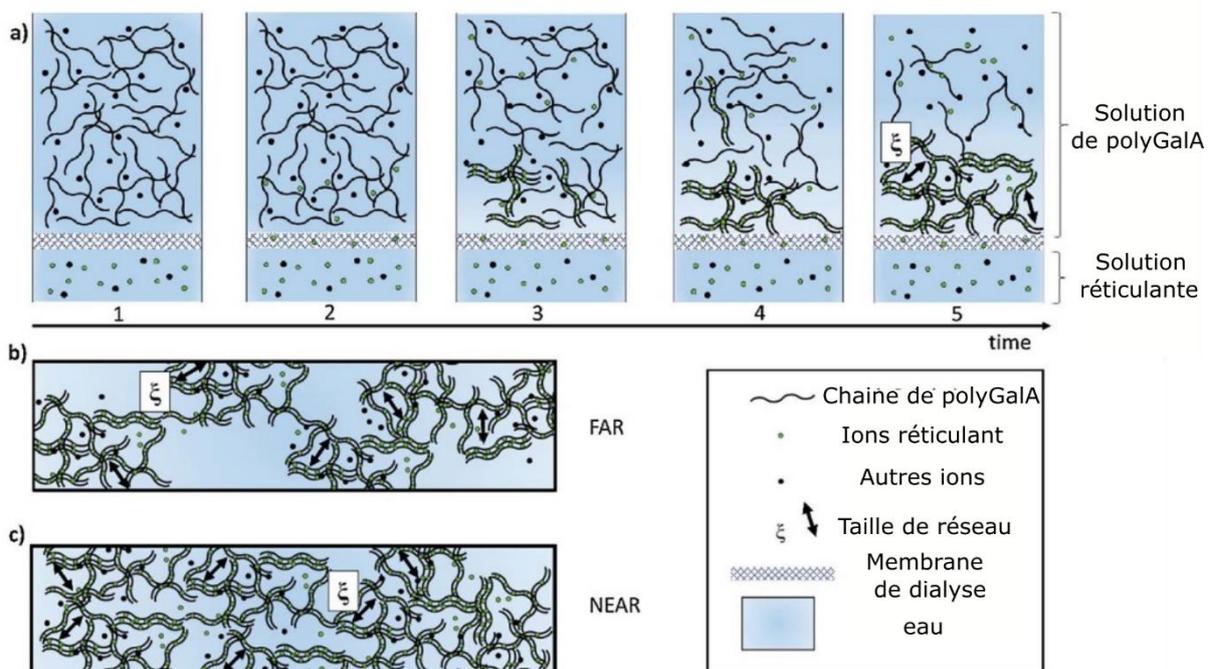


Figure 1.11 a) Proposition d'un schéma de gélification. b) Représentation d'une hypothétique structure dans la partie la plus proche de la membrane de dialyse (Near) et dans la partie la plus éloignée (Far) d'un gel (d'après Maire du Poset et al., 2018).

Les propriétés mécaniques du gel varient le long de l'axe de diffusion. A titre d'illustration, la Figure 1.12 reporte les modules élastiques ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) d'un gel tranché en quatre parties. Maire du Poset (2018) a montré que  $G'$  et  $G''$  ainsi que la concentration en polymère diminuent rapidement avec la position de la tranche. La Figure 1.12 a) montre que quelle que

soit la nature du cation divalent (Ca, Fe, Zn) les valeurs de  $G'$  ne sont pas impactées suggérant une structure du gel indépendante du cation. La Figure 1.12 b) illustre la relation entre la concentration en polymère et la concentration en ions métallique. Quelle que soit la nature du cation la relation est toujours identique avec  $[\text{GalA}] = 4 \times [\text{M}^{2+}]$ . Il existe donc un ratio constant ( $R=0,25$ ) dans l'ensemble du gel, et quel que soit le cation.

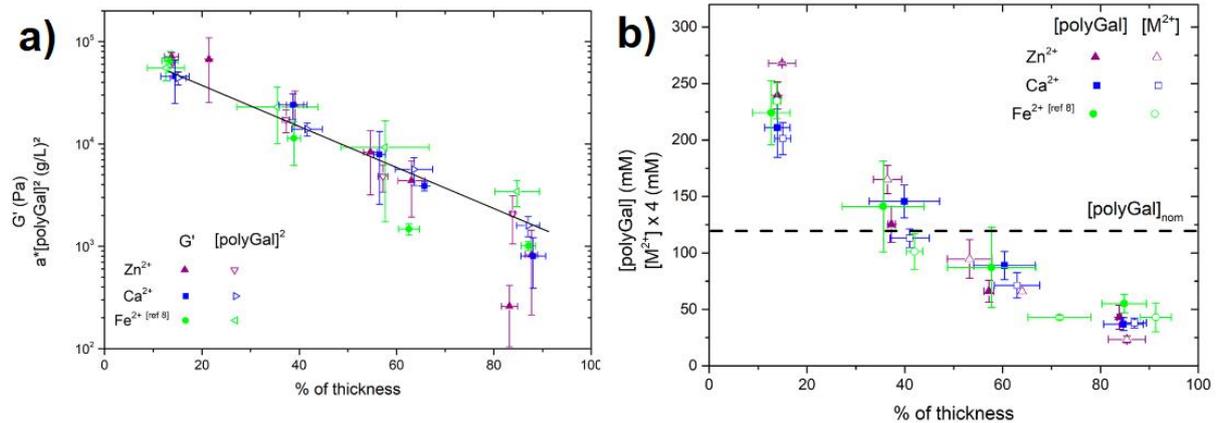


Figure 1.12 a) Evolution du module élastique  $G'$  et du carré de la concentration en polyGalA en fonction de la position de la tranche (4 tranches) (par rapport à la membrane de dialyse). b) Evolution de la concentration en polyGalA (symbole plein) et en cation multiplié par 4 (symbole vide) pour les différentes tranches. La ligne pointillée correspond à la concentration initiale en polyGalA. Le domaine 0-25% correspond à la partie la plus proche de la membrane de dialyse (Near), 75-100% la partie Far, 25-50% et 50-75% sont les deux tranches intermédiaires. (D'après Maire du Poset et al., 2019).

De manière intéressante, bien que la concentration en polymère diminue dans le gel au fur et à mesure de l'éloignement de la membrane de dialyse, des mesures DNPA semblent indiquer qu'il n'existe qu'une seule de taille de réseaux dans le gel (7,5 nm ; Maire du Poset, 2018) (Figure 1.13). Cette observation est surprenante, car on s'attendrait à ce que l'augmentation de la taille des espaces vides corresponde à la diminution de la quantité de polymère dans les tranches éloignées (Far), une augmentation de la taille des espaces vides est attendue. Ceci est attribué à la fenêtre d'observation de la technique DNPA. En effet la DNPA ne peut pas observer des structures beaucoup plus grandes. Ainsi elle ne mesure que le même motif, répété localement dans tout le gel, et caractériser par une taille de réseau moyenne de 7,5 nm. Cette taille de réseau caractéristique est en très bonne concordance avec la longueur de persistance ( $L_p$ ) des chaînes de polyGalA. La longueur de persistance traduit une longueur spécifique en dessous de laquelle les fibres de polyGalA sont complètement rigides. Ainsi la taille du réseau observée correspond à la taille minimale dans un gel polyGalA. (Figure 1.13).

Par ailleurs le ratio molaire entre le polyGalA et les ions fer(II) (ou Zn et Ca) semble constant (0,25) en accord avec le model boîte à œufs. Cependant, quantifier la teneur en fer dans les différentes parties du gel pour suivre le ratio R dans chaque tranche peut être assez difficile. Le Chapitre 5 se penchera sur le ratio Fe/polyGalA.

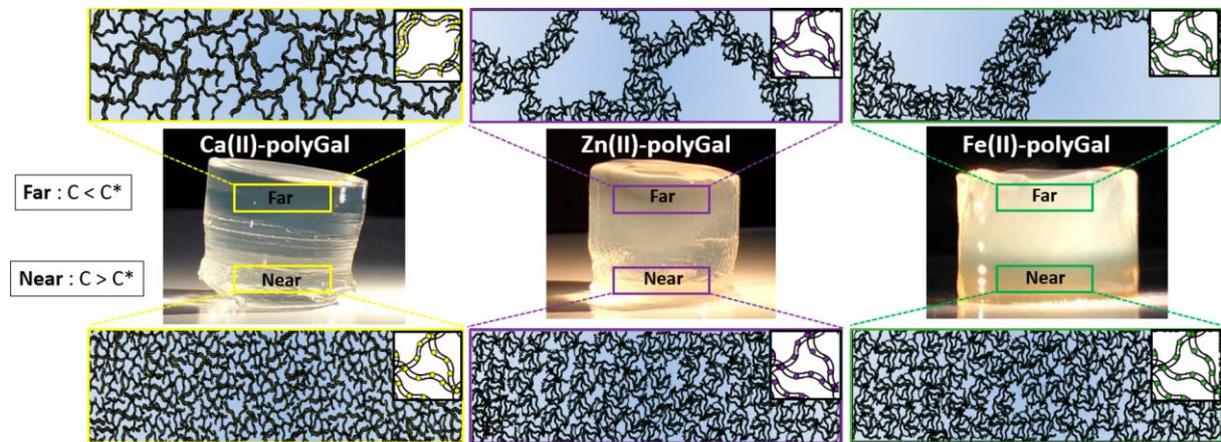


Figure 1.13 Représentation schématique de la structure mésoscopique et locale (encarts carrés) de gels de calcium, Zinc et Fer(II) Les inserts du haut correspondent à la partie Far des gels et ceux du bas à la partie Near (d'après Maire du Poset et al., 2019).

## 5.2 La gélification interne

La gélification interne utilise la même solution d'acide polygalacturonique utilisée pour la gélification externe. Cependant, la source des ions réticulants est, cette fois-ci, une poudre de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) insoluble qui est mise en suspension homogène dans la solution de polyGalA. Le carbonate de calcium se solubilise par ajout d'un acidifiant lent (GDL : Glucono-Delta-Lactone). Le GDL va lentement s'hydrolyser en acide gluconique, ce qui abaisse progressivement le pH et solubilise les carbonates de calcium. Les ions calcium solubilisés peuvent ensuite se réticuler au polysaccharide et former un gel.

Grâce à une agitation, les particules de carbonate de calcium sont réparties de façon homogène dans la solution de polyGalA favorisant ainsi la formation d'un gel homogène (Reis et al., 2006). Contrairement aux gels externes, les propriétés (mécaniques, de libérations...) sont identiques dans l'ensemble du gel. En pratique le gel est bien plus homogène qu'un gel externe, cependant la lenteur de la solubilisation peut, dans certains cas, créer une

sédimentation des particules de  $\text{CaCO}_3$  et modifier légèrement les propriétés du gel dans le domaine de sédimentation.

### 5.3 La protection du fer contre l'oxydation

Une des propriétés intéressantes des gels anioniques est la capacité du gel de polyGalA à protéger les ions  $\text{Fe}^{2+}$  de l'oxydation (Maire du Poset et al., 2018). Cette propriété est de première importance dans le cadre de la physiologie humaine et plus généralement de celle des mammifères où le fer(II) joue un rôle essentiel. En effet l'OMS considère que le manque de fer (l'anémie) est une des maladies les plus répandues dans le monde ("Anémie," OMS 2022; Barragán-Ibañez et al., 2016). D'après cet organisme, en 2022, 42% des enfants de moins de 5 ans et 40% des femmes enceintes dans le monde sont anémiques. Paradoxalement, le fer est un des éléments les plus répandus sur notre planète. On explique cette surprenante séparation entre abondance du fer et anémie par la forme biodisponible à l'homme. En effet l'homme assimile principalement le fer(II) de son alimentation tandis que le fer(III) (majoritairement présent dans la nature) est très peu biodisponible. Dans les régimes carnés, ce sont principalement les ions  $\text{Fe}^{2+}$  présents sous forme d'hème (myoglobine, hémoglobine) qui sont absorbés. Il faut signaler qu'il existe une enzyme capable de réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  inorganique dans le tractus gastrique (duodenal cytochrome B [Dcytb] (Barragán-Ibañez et al., 2016)), mais ceci ne contribue que pour une fraction marginale des apports journaliers en fer.

Maire du Poset et al. (2018) ont montré par une combinaison de mesures d'EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) et XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) que le  $\text{Fe}^{2+}$  réticulé dans le gel présente le même profil qu'un  $\text{Fe}^{2+}$  en solution (Figure 1.14) même après des essais de barbotage excessif d' $\text{O}_2$ .

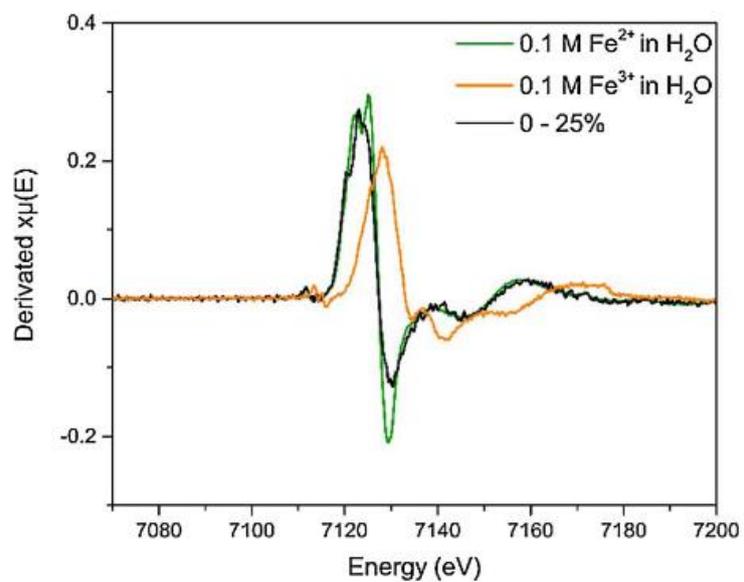


Figure 1.14 Spectre d'absorption EXAFS de solution de  $\text{Fe}^{2+}$  (vert) de  $\text{Fe}^{3+}$  (orange) dans l'eau comparé à une tranche de gel externe dense (0-25% en noir) (d'après Maire du Poset, 2018).

## **II. Mesure conventionnelle et par FFC de la relaxation RMN des protons**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) a été découverte en 1938 par I. I. Rabi (Rabi et al., 1938) à partir de jets moléculaires traversant un champ magnétique. Cette découverte lui a valu le prix Nobel de physique en 1944. Plus tard, en 1946 la technique fut étendue aux liquides et aux solides par Felix Bloch et Edward Mills Purcell (Purcell et al., 1946) qui reçurent eux aussi un prix Nobel de physique en 1952. Les trois lauréats du prix Nobel ont observé un effet de résonance spécifique à un noyau lorsque la fréquence du champ magnétique de balayage atteint une valeur particulière. C'est un effet de résonance des noyaux atomiques possédant un spin nucléaire non nul. En effet, lorsque les noyaux atomiques sont exposés à un champ magnétique, ils acquièrent un moment magnétique, qui dans une représentation classique, s'anime d'un mouvement de précession autour du champ magnétique appliqué. Grâce à une bobine émettrice (et réceptrice) d'ondes radiofréquences, l'aimantation des noyaux peut être manipulée et enregistrée, la résonance magnétique nucléaire peut de cette façon être mesurée. Ainsi, si la fréquence de résonance est spécifique à un noyau, il est possible d'identifier les composants d'une molécule par les fréquences de résonance des noyaux. C'est ce qui deviendra la base de la spectroscopie RMN. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons principalement au phénomène de relaxation RMN, qui traduit le retour à l'équilibre d'une assemblée de spin (ici associé au proton  $^1\text{H}$ ) dans un champ magnétique statique après une perturbation radiofréquence du système.

Nous utiliserons la relaxation RMN pour étudier (i) **les mouvements de l'eau** (Chapitre 3), (ii) **la taille de réseau** des hydrogels (Chapitre 4) et enfin (iii) **quantifier et différencier** les deux formes ioniques du fer dans un hydrogel (Chapitre 5). Les formalismes et modèles inhérents aux trois points précédents, sont exposés dans les chapitres respectifs. Il est ici hors de propos de vouloir donner une description exacte ou complète des fondements de la RMN ou des mécanismes de relaxation, pour cela le lecteur est renvoyé à la très vaste littérature existante (Abragam, 2007; Ernst et al., 2004; Kimmich, 1997; Kruk, 2016, 2007 pour ne citer que quelques ouvrages). Nous nous efforcerons ici de présenter aux lecteurs novices un minimum de concepts utiles pour la lecture de ce manuscrit. Nous tacherons donc de rendre compréhensibles ces phénomènes sans toutefois être trop éloigné de la réalité.

# 1. Applications de la relaxométrie à bas champ

## 1.1 Application dans le domaine médical

Une importante application qui exploite les temps de relaxation de la RMN en médecine est l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRMN) plus connue sous le nom d'IRM pour le grand public. C'est une méthode a été proposée pour la première fois en 1969 par Damadian et été appliquée en 1971 pour la détection de tumeurs (Damadian, 1971). La technique repose sur l'utilisation de mesure de  $T_1$  et/ou  $T_2$  (les temps caractéristiques de la relaxation par RMN), où il montra une différence significative entre les valeurs de  $T_1$  ou  $T_2$  entre un tissu sain et une tumeur. Il fallut moins de 10 ans pour obtenir le premier scanner commercial. La méthode s'est alors rapidement développée pour finalement, aujourd'hui, être une méthode d'imagerie des plus proéminentes et des plus précises pour l'étude de tissus mous. Elle continue à susciter un grande intérêt, notamment dans le développement d'agents de contraste paramagnétique, principalement des molécules basées sur du gadolinium (Rogosnitzky and Branch, 2016) bien que d'autres agents paramagnétiques puissent également être utilisés (Krause, 2002).

La relaxation RMN a aussi été utilisée pour l'étude de protéines et de microorganismes. En effet la relaxation des protons de l'eau est sensible à son environnement. Cela permet entre autres d'étudier les diffusions des protéines dans des milieux aqueux (Cistola and Robinson, 2016; Grösch and Noack, 1976; Peng and Wagner, 1994). La méthode devient particulièrement intéressante pour les métalloprotéines (par exemple l'hémoglobine du sang), car la présence d'éléments paramagnétiques (comme le fer de l'hémoglobine) induit une augmentation caractéristique de la relaxation (Cistola and Robinson, 2016).

## 1.2 Application dans le domaine alimentaire

La relaxométrie a connu un développement le domaine alimentaire avec l'apparition du premier instrument RMN de paillasse développé par Bruker en 1970. Cet instrument est le fruit d'une collaboration entre Bruker, une société spécialisée dans l'équipement scientifique, et Unilever, un géant de l'industrie alimentaire, qui souhaitait changer la méthode de quantification les acides gras dans les aliments (van den Enden et al., 1982; van Duynhoven et al., 2010). Auparavant, les entreprises agroalimentaires utilisaient des méthodes longues et encombrantes (comme la méthode dilatométrique), qui ont été remplacées par une mesure simple des temps de relaxation. En effet, la différence de temps de relaxation entre les protons de l'eau et les protons des chaînes lipidiques permet d'obtenir ces informations in-situ et de manière beaucoup plus rapide.

Dans leur revue, van Duynhoven et al. (2010) citent plus de 100 différentes applications de la RMN bas champ pour des aliments. Parmi les grandes catégories, on retrouve, les protéines, les pâtes biscuitières (Assifaoui et al., 2006) l'amidon (Roudaut et al., 2009), les produits laitiers, des confiseries, des boissons alcooliques ou non, des viandes, les œufs et enfin la plupart des graines alimentaire. Des travaux récents sur les matrices alimentaires ont également inspiré une grande partie des recherches de cette thèse. La détection de paramagnétiques comme le manganèse dans le vin (Bodart et al., 2019), la mesure des mouvements de l'eau dans les loukoums, les fromages et dans les œufs (Kruk, FlorekWojciechowska, et al., 2021; Kruk, Florek-Wojciechowska, et al., 2021; Pocań et al., 2021) sont des exemples d'inspiration des Chapitre 3 et Chapitre 5.

## 2. Introduction aux temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ) et transversale ( $T_2$ )

### 2.1 Définition de la relaxation

Par définition, la relaxation est un procédé temporel par lequel, un système perturbé retourne à son état d'équilibre. En RMN la relaxation concernera "le retour à l'équilibre de l'aimantation d'un échantillon placé dans un champ magnétique statique ( $B_0$ ), après que celle-ci ait été perturbée." Il est accepté qu'à l'équilibre aucune aimantation transversale n'existe. Cependant le long de l'axe Z (correspondant au champ magnétique appliqué à l'échantillon), une aimantation est présente.

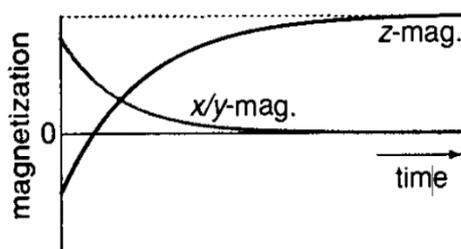


Figure 1.15 Evolution de la magnétisation (projeté sur l'axe Oz (z-mag) et dans le plan (Oyx) (x/y-mag)) après une perturbation quelconque du système. (d'après Keeler, 2009).

À l'équilibre l'amplitude de l'aimantation suivant l'axe Z dépendra du nombre de spin, du ratio gyromagnétique du noyau considéré ( $\gamma$ ) et de la valeur du champ magnétique appliqué. Suite à la perturbation du système (qui revient souvent à inverser l'aimantation, ou la faire basculer dans le plan (Oxy) à l'aide d'un champ radiofréquence), on observe pendant la relaxation l'aimantation transversale retourner vers une valeur nulle et l'aimantation longitudinale vers sa valeur d'équilibre.

### 2.2 Temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ )

La RMN est une expérience quantique qui exploite les propriétés des spins nucléaires. Chaque spin est caractérisé par un nombre quantique de spin  $I$  auquel on associe au moment cinétique de spin  $\hbar \vec{I}$ . Le nombre  $I$  peut être un entier ou un semi-entier, et il quantifie le moment cinétique de spin. Ce nombre est important pour la compréhension du phénomène de résonance magnétique nucléaire et du phénomène du moment de spin  $\hbar \vec{I}$  ainsi que pour la co-existence d'un moment magnétique  $\vec{\mu}$  aligné à  $\hbar \vec{I}$ :

$$\vec{\mu} = \frac{h\gamma\vec{I}}{2\pi} = \hbar\gamma\vec{I} \quad 1.4$$

Où  $h$  est la constante de Planck ( $h=6.626 \cdot 10^{-34}$  J.s).

La constante  $\gamma$  caractéristique de chaque isotope, est appelée rapport gyromagnétique. Les nombres de spin, les rapports gyromagnétiques, ainsi que les fréquences de résonance (proportionnelles aux rapports gyromagnétiques) pour un champ magnétique de 2,35 Teslas des isotopes les plus couramment étudiés sont répertoriés dans le Tableau 1.1.

Tableau 1.1. Caractéristiques des isotopes les plus courants : nombre de spins, rapport gyromagnétique, fréquence de résonance pour un champ magnétique de 2,35 T et abondance naturelle.

Noyau	Nombre de spin I	$\gamma$ ( $10^7$ rad.s <sup>-1</sup> )	$\nu$ (Mhz)	Abondance naturelle (%)
<sup>1</sup> H	1/2	26,75	100	99,98
<sup>2</sup> H	1	4,11	15,35	$1,5 \cdot 10^{-2}$
<sup>13</sup> C	1/2	6,73	25,14	1,11
<sup>14</sup> N	1	1,93	7,22	99,63
<sup>15</sup> N	1/2	2,71	10,13	0,37
<sup>17</sup> O	5/2	3,63	13,56	0,037
<sup>19</sup> p	1/2	25,17	94,08	100
<sup>23</sup> Na	3/2	7,08	26,45	100
<sup>27</sup> Al	5/2	6,97	26,06	100
<sup>29</sup> Si	1/2	5,31	19,87	4,7
<sup>31</sup> p	1/2	10,83	40,48	100
<sup>51</sup> V	7/2	7,03	26,29	99,76
<sup>87</sup> Rb	3/2	8,75	32,72	27,85

La résonance magnétique nucléaire appliquée aux matériaux diamagnétiques (liquides, solides, ou même gazeux à haute pression) est liée principalement aux moments magnétiques nucléaires individuels qui sont affectés par le phénomène de résonance. Pour bien comprendre le comportement d'un ensemble de moments magnétiques nucléaires au sein d'un échantillon macroscopique, suivons-les lors de la préparation d'une expérience de RMN.

En l'absence de champ magnétique, l'orientation des moments magnétiques nucléaires est uniformément distribuée dans l'espace. L'aimantation résultante est nulle. L'application d'un champ magnétique uniforme  $\vec{B}_0$  (dans ce mémoire nous supposons que  $\vec{B}_0$  est aligné avec

l'axe Oz du référentiel lié au laboratoire et nous appelons cette direction longitudinale),) provoque une précession de tous les moments magnétiques nucléaires autour de la direction Oz à la fréquence de Larmor  $\nu_0 = \gamma H_0 / 2\pi$ . Cette précession des moments magnétiques n'affecte pas leur distribution isotrope (dans le cadre d'une vision classique) et l'aimantation résultante reste nulle (Figure 1.16).

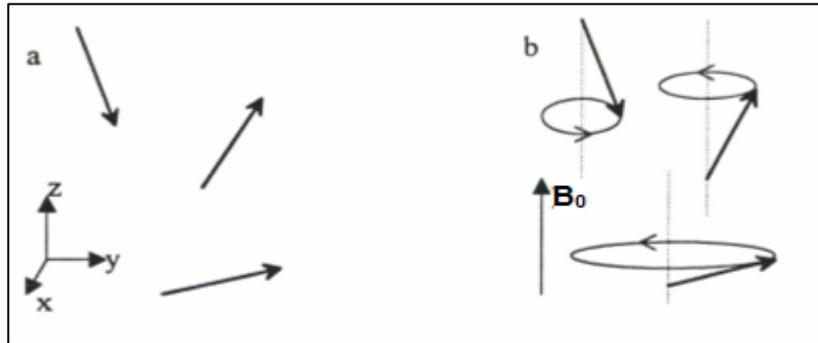


Figure 1.16 a) Distribution isotrope des moments nucléaires en l'absence de champs magnétiques. b) Application d'un champ magnétique statique  $\vec{B}_0$ , précession des moments cinétiques autour de Oz dans le cadre d'une vision classique.

Cependant une description quantique de cet état dénonce l'égalité de la population des niveaux d'énergie, ce qui ne représente pas l'état d'équilibre attendu. La distribution d'équilibre de Boltzmann entre les niveaux d'énergie est atteinte grâce à l'interaction entre les mouvements moléculaires où les vibrations thermiques du réseau et les moments magnétiques. Ainsi, il apparaît progressivement une aimantation longitudinale  $M_z$  le long de Oz, lorsque l'échantillon est placé dans le champ magnétique  $\vec{H}_0$ , dont l'évolution temporelle est décrite par :

$$M_z = M_0 \left( 1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad 1.5$$

Où  $T_1$  est appelé temps de relaxation longitudinal (ou encore spin-réseau).

L'équation 1.5 décrit l'apparition de l'aimantation macroscopique longitudinale lorsqu'un échantillon est placé dans un champ magnétique. À  $t=0$ , l'aimantation longitudinale  $M_z$  est nulle puis elle croît exponentiellement jusqu'à atteindre l'aimantation d'équilibre  $M_0$ . Fondamentalement le mécanisme de peuplement des niveaux d'énergie qui permet la croissance de l'aimantation ou de "dépeuplement" est le même (statistiquement il y a sans cesse des sauts d'énergie entre les états d'énergies dans un sens ou un autre, une aimantation

apparaîtra parce que la fréquence dans un sens sera un peu plus élevée quand dans l'autre). En d'autres termes l'équation 1.5 qui décrit la croissance de la magnétisation décrit aussi sa décroissance c'est-à-dire la relaxation.

### 2.3 Temps de relaxation transversal (T<sub>2</sub>)

L'aimantation  $\vec{M}_0$  d'un échantillon à l'équilibre dans un champ magnétique  $\vec{B}_0$  peut être manipulée à volonté grâce à des impulsions radiofréquences (RF) produites par un champ magnétique  $\vec{B}_1$  (plus faible) perpendiculaire à  $\vec{B}_0$ . Les spins sont alors animés d'un mouvement de précession autour de  $\vec{B}_1$ , ce qui va éloigner  $\vec{M}_0$  de  $\vec{B}_0$ . Cependant le champ magnétique  $\vec{B}_0$  étant présent en permanence, pendant l'application du champ  $\vec{B}_1$  l'aimantation est animée d'un mouvement de précession autour de  $\vec{B}_0$  mais aussi autour de  $\vec{B}_1$ . Le mouvement observé est donc une précession autour du champ  $\vec{B} = \vec{B}_0 + \vec{B}_1$ . Si pendant la durée de son application  $\vec{B}_1$  est fixe, alors le mouvement de précession autour de  $\vec{B}$  ne permet pas (sauf cas particulier) d'amener l'aimantation perpendiculairement à  $\vec{B}_0$ . Pour réaliser facilement cette bascule à 90° il est nécessaire que  $\vec{B}_1$  tourne autour de  $\vec{B}_0$  à la fréquence de Larmor (pour entrer en résonance) ainsi l'action de  $\vec{B}_1$  permettra d'éloigner continuellement l'aimantation de  $\vec{B}_0$ .

Il est ainsi possible, grâce à un champ  $\vec{B}_1$  tournant à la fréquence de Larmor, d'incliner l'aimantation dans le plan {Oxy}. Par ailleurs, dans une expérience de RMN c'est dans ce plan que se trouve la bobine de détection du signal (qui est aussi celle permettant de générer le champ  $\vec{B}_1$ ) l'amplitude du signal détectée sera maximale lorsque l'aimantation sera complètement basculée dans le plan {Oxy} que l'on nomme plan transversal (par rapport à  $\vec{B}_0$ ). Il est important de réaliser que dans ce plan l'aimantation a une composante transversale qui relaxe avec un temps caractéristique différent de  $T_1$  : le temps de relaxation transversale  $T_2$ .

Comme dans le cas de la relaxation longitudinale, l'évolution de l'aimantation transversale est toujours décrite par une loi exponentielle qui s'exprime par exemple dans le cas d'une séquence CPMG (voir paragraphe 3.2) par :

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad 1.6$$

### 3. Les mesures conventionnelles des temps de relaxation

#### 3.1 La séquence d'« inversion-récupération » (mesure du T<sub>1</sub>)

Il existe plusieurs manières de mesurer le T<sub>1</sub>. La plus couramment utilisée est la séquence d'inversion-récupération (*inversion-recovery*). Cette méthode remonte quasiment aux début de la découverte de la RMN. La séquence d'impulsion se compose simplement de deux impulsions espacées par un intervalle de temps variable  $\tau$ . Le signal est enregistré immédiatement après la seconde impulsion (avec une petite marge de temps mort) :

$$\pi - \tau - \frac{\pi}{2} - \text{signal} \quad 1.7$$

A un temps  $\tau$  après la seconde impulsion, le signal présente une amplitude

$$M(\tau) = M_0 \left( 1 - 2e^{-\frac{\tau}{T_1}} \right) \quad 1.8$$

Pour extraire le temps caractéristique T<sub>1</sub> il est nécessaire de répéter la séquence décrite en équation 1.7 pour différentes valeurs de  $\tau$  : { $\tau_i$ } afin d'obtenir une liste d'aimantation {M<sub>i</sub>} qui est ajustée numériquement par l'équation 1.8.

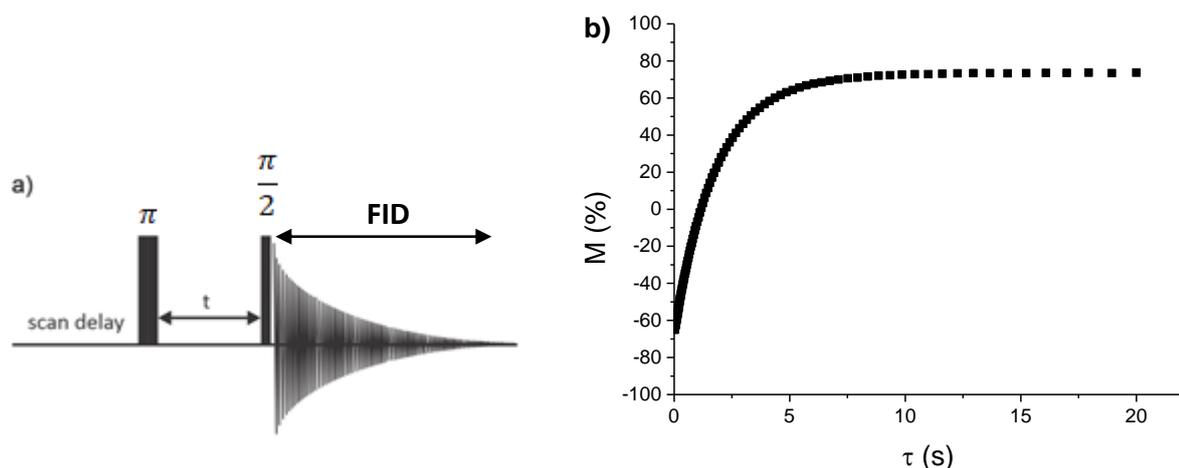


Figure 1.17 Séquence d'inversion-récupération utilisée pour déterminer le T<sub>1</sub>. Le premier pulse est de 180° et un temps  $\tau$  le sépare du second pulse à 90°. Ensuite le FID (« Free Induction Decay ») est enregistré. b) courbe de relaxation longitudinale enregistré sur un gel Ca-polyGalA.

### 3.2 La séquence CPMG (mesure du T2)

La séquence CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill) est une méthode développée pour mesurer le temps de relaxation transversale (Carr and Purcell, 1954; Meiboom and Gill, 1958). Elle consiste à effectuer une première impulsion  $\frac{\pi}{2x}$  suivie d'un train de  $n$  impulsions  $\pi_y$  selon la séquence suivante :

$$\frac{\pi}{2x} - (\tau - \pi_y - \tau - echo)_n \quad 1.9$$

Illustré par la Figure 1.18

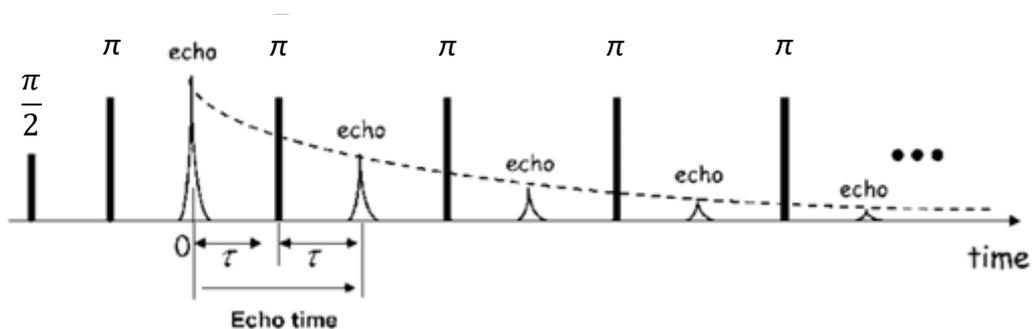


Figure 1.18 Séquence d'impulsion CPMG, une impulsion initiale à  $90^\circ$  est suivie d'écho de spin provoqué par des impulsions à  $180^\circ$  séparé d'un temps  $\tau$ .

La perturbation initiale  $\frac{\pi}{2x}$  fait basculer l'aimantation dans le plan transversal.

L'aimantation nucléaire évolue (relaxe) pendant une durée  $\tau$ . L'aimantation a un mouvement de précession autour de l'axe  $z$  dans le plan transversal en se défocalisant. La perte de cohérence résulte naturellement du fait que chaque noyau n'est pas exactement exposé au même champ magnétique, en raison, par exemple de l'inhomogénéité du champ statique, de l'écrantage électronique, de la dynamique. Chaque "aimantation nucléaire" ne précesse pas exactement à la même pulsation.

A l'instant  $\tau$ , un second pulse  $\pi_y$  est appliqué, provoquant une rotation de  $180^\circ$  de l'aimantation autour de la direction  $Oy$ . Etant donné que la précession de Larmor s'effectue toujours dans le même sens, les "aimantations nucléaires" en avance se retrouvent en retard, et vice versa.

Après d'un nouvel intervalle  $\tau$ , une partie des aimantations nucléaires individuelles se regroupent (se refocalisent) et une partie du signal se reconstruit donnant naissance à un écho à l'instant  $\tau$ . L'intensité de cet écho ne dépend plus des processus réversibles de déphasage, et l'amplitude du signal à l'instant  $\tau$  est gouverné par le temps de relaxation  $T_2$  :

$$M(\tau) = M_0 \cdot e^{-\frac{\tau}{T_2}} \quad 1.10$$

Ensuite la séquence CPMG se compose d'une série de  $(2n+1)$  impulsions  $\pi_y$  qui produisent autant d'échos aux instants  $2n\tau$  ( $n>0$ ) dont l'évolution globale est décrite par l'équation 1.10.

### 3.3 Distribution des temps de relaxation

Les descriptions précédentes supposent une unique valeur de  $T_1$  ou  $T_2$ . Cependant, à l'échelle macroscopique, on peut se demander si une description utilisant un seul temps de relaxation (une évolution monoexponentielle du signal) est pertinente. Cette hypothèse est généralement très satisfaisante pour les liquides en raison du mouvement brownien des molécules d'eau (Brownstein and Tarr, 1979a; Gomes et al., 2016). En effet, durant le temps de l'expérience, les protons de l'eau ont des mouvements aléatoires qui permettent une relaxation uniforme à l'échelle macroscopique. C'est pourquoi dans cette thèse les solutions sont usuellement analysées grâce à une régression monoexponentielle des courbes de relaxation. Cependant, cette simplification n'est plus valable pour les gels. Ces derniers peuvent être considérés comme des structures composées de nombreux petits compartiments d'eau libre séparée par les fibres de polysaccharide qui agissent comme des barrières (murs). Ces compartiments que l'on peut considérer comme des cellules de relaxation ralentissent la diffusion de l'eau. Selon la taille de la cellule, le temps de relaxation varie considérablement d'un point à l'autre dans le gel. Il est donc pertinent de parler de plusieurs populations de temps de relaxation. Les populations peuvent alors être estimées grâce à une distribution statistique des valeurs des temps de relaxation. De telle distribution peut être obtenue par des logiciels spécialisés comme UPEN (© 2012 Alma Mater Studiorum – *Università di Bologna*). Ce logiciel est largement décrit dans la littérature (Borgia et al., 2000; G.C. Borgia et al., 1998; G.C Borgia et al., 1998). UPEN utilise un algorithme basé sur l'inversion de Laplace. À partir des résultats expérimentaux, le logiciel est capable d'obtenir des distributions discrètes des temps de relaxation. Chaque amplitude correspond à la population de l'assemblée de proton relaxant avec le temps de relaxation associé.

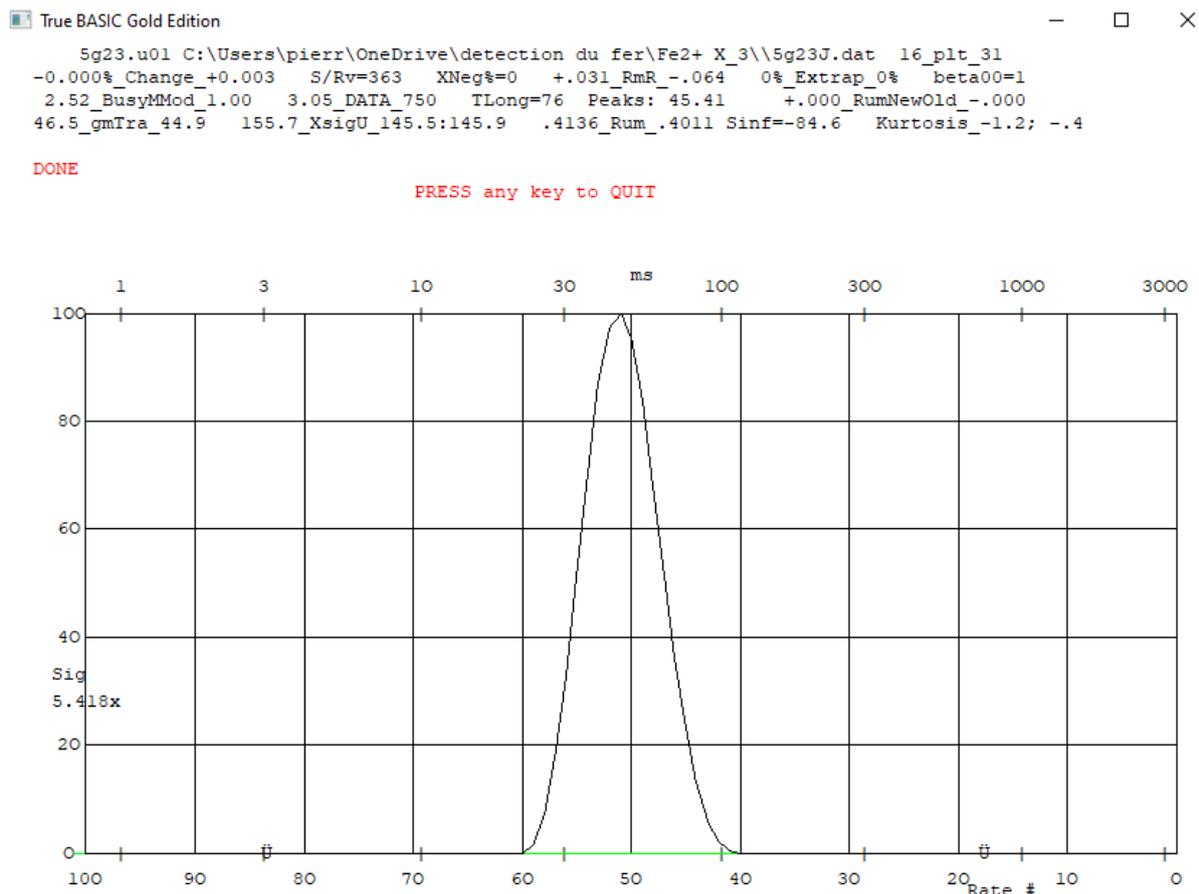


Figure 1.19 Exemple d'un traitement UPEN sur un gel Fe(II)-polyGalA une distribution des temps de relaxation de 25 à 100 ms est observé sur l'échelle logarithmique du haut.

## 4. Les mesures par RMN à cycle de champs rapide (FFC-NMR)

### 4.1 Description de la FFC-NMR

La FFC-RMN a principalement été développée pour la mesure de  $T_1$ , bien que la mesure de  $T_2$  soit également possible. Dans cette discussion, nous nous concentrerons sur les mesures de  $T_1$ . Cette technique est la seule à pouvoir évaluer les variations des temps de relaxation longitudinale sur une large gamme de fréquence, le tout sur un seul instrument. Ce type d'expérience produit des profils RMN de diffusion (RMND, NMRD). Les profils de diffusion peuvent être obtenue de deux principales façons : soit par des variations de température (dans ce cas, on peut travailler à champ magnétique fixe), mais cette approche est inadaptée à l'étude des gels qui ne sont stables que sur une plage restreinte de température, soit des variations de fréquences du champ magnétique. Les deux approches ne sont pas équivalentes et il est également possible de combiner les variations de température et de fréquence.

Le relaxomètre que nous avons utilisé dispose d'un électroaimant (solénoïde) dont la fréquence du champ magnétique peut varier de quelques kHz à 42 MHz environ. La grande versatilité de l'électroaimant permet de modifier rapidement le champ magnétique appliqué ce qui permet de réaliser des expériences de relaxométrie à cycle de champs rapide (Fast Field Cycling, FFC). Un des principaux avantages de la FFC-NMR est la possibilité de changer le champ sans mouvement de l'échantillon vers un autre aimant statique. Dans cet appareil, le temps de transition entre deux fréquences est de l'ordre de 3 ms (en dessous de cela, il existe un risque élevé de problèmes électroniques liés à l'instabilité de champ). Ce temps reste considérablement plus court que d'autres alternatives qui nécessitent un déplacement physique (automatisé ou non) de l'échantillon vers un autre aimant (Steele et al., 2016)

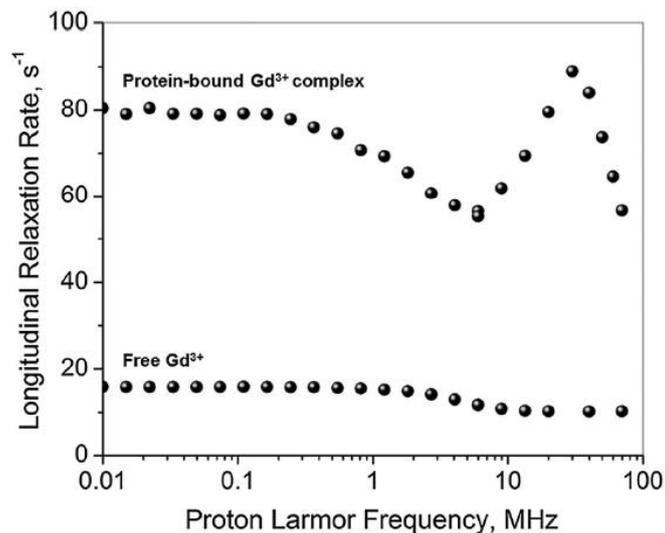


Figure 1.20 Exemple de profils proton obtenues par FFC-NMR. Deux profils sont présentés, le premier correspond à un paramagnétique ( $Gd^{3+}$ ) lié à une protéine (*protein-bound  $Gd^{3+}$  complex*) et le deuxième à une solution de gadolinium (*Free  $Gd^{3+}$* ). La liaison à une protéine augmente le taux de relaxation, ce qui est un aspect intéressant pour le développement d'agent de contraste IRM (Conte, 2019).

Lors de l'enregistrement d'un profil de relaxation, le  $T_1$  est mesuré à plusieurs fréquences (voir l'exemple dans la Figure 1.20) en utilisant principalement deux types de séquences que nous présenterons ci-dessous. La modélisation des profils permet d'accéder à la dynamique moléculaire sur une très large gamme de temps, allant de  $10^{-6}$  à  $10^{-12}$  s, pour des champs de 1 kHz à 1 GHz). Le champ d'application de la FFC-NMR est extrêmement vaste, couvrant des phénomènes comme la dynamique des fluides aux interfaces solide-liquide, le transport dans des milieux poreux, l'hydratation des protéines, les tissus biologiques et les membranes, la

mobilité des polymères, l'études des sols (Conte, 2019), des sédiments, des ciments (Steele et al., 2016) et plus récemment dans l'analyse d'aliments (Kruk et al., 2021a, 2021b; Pohan et al., 2021). Le constructeur principal de la FFC-RMN en Europe, Stellar, cite au moins 13 utilisations différentes de la FFC-NMR dans son introduction à la méthode (Stelar, consulté en 2022). La FFC-NMR est donc une branche relativement jeune de la RMN (le premier modèle commercial a été distribué en 1997), mais qui connaît aujourd'hui une grande dynamique tant sur le plan académique qu'industriel.

## 4.2 La séquence de pré-polarisation

Pour des fréquences inférieures à 10 MHz, les séquences permettant d'obtenir les  $T_1$  nécessitent une étape de pré-polarisation (PP, Figure 1.21). Dans ce cas de figure, un champ magnétique de polarisation ( $B_{pol}$ ) suffisamment intense (typiquement 20 MHz) est appliqué afin d'obtenir une aimantation initiale importante.

Un second champ magnétique de relaxation ( $B_{rlx}$ , de quelques kHz jusque  $\sim B_{pol}$ ) est maintenu pendant un temps  $\tau$  ou la relaxation a lieu. Ensuite le champ magnétique bascule vers un champ de détection (ou d'acquisition,  $B_{Acq} \sim 16 \text{ MHz}$ ). Après une impulsion à  $\pi/2$ , le signal est enregistré.

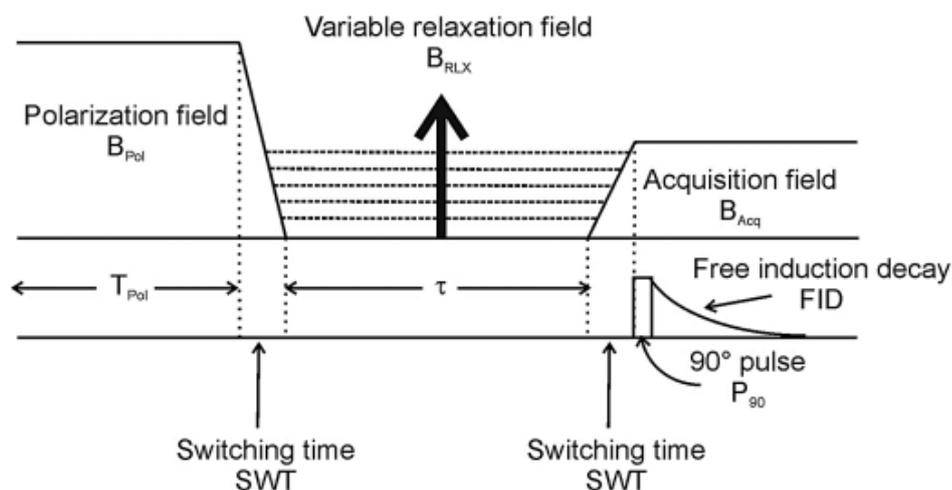


Figure 1.21 Séquence de pré-polarisation. Le champ de pré-polarisation  $B_{pol}$  est appliqué, le champ est ensuite changé à un champ d'acquisition plus faible  $B_{rlx}$ . Le champ  $B_{rlx}$  est maintenu pendant un temps  $\tau$  jusqu'à un changement du champ vers le champ d'acquisition ou une impulsion de lecture ( $\pi/2$ ) est appliquée. SWT représente le temps ( $\sim 3 \text{ ms}$ ) nécessaire au passage d'un champ à un autre (d'après Conte, 2019).

Afin de discrétiser la courbe de relaxation dans le champ  $B_{RLx}$ , la séquence PP précédente est répétée pour plusieurs valeurs de  $\tau \sim (16, 32, 64, \dots)$ . Puis pour avoir une signature dynamique, l'ensemble du processus est répété pour plusieurs valeurs du champ de relaxation, telles que 36, 48, etc. Il n'y a pas de limite au nombre de valeur de  $\tau$  ou de champ de relaxation utilisés, sauf la contrainte de la durée expérimentale.

La courbe de relaxation générée au champ  $B_{RLx}$  est décrite par:

$$M(\tau, B_{RLx}) = M_{RLx} + (M_{pol} - M_{RLx}) \exp\left(-\frac{\tau}{T_1(B_{RLx})}\right) \quad 1.11$$

Où  $M_{RLx}$  est la magnétisation d'équilibre dans le champ de relaxation et  $M_{pol}$  est la magnétisation générée dans le champ de polarisation.

### 4.3 La séquence non-pré-polarisée

Lorsque le champ de relaxation approche la fréquence du champ de pré-polarisation choisi, alors la séquence de pré-polarisation n'est plus nécessaire. La séquence non-pré-polarisée (NP) est alors semblable à la séquence PP, mais n'inclut plus l'étape  $B_{pol}$  (Figure 1.22).

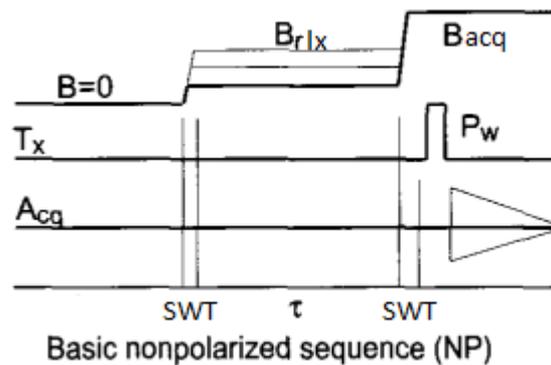


Figure 1.22 Illustration de la séquence sans pré-polarisation. La séquence débute sans champ magnétique de polarisation. Un champ de relaxation est appliqué ( $B_{rlx}$ ) pendant un temps  $\tau$  ensuite le FID est enregistré après une impulsion et basculement vers le champ d'acquisition  $B_{acq}$ . (d'après Anoardo et al., 2001)

L'expérience se réduit à une simple montée de polarisation (Figure 1.21) et la courbe de relaxation est décrite par l'équation 1.5.

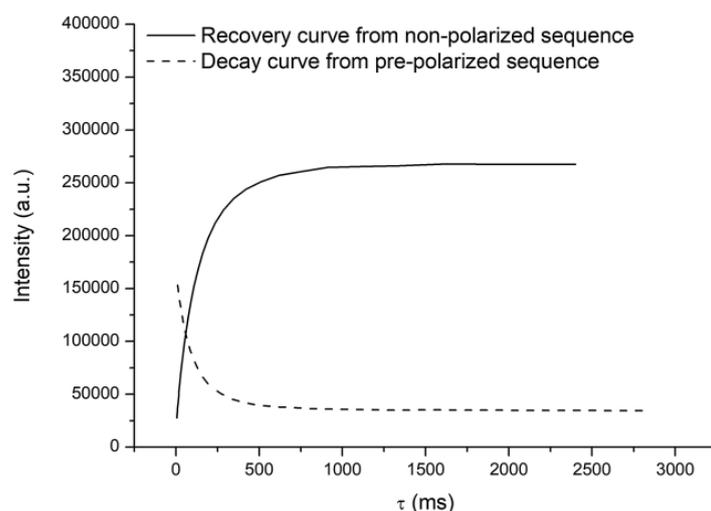


Figure 1.23 Exemple de courbe de relaxation obtenue par la séquence de prépolarisation (ligne pointillée) et par séquence sans prépolarisation (ligne continue) (Conte, 2019)

### III. Conclusion :

Ce premier chapitre permet d'introduire deux aspects fondamentaux de cette thèse, à savoir : la physico-chimie des hydrogels et la relaxation par résonance magnétique nucléaire.

Les mécanismes de gélification des polysaccharides anioniques ont été abordés et décrits, notamment en ce qui concerne la réticulation avec des ions tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  et enfin  $\text{Mg}^{2+}$ . La capacité des gels à retenir des cations est entre autres une propriété d'intérêt, car la plupart des ions font partie des micronutriments indispensables à la physiologie humaine. Dans le volet RMN, les relaxations longitudinales ( $T_1$ ) et transversales ( $T_2$ ) sont présentées classiquement et les séquences d'impulsion utilisées pour les mesures sont rappelées (inversion recovery et CPMG respectivement). Nous avons conclu la discussion sur la RMN en présentant la FFC-NMR, une technique particulièrement intéressante pour étudier la dynamique moléculaire dans les hydrogels. Ce sujet sera traité plus en détail dans des travaux originaux dans le chapitre 3.

Les principaux paramètres d'intérêt des hydrogels, comme les propriétés mécaniques, la taille de réseaux, la concentration en polymère et en agents réticulants, ont été décrits et mis en relation avec les capacités technologiques des gels. Nous avons également abordé les capacités de libération de substances actives de différentes tailles. Dans le chapitre 4, nous

examinerons comment la RMN peut être utilisée pour étudier la taille du réseau dans des hydrogels à base de polyGAL.

Parmi les micronutriments qu'on souhaite encapsuler et protéger, on retrouve le  $\text{Fe}^{2+}$ . Ce dernier est un micronutriment biodisponible utilisé pour traiter la carence en fer. La capacité de l'acide polygalacturonique à fixer le  $\text{Fe}^{2+}$  et à le protéger contre l'oxydation est établie (Maire du Poset et al., 2018). Nous utiliserons la relaxométrie pour déterminer la teneur en  $\text{Fe}^{2+}$  et différencier  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  dans le gel (chapitre 5).



## Chapitre 2 Matériels et méthodes

### I. Préparation des solutions de polyGalA et de cation de réticulation

Une solution d'acide polyGalA est préparée à partir d'une poudre commerciale achetée chez Sigma-Aldrich (pureté ~90%). Une quantité de poudre correspondant à une concentration finale de 20g/L de polyGalA ( $M_{polyGalA} \cong 80 \text{ kDa}$ ) est pesée. Elle est ensuite solubilisée dans une solution de NaCl 10 mM puis le pH est ajusté à une valeur égale à 5,5. Il faut noter qu'il est important de maintenir un pH supérieur au pKa du polyGalA (pKa = 3,4) pour assurer une bonne solubilisation de ce dernier. Le polyGalA est laissé sous agitation (pendant au moins 30 minutes) pour assurer une hydratation complète. Ensuite le pH est progressivement réajusté à 5,5 favorisant ainsi la solubilisation totale du polyGalA. La solution de polyGalA obtenue est finalement dialysée 3 fois pendant 2h (en utilisant une membrane avec un seuil de coupure égal à 3,5 kDa) contre une solution de NaCl 10mM pH 5,5. Cela permet d'éliminer les impuretés présentes dans la poudre de polyGalA et garantir une force ionique fixe.

Les diverses solutions de cations réticulants sont préparées à partir de  $\text{CaCl}_2$  (pureté > 95%, lot 1123415, Fluka (Sigma Aldrich), St louis MO),  $\text{ZnCl}_2$  (pureté  $\geq 98\%$ , lot B634516 508, Sigma-Aldrich, St louis MO),  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (pureté  $\geq 99\%$ , lot BCCB5177, Sigma-Aldrich, St louis MO) ou  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (pureté  $\geq 99\%$ , lot STBH8927, Sigma-Aldrich, St louis MO). Les sels sont solubilisés dans une solution de NaCl 10 mM. Les solutions sont formulées en pesant précisément une masse de sel permettant d'obtenir une concentration des solutions d'ions réticulants égale à 50 mM. Les solutions de  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{ZnCl}_2$  ont été ajustées à pH 5,5. Les solutions à base de fer ne sont pas ajustées en pH, car un ajout de NaOH favorise la précipitation d'oxydes de fer non solubles, les sels sont donc dissous simplement dans la solution de NaCl 10 mM pH 5,5.

#### *Dégazage des solutions polyGalA et $\text{FeCl}_2$ :*

Dans le cas de la formulation des gels avec des ions  $\text{Fe}^{2+}$ , il est important de minimiser la concentration en dioxygène dissous dans les solutions ainsi que dans les solutions de polyGalA. Des protocoles de dégazage ( $\text{N}_2$ ) ont été mis en place et les durées nécessaires pour éliminer le dioxygène ont été explorées. A cet effet, nous avons utilisé l'azote ( $\text{N}_2$ ) pour cette

opération. Ces expériences ont été réalisées dans un flacon avec bouchon adapté qui permet de placer une arrivée d'azote, une sortie d'air et un emplacement pour la sonde de l'oxymètre. Pour cela, nous avons, à l'aide d'une imprimante 3D (discovery 200, Dagoma), réalisé ce bouchon basé sur le modèle GL45 en utilisant le logiciel Fusion360 (Figure 2.2). Le bouchon a été fabriqué à l'aide de deux polymères (acrylonitrile butadiène styrène et en acide polylactique plus communément appelé ABS et PLA).

Le modèle (Figure 2.2) est mis à disposition gratuitement sur le site internet Thingiverse (<https://www.thingiverse.com/thing:5775856>). L'oxymètre utilisé est un modèle Portavo 904 Oxy de Knick. La Figure 2.1 présente les cinétiques de dégazage et de reprise d'oxygène de solutions de NaCl 10 mM sous parafilm ou à l'air libre.

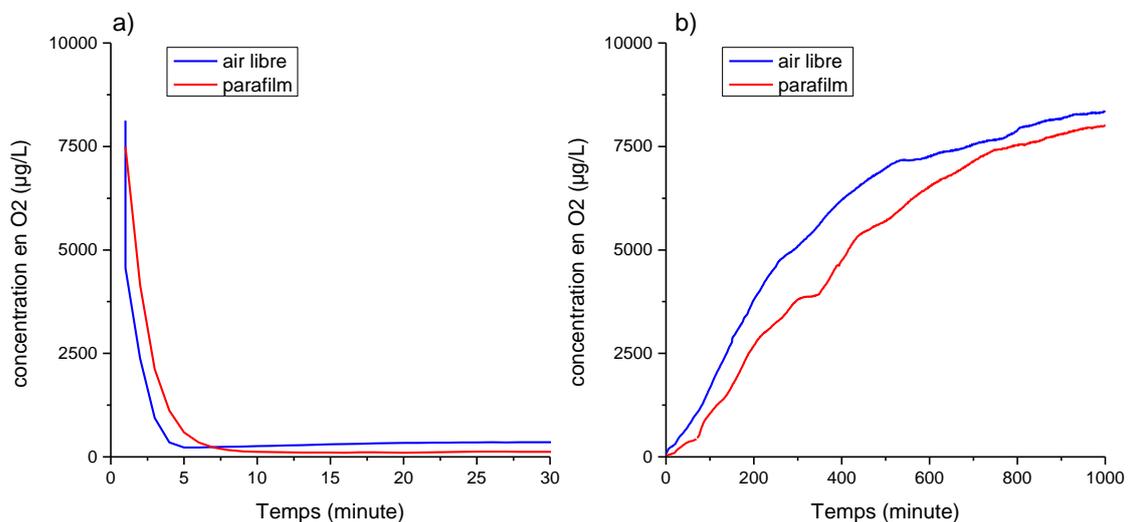


Figure 2.1 a) cinétique de dégazage. b) temps de retour à une oxygénation normale d'une solution NaCl 10mM à l'air libre ou sous parafilm.

La Figure 2.1 a) montre que la concentration en O<sub>2</sub> est quasiment nulle (< 0,03 mg/l) à partir de 5 minutes de dégazage pour les tubes sans parafilm. Pour les tubes couverts de parafilm, ce plateau est atteint à partir de 10 minutes. Ceci est certainement dû à un échange et à une circulation des gaz (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) impactés par la présence de parafilm. Néanmoins, une concentration plus faible semble être atteinte aux temps longs. Au bout de 30 minutes de dégazage, la reprise en O<sub>2</sub> a été mesurée (Figure 2.1 b). Le regain en oxygène est relativement lent et s'étale sur plus de 16h. Au cours de l'ensemble des manipulations, les échantillons ne sont exposés à l'air libre que pendant quelques minutes au maximum, et nous estimons que la concentration d'O<sub>2</sub> dissous reste très faible.

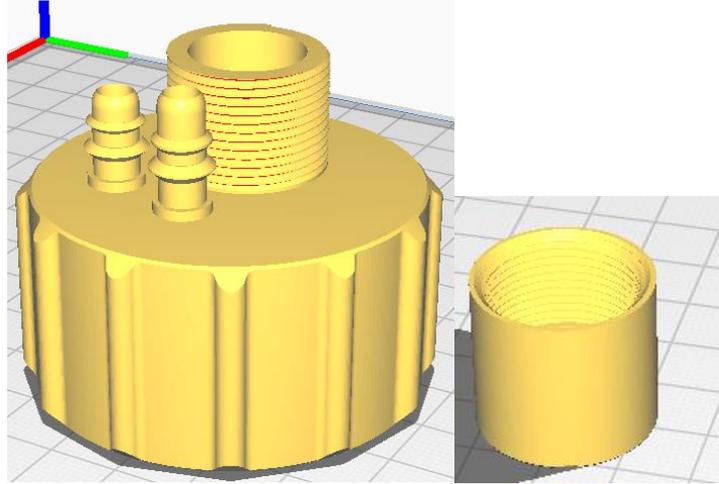


Figure 2.2 Modèle 3D imprimé pour le dégazage

## II. Fabrication des gels à base de polyGalA

### *Gélification externe*

Dans un premier temps, un tube de RMN ( $\phi_{interne}: 6mm$ ) ouvert aux deux extrémités a été utilisé. Une des extrémités de ce tube a été couverte d'une membrane de dialyse (seuil de coupure 3,5 kDa). Ensuite, la solution de polyGalA préparée précédemment est versée dans ce tube. Un volume correspondant à une hauteur de 1 cm (284  $\mu$ L) est versé dans le cylindre. Le volume de la solution de diffusion est ajusté à 100 fois le volume de polyGalA soit environ 30 mL. Le tube contenant la solution de polyGalA est ensuite plongé dans la solution contenant les cations de réticulation de telle sorte que le niveau de la solution de réticulation soit identique à la solution de polyGalA. Les cations peuvent alors diffuser à travers la membrane de dialyse vers la solution de polyGalA. Le polyGalA ayant une masse moléculaire plus grande que le seuil de coupure de la membrane de dialyse, il reste dans le tube de dialyse et forme un gel lors de la diffusion des cations de réticulation. Au bout de 24 h de diffusion, un gel est récupéré. Ce protocole est valable pour les gels à base de  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Fe^{3+}$ . Pour le  $Fe^{2+}$  des précautions supplémentaires sont prises afin d'éviter son oxydation en  $Fe^{3+}$  (Figure 2.3).

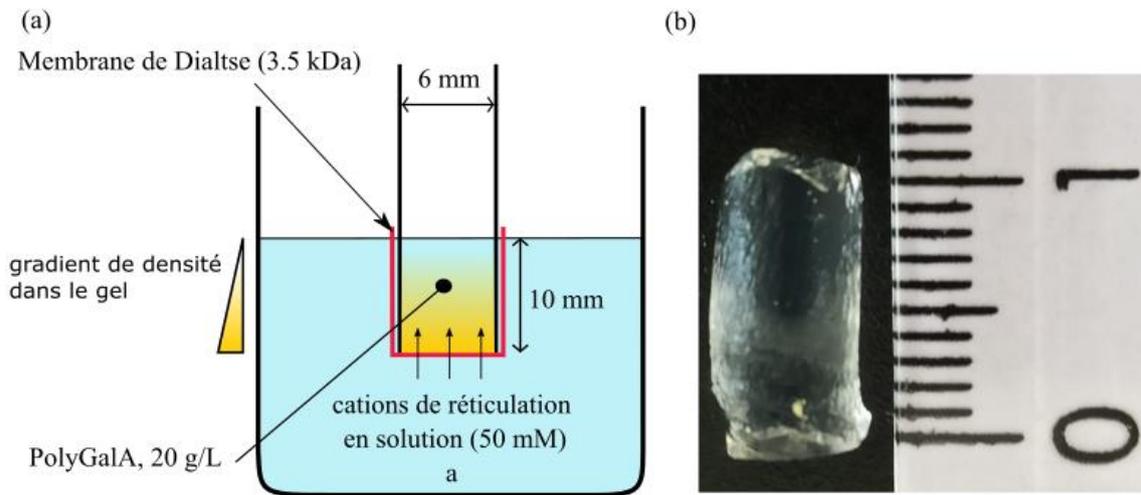


Figure 2.3 (a) Schéma d'une gélification externe (b) photo d'un gel Ca-polyGalA obtenue par la méthode présentée en (a)

### *Gestion de l'oxydation du fer*

Les gels Fe(II)-polyGalA nécessitent un traitement particulier pour prévenir une éventuelle oxydation du fer. Un dégazage est effectué pour toutes les solutions, (FeCl<sub>2</sub>, polyGalA et eau distillée utilisée pour hydrater la membrane de dialyse). Le montage de la Figure 2.3 est maintenu sous atmosphère inerte pendant l'étape de gélification (24 h) par l'entremise d'un ballon de baudruche gonflé à l'azote. (Figure 2.4).

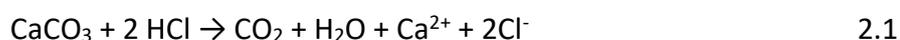


Figure 2.4 Montage avec ballon de baudruche gonflé à l'azote.

Pour minimiser l'exposition du gel à l'oxygène (atmosphérique), le tube RMN est rempli d'azote puis fermé par un capuchon classique. Dans tous les cas, les mesures sont immédiatement réalisées après la formation du gel.

### *Gélification interne*

La gélification interne utilise la même solution de polyGalA précédemment décrite. La source du cation est cependant différente. Le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) (pureté  $\geq 98\%$ , lot B634516 508, Sigma-Aldrich, St Louis MO) est utilisé comme source de cations. Les gels internes ne sont formulés que pour l'ion calcium ( $\text{CaCO}_3$ -polyGalA). Le  $\text{CaCO}_3$  est un composé insoluble qui peut se dissocier en présence d'acide selon la réaction suivante :



Cependant la solution de polyGalA est ajustée à pH 5,5, dans ces conditions le  $\text{CaCO}_3$  se dissocie lentement. Il est nécessaire d'ajouter un acidifiant pour accélérer la réaction et garantir une distribution homogène des ions calcium. L'acidification lente du milieu est assurée par l'ajout de Glucono-Delta-Lactone (GDL). Le  $\text{CaCO}_3$  est ajouté à la solution de polyGalA de manière à avoir un ratio molaire ( $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{GalA}]$ ) égale à 0,5. La GDL est quant à elle est ajoutée en quantité deux fois supérieure (mol à mol) au  $\text{CaCO}_3$ . Ainsi au bout d'environ 30 minutes, un gel est obtenu.

### *Gel deutéré*

Dans certaines expériences, nous avons formulé des gels deutérés (Chapitre 3). Ces derniers ont été préparés suivant le protocole de gélification externe. Le polyGalA et le  $\text{CaCl}_2$  ont été dissous dans de l'eau lourde ( $\text{D}_2\text{O}$ ) pure. 50 mL de solution d'eau lourde  $\text{CaCl}_2$  ont été mis à dialyser contre 284  $\mu\text{L}$  de polyGalA- $\text{D}_2\text{O}$ . Une mesure contrôle a été effectuée permettant de montrer que les signaux RMN des protons provenant des protons non échangeables du polyGalA peuvent être négligés.

### III. Caractérisation des hydrogels

#### *Matière sèche*

La quantité de matière sèche du gel permet de quantifier la proportion de polysaccharide dans le gel par rapport à la quantité d'eau. Pour ce faire, le gel frais est initialement pesé, puis placé dans une étuve réglée à 70°C pendant au moins 6 heures. Cela permet une évaporation totale de l'eau, (en particulier pour des gels de moins de 0,5 ml de volume). A l'issue de la déshydratation la matière sèche résiduelle est pesée.

La matière sèche se compose du polysaccharide de sodium, chlore et du métal de réticulation. Ici, on considère que la masse des éléments atomiques est négligeable par rapport à celle du polysaccharide, ce qui permet de considérer que la masse de la matière sèche est égale à la masse du polysaccharide.

La fraction de matière sèche ( $\chi$ ) est donc la masse de la matière sèche ( $M_s$ ) sur la masse initiale du gel frais ( $M_i$ )

$$\chi = \frac{M_s}{M_i} \quad 2.2$$

#### *Propriétés viscoélastiques des hydrogels*

Les mesures des propriétés viscoélastiques des hydrogels ont été effectuées sur un rhéomètre dynamique MCR 302 Anton Paar. Le principe de la méthode est présenté sur la Figure 2.6 Une géométrie plan-plan a été utilisée pour l'ensemble des mesures. Cela signifie que le gel est placé entre deux surfaces planes : le support et la sonde. La sonde utilisée est une sonde cylindrique en aluminium de diamètre 5 mm. Le gel analysé étant un cylindre plus haut que large (Longueur 10 mm, largeur 6 mm) il est nécessaire de le découper en plusieurs tranches pour pouvoir le stabiliser entre les deux plans du rhéomètre. Le gel est tranché en utilisant une plateforme à découpe modélisée en 3D sur le logiciel Fusion 360 ( Figure 2.5). La plateforme permet une maîtrise relative des épaisseurs des tranches. Le gel est découpé en 4 tranches d'environ 2,5 mm d'épaisseur. La valeur exacte de l'épaisseur est obtenue grâce au logiciel du rhéomètre.

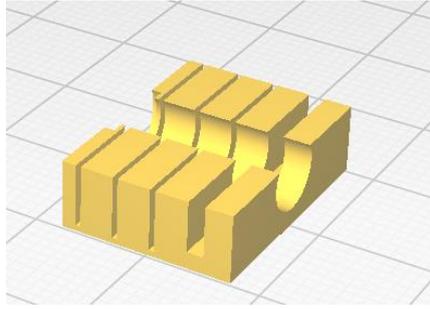


Figure 2.5 plateforme de découpe utilisée pour découper les gels (modèle 3D). Une lamelle de microscope sert de tranchant.

Dans un premier temps, un balayage en fréquence (de cisaillement) est effectué sur chaque gel (Ca-polyGalA, Zn-polyGalA, CaCO<sub>3</sub>-polyGalA) et sur chaque tranche afin de s'assurer qu'il existe bien un domaine de linéarité viscoélastique (ou LVR, *Linear viscoelastic region*). Une fréquence est choisie dans le domaine de linéarité (0,1 kHz) et ensuite un deuxième balayage avec différentes contraintes de cisaillement est effectué. Le régime LVR est recherché pour chacun des gels et une contrainte commune dans chacun (des gels) des LVR est choisie (0,0126% de déformation). Les modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) ainsi que le module de Young ( $E=3G'$ ) sont alors comparés pour chaque tranche des gels à 0,1 kHz pour 0,0126% de déformation.

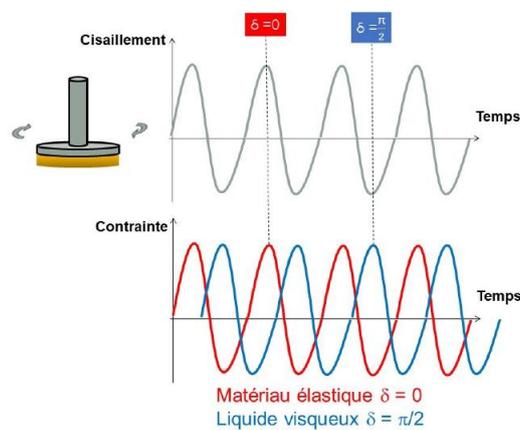


Figure 2.6 Principe d'une expérience de rhéologie dynamique

#### **IV. Dosage des cations dans les gels : Spectroscopie d'absorption atomique**

Chaque élément métallique possède des bandes d'absorption spécifique lorsqu'il est atomisé. C'est un principe remontant à Sir Isaac Newton, qui a révélé comment séparer les différentes longueurs d'onde de la lumière en utilisant un prisme, et à Gustav Kirchhoff qui a découvert que des sels métalliques brûlés présentaient une absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

La spectrométrie d'absorption atomique par four graphite (GFAAS) (que nous appellerons, plus simplement SAA) est une technique de spectroscopie utilisée pour l'analyse et la quantification d'éléments chimiques. Cette méthode utilise une source lumineuse polychromatique. A l'aide d'un jeu de miroirs et de prismes, l'appareil sélectionne une longueur d'onde correspondant à la différence entre un niveau d'énergie excité et fondamentale ( $\Delta E = h\nu$ ) de l'élément à quantifier. L'échantillon est placé dans un four graphite capable d'atteindre des températures élevées (jusqu'à 3000°C en quelques secondes, avec des rampes de température atteignant 500°C/s) permettant une atomisation complète de l'élément à analyser. L'absorbance des atomes est mesurée et la concentration atomique est déduite à l'aide de la loi de Beer-Lambert, préalablement établie à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Figure 2.7).

Le spectromètre d'absorption atomique contrAA 600 à four, développé par Analytik-Jena, est utilisé dans ces travaux pour la quantification du fer. Afin d'éviter la saturation du signal (bande d'absorption primaire), la mesure de concentration est réalisée dans la plage de 1 à 100 µg/L. Les solutions de fer analysées (contenant jusqu'à quelques g/L de fer) sont diluées dans l'acide nitrique à 0,5%. Pour réduire les erreurs de pipetage et minimiser les erreurs de dilutions, toutes les étapes de dilutions sont pesées grâce à une balance de haute précision ( $d = 0,01$  mg). Pour la plupart des solutions concentrées en fer des facteurs de dilution de 100 000 à 1 000 000 peuvent être nécessaires. Les volumes des solutions sont dilués en deux étapes.

Pour les gels analysés, une étape de minéralisation est nécessaire afin de détruire les macromolécules et faciliter la pyrolyse et l'atomisation du fer. Pour ce faire le gel est pesé, et

puis déposé dans une solution d'acide nitrique à 65% préalablement pesée pour prendre en compte une première dilution. Le gel dans l'acide est alors placé dans une enceinte thermostatée à 65°C pour une minéralisation pendant une nuit. De la même manière que pour les solutions, la solution de gel minéralisé est diluée dans l'acide nitrique 0,5% (Acide nitrique 65%, Suprapur®, Superlco (Sigma-Aldrich), St louis MO et eau ultrapur) en deux étapes, jusqu'à obtenir une concentration dans le domaine de mesure de l'appareil. Une calibration est effectuée grâce à une solution commerciale de Fer à 1 g/L (Certipur®, lot HCO 2468981, Superlco (Sigma-Aldrich), St louis MO) diluée à 50 µg/L et une courbe de calibration est établie (Figure 2.7).

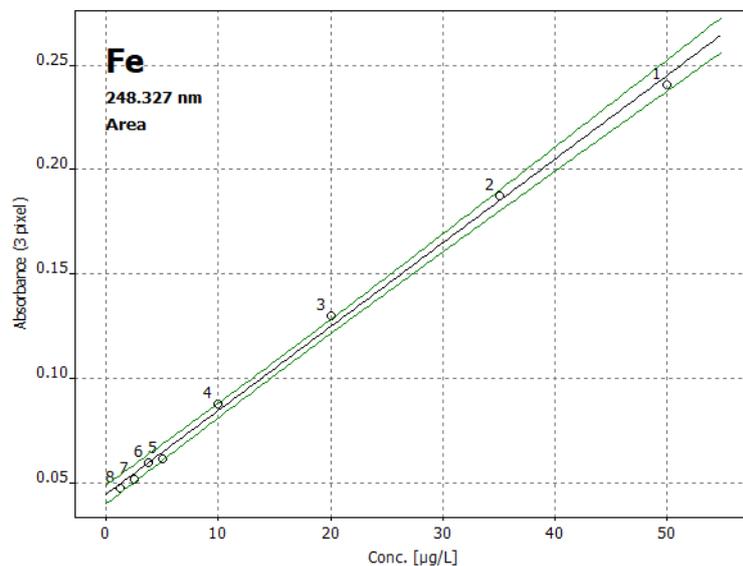


Figure 2.7 Courbe de calibration expérimentale pour le Fer à une longueur d'onde de 248,327 nm de 0 à 50 µg/L. Les dilutions sont obtenues à partir d'une solution commerciale de Fer à 1 g/L.

## V. Relaxométrie RMN

### *Minispec*

Un spectromètre de paillasse minispec MQ20 fonctionnant à une fréquence de proton Larmor de 19,6 MHz, a été utilisé. La mesure de  $T_1$  est effectuée grâce à une séquence d'*inversion-recovery* (Chapitre 1)3). Pour les échantillons diamagnétiques, les temps de relaxation sont de l'ordre de 1 à 3 secondes. Pour les échantillons paramagnétiques à base de fer, les temps de relaxation sont plus courts (1-100 ms). Pour les échantillons liquides, le temps de recyclage est ajusté à 6 fois la valeur de  $T_1$ . Dans le cas des gels, il existe une distribution de temps de

relaxation, le temps de recyclage est alors ajusté par rapport à la valeur maximale de  $T_1$  de la distribution. Pour les gels diamagnétiques le temps de recyclage est fixé à 20 secondes, une valeur qui peut sembler surestimée, mais qui permet de ne pas saturer les composantes ayant un temps de relaxation très long. Pour les gels contenant des paramagnétiques, le temps de recyclage est significativement plus court (de l'ordre de quelques secondes ou moins) car les temps de relaxation sont petits. Les valeurs de  $\tau$  (espacement entre les deux impulsions) sont également ajustées en fonction des valeurs de  $T_1$  attendues. Les solutions sont enregistrées avec 20 points et 4 scans, tandis que les gels sont enregistrés avec 128 points et 16 scans.

Enfin, un facteur de gain électronique est ajusté pour amplifier le signal. Lorsque l'on souhaite comparer l'amplitude des signaux provenant de différentes expériences, en l'absence de référence interne, l'amplitude de ces signaux doit être normalisée par le gain. Pour évaluer l'impact du gain, une solution de référence de  $\text{FeCl}_3$  à 100 mM a été formulée et placée dans un tube RMN scellé. Des courbes de relaxation de la solution sont mesurées pour plusieurs gains et la magnétisation au plateau et représentée en fonction du niveau de gain (Figure 2.8). La courbe obtenue est ensuite ajustée et l'équation obtenue ( $y=0,003e^{\text{gain}/8,76}$ ) permet de normaliser les populations par le gain.

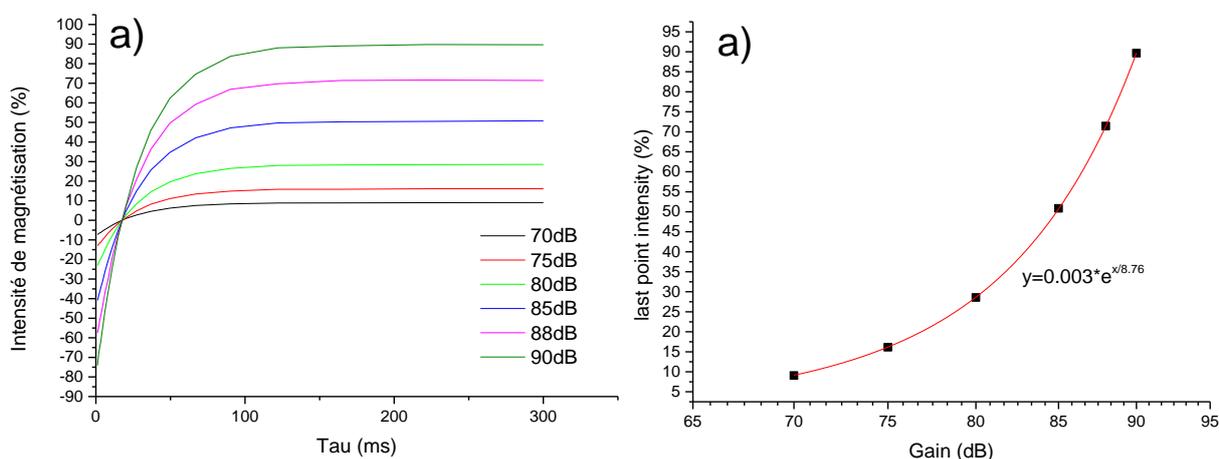


Figure 2.8 a) Courbes de relaxation obtenues pour différents gains pour une solution 100mM de  $\text{FeCl}_3$  b) Courbe de normalisation obtenue.

### Relaxométrie à cycle de champs rapide (FFC-NMR)

Deux appareils semblables ont été utilisés pour cette thèse. Un relaxomètre spinmaster FFC2000 ayant un champ maximal de 1 Tesla (42 MHz) situé à l'institut polonais de physique

moléculaire (IFMPAN) à Poznań, et un deuxième relaxomètre spinmaster « duo » FFC2000 situé dans notre laboratoire à Dijon. Les séquences utilisées sont présentées au chapitre 1. De la même manière que sur le minispec, le temps de recyclage entre deux mesures est fixé par rapport à la valeur de  $T_1$  attendu (6 fois  $T_1$ ). Les profils sont généralement mesurés avec 42 points espacé logarithmiquement de 1 KHz à 20 MHz avec une fenêtre spectrale de 10 MHz. Les conditions expérimentales sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2.1 : Conditions expérimentales des expériences de FFC-NMR

Type d'échantillons	Température (°C)	Nombre de scans	Bpol (MHz)	Bacq (MHz)	Longueur du pulse $\pi/2$ ( $\mu\text{s}$ )
Ca-G ( $^1\text{H}$ )	25	8	20-24	16	10
Zn-G ( $^1\text{H}$ )	25	8	24	16	10
Ca-G-D <sub>2</sub> O ( $^2\text{H}$ )	25	16	3,84	5,53	31



# Chapitre 3 Dynamique de l'eau dans un gel de polygalacturonate : nature et origine

## Introduction

La dynamique de l'eau dans un gel est de prime importance. En effet que ce soit pour une utilisation dans le domaine pharmaceutique ou alimentaire, l'eau contenue dans le gel agit la plupart du temps comme le solvant contenant la substance active. Cette substance active peut prendre différentes formes telles que des bactéries, des protéines, des peptides ou des vitamines ; mais aussi des micronutriments ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ...). Le gel est souvent destiné à être ingéré et à libérer la SA encapsulée. La caractérisation de la dynamique de l'eau dans le gel est essentielle à la compréhension des mécanismes d'encapsulation et de libération. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la mobilité de l'eau mesurée par FFC NMR dans des gels à base de polyGalA formulés par gélification « externe » en utilisant les ions calcium ou zinc comme agent de réticulation (Ca-polyGalA et Zn-polyGalA). Trois modèles physiques sont considérés pour interpréter la mobilité de l'eau dans ces deux types de gel. Ces deux gels ont été également formulés en remplaçant l'eau légère par l'eau deutérée afin de vérifier l'origine du signal enregistré lors des expériences de relaxométrie. Enfin les résultats sont confrontés à des simulations de dynamique moléculaire.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « Carbohydrate Polymers » intitulé « Slow water dynamics in polygalacturonate hydrogels revealed by NMR relaxometry and molecular dynamics simulation », (voir Annexe G).

## I. Contexte

Comme énoncé à plusieurs reprises, la RMN est une technique de choix pour sonder la dynamique moléculaire, à titre d'illustration nous reproduisons le tableau comparatif de Lorén et al. (2015), Tableau 3.1), où les domaines mesurables du coefficient de diffusion obtenu par des différentes techniques sont comparés.

Tableau 3.1 : Représentation des domaines de mesure du coefficient de diffusion par différentes techniques : spectroscopie corrélation de fluorescence (FCS), *Raster Scanning* ICS (RICS) et le *Single-Particle Tracking* (SPT) ( adapté de Lorén et al., 2015).

D(m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	1E-15	1E-14	1E-13	1E-12	1E-10
FCS					
RICS					
FRAP					
NMR					
SPT					

Par des mesures de  $T_2$  sur une série de solution et gels de divers polysaccharides (amylose, amidon, maltoheptose, carraghénane, schléroglucane et dextran), Hills et al. (1991) ont récolté les premières preuves indiquant que les polysaccharides influencent le comportement de l'eau dans un gel, ils ont établi l'existence d'eau « liée » à la chaîne polysaccharidique. La diffusion de l'eau dans les matrices polysaccharidiques est donc bien impactée par la structure du gel. Il a été observé dans des hydrogels à base de poly(2-hydroxyethyl-méthacrylate), que le coefficient d'autodiffusion de l'eau était un ordre de grandeurs inférieur à celui de l'eau libre (i.e.  $\sim 4 \cdot 10^{-10}$  contre  $2,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$ ) (Barbieri et al., 1998; Holz et al., 2000; Mills, 1973). Si la relaxométrie RMN des protons est une méthode particulièrement adaptée à la mesure des dynamiques de l'eau dans des hydrogels polysaccharidiques, il est cependant nécessaire de comprendre les mécanismes de relaxation des protons dans un gel avant d'étudier les dynamiques moléculaires de l'eau.

Dans une série d'articles, l'équipe de Kruk s'est intéressée à la mobilité de l'eau dans différentes matrices alimentaires comme les fromages (Kruk et al., 2021a) et les œufs (Kruk et al., 2021b). Les auteurs utilisent un modèle simple permettant d'exploiter les profils de temps

de relaxation longitudinaux. Le modèle, suppose deux mouvements (rotation et translation) d'une population de protons dans ces systèmes. Des diffusions translationnelles de  $5-7 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  sont observées pour un assortiment de fromages, et entre  $2 \cdot 10^{-14}$  à  $2 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour différent blanc d'œuf. Le modèle permet aussi d'obtenir les populations de protons associés aux mouvements calculés. Ainsi des populations de protons mesurées pour les fromages et pour les blancs d'œuf sont de l'ordre de  $2-5 \cdot 10^{27} \text{ }^1\text{H}/\text{m}^3$  et  $0,1-1 \cdot 10^{27} \text{ }^1\text{H}/\text{m}^3$ , respectivement. Cependant leurs matrices d'études utilisées présentent une grande complexité, ce qui pose des difficultés d'identification et d'attribution des populations de protons analysées. Dans le cadre de cette thèse, l'identification des populations sera plus facile à réaliser, car notre matrice s'apparente à un système modèle bien identifié et caractérisé par ailleurs.

## **II. Description des phénomènes de relaxation et des modèles théoriques**

### **1. Modèle RT : mouvement de rotation et de translation**

#### **1.1 Modèle théorique**

Les phénomènes de relaxation observés lors de l'enregistrement d'un profil de relaxation d'un gel peuvent être décrits par le mouvement de deux populations de protons : (i) les protons de l'eau « libre » dont les mouvements ne sont pas restreints et (ii) les protons de l'eau ralentis par leurs interactions avec le réseau.

Parmi les protons non associés à l'eau libre, ayant une dynamique plus lente, nous pouvons distinguer trois types : (i) les protons de l'eau en interactions avec les chaînes de polyGalA, (ii) les protons de l'eau situés dans les couches d'hydratation des cations de réticulation et (iii) les protons de la chaîne polyGalA. La Figure 3.1 illustre ces différentes populations de protons dans un gel.

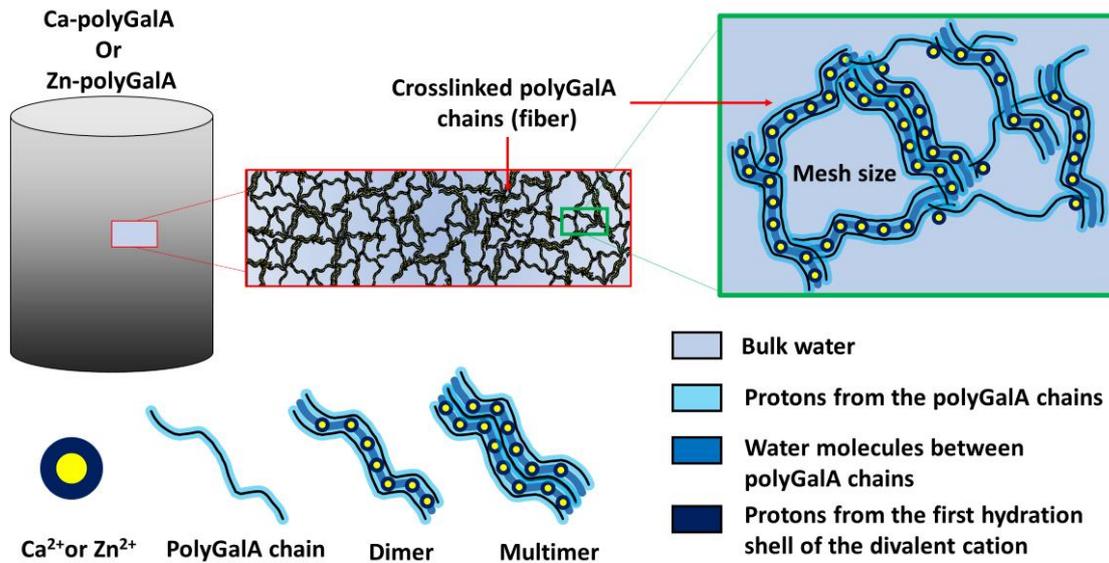


Figure 3.1 Représentation schématique de la microstructure d'un gel ; des cations de réticulation et de leurs couches d'hydratation, des chaînes de polyGalA ainsi que les différentes populations d'eau.

Etant donné que les gels de Ca-polyGalA et Zn-polyGalA sont composés d'environ 98% d'eau, il est raisonnable de supposer que la relaxation observée lors d'une mesure de  $T_1$  provient principalement des protons des molécules d'eau grâce aux interactions dipolaires de leurs protons. La dynamique des protons aliphatiques peut être négligée dans ce contexte.

Les temps de corrélation (de rotation et translation) de l'eau libre sont de l'ordre de la picoseconde ( $10^{-12}$  s). Les dispersions associées sur le profil de relaxation sont observables à des fréquences de l'ordre du GHz, soit dans une plage de fréquences bien supérieure à celle étudiée dans cette thèse [1 kHz – 20 MHz]. C'est pour cette raison que la contribution de l'eau libre à la relaxation dans la fenêtre observée ici peut être assimilée à une constante  $A$  (équation 3.1).

En revanche, les molécules d'eau en interaction avec le polyGalA ont des mouvements rotationnels et translationnels ralentis, ce qui se traduit par des temps de corrélation plus courts, observables en FFC NMR. L'équation 3.1 permet de décrire de façon générale le taux de relaxation ( $R_1 = \frac{1}{T_1}$ ) du gel en fonction des contributions de l'eau libre ainsi que des taux de relaxation résultant de la rotation ( $R_1^{géné,rot}$ ) et de la translation ( $R_1^{géné,trans}$ ) des molécules d'eau en interaction avec les fibres du gel.

$$R_1(\nu) = A + R_1^{g\u00e9n\u00e9,rot}(\nu) + R_1^{g\u00e9n\u00e9,trans}(\nu), \quad 3.1$$

Avec  $\nu$  la fr\u00e9quence de Larmor des protons exprim\u00e9e en Hz.

Si on consid\u00e8re deux spins  $\frac{1}{2}$  dans une mol\u00e9cule d'eau, le taux de relaxation issu de la dynamique rotationnelle de l'eau pi\u00e9g\u00e9e peut \u00eatre exprim\u00e9 comme (Bloembergen et al., 1948; Kruk et al., 2021a; Poca\u00f1 et al., 2021) :

$$R_1^{g\u00e9n\u00e9,rot}(\nu) = C_r \left[ \frac{\tau_r}{1 + (2\pi\nu\tau_r)^2} + \frac{4\tau_r}{1 + (4\pi\nu\tau_r)^2} \right], \quad 3.2$$

Avec  $\tau_r$  le temps de corr\u00e9lation rotationnel. Quand seulement deux protons interagissent, la constante de couplage dipolaire  $C_r$  est donn\u00e9e par (Kruk, 2015) :

$$C_r = \frac{3}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} \right)^2, \quad 3.3$$

O\u00f9  $\gamma$  d\u00e9note le rapport gyromagn\u00e9tique,  $r$  la distance internucl\u00e9aire entre les deux protons, et les autres symboles repr\u00e9sentent les constantes physiques usuelles.

Dans le cas d'une diffusion isotrope, la contribution \u00e0 la relaxation provenant de la translation des mol\u00e9cules d'eau peut \u00eatre exprim\u00e9e comme (Ayant et al., 1975; Kruk et al., 2021a) :

$$R_1^{g\u00e9n\u00e9,trans}(\nu) = C_t \int_0^\infty \frac{u^4}{81 + 9u^2 - 2u^4 + u^6} \left( \frac{\tau_t}{u^4 + (2\pi\nu\tau_t)^2} + \frac{4\tau_t}{u^4 + (4\pi\nu\tau_t)^2} \right) du, \quad 3.4$$

Avec

$$C_t = \frac{108}{5} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \gamma^2 \hbar \right)^2 \frac{N_H}{d^3}, \quad 3.5$$

O\u00f9  $N_H$  est le nombre de protons par  $m^3$  et  $d$  est la distance la plus proche entre deux mol\u00e9cules d'eau, le plus souvent, elle est associ\u00e9e au diam\u00e8tre de celle-ci (2,75 \u00c5).

Enfin le temps de corr\u00e9lation translationnel  $\tau_t$  est d\u00e9fini comme :

$$\tau_t = \frac{d^2}{D_t}, \quad 3.6$$

Avec  $D_t$  la diffusion translationnelle relative (pas l'autodiffusion) des mol\u00e9cules d'eau pi\u00e9g\u00e9es.

## 1.2 Application aux gels Ca-polyGalA et Zn-polyGalA

Les profils de diffusion de deux gels externes (Ca-polyGalA et Zn-polyGalA) sont présentés dans la Figure 3.2.

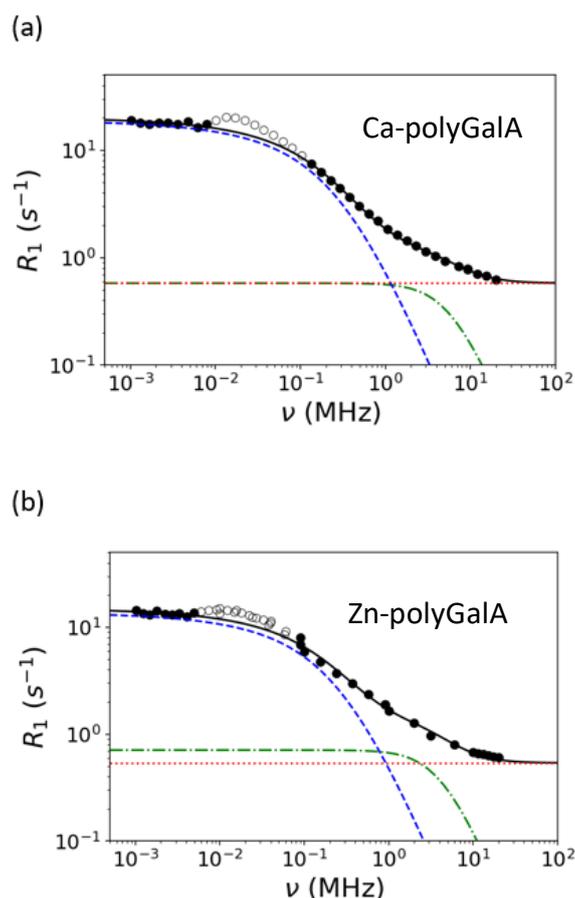


Figure 3.2 Profils de relaxation RMN des protons d'un hydrogel Ca-polyGalA (a) et d'un hydrogel Zn-polyGalA (b). Les symboles ouverts (○) représentent des points expérimentaux qui n'ont pas été ajustés. La ligne continue représente l'ajustement selon le modèle présenté (équations 3.2 et 3.4). Les lignes discontinues indiquent les trois contributions indépendantes : les pointillés rouges correspondent à la contribution de l'eau libre (tableau 3.2), les pointillés bleus représentent la contribution translationnelle, et les pointillés verts représentent la contribution rotationnelle.

Chaque profil présente une augmentation du temps de relaxation sous la forme d'une bosse localisée autour de  $2 \cdot 10^{-2}$  MHz. Cette augmentation a été observée dans des loukoums gélatineux, cependant aucune explication n'a été proposée jusqu'à présent (Pocan et al., 2021). Pour obtenir un ajustement plus précis des données expérimentales, les points correspondant à cette bosse n'ont pas été inclus, car ils sont le résultat d'une contribution non identifiée ou d'un artefact qui ne peut pas être reproduits mathématiquement reproduits avec

les équations précédentes. Les profils des gels Ca-polyGalA et Zn-polyGalA sont très similaires indiquant que les dynamiques de l'eau dans les deux gels sont comparables. Cependant les taux de relaxation sont légèrement plus faibles pour le gel Zn-polyGalA. Il est surprenant que, malgré une grande hétérogénéité et une distribution importante des tailles de réseaux dans le gel (Chapitre 4), il ne soit pas nécessaire d'utiliser une distribution de temps de corrélation pour décrire le comportement des profils. Il semble que l'hétérogénéité du gel n'ait pas d'impact sur les profils.

Aux basses fréquences, la relaxation des protons est dominée par les mouvements translationnels des molécules d'eau en interaction avec le réseau polysaccharidique. Elle est caractérisée dans le Tableau 3.2 par  $\tau_t$  et  $C_t$ . Aux fréquences intermédiaires, on observe une contribution des mouvements rotationnels de ces mêmes molécules, caractérisé par  $\tau_r$  et  $C_r$ . Aux fréquences les plus élevées, la relaxation est dominée par la relaxation des protons de l'eau libre représentée par A.

Tableau 3.2 : paramètres obtenus lors de l'ajustement présenté en Figure 3.2. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux marges d'erreur résultant de l'ajustement numérique sur le chiffre précédent.

Échantillon	$C_r$ ( $10^6 \text{ Hz}^2$ )	$\tau_r$ ( $10^{-8} \text{ s}$ )	$C_t$ ( $10^7 \text{ Hz}^2$ )	$\tau_t$ ( $10^{-6} \text{ s}$ )	A ( $\text{s}^{-1}$ )	$N_H$ ( $10^{26} \text{ m}^{-3}$ )	$D_t$ ( $10^{-14} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )
Ca-polyGalA	7(5)	1,5(9)	9,5(9)	1,5(1)	0,58	1,6(9)	4,9(3)
Zn-polyGalA	7(5)	2,0(3)	6,5(8)	1,6(2)	0,54	1,1(8)	4,6(6)

Dans un souci de comparaison, le taux de relaxation des solutions aqueuses des cations de calcium et zinc a été mesuré ( $0,37 \text{ s}^{-1}$ ). Il est légèrement inférieur à celui de l'eau libre des gels ( $0,58 \text{ s}^{-1}$  et  $0,54 \text{ s}^{-1}$  pour Ca-polyGalA et Zn-polyGalA, respectivement). Cette différence peut être attribuée au réseau de fibre structurant l'hydrogel. En effet, les fibres réduisent la dynamique de l'eau libre et offre d'autres puits de potentiel de relaxation et induisent une relaxation plus rapide des protons, qui se traduit par un taux de relaxation plus élevé (comme observé dans le Chapitre 4).

Il est intéressant de noter qu'à 20 MHz, la relaxation des protons de l'eau libre des hydrogels de polyGalA est décrite dans par une distribution des temps de relaxation (Chapitre 4 & Chapitre 5). Le fait que l'ajustement des profils ne nécessite pas l'utilisation de distributions suggère que la population des protons responsables de la signature observée sur les profils diffère de celle de l'eau libre. De plus, la population de proton contribuant au signal ( $N_H \sim 10^{26}$  H/m<sup>3</sup>) est très faible par rapport à la population des protons associée à l'eau libre présente dans l'hydrogel ( $N_{H, total\ water} \cong 6,55 \cdot 10^{28}$  H<sup>1</sup>/m<sup>3</sup>, correspondant à 98% de protons de l'eau pure ( $0,98 \times 6,68 \cdot 10^{28}$  H<sup>1</sup>/m<sup>3</sup>), une grande disparité est observée. Les valeurs de  $N_H$  obtenues pour Ca-polyGalA et Zn-polyGalA sont approximativement 600 fois inférieures au nombre total de protons dans l'hydrogel. Cela suggère que seulement environ 0,2% des protons sont responsables des mouvements translationnels modélisés.

Par ailleurs, des coefficients de diffusion apparents de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-14}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> sont observés pour les mouvements de translation. Cette valeur, remarquablement faible, ne peut en aucun cas être associée à des mouvements de l'eau libre, ou de l'eau d'hydratation des ions (Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) en solution dans le gel. En effet, des valeurs expérimentales obtenues par Larentzos and Criscenti (2008) indiquent un temps de résidence de l'eau dans la sphère d'hydratation du calcium  $7,5 \cdot 10^{-10}$  s (Zeng et al., 2021). De plus, si l'on néglige les échanges entre la deuxième couche d'hydratation et la première couche d'hydratation, les coefficients de diffusion des ions Zn<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> dans des solutions de CaCl<sub>2</sub> et ZnSO<sub>4</sub> à 25°C sont respectivement de 1,14 et  $0,75 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (Chen et al., 2019). Ce sont donc des coefficients de diffusion très proche de l'eau libre à 25°C ( $2,3 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) et d'un autre ordre de grandeur différent de ceux déduits de l'ajustement par le modèle proposé. De plus, Sandrin et al. (2016) ont démontré, en utilisant la spectroscopie d'image à fluorescence multiparamétrique et la spectroscopie de corrélation de fluorescence que pour des molécules de taille modérées comme des colorants (0,53 kDa) la diffusion n'est que très peu affectée par la structure du gel. Des coefficients de diffusion de  $0,37 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pour le colorant dans de l'eau libre et de  $0,27 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pour le colorant dans un gel ont été observés. Même le coefficient de diffusion d'une grosse molécule comme le FTIC-dextran (500 kDa, rayon hydraulique 13,5 nm) reste du même ordre de grandeur : dans l'eau ( $1,78 \cdot 10^{-11}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) et dans un gel pectine-calcium ( $0,7 \cdot 10^{-11}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) (Lopez-Sanchez et al., 2017). Dans tous les cas, ce sont des coefficients bien plus grands que ceux mesurés dans notre étude. De plus, nous signalons que des coefficients diffusion très faibles, comparables à

nos observations sont observés dans des polymères (de  $10^{-15}$  à  $10^{-11}$   $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ) (Schwiderke and di Sarli, 1986; Tian et al., 2020; Yang et al., 2020).

Concernant les temps de corrélation rotationnels, des observations similaires peuvent être soulignées. En effet, des temps de rotation de l'ordre de  $10^{-8}$  s sont observés. En comparaison, les temps de corrélation rotationnels observés classiquement sur de l'eau libre sont de l'ordre de  $10^{-12}$  s soit des valeurs considérablement plus petites (mouvement plus rapide) que les protons observés lors de l'enregistrement du profil. Des valeurs comparables ont été retrouvées par relaxométrie dans des matrices alimentaires :  $3 - 0,6 \cdot 10^{-8}$  s pour des bonbons gélatineux,  $0,3 - 1,7 \cdot 10^{-9}$  s pour des loukoums,  $1,8 - 3,1 \cdot 10^{-8}$  s pour des œufs, et  $2 - 2,4 \cdot 10^{-6}$  s pour des fromages (Kruk et al., 2021a, 2021b; Pocan et al., 2021) indiquant que les rotations observées ne sont certainement pas dues à de l'eau libre.

Les valeurs obtenues par relaxométrie indiquent des mouvements très lents des protons. Étant donné la relative simplicité du système utilisé (eau, polyGalA-cations), seuls les protons associés aux chaînes polysaccharides, c'est-à-dire les protons aliphatiques, ainsi que les protons de la couche d'hydratation des ions de réticulation et ceux de la couche d'hydratation des chaînes de polyGalA, sont susceptibles d'avoir une dynamique aussi lente.

La Figure 3.3 représente la configuration moléculaire entre deux chaînes de 8 unités GalA (octamères) et 4 ions réticulants ( $R=0,25$ ) calcium ou zinc. Comme décrit au Chapitre 1 l'association la plus simple entre deux chaînes polysaccharidiques est le modèle de boîte à œufs où deux chaînes ou plus s'associent en se réticulant à des cations divalents via les groupes carboxylate et hydroxyle du polysaccharide. Le mécanisme d'association fait intervenir la première couche d'hydratation du cation (Assifaoui et al., 2015a). Pour l'ion calcium qui possède 7 molécules dans sa couche d'hydratation, le mode d'association est bidentate, alors que pour l'ion zinc (avec 6 molécules dans sa couche d'hydratation), le mode d'association est monodentate (Figure 3.3).

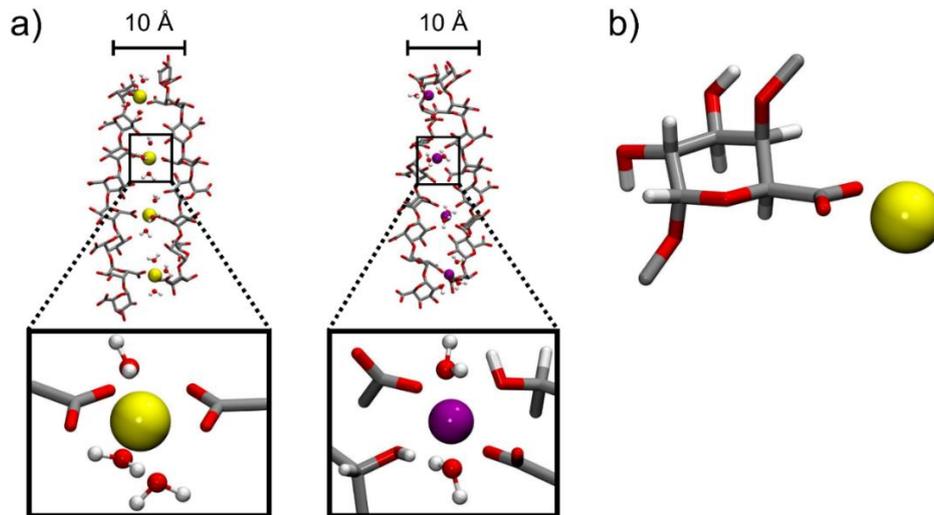


Figure 3.3 a) Représentation de la configuration (obtenue par modélisation moléculaire) entre deux chaînes octamériques de polyGalA liés par 4 ions  $\text{Ca}^{2+}$  (jaune) ou  $\text{Zn}^{2+}$  (violet). Par souci de clarté seuls les atomes lourds du polyGalA sont représentés ainsi que les molécules d'eau de la première couche d'hydratation des ions liants. Carbone, oxygène et hydrogène sont représentés respectivement en gris, rouge et blanc. L'environnement local des liaisons ion-carboxylate est détaillé dans l'encadré. b) structure du GalA liée à un ion calcium.

Une fois réticulé, la première couche d'hydratation du cation sera composée soit de 3 molécules d'eau (cas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) soit de 4 molécules d'eau (cas de  $\text{Zn}^{2+}$ ). En utilisant la structure décrite (Figure 3.3), il est alors possible d'estimer les quantités de proton présent dans les fibres et dans la réticulation polyGalA- $\text{M}^{2+}$  :

$$N_H(x) = C(x) \times N_A \times n_H(x) , \quad 3.7$$

L'équation 3.7 permet de quantifier le nombre de protons associé à un composant  $x$  présent dans un gel.  $C(x)$  correspond à la concentration molaire de ce composant.  $N_A$  le nombre d'Avogadro ( $6,023 \cdot 10^{23}$ ) et  $n_H(x)$  est le nombre de protons dans chaque molécule du composant  $x$ . Ici  $x$  est associé soit au polyGalA, soit aux protons de l'eau d'hydratation de la couche primaire des ions réticulants ou soit à l'eau libre. Une unité GalA compte 7 protons : 2 fonctions hydroxyles et 5 protons aliphatiques sur la chaîne carbonée). Sur les ions réticulés on retrouve, dans la première couche d'hydratation, 6 (3  $\text{H}_2\text{O}$ ) et 4 protons (2  $\text{H}_2\text{O}$ ) respectivement  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Le gel contient 20 g/L de polyGalA, ce qui correspond à une concentration molaire en GalA de 114 mM. Si le modèle *eggbox* est respecté, il doit y avoir 4

fois moins d'ions que d'unité galacturonate ( $R = [M^{2+}]/[GalA] = 0,25$ , Figure 3.3.a). A partir de ces hypothèses, le Tableau 3.3 reporte les différentes populations de proton dans le gel.

Tableau 3.3 : Origine et nombre de proton  $N_H(x)$ , présent dans les gels  $Ca^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ . Le nombre de proton par unité de volume est estimé grâce à l'équation 3.7. Les concentrations de calcium et zinc sont assumées et égales à  $C(GalA) \cdot 0,25$ . Le nombre de proton des ions est déterminé par rapport à la Figure 3.3.a.

$x$	$C(x)(g/L)$	$C(x)$ (mM)	Origine des protons	$n_H(x)$	$N_H(x)$ (Par $m^3$ )
Unité GalA	20	114	H hydroxyle (OH)	2	$1,37 \cdot 10^{26}$
			H aliphatique (C-H)	5	$3,42 \cdot 10^{26}$
Calcium lié		28,5	H des 3 molécules d'eau	6	$1,03 \cdot 10^{26}$
Zinc lié		28,5	H des 2 molécules d'eau	4	$0,69 \cdot 10^{26}$
Eau (libre)	980	$54,4 \cdot 10^3$		2	$6,55 \cdot 10^{28}$

Comme mentionné précédemment, la quantité de protons associé à l'eau libre est deux ordres de grandeur plus grande que la quantité de protons participant aux mouvements translationnels. Le Tableau 3.3 indique qu'au total les protons associés aux chaînes réticulées (GalA + cation) sont au nombre de  $5,8$  (Ca-polyGalA) et  $5,5 \cdot 10^{26}$  (Zn-polyGalA) H/ $m^3$  contre  $6,55 \cdot 10^{28}$  H/ $m^3$  pour l'eau libre. Les populations des protons liés sont donc du même ordre de grandeur que celles obtenues expérimentalement dans le Tableau 3.2 ( $1,6(9) \cdot 10^{26}$  et  $1,1(8) \cdot 10^{26}$  H/ $m^3$  pour respectivement Ca-polyGalA et Zn-polyGalA respectivement; Tableau 3.2). Cela semble indiquer que la faible population des protons relaxant à basses fréquences peut correspondre aux protons liés.

Il est intéressant de remarquer que la contribution  $A$ , associée à la relaxation des protons libres, qui semble être une contribution mineure sur la Figure 3.2 comme étant une contribution mineure, est en fait responsable de la relaxation de plus de 99% de protons. Dès lors les contributions rotationnelles et translationnelles impactantes la forme de la courbe à bas champ sont associées à une petite fraction des protons relaxants. La relative simplicité de notre système d'étude polyGalA- $M^{2+}$ -eau nous permet d'identifier l'eau structurale comme

responsable de ce phénomène. Un si faible niveau d'eau structurelle pourrait donc expliquer pourquoi cela n'a pas été identifié par d'autres expériences de diffusion RMN effectuées sur des gels plus complexes (Barbieri et al., 1998; Hills et al., 1991; Wende et al., 2020).

### **1.3 Application aux gels partiellement séchés et gels à différentes tailles de réseau**

Dans la partie précédente, nous avons montré qu'un nombre faible de proton (0,2%) a été identifié comme potentiellement responsable des mouvements rotationnels et translationnels observés aux basses fréquences. Il faut rappeler que les gels obtenus par gélification externe présentent une hétérogénéité de structure qui se traduit par un gradient de concentration en polymère et une distribution de taille de réseau selon l'axe de diffusion du cation (Chapitre 4). Cependant, il a aussi été montré qu'au niveau local, les associations entre chaînes de polyGalA et calcium (ou zinc) respectent le ratio  $R([M^{2+}]/[GalA])=0,25$  et sont semblables quel que soit la partie du gel. Pour vérifier que la taille de réseau n'impacte pas le profil observé, nous avons extrait d'un gel Ca-polyGalA deux tranches extrêmes (*Near* et *Far*, chacune représentant 25% du gel complet) et nous avons enregistré chaque profil. La partie *Near* est rigide et compacte, elle possède une faible taille de réseau ; alors que la partie *Far* est plus riche en eau avec une rigidité plus faible et une taille de réseau plus importante. Par ailleurs, afin de contraster l'impact de l'eau libre, un gel Ca-polyGalA a été partiellement séché (PS ; perte de ~42% d'eau) et un profil de relaxation a été enregistré (Figure 3.4).

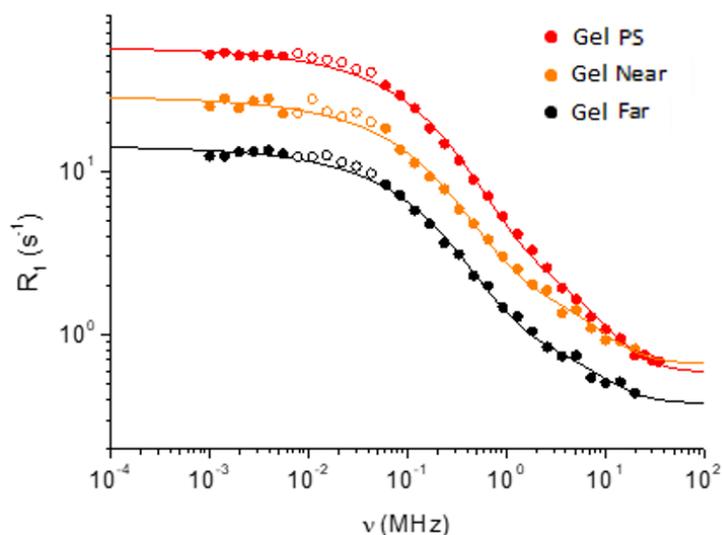


Figure 3.4 Profils RMN et ajustement par le modèle rotationnel-translational de la partie Far d'un gel calcium (1/4 du gel initial ; noir) avec une taille de réseau large et de la partie Near d'un gel calcium (1/4 du gel initial ; jaune) avec taille de réseaux faible ainsi que d'un gel calcium partiellement séché (perte de poids de 42% ; rouge).

La Figure 3.4 montre les profils de relaxation obtenus pour la partie Near, Far et le gel partiellement séché. Les courbes ont un comportement proche du profil obtenu pour le gel complet calcium. De la même manière une contribution locale non identifiée est observée entre 10 kHz et 100 kHz, les points sont donc négligés. Si les mouvements observés par FFC-NMR viennent bien d'une population minoritaire et fortement liée aux fibres alors les mouvements translationnels et rotationnels seront peu impactés. Cependant, la contribution A de l'eau libre sera modifiée. Le Tableau 3.4 présente les valeurs obtenues lors de l'ajustement des données expérimentales avec l'équation 3.1, il est important de noter que le niveau de bruit lors de la mesure est bien plus important que sur les gels complets présentés précédemment. Cela est dû à la faible masse des échantillons (25% du gel soit 25% de la population de proton initiale).

Tableau 3.4 : paramètres obtenus par les ajustements présentés en Figure 3.4 (gel Ca-polyGalA). PD pour partiellement déshydrater, Near pour le gel à petite taille de réseau et Far pour le gel à large taille de réseau. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux marges d'erreur sur le chiffre précédent.

Échantillon	$C_r$ ( $10^6 \text{ Hz}^2$ )	$\tau_r$ ( $10^{-8} \text{ s}$ )	$C_t$ ( $10^7 \text{ Hz}^2$ )	$\tau_t$ ( $10^{-6} \text{ s}$ )	A ( $\text{s}^{-1}$ )	$N_H$ ( $10^{26} \text{ m}^{-3}$ )	$D_t$ ( $10^{-14} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )
PS	2(3)	1(3)	3,3(2)	1,28(8)	0,6(6)	6(2)	5,9(4)
Near	10(20)	1(2)	15(3)	1,4(2)	0,6(6)	3(3)	5,5(8)
Far	6	1(2)	7,6(1)	1,3(2)	0,4(6)	1,3(1)	5,6(9)

Ainsi, la contribution de l'eau libre  $A$  semble plus importante dans le gel ayant une taille de réseau plus faible (*Near*) et dans le gel partiellement séché (PS), car le réseau se contracte lors du séchage. Les coefficients de diffusion  $D_t$  sont proches des résultats obtenus pour les gels complets. De plus, la population de proton  $N_H$  reste dans l'ordre des  $10^{26} \text{ H/m}^3$  malgré la perte conséquente d'eau libre dans le gel PS. Ces observations tendent donc à confirmer que les mouvements rotationnels et translationnels observés proviennent bien d'une population de protons fortement liée à la structure polysaccharidique du gel, ce qui entraîne une dynamique bien plus lente.

## 2. Modèle BMSD : Marche de Levy

### 2.1 Modèle théorique

Face à la simplicité du modèle RT (rotation / translation), qui bien qu'informatif, peut parfois être approximatif dans des systèmes complexes, nous confrontons les conclusions obtenues par le modèle RT avec celles obtenues à l'aide d'une marche de Levy. Les marches de Levy sont généralement utilisées pour interpréter les dynamiques lentes observées sur les profils de dispersion RMN (Stapf et al., 1996, 1995). Ce modèle décrit une dynamique à la surface de matériaux en contact avec de l'eau libre (*Bulk-mediated surface diffusion BMSD*). Des molécules (ou plus généralement des particules) sont décrites comme pouvant diffuser sur la

surface du solide, mais aussi dans une fine couche recouvrant la surface et s'apparentant à l'eau libre (bulk) (Bychuk and O'Shaughnessy, 1995, 1994). Le modèle suppose que la particule se trouve la plupart du temps à la surface du polysaccharide mais elle peut, pour une courte période, s'échapper pour se retrouver dans l'eau libre et revenir ensuite en contact avec la surface. La succession de la désorption et de l'adsorption de cette particule génère les dynamiques BMSD. Ainsi, lorsque l'adsorption est forte ( $r \ll \sqrt{Dt}$  avec  $r$  le déplacement spatial à la surface,  $D$  le coefficient de diffusion de l'eau libre et  $t$  la dimension temporelle de la distribution), la marche de Levy est basée sur une distribution de molécules à la surface, décrite par une distribution bivariée de Cauchy standard.

$$p(r, t) = \frac{1}{2\pi} \frac{ct}{(r^2 + c^2t^2)^{\frac{3}{2}}}, \quad 3.8$$

Le ratio entre le coefficient de diffusion de l'eau libre et un facteur  $h$  et une vitesse  $c$ , appelé « profondeur de l'adsorption » :

$$c = \frac{D}{h} \quad 3.9$$

La fonction de temps de corrélation RMN est donnée par l'équation suivante (Stapf et al., 1995) :

$$G(t) = t \int_0^\infty u \frac{g(u)}{(t^2 + u^2)^{\frac{3}{2}}} du, \quad 3.10$$

Avec  $u = \frac{r}{c}$ ,  $g(u)$  est la fonction spatiale de corrélation du déplacement de la molécule à la surface. Pour obtenir la longueur caractéristique du mouvement à la surface Stapf et al., (1996, 1995) ont proposé la procédure suivante :

- i) Ajuster le profil obtenu expérimentalement, avec un algorithme des moindres carrés à coefficients non négatifs (NNLS, « *non negative least square* »), avec un ensemble formel de fonctions dont la forme est identique à l'équation 3.2.
- ii) Construire la fonction temporelle de corrélation  $G(t)$ .

- iii) Discrétiser l'intégral de l'équation 3.10 pour former un système d'équations qui est inversé avec une procédure NNLS pour obtenir la fonction de corrélation spatiale  $g(u)$ .

## 2.2 Application du modèle BMSD aux gels

Le modèle BMSD s'est notamment illustré en extrayant des longueurs de déplacement (4, 30, 208 nm) corrélées à la taille des pores (Stapf et al., 1996). Le mécanisme BMSD décrit le déplacement d'une molécule d'eau entre deux points d'adsorption, à la surface de la matrice où la mobilité est restreinte. Ces dynamiques sont caractérisées par des temps de corrélation translationnelle très longs (jusqu'à 8 ordres de grandeur supérieurs à ceux de l'eau libre) comme ceux observés dans le Tableau 3.2 et le Tableau 3.4 ( $1,5 \cdot 10^{-6}$  s).

De manière similaire à ce qui a été décrit par Stapf (Stapf et al., 1995), le modèle BMSD a été appliqué au profil de relaxation des gels entiers, ainsi que ceux des tranches du gel : Far, Near et du gel PS mentionnés précédemment. Les fonctions de corrélation spatiales calculées sont représentées dans la Figure 3.5.

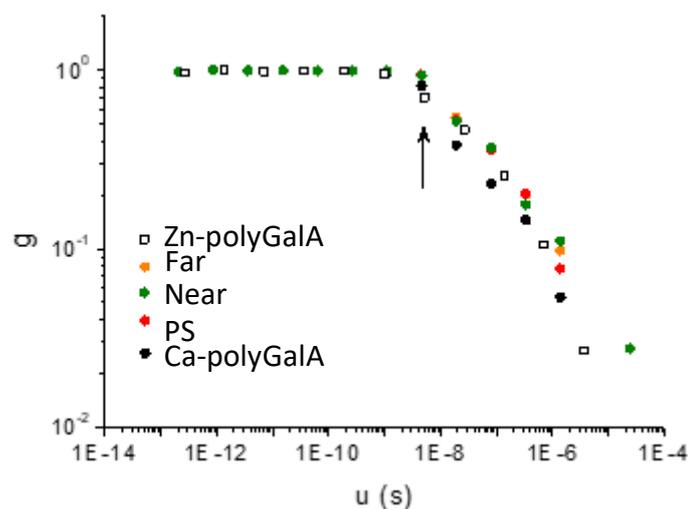


Figure 3.5 Fonctions de corrélation spatiale évaluées pour des gels complets à base de calcium (point noir) et de zinc (carré vide). La figure reporte également les fonctions pour des gels Ca-polyGalA à basse taille de réseau (Near, vert) et haute taille de réseau (Far, jaune) ainsi qu'un échantillon partiellement déshydraté (PS, rouge). La flèche verticale indique le point d'inflexion (environ  $4,6 \cdot 10^{-9}$  s).

Pour tous les échantillons, la corrélation spatiale commence à perdre sa cohérence au point d'inflexion indiqué (environ  $4,6 \cdot 10^{-9}$  s). En supposant une « profondeur d'adsorption » d'environ 2 molécules d'eau, soit une distance de  $5,5 \cdot 10^{-10}$  m, et un coefficient de diffusion égal à  $2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , on obtient une distance caractéristique de 19 nm. En comparaison, l'utilisation des paramètres utilisés par Stapf ( $h=8 \cdot 10^{-10}$  m et  $D=1,6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) une distance de 11 nm est obtenue. Aux regards d'études indépendantes, les distances obtenues sont très raisonnables. En effet, l'utilisation de la diffusion de neutrons aux petits angles a révélé une taille de réseaux de 7,5 nm dans les gels de Ca-polyGalA (partie Near) et les distributions de tailles de réseaux calculées à partir d'inversion de courbe de relaxation à 20 MHz (Chapitre 4) indique une taille de réseaux comprise entre 10 et 40 nm.

Cependant, la partie « Far » et les gels partiellement séchés (PS) aient des tailles de réseaux différentes. Des variations de la distance caractéristique sont attendues, mais ne sont pas observées sur la Figure 3.5. Cela suggère que la distance obtenue par le modèle BSMD pourrait être associée aux diamètres des fibres (les molécules d'eau évoluent autour de la fibre), ou alors que le gel peut être considéré comme une matrice uniforme avec une taille de réseaux constante (19 nm), mais avec des pores de tailles croissantes le long de l'axe de diffusion. Il convient de souligner que la résolution des points d'inflexion n'est peut-être pas suffisante pour observer de petites différences. Stapf et al. (1996) ont observé des variations sur des systèmes ayant jusqu'à 2 ordres de grandeur d'écart en termes de porosité. Par ailleurs, pour plus de précision, les profils devraient être prolongés vers des fréquences de Larmor plus grandes, ce qui permettrait peut-être une meilleure résolution.

Le modèle BSMD peut aussi être critiqué. Pour décrire ce modèle, Bychuk and O'Shaughnessy, (1995) évoquent : « *la dynamique d'un surfactant fortement dilué confronté à une surface plane qui peut adsorber les molécules surfactantes* ». Dans le cadre des hydrogels « externes » de polyGalA, plusieurs candidats à ces dynamiques peuvent être identifiés. Le candidat implicite est l'eau, mais d'après les simulations de dynamique moléculaire (paragraphe III de ce chapitre), il n'y a pas de preuve d'adsorption d'eau sur une longue période de temps à la surface du polymère. Un deuxième candidat pour les dynamiques BSDM peut être l'ion hydraté réticulants (calcium ou zinc) qui peut être adsorbé à la surface du polyGalA. Cependant, l'eau libre du gel ne peut pas être considérée comme une solution diluée d'ions. En effet, la solution libre contient une concentration d'ions proche de la solution de diffusion

(50 mM). Dans ce cas, si un ion est désorbé de la surface du polymère, la probabilité qu'il diffuse et soit de nouveau adsorbé dans son voisinage direct sur un site libre semble extrêmement faible. L'ion aura plus tendance à « voyager » dans le solvant libre et se faire remplacer par un de ses très nombreux « congénères ». En ce qui concerne les molécules d'eau d'hydratation des cations labiles, le temps de résidence d'une molécule d'eau dans la première couche d'hydratation est de  $7,5 \cdot 10^{-10}$  s (Zeng et al., 2021). Ce temps de résidence est plusieurs ordres de grandeur inférieur à celui attribué aux mouvements lents (Annexe G). Cela suggère que les molécules d'hydratation se dissocient du cation avant la fin de la marche de Levy, ce qui indique que la marche n'est pas due aux cations eux-mêmes.

### 3. Relaxation du deutérium ( $^2\text{H}$ ) et modèle $2\beta$

#### 3.1 Profil de relaxation du deutérium

Les calculs réalisés pour l'application des deux modèles précédents, convergent de manière univoque, bien qu'ils soient conceptuellement différents. Cela souligne la nécessité de prendre des précautions lors de l'analyse des profils. Pour aller plus loin, il est nécessaire de compléter les données expérimentales par d'autres résultats fournissant des nouvelles informations indépendantes. La RMN offre intrinsèquement cette possibilité, et l'une des approches consiste à utiliser l'observation multinucléaire. Ainsi, afin de diversifier nos observations, nous avons réalisé un gel Ca-polyGalA où l'eau a été remplacée par l'eau deutérée, seuls les protons aliphatiques associés à la chaîne polysaccharidique ne sont pas substitués.

La relaxation du deutérium diffère de la relaxation du proton, car le deutérium est quadripolaire ( $I=1$ ). Une solution de  $\text{D}_2\text{O}$  connaît les mêmes mécanismes rotationnels et translationnels de relaxation qu'une solution d' $\text{H}_2\text{O}$ , mais la solution de  $\text{D}_2\text{O}$  présente en plus un mécanisme de relaxation quadripolaire. C'est un mécanisme intramoléculaire qui résulte du couplage du moment quadripolaire du noyau avec le gradient de champ électrique existant à l'emplacement du noyau. La relaxation quadripolaire est très efficace par rapport à la relaxation issue de la rotation et de la translation moléculaire. Elle domine largement la relaxation due à la translation. Il est commun de supposer que la relaxation résultant de la diffusion translationnelle n'est pas observable sur les profils deutérium (Abragam, 2007; Kimmich and Weber, 1993; Stapf et al., 1996, 1995) car elle serait masquée par la relaxation quadripolaire.

Le profil du gel deutéré se dessine à des taux de relaxation plus élevés que celui de l'échantillon protoné (Figure 3.6). En effet, la relaxation quadripolaire, les temps de relaxation diminuent, ce qui se traduit par un taux de relaxation supérieur dans le profil du gel deutéré par rapport au gel non enrichi isotopiquement. Les deux profils se superposent par une simple translation verticale (voir insert en Figure 3.6). Cette forte similarité entre les deux profils semble contredire le modèle basé sur les dynamiques translationnelles et rotationnelles de

l'eau. En effet, la relaxation quadripolaire doit totalement masquer les diffusions translationnelles. Ainsi, La diffusion translationnelle des molécules d'eau postulée précédemment ne semble pas contribuer à la forme du profil malgré les populations raisonnables de protons et les constantes de diffusion extraites. En d'autres termes, les mouvements de translation seuls ne peuvent pas expliquer la forme du profil observée à bas champ.

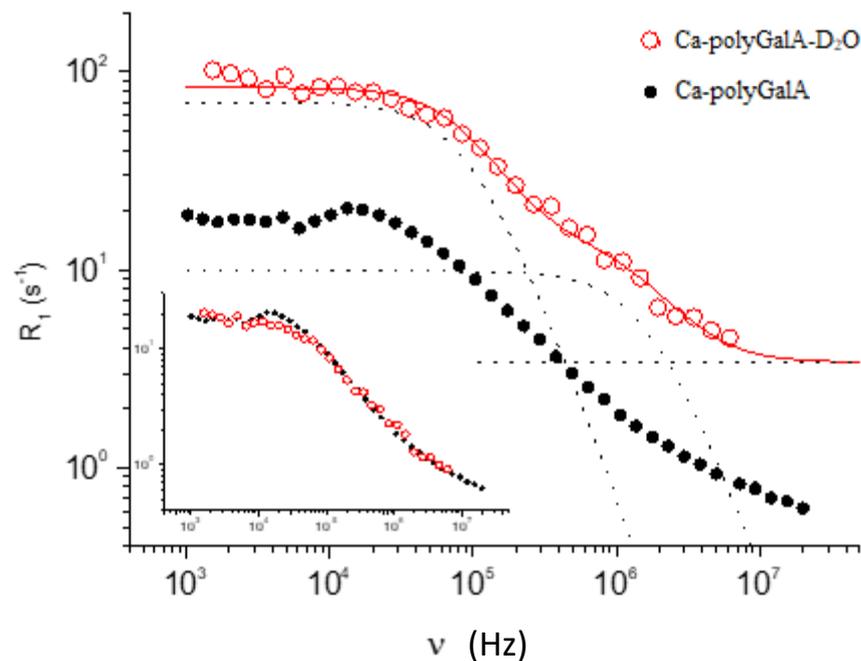


Figure 3.6 Profils d'un gel deutéré (cercles rouges) et d'un gel protoné (disques noirs) d'hydrogel à base de calcium. Les fréquences sont exprimées en fréquences Larmor du proton ou deutérium. L'encart représente les deux profils après une normalisation de 1/5 sur du profil de l'échantillon deutéré. La courbe continue rouge est le meilleur ajustement possible en assumant deux mouvements rotationnels. Les lignes pointillées représentent les composantes individuelles des rotations, la ligne horizontale reporte la contribution de l'eau libre.

### 3.2 Modèle $2\beta$

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, la forme du profil du gel deutéré est très proche à celle du gel protoné. De la même manière que pour les gels protonés, le profil ne peut pas être ajusté avec seulement une contribution rotationnelle, deux contributions sont

nécessaires. L'ajustement du profil du gel deutéré (Figure 3.6) correspond à un ajustement impliquant deux rotations et une contribution linéaire de l'eau libre :

$$R_1 = f_1 \cdot R_1^{Q,1} + f_2 \cdot R_1^{Q,2} + f_b \cdot R_1^{bulk} \quad 3.11$$

Où  $f_1$  et  $f_2$  sont les fractions des molécules avec une dynamique lente, et  $f_b$  et la fraction de l'eau bulk. D'après le formalisme d'Abragam (Abragam, 2007), (Kowalewski and Mäler, 2018),  $R_1^{Q,i}$  peut-être retranscrit comme :

$$R_1^{Q,i} = \frac{3}{40} \lambda^2 \left\{ \frac{\tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} + 4 \frac{\tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} \right\}, \quad 3.12$$

Avec  $\lambda$ , la constante quadripolaire composite, définie comme :

$$\lambda^2 = \left( 1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \left( \frac{eQ}{\hbar} \frac{\partial^2 V}{\partial z'^2} \right)^2, \quad 3.13$$

où  $\frac{eQ}{\hbar} \frac{\partial^2 V}{\partial z'^2}$  et la constante quadripolaire et  $\eta$  le paramètre d'asymétrie.

L'ajustement des données expérimentales en utilisant l'équation 3.11 a permis d'obtenir un taux de relaxation de l'eau libre de  $3,4 \text{ s}^{-1}$ , et deux temps de corrélation rotationnelle de  $1,0(1) \cdot 10^{-6}$  et  $6(3) \cdot 10^{-8} \text{ s}$ .

Dans une étude menée par Shamsir et al. (2020) sur un solvant (acétonitrile deutéré) à la surface de gels de silicates poreux, des profils de relaxation similaires ont été analysés. Ils ont observé des temps de résidence très courts (100 ps); ce qui exclut la possibilité d'une marche de Levy à la surface. Ils ont expliqué les profils obtenus par la présence de sites  $\beta$ , qui sont de petites cavités cylindriques à la surface des pores où le temps de résidence de l'acétonitrile varie de de 0,2 à 2 ms. Cette analyse peut être étendue à notre système en considérant que l'eau présente au sein de la fibre ou dans des agrégats de fibres réticulées occupe des sites  $\beta$ .

De plus, en supposant une constante de couplage quadripolaire (typiquement ) de 220 KHz (Franks, 1972) et un paramètre d'asymétrie de 1, les deux paramètres rotationnels

correspondraient à moins de 1% du nombre total de molécules de D<sub>2</sub>O (en accord avec les hypothèse du modèle RT).

Tableau 3.5 : Fraction des molécules d'eau associées aux deux rotations, en considérant des rotations isotopes et des rotations unies axiales. Les temps de corrélation pour les populations 1 et 2 sont respectivement de 10<sup>-6</sup> s et 5.6 10<sup>-8</sup> s.

	Population	$\eta = 0$	$\eta = 1$
Rotation	1	0,51%	0,38%
uni axiale	2	1,02%	0,76%
Rotation	1	0,38%	0,29%
isotrope	2	0,76%	0,57%

Le profil du gel deutéré affirme la présence de deux populations ayant une dynamique lente. Cela remet en question le modèle rotationnel/translationnel malgré des similitudes numériques qui pourraient résulter de similarités mathématiques dans les modèles utilisés. Cependant, il ne permet pas de juger de l'hypothèse de la marche de Levy. La présence des deux populations observées sur le gel deutéré suggère l'existence de sites où la dynamique est ralentie et où le temps de résidence de l'eau est probablement long. De telles hypothèses peuvent être confrontées à des simulations de dynamique moléculaire.

### III. Simulations de dynamique moléculaire

#### 1. Système simulé

Une simulation de dynamique moléculaire (N,V,T) d'une durée de 1  $\mu$ s a été réalisée sur un système modèle composé de 16 fibres octamériques de GalA<sub>8</sub>, 72 ions Ca<sup>2+</sup> et 1100 molécules d'eau. La concentration résultante des unités galacturonates est de 721 g/L, bien au-delà de ce qui est possible dans un système macroscopique réel. Cependant, au niveau local, l'agrégation des fibres lors de la réticulation semble permettre une telle concentration. Les

étapes de la construction ainsi qu'une représentation finale sont illustrées et modélisées en Figure 3.7.

Plus précisément dans la première étape, une simulation d'une durée de 50 ns est réalisée sur 50 ns de deux chaînes antiparallèles octamériques de polyGalA dans la configuration 2<sub>1</sub>, réticulées par 4 ions Ca<sup>2+</sup> (R=0.25) dans une configuration de type "boite à œufs" est réalisée. Dans la seconde étape, la configuration obtenue est dupliquée dans l'espace :

Pour limiter les effets de bord, les chaînes qui sont relativement courtes, ont été répliquées périodiquement et indéfiniment selon l'axe Z. Le dimère [GalA-Ca-GalA] est répliqué et déplacé de 6 Å suivant l'axe X avec un vecteur de translation (6 Å, 0, 0) (step 1, Figure 3.7). Huit ions Ca<sup>2+</sup> sont ajoutés pour relier les unités GalA adjacentes non reliées (R = 0,5 ; step 2, Figure 3.7). Ensuite, les quatre chaînes sont répliquées trois fois afin de former une grille de 4x4 unités galacturonate (step 3 et 4, Figure 3.7). Les groupes de 4 chaînes sont traduits par les vecteurs suivants : (12 Å, 0, 0), (0, 20 Å, 0) et (12 Å, 20 Å, 0). Enfin, 8 cations Ca<sup>2+</sup> (et leurs contre-ions 16 Cl<sup>-</sup>) sont ajoutés pour permettre la création de ponts entre les nouvelles répliques.

Le système construit est finalement hydraté avec 1100 molécules d'eau dans une boîte de simulation orthorhombique de taille L<sub>x</sub> = 33 Å, L<sub>y</sub> = 48 Å, L<sub>z</sub> = 33,525 Å. La concentration de molécules d'eau est inférieure à une concentration réaliste, mais cela permet de réduire le temps de simulation et d'observer individuellement le comportement des molécules d'eau. Le système construit est stabilisé en le laissant évoluer pendant 50 ns dans un ensemble isobarique-isotherme (N, P, T) en utilisant une pression isotrope avec une constante de temps de couplage τ<sub>p</sub> de 1 ps. La dimension finale de la boîte simulée est fixée à L<sub>x</sub> = 28,647 Å, L<sub>y</sub> = 52,566 Å et L<sub>z</sub> = 34,269 Å. Pour maintenir la position harmonique des chaînes de GalA, une force de contrainte de 1000 kJ.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-2</sup> est appliquée aux unités GalA et aux ions calcium, garantissant ainsi une position stable et évitant des translations de grande amplitude. Finalement les trajectoires des molécules d'eau sont enregistrées toutes les picosecondes. Plus de détails sur la méthode de simulation sont reportés en Annexe G.

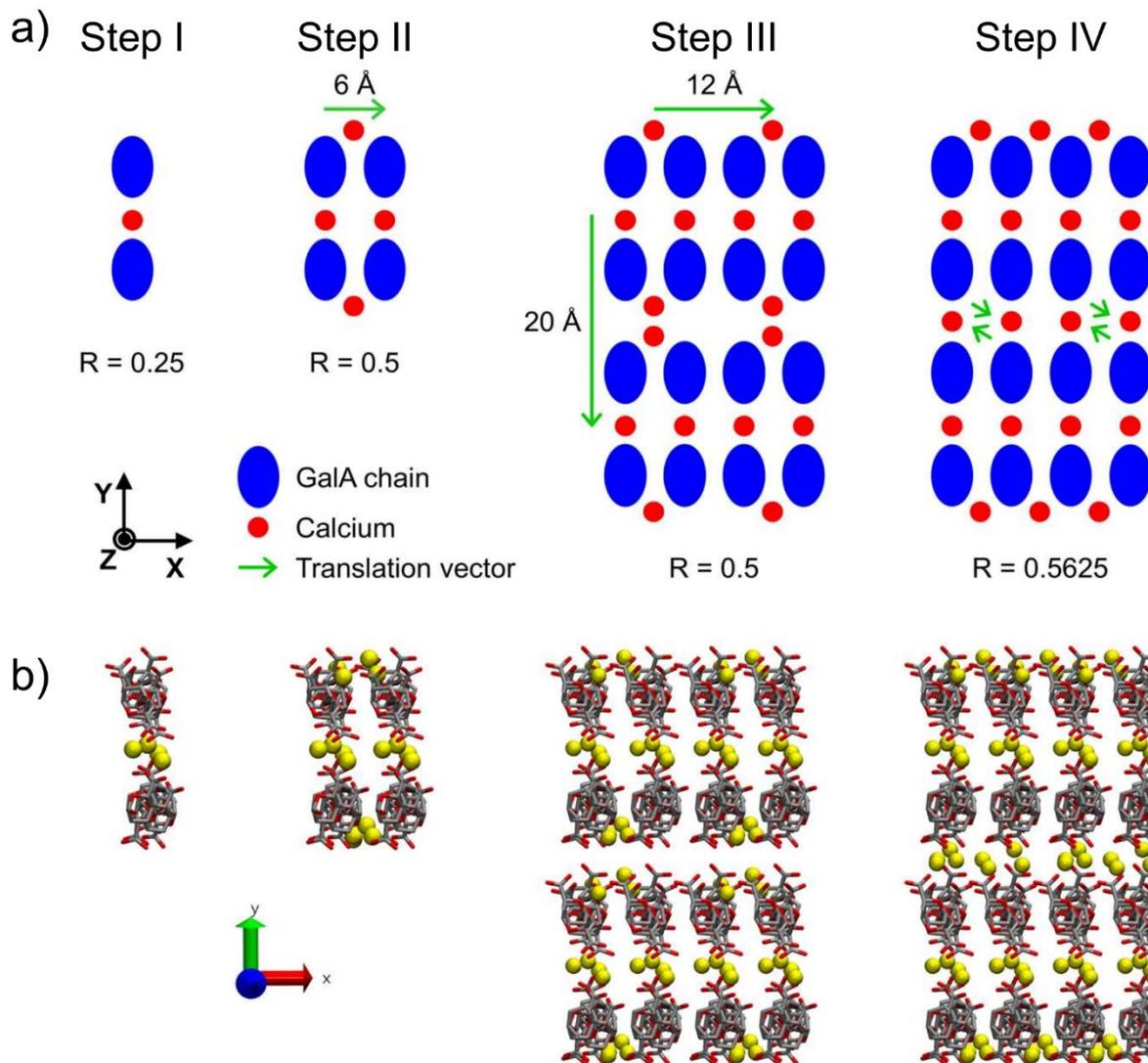


Figure 3.7 représentation de la construction du modèle de la boîte de simulation de dynamique moléculaire a) schématiquement représenté et b) dans le logiciel R (<https://www.r-project.org/>).

## 2. Résultats

Pour tester l'hypothèse selon laquelle les profils de relaxation résultent principalement de la dynamique lente de molécules d'eau en forte interaction avec les chaînes polysaccharidiques de l'hydrogel, le déplacement de chaque molécule d'eau dans la boîte de simulation a été déterminé avec,  $\Delta r(t) = |r(t+\Delta\tau) - r(t)|$  où  $r(t)$  est la position de l'oxygène de la molécule d'eau à un instant  $t$ , et  $\Delta\tau$  et le temps de latence (arbitrairement fixé à 1 ns). Des dynamiques très caractéristiques sont illustrées sur la Figure 3.8. Dans la simulation, quatre catégories de molécules d'eau peuvent être distinguées.

- (i) Des molécules d'eau libres (« *unbound* ») dont le comportement ne montre aucune association avec les chaînes de polyGalA dans la boîte de simulation.
- (ii) Des molécules d'eau en adsorption/désorption (« *bound/unbound* ») avec les chaînes de polyGalA qui ont des déplacements oscillants entre ceux d'une molécule d'eau totalement libre et ceux d'une molécule ayant un déplacement restreint, car adsorbée par le polysaccharide.
- (iii) Des molécules d'eau sautillantes (« *jumping* ») de lieux d'adsorption en lieu d'adsorption.
- (iv) Des molécules d'eau localisées (« *localized* ») dont le site d'adsorption ne varie pas pendant le temps de simulation.

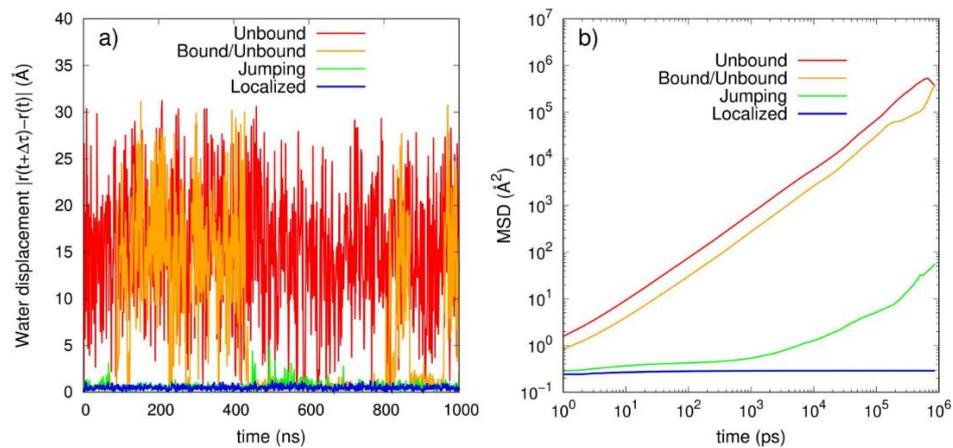


Figure 3.8 a) dépendance temporelle du déplacement de l'atome d'oxygène de 4 types de molécules d'eau ayant des comportements dynamiques distincts. « Unbound » avec un déplacement large, « Bound/Unbound » avec un déplacement occasionnellement important (indiquant une désorption), « jumping » avec des petits déplacements et « localized » avec des déplacements quasi nul. b) déplacement moyen carré d'une molécule d'eau de chaque catégorie sur la durée totale de la simulation.

Les populations des molécules d'eau localisées et sautillantes montrent clairement des dynamiques lentes illustrées par la Figure 3.8. Les positions des molécules d'eau localisées et sautillantes sont illustrées par la Figure 3.9.

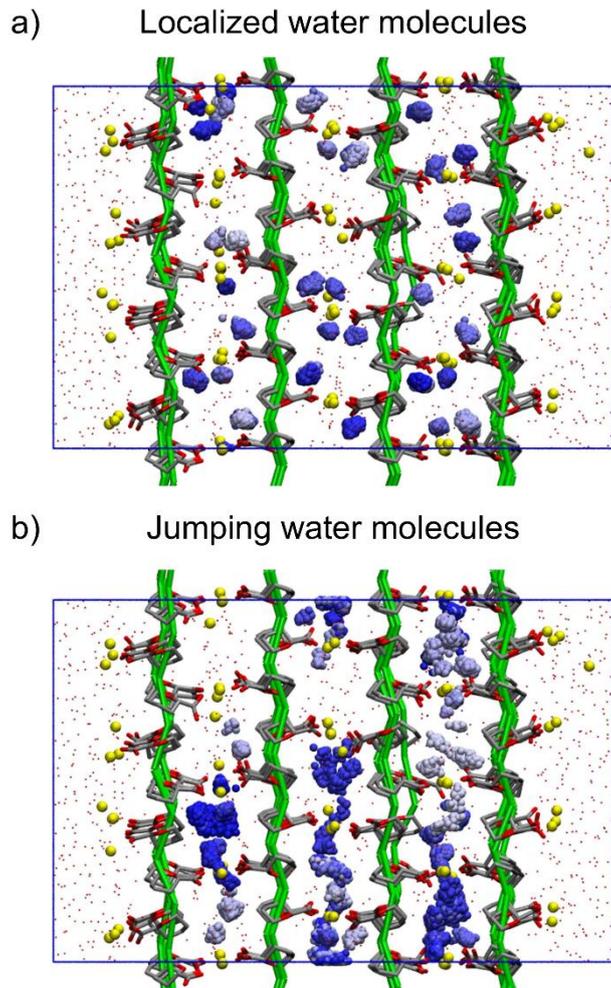


Figure 3.9 Molécules d'eau localisée (a) et sautillante (b) dans l'environnement modélisé (fibre de polyGalA en vert et ions calcium en jaune). Chaque groupe de couleur bleutée représente 1000 positions instantanées échantillonnées chaque nanoseconde d'une molécule d'eau sur une période de 1 $\mu$ s.

Les groupements des molécules d'eau de la Figure 3.9 représentent la position des molécules d'eau qui ont une dynamique de rotation et de translation particulièrement lente. La population totale des molécules d'eau localisées est de 46 sur 1100 molécules, soit environ 4% des molécules d'eau présentes dans la simulation. Ces molécules se trouvent principalement soit dans la sphère d'hydratation des ions calcium, soit liées par des liaisons hydrogène aux carboxylates et aux groupes hydroxyle des chaînes de polyGalA (Figure 3.8 a).

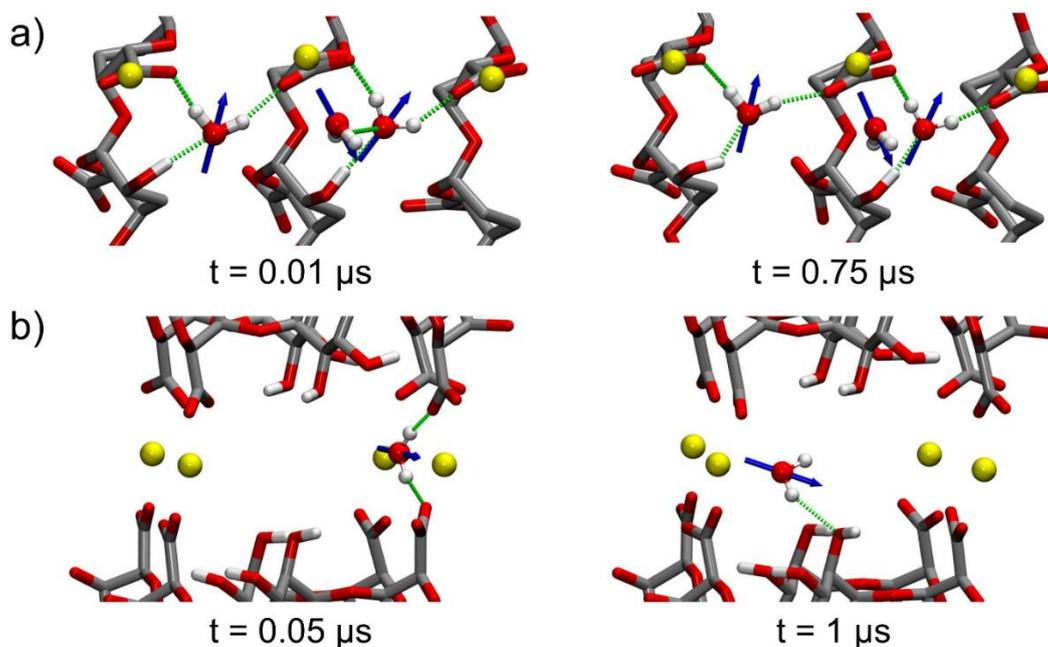


Figure 3.10 a) Molécules d'eau localisée retenue par des liaisons hydrogène aux chaînes de polyGalA. b) Molécule d'eau sautillante entre deux chaînes de polyGalA.

Pendant la durée de simulation ( $1 \mu\text{s}$ ), aucune translation des molécules localisées n'est observée et évidemment aucun coefficient de diffusion translationnel ne peut être calculé. La dynamique des molécules d'eau localisées est dominée par une oscillation de leur dipôle électrique sous la forme d'un cône le long d'une direction préférentielle (comme l'axe de la chaîne de PolyGalA ou l'axe moyen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oxygène) (Figure 3.10). Dès lors, la dynamique du vecteur H-H dont l'orientation par rapport au champ magnétique gouverne les mécanismes de relaxation RMN est anisotrope. Ce vecteur présente un temps de corrélation moyen d'environ  $0,54 \cdot 10^{-9} \text{ s}$ , un temps bien plus long que celui des molécules d'eau libre ( $\tau_1^{HH} \approx 1,4 \cdot 10^{-12} \text{ s}$  pour les molécules d'eau du modèle TIP3P ; van der Spoel et al., 1998a).

La seconde population de molécules d'eau sautillantes compte 24 molécules qui présentent une dynamique translationnelle entre au moins 2 sites. Leurs déplacements carré moyen, avec un temps de corrélation de  $0,1 \mu\text{s}$ , varient entre  $0,3$  à  $15 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$ , avec une valeur moyenne de  $7 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$ . Cela correspond à un coefficient d'autodiffusion apparent  $D$  de  $3,5$  ou  $1,2 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , en supposant respectivement une diffusion 1D ou 3D ( $\text{MSD}(t)=2 \cdot D \cdot t$  ou  $\text{MSD}(t)=6 \cdot D \cdot t$ ). Ces valeurs estimées sont entre 2 et 7 fois plus grandes que celles obtenues lors de l'ajustement par le modèle translationnel/rotationnel ( $\sim 0,5 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour les gels calcium et zinc, Tableau 3.2,).

Il est important de noter cependant que la durée de simulation est trop courte pour obtenir un coefficient de diffusion bien défini pour des diffusions aussi lentes. En effet, un temps de simulation de 10 à 100  $\mu\text{s}$  serait plus approprié. De plus, l'utilisation d'équations simplistes pour estimer la diffusion relative ou l'autodiffusion est remise en question dans le sens où les hypothèses de départ (interaction avec sphère dure ou mouvement Brownien peuvent ne pas être applicables au centre des fibres de l'hydrogel. La dynamique rotationnelle dépend de la nature des sites explorés (ions calcium, fonction carboxylates, et hydroxyles du polyGalA...) ce qui peut impliquer un changement dans l'environnement local des liaisons hydrogène (voir Figure 3.10.b). Le temps de corrélation rotationnelle trouvé par simulation est environ 2 fois plus court que celui des molécules d'eau localisées ( $0,5 \cdot 10^{-9}$  s contre  $0,25 \cdot 10^{-9}$  s), et donc plus court que les temps de corrélation obtenus par les profils RMN ( $1,5\text{-}2,0 \cdot 10^{-8}$  s, Tableau 3.2).

### 3. Discussion

Les simulations de dynamique moléculaire ont révélé des dynamiques rotationnelles et translationnelles couvrant de 3 à 5 ordres de grandeur confirmant ainsi l'hypothèse principale selon laquelle il existe plusieurs populations d'eau avec des dynamiques différentes pouvant affecter les profils de relaxation RMN à bas champ. Deux populations de protons présentant une dynamique très lente (localisée et sautillante) ont été identifiées avec des temps de corrélation et des coefficients d'autodiffusion relativement proche de ceux observés grâce au modèle RT. Il convient néanmoins de noter que le temps de simulation ( $1 \mu\text{s}$ ) ne permet pas de calculer les coefficients de diffusion avec une grande précision, mais elle confirme l'existence de populations jusqu'alors hypothétiques.

Le modèle  $2\beta$  n'est pas être exclu. Selon l'hypothèse principale de ce modèle il existe des sites  $\beta$  capables d'adsorber fortement les molécules d'eau ralentissant ainsi les dynamiques moléculaires. Les molécules d'eau sautillantes et localisées pourraient très bien se trouver dans de tels sites. Les populations respectives des deux sites de rotation mesurés par RMN sont dans un rapport 1 : 2 (Tableau 3.5), ce qui est très proche du rapport des populations déterminées en dynamique moléculaire entre molécules localisée et sautillantes 24 : 46.

Le profil obtenu à partir du gel deutéré indique qu'il y a certainement deux dynamiques de rotation et probablement pas de phénomène de translation. Le premier modèle RT semble alors affaibli, il permet néanmoins d'obtenir des populations de protons ayant des

mouvements lents du même ordre de grandeur que les populations de protons situés dans le voisinage direct des chaînes de polyGalA (protons aliphatiques, carboxylate, ou couche d'hydratation des ions réticulés). La simulation de dynamique moléculaire permet, elle aussi, d'identifier deux populations de protons largement minoritaires avec des mouvements fortement ralentis.

#### **IV. Conclusion**

Dans ce chapitre, les dynamiques lentes de molécules d'eau dans deux hydrogels à base de polyGalA formulés avec des ions calcium ou zinc en utilisant la relaxométrie à cycle de champs rapide. Trois modèles ont été considérés pour expliquer ces dynamiques lentes.

Le premier modèle considère des mouvements translationnels et rotationnels de molécules d'eau à l'intérieur des fibres de polysaccharide du gel. Ce modèle suggère des coefficients de diffusion apparente de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , une valeur typique pour les polymères. De manière cohérente, les temps de corrélation rotationnelle observés dans les gels entiers et dans les tranches sont 4 ordres de magnitude plus lente que dans de l'eau libre ( $10^{-8} \text{ s}$  contre  $10^{-12} \text{ s}$ ).

En se basant sur les résultats obtenus par les simulations de dynamique moléculaire, deux populations d'eau à la dynamique très lente ont été identifiées. La première population, composée de molécules d'eau localisées à l'intérieur des fibres, étant retenues par des liaisons hydrogène avec le polyGalA ou se trouvant dans les couches primaires d'hydratation des ions réticulants. La deuxième population présente des propriétés dynamiques similaires à celles de l'eau d'hydratation, mais est capable de passer d'un point localisé à un autre par des sauts. Dans les deux cas, les dynamiques observées sont fortement anisotropes et lentes.

Le profil  $^2\text{H}$  du gel deutéré met en question le premier modèle en excluant l'observation d'un mécanisme de relaxation par diffusion translationnelle. Cependant les profils sont parfaitement reproduits par deux dynamiques rotationnelles (à la place d'une dynamique rotationnelle et d'une dynamique translationnelle).

Le profil de relaxation des gels deutéré suggère un deuxième modèle (BSDM) basé sur une marche de Lévy. Ce modèle conduit à un déplacement des molécules d'eau à la surface de la fibre de 19 nm quelle que soit l'hétérogénéité du gel. Mais le profil deutérium ne peut pas

être ajusté avec une seule dynamique rotationnelle. Deux populations de molécules d'eau avec des temps de corrélation rotationnelle distincts sont nécessaires. Il est difficile de situer ces deux sites à la surface de la fibre. De plus, dans les simulations de dynamique moléculaire, rien n'indique clairement qu'une marche de Lévy puisse se produire à la surface des fibres. Il est probable que les molécules d'eau privilégient l'échange avec le bulk plutôt que de résider longuement à la surface.

Un troisième modèle ( $2\beta$ ) propose des sites de forte adsorption (sites  $\beta$ ). Quantitativement, le ratio des populations de ces deux sites estimé à partir du profil deutérium est en accord avec les simulations moléculaires. Dans ce cas la relaxation pourrait effectivement être associée aux molécules d'eau qui structurent la fibre.

Le modèle  $2\beta$  qui semble le plus probable pour l'instant, devrait être confirmé par des calculs de modélisation numérique plus approfondis. La coexistence d'un site  $\beta$  où une translation lente est observée (molécules sautillantes). De plus, un site  $\beta$  occupé par des molécules localisées pourrait probablement faire converger les résultats de la modélisation RT et des observations en deutérium, à condition que le temps de corrélation translationnelle des molécules d'eau dans le site  $\beta$  soit proche du temps de corrélation rotationnelle des molécules localisées dans le site  $\beta'$ . Il convient de souligner que ce chapitre de thèse a permis de mettre en évidence que les profils RMN obtenus à bas champ sont principalement influencés par les dynamiques lentes d'une petite fraction de molécules d'eau, représentant moins de 1% de l'ensemble des molécules d'eau présentes dans le gel. Les molécules d'eau libres, quant à elles, contribuent significativement au signal, mais n'ont pas d'impact sur la forme du profil, qui est essentiellement déterminée par les dynamiques lentes.





# Chapitre 4 Détermination de la taille de réseau des hydrogels de polygalacturonate.

## Introduction

La relaxométrie RMN s'est largement illustrée dans l'analyse des matériaux poreux souvent inorganiques comme les céramiques, les ciments, les sédiments et les autres sols (Brax et al., 2019, 2018; Jaeger et al., 2009; Mitreiter et al., 2010). En particulier, elle est utilisée pour l'étude de leur contenu comme dans le cas des roches et des sols pétrolifères (Golsanami et al., 2016). Dans ces matériaux, le principe est d'utiliser la différence de relaxation entre l'eau en interaction forte avec la surface du solide et l'eau libre (*bulk*) présente au centre des pores. Les teneurs en eau dans ces matériaux inorganiques sont souvent très faibles (0,7-2,0%). Les tailles de pore sondées dans ces matériaux sont comprises entre 2 nm et 100  $\mu\text{m}$  (Lyu et al., 2018; Steiner, 2011). L'objectif de ce chapitre est de transposer ce principe de mesure appliquée aux mésoporeux à la détermination des tailles de réseau dans des hydrogels. Toutefois, il convient de prendre en compte des différences non négligeables. Tout d'abord, contrairement aux mésoporeux, les gels ne sont pas constitués de cavités plus ou moins remplies d'un fluide. La structure du gel est en réalité composée de fibres hydratées qui s'entrecroisent, et sont immergées dans une solution. De plus, la teneur en eau des hydrogels est généralement beaucoup plus élevée (96 – 98%) que celle des mésoporeux.

Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux d'Aline Maire du Poset, (2018), qui a utilisé la diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA), rhéologie dynamique dans la partie Near de gels Ca-polyGalA, Zn-polyGalA et Fe-polyGalA obtenus par gélification externe. Cette taille de réseau est associée à la longueur de persistance ( $L_p$ ) du polyGalA qui est de 7 nm. En effet, dans la partie Near les chaînes de polyGalA se concentrent jusqu'à atteindre une valeur proche de leur  $L_p$ . Dans les autres parties du gel (Mid et Far), les tailles de réseau sont plus élevées et dépassent la fenêtre d'observation de la DNPA. Il serait nécessaire d'utiliser des techniques telles que la diffusion des neutrons aux très petits angles pour les étudier.

Dans ce chapitre, nous décrivons d'abord le modèle physique utilisé pour la détermination de la taille de réseau par relaxométrie. La méthode sera ensuite appliquée à deux gels

diamagnétiques hétérogènes (Ca-polyGalA et Zn-polyGalA) obtenus par gélification externe, ainsi qu'à un gel homogène (CaCO<sub>3</sub>-polyGalA) obtenu par gélification interne (Chapitre 2).

## I. Théorie de la diffusion et de la relaxation de l'aimantation de l'eau "libre" dans un système hydrogel

### 1. Solution générale de l'équation de diffusion

Chui et al. (1995) ont développé une méthode de détermination des distributions de taille de réseau à partir des temps de relaxation des protons de l'eau du gel. La méthode est basée sur les équations de diffusion de la densité de magnétisation dans des matériaux poreux (Brownstein and Tarr, 1979a; Cohen and Mendelson, 1982; Gallegos et al., 1988; Glaves et al., 1989). Le modèle de Chui décrit une longue fibre qui peut se replier et qui possède un rayon  $R_f$ , entourée d'un espace annulaire de rayon  $c$  où la relaxation de l'eau est affectée par l'interaction avec la fibre (Figure 4.1.a). A noter que la fibre peut être une chaîne polymérique ou une association de plusieurs chaînes (dimère ou multimère).

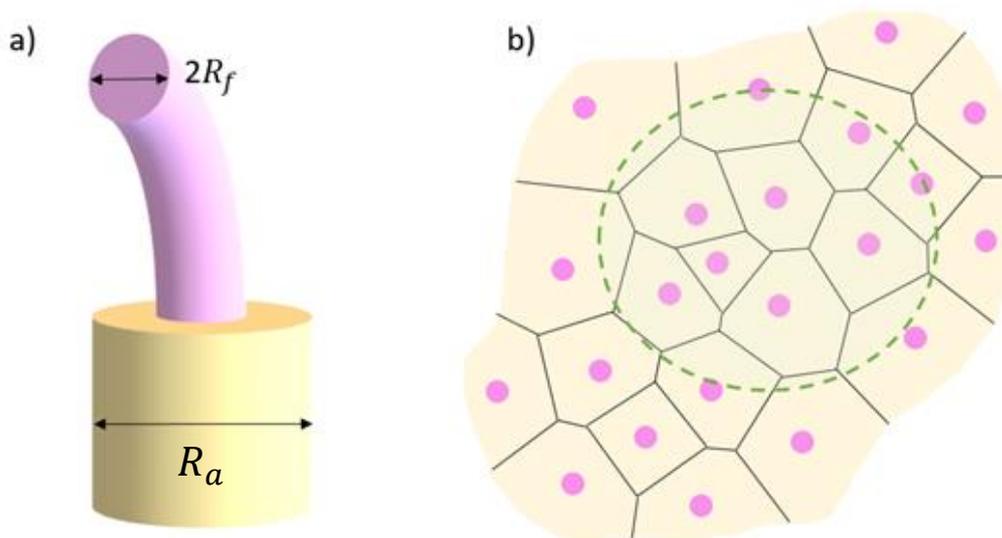


Figure 4.1 a) Représentation du modèle de Chui, en rose la fibre de rayon  $R_f$ , en jaune l'espace annulaire de relaxation de rayon  $R_a$ . b) Schéma de coupe du réseau de fibre d'un hydrogel où des agrégats d'espace annulaire sont représentés. Les segments correspondent aux lieux de la condition :  $\vec{\nabla}\rho(\vec{r}, t) = \vec{0}$ . L'espace inclus dans la ligne pointillée verte symbolise la cellule de diffusion d'une molécule d'eau (pendant le temps de l'expérience) initialement située en son centre.

Le traitement algébrique de ce problème est classique et connu dans d'autres branches de la physique, en particulier pour l'étude des transferts de chaleur. Nous nous limiterons à l'énoncé de l'équation différentielle de diffusion, aux conditions aux limites utilisées pour résoudre cette équation et à la solution générale. L'équation partielle différentielle de diffusion de la densité de magnétisation pour un milieu isotrope est décrite par l'équation suivante (Brownstein and Tarr, 1979a):

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(\vec{r}, t) = D \nabla^2 \rho(\vec{r}, t) - \mathcal{V} \rho(\vec{r}, t), \quad 4.1$$

Avec  $\rho(\vec{r}, t)$  la densité de magnétisation à un temps  $t$  et à une position  $\vec{r}(x, y, z)$ .  $D$  est le coefficient d'autodiffusion des molécules d'eau que l'on considère un milieu isotrope mais le traitement s'accommode sans difficulté particulière d'un tenseur de diffusion.  $\mathcal{V}$  exprime la vitesse de la relaxation de l'eau indépendamment de toute interaction avec une surface (eau libre).

Il est à noter que lorsque aucune interaction avec une surface n'est présente, c'est-à-dire lorsque le volume entre deux surfaces est trop grand ou lorsqu'il n'y a tout simplement pas de surface, le terme de Laplace de l'équation 4.1 peut être négligé, de même que la dépendance spatiale de la densité de magnétisation. L'équation différentielle devient alors triviale et on obtient  $\mathcal{V} = 1/T_1$ , en accord avec les équations de Bloch.

Le signal expérimental  $M(t)$  est relié à  $\rho(\vec{r}, t)$  par une intégration sur l'espace de volume  $V$ :

$$M(t) = \int_V \rho(\vec{r}, t) dV. \quad 4.2$$

Trois conditions sont posées pour la résolution de l'équation 4.1.

- La première condition exprime un équilibre uniforme à  $t=0$ . Dans ce cas, la densité de magnétisation s'écrit selon l'équation (4.3) :

$$\rho(\vec{r}, 0) = \frac{M(0)}{V}, \quad 4.3$$

Où  $M(0)$  est la magnétisation totale de l'échantillon au temps initial,  $V$  est le volume de l'échantillon.

- La seconde condition exprime une continuité à la bordure entre la fibre et le volume annulaire entourant la fibre.
  - Dans le volume annulaire, la variation spatiale (le gradient) de l'aimantation, peut s'exprimer comme  $\vec{\nabla}\rho(\vec{r}, t)$ . Cette quantité évolue dans le temps par diffusion, et s'exprime comme  $D\vec{\nabla}\rho(\vec{r}, t)$ . Lorsqu'elle est projetée sur un vecteur normal à la fibre pointant vers le centre de celle-ci, elle donne l'évolution temporelle de l'aimantation à la surface de la fibre dans la direction de la fibre, du côté du volume annulaire.
  - Dans la fibre, aucune diffusion d'eau n'est considérée, et la fibre est traitée comme une entité relaxante. Elle est assimilée à un puit de relaxation ayant une capacité de relaxation à la surface  $\mathcal{M}$ , défini comme un scalaire phénoménologique, exprimé comme une vitesse qui pourrait être associée à une vitesse de déplacement des molécules d'eau permettant la même relaxation que sur la fibre. Etant donné qu'il n'y a pas de diffusion à la surface de la fibre, la magnétisation est forcément  $\rho(\vec{r}, t)$ . Ainsi, la condition de bord de Neumann peut être formulée de la manière suivante :

$$D\vec{\nabla}\rho(\vec{r}, t) \cdot \vec{n} = -\mathcal{M}\rho(\vec{r}, t) \Big|_{\text{à la surface de la fibre}} \quad 4.4$$

- Dans le cas d'un gel, où le volume relatif des fibres est faible, Chui et al., (1995) introduisent une deuxième condition aux limites : à une distance  $R_c$  (à partir du centre de la fibre), il n'y a pas de variation de magnétisation (Figure 4.1.b):

$$\vec{\nabla}\rho(\vec{r}, t) = \vec{0} \Big|_{R_c} \quad \vec{\nabla}\rho(\vec{r}, t) = \vec{0} \Big|_{R_a} \quad 4.5$$

Cela permet de couvrir deux possibilités : (i) il n'y a pas d'effet de relaxation de la fibre à partir de  $R_c$ , les molécules d'eau sont considérées comme libres au-delà de cette distance, ou (ii) il y a contact entre deux espaces annulaires de deux fibres et dans ce cas la densité de magnétisation est minimale (Figure 4.1.b).

Avec cette seconde condition aux limites, la solution générale analytique pour la magnétisation  $M(t)$  est une somme infinie d'exponentielles de mode ( $n$ ) (Brownstein & Tarr, (1979), Chui et al., (1995)) :

$$M(t) = M(O) \sum_{n=0}^{\infty} I_n e^{-\frac{t}{T_n^*}}, \quad 4.6$$

$T_n^*$  et  $I_n$  n'ont pas de dépendance avec les paramètres physiques du problème, mais expriment une solution numérique.

## 2. Solution particulière pour les gels

Il n'est pas possible de développer davantage les solutions de l'équation 4.6 sans prendre en compte la géométrie du système. La solution générale de l'équation 4.6 devient triviale (monoexponentielle) si l'on considère un régime de diffusion rapide, (c'est-à-dire lorsque la distance de diffusion de l'eau pendant l'expérience est supérieure à la taille du volume annulaire). La condition pour que la diffusion soit rapide peut être exprimée par :

$$\mathcal{M}R_c/D \ll \mathcal{M}R_a/D \ll 1, \quad 4.7$$

Dans le régime de relaxation rapide, Chui et al. ont montré que l'intégration de l'équation 4.1, sur la cellule de relaxation permet d'exprimer le temps de relaxation observé comme une combinaison du temps de relaxation de l'eau libre et du temps de relaxation de l'eau en interaction avec les fibres (Chui et al., 1995b).

$$\frac{1}{T_1^{obs}} = \frac{1}{T_{1,fw}} + \frac{1}{\tilde{T}_1} = \frac{1}{T_{1,fw}} + \frac{\mathcal{M}}{R_h}. \quad 4.8$$

Avec  $T_1^{obs}$  le temps de relaxation expérimental,  $T_{1,fw}$  est le temps de relaxation de l'eau libre.  $\tilde{T}_1$  est le temps de relaxation des molécules d'eau en interaction avec la fibre.

Une nouvelle quantité apparaît :  $R_h$ , c'est le rayon hydraulique du réseau des fibres, défini comme le rapport du volume annulaire sur la surface des fibres :

$$R_h = \frac{V_{annular\ cell}}{S_{fiber}}. \quad 4.9$$

$R_h$  est une grandeur essentielle puisqu'elle exprime une longueur structurale qui permet d'accéder à la taille du réseau.  $R_h$  peut être estimé en considérant le déplacement quadratique moyen d'une molécule d'eau pendant le temps de l'expérience  $t$  :

$$l_D = \sqrt{6Dt}, \quad 4.10$$

Lors d'une expérience utilisant une séquence d'inversion récupération, le temps de l'expérience peut varier de 1 ms à 15 s. En considérant le coefficient de diffusion de l'eau libre ( $D=2,2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ), la longueur de diffusion peut varier de 37 à 445  $\mu\text{m}$ . Pour une longueur du réseau de l'ordre 40 nm, pendant la durée de l'expérience, les molécules d'eau ont une probabilité suffisamment élevée d'interagir plusieurs fois avec la surface de la fibre. La relaxation par contact des molécules d'eau avec la fibre devient importante et peut être détectée par RMN.

La grande distance de diffusion de l'eau implique qu'il n'y a probablement pas ou peu d'eau libre qui relaxe sans aucune interaction avec les fibres (relaxation directe) ou sans interagir avec une autre molécule d'eau qui a elle-même interagi avec la fibre (relaxation indirecte). Dans cette hypothèse, Chui propose de choisir un rayon annulaire  $R_a$  de telle sorte qu'au travers de l'échantillon, la fraction volumique des espaces annulaires soit égale à la fraction volumique des fibres de l'échantillon. Cela permet ainsi d'exprimer le rayon hydraulique de manière indépendante de la géométrie de la cellule annulaire (Chui et al., 1995a):

$$\langle R_h \rangle = \frac{V_{sample} - V_{fiber}}{S_{fiber}} \quad 4.11$$

Pour rendre compte de la diffusion sur de longues distances de l'eau entre les fibres du gel, il est nécessaire de considérer la notion de cellule de diffusion (qui est beaucoup plus grande que les espaces annulaires). Cela permet d'introduire le concept de distribution de taille de réseau en considérant des cellules de diffusion individuelles de tailles comparables, mais avec des densités de fibre différentes à travers du gel (Figure 4.1.b). Chui et al. considère alors que pour chaque cellule de diffusion  $i$ , il existe une relaxation de temps caractéristique  $\tilde{T}_i$  qui peut être exprimé suivant :

$$\frac{1}{\tilde{T}_{1,i}} = \frac{\mathcal{M}}{R_{h,i}} \quad 4.12$$

La magnétisation de l'échantillon peut alors être considérée comme une somme continue d'exponentielles décroissantes de temps caractéristique  $\tilde{T}$  associé à une distribution de probabilité  $P(\tilde{T})$ .

$$M(t) = e^{-\frac{t}{T_{1,fw}}} \cdot \int_0^{\infty} P(\tilde{T}) e^{-\frac{t}{\tilde{T}}} d\tilde{T} \quad 4.13$$

$P(\tilde{T})$  peut-être obtenu numériquement par transformée de Laplace inverse de la courbe de relaxation expérimentale. Cette inversion est faite par le logiciel UPEN (Borgia et al., 2000; G.C Borgia et al., 1998; G.C. Borgia et al., 1998). Toutefois, il faut corriger la courbe de relaxation expérimentale en annulant la contribution de l'eau libre avant d'effectuer la transformée de Laplace inverse ( $M(t) \cdot e^{t/T_{1,fw}}$ ). Le temps de relaxation de l'eau libre ( $T_{1,fw}$ ) peut être estimé dans les gels de polyGalA par la mesure du  $T_1$  des solutions de diffusion après la gélification externe. Etant donné que la diffusion a atteint un équilibre, la solution qui remplit le gel doit être équivalente à celle de diffusion elle-même.

Grâce à l'équation 4.12, la densité de probabilité des temps de relaxation  $P(\tilde{T})$  peut-être transformée en une distribution de rayon hydraulique :

$$P(R_h) = \mathcal{M} P(\tilde{T}) \quad 4.14$$

Le puit de potentiel de relaxation de la fibre  $\mathcal{M}$  peut être calculé grâce à la définition de l'espérance mathématique de  $P(\tilde{T})$  et de la valeur moyenne de la distribution de rayon hydraulique :

$$\frac{\mathcal{M}}{\langle R_h \rangle} = \langle \frac{1}{\tilde{T}} \rangle = \int_0^{\infty} \frac{1}{\tilde{T}} P(\tilde{T}) d\tilde{T}, \quad 4.15$$

Les symboles  $\langle \dots \rangle$  dans l'équation 4.15 représentent la moyenne sur toutes les cellules de diffusion.

La procédure numérique utilisée pour obtenir la distribution des rayons hydrauliques consiste donc à :

1. La suppression de la contribution de l'eau libre,
2. L'extraction de la distribution des temps de relaxation  $\tilde{T}_1$  par inversion de Laplace de la courbe de relaxation.
3. La multiplication de la distribution par le paramètre de puits de potentiel de surface  $\mathcal{M}$ .

Le paramètre  $\mathcal{M}$  est calculé en effectuant le produit de l'espérance mathématique de  $1/\tilde{T}$  (équation 4.15) par le rayon hydraulique moyen défini dans l'équation 4.11.

Un dernier point doit être pris en compte : le traitement mathématique décrit l'évolution du temps de relaxation du gel comme une distribution d'exponentielles décroissantes. Cependant, les signaux RMN enregistrés n'ont pas forcément cette allure et il convient de les transformer en un signal réduit. Par exemple, si on considère une courbe de relaxation monoexponentielle résultant d'une expérience d'inversion-récupération, d'écrite par :

$$M(\tau) = M_0 \left( 1 - 2e^{-\frac{\tau}{T_1}} \right) \quad 4.16$$

Sa contrepartie réduite sera :

$$M_r(\tau) = \frac{M(\tau) - M_0}{2M_0} = e^{-\frac{\tau}{T_1}} \quad 4.17$$

Plus généralement, même si le signal n'est pas monoexponentiel, le signal réduit correspondra au terme central de l'égalité précédente.

### 3. Accès à la taille du réseau des hydrogels

Le modèle de Chui (Chui et al., 1995a) permet de déterminer la distribution des rayons hydrauliques ( $R_h$ ) à partir d'une expérience de relaxométrie. Pour accéder à la taille du réseau, il est nécessaire d'introduire un modèle géométrique pour représenter le réseau de fibre. Scherer a testé trois modèles simples de gel où les fibres sont représentées par des cylindres qui s'entrecroisent suivant des structures régulières : cubique, octaédrique ou tétraédrique (Abrami et al., 2018; Scherer, 1994). Il est intéressant de noter que seule la forme cubique remplit intégralement l'espace, ce qui la rend plus adaptée à nos gels. Les modèle de Scherer

se distinguent des modèles couramment utilisés pour des matériaux poreux où les pores sont représentés à des surfaces planes (Gallegos et al., 1988).

Abrami a montré que pour un réseau cubique, la taille du réseau  $\xi$ , est solution d'une équation approximée qui ne dépend que du rayon de la fibre et du rayon hydraulique (Abrami et al., 2018):

$$\frac{\xi^3}{R_h R_f} - 3\pi \left(1 + \frac{R_f}{R_h}\right) \xi + 12\sqrt{2}R_f \left(1 + \frac{2R_f}{3R_h}\right) = 0 \quad 4.18$$

Dans le cas où  $R_f/R_h \ll 1$ , l'équation 4.18 peut se réduire à :

$$\xi = \sqrt{3\pi R_h R_f}, \quad 4.19$$

Cette approximation (équation 4.19) a tendance à surestimer légèrement la taille du réseau (au maximum) d'environ 7%. À l'inverse, si la condition  $R_f/R_h \ll 1$  n'est pas suffisamment respectée, la taille du réseau sera largement sous-estimée (voir Figure 4.2).

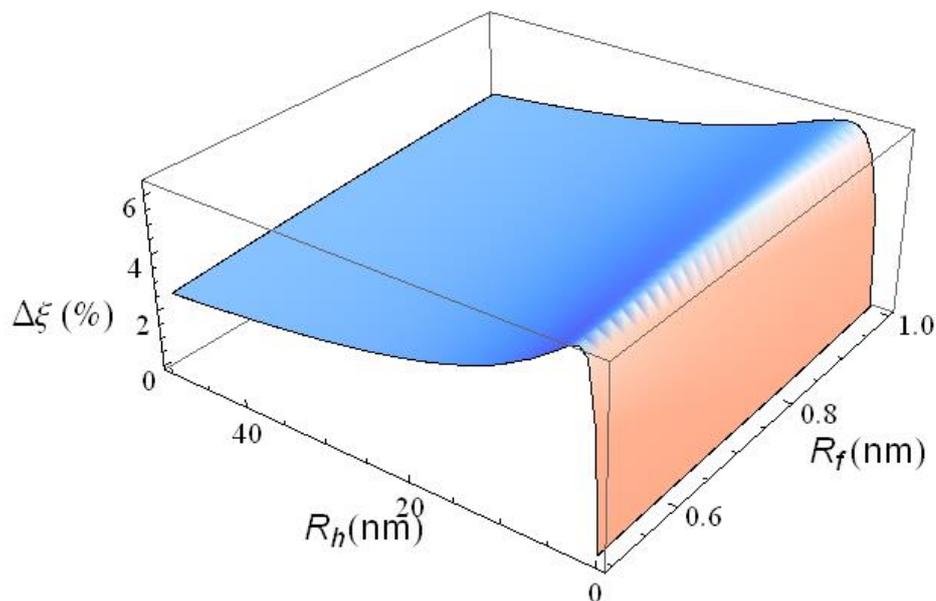


Figure 4.2 : Ecart relatif des tailles de réseau calculées avec les équations 4.18 et 4.19.

$$(\Delta \xi = (\xi_{4.20} - \xi_{4.19})/\xi_{4.19}).$$

La distribution de la taille du réseau d'un gel à maille cubique peut être obtenue en insérant la distribution de rayon hydraulique dans le gel (équation 4.14) dans l'équation précédente (équation 4.19).

Pour conclure, il convient de quantifier certaines grandeurs importantes inhérentes aux développements précédents et de vérifier la validité que certaines hypothèses :

- La fibre est considérée comme constituée de deux chaînes polygalacturonique (association minimale pour former un gel) de rayon  $R_f$  égal à 0,75 nm.
- Le rayon hydraulique  $R_h$  défini par l'équation 4.11 est estimé à 24 nm.
- Le paramètre  $\mathcal{M}$  mesuré expérimentalement (équation 4.14) est de l'ordre de 10 nm/s

Ces valeurs permettent de vérifier la condition  $R_f/R_h \ll 1$ , ce qui justifie l'égalité 4.19. La condition de l'équation 4.7 équivalente à  $\mathcal{M}R_a \ll D$  est largement vérifiée ( $D=2,2 \cdot 10^9 \text{ nm}^2/\text{s}$ ) puisqu'il est très raisonnable de supposer  $R_a \ll 2,2 \cdot 10^8 \text{ nm}$ .

#### **4. Comparaison entre traitements monoexponentiels et inversions des courbes de relaxation des gels**

Avant de décrire les tailles de réseau mesurées dans les gels, nous désirons insister sur l'importance d'inverser les signaux, même si la courbe de relaxation semble être monoexponentielle.

La Figure 4.3 présente une courbe de relaxation typique obtenue sur un gel Ca-polyGalA. La courbe de relaxation est ajustée à l'aide d'une fonction monoexponentielle et la distribution des temps de relaxation est calculée à l'aide du logiciel UPEN. Il est important de remarquer qu'un ajustement monoexponentiel (visuellement satisfaisant) de la courbe expérimentale de relaxation ne permet d'obtenir qu'une valeur discrète du temps de relaxation longitudinale. À l'échelle macroscopique, cette valeur discrète du temps de relaxation pourrait être grossièrement associée à la valeur moyenne des temps de relaxation de l'ensemble des protons présents dans le gel.

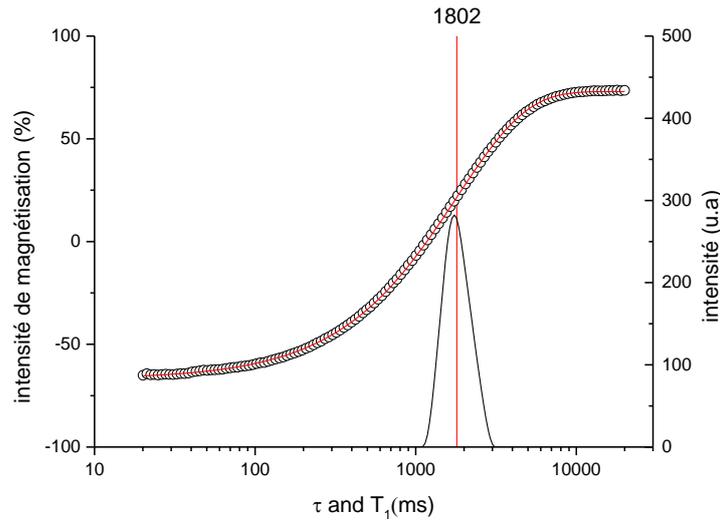


Figure 4.3 Courbe de relaxation expérimentale (o) et son ajustement monoexponentiel (courbe rouge) d'un gel Ca-polyGalA. La distribution des temps de relaxation longitudinaux (courbe noire) est obtenue grâce au logiciel UPEN.

Sur la Figure 4.3, l'ajustement de la courbe de relaxation à l'aide d'une fonction monoexponentielle donne un temps caractéristique de 1,80 s. Cependant, l'analyse effectuée avec le logiciel UPEN révèle une distribution de temps de relaxation dont le centre de masse se situe à 1,74 s, et qui s'étend de 1 à 3 s. Dans le cadre d'un diagnostic rapide, l'approche monoexponentielle permet d'obtenir un temps de relaxation proche du maximum de la distribution. Cependant, cette approche occulte la distribution et conduit à une sous-estimation des temps de relaxation de l'échantillon, qui peuvent s'étendre jusqu'à 3s. cela peut entraîner l'utilisation d'un temps de recyclage trop court, provoquant une saturation partielle du signal et altérant les quantifications.

## II. Résultats

### 1. Application aux gels externes de calcium

#### 1.1 Mesure de la taille de réseau par RMN

Dans un premier temps, des courbes de relaxation de gels complets de Ca-polyGalA ont été enregistrées (Figure 4.4). Ensuite, les gels ont été découpés de manière reproductible en 3 tranches (Chapitre 2) et les courbes de relaxation pour chaque tranche ont été collectées. Un exemple de distributions de temps de relaxation d'un gel complet et de ses tranches sont reportées dans la Figure 4.4. Les expériences ont été réalisées en triplicata, et des distributions obtenues sur d'autres gels sont présentées en annexe.

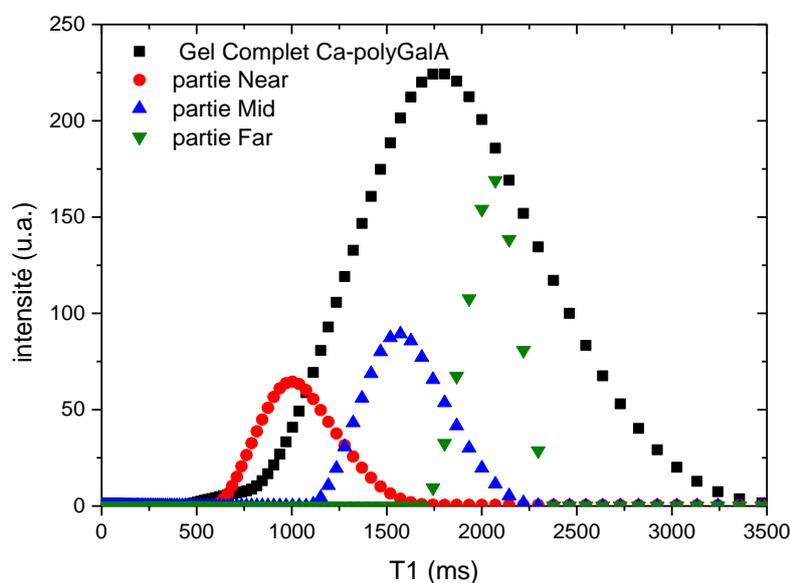


Figure 4.4 Distribution des T<sub>1</sub> d'un gel complet Ca-polyGalA (carrés noirs) comparé aux distributions mesurées dans ses tranches nommées Near (ronds rouges), Mid (triangles bleus) et Far (triangles inversés verts) en fonction de leur position par rapport à la membrane de dialyse.

Remarquablement, on peut observer sur la Figure 4.4 que, les distributions de temps de relaxation des tranches de gels sont beaucoup moins étendues que celle du gel complet. Par exemple, les valeurs de T<sub>1</sub> obtenues pour la partie Near varient de 0,6 à 1,75 s, tandis que pour le gel complet, elles s'étendent de 0,5 à 3,5 s.

Lorsque l'on se déplace de la tranche Near vers la tranche Far, on observe que le centre de masse de la distribution des distributions augmente de manière significative, ce qui traduit

une relaxation moins efficace. Cela est associé à une taille de réseau plus grande où l'interaction statistique entre l'eau et les fibres se produit moins fréquemment. Par ailleurs, la distribution de la partie Mid présente un centre de masse proche de celui du gel complet.

Comme indiqué dans la section précédente, le passage de la distribution de temps de relaxation à la distribution de taille de réseau nécessite la connaissance du temps de relaxation de l'eau libre dans le gel. Celui-ci est déterminé par la mesure du temps de relaxation de la solution de cation après la gélification. Des valeurs identiques ont été obtenues pour des solutions de calcium ou zinc :  $T_{1,fw,Ca} = T_{1,fw,Zn} = 2,8$  s.

La Figure 4.5 reporte les distributions de taille de réseau du gel complet et de ses tranches.

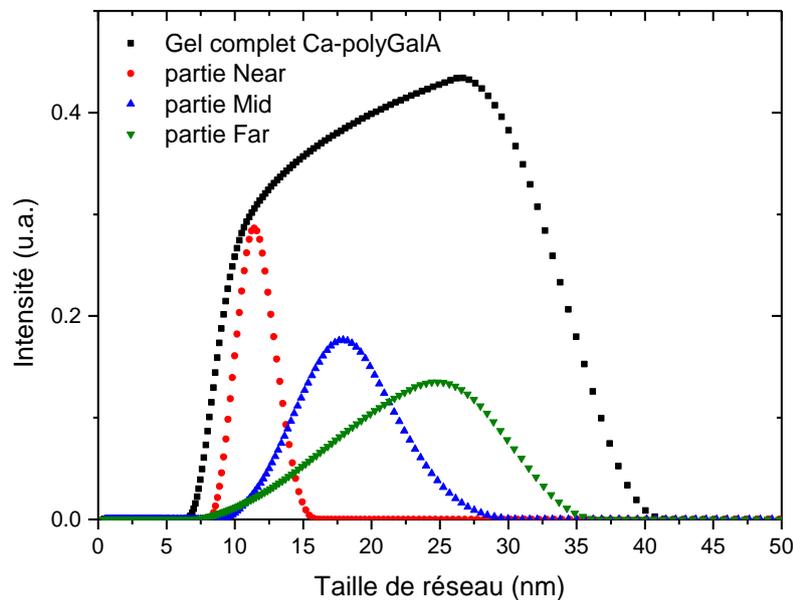


Figure 4.5 Distribution de taille de réseau obtenue par relaxométrie des protons d'un gel polyGalA-Ca<sup>2+</sup> (carrés noirs) comparé aux distributions de ses propres tranches Near (disques rouges), Mid (triangles bleus) et Far (Triangles inversés verts).

La distribution de la taille du réseau dans le gel complet s'étend de 7 à 40 nm. Comme attendu, lorsque l'on examine les distributions de taille de réseau de la tranche Near à la tranche far, on observe une augmentation de la taille de réseau, qui découle de l'augmentation des temps de relaxation observée sur la Figure 4.4. La partie Near présente les tailles de réseau les plus faibles (de 7 à 15 nm), dans la partie Mid les tailles de réseaux augmentent (de 10 à 27 nm), c'est dans la tranche Far que l'on observe la plus grande hétérogénéité et les plus grandes tailles de réseau (de 7 à 35 nm).

Les tailles de réseau minimales de chaque tranche sont très proches les unes des autres. Bien que les probabilités associées à cette taille soient faibles, le fait qu'elles soient semblables souligne que la taille de réseau minimale (7 nm, proche de la longueur de persistance du polyGalA,  $L_p$ ) observée par Maire du Poset et al. (2019) est présente de manière homogène dans tout le gel au niveau local. Cependant, cette taille observée en DNPA n'est pas majoritaire, avec la diminution de la concentration du polymère le long de la direction de diffusion.

## 1.2 Mesure de la taille de réseau par le module de Young

Afin de valider les valeurs obtenues par relaxométrie, le comportement rhéologique des gels Ca-polyGalA a été enregistré dans le domaine LVR. Les valeurs du module de Young ( $E$ ) sont comparées pour quatre tranches du gel. La montre une diminution du module de Young lorsque l'on passe de la tranche Near à la tranche Far. Cela permet de confirmer l'hétérogénéité du gel.

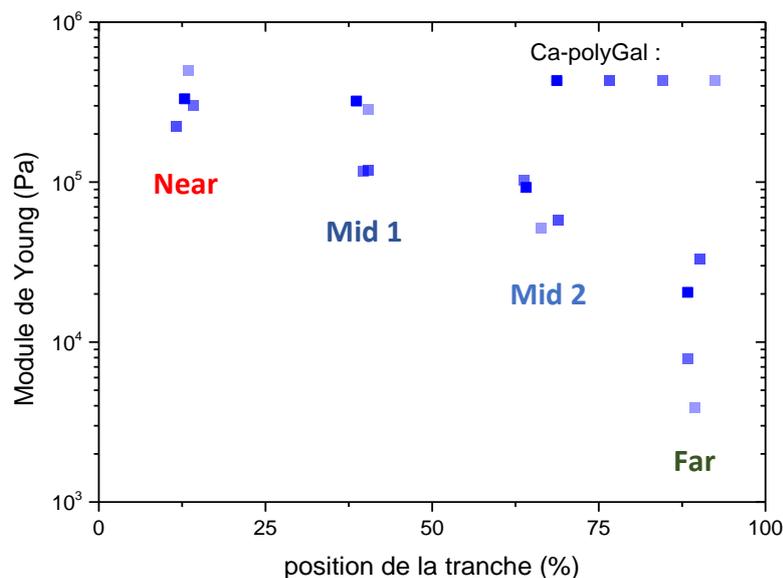


Figure 4.6 Comparaison des modules de Young de gels de Ca-polyGalA en fonction de la position du milieu de la tranche dans le gel complet. Quatre gels ont été testés, ils sont discriminés par un gradient de couleur bleue. Sur l'axe des abscisses, 0 et 100 représentent les deux extrémités des gels.

Les équations reliant le module de Young à la taille de réseau sont décrites dans le Chapitre 2, par l'équation 1.2. Il est important de rappeler que cette équation ne s'applique en toute rigueur qu'à des gels homogènes, c'est-à-dire lorsqu'il existe une répartition homogène dans

l'espace des points de réticulation (caractérisée par  $\rho_{CL}$ , la densité de réticulation dans l'équation 1.2). Il est probable que cette hypothèse soit raisonnablement vérifiée dans la partie proche de la membrane de dialyse du gel externe (Near), mais elle est moins adaptée aux parties plus hétérogènes (Mid et Far). Néanmoins, la méthode permet l'obtention d'une estimation de la taille de réseau et, faute de mieux, nous l'utiliserons aussi dans les parties Mid et Far.

La Figure 4.7 représente la taille de réseau en fonction de la position de la tranche dans le gel. Dans la partie la plus proche de la membrane de dialyse, on observe une taille moyenne de 4,1 nm. Dans les parties suivantes les tailles de réseau sont plus dispersées en raison de l'hétérogénéité des gels qui fait varier la structure d'un gel à l'autre. Pour les parties Mid (1 et 2), des tailles comprises entre 5 et 8 nm sont mesurées, tandis que pour la partie Far, ce sont des tailles entre 8 et 17 nm qui sont obtenues.

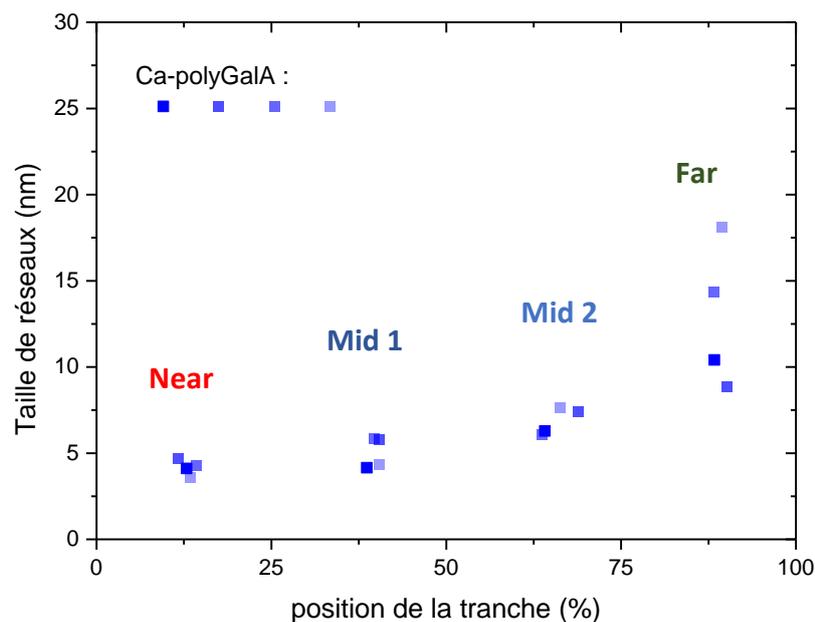


Figure 4.7 Tailles de réseau (nm) calculées à l'aide du module de Young, en fonction de la position de la tranche. Le gradient de couleur bleue distingue quatre répétitions.

### 1.3 Comparaison des résultats : gel externe Ca-polyGalA

La Figure 4.8 permet de comparer les résultats obtenus par relaxométrie, rhéologie et DNPA. Comme mentionné précédemment, la valeur observée par DNPA est de 7,5 nm, ce qui correspond à la limite inférieure des tailles de réseau associé à la longueur de persistance du

polymère ( $L_p$ ). Cette valeur limite est très proche de la valeur minimale observée par relaxométrie dans le gel complet. Cependant, la relaxométrie permet de mettre en évidence une distribution de taille de réseaux. Dans les gels Ca-polyGalA, la partie la plus dense en polymère (Near) présente des tailles de réseau proche des 7 nm, tandis que dans les parties supérieures, les tailles de réseau augmentent et deviennent plus dispersées, en raison des fluctuations locales de la densité de polymère dans la direction de diffusion. La rhéologie semble légèrement sous-estimer les tailles de réseau par rapport à la relaxométrie et à la DNPA. Cependant, des valeurs plus concordantes avec ces techniques ont été retrouvées par Maire Du Poset (Tableau 4.1), pour des gels formulés de la même manière mais présentant un rayon et un volume plus importants. Dans notre étude, les distributions de tailles de réseau obtenues par relaxométrie RMN pour les différentes parties sont corrélées avec les résultats obtenus par rhéologie et DNPA. Cela suggère que le modèle mathématique utilisé pour analyser les profils de relaxation produit des résultats cohérents.

Tableau 4.1 : comparaison de résultats issus de différentes méthodes utilisées pour déterminer la taille de réseau dans des gels Ca-polyGalA. Le symbole circonflexe symbolise le maximum de la distribution.

		Near	Mid 1	Mid 2	Far
Maire Du Poset et al. (2019)	$\xi$ (DNPA) (nm)	7,5	8,5	N.D.	N.D.
	E (Rhéologie) (kPa)	210	60	18	2
	$\xi$ (Rhéologie) (nm)	6	7,5	11	23
Résultats originaux	$\xi$ (Relaxométrie) (nm)	$[7, \widehat{11}, 15]$	$[10, \widehat{18}, 27,5]$	$[7,5, \widehat{25}, 35]$	
	$\xi$ (Rhéologie) (nm)	4	5	7	12.5

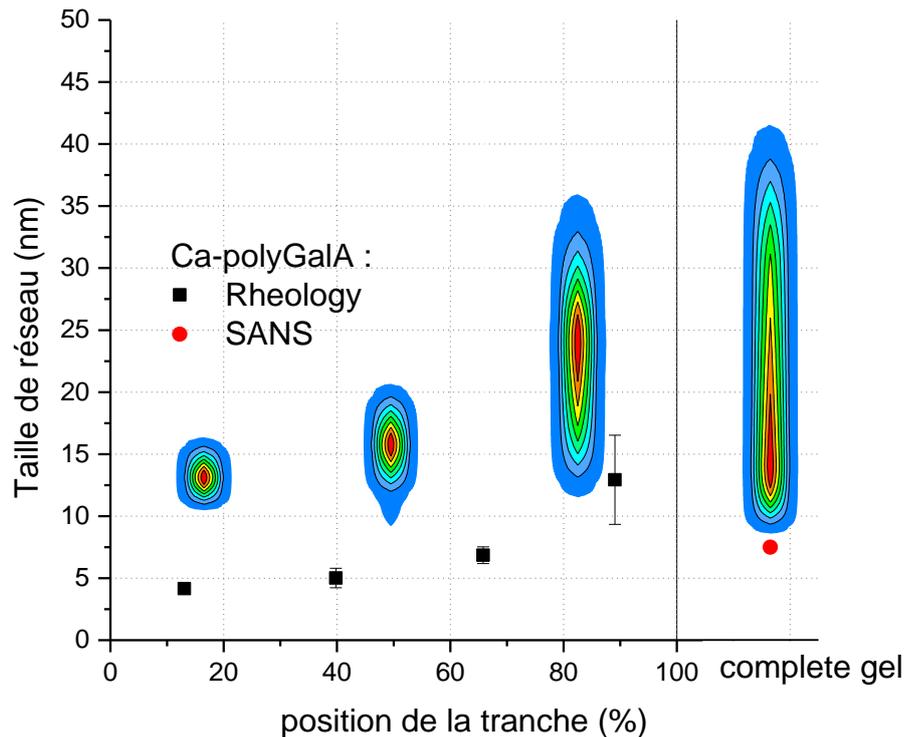


Figure 4.8 Comparaison des tailles de réseaux obtenue par mesure du module de Young (carré noir), DNPA (Rond rouge) et par relaxométrie (zone de couleur bleue = minimum, rouge = maximum) en fonction de la position de la tranche du gel mesurée et du gel complet.

## 2. Application aux gels internes de calcium

Un gel homogène  $\text{CaCO}_3$ -polyGalA obtenu par gélification interne (Chapitre 2) a été découpé en trois tranches. Par souci de clarté, la nomenclature Near, Mid et Far est conservée, bien qu'il n'y ait pas de membrane de dialyse dans la formation de ce type de gel. Dans ce contexte, la partie Near est celle qui se trouve au fond du tube lors de la gélification et la partie Far correspond à celle qui se trouve en surface.

La Figure 4.9(a) illustre la distribution des temps de relaxation observée dans un gel interne  $\text{CaCO}_3$ -polyGalA. Cette distribution est comparée à celle d'un gel externe réticulé par le même cation. On remarque que la distribution des temps de relaxation dans le gel interne est moins étendue que celle du gel externe. De plus, la distribution du gel interne de  $\text{CaCO}_3$ -polyGalA présente un pic plus prononcé et une forme gaussienne remarquable. En termes de valeurs, on retrouve des bornes allant de 1,3 à 2,1 s pour le gel complet de  $\text{CaCO}_3$ -polyGalA le gel de

Ca-polyGalA. Les temps de relaxation les plus longs et les plus courts, qui sont associés aux tailles de réseau les plus grandes et les plus petites observées dans le gel externe, disparaissent avec une gélification interne. On observe par ailleurs des similarités entre la distribution de la partie Mid du gel externe Ca-polyGalA et celle du gel interne CaCO<sub>3</sub>-polyGalA.

La Figure 4.9.b montre les distributions des tailles de réseau. Comme attendu, les distributions des tailles de réseau obtenues pour chaque tranche du gel interne sont très similaires les unes aux autres (contrairement aux distributions des tranches d'un gel externe). Cependant, il existe un léger décalage vers des tailles de réseaux plus élevées pour la partie supérieure du gel. Cela peut être expliqué par la sédimentation des particules de carbonate de calcium pendant l'acidification du milieu. En effet, durant les quelques minutes nécessaire à la solubilisation des particules, la gravité tend à concentrer les particules vers le fond du tube. Ainsi, la partie supérieure du gel peut contenir moins de calcium et gélifier légèrement plus tard, ce qui conduit à des tailles de réseau un peu plus grandes.

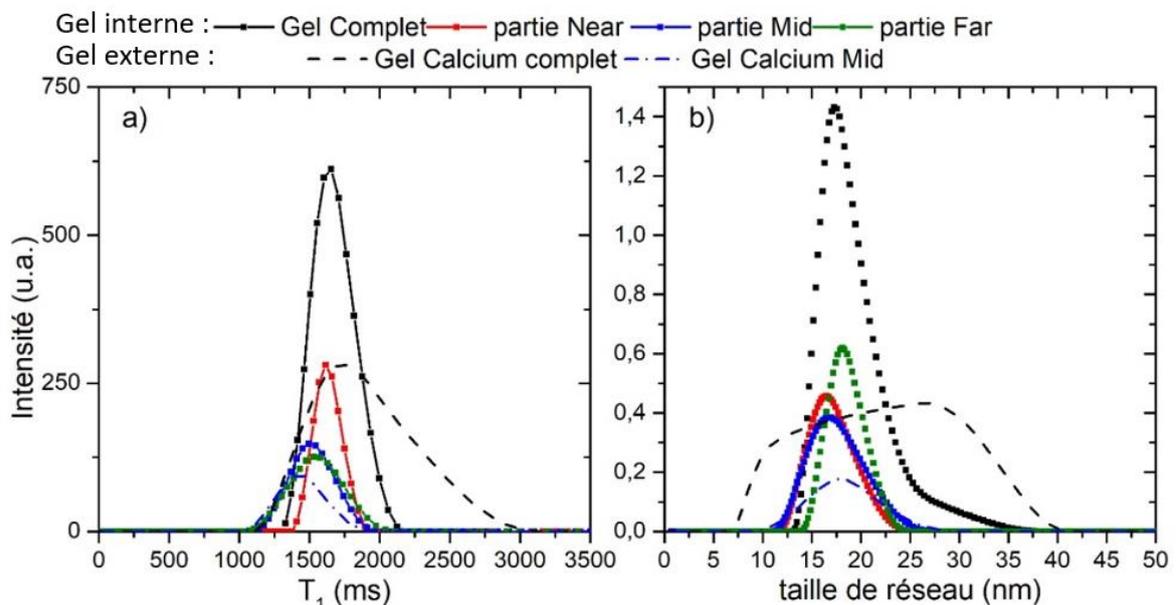


Figure 4.9 Distributions des temps de relaxation (a) et des tailles de réseau (b) d'un gel externe CaCO<sub>3</sub>-polyGalA (carrés noirs) comparé à ses propres tranches Near (ronds rouges), Mid (triangles bleus) et Far (triangles inversés verts). Les résultats sont comparés aux résultats obtenus sur un gel externe Ca-polyGalA complet (trait discontinu noir) et sa tranche Mid (ligne mixte discontinue bleue).

La comparaison des tailles de réseau obtenues par RMN et rhéologie (résultats présentés en Annexe C) est présentée dans la Figure 4.10. L'expérience permet de confirmer que les gels internes présentent un caractère homogène (Liu et al., 2003). Il faut néanmoins nuancer l'utilisation du terme homogène. En effet, la structure est plus homogène qu'un gel externe, mais la distribution des tailles de réseau met en évidence une certaine hétérogénéité dans la structure. Il s'agit de structures qui se forment spontanément lorsque le polyGalA est exposé à des cations réticulants, donnant lieu macroscopiquement à des structures aléatoires avec une fluctuation de la taille de réseau.

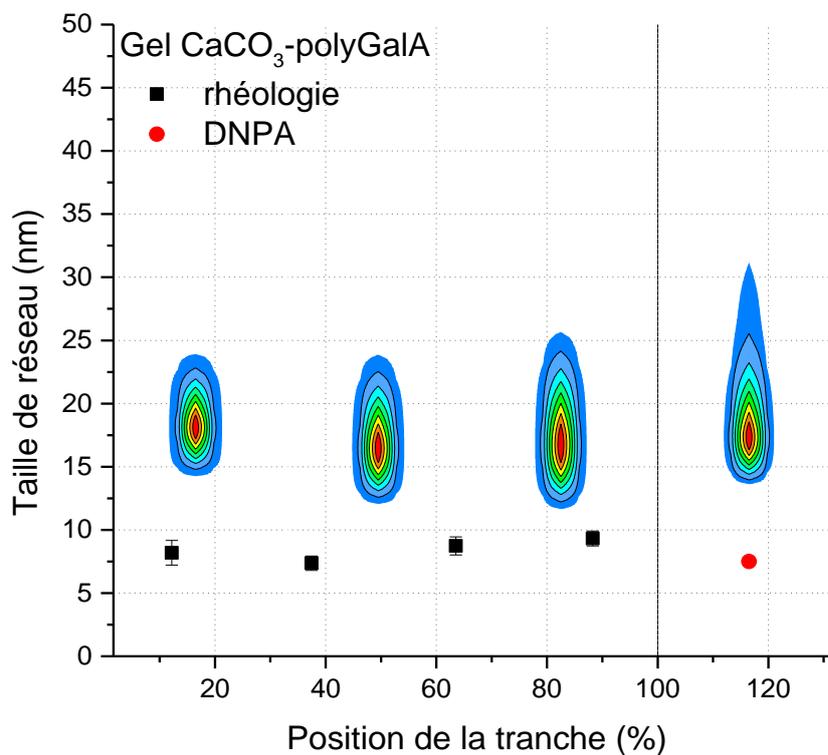


Figure 4.10 Comparaison des tailles de réseau obtenues par rhéologie (carrés noirs) et relaxométrie (zone de couleur bleue = minimum, rouge = maximum) en fonction de la position de la tranche du gel CaCO<sub>3</sub>-polyGalA. La distribution de taille de réseau du gel complet est reportée à droite. Le point rouge reporte à titre indicatif la taille du réseau obtenue par DNPA sur un gel externe.

Pour les gels internes, la relative homogénéité du gel donne plus de crédit à la valeur obtenue par rhéologie, car la condition initiale d'un gel homogène est mieux respectée. Les distributions des tailles de réseau obtenues par RMN témoignent d'une taille minimale de réseau légèrement plus élevée (12-22 nm) que la taille mesurée en rhéologie (~7,5 nm). Il convient de noter que les conditions initiales utilisées pour le calcul des tailles de sont les

mêmes que celles utilisées pour le traitement des gels externes bien que le mécanisme de gélification soit différent dans le cas des gels internes. Il est donc possible que ces conditions ne soient pas parfaitement adaptées et puissent expliquer les différences observées entre les résultats.

A titre informatif, l'impact des variations de certains paramètres utilisé pour le calcul de la distribution de taille de réseau, ( $R_h$ ,  $T_{1,fw}$  et  $\mathcal{M}$ ), est présenté en Annexe A.

### 3. Application aux gels externes zinc

Pour tester la robustesse de la méthode, un autre gel externe est analysé. Ce gel est formulé à partir des ions  $Zn^{2+}$  qui ont la particularité de former des liaisons monodentate avec les fonctions carboxylates de polyGalA (contrairement aux ions  $Ca^{2+}$  qui s'associent en mode bidentate). Cette différence d'association se traduit, à l'échelle macroscopique, par un gel Zn-polyGalA plus hétérogène que le gel Ca-polyGalA (Maire du Poset et al., 2019).

Les distributions de temps de relaxation pour le gel complet et ses tranches sont reportées sur la Figure 4.11. Les gels à base de zinc utilisés pour la RMN sont tranchés en seulement deux parties, en raison d'une synérèse plus importante par rapport aux gels Ca-polyGalA. La découpe en en deux parties égales permet de conserver dans chaque tranche une quantité de proton comparable à celle des tranches des gels Ca-polyGalA (c'est-à-dire des volumes comparables). Les gels Zn-polyGalA présentent des temps de relaxation très semblables à ceux des gels Ca-polyGalA. Etant donné que les structures sont très similaires et que les deux gels ne contiennent pas d'éléments paramagnétiques, il est normal d'obtenir des relaxations comparables. L'application du modèle permet également d'obtenir des tailles de réseau tout aussi comparables. Comme précédemment, la partie la plus proche de la membrane de dialyse montre un réseau de petite taille, celle-ci augmente lorsque l'on s'éloigne de la membrane. La taille minimale du réseau est légèrement supérieure à celle obtenue pour les gels de Ca-polyGalA (10 nm contre 7 nm), mais elle reste dans le même ordre de grandeur.

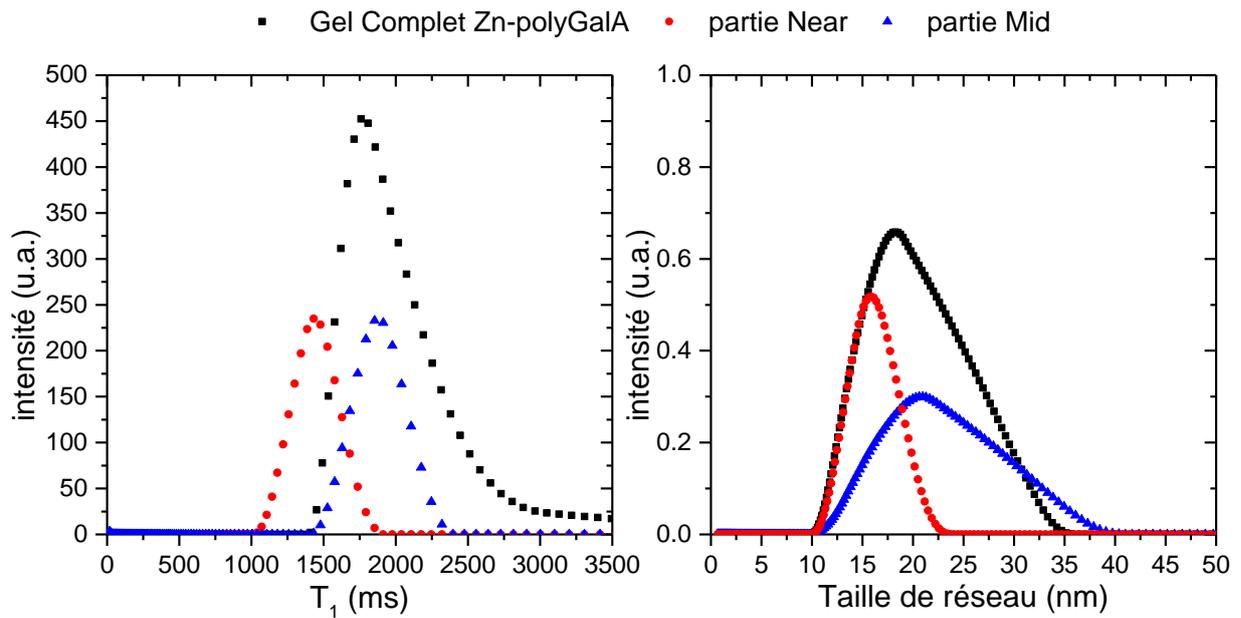


Figure 4.11 Distribution des temps de relaxation (a) et des tailles de réseau (b) d'un gel Zn-polyGalA complet (carrés noirs) comparé à ses propres tranches Near (ronds rouges) et Far (triangles bleus).

Les résultats de rhéologie (Figure 4.12, résultats en Annexe C) indiquent que Zn-polyGalA est un gel possédant un module de Young plus faible que Ca-polyGalA ( $E_{\text{Ca-polyGalA}} > E_{\text{Zn-polyGalA}}$ ), en particulier pour les parties Far. Ceci est probablement lié à la différence de mode d'association des chaînes de polyGalA avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (bidentate) et  $\text{Zn}^{2+}$  (monodentate). Dans la partie Far, en raison de la forte hétérogénéité du gel, les résultats obtenus par rhéologie ne sont pas très reproductibles. Dans la partie Near, la taille de réseau déduite des mesures rhéologiques est d'environ 6 nm, ce qui est proche de la valeur obtenue par DNPA sur les gels Ca-polyGalA. Les calculs des tailles de réseau à partir des mesures de relaxométrie donnent des résultats très similaires pour les gels Zn- et Ca-polyGalA. La taille minimale de réseau est proche de 7 nm et les tailles de réseau s'étendent de 7 à 35 nm.

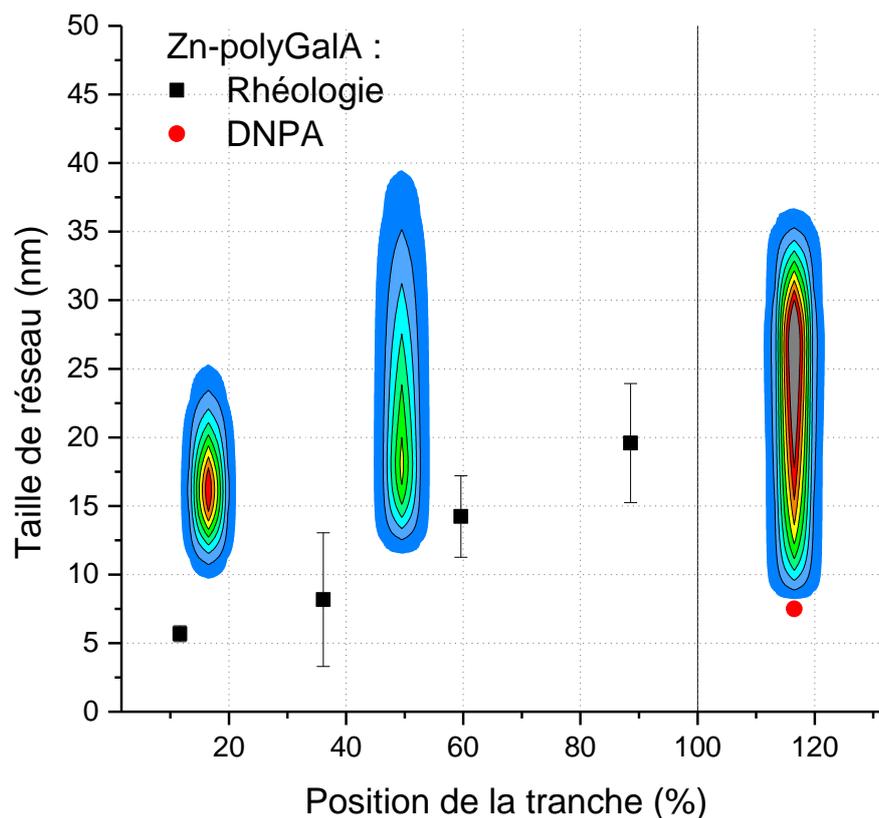


Figure 4.12 Comparaison des tailles de réseau obtenues à l'aide de la mesure du module de Young (carrés noirs), DNPA (Maire du Poset et al., 2019) (Rond rouge) et par relaxométrie (zone de couleur bleue = minimum, rouge/gris = maximum) en fonction de la position de la tranche du gel et du gel complet (à droite).

### III. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre de thèse, une méthode innovante de relaxométrie des protons a été utilisée pour analyser la taille de réseau des gels. Cette méthode exploite la différence de relaxation entre les protons se comportant comme une solution libre et les protons de l'eau qui relaxent grâce à leur interaction avec la surface des fibres du gel. À l'échelle macroscopique, le temps de relaxation longitudinale peut être décrit comme une combinaison de ces deux phénomènes. Moyennant une modélisation de la maille du réseau, la taille de réseau d'un gel peut être décrite à partir de mesures de  $T_1$ .

Dans les gels, la description monoexponentielle du phénomène de relaxation n'est pas adaptée car elle se limite à une estimation du temps de relaxation longitudinale moyen dans le gel. Cette approche fournit une information utile, elle limite la mesure des tailles de réseau

et peut conduire à des phénomènes de saturation du signal si on utilise des temps de recyclage trop courts, ce qui compromet la propriété quantitative de la RMN.

La description la plus adaptée reste une distribution des temps de relaxation obtenue par inversion des courbes de relaxation. En effet, dans le cas des gels externes, les parties les plus concentrées en fibre et les parties les moins concentrées montrent des temps de relaxation pouvant être séparés de 2 secondes ( $T_{1,\min} = 1 \text{ s}$  ;  $T_{1,\max} = 3 \text{ s}$ ) ce qui est considérable. La découpe du gel en plusieurs tranches et les mesures réalisées sur chacune d'elles permettent de confirmer l'hétérogénéité du gel. Les parties les plus proches de la membrane de dialyse (les plus concentrées en fibre de polyGalA) présentent des  $T_1$  très bas et les  $T_1$  augmentent graduellement avec la diminution de la concentration de fibre de polyGalA le long de la direction de diffusion.

Les tailles de réseau obtenues par RMN sont comparables de manière satisfaisante aux résultats de la DNPA et de la rhéologie. Cependant, seule la RMN permet une représentation quantitative de la distribution des tailles de réseau (de 7 à 40 nm Figure 4.13).

Des gels internes (plus homogènes) ont également été analysés. L'homogénéité supposée du gel est confirmée, malgré une distribution de taille de réseau dans chaque tranche. La plus grande homogénéité du gel permet d'accorder plus de crédit aux expériences rhéologiques dont on déduit une taille de réseau unique de 7 nm contre un minimum à 12 nm pour la distribution de (12 à 25 nm) mesurée par RMN. Cet écart peut éventuellement s'expliquer par les valeurs attribuées à certains paramètres nécessaires aux calculs tels que  $\mathcal{M}$ ,  $Rh$ , et  $T_{1,fw}$ . Plus particulièrement,  $T_{1,fw}$  qui n'est pas directement mesurable dans le cas d'une gélification interne pourrait contribuer à cette différence.

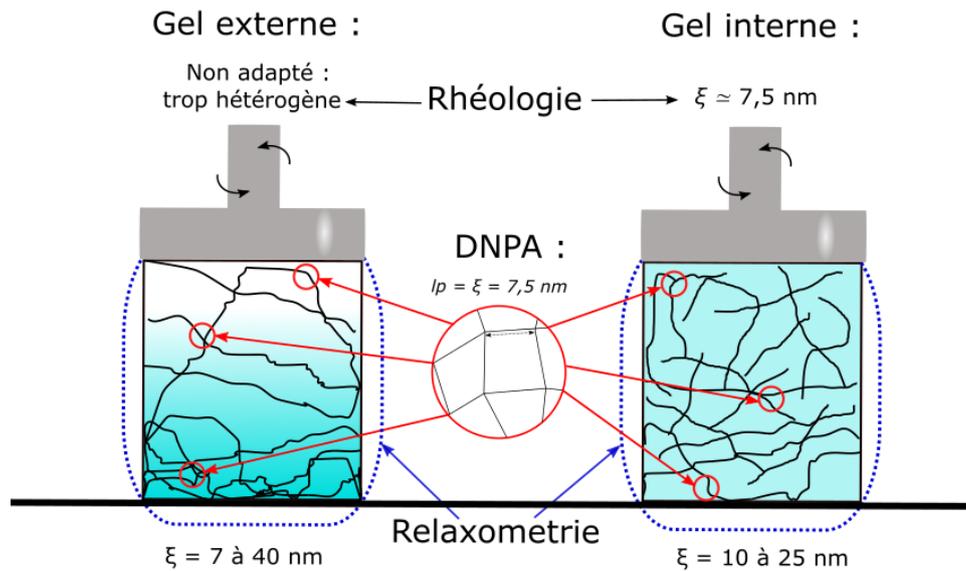


Figure 4.13 Schématisation des différentes mesures de la taille de réseau obtenues par relaxométrie, DNPA et rhéologie sur des gels externes et internes (figure originale).

Les travaux de ce chapitre présentent une méthode unique utilisant les protons comme sonde pour analyser l'un des paramètres les plus importants des gels : la taille du réseau. Cette méthode repose sur plusieurs paramètres caractéristiques dont les valeurs peuvent être questionnées. Quelques travaux supplémentaires de simulation (engagés en Annexe A) devraient permettre d'estimer des intervalles de confiance. Cependant, il est indéniable que la RMN permet d'accéder aux hétérogénéités des gels et aux distributions de taille de réseau, ce qui n'est pas possible par d'autres méthodes pour ce matériau.

# Chapitre 5 Différenciation et quantification *in-situ* de la concentration en Fer(II) et Fer(III) des hydrogels de polygalacturonate

## Introduction

Ce cinquième chapitre de thèse s'éloigne de la simple relaxation de systèmes diamagnétiques et rentre dans le domaine de la relaxation due à la présence d'espèces paramagnétiques. Dans ce chapitre, nous étudierons des gels polysaccharidiques dont la réticulation du polyGalA est assurée par des cations paramagnétiques, plus particulièrement le fer(II) ou le fer(III). En plus de l'intérêt d'étudier la différence entre un gel paramagnétique et un gel diamagnétique, les ions de fer sont des micronutriments indispensables à l'homme. La sensibilité de la relaxation des protons au paramagnétisme peut être exploitée pour déterminer la teneur en fer et son état d'oxydation dans les gels. L'utilisation de la relaxométrie RMN permet d'accéder à ces deux informations *in-situ* sans destruction de l'hydrogel, ce qui présente un avantage très net comparé aux méthodes « classiques » de détection. Dans ce chapitre, nous avons formulé et étudié quatre types de gels externes: deux gels réticulés par  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ , nommés respectivement Fe(III)-polyGalA et Fe(II)-polyGalA, et deux autres gels dont l'un est réticulé grâce à la diffusion d'ions  $\text{Fe}^{2+}$ , suivie d'une deuxième diffusion d'ions  $\text{Fe}^{3+}$ , et vice-versa, nommés respectivement Fe(III)<sub>2</sub>-Fe(II)<sub>1</sub>-polyGalA ou Fe(II)<sub>2</sub>-Fe(III)<sub>1</sub>-polyGalA. Nous savons que les gels externes présentent un fort gradient de concentration en cation réticulant suivant l'axe de diffusion, ainsi qu'un gradient de taille de réseau. Ces gels sont donc des systèmes modèles appropriés pour tester la spécification et la quantification du fer par RMN. La relaxométrie pourrait-elle devenir une méthode de référence pour mesurer le fer *in-situ* dans des matrices de type hydrogel ? Pour répondre à cette question, nous commencerons par contextualiser la problématique de quantification et de spécification du fer en comparant les différentes techniques les plus utilisées pour doser le fer. Ensuite, nous décrirons la théorie derrière l'utilisation de la relaxométrie pour doser les ions paramagnétiques. Enfin, dans les gels, les teneurs en fer mesurées par RMN seront comparées à celles obtenues par spectroscopie d'absorption atomique. Seuls les gels dits « externes » sont considérés dans ce chapitre.

## I. Fer en solution

### 1. Dosages colorimétriques

Les dosages colorimétriques permettent de quantifier la une quantité de fer dans une solution en utilisant un ligand qui réagit avec le fer pour former un composé coloré quantifiable par des méthodes de spectroscopie photonique conventionnelles. Plusieurs réactifs peuvent être utilisés, tels que la phénantroline pour doser les ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), le thiocyanate ou la bipyridine ferrique pour doser les ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Ahmed & Roy, 2009). Cependant, pour doser les deux formes ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ) dans une solution, il est nécessaire d'effectuer deux étapes : doser d'abord le fer (II) puis doser le fer total après avoir oxydé le fer (II). Les techniques colorimétriques sont largement utilisées, mais elles présentent plusieurs inconvénients. Premièrement, elles reposent sur l'utilisation d'un agent complexant qui parfois ne réagit pas avec la totalité du fer présent, en particulier lorsque le fer est lié à la matrice (affinité, sélectivité). Deuxièmement, le dosage s'effectue uniquement en milieu liquide et peut ne pas être applicable aux solutions visqueuses ou aux gels. Dans le cas des gels polysaccharidiques, il est nécessaire de procéder à un séchage du gel (élimination de l'eau), suivi d'une calcination (élimination de la matière organique), puis d'une minéralisation en milieu acide très concentré pour solubiliser les cendres. La relative simplicité et la rapidité qui sont les points forts du dosage colorimétrique, sont alors fortement impactées. Au cours de la calcination, les ions ferreux s'oxydent et le dosage colorimétrique ne peut plus différencier les deux espèces ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ). Par ailleurs, il convient de noter que Martínez (Martínez et al., 2017) a montré récemment qu'il est possible par gonflement d'incorporer de la phénantroline à certains hydrogels. Le gel contenant la phénantroline est séché dans le but d'obtenir une sonde capable de fixer (après réhydratation avec la solution à doser) le  $\text{Fe}(\text{II})$ . La colorimétrie peut alors être utilisée directement sur le gel. Dans ce le gel est un support pour la phénantrolène permettant de doser des solutions opaques comme le lait.

## 2. Spectroscopie d'absorption atomique

La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) est une technique de référence pour détecter et quantifier les métaux dans divers secteurs industriels et de recherche. Les échantillons peuvent être solides ou liquides, mais la SAA liquide est plus courante. La précision de la mesure varie de 0,1 à 100 µg/L selon le métal à analyser. Il s'agit d'une méthode monoélément, destructive, car l'échantillon doit être minéralisé et atomisé. Cependant, la technique ne permet pas de spécifier les différentes formes ioniques du fer. Cette méthode nécessite l'établissement d'une courbe d'étalonnage de l'élément à doser. De plus, il est parfois nécessaire d'ajouter un élément secondaire catalytique lors de la pyrolyse (l'une des étapes de l'atomisation) appelé « *modificateur* ». Celui-ci améliore la destruction d'éventuelles traces organiques pouvant impacter l'atomisation, un phénomène connu sous le nom « effet matrice ». En d'autres termes, il est nécessaire d'explorer et de trouver les bonnes conditions de température, de dilution (pour être dans la gamme de dosage) et de *modifier* pour atomiser efficacement le fer ainsi que réduire les températures d'atomisation. D'après notre expérience avec le spectromètre contraAA 600, l'ASS montre une reproductibilité très élevée mais la précision nous semble plus relative, en particulier lorsque la préparation de l'échantillon nécessite de nombreuses étapes de dilution.

## 3. Autres techniques

D'autres techniques peuvent être mentionnées lorsqu'on souhaite étudier le fer en solution ou en gel. Elles ne seront pas utilisées dans les travaux de cette thèse. Néanmoins, les comparer à la méthode développée dans ce chapitre permet de mieux apprécier les avantages de la relaxométrie.

- La spectroscopie à couplage inductif ou ICP est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour analyser la composition en métaux d'un échantillon. La technique est très similaire à l'absorption atomique, la principale différence étant de la possibilité d'analyser plusieurs éléments simultanément. Elle présente certains inconvénients communs à l'AAS, (minéralisation et dilution), cependant les températures d'analyse sont beaucoup plus élevées, ce qui élimine le besoin d'ajouter un modificateur.
- L'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) est une méthode très sensible aux configurations électroniques, qui permet de différencier efficacement Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>. Il faut

noter qu'elle a été utilisée pour déterminer la forme des ions fer fixés sur les chaînes de polyGalA dans un gel (Maire du Poset et al., 2018). Ce qui a permis de confirmer que le polyGalA protégeait le  $\text{Fe}^{2+}$  de l'oxydation. La méthode n'est cependant pas très adaptée à la quantification et se réalise à l'aide d'un très gros instrument (synchrotron).

Un tableau comparatif de ces méthodes (et d'autres) est présenté ci-dessous (Tableau 5.1).

Tableau 5.1 : comparaison des différentes techniques les plus communes pour étudier le fer

Type de méthode	Nom de la méthode	Principe	Différencier Fe(II) et Fe(III) ?	Quantifier Fe(II) et/ou Fe(III) ?	Liquide, gel ou solide ?	In-situ ?
<b>colorimétrie</b>	Phenantroline <small>(Fortune and Mellon, 1938)</small>	Absorption de la phenantroline	Non	Oui Fer(II)	Liquide	Non
	Thiocyanate <small>(Woods and Mellon, 1941)</small>	Absorption du thiocyanate	Non	Oui Fer(III)	Liquide	Non
	Bipyridine <small>(Ale and Smith, 1947)</small>	Absorption de la bipyridine	Non	Oui Fer(II)	Liquide	Non
	Ferrozine <small>(Stookey, 1970)</small>	Absorption de la Ferrozine	Non	Oui Fer(II)	Liquide	Non
<b>spectroscopie</b>	Spectroscopie d'absorption atomique <small>(Robinson, 1960)</small>	Les photons caractéristiques à un métal qui brûle	Non	Oui Fer total	Liquide Gel (minéralisé)	Non
	ICP <small>(Ohls and Bogdain, 2016; Reed, 1961)</small>	Les photons émis par un métal dans un plasma	Non	Oui Fer total	Liquide Gel Solide	Non
	EXAFS <small>(Lee et al., 1981)</small>	Absorption de rayon X et réémission de photoélectron caractéristique a l'environnement électronique	Oui	Non	Liquide Gel Solide	Oui
	Résonance paramagnétique électronique <small>(Williams, 2009)</small>	Mesure de l'énergie libre des électrons dans un champ magnétique	Oui	Non	Liquide Gel Solide	Oui
	spectroscopie Mössbauer <small>(Greenwood and Gibb, 1971)</small>	Mesure de l'effet Mössbauer, absorption et émission d'un photon sans recul dans un cristal.	Non	Oui	Solide	Oui
	Spectroscopie Raman <small>(Gardiner and Bowley, 1989)</small>	Mesure de l'effet Raman, soit le changement de fréquence du photon lorsqu'il traverse un milieu	Oui	Oui	Liquide Gel Solide	Oui
	Relaxométrie	Relaxation des protons	Oui	Oui	Liquide Gel Solide	Oui

## II. Paramagnétisme du fer et relaxométrie RMN

### 1. L'origine du paramagnétisme du fer

Le paramagnétisme est la capacité d'un matériau (ou d'un ensemble d'éléments), qui ne possède pas de champ magnétique propre à acquérir une aimantation orientée lorsqu'il est exposé à un champ magnétique extérieur. L'aimantation s'aligne dans le même sens que l'aimantation appliquée (la susceptibilité magnétique  $\chi$  est positive, ce qui le différencie du diamagnétisme).

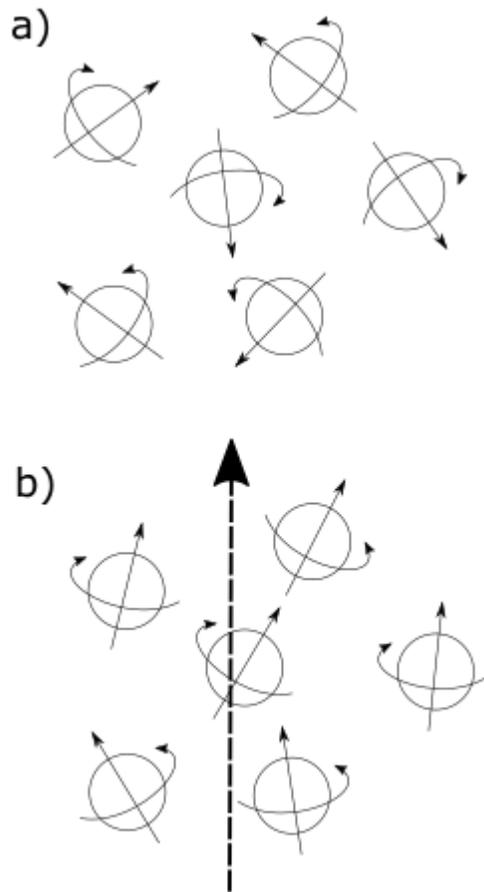


Figure 5.1 Description du comportement de particules paramagnétiques a) sans champ magnétique b) avec champ magnétique appliqué.

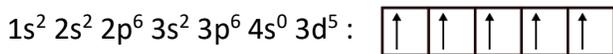
Le paramagnétisme est un phénomène physique qui se manifeste en présence d'électrons non appariés. Ces électrons non appariés possèdent un moment magnétique associé à leur spin, ce qui en fait des dipôles magnétiques. Lorsqu'un champ magnétique est appliqué, ces dipôles peuvent s'orienter parallèlement au champ. De manière générale, la susceptibilité magnétique d'un matériau est la somme de sa susceptibilité diamagnétique et de sa susceptibilité paramagnétique.

Le matériau est qualifié de paramagnétique s'il se caractérise par une susceptibilité paramagnétique  $\chi_{para}$  sensiblement supérieure à sa susceptibilité diamagnétique ( $\chi_{para} > |\chi_{dia}|$ ) (Parodi, 1989).

Dans le cas du  $Fe^{2+}$  et du  $Fe^{3+}$ , le nombre d'électrons non appariés n'est pas le même, ce qui signifie qu'ils n'ont pas la même susceptibilité paramagnétique. L'ion  $Fe^{2+}$  présente le schéma orbital suivant avec 4 électrons non appariés :



Tandis que  $Fe^{3+}$  possède 5 électrons non appariés :



## 2. La relaxation paramagnétique

Comme nous l'avons vu précédemment (Chapitre 1) dans les gels diamagnétiques (Ca-polyGalA et Zn-polyGalA), la relaxation est principalement due aux interactions dipôle-dipôle entre les protons du milieu. Lorsqu'un élément paramagnétique est introduit dans une solution aqueuse, la relaxation des protons (majoritairement ceux de l'eau) peut alors être accélérée par deux interactions de couplage paramagnétique : l'interaction dipolaire paramagnétique (mécanisme de Solomon) (Solomon, 1955) et l'interaction de contact paramagnétique (mécanisme de Bloembergen) (Bloembergen and Morgan, 1961). L'interaction de contact est une interaction qui se produit lorsque le nuage électronique du noyau paramagnétique est suffisamment étendu pour se retrouver physiquement à l'emplacement des protons, cela peut typiquement s'observer sur les profils de diffusion du manganèse en solution (Bodart et al., 2019). A basse fréquence, ce mécanisme n'est pas observé sur les profils du fer en solution (Bertini et al., 2017), nous ne l'avons pas non plus identifié sur ceux des gels. Le mécanisme de Solomon repose sur un modèle de couplage entre un dipôle ponctuel électronique et un dipôle ponctuel nucléaire. Le taux de relaxation peut alors s'écrire (Keeler, 2009) :

$$\frac{1}{T_1^{para}} = \tilde{R}_D(\omega_I, \tau_{d1}, \omega_S, \tau_{d2}) = \tilde{C}_D \left[ \frac{7\tau_{d2}}{1 + (\omega_S \tau_{d2})^2} + \frac{3\tau_{d1}}{1 + (\omega_I \tau_{d1})^2} \right] \quad 5.2$$

Avec :

$$\tilde{C}_D = \frac{2}{15} = \frac{2}{15} \left( \frac{\mu_o}{4\pi} \right)^2 \frac{S(S+1)(\gamma_I \gamma_S \hbar)^2}{r_{IS}^6} \frac{S(S+1)(\gamma_I \gamma_S \hbar)^2}{r_{IS}^6} \quad 5.3$$

Avec  $S$ , le nombre de spin électronique de l'ion paramagnétique, les indices  $S$  font référence à l'ion paramagnétique et  $I$  au noyau couplé (proton),  $\omega$  sont les pulsations de Larmor des électrons ou des protons. Le temps de corrélation  $\tau_{di}$  est une composante du temps de corrélation de réorientation de l'ion paramagnétique ( $\tau_R$ ) résultant des mouvements rotationnels browniens, des temps de relaxation (longitudinale ( $i=1$ ) et transversale ( $i=2$ )) de l'électron ( $\tau_{Si}$ ) ainsi que du temps de contact (temps d'échange du noyau  $I$  dans la sphère d'hydratation de l'ion paramagnétique ( $\tau_M$ )) :

$$\frac{1}{\tau_{di}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_{Si}} \quad 5.4$$

Il est important de noter qu'en pratique, aux faibles champs magnétiques,  $\tau_{d1} = \tau_{d2} = \tau_d$ .

L'inverse du temps de relaxation observé  $T_1^{obs}$  peut-être exprimé comme la somme des inverses (taux de relaxation  $R_1$ ) des différentes contributions :

$$\frac{1}{T_1^{obs}} = \frac{1}{T_1^{para}} + \frac{1}{T_1^{dia}}, \text{ soit } R_1^{obs} = R_1^{para} + R_1^{dia} \quad 5.5$$

L'équation 5.2 met en évidence deux dispersions qui peuvent être observées à différentes fréquences. Dans des solutions de faible viscosité et à température ambiante, le premier terme de l'équation est responsable d'une dispersion ( $\omega_S \tau_{d1} \sim 1$ ) sur le profil de relaxation à environ 10 MHz pour certains ions en solution ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  (Banci et al., 1985; Bertini et al., 1993; Koenig et al., 1984; Koenig and Brown, 1984)). Pour d'autres ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  (Banci et al., 1985; Kowalewski et al., 2008)) les profils ne montre généralement aucune dispersion avant 40 MHz. Avec  $\omega_S = 658\omega_I$  (Koenig and Brown, 1984), Le second terme ( $\omega_I \tau_{d1} \sim 1$ ) de l'équation induit une dispersion à des fréquences de champs significativement supérieurs (de l'ordre des GHz).

À champ faible, dans le cas d'un liquide avec une concentration relativement élevée d'ions paramagnétique et où les mouvements browniens des molécules d'eau permettent à chaque proton de rencontrer un ion paramagnétique, on observe  $R_1^{para} \gg R_1^{dia}$  ce qui permet de faire l'approximation :

$$\frac{1}{T_1^{obs}} \cong \frac{1}{T_1^{para}} \text{ soit } R_1^{obs} \cong R_1^{para} \quad 5.6$$

Cependant, dans un gel, l'approximation n'est pas garantie car les mouvements de l'eau sont restreints par la structure du gel, ce qui empêche une diffusion uniforme. Ainsi, il est possible qu'une contribution diamagnétique soit observable si l'ion réticulant est faiblement paramagnétique.

### III. Quantification Fe(II)/Fe(III) en solution et en gel:

#### 1. Structure du gel

La Figure 5.2, qui reporte le pourcentage de matière sèche en fonction de la position de la tranche, montre que les gels Fe(II)-polyGalA présentent un gradient de concentration (polymère et cation) plus prononcé que les gels Fe(III)-polyGalA. La concentration en matière sèche varie de 3,5 à 1,6% pour Fe(II)-polyGalA et de 2,5 à 2% pour Fe(III)-polyGalA.

Cela reflète la différence de structure à l'échelle moléculaire des deux gels. En effet, il est admis que le mode d'association de Fe(II)-polyGalA est du type "boîte à œufs" (chapitre 1 section 3), tandis que le mode d'association des ions Fe(III) avec les fonctions carboxylates est peu décrit et documenté. Il est souvent indiqué que les associations entre polysaccharides anioniques (carboxylate ou sulfate) et cations trivalents induisent la formation d'agrégats de chaînes de polysaccharide. Cette association impliquerait 6 unités uroniques autour du Fe(III), tandis que les ions divalents s'associent à 4 unités uroniques (Menakbi et al., 2016; Schefer et al., 2015). Dans le cas de Fe(III)-polyGalA, la formation d'agrégats aurait un impact sur la structure macroscopique du gel, qui serait plus homogène, comme observé sur la Figure 5.2.

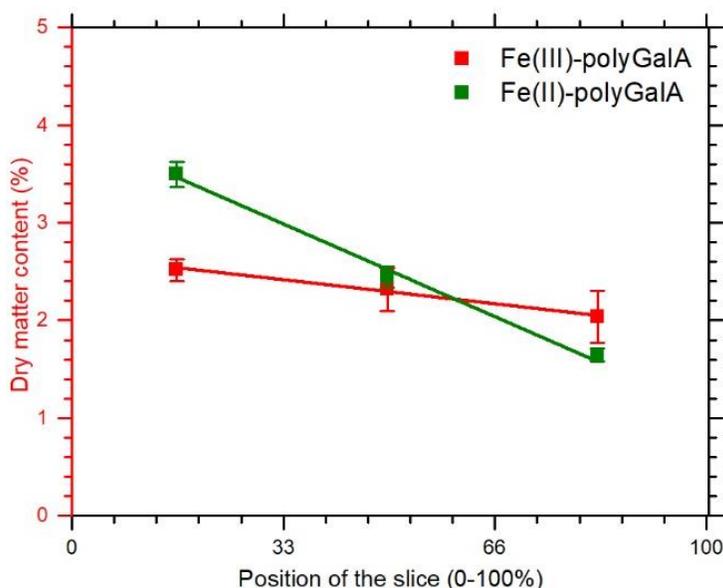


Figure 5.2 : Quantité de matière sèche dans trois tranche: Near (0-33%), Mid (34-66%) et Far (67-100%) de gels Fe(II)- et Fe(III) polyGalA. La position centrale des tranches est utilisée pour placer les points sur l'axe des abscisses.

## 2. Profils de relaxation

Les profils des gels montrent des comportements très distincts entre les gels diamagnétiques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et paramagnétiques ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Figure 5.3). Comme décrit dans le Chapitre 3, la dispersion observée entre 0,1 et 0,2 MHz sur le profil du gel diamagnétique (Ca-polyGalA) témoigne de mouvements lents de protons liés aux fibres polysaccharides. L'absence de cette dispersion dans le profil de relaxation du gel Fe(III)-polyGalA indique la prédominance du paramagnétisme qui masque les mouvements lents des protons en interaction avec les fibres. En revanche, pour le gel Fe(II)-polyGalA, une dispersion dans la même gamme de fréquences que le gel diamagnétique est visible (Figure 5.3).

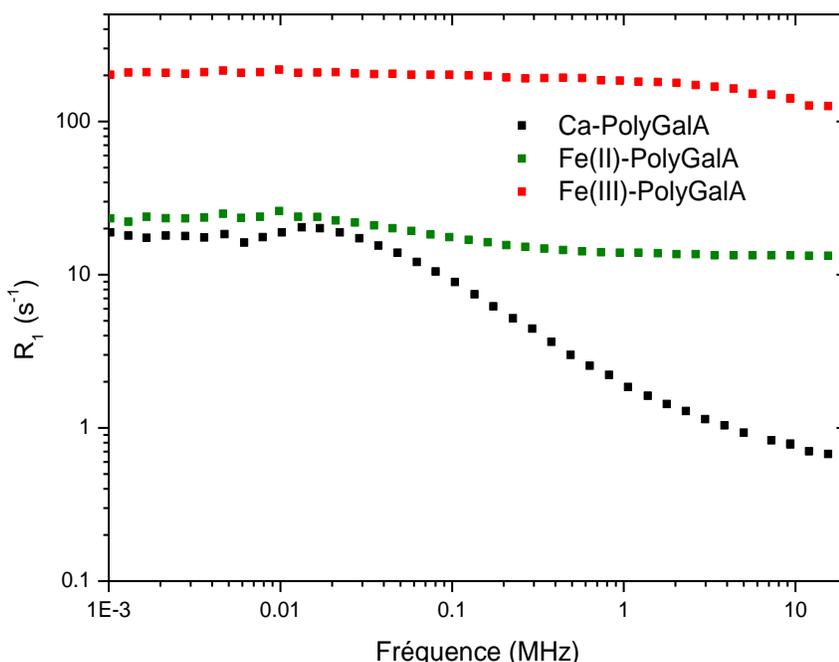


Figure 5.3 Représentation Log-Log des profils de relaxation  $^1\text{H}$ , de gels diamagnétiques à base de calcium (Noir) et de gels paramagnétiques à base de Fe(II) (vert) et Fe(III) (rouge).

Dans toute la gamme de fréquences, les taux de relaxation observés dans Fe(III)-polyGalA ( $\sim 400 \text{ s}^{-1}$ ) sont environ 20 fois plus élevés que dans Fe(II)-polyGalA ( $\sim 20 \text{ s}^{-1}$ ). Cette différence importante constitue une première indication de la possibilité d'utiliser la relaxométrie pour identifier la présence et de distinguer l'état d'oxydation du fer dans un gel.

Le profil de relaxation d'un gel  $\text{Fe}^{2+}$  comparé à une solution de  $\text{Fe}^{2+}$  (Figure 5.4) montre sans équivoque la dispersion caractéristique vers 0,1 MHz, due aux mouvements lents de l'eau en interaction avec les fibres du gel qui n'existe pas dans la solution. La dispersion à 10 MHz observé sur la solution ferrique et liée au premier terme de l'équation 5.2 est également observable sur le gel  $\text{Fe}^{3+}$ . La forte similitude

entre les profils du gel et de la solution dans toute la gamme de fréquences, suggère que la relaxation paramagnétique prédomine dans le gel Fe(III)-polyGalA.

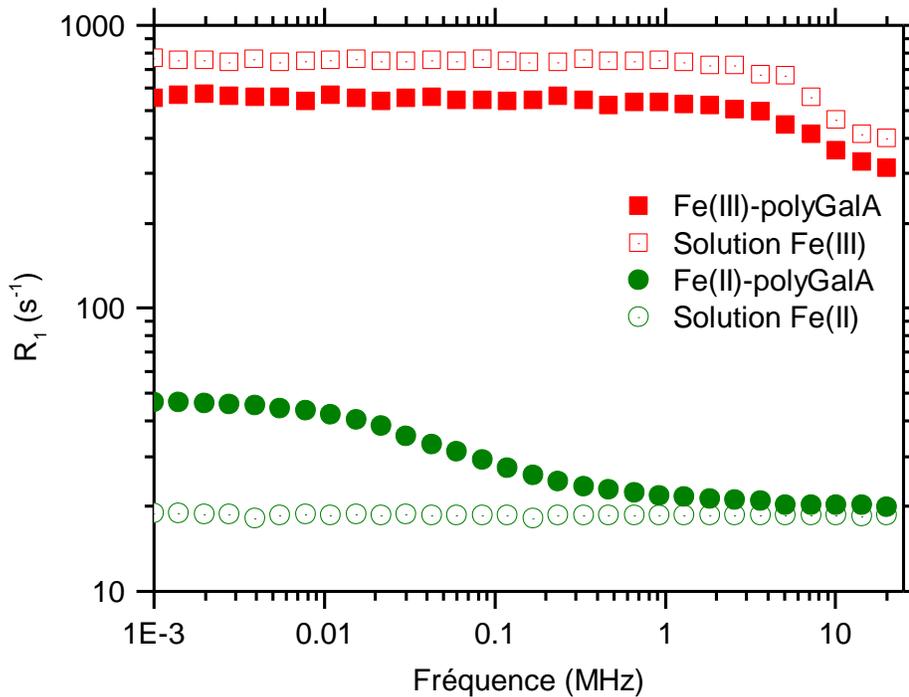


Figure 5.4 Profils de relaxation de gels de polyGalA formulés avec des ions  $\text{Fe}^{2+}$  (ronds verts),  $\text{Fe}^{3+}$  (carrés rouges) et des solutions de  $\text{FeCl}_2$  ( $\text{Fe}^{2+}$ , ronds verts vides) et  $\text{FeCl}_3$  ( $\text{Fe}^{3+}$ , carrés vides rouges) à 50 mM.

La Figure 5.5 présente les profils de relaxation normalisés par les concentrations (relaxivité). Cette représentation permet de s'affranchir de l'effet de concentration pour la solution, mais elle suppose une concentration totale de 50 mM de fer dans les gels. Aux hautes fréquences ( $>1$  MHz), les écarts entre les profils des gels et des solutions sont assez faibles et les deux ions sont bien résolus. Cela suggère qu'en première approximation, les gels pourraient être assimilés à des solutions. A 20 MHz, la Figure 5.5 montre que la relaxivité d'une solution de  $\text{Fe}^{2+}$  et celle du gel correspondant sont presque identiques à 20 MHz ( $19,8 \text{ s}^{-1}/\text{mM}$  et  $18,5 \text{ s}^{-1}/\text{mM}$ , soit une différence de 7%). Cela indique que la relaxation des molécules d'eau dans un gel Fe(II)-polyGalA est équivalente à la relaxation des molécules d'eau dans une solution d'aquaion  $\text{Fe}^{2+}$ . En revanche, pour les ions  $\text{Fe}^{3+}$ , la relaxivité du gel et de la solution associée diffèrent de 24%. Cela indique que dans le gel, l'ensemble des ions  $\text{Fe}^{3+}$  (réticulés ou pas) induiraient une relaxation plus faible que les ions  $\text{Fe}^{3+}$  libres dans une solution équivalente.

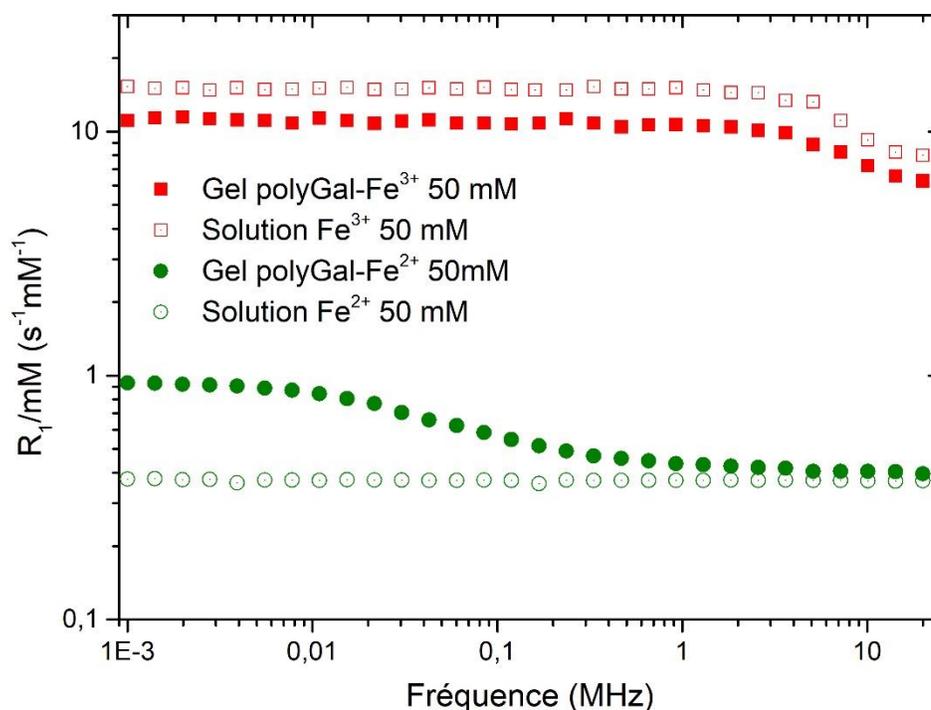


Figure 5.5 : Profils de relaxation (Log-Log) de gels de polyGalA exprimés en taux de relaxation par concentration ( $R_1/\text{mM}$ ) formulés avec des ions  $\text{Fe}^{2+}$  (carrés vides verts),  $\text{Fe}^{3+}$  (carrés vides rouges). Les gels sont comparés à des solutions de  $\text{FeCl}_2$  ( $\text{Fe}^{2+}$ , vert) et  $\text{FeCl}_3$  ( $\text{Fe}^{3+}$ , rouge)

### 3. Dosage du fer en solution par relaxométrie RMN

Les profils de relaxation suggèrent une similitude entre les taux de relaxation d'un gel et d'une solution. En particulier, dans une première approche, la comparaison des profils des solutions et des gels aux hautes fréquences ( $\sim 20$  MHz, Figure 5.5) peut permettre d'assimiler les gels à des solutions. Pour cela, l'extrapolation des courbes de titration des solutions aux gels est testée. La Figure 5.6 reporte les taux de relaxation mesurés à 19,6 MHz pour des solutions de chlorure ferrique et ferreux (de 1 à 100 mM).

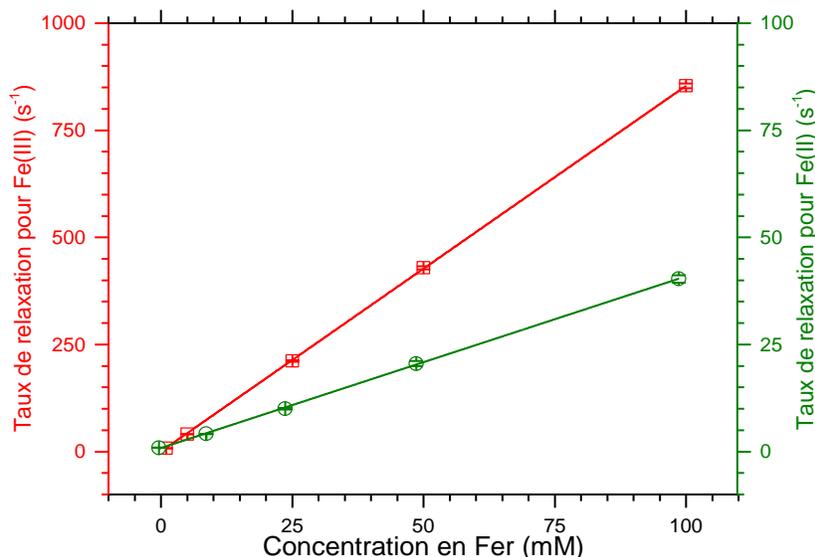


Figure 5.6 : Courbes de titration des solutions  $\text{FeCl}_2$  (vert) et  $\text{FeCl}_3$  (rouge) obtenues à  $25^\circ\text{C}$  et à  $19,6\text{ MHz}$ . Les solutions de  $\text{Fe(II)}$  ont été dégazées à  $\text{N}_2$ . Le pH des solutions de  $\text{Fe(III)}$  varie de pH 3 (1mM) à pH 1.49 (100mM).

Les régressions linéaires ont permis d'établir les équations suivantes :

$$R_1 = 8.54 \times [\text{Fe}^{3+}] + 0.35 \quad 5.7$$

$$R_1 = 0.4 \times [\text{Fe}^{2+}] + 0.29 \quad 5.8$$

Où les taux de relaxation sont exprimés en  $\text{s}^{-1}$  et les concentrations en mM.

Les concentrations (mM) peuvent donc être déduites directement des taux de relaxation ( $\text{s}^{-1}$ ) par :

$$[\text{Fe}^{3+}] = (R_1 - 0.35)/8.54 \quad 5.9$$

$$[\text{Fe}^{2+}] = (R_1 - 0.29)/0.4 \quad 5.10$$

La différence de pentes entre les équations 5.7 et 5.8 montre qu'à  $20\text{ MHz}$ , les ions  $\text{Fe}^{3+}$  relaxent font relaxer environ 19 fois plus rapidement les molécules d'eau que les ions  $\text{Fe}^{2+}$  à  $20\text{ MHz}$ . La différence entre les ordonnées à l'origine est une conséquence directe du protocole de dégazage de la solution ferreuse (Chapitre 2). En effet, l'ordonnée à l'origine correspond à la relaxation d'une solution de diffusion sans fer en présence d'oxygène dissous (équation 5.7) et d'une solution désoxygénée (équation 5.8). Le dioxygène étant paramagnétique, le taux de relaxation est plus élevé pour une solution oxygénée.

## 4. Relaxation dans des gels paramagnétiques

### 4.1 Distribution des temps de relaxation

Comme vu précédemment dans le Chapitre 4 et dans une première approximation, le temps de relaxation d'un gel diamagnétique peut être estimé et apprécié en utilisant un ajustement de la courbe de relaxation par une loi monoexponentielle. Cependant, une description plus correcte requière une transformation de Laplace inverse de la courbe de relaxation pour en extraire la distribution des temps de relaxation. Pour illustrer une nouvelle fois l'importance de ce point, la Figure 5.7 compare un traitement monoexponentiel des courbes de relaxation aux distributions de temps de relaxation obtenues à partir des mêmes données. À première vue, l'ajustement monoexponentiel semble correct pour le gel Fe(III) (Figure 5.7 (a) et (c)). Cependant, il existe une légère divergence entre le modèle et les valeurs expérimentales (encart Figure 5.7 (a)), qui résulte de l'hétérogénéité du gel. Toutefois, la valeur du pic de la distribution est très proche de la valeur de l'ajustement exponentiel indiquant qu'un ajustement monoexponentiel est suffisant pour estimer la valeur maximale ( $\sim$ moyenne) de la distribution de  $T_1$ . Cependant, il persiste un risque de saturation du signal si un temps de recyclage trop court est utilisé. (la distribution centrée sur 3 ms s'étalant au-delà de 4 ms). En ce qui concerne les gels Fe(II)-polyGalA lavés, des variations plus importantes sont observées, il est clair que l'ajustement monoexponentiel n'est plus adapté (Figure 5.7 (c)). Toutefois, la valeur obtenue par l'ajustement monoexponentiel reste comprise dans la distribution des  $T_1$  et elle est proche de la valeur maximale de la distribution.

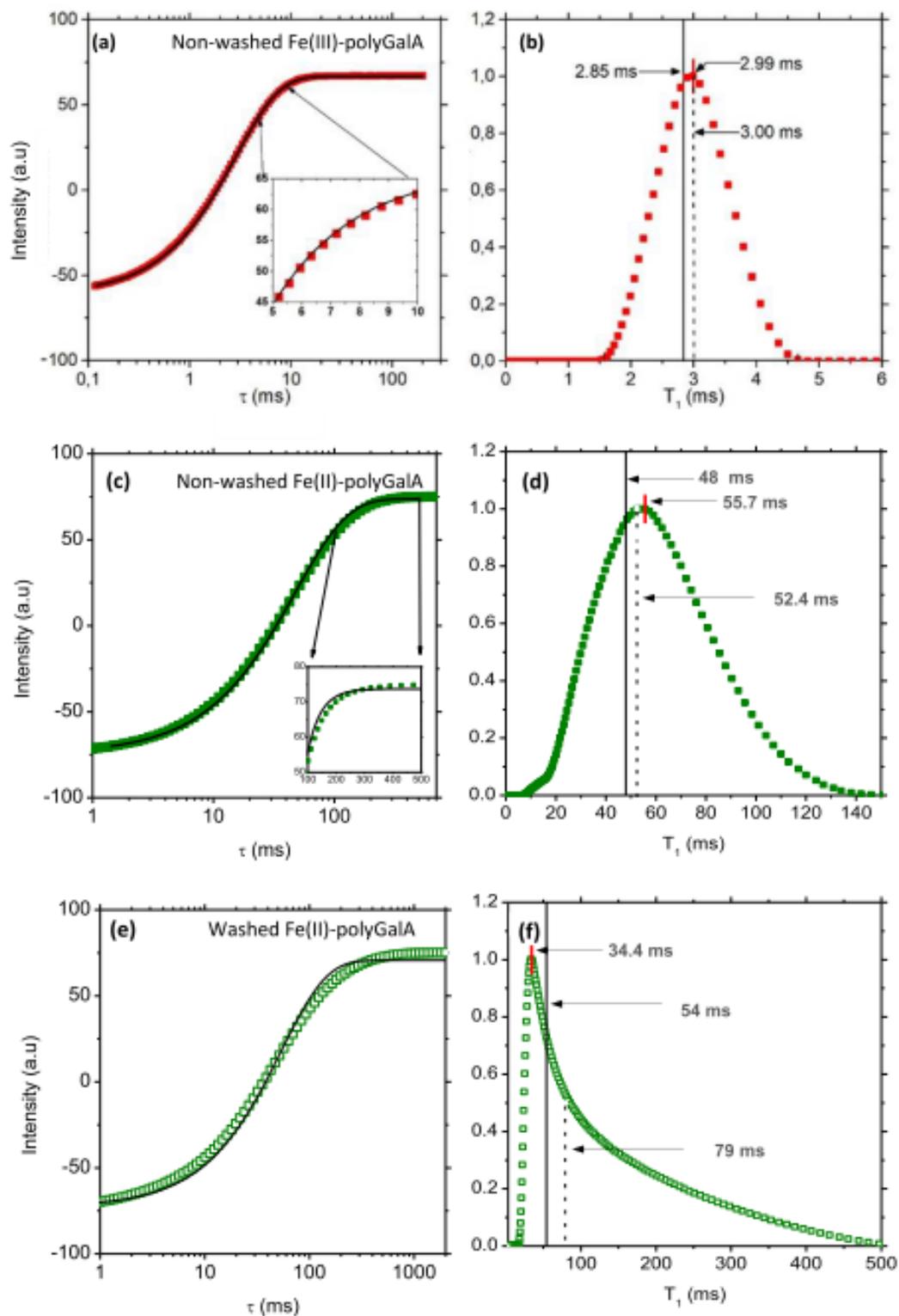


Figure 5.7 : Courbe de relaxation du Fe(III)-polyGalA (a) et Fe(II)-polyGalA non lavé (c) et lavé (e). Les courbes noires correspondent aux régressions monoexponentielles. (c) (d) et (f) représentent la distribution de  $T_1$  de Fe(III)-polyGalA et Fe(II)-polyGalA non lavé et lavé, respectivement. Le segment rouge correspond à la valeur de pic de la distribution et la droite verticale à la valeur obtenue par ajustement monoexponentiel. La droite segmentée correspond à la valeur du centre de masse de la distribution.

## 4.2 Teneur en fer dans des gels Fe-polyGalA

Dans un premier temps, la relaxation des gels Fe(II)-polyGalA et Fe(III)-polyGalA entiers ainsi que celle des solutions contenant les ions de réticulation correspondants (avant et après la diffusion) est mesurée. Ensuite, les gels sont tranchés en 3 parties (Near, Mid et Far). Les courbes de relaxation de chaque tranche sont enregistrées, puis les tranches sont séchées dans une étuve à 70°C pendant une nuit. A l'issue de cette étape, la matière sèche est pesée, puis minéralisée pour mesurer la concentration en fer par spectroscopie d'absorption atomique.

## 4.3 Dosage du Fe(II) dans un gel Fe(II)-polyGalA

La Figure 5.8 montre les distributions de temps de relaxation obtenues pour un gel Fe(II)-polyGalA complet, ainsi que pour les trois tranches (Near, Mid et Far). Pour le gel complet, la distribution des  $T_1$  est remarquablement large, elle s'étend de 25 à 110 ms. On observe également une queue asymétrique, aux niveaux des temps plus grand. Cette large distribution pourrait être la manifestation d'un effet de confinement (comme pour les gels diamagnétiques) et/ou synonyme d'une large distribution de teneur en ions Fe(II), probablement liée à la distribution des tailles de réseau. En utilisant l'équation 5.10, il est possible de calculer la concentration en Fe(II) labile-équivalente dans le gel. Cette concentration **labile-équivalente** correspond à la concentration en fer d'une solution ayant le même taux de relaxation que dans le gel, elle est identifiée par un astérisque **[Fe]\***. Cette distinction est nécessaire car rien n'indique que la relaxation induite par un ion fer réticulé ou complexé soit comparable à celle d'un ion fer en solution. La concentration en fer(II) produit une distribution comprise entre 20 et 100 mM. A noter que la concentration en fer dans la solution de diffusion est égale à 50 mM.

Les distributions des temps de relaxations dans les parties Near, Mid et Far se trouvent à l'intérieur de la distribution du gel complet et l'abscisse des maximums de chaque distribution augmentent de la tranche Near vers la tranche Far. Dans la partie Near (la plus dense), les temps de relaxation sont les plus courts (25-55 ms). Dans cette partie, la concentration de fer calculée est comprise entre 100 et 44 mM, avec un pic à 75 mM. Cette concentration est plus élevée que la concentration initiale de la solution de diffusion (50 mM). Ce résultat est à relier à la densification de cette tranche. En effet, la concentration en polymère dans la partie Near (3,6%) est plus élevée que celle de la solution initiale de polyGalA (2%) (Figure 5.2). La partie Mid présente des temps de relaxation s'étendant de 27 à 80 ms, avec un pic à

42,7 ms, qui est identique au maximum observé dans le gel complet, ce qui confirme que la partie Mid reflète les valeurs moyennes du gel complet, un phénomène déjà observé dans le Chapitre 4. Enfin, la partie Far présente les temps de relaxation les plus longs allant de 40 à 82 ms.

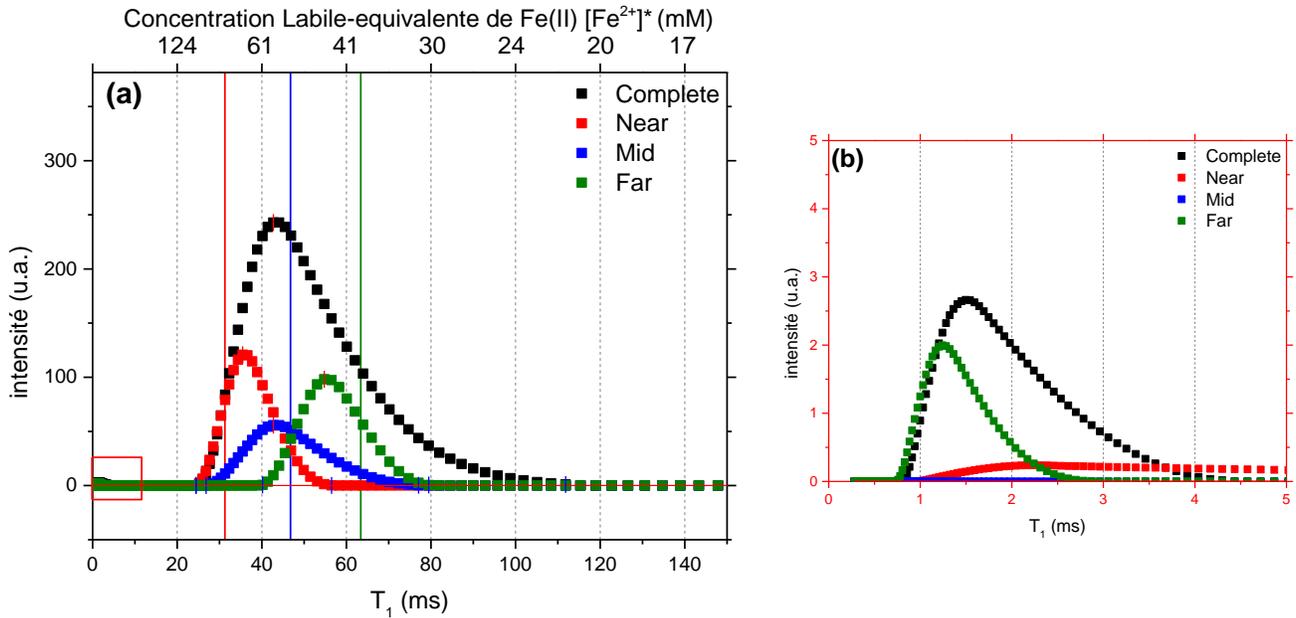


Figure 5.8 : (a) Distribution des temps de relaxation longitudinaux ( $T_1$ ) d'un gel Fe(II)-polyGaLA comparée à celles de ses propres tranches Near (rouge) Mid (bleu) et Far (vert). Les concentrations obtenues par absorption atomique sont représentées par des lignes verticales aux couleurs respectives. L'axe supérieur représente l'équivalent en concentration de Fer(II) labile obtenue avec l'équation 5.10 (b) Zoom sur le carré rouge en (a) révélant des temps de relaxation très courts.

La mesure des concentrations en fer dans les différentes tranches par SAA est reportée dans le Tableau 5.2. Ces valeurs de concentration ne correspondent pas exactement aux maximums des pics obtenus par relaxométrie RMN (Tableau 5.2). Pour les trois tranches (Near, Mid et Far), les différences entre SAA et RMN sont d'environ 10%. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet écart :

- Un facteur de dilution élevé : les concentrations en fer étant élevées dans les échantillons, d'importantes dilutions (10 000 à 100 000 fois) sont nécessaires, ce qui peut être source d'erreurs.
- Les valeurs de concentrations en fer obtenues par SAA peuvent dépendre fortement des conditions de minéralisation et d'atomisation.
- Une lecture trop simplifiée des distributions obtenues par RMN.

Cependant, l'accord entre SAA et RMN est globalement bon ce qui nous permet de ne plus utiliser l'approximation « labile équivalent » car l'équation 5.10 mesure une concentration réelle en fer.

Il est important de rappeler que le Fe(II) dans le gel Fe(II)-polyGalA conserve son degré d'oxydation (Maire du Poset et al., 2018). Ce résultat est confirmé par les mesures RMN. Une oxydation du Fe(II) dans ce type de gel conduirait à l'apparition d'un pic de relaxation à un ordre de grandeur inférieur (Figure 5.5). Un tel phénomène est observable sur le gel (Figure 5.9) et les distributions (Figure 5.8.b) entre 0 et 5 ms, où un petit pic est perceptible. Ce pic est dû à l'oxydation du Fe<sup>2+</sup> libre à la surface du gel (visible par une légère coloration orangée sur la Figure 5.9). Cela montre par ailleurs que la relaxométrie est assez sensible pour détecter cette petite oxydation. Cela ne remet pas en cause la protection du Fe(II) par le polyGalA, en effet cette oxydation arrive seulement dans l'eau de surface du gel, là où les ions ne sont pas exposés au polysaccharide.

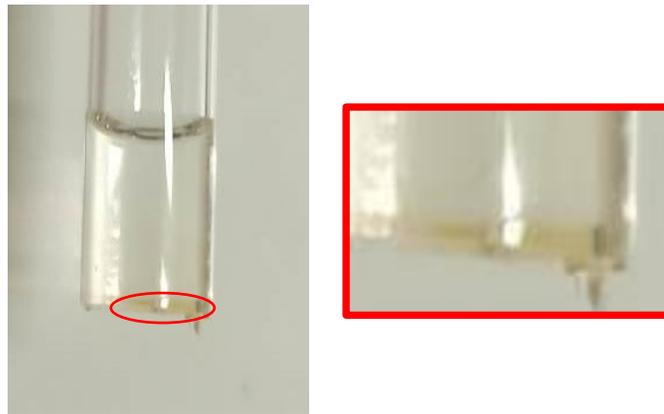


Figure 5.9 : Gel Fe(II)-polyGalA, le cercle rouge indique une zone légèrement orangée probablement lié à l'oxydation du Fe(II) libre à la surface du gel.

Dans la partie « Near », la concentration en polyGalA est d'environ 198 mM d'unités GalA. Ainsi, le ratio (Fe<sup>2+</sup>/GalA) dans cette partie serait d'environ (75/198=0,38). Ce ratio augmente à 0,41 puis 0,49 pour les parties Mid et Far, respectivement (Tableau 5.2). Cette augmentation est attribuée à la diminution de la concentration en polyGalA lorsque l'on se déplace de la tranche Near à la tranche Far.

Tableau 5.2 : Récapitulatif des différentes valeurs de la concentration en fer dans un gel Fe(II)-polyGalA obtenues par RMN et SAA. Les valeurs entre crochets: représentent l'étendue de la distribution,  $[Fe^{2+}]_{RMN}$  correspond à la concentration associée au maximum de la distribution et  $[Fe^{2+}]_{SAA}$  correspond

$$\Delta = \frac{[Fe^{2+}]_{SAA} - [Fe^{2+}]_{RMN}^*}{[Fe^{2+}]_{SAA}}$$

à la concentration mesurée par SAA.

		Near	Mid	Far	Complet
SAA	$[Fe^{2+}]$ (mM)	79±0,2	53±0,6	39±0,7	N.D.
	$[Fe^{2+}]$ , (mM)	75	58	45	58
RMN	Intervalle $[Fe^{2+}]$ (mM)	[100 – 44]	[95 – 31]	[61– 79]	[100 – 20]
	$\Delta$ (%)	5%	-9%	-13%	-
R	[Unité GalA] (mM)	198	142	91	-
	$[Fe^{2+}]_{RMN}/[GalA]$	0,38	0,41	0,49	-

#### 4.4 Dosage du Fe(III) dans un gel Fe(III)-polyGalA

La Figure 5.10 présente les distributions de T1 obtenues pour le gel Fe(III)-polyGalA complet et pour les tranches correspondantes. L'axe supérieur représente la concentration de "labile-équivalente" de fer calculée avec l'équation 5.12. Les distributions s'étendent de 2 à 6,5 ms (110% de l'abscisse du maximum de la distribution (amd)). Elles sont moins larges que celles observées pour le gel Fe(II)-polyGalA (180 % amd). Comme pour les gels Fe(II)-polyGalA, les distributions de temps de relaxation des trois tranches se situent à l'intérieur de la distribution du temps de relaxation du gel complet. Une fois de plus, les temps de relaxation augmentent du Near vers le Far, ce qui reflète un réseau dont la densité en fibre et de la concentration en fer dans la direction de diffusion (bien que le gradient soit plus faible que pour Fe(II)-polyGalA, voir Figure 5.2).

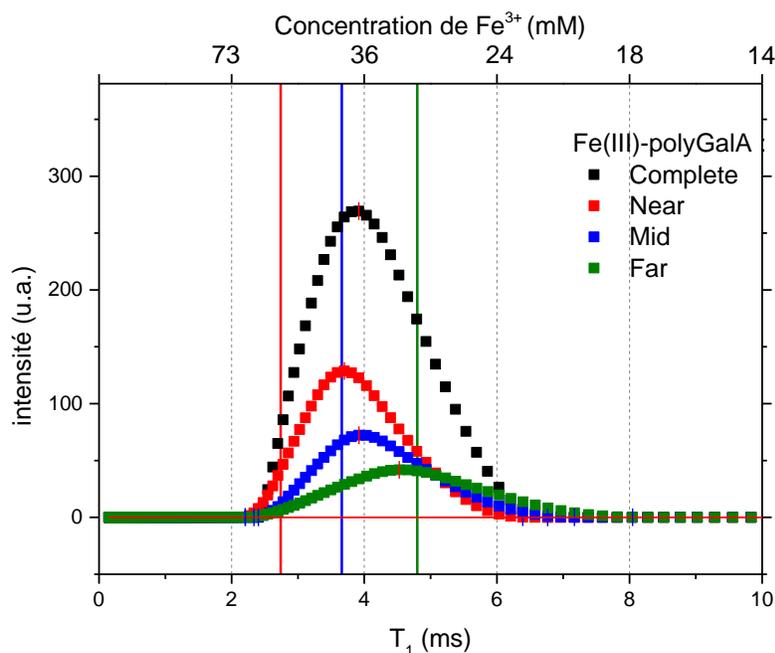


Figure 5.10 : Distribution des temps de relaxation longitudinaux ( $T_1$ ) d'un gel Fe(III)-polyGalA comparée à celles de ses tranches Near (rouge) Mid (bleu) et Far (vert). Les concentrations obtenues par absorption atomique sont représentée par des lignes verticales aux couleurs respectives. L'axe supérieur reporte les concentrations de Fer calculées par l'équation 5.12 avec le facteur  $K=1,25$ .

Le Tableau 5.3 reporte les concentrations labile-équivalente de fer dans le gel, calculées avec les équations 5.9, 5.12 et 5.13. Comme le suggère la Figure 5.5, Les concentrations labile-équivalentes en fer calculées sont inférieures à celles obtenues par absorption atomique. Cela est probablement dû à un encombrement stérique qui empêche le rapprochement des molécules d'eau autour des ions Fe(III) liés au polyGalA. Ce phénomène sera exploré plus en détail dans la partie lavage des gels. Afin d'exprimer une concentration en accord avec les mesures de SAA, nous introduisons un coefficient correctif  $K$  estimé à 1,25 d'après les profils (Figure 5.5, point à 20 MHz).

Ainsi, les équations 5.7 et 5.9 deviennent :

$$K * R_1 = (8,54 \times [Fe^{3+}] + 0,35) = (8,54 \times [Fe^{3+}] + 0,35) \quad 5.11$$

$$[Fe^{3+}]^{totale} = (K * R_1 - 0.35)/8.54 \quad 5.12$$

Dans ces équations,  $[Fe^{3+}]^{totale}$  représenterait la concentration totale en fer dans le gel. La valeur du coefficient K (1,25) suppose qu'il y ait la même concentration totale en fer dans la solution et dans le gel, ce qui reste questionnable.

Pour éviter la question précédente, et alternativement, ce coefficient peut aussi être estimé par une comparaison directe entre la concentration labile-équivalente en fer et de la concentration mesurée par SAA. Par exemple, sur un gel découpé, ce coefficient que nous nommons maintenant K', peut être estimé par le rapport moyen de la concentration en fer mesurée par absorption atomique sur la concentration en équivalent-labile déterminée par RMN au niveau du maximum de la distribution :

$$K' = \frac{1}{3} \sum_{Near}^{Far} \frac{[Fe^{+3}]_{SAA}}{[Fe^{+3}]_{RMN}^*} \sim 1,38 \quad 5.13$$

Et :

$$[Fe^{3+}]^{totale} = K'[Fe^{+3}]^* = K' * (R_1 - 0,35)/8,54 \quad 5.14$$

L'axe supérieur de la Figure 5.10 représente les concentrations obtenues avec l'équation 5.12 (K=1,25).

Le Tableau 5.3 compare également la concentration totale en fer du gel mesurée par SAA et calculée avec les coefficients K et K'. Malheureusement, la correction apportée par ces coefficients est décevante. Selon le coefficient K ou K', une ou deux tranches peuvent être relativement corrigées au détriment des autres. Cela suggère que si une telle correction est possible, le coefficient doit dépendre d'un équilibre entre le fer labile (qui relaxe conformément à l'équation 5.7) et le fer lié (qui présente une relaxation encombrée). Dans la partie dense en fibre (Near), le facteur de correction n'est plus valide car il y a plus de fer lié que de fer libre, ce qui ralentit la relaxation, même si la concentration en Fe(III) est plus élevée. De même, dans la partie Far, où il y a plus de fer labile que lié, le facteur de correction n'est pas approprié.

Tableau 5.3 : tableau récapitulatif des différentes valeurs de concentration obtenue par RMN et AAS

$$\text{pour un gel Fe(III)-polyGalA, } \Delta = \frac{[\text{Fe}^{2+}]_{\text{SAA}} - [\text{Fe}^{2+}]_{\text{RMN}}^*}{[\text{Fe}^{2+}]_{\text{SAA}}}$$

		Near	Mid	Far	Complet	
<b>SAA</b>	[Fe <sup>3+</sup> ], (mM)	53±0.5	40±0.4	30±0.2	N.D.	
	Labile- équivalent	Intervalle [Fe <sup>3+</sup> ] <sup>*</sup> (mM)	[53 – 18]	[48 – 17]	[50 – 14]	[32 – 22]
		[Fe <sup>3+</sup> ] <sup>*</sup> , (mM)	32	30	26	30
		Δ (%)	40%	25%	14%	-
<b>RMN</b>	K' = 1.38	Intervalle [Fe <sup>3+</sup> ] <sup>k</sup> (mM)	[74 – 25]	[67 – 24]	[74 – 20]	[69 – 24]
		[Fe <sup>3+</sup> ] <sup>totale</sup> (mM)	44	42	36	42
		Δ (%)	17%	-4%	-19%	-
	K = 1.25	Intervalle [Fe <sup>3+</sup> ] <sup>k</sup> (mM)	[66 – 22]	[60 – 21]	[62 – 18]	[62 – 22]
		[Fe <sup>3+</sup> ] <sup>totale</sup> , (mM)	39	37	32	37
		Δ (%)	25%	6%	-7%	-

## 5. Fer libre et fer lié dans les gels Fe-polyGalA

Dans cette partie, nous examinerons sur la contribution du fer libre et du fer lié dans les gels sur les distributions des temps de relaxation. Afin de réduire la quantité de fer labile dans les gels, ces derniers sont lavés à plusieurs reprises avec de l'eau ultra pure. Cette eau, dépourvue d'ion est très osmotique, ce qui permet la migration de la plupart, voire de tous les ions libres présents dans le gel vers l'eau pure (Figure 5.11).

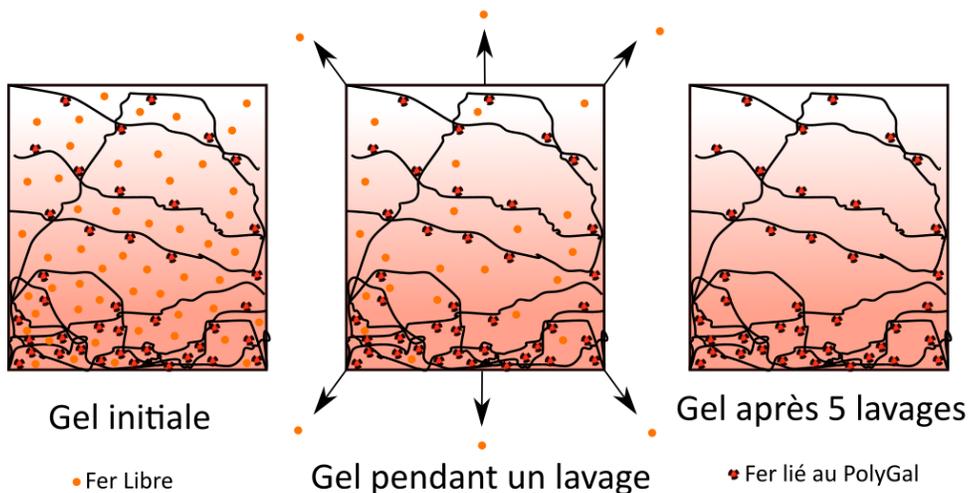


Figure 5.11 : Schématisation du lavage des gels

## 5.1 Les gels Fe(II)-polyGalA : effet du lavage

La Figure 5.13 (a) représente la distribution des  $T_1$  dans un gel Fe(II)-polyGalA non lavé et après cinq lavages successifs (les gels et solutions de lavage sont mesurés à chaque étape). Le gel initial présente une distribution des temps de relaxation (approximativement gaussienne) comprise entre 7 et 145 ms, avec un pic à 68 ms, correspondant à une concentration en Fe(II) de 36 mM en utilisant l'équation 5.10 (Tableau 5.4).

De manière assez notable le lavage des gels a un impact considérable sur la forme des distributions. Celles-ci passent d'une forme quasi gaussienne à une forme très asymétrique, très étirée vers les temps longs. Ce phénomène résulte de deux sources, l'une mathématique et l'autre physique. Premièrement, dans la plage de concentrations étudiée, la relaxivité du fer(II) est telle que la variation de la courbe décrivant le temps de relaxation en fonction de la concentration en fer est significative (Figure 5.12), en particulière en dessous de 20 mM.

Par exemple, si la concentration varie de 1 à 10 mM, le  $T_1$  varie de 1,25 à 0,26 s. (Dans le cas de la solution de Fe(III), l'augmentation significative de la variation se situe entre 0 et 5 mM).

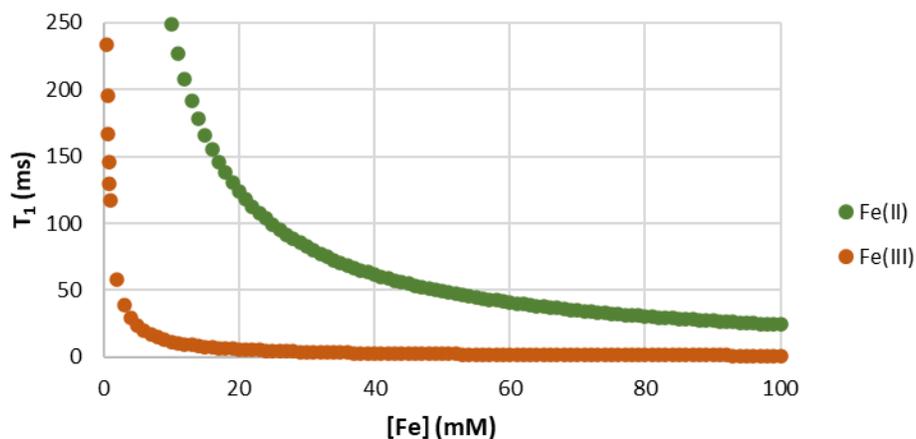


Figure 5.12 Evolution de  $T_1$  en fonction de la concentration en fer pour une solution de Fe(II) ou Fe(III) suivant les équations 5.7 et 5.8.

Deuxièmement, il existe un effet de confinement comparable à celui observé dans le Chapitre 4. Cet effet n'est pas lié au paramagnétisme et, il a donc un impact moins prononcé, se traduisant par des temps de relaxation plus longs. Ainsi, les temps de relaxation non liés au paramagnétisme se traduisent par une accentuation de la queue de la distribution (des valeurs élevées de  $T_1$ ) des gels lavés. Ce phénomène n'est pas dominant dans le gel non lavé, ce qui permet d'extrapoler l'utilisation d'une solution de titration pour celui-ci.

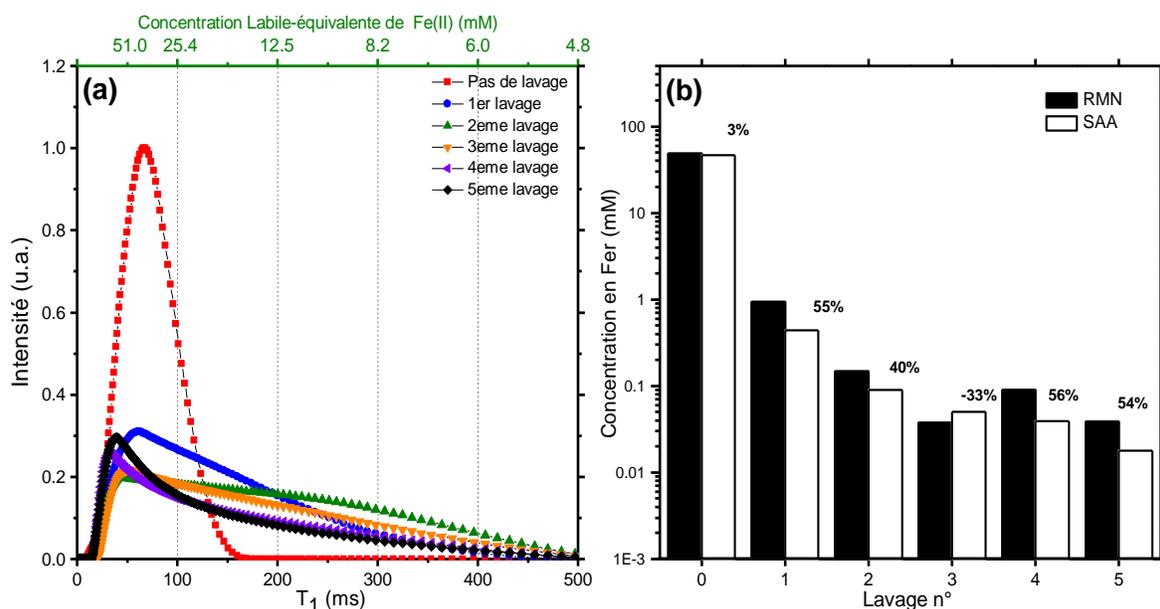


Figure 5.13 : Distributions des temps de relaxation dans un gel complet Fe(II)-polyGalA après plusieurs lavage (a). Concentrations en Fe(II) déterminées dans les solutions de lavage par SAA et relaxométrie RMN (b). Les valeurs en % représentent les écarts relatifs entre SAA et RMN.

Le Tableau 5.4 représente les valeurs clés des distributions. Le gel non lavé a une concentration centrée à environ 33 mM. Cette valeur diminue de manière constante au fur et à mesure des lavages, pour atteindre une valeur de 16 mM au cinquième lavage. Les concentrations de fer dans le gel peuvent atteindre des valeurs très élevées. En effet, la valeur maximale de la distribution de concentration du gel initial atteint 261 mM, bien que cette valeur soit associée à des probabilités très faibles (voire à un artefact de la procédure d'inversion), ce qui reste physiquement improbable. Dans ce cas, une légère oxydation du  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  dans le processus de lavage du gel pourrait expliquer l'observation de courts temps de relaxation et donc une grande concentration calculée.

Les mesures par spectroscopie d'absorption atomique (en SAA) et par relaxométrie des eaux de lavage 2 à 5 (Figure 5.13 (b)) sont cohérentes et montrent des évolutions similaires, mais des écarts (jusqu'à 56 %) entre les mesures sont observés. Cependant, ces écarts peuvent être raisonnablement discutés:

Ils apparaissent sur les solutions de lavage où, malgré les précautions (élimination de l'oxygène), il est possible que le fer s'oxyde lors de brèves expositions à l'air lors des transferts de verrerie, entraînant ainsi une augmentation virtuelle de la concentration due à une augmentation de la relaxivité de la solution et une surestimation de la mesure par RMN. Cet argument ne peut cependant pas s'appliquer à l'eau de lavage 3, où la concentration mesurée par SAA est supérieure à celle mesurée par RMN. Dans ce cas, la mesure SAA doit être remise en question.

Tableau 5.4 caractéristiques des distributions de  $T_1$  des gels Fe(II)-polyGalA et concentrations associées (équation 5.10) en fonction du nombre de lavage.

Fe(II)-polyGalA								
Nombre de lavage	Maximum (Intensité)		Centre de masse ( $T_1$ )		Minimum ( $T_1$ )		Maximum ( $T_1$ )	
	$T_1$ (ms)	[Fe $^{2+}$ ] (mM)	$T_1$ (ms)	[Fe $^{2+}$ ] (mM)	$T_1$ (ms)	[Fe $^{2+}$ ] (mM)	$T_1$ (ms)	[Fe $^{2+}$ ] (mM)
0	66	37	74	33	10	261	169	14
1	61	40	149	16	16	151	511	4
2	44	56	202	12	13	196	573	4
3	51	48	184	13	19	131	573	4
4	32	76	159	15	14	175	541	4
5	39	64	149	16	13	190	573	4

## 5.2 Les gels Fe(II)-polyGalA lavés, tranchés

L'analyse des trois tranches du gel Fe(II)-polyGalA (Near, Mid et Far) lavées cinq fois permet d'obtenir un point de vue local de la concentration en fer lié aux chaînes de polyGalA. Dans la partie « Near », la distribution est plus étroite avec un pic à 29 ms, ce qui correspond à une concentration en Fe(II) de 83 mM, une concentration proche de celle obtenue dans le gel non lavé. Le lavage ne semble pas avoir un effet significatif sur la partie Near. Cela peut être dû à deux phénomènes : (i) la majorité du fer est liée dans la partie Near et n'est pas évacuée pendant le lavage, ou (ii) le lavage a pour effet de contracter le gel et d'augmenter ainsi la concentration. Dans les parties suivantes (Mid et Far), les concentrations sont plus faibles que dans le gel non lavé, ce qui indique que l'effet du lavage est principalement observé sur les parties de plus grande taille de réseau. En considérant les concentrations en GalA calculées précédemment, on peut retrouver un rapport R de 0,40 dans la partie Near (inchangé par rapport aux gels non lavés) et des rapports de 0,29 et 0,20 qui sont beaucoup plus proche du R 0,25 attendu pour une réticulation de proche du type *boîte à œufs*. Il semble donc effectivement que le lavage retire les ions libres des parties Mid et Far mais pas de la partie Near qui nécessite probablement plus de lavage ou de plus de temps en immersion en raison de son réseau dense.

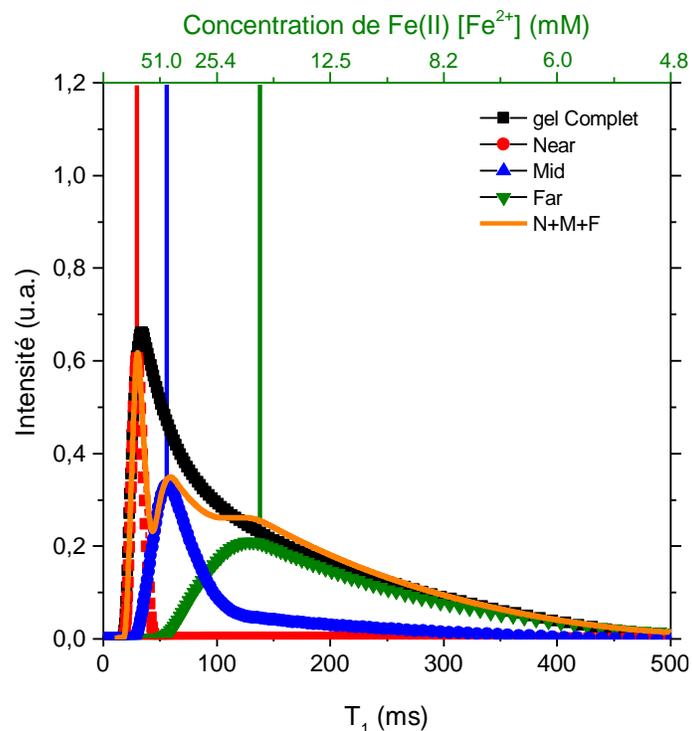


Figure 5.14 Distributions des T<sub>1</sub> et des concentrations en Fer(II) d'un Gel Fe(II)-polyGalA lavé 5 fois et comparé à ses propres tranches. Les mesures des concentrations dans les tranches par AAS sont représentées par des lignes verticales.

Les concentrations en Fe(II) obtenues par RMN sont similaires à celles obtenues par SAA, ce qui suggère une fois de plus que dans les gels, il est possible que le report du taux de relaxation associé au maximum de la distribution sur une simple courbe d'étalonnage réalisée en solution permet de quantifier *in-situ* la concentration moyenne du fer. Nous pouvons dès lors abandonner l'appellation « labile-équivalent » qui était utilisée jusqu'à présent pour les gels Fe(II)-polyGalA. La relaxométrie RMN permet d'obtenir les mêmes valeurs qu'en spectroscopie d'absorption atomique sans passer par l'étape de minéralisation. De plus, la relaxométrie présente un avantage indéniable en permettant d'apprécier les distributions de concentration *in-situ* dans un milieu hétérogène.

Tableau 5.5 : Récapitulatif des différentes valeurs de concentration obtenues par RMN et SAA pour un gel Fe(II)-polyGalA lavé

		Near	Mid	Far	Complet
SAA	[Fe <sup>2+</sup> ] (mM)	86±1	45±3	17±0.2	N.D.
	[Fe <sup>2+</sup> ] <sub>l</sub> (mM)	83	43	19	71
RMN	Intervalle [Fe <sup>2+</sup> ] (mM)	[136 – 54]	[89 – 5]	[50 – 3]	[126 – 4]
	Δ (%)	4%	5%	-10%	-
R	[Unité GalA] (mM)	198	142	91	-
	[Fe <sup>2+</sup> ] <sub>SAA</sub> /[GalA]	0,43	0,31	0,18	-

### 5.3 Les gels Fe(III)-polyGalA lavés

La Figure 5.15 présente les distributions des T<sub>1</sub> observées dans un gel Fe(III)-polyGalA à chaque étape de lavage. Une observation importante est que chaque distributions est très proche d'une distribution gaussienne. De plus, les temps de relaxation T<sub>1</sub> augmentent significativement après chaque lavage. Cela s'explique simplement par l'extraction progressive des ions Fe<sup>3+</sup> labiles lors des lavages successifs.

Les mesures réalisées en SAA et par relaxométrie des eaux de lavage 2 à 5 (Figure 5.15 (b)) sont cohérentes et montrent des évolutions similaires. Une nouvelle fois des écarts entre les mesures sont observés (comme pour la Figure 5.13.b), allant de 30 à 80% sur les trois premières mesures.

Dans le cas de la mesure de la concentration en Fe<sup>3+</sup> par RMN dans des solutions fraîches en milieu acide, la méthode est extrêmement robuste. Il est difficile de pointer des sources expérimentales d'erreur, (hormis sur la courbe d'étalonnage). En général, les mesures par RMN peuvent être considérées comme moins sujettes aux erreurs de manipulation.

Les écarts entre les mesures apparaissent principalement dans la solution de diffusion et sur les deux premières eaux de lavage, où les concentrations sont les plus élevées et nécessitent des dilutions pour les mesures par SAA. Par exemple, la concentration de la solution de dilution est connue : 50 mM, la RMN mesure 49 mM tandis que la mesure par SAA indique 31 mM, ce qui est manifestement erroné.

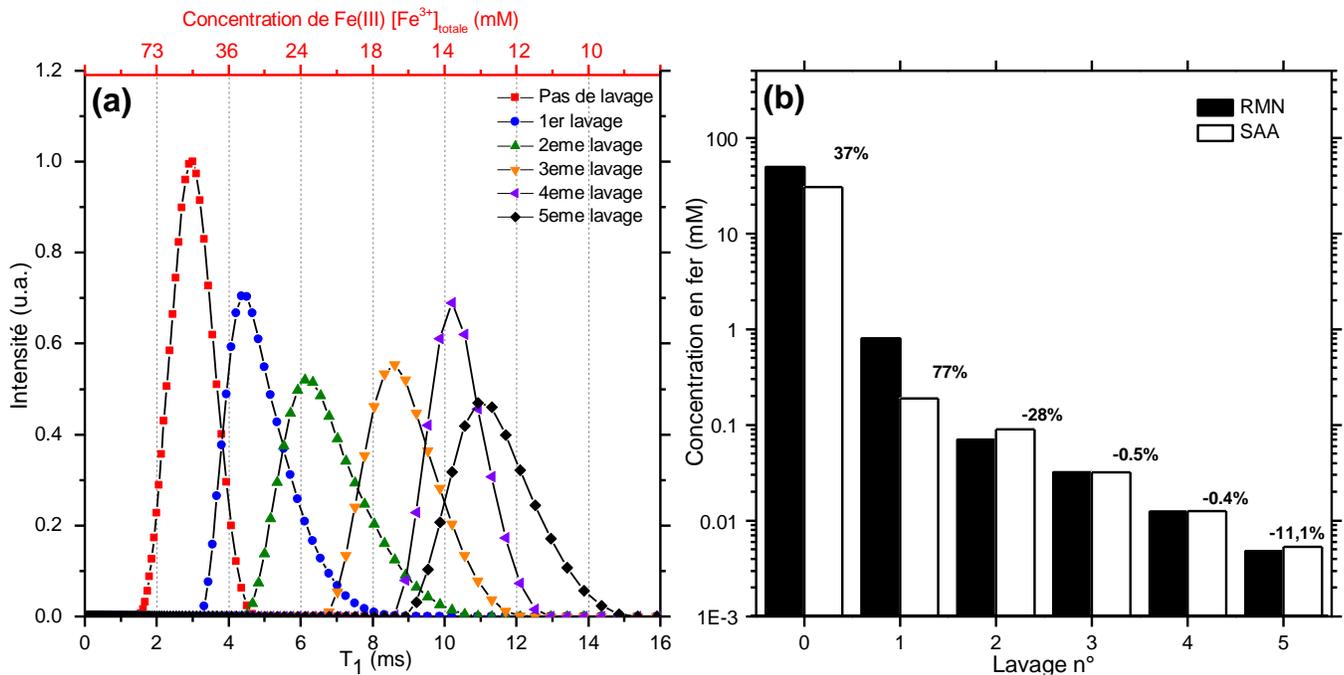


Figure 5.15 Distributions des  $T_1$  dans un gel complet Fe(III)-polyGalA après plusieurs lavages (a). Concentrations en Fe(III) déterminées dans les solutions de lavage par SAA et par relaxométrie RMN (b). Les valeurs en % représentent l'écart relatifs entre SAA et RMN.

Le gel initial (non lavé) montre une concentration en fer calculée (Tableau 5.6) pour l'abscisse du maximum de distribution de 49 mM. Cette valeur diminue régulièrement à mesure des lavages, pour atteindre une valeur de 17 mM au cinquième lavage. Cela représente une perte de 32 mM de fer au cours des cinq lavages.

L'étendue de la distribution du temps de relaxation augmente avec les lavages, passant de 3 ms pour le gel non lavé à 6 ms pour le gel lavé cinq fois. Cette augmentation peut être attribuée à l'hétérogénéité de la taille réseau, similaire aux gels diamagnétiques. La diminution du fer labile suite aux lavages induit naturellement une augmentation des temps de relaxation (décalage des distributions vers la droite). Cependant, la diminution de la "contribution labile" de la relaxation permet à celle issue du fer(III) lié de se révéler graduellement. On peut conceptuellement rapprocher cette contribution de l'effet de d'un effet de confinement observé dans le chapitre 4. Cependant, dans ce cas, les fibres sont très

paramagnétiques car les ions fer lié sont largement répartis de manière homogène dans la fibre, étant donné que le fer est en excès lors de la formation du gel externe. Le paramètre  $\mathcal{M}$  (équation 4.4), qui caractérise de la relaxation de la fibre est plus élevé que dans le cas des gels diamagnétiques. Il s'agit donc plutôt d'un effet de « confinement paramagnétique ».

Une analyse aussi détaillée ne peut cependant pas être menée pour les distributions en termes de concentration. Dans un premier temps, l'abscisse du maximum de la distribution permet en principe le calcul de la concentration en fer grâce à l'équation 5.9. Cependant, dans un gel lavé où la relaxation due au fer labile disparaît, cette équation ne peut probablement pas expliquer la distribution, car il faudrait prendre en compte l'effet de confinement paramagnétique, c'est-à-dire une nouvelle relaxivité du fer lié à la fibre. Cette relaxivité nouvelle peut probablement être ajustée en utilisant un facteur  $K_{lié}$  spécifique au fer(III) lié, que nous allons tenter de définir en découpant un gel lavé cinq fois.

Par ailleurs, sachant (i) qu'il est très probable que le Fe(III) ne suive pas une association de type « boîte à œufs » ( $R=0,25$ ) mais une association plus proche de  $R=0,16$  (1 Fe(III) pour 6 unités GalA) (Menakbi et al., 2016) et que (ii) la concentration moyenne de GalA est d'environ 100 mM dans le gel, on peut supposer que la concentration de le fer lié maximale doit être proche de 16 mM, une valeur comparable à celles obtenues à partir du troisième lavage.

Tableau 5.6 : valeurs remarquables des distributions de temps de relaxation des gels Fe(III)-polyGalA et concentrations calculées d'après l'équation 5.12 ( $K=1,25$ ).

Lavage N°	Gel Fe(III)-polyGalA							
	Maximum		Centroïde		Minimum ( $T_1$ )		Maximum ( $T_1$ )	
	T1	[Fe3+]	T1	[Fe3+]	T1	[Fe3+]	T1	[Fe3+]
0	2,99	48,9	3,01	48,6	1,57	93,2	4,66	31,4
1	4,35	33,6	4,93	29,6	3,2	45,7	8,32	17,5
2	6,12	23,9	6,76	21,6	4,5	32,5	10,93	13,3
3	8,61	16,9	8,88	16,4	6,55	22,3	12,1	12,0
4	10,21	14,3	10,39	14,0	8,61	16,9	12,52	11,6
5	10,93	13,3	11,43	12,8	8,91	16,4	14,85	9,8

## 5.4 Les gels de Fe(III)-polyGalA lavés tranchés

La Figure 5.16 représente les distributions des temps de relaxation observées dans un gel lavé cinq fois et dans ses tranches. Comme dans les précédentes observations, les positions des maximums des distributions des tranches Near Mid et Far sont associées à des concentrations décroissantes en fer. Les parties Near et Mid présentent un décalage par rapport au début de la courbe de distribution de  $T_1$  du gel complet. Ces défauts d'alignement sont probablement causés par un séchage du gel lors de la découpe. Cela a pour effet de concentrer le fer dans les extrémités du gel, ce qui se traduit par. Ainsi, en RMN, une augmentation locale des concentrations en fer en RMN. En conséquence, une plus grande étendue de l'étendue de la distribution des temps de relaxation est observée, car des concentrations plus élevées en fer apparaissent localement dans les extrémités du gel.

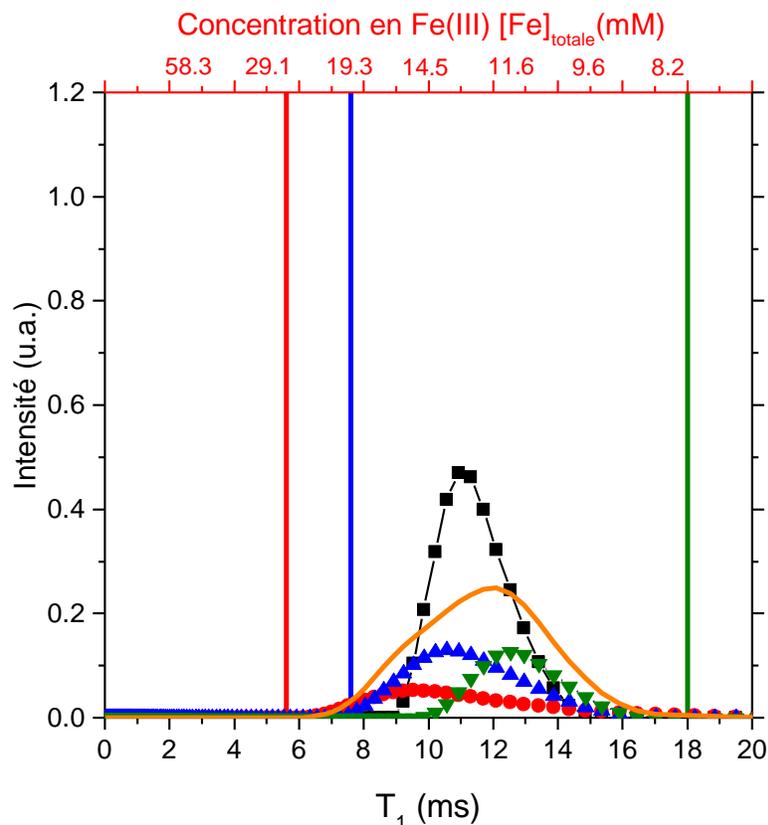


Figure 5.16 Distributions des  $T_1$  et concentrations en Fer(III) d'un Gel Fe(III)-polyGalA lavé 5 fois et de ses tranches. Les concentrations en fer calculées (équation 5.12  $K=1,25$ ) sont reportées sur l'axe supérieur. Les lignes verticales correspondent à la concentration déterminée par SAA.

Le Tableau 5.7 compare les concentrations en fer mesurées par RMN et par spectroscopie d'absorption atomique (SAA). Il apparaît que les concentrations obtenues par RMN dans les différentes tranches

s'écartent significativement (entre 53 et -16%) des concentrations obtenues par SAA. Bien que les mesures par SAA puissent également remises en question, il est légitime de s'interroger sur le calcul de la concentration obtenue à partir des temps de relaxation mesurés par RMN. Ces écarts suggèrent que le coefficient phénoménologique K de l'équation 5.12 (1,25) obtenu pour un gel non lavé ne s'applique pas à un gel lavé, et qu'une analyse différenciant le fer labile du fer lié est nécessaire. Dès lors, le traitement d'un tel problème devient complexe car il y a plus d'inconnues que d'équations (une mesure de temps de relaxation pour deux relaxivités). Une approche possible consiste à approximer la relaxivité du fer labile pourrait être approximée à celle d'une solution (8,54 mM.s<sup>-1</sup>) mais la relaxivité du fer lié reste à déterminer. Les mesures de SAA permettent d'avancer dans cette résolution, le traitement détaillé est développé dans l'article en annexe. Pour le gel labile, le coefficient phénoménologique K<sub>5</sub> pour un gel lavé 5 fois est obtenu par :

$$K_5 = \frac{1}{3} \sum_{Near}^{Far} \frac{[Fe^{+3}]_{SAA}}{[Fe^{+3}]_{RMN}^*} \sim 1.56 \quad 5.15$$

Le facteur semble toutefois adapté seulement pour la partie Mid, c'est à dire la partie moyenne du gel. Dans les autres parties, le facteur est très peu adapté, ce qui souligne la faiblesse de l'utilisation du facteur K dans un gel où la relaxation issue du fer(III) va fortement varier en fonction de la structure locale.

Tableau 5.7 : Récapitulatif des différentes valeurs de concentration obtenues par RMN et SAA pour un gel Fe(III)-polyGalA lavé.

		Near	Mid	Far	Complet	
SAA	[Fe <sup>3+</sup> ] <sub>SAA</sub> (mM)	26	19	8	N.D.	
RMN	Labile équivalent	Intervalle [Fe <sup>3+</sup> ] <sup>*</sup> (mM)	[19 – 5]	[16 – 7]	[12 – 7]	[13 – 8]
		[Fe <sup>3+</sup> ] <sup>*</sup> , (mM)	12	11	9	11
		Δ (%)	53%	41%	-16%	-
	K <sub>5</sub> = 1,59	Intervalle [Fe <sup>3+</sup> ] <sup>k<sub>5</sub></sup> (mM)	[30 – 8]	[11 – 26]	[10 – 18]	[12 – 20]
		[Fe <sup>3+</sup> ] <sup>k<sub>5</sub></sup> , (mM)	19	17	14	17
		Δ (%)	26%	9%	-81%	-
	K = 1,25	Intervalle [Fe <sup>3+</sup> ] <sup>k</sup> (mM)	[24 – 7]	[20 – 9]	[15 – 8]	[16 – 10]
		[Fe <sup>3+</sup> ] <sup>k</sup> , (mM)	15	14	12	13
		Δ (%)	41%	27%	-45%	-
R	[Unité GalA] (mM)	130	119	105	-	
	[Fe <sup>3+</sup> ] <sub>SAA</sub> /[GalA]	0,20	0,16	0,08	-	

## 6. Discussion

Les résultats précédents permettent de proposer un modèle expliquant les différences de relaxivité observées dans les différents gels à base de fer.

D'une part, le gel Fe(II)-polyGalA montre une forme de profil de relaxation proche de celle d'un gel diamagnétique. A 20 MHz, une très faible différence de relaxivité est observée entre un gel et une solution de Fe<sup>2+</sup> (Figure 5.5). La droite d'étalonnage d'une solution de fer(II) permet de quantifier la concentration en fer du gel, qu'il soit lavé ou pas. Cela signifie que le Fe<sup>2+</sup> labile et le Fe<sup>2+</sup> réticulé se comportent de façon équivalente vis-à-vis de la relaxation des protons environnants.

Ce phénomène peut être associé à deux observations. Premièrement, le Fe(II) réticulé et Fe(II) libre ont le même environnement local (chapitre 1). deuxièmement, les molécules d'eau de la première couche d'hydratation du Fe<sup>2+</sup> s'échangent rapidement avec l'eau environnante (temps de résidence est égale à 0,23 μs, Helm and Merbach, 1999). Le Fe(II) lié au polyGalA contient 4 molécules d'eau dans sa première sphère d'hydratation, mais on peut considérer qu'à la fréquence de 20 MHz (T<sub>1</sub> = 20-500 ms,) les échanges sont suffisamment fréquents pour que le nombre de molécules d'eau d'hydratation n'ait pas d'impact sur la relaxation, que le fer soit libre (6 molécules d'hydratation) ou lié (4 molécules d'hydratation). La Figure 5.17 illustre ce comportement à différentes échelles.

En ce qui concerne les gels Fe(III)-polyGalA, la forme des profils indique que la relaxation paramagnétique domine les phénomènes de relaxation. Cependant, une différence de relaxation d'environ 25% est observée entre la solution et le gel à 20 MHz. Cette différence de relaxivité est à nouveau observée dans les distributions obtenues pour des gels non lavés, lorsque les concentrations obtenues par l'équation 5.9 sont comparées aux concentrations obtenues par SAA. Cela a conduit à la rectification de la courbe de dosage par un facteur K de 1,25. Cependant, il apparaît que le facteur n'est que modérément efficace en partie Mid et Far. Un facteur affiné à 1,38 grâce aux parties tranchés ne semble pas donner de meilleurs résultats.

Dans les gels lavés Fe(III)-polyGalA, une différence de plus de 50% entre les concentrations issues de la mesure RMN (équation 5.9) et de la mesure SAA est supérieure à 50%. Il est donc évident que l'élimination du fer libre change le facteur K. Cela est probablement dû à la variation des proportions du fer labile relaxant comme en solution) et du fer lié (pour lesquels la relaxivité des protons est difficile à établir).

En comparant la distribution des gels Fe(II)-polyGalA et Fe(III)-polyGalA, une proposition séduisante (bien que discutable) peut être avancée en se basant sur les modes d'association ions fer-polyGalA, ainsi que sur les temps de résidence de l'eau dans la première sphère d'hydratation des ions.

L'association des ions trivalents Fe(III) diffère de l'association bidentée observée pour les ions Fe(II), permettant ainsi jusqu'à 3 complexations autour de l'ion  $Fe^{3+}$  ( $R = 0,16 = 1 Fe^{3+}/6 GalA$ ) contre 2 pour l'ion  $Fe^{2+}$ . Cela signifie que jusqu'à 3 molécules d'eau sont retirées de la couche d'hydratation primaire, ce qui correspond à 50% de l'eau d'hydratation (CN=6). De plus, l'eau d'hydratation est fortement liée à  $Fe^{3+}$  (temps de résidence 6,25 ms) par rapport à  $Fe^{2+}$  (temps de résidence 0,23  $\mu s$ ). Ainsi, par rapport au gel Fe(II), il y a peu d'échange d'eau s'échange pendant l'expérimentation RMN pour les gels Fe(III). Si l'on suppose que l'échange des molécules d'eau de la première sphère d'hydratation des ions est un mécanisme prédominant dans la relaxation paramagnétique, celui-ci serait bien moins efficace dans le cas des gels Fe(III). Par conséquent, il est nécessaire d'appliquer un facteur correctif K prenant en compte ce changement de relaxivité. De plus, ce phénomène pourrait être amplifié par l'encombrement local dû à une agrégation typique des polysaccharides autour des ions trivalents, qui n'existe pas dans les gels Fe(II) (Schefer et al., 2015). Cela est soutenu par le fait que, lorsque le gel Fe(III)-polyGalA est lavé, le facteur correctif K devient plus important (la relaxivité du fer(III) lié est nettement plus basse que celle du fer labile). Un schéma comparatif de ces mécanismes est proposé sur la Figure 5.17.

Il est cependant important de souligner qu'il est difficile d'estimer les concentrations en fer lié et en fer libre seulement en utilisant la mesure de la RMN. Il est nécessaire de combiner une deuxième méthode de quantification (ici SAA) et un lavage du gel pour estimer l'élimination du fer qui correspondra au fer labile total.

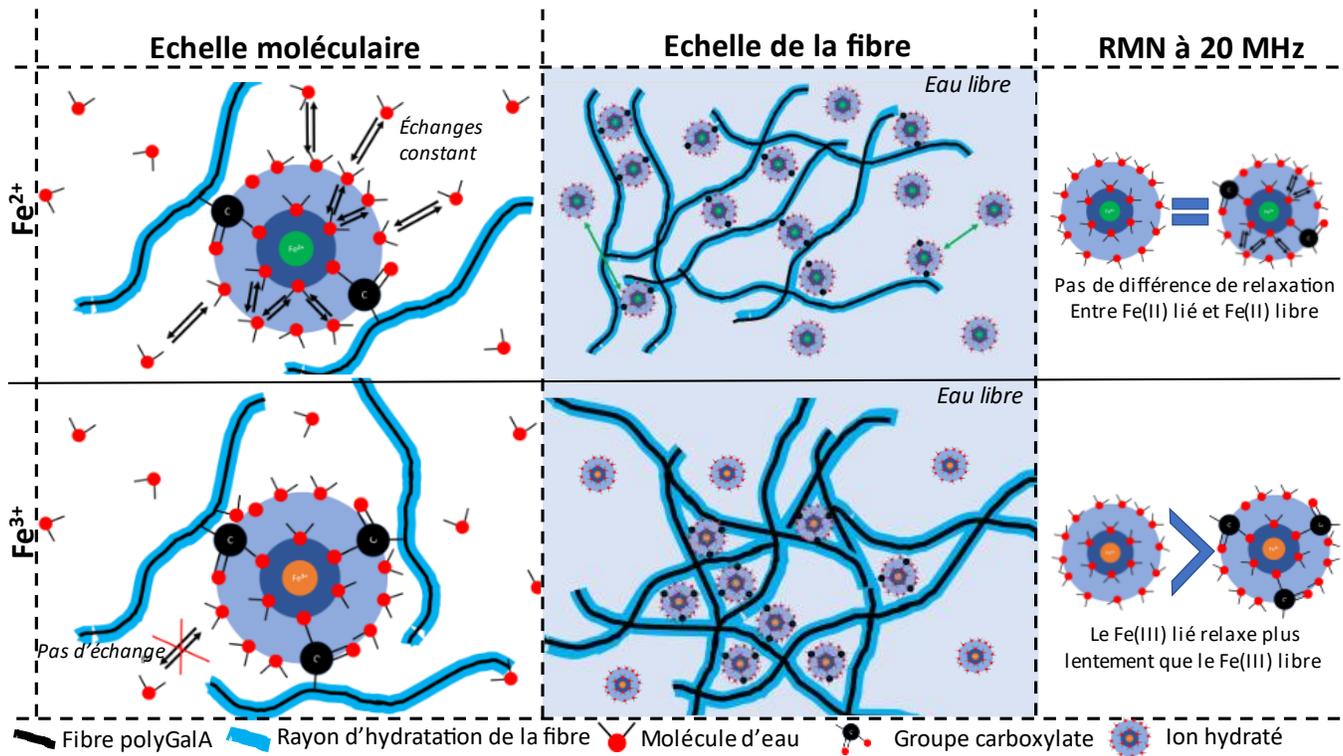


Figure 5.17 : Illustration des mécanismes de réticulation des ions Fe(II) et Fe(III) au polyGalA et leur conséquence sur les échanges de l'eau et la relaxivité RMN des protons de l'eau.

#### IV. Différenciation *in-situ* du Fe(II) et du Fe(III) dans un gel polysaccharidique

Des gels à double diffusion  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  ont été formulés en suivant le même protocole de gélification externe. Cependant, une diffusion supplémentaire a été réalisée après 24h en changeant la solution de diffusion ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ ) par une solution de fer dans l'autre degré d'oxydation ( $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ ).

Deux types d'expériences ont été menées : une diffusion secondaire de  $\text{Fe}^{2+}$  dans un gel  $\text{Fe}^{3+}$  et une diffusion secondaire de  $\text{Fe}^{3+}$  dans un gel  $\text{Fe}^{2+}$ . Dans le premier cas, nous n'avons pas observé de diffusion des ions  $\text{Fe}^{2+}$  dans le gel Fe(III)-polyGalA n'a été observée dans le gel Fe(III) sur les distributions de temps de relaxation. Ceci ne signifie pas qu'elle n'existe pas, mais si on suppose que le  $\text{Fe}^{2+}$  est labile, pour être visible, il faudrait que la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  soit considérablement plus élevée que celle de  $\text{Fe}^{3+}$  afin de compenser la différence de relaxivité entre les deux ions. En revanche, dans le deuxième type d'expérience, montre une nette diffusion des ions  $\text{Fe}^{3+}$  dans le gel Fe(II)-polyGalA a été observée. La Figure 5.18 représente la distribution des temps de relaxation des protons d'un gel Fe(II)24h-Fe(III)6h-polyGalA, où deux distributions sont observées. Un ajustement à l'aide de deux lois bigaussiennes (la forme de raie est arbitraire) permet de décomposer la distribution sans toutefois prendre en compte la

queue situé à droite. La première distribution (1-10ms) est associée à la distribution des gels de Fe(III) non lavés, tandis que la seconde distribution (10-150 ms) est associée à la distribution des gels de Fe(II) non lavés. Etant donné que le gel Fe(II)24h-Fe(III)6h-polyGal est non lavé, la détermination des concentrations tient compte de l'équation 5.12. Cependant, il convient de noter que le facteur K n'a pas été déterminé précisément en raison de la complexité de l'interaction entre le polyGalA et les deux ions fer. K est alors attribué à 1,25, comme dans un gel non lavé. Les concentrations déterminées pour Fe(III) sont comprises entre 150 mM et 13 mM, et pour Fe(II) entre 249 et 4 mM. Les concentrations les plus élevées ne sont pas réalistes. Elles sont probablement le résultat de plusieurs facteurs : (i) un ajustement bigaussien qui favorise l'apparition de la queue (surtout vrai pour la queue au court  $T_1$  de Fe(II)), (ii) une distribution mal calculée par le logiciel de traitements (les queues pourraient être des artefacts de l'inversion de la courbe de relaxation); (iii) l'apparition de complexes très relaxants lorsque Fe(II) et Fe(III) sont réunis (oxyde). Les concentrations moyennes indiquent environ 30 mM et 60 mM pour Fe(III) et Fe(II) respectivement, des valeurs relativement proches de celles des gels non lavés.

Cette expérience montre qu'il est possible de différencier assez facilement le Fe(II) et le Fe(III) présents dans le gel. Il est même possible de les quantifier, bien que le traitement puisse certainement être amélioré.

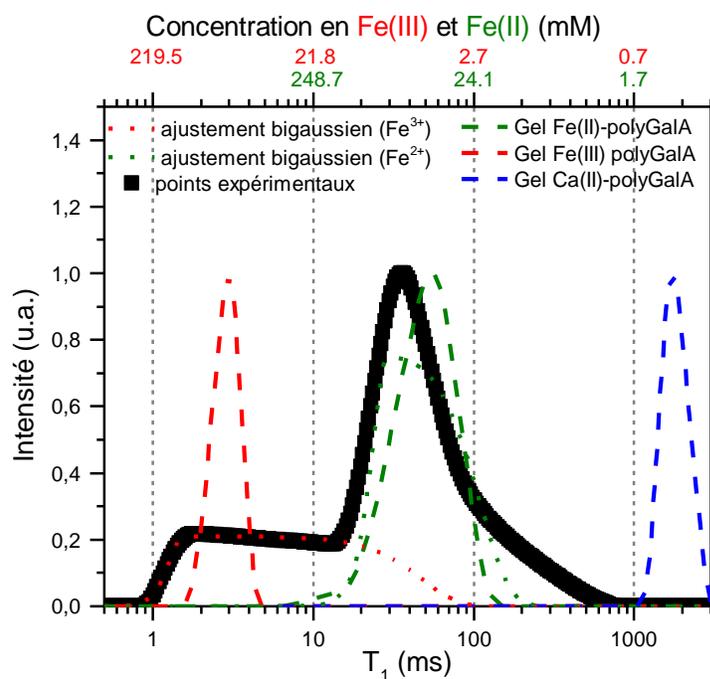


Figure 5.18 : Distributions des  $T_1$  dans un gel Fe(II)24h-Fe(III)6h-polyGal. La distribution calculée (ligne épaisse) est ajustée avec deux raies arbitrairement gaussiennes (pointillés rouges et verts). A titre de

comparaison les distribution d'un gel Fe(II)-, Fe(III)- et Ca-polyGalA sont reportés en traits discontinues rouges, verts et bleus respectivement. Les deux axes des abscisses supérieures reportent les concentrations en Fe(III) (équation 5.12) et Fe(II) (équation 5.10).

## **V. Conclusions et perspectives**

Ce chapitre, nous avons examiné l'utilisation de la relaxométrie pour la quantification et la différenciation des ions Fe(II) et Fe(III) au sein d'un gel polysaccharidique de polygalacturonate. Les phénomènes de relaxation qui permettent cette différenciation et la quantification sont principalement basés sur l'augmentation de la relaxation par paramagnétisme (PRE). Nous avons démontré que la relaxation d'un gel réticulé par des ions paramagnétiques Fe(II) peut être assimilée à la relaxation d'une solution. Cela permet, grâce à l'aide d'une courbe de titrage réalisée sur des solutions de l'ion réticulant, de quantifier les ions paramagnétiques présents dans le gel. Le processus de lavage mis en œuvre dans cette étude a également permis de mettre en évidence la sensibilité de la relaxométrie RMN est suffisamment sensible pour détecter des changements minimes (quelques mM) et une légère oxydation (Figure 5.8 (b)).

Toutefois, pour les gels Fe(III), l'utilisation d'une gamme étalon réalisée sur une solution peut être critiquée et une alternative doit être trouvée.

La technique décrite dans ce chapitre peut s'appliquer directement au suivi et à la formulation de gels enrichis en fer pour le traitement de l'anémie, et ce, de manière à *in-situ*. En effet, l'un des principaux avantages de cette technique réside dans sa rapidité et sa capacité de mesure *in-situ*. Dans le même contexte, cette méthode pourrait être utilisée pour la quantification des protéines paramagnétiques en solution, telles que l'hémoglobine dans le sang.

## **Conclusion générale et Perspectives :**

Les travaux de cette thèse ont été initiés dans le but d'étudier les métaux ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) au sein d'une structure d'hydrogel polysaccharidique. L'innovation principale de la proposition faite à l'école doctorale était l'utilisation de la RMN bas-champ. Il est rapidement devenu évident que l'application de la relaxation bas-champ appliquée aux hydrogels n'était pas aussi explorée que la physico-chimie des hydrogels. Il a fallu donc appréhender des modèles physiques de RMN appliqués à des matrices « classiques » (eau confinée dans des mésoporeux, relaxation de l'eau des sols et d'autres matrices alimentaires). Ensuite, un travail d'adaptation a été réalisé pour transférer ces modèles et concepts à un modèle « nouveau » riche en eau tels que les hydrogels.

Dans un premier temps, des techniques de relaxométrie à cycle de champs rapide ont été utilisées sur des hydrogels diamagnétiques afin d'étudier la dynamique présente dans ces structures. Les temps de relaxations ont ensuite été mesurés de 1 kHz à 20 MHz révélant une forme caractéristique des profils indépendante des ions réticulants. Trois modèles de relaxation ont été appliqués permettant d'obtenir des informations inédites sur la dynamique lente de l'eau dans le gel. Le premier modèle ( $\beta$ ) a révélé une population très minoritaire de protons affectant le profil (0,2% des protons totaux). Le deuxième modèle (BMSD) a permis de trouver un déplacement caractéristique de l'eau à la surface des fibres que nous avons associé aux diamètres des fibres plutôt qu'à la taille de réseau. Le dernier modèle considère deux rotations et donc deux environnements différents de protons fortement ralentis qui sont probablement associés aux cations (première couche d'hydratation) et à l'eau « bloquée » entre les fibres. Ces résultats sont soutenus par des simulations de dynamique moléculaire. Toutefois, les trois modèles doivent être critiqués, mais ils produisent tous des valeurs numériques spatiales et temporelles en accord avec les dimensions du système étudié et avec les simulations numériques.

Dans un deuxième temps, en combinant deux modèles de relaxométrie pour mesurer la distribution du rayon hydraulique dans un gel et modéliser un réseau de fibres, nous avons pu obtenir une distribution de taille de réseau dans des gels diamagnétiques (Ca-polyGalA et Zn-polyGalA). Les résultats de relaxométrie ont permis d'observer une distribution de taille de réseau pour chaque tranche de gel. Dans la partie « Near » du gel, la taille de réseau obtenue par RMN est corrélée aux résultats obtenus par DNPA (7,5 nm) et par rhéologie dynamique (~6 nm). Dans les parties « Mid » et « Far », la rhéologie ne permet pas d'accéder à la taille du réseau car elle assume une distribution homogène des densités de réticulation ; ce qui n'est pas le cas des hydrogels « externe ». Les mesures de DNPA obtenus dans

des études ultérieures, montrent que la taille de 7,5 nm est observable dans toutes les tranches de l'hydrogel. Cette taille minimale a été également observée par la RMN. Elle présente les bornes des distributions obtenues par relaxométrie. A titre d'exemple, dans les gels Ca-polyGalA, la distribution des tailles de réseau obtenue par relaxométrie RMN sont égales à [7 – 15 nm], [10 – 27 nm] et [7,5 – 35 nm] pour les parties « Near », « Mid » et « Far », respectivement. Pour consolider le modèle mathématique utilisé, des gels « internes », qualifiés d'homogènes par rapport aux gels externes, ont été formulés. Les résultats obtenus par RMN montrent une distribution de taille de réseau [12 – 22 nm] identique dans les trois tranches du gel (CaCO<sub>3</sub>-polyGalA). Cette distribution observée dans le gel interne est similaire de celle obtenue dans la partie « Mid » du gel externe. Pour conclure, la force de la relaxométrie RMN provient de la capacité à déterminer des distributions de taille de réseaux contrairement à d'autres techniques qui permettent d'obtenir des valeurs moyennes avec des approximations non négligeables. Pour la rhéologie : la densité de réticulation doit être homogène dans l'ensemble du gel ; pour la DNPA : il est nécessaire de formuler le gel dans D<sub>2</sub>O pour avoir un contraste mais aussi d'avoir une concentration en éléments diffuseur relativement élevé (dans notre cas le polyGalA).

Enfin, nous avons cherché à exploiter l'augmentation de la relaxation des protons par leur couplage avec des ions paramagnétiques. Le fer s'est imposé de lui-même comme élément paramagnétique (à cause de son importance pour la santé et dans le vivant en générale). La RMN s'est montrée capable de (i) quantifier Fe<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup> *in-situ* dans des gels polysaccharidiques réticulés par le même élément, (ii) différencier et quantifier simultanément, *in-situ* les deux états d'oxydation du fer dans le gel obtenu par les deux cations (Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>). Cette méthode semble particulièrement adaptée à la mesure de Fe<sup>2+</sup>. Toutefois, elle devient plus complexe pour Fe<sup>3+</sup> car la relaxation de l'eau semble particulièrement influencer par la configuration, soit libre soit réticulé, des ions Fe<sup>3+</sup>. La quantification repose pour l'instant sur des conjectures simples voir simplistes nécessitant une correction phénoménologique (au moins pour Fe<sup>3+</sup>) mais capable de fournir des valeurs relativement acceptables.

Pour conclure, la RMN nous a permis d'aborder les gels sous trois aspects : dynamique, structurel et quantitatif. La relaxométrie s'avère être une technique particulièrement adaptée à l'étude des hydrogels. Non seulement parce qu'ils sont riches en protons, mais aussi parce que leurs structures influencent grandement les mécanismes de relaxation, nous permettant ainsi d'approfondir notre compréhension de la physico-chimie des gels. Beaucoup de systèmes et matériaux autres que les gels peuvent bénéficier des résultats obtenus. Par exemple, la quantification de métalloprotéine telles que l'hémoglobine, qu'elle soit encapsulée dans un gel ou non. Il semble généralement possible de distinguer

rapidement et in situ la nature de l'hème de l'hémoglobine (lié à  $-O_2$ ,  $-CO_2$  ou dénaturé en metHb). Il serait également intéressant d'étudier plus en détail l'évolution de la dynamique de l'eau et de la taille de réseaux pendant le séchage du gel. Cela pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de l'eau lié et libre dans le gel. Enfin, les mécanismes d'association entre les ions trivalent et le polyGalA sont encore mal compris. La relaxométrie nous a permis, dans le cadre de cette thèse, de mettre en évidence une sensibilité importante de la relaxation à la réticulation du  $Fe^{3+}$ . Ce phénomène pourrait probablement être exploré en combinant la relaxométrie avec des simulations de dynamique moléculaire afin de mieux comprendre les interactions en jeu. Nous espérons donc que ces travaux exerceront une influence sur l'utilisation de la relaxométrie au-delà de ses domaines de prédilections, car il s'agit indéniablement d'une méthode multidisciplinaire et puissante.



## **Bibliographies :**

- Abragam, A., 2007. The principles of nuclear magnetism, Reprinted. ed, The international series of monographs on physics. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Abrami, M., Chiarappa, G., Farra, R., Grassi, G., Marizza, P., Grassi, M., 2018. Use of low field NMR for the characterization of gels and biological tissues 13.
- Agulhon, P., Robitzer, M., Habas, J.-P., Quignard, F., 2014. Influence of both cation and alginate nature on the rheological behavior of transition metal alginate gels. *Carbohydr. Polym.* 112, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.097>
- Anémie [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/fr/health-topics/anaemia> (accessed 8.31.22).
- Anoardo, E., Galli, G., Ferrante, G., 2001. Fast-field-cycling NMR: Applications and instrumentation. *Appl. Magn. Reson.* 20, 365–404. <https://doi.org/10.1007/BF03162287>
- Assifaoui, A., Champion, D., Chiotelli, E., Verel, A., 2006. Characterization of water mobility in biscuit dough using a low-field  $^1\text{H}$  NMR technique. *Carbohydr. Polym.* 64, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.020>
- Assifaoui, A., Lerbret, A., Uyen, H.T.D., Neiers, F., Chambin, O., Loupiac, C., Cousin, F., 2015a. Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in the presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ): a process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit. *Soft Matter* 11, 551–560. <https://doi.org/10.1039/C4SM01839G>
- Assifaoui, A., Lerbret, A., Uyen, H.T.D., Neiers, F., Chambin, O., Loupiac, C., Cousin, F., 2015b. Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in the presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ): a process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit. *Soft Matter* 11, 551–560. <https://doi.org/10.1039/C4SM01839G>
- Atkins, P.W., De Paula, J., 2006. *Atkins' Physical chemistry*, 8th ed. ed. W.H. Freeman, New York.
- Ayant, Y., Belorizky, E., Aluzon, J., Gallice, J., 1975. Calcul des densités spectrales résultant d'un mouvement aléatoire de translation en relaxation par interaction dipolaire magnétique dans les liquides. *J. Phys.* 36, 991–1004. <https://doi.org/10.1051/jphys:019750036010099100>
- Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., 1985.  $^1\text{H}$  NMRD studies of solutions of paramagnetic metal ions in ethyleneglycol. *Inorganica Chim. Acta* 100, 173–181. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)88305-X](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)88305-X)
- Barbieri, R., Quaglia, M., Delfini, M., Brosio, E., 1998. Investigation of water dynamic behaviour in poly(HEMA) and poly(HEMA-co-DHPMA) hydrogels by proton  $T_2$  relaxation time and self-diffusion coefficient n.m.r. measurements. *Polymer* 39, 1059–1066. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00403-5)
- Barragán-Ibañez, G., Santoyo-Sánchez, A., Ramos-Peñafiel, C.O., 2016. Iron deficiency anaemia. *Rev. Médica Hosp. Gen. México* 79, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.06.008>
- Bellemjid, N., Assifaoui, A., Moussaif, A., El Abbadi, N., Mesfioui, A., Iddar, A., 2021. Silica-coated calcium pectinate formulations for controlling carbendazim release: water and soil release studies. *J. Environ. Sci. Health Part B* 56, 613–622. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1927603>
- Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., Xia, Z., 1993. Nuclear and electron relaxation of hexaquaairon(3+). *J. Phys. Chem.* 97, 1134–1137. <https://doi.org/10.1021/j100108a006>
- Bertini, I., Luchinat, C., Parigi, G., Ravera, E., 2017. *NMR of paramagnetic molecules: applications to metallobiomolecules and models*, Second edition. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Bloembergen, N., Morgan, L.O., 1961. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *J. Chem. Phys.* 34, 842–850. <https://doi.org/10.1063/1.1731684>

- Bloembergen, N., Purcell, E.M., Pound, R.V., 1948. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys. Rev.* 73, 679–712. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.73.679>
- Bodart, P.R., Rachocki, A., Tritt-Goc, J., Michalke, B., Schmitt-Kopplin, P., Karbowiak, T., Gougeon, R.D., 2019. Quantification of manganese ions in wine by NMR relaxometry. *Talanta* 120561. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120561>
- Borgia, G.C., Brown, R.J.S., Fantazzini, P., 2000. Uniform-Penalty Inversion of Multiexponential Decay Data. *J. Magn. Reson.* 147, 273–285. <https://doi.org/10.1006/jmre.2000.2197>
- Borgia, G.C., Brown, R.J.S., Fantazzini, P., 1998. Uniform-Penalty Inversion of Multiexponential Decay Data. *J. Magn. Reson.* 132, 65–77. <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1387>
- Borgia, G.C., Brown, R.J.S., Fantazzini, P., 1998. Examples of uniform-penalty inversion of multiexponential relaxation data. *Magn. Reson. Imaging* 16, 549–552. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(98\)00056-3](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(98)00056-3)
- Braccini, I., Pérez, S., 2001. Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup>-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules* 2, 1089–1096. <https://doi.org/10.1021/bm010008g>
- Brax, M., Buchmann, C., Schaumann, G.E., 2018. Effect of mucilage on water properties in the rhizosphere monitored by <sup>1</sup>H-NMR relaxometry. *Microporous Mesoporous Mater.* 269, 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.07.044>
- Brax, M., Köhne, M., Kroener, E., Schaumann, G.E., 2019. Potential of NMR relaxometry to unravel the properties of mucilage in several pore sizes. *Geoderma* 340, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.01.013>
- Brownstein, K.R., Tarr, C.E., 1979a. Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Phys. Rev. A* 19, 2446–2453. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.19.2446>
- Brownstein, K.R., Tarr, C.E., 1979b. Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Phys. Rev. A* 19, 2446–2453. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.19.2446>
- Bychuk, O.V., O'Shaughnessy, B., 1995. Anomalous Diffusion at Liquid Surfaces. *Phys. Rev. Lett.* 74, 1795–1798. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.74.1795>
- Bychuk, O.V., O'Shaughnessy, B., 1994. Anomalous surface diffusion: A numerical study. *J. Chem. Phys.* 101, 772–780. <https://doi.org/10.1063/1.468132>
- Cagle, F.W., Smith, G.F., 1947. 2,2'-Bipyridine Ferrous Complex Ion as Indicator in Determination of Iron. *Anal. Chem.* 19, 384–385. <https://doi.org/10.1021/ac60006a008>
- Calero, C., Martí, J., Guàrdia, E., 2015. <sup>1</sup>H Nuclear Spin Relaxation of Liquid Water from Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* 119, 1966–1973. <https://doi.org/10.1021/jp510013q>
- Carr, H.Y., Purcell, E.M., 1954. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.* 94, 630–638. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.94.630>
- Chen, X., Wang, Y., Wu, L., Zhang, W., Hu, Y., 2019. A new model in correlating and calculating the diffusion-coefficient of electrolyte aqueous solutions. *Fluid Phase Equilibria* 485, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2018.12.011>
- Chui, M.M., Phillips, R.J., McCarthy, M.J., 1995a. Measurement of the Porous Microstructure of Hydrogels by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Colloid Interface Sci.* 174, 336–344. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1399>
- Chui, M.M., Phillips, R.J., McCarthy, M.J., 1995b. Measurement of the Porous Microstructure of Hydrogels by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Colloid Interface Sci.* 174, 336–344. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1399>
- Cistola, D.P., Robinson, M.D., 2016. Compact NMR relaxometry of human blood and blood components. *TrAC Trends Anal. Chem.* 83, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.020>
- Cohen, M.H., Mendelson, K.S., 1982. Nuclear magnetic relaxation and the internal geometry of sedimentary rocks. *J. Appl. Phys.* 53, 1127–1135. <https://doi.org/10.1063/1.330526>

- Conte, P., 2019. Chapter 10 Environmental Applications of Fast Field-cycling NMR Relaxometry, in: Field-Cycling NMR Relaxometry: Instrumentation, Model Theories and Applications. The Royal Society of Chemistry, pp. 229–254. <https://doi.org/10.1039/9781788012966-00229>
- Damadian, R., 1971. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* 171, 1151–1153. <https://doi.org/10.1126/science.171.3976.1151>
- Devkota, R., Pilon, M., 2018. FRAP: A Powerful Method to Evaluate Membrane Fluidity in *Caenorhabditis elegans*. *Bio-Protoc.* 8, e2913. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2913>
- Dragan, E.S., Dinu, M.V., 2019. Polysaccharides constructed hydrogels as vehicles for proteins and peptides. A review. *Carbohydr. Polym.* 225, 115210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115210>
- Dubrovskii, S.A., Rakova, G.V., 1997. Elastic and Osmotic Behavior and Network Imperfections of Nonionic and Weakly Ionized Acrylamide-Based Hydrogels. *Macromolecules* 30, 7478–7486. <https://doi.org/10.1021/ma970788e>
- Ekebafé, L.O., Ogbeifun, D.E., Okieimen, F.E., 2011. *Polymer Applications in Agriculture* 23, 9.
- Ernst, R.R., Bodenhausen, G., Wokaun, A., 2004. Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions, Repr. ed, The international series of monographs on chemistry. Clarendon Pr, Oxford.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G., Nishinari, K., Funami, T., 2008. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydr. Polym.* 72, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.021>
- Flory Paul J., 1953. Principles of polymer chemistry / by Paul J. Flory,..., <>George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. Cornell University Press, Ithaca New York.
- Fortune, W.B., Mellon, M.G., 1938. Determination of Iron with o-Phenanthroline: A Spectrophotometric Study. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 10, 60–64. <https://doi.org/10.1021/ac50118a004>
- Franks, F. (Ed.), 1972. The Physics and Physical Chemistry of Water. Springer New York, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8334-5>
- Gallegos, D.P., Smith, D.M., Brinker, C.J., 1988. An NMR technique for the analysis of pore structure: Application to mesopores and micropores. *J. Colloid Interface Sci.* 124, 186–198. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(88\)90339-6](https://doi.org/10.1016/0021-9797(88)90339-6)
- Gardiner, D.J., Bowley, H.J. (Eds.), 1989. Practical Raman spectroscopy: with 11 tables. Springer, Berlin Heidelberg.
- Glaves, C.L., Frye, G.C., Smith, D.M., Brinker, C.J., Datye, A., Ricco, A.J., Martin, S.J., 1989. Pore structure characterization of porous films. *Langmuir* 5, 459–466. <https://doi.org/10.1021/la00086a030>
- Golsanami, N., Sun, J., Zhang, Z., 2016. A review on the applications of the nuclear magnetic resonance (NMR) technology for investigating fractures. *J. Appl. Geophys.* 133, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jappgeo.2016.07.026>
- Gomes, B.F., Burato, J.S. da S., Silva Lobo, C.M., Colnago, L.A., 2016. Use of the Relaxometry Technique for Quantification of Paramagnetic Ions in Aqueous Solutions and a Comparison with Other Analytical Methods. *Int. J. Anal. Chem.* 2016, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/8256437>
- Grant, G.T., Mon, E.R., Rees, S.D.A., 1973. BIOLOGICAL INTERACTIONS BETWEEN POLYSACCHARIDES AND DIVALENT CATIONS: THE EGG-BOX MODEL. *FEBS Lett.* 32, 195–198.
- Greenwood, N.N., Gibb, T.C., 1971. Mössbauer Spectroscopy. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5697-1>
- Gregorova, A., Saha, N., Kitano, T., Saha, P., 2015. Hydrothermal effect and mechanical stress properties of carboxymethylcellulose based hydrogel food packaging. *Carbohydr. Polym.* 117, 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.009>

- Grösch, L., Noack, F., 1976. NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solutions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* 453, 218–232. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(76\)90267-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(76)90267-1)
- Guilherme, M.R., Aouada, F.A., Fajardo, A.R., Martins, A.F., Paulino, A.T., Davi, M.F.T., Rubira, A.F., Muniz, E.C., 2015. Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. *Eur. Polym. J.* 72, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.017>
- Hadjiev, N.A., Amsden, B.G., 2015. An assessment of the ability of the obstruction-scaling model to estimate solute diffusion coefficients in hydrogels. *J. Controlled Release* 199, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.010>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Vibe Scheller, H., 2010. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiol.* 153, 384–395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Helm, L., Merbach, A.E., 1999. Water exchange on metal ions: experiments and simulations. *Coord. Chem. Rev.* 187, 151–181. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)90232-1](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)90232-1)
- Hills, B.P., Cano, C., Belton, P.S., 1991. Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems. *Macromolecules* 24, 2944–2950. <https://doi.org/10.1021/ma00010a047>
- Holz, M., Heil, S.R., Sacco, A., 2000. Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate  $^1\text{H}$  NMR PFG measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4740–4742. <https://doi.org/10.1039/b005319h>
- Huynh, T.D.U., 2016. Structuration de matrices à base de pectine : formulation, caractérisation, fonctionnalités et libération contrôlée lors de l'encapsulation.
- Huynh, U.T.D., Assifaoui, A., Chambin, O., 2017. Pellets based on polyuronates: Relationship between gelation and release properties. *J. Food Eng.* 199, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.004>
- Huynh, U.T.D., Chambin, O., du Poset, A.M., Assifaoui, A., 2018. Insights into gelation kinetics and gel front migration in cation-induced polysaccharide hydrogels by viscoelastic and turbidity measurements: Effect of the nature of divalent cations. *Carbohydr. Polym.* 190, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.046>
- Huynh, U.T.D., Lerbret, A., Neiers, F., Chambin, O., Assifaoui, A., 2016. Binding of Divalent Cations to Polygalacturonate: A Mechanism Driven by the Hydration Water. *J. Phys. Chem. B* 120, 1021–1032. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11010>
- Jaeger, F., Bowe, S., Van As, H., Schaumann, G.E., 2009. Evaluation of  $^1\text{H}$  NMR relaxometry for the assessment of pore-size distribution in soil samples. *Eur. J. Soil Sci.* 60, 1052–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2009.01192.x>
- Jamnongkan, T., Kaewpirom, S., 2010. Potassium Release Kinetics and Water Retention of Controlled-Release Fertilizers Based on Chitosan Hydrogels. *J. Polym. Environ.* 18, 413–421. <https://doi.org/10.1007/s10924-010-0228-6>
- Keeler, J.J., 2009. *Understanding NMR spectroscopy*, Reprinted Febr. 2009. ed. Wiley, Chichester Weinheim.
- Kimmich, R., 1997. *NMR Tomography, Diffusometry, Relaxometry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60582-6>
- Kimmich, R., Weber, H.W., 1993. NMR relaxation and the orientational structure factor. *Phys. Rev. B* 47, 11788–11794. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.47.11788>
- Klein, M., Poverenov, E., 2020. Natural biopolymer - based hydrogels for use in food and agriculture. *J. Sci. Food Agric.* 100, 2337–2347. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10274>

- Koenig, S.H., Baglin, C., Brown, R.D., Fred Brewer, C., 1984. Magnetic field dependence of solvent proton relaxation induced by Gd<sup>3+</sup> and Mn<sup>2+</sup> complexes. *Magn. Reson. Med.* 1, 496–501. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910010408>
- Koenig, S.H., Brown, R.D., 1984. Relaxation of solvent protons by paramagnetic ions and its dependence on magnetic field and chemical environment: implications for NMR imaging. *Magn. Reson. Med.* 1, 478–495. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910010407>
- Kopeček, J., 2009. HYDROGELS FROM SOFT CONTACT LENSES AND IMPLANTS TO SELF-ASSEMBLED NANOMATERIALS. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 47, 5929–5946. <https://doi.org/10.1002/pola.23607>
- Kowalewski, J., Egorov, A., Kruk, D., Laaksonen, A., Nikkhou Aski, S., Parigi, G., Westlund, P.-O., 2008. Extensive NMRD studies of Ni(II) salt solutions in water and water–glycerol mixtures. *J. Magn. Reson.* 195, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2008.08.011>
- Kowalewski, J., Mäler, L., 2018. Nuclear spin relaxation in liquids: theory, experiments, and applications, Second edition. ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York.
- Krause, W. (Ed.), 2002. Contrast agents. 1: Magnetic resonance imaging / vol. ed.: Werner Krause, Topics in current chemistry. Springer, Berlin Heidelberg.
- Kropman, M.F., Bakker, H.J., 2001. Dynamics of Water Molecules in Aqueous Solvation Shells. *Science* 291, 2118–2120. <https://doi.org/10.1126/science.1058190>
- Kruk, D., 2016. Understanding spin dynamics. Pan Stanford Publishing, Singapore.
- Kruk, D., 2015. Understanding Spin Dynamics, 0 ed. Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/b19179>
- Kruk, D., 2007. Theory of evolution and relaxation of multi-spin systems: application to nuclear magnetic resonance and electron spin resonance. arima publ, Bury St Edmunds.
- Kruk, D., Florek – Wojciechowska, M., Masiewicz, E., Oztop, M., Ploch-Jankowska, A., Duda, P., Wilczynski, S., 2021a. Water mobility in cheese by means of Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. *J. Food Eng.* 298, 110483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110483>
- Kruk, D., Florek-Wojciechowska, M., Oztop, M., Ilhan, E., Wiczorek, Z., 2021b. Water dynamics in eggs by means of Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. *J. Magn. Reson.* 327, 106976. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2021.106976>
- Larentzos, J.P., Criscenti, L.J., 2008. A Molecular Dynamics Study of Alkaline Earth Metal–Chloride Complexation in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* 112, 14243–14250. <https://doi.org/10.1021/jp802771w>
- Lee, K.Y., Mooney, D.J., 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 37, 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Lee, P.A., Citrin, P.H., Eisenberger, P., Kincaid, B.M., 1981. Extended x-ray absorption fine structure—its strengths and limitations as a structural tool. *Rev. Mod. Phys.* 53, 769–806. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.53.769>
- Lerbret, A., Lelong, G., Mason, P.E., Saboungi, M.-L., Brady, J.W., 2011. Water Confined in Cylindrical Pores: A Molecular Dynamics Study. *Food Biophys.* 6, 233–240. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9191-y>
- Li, J., Mooney, D.J., 2016. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat. Rev. Mater.* 1, 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- Lin, C.-C., Metters, A.T., 2006. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1379–1408. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>

- Liu, X.D., Bao, D.C., Xue, W.M., Xiong, Y., Yu, W.T., Yu, X.J., Ma, X.J., Yuan, Q., 2003. Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. *J. Appl. Polym. Sci.* 87, 848–852. <https://doi.org/10.1002/app.11537>
- Lopez-Sanchez, P., Martinez-Sanz, M., Bonilla, M.R., Wang, D., Gilbert, E.P., Stokes, Jason.R., Gidley, Michael.J., 2017. Cellulose-pectin composite hydrogels: Intermolecular interactions and material properties depend on order of assembly. *Carbohydr. Polym.* 162, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.049>
- Lopez-Sanchez, P., Schuster, E., Wang, D., Gidley, M.J., Strom, A., 2015. Diffusion of macromolecules in self-assembled cellulose/hemicellulose hydrogels. *Soft Matter* 11, 4002–4010. <https://doi.org/10.1039/C5SM00103J>
- Lorén, N., Hagman, J., Jonasson, J.K., Deschout, H., Bernin, D., Cella-Zanacchi, F., Diaspro, A., McNally, J.G., Ameloot, M., Smisdom, N., Nydén, M., Hermansson, A.-M., Rudemo, M., Braeckmans, K., 2015. Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: putting theory into practice. *Q. Rev. Biophys.* 48, 323–387. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000013>
- Lyu, C., Ning, Z., Wang, Q., Chen, M., 2018. Application of NMR  $T_2$  to Pore Size Distribution and Movable Fluid Distribution in Tight Sandstones. *Energy Fuels* 32, 1395–1405. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b03431>
- Maire du Poset, A., 2018. Hydrogels de polygalacturonate réticulés par les ions  $Fe^{2+}$  : impact du mode d'association local sur les mécanismes de gélification, contrôle de la structure multi-échelle et des propriétés mécaniques.
- Maire du Poset, A., Lerbret, A., Boué, F., Zitolo, A., Assifaoui, A., Cousin, F., 2019. Tuning the Structure of Galacturonate Hydrogels: External Gelation by Ca, Zn, or Fe Cationic Cross-Linkers. *Biomacromolecules* 20, 2864–2872. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00726>
- Maire du Poset, A., Lerbret, A., Zitolo, A., Cousin, F., Assifaoui, A., 2018. Design of polygalacturonate hydrogels using iron(II) as cross-linkers: A promising route to protect bioavailable iron against oxidation. *Carbohydr. Polym.* 188, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.007>
- Maire du Poset, A., Zitolo, A., Cousin, F., Assifaoui, A., Lerbret, A., 2020a. Evidence for an egg-box-like structure in iron(ii)–polygalacturonate hydrogels: a combined EXAFS and molecular dynamics simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 2963–2977. <https://doi.org/10.1039/C6CP06015C>
- Maire du Poset, A., Zitolo, A., Cousin, F., Assifaoui, A., Lerbret, A., 2020b. Evidence for an egg-box-like structure in iron(II)–polygalacturonate hydrogels: a combined EXAFS and molecular dynamics simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 2963–2977. <https://doi.org/10.1039/C9CP04065J>
- Martínez, M.V., Rivarola, C.R., Miras, M.C., Barbero, C.A., 2017. A colorimetric iron sensor based on the partition of phenanthroline complexes into polymeric hydrogels. Combinatorial synthesis and high throughput screening of the hydrogel matrix. *Sens. Actuators B Chem.* 241, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.013>
- Meiboom, S., Gill, D., 1958. Modified Spin - Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.* 29, 688–691. <https://doi.org/10.1063/1.1716296>
- Menakbi, C., Quignard, F., Mineva, T., 2016. Complexation of Trivalent Metal Cations to Mannuronate Type Alginate Models from a Density Functional Study. *J. Phys. Chem. B* 120, 3615–3623. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00472>
- Mills, R., 1973. Self-diffusion in normal and heavy water in the range 1-45.deg. *J. Phys. Chem.* 77, 685–688. <https://doi.org/10.1021/j100624a025>
- Mishra, R.K., Majeed, A.B.A., Banthia, A.K., 2011. Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *Int. J. Plast. Technol.* 15, 82–95. <https://doi.org/10.1007/s12588-011-9016-y>

- Mitreiter, I., Oswald, S.E., Stallmach, F., 2010. Investigation of Iron(III)-Release in the Pore Water of Natural Sands by NMR Relaxometry 6.
- Morris, E.R., Rees, D.A., Thom, D., Boyd, J., 1978. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydr. Res.* 66, 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83247-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83247-4)
- Ohls, K., Bogdain, B., 2016. History of inductively coupled plasma atomic emission spectral analysis: from the beginning up to its coupling with mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 31, 22–31. <https://doi.org/10.1039/C5JA90043C>
- Parodi, F., 1989. Physics and Chemistry of Microwave Processing, in: *Comprehensive Polymer Science and Supplements*. Elsevier, pp. 669–728. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096701-1.00258-5>
- Parvathy, P.C., Jyothi, Alummoottil.N., 2014. Rheological and thermal properties of saponified cassava starch- *g* -poly(acrylamide) superabsorbent polymers varying in grafting parameters and absorbency. *J. Appl. Polym. Sci.* 131, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.40368>
- Peng, J.W., Wagner, G., 1994. [20] Investigation of protein motions via relaxation measurements, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 563–596. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)39022-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)39022-3)
- Pocan, P., Knapkiewicz, M., Rachocki, A., Oztop, M.H., 2021. Detection of Authenticity and Quality of the Turkish Delights (Lokum) by Means of Conventional and Fast Field Cycling Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry. *J. Agric. Food Chem.* [acs.jafc.1c00943](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00943). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00943>
- Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V., 1946. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.* 69, 37–38. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.69.37>
- Qi, X., Wei, W., Su, T., Zhang, J., Dong, W., 2018. Fabrication of a new polysaccharide-based adsorbent for water purification. *Carbohydr. Polym.* 195, 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.112>
- Rabi, I.I., Zacharias, J.R., Millman, S., Kusch, P., 1938. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Phys. Rev.* 53, 318–318. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.53.318>
- Reed, T.B., 1961. Induction - Coupled Plasma Torch. *J. Appl. Phys.* 32, 821–824. <https://doi.org/10.1063/1.1736112>
- Rees, D.A., 1969. Structure, Conformation, and Mechanism in the Formation of Polysaccharide Gels and Networks, in: *Wolfrom, M.L., Tipson, R.S., Horton, D. (Eds.), Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, pp. 267–332. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60352-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60352-2)
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Vilela, S., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J. Microencapsul.* 23, 245–257. <https://doi.org/10.1080/02652040500286086>
- Robinson, J.W., 1960. Atomic Absorption Spectroscopy 11.
- Rogosnitzky, M., Branch, S., 2016. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals* 29, 365–376. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9931-7>
- Roudaut, G., Farhat, I., Poirier-Brulez, F., Champion, D., 2009. Influence of water, temperature and sucrose on dynamics in glassy starch-based products studied by low field 1H NMR. *Carbohydr. Polym.* 77, 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.029>
- Roy, N., Saha, N., Kitano, T., Saha, P., 2012. Biodegradation of PVP–CMC hydrogel film: A useful food packaging material. *Carbohydr. Polym.* 89, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.008>

- Sakai, T., Matsunaga, T., Yamamoto, Y., Ito, C., Yoshida, R., Suzuki, S., Sasaki, N., Shibayama, M., Chung, U., 2008. Design and Fabrication of a High-Strength Hydrogel with Ideally Homogeneous Network Structure from Tetrahedron-like Macromonomers 41, 6.
- Sandrin, D., Wagner, D., Sitta, C.E., Thoma, R., Felekyan, S., Hermes, H.E., Janiak, C., de Sousa Amadeu, N., Kühnemuth, R., Löwen, H., Egelhaaf, S.U., Seidel, C.A.M., 2016. Diffusion of macromolecules in a polymer hydrogel: from microscopic to macroscopic scales. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 12860–12876. <https://doi.org/10.1039/C5CP07781H>
- Schefer, L., Bulant, A., Zeder, C., Saha, A., Mezzenga, R., 2015. Magnetic Control of Macromolecular Conformations in Supramolecular Anionic Polysaccharide–Iron Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 13289–13292. <https://doi.org/10.1002/anie.201506898>
- Scherer, G.W., 1994. Hydraulic radius and mesh size of gels. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 1, 285–291. <https://doi.org/10.1007/BF00486171>
- Schwiderke, E.E., di Sarli, A.R., 1986. A mathematical basis for calculating the water permeability of organic films supported by metal substrates. *Prog. Org. Coat.* 14, 297–308. [https://doi.org/10.1016/0033-0655\(86\)80004-8](https://doi.org/10.1016/0033-0655(86)80004-8)
- Shamshir, A., Sparrman, T., Westlund, P.-O., 2020. Analysis of the behaviour of confined molecules using  $^2H$  T<sub>1</sub> nuclear magnetic relaxation dispersion. *Mol. Phys.* 118, e1645367. <https://doi.org/10.1080/00268976.2019.1645367>
- Sharma, S., Tiwari, S., 2020. A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 162, 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.110>
- Skjllk-Brek, G., Grasdalen, H., Smidsrod, O., 1989. Inhomogeneous Polysaccharide Ionic Gels. *Carbohydrate polymers* 10., 31–54.
- Solomon, I., 1955. Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys. Rev.* 99, 559–565. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.99.559>
- Stapf, S., Kimmich, R., Seitter, R.-O., 1996. Field-cycling NMR relaxometry of liquids confined in porous glass: Evidence for levy-walks. *Magn. Reson. Imaging* 14, 841–846. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(96\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(96)00213-5)
- Stapf, S., Kimmich, R., Seitter, R.-O., 1995. Proton and Deuteron Field-Cycling NMR Relaxometry of Liquids in Porous Glasses: Evidence for Lévy-Walk Statistics. *Phys. Rev. Lett.* 75, 2855–2858. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.2855>
- Steele, R.M., Korb, J.-P., Ferrante, G., Bubici, S., 2016. New applications and perspectives of fast field cycling NMR relaxometry: New trends in FFC NMR relaxometry. *Magn. Reson. Chem.* 54, 502–509. <https://doi.org/10.1002/mrc.4220>
- Steiner, E., 2011. Relaxométrie du proton pour l'étude de fluides à l'intérieur de milieux poreux.
- Stelar, n.d. Introduction to Fast Field Cycling (FFC) relaxometry [WWW Document]. URL <https://www.stelar.it/ffc-technique> (accessed 9.7.22).
- Stookey, L.L., 1970. Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42, 779–781. <https://doi.org/10.1021/ac60289a016>
- Tian, Y., Du, E., Abdelmola, F., Qiang, Y., Carlsson, L.A., 2020. Rapid Characterization of Water Diffusion in Polymer Specimens Using a Droplet-Based Method. *Langmuir* 36, 7309–7314. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00727>
- Tokuyama, H., Nakahata, Y., Ban, T., 2020. Diffusion coefficient of solute in heterogeneous and macroporous hydrogels and its correlation with the effective crosslinking density. *J. Membr. Sci.* 595, 117533. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117533>
- van den Enden, J.C., Rossell, J.B., Vermaas, L.F., Waddington, D., 1982. Determination of the solid fat content of hard confectionery butters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59, 433–439. <https://doi.org/10.1007/BF02634428>

- van der Spoel, D., van Maaren, P.J., Berendsen, H.J.C., 1998a. A systematic study of water models for molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field. *J. Chem. Phys.* 108, 10220–10230. <https://doi.org/10.1063/1.476482>
- van der Spoel, D., van Maaren, P.J., Berendsen, H.J.C., 1998b. A systematic study of water models for molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field. *J. Chem. Phys.* 108, 10220–10230. <https://doi.org/10.1063/1.476482>
- van Duynhoven, J., Voda, A., Witek, M., Van As, H., 2010. Time-Domain NMR Applied to Food Products, in: *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. Elsevier, pp. 145–197. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(10\)69003-5](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(10)69003-5)
- Ventura, I., Jammal, J., Bianco-Peled, H., 2013. Insights into the nanostructure of low-methoxyl pectin-calcium gels. *Carbohydr. Polym.* 97, 650–658. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.055>
- Wende, F.J., Xue, Y., Nestor, G., Öhrlund, Å., Sandström, C., 2020. Relaxation and diffusion of water protons in BDDE cross-linked hyaluronic acid hydrogels investigated by NMR spectroscopy—Comparison with physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* 248, 116768. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116768>
- Wichterle, O., Lim, D., 1960. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 185, 117–118. <https://doi.org/10.1038/185117a0>
- Williams, F., 2009. *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications, Second Edition* (John A. Weil and James R. Bolton). *J. Chem. Educ.* 86, 33. <https://doi.org/10.1021/ed086p33>
- Woessner, D.E., 1962. Nuclear Spin Relaxation in Ellipsoids Undergoing Rotational Brownian Motion. *J. Chem. Phys.* 37, 647–654. <https://doi.org/10.1063/1.1701390>
- Woods, J., Mellon, M., 1941. Thiocyanate Method for Iron: A Spectrophotometric Study. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 13, 551–554. <https://doi.org/10.1021/i560096a013>
- Yang, C., Xing, X., Li, Z., Zhang, S., 2020. A Comprehensive Review on Water Diffusion in Polymers Focusing on the Polymer–Metal Interface Combination. *Polymers* 12, 138. <https://doi.org/10.3390/polym12010138>
- Zeng, Y., Jia, Y., Yan, T., Zhuang, W., 2021. Binary structure and dynamics of the hydrogen bonds in the hydration shells of ions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23, 11400–11410. <https://doi.org/10.1039/D0CP06397E>
- Zhang, Z., Decker, E.A., McClements, D.J., 2014. Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. *Food Res. Int.* 64, 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.020>

## Annexe A Impacte de la variation des différents paramètres sur la taille de réseaux par RMN

### Simulation des changements de taille de fibre :

Dans cette thèse, nous avons choisi une taille de rayon hydraulique de 24nm (ou 12nm suivant la formule utilisé). C'est une valeur choisie en se basant sur les simulations de dynamique moléculaire. Cette valeur est essentielle pour le calcul de la distribution des tailles de réseau. Il faut donc s'assurer que cette valeur est proche de la réalité mais aussi que la variation impliquée par un changement dans cette valeur soit minimale.

Pour estimer la variation, nous avons fait varier la taille de réseau que nous avons ensuite introduit dans l'équation 4.8. La valeur de base étant de 24 nm nous avons testé une gamme de valeurs allant de 12 nm à 30 nm puis nous étudions la variation.

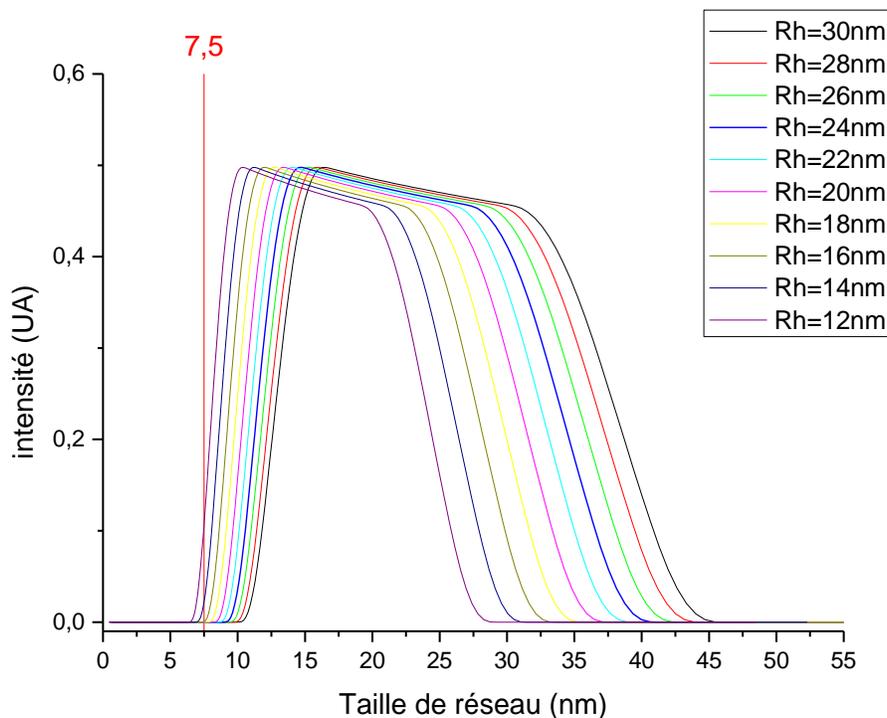


Figure A.1 distribution de la taille du réseau dans un gel calcium suivant la taille de rayon hydraulique (Rh) choisie.

Dans cette figure, nous remarquons un certain impact dû au changement de la taille du rayon hydraulique. En effet, avec la valeur de base on obtient une distribution comprise entre 9,04 et 40,62nm ce qui représente un écart de 31,58 nm. Si on réduit la taille du Rh de 2nm, on observe un effet double, la taille de réseaux minimum et maximum sont plus petite (8,65 contre 9,04 et 38,89 contre 40,62) de plus l'écart diminue aussi (30,24 nm). Finalement un changement de rayon hydraulique de 2 nm qui représente un changement de taille de 8,33% représente un changement de distribution de 4,25% sur

l'écart de taille de réseau. L'effet est donc bien réel et il faut donc bien choisir la valeur utilisée pour les calculs.

Tableau A.1 : impact du changement du rayon hydraulique de la fibre sur les valeurs minimales de taille de réseau et les valeurs max ainsi que l'écart crée.

nm	min	delta(min)	max	delta(max)	écart
12	6,39		28,72		22,33
14	6,90	0,51	31,02	2,30	24,12
16	7,38	0,48	33,16	2,14	25,78
18	7,82	0,44	35,17	2,01	27,34
20	8,25	0,42	37,08	1,91	28,83
22	8,65	0,40	38,89	1,81	30,24
24	9,04	0,39	40,62	1,73	31,58
26	9,40	0,36	42,28	1,65	32,88
28	9,76	0,36	43,87	1,59	34,11
30	10,1	0,34	45,41	1,54	35,31

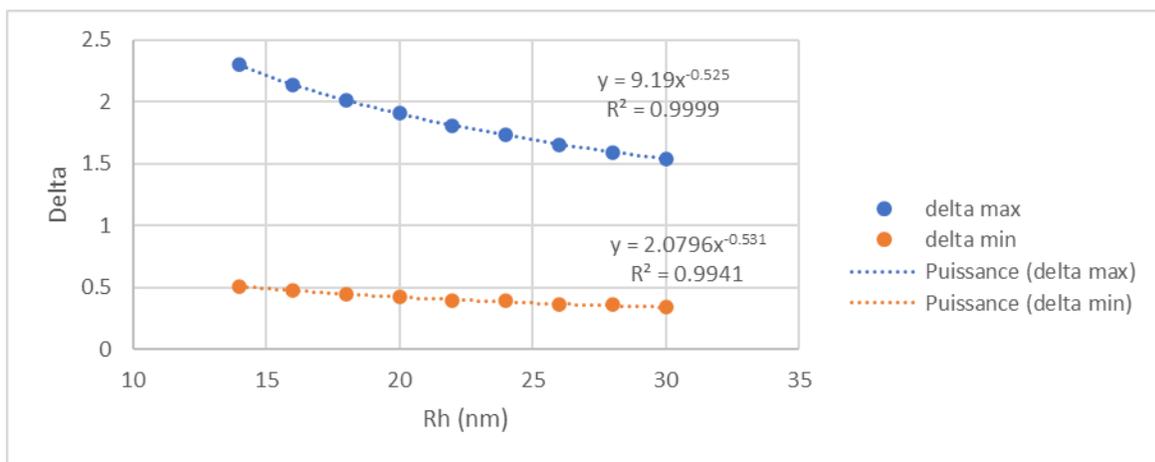


Figure A.2 : évolution de l'écart entre deux tailles de réseaux (delta min et delta max) à différents rayons hydrauliques (Rh).

*Simulations des changements de la relaxivité de la fibre (M et P( $\Omega$ )) :*

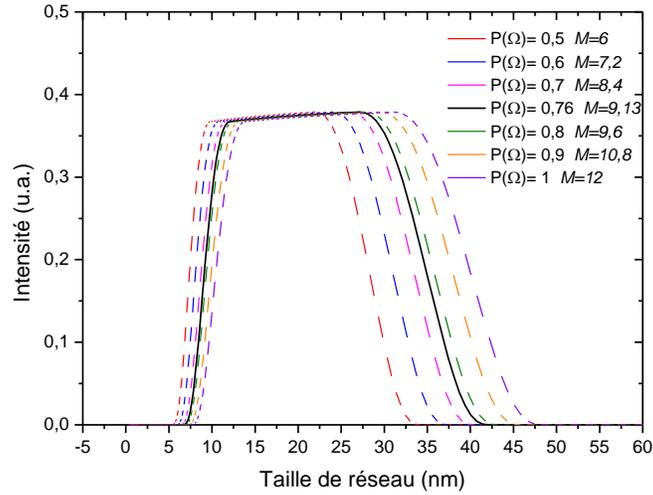


Figure A.3 : impact de la variation du potentiel de relaxation de la fibre sur une distribution de taille de réseau d'un gel Ca-polyGalA (noir).

La variation de  $P(\Omega)$  et de M semble impacter particulièrement les hautes tailles de réseau que les petites tailles de réseaux.

*Simulation des changements de la relaxation de l'eau libre :*

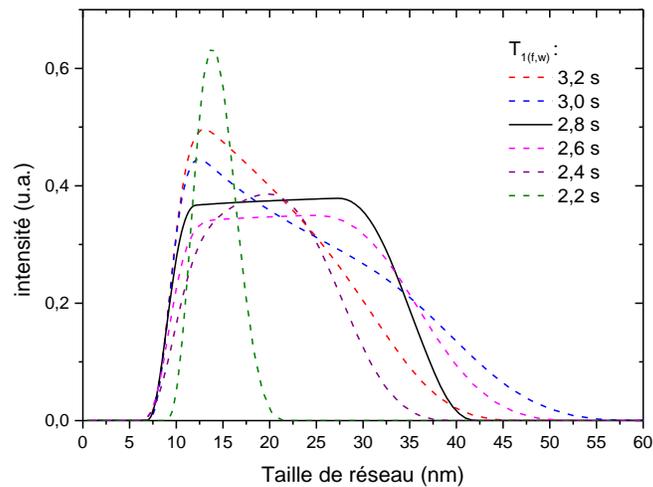


Figure A.4 : impact de la variation du temps de relaxation de l'eau libre sur une distribution de taille de réseau d'un gel Ca-polyGalA (noir).

La variation de la relaxation de l'eau libre impacte fortement la forme du profil. Il est donc nécessaire de la caractériser correctement. Il est aussi important de noter que la méthode ne marche plus en dessous de 2,2 s et nécessite des ajustements de paramètre UPEN (tau max) qui doit être en dessous de

2,8 s, paramètre improbable et qui devrait donc donner à l'utilisateur une indication concernant sont mauvais choix de  $T_{1(fw)}$ .

## Annexe B Gels supplémentaires pour la mesure de la taille de réseau

Trois gels différents sont analysés pour chaque type de Gel (Ca-polyGalA et Zn-polyGalA). Dans le manuscrit, nous avons présenté qu'un seul un gel de chaque. Cette annexe regroupe les résultats obtenus pour les autres gels et permet de montrer que les variations entre gels sont minimales.

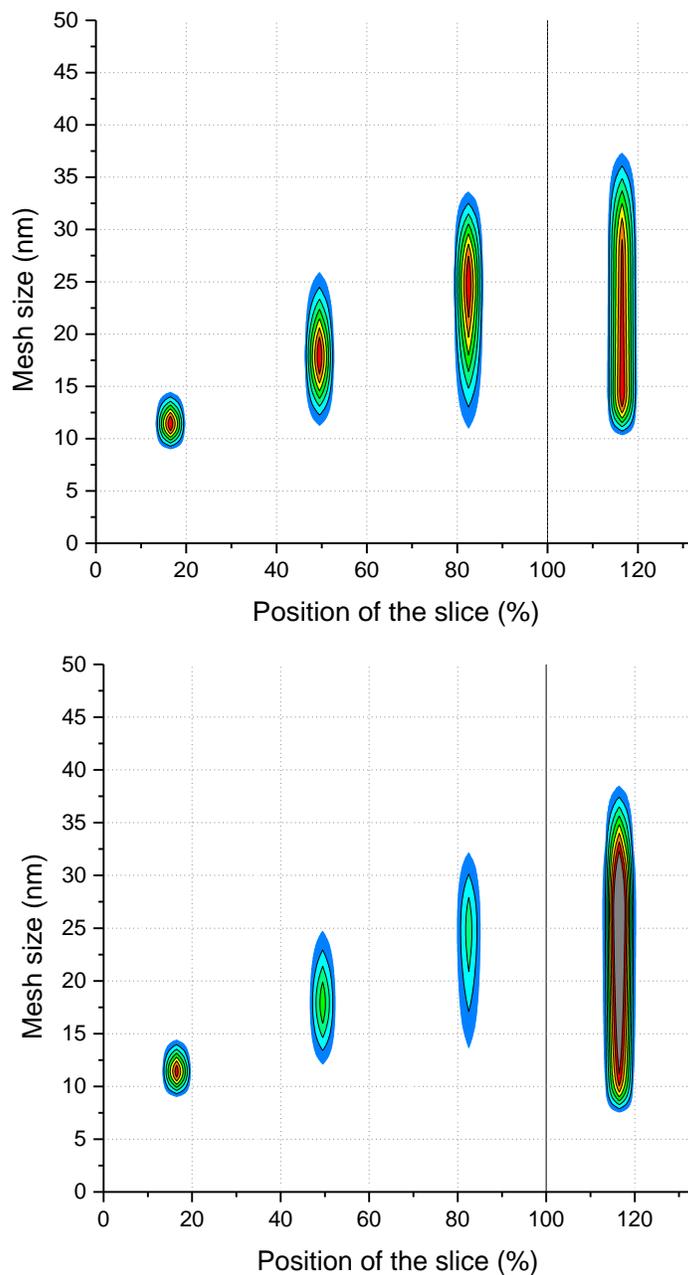


Figure A.5 : Distribution des tailles de réseau en fonction de la position de la tranche du gel pour un gel Ca-polyGalA (numéro 2 & 3)

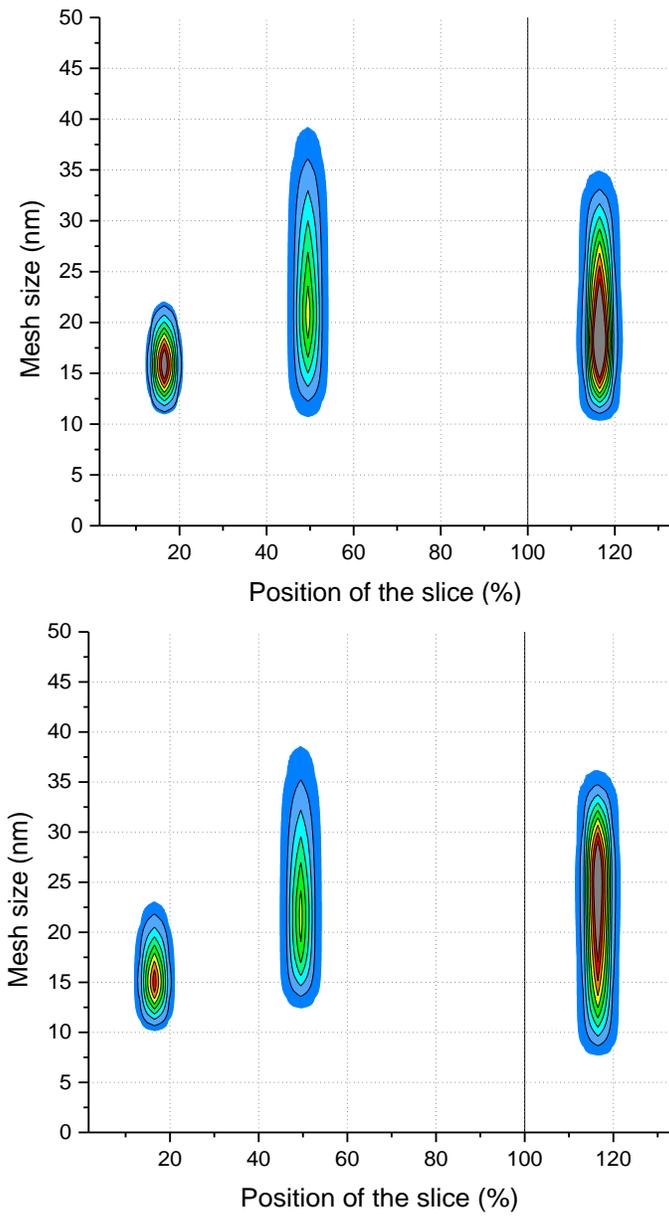


Figure A.6 Distribution des tailles de réseau en fonction de la position de la tranche du gel pour un gel Zn-polyGalA (numéro 2)

## Annexe C Mesure du module de Young et de la taille de réseaux

Afin de mesurer la taille de réseau dans différents gel : Ca-polyGalA, Zn-polyGalA et CaCO<sub>3</sub>-polyGalA, les gels ont été découpés en 4 tranches. L'épaisseur de chacune des tranches a été mesuré et le module de Young enregistré (résultant en un nuage de point). Pour chaque condition, nous avons réalisé quatre répétitions (Figure A.5). Ensuite le module de Young est transformé en taille de réseau en utilisant l'équation 1.2 et la taille de réseau est représenté en fonction de la position de la tranche.

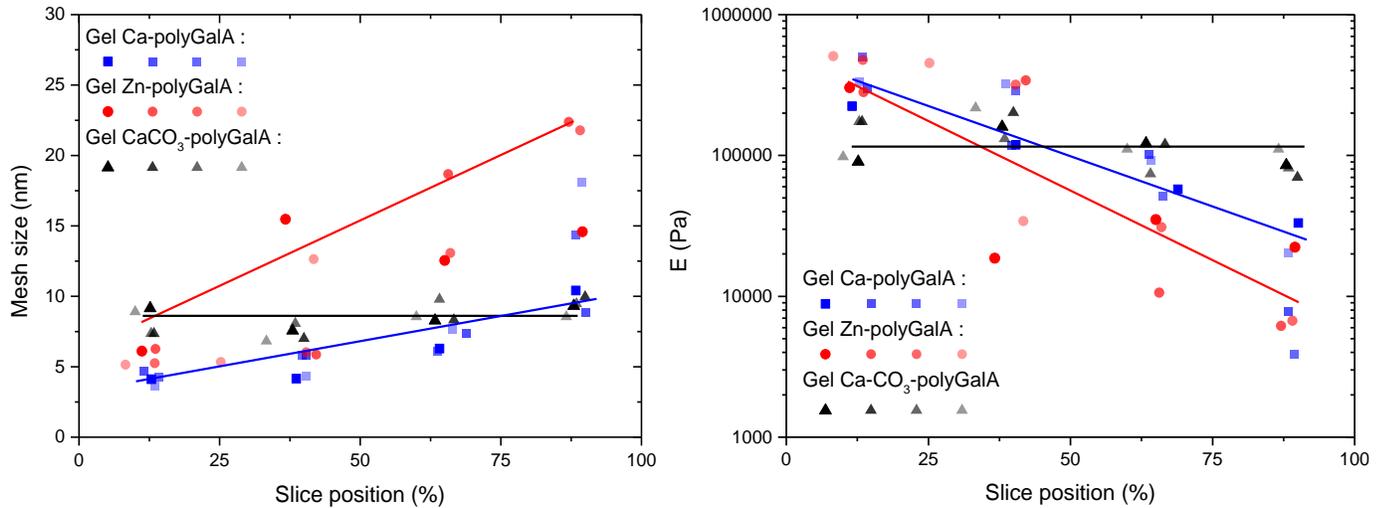


Figure A.7 Evolution du module de Young et de la taille de réseau à travers un gel Ca-polyGalA (bleu), un gel Zn-polyGalA (rouge) et CaCO<sub>3</sub>-polyGalA (noir). Les lignes de couleurs sont des supports visuels pour aider le lecteur.

La Figure A.7 met en évidence une différence de résistance entre les deux gels externes (Ca-polyGalA et Zn-polyGalA). Le gel à base de zinc est donc plus faible que le gel calcium. Par ailleurs, il met aussi en évidence que le gel interne est homogène quel que soit la tranche sondée. Ces observations sont transférables aux tailles de réseau ou les tailles sont plus hautes pour Zn-polyGalA que pour Ca-polyGalA et son uniforme pour CaCO<sub>3</sub>-polyGalA. Il est important de rappeler que pour les gels externes l'équation 1.2 ne s'applique vraiment que pour la partie Near (0-25%).

## Annexe D Autres gels Fe(III) et Fe(II)-polyGalA

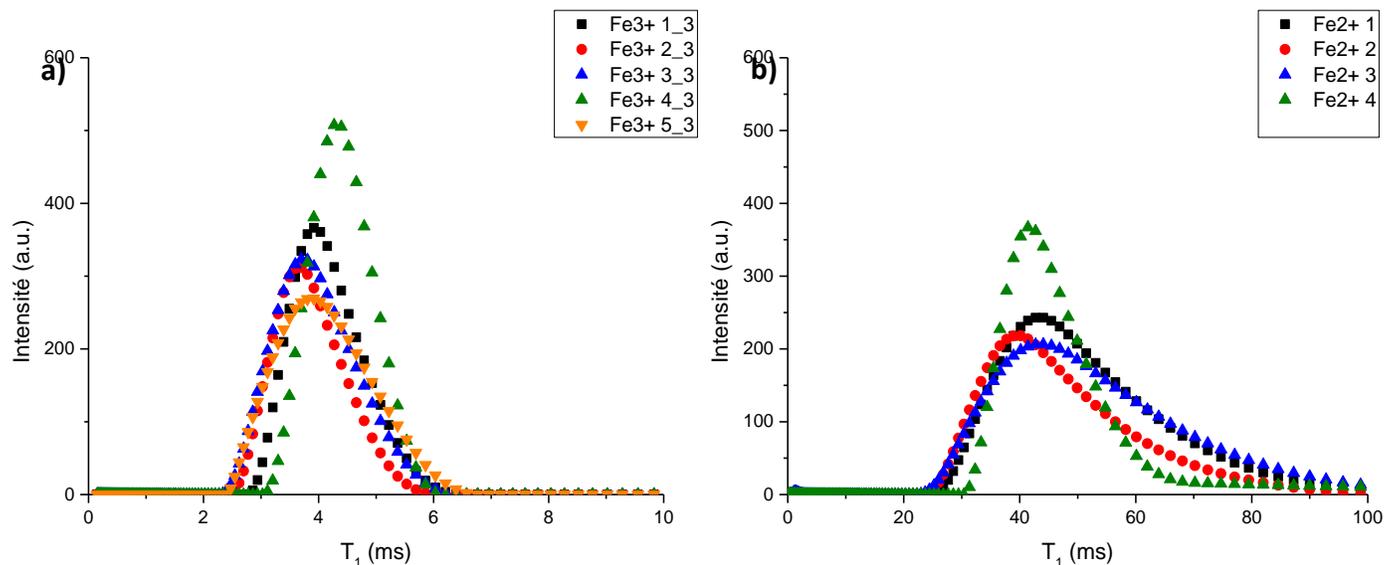


Figure A.8 distribution des  $T_1$  dans des gels Fe(III)-polyGalA (a) et Fe(II)-polyGalA (b)

La Figure A.8 montre plusieurs gels Fe(III) et leur distributions de temps de relaxation longitudinaux ( $T_1$ ). Que ce soit pour Fe(II)-polyGalA ou Fe(III)-polyGalA, les distributions ne montrent que très peu de variations dans leur propre famille. Dans le reste des manipulations, seul un de ces gels est présenté mais les manipulations ont été effectuées en duplicatas ou triplicatas.

## Annexe E Diffusion de $\text{Fe}^{2+}$ dans un gel $\text{Fe}^{3+}$

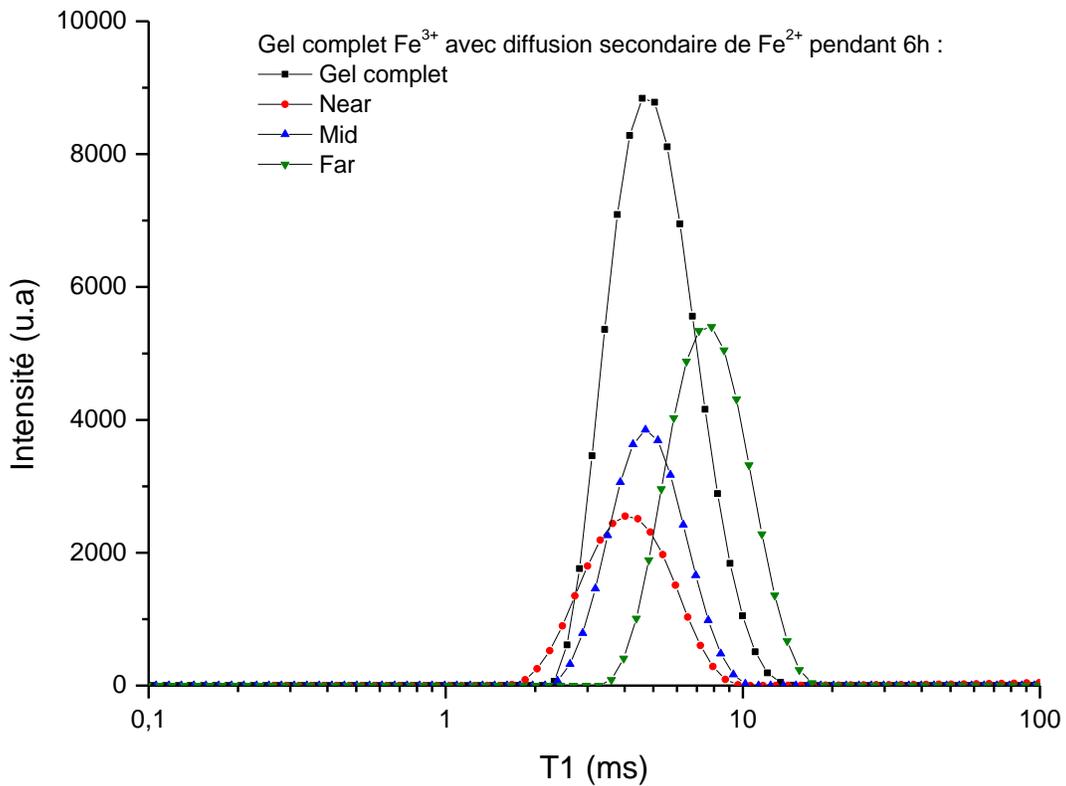


Figure A.9 : Distribution des temps de relaxation longitudinaux ( $T_1$ ) dans un gel externe  $\text{Fe}^{3+}$  gélifié 24h dans lequel on a laissé diffuser 12h une solution de  $\text{Fe}^{2+}$ .

Un gel est formulé à partir de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ) suivi d'une diffusion d'une solution de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeCl}_2$ ) pendant 6h. Les distributions de  $T_1$  obtenues sur le gel montrent des dispersions entre 2 et 11 ms des temps typiquement observés pour des gels  $\text{Fe}^{3+}$ . Aucun temps de relaxation correspondant au  $\text{Fe}^{2+}$  (100 ms et plus) n'est observé sur les distributions. Cela indique que le  $\text{Fe}^{2+}$  n'a pas pu pénétrer de manière significative dans le gel et que la relaxation est dominée par la relaxation paramagnétique de  $\text{Fe}^{3+}$ . En d'autres mots, le  $\text{Fe}(\text{II})$  a une affinité moins importante pour le polyGalA et n'arrive pas à chasser le  $\text{Fe}(\text{III})$  du gel et des réticulations conduisant ainsi à un signal complètement dû au  $\text{Fe}^{3+}$ .

**Annexe F** Comparaison des valeurs de concentration de fer obtenue par SAA et par relaxométrie (0).

Tableau A.2 : Valeurs clés obtenues par les distributions des temps de relaxations par les analyses élémentaires par SAA

		NMR (valeurs de piques)			AAS			
		T <sub>1</sub>	Eq [Fe]	corrige [Fe]	[Fe]	eq T1	diff	increase
		(ms)	(mM)	(mM)	(mM)	(ms)		
Fe(II)- polvGalA	Complect	42,72	58	-	-	-	-	-
	Near	35,47	70	-	79	31,28	0,88	0,12
	Mid	42,73	58	-	53	46,79	1,10	-0,10
	Far	54,76	45	-	39	63,38	1,16	-0,16
Fe(II)- polvGalA	Complect	44,07	56	-	-	-	-	-
	Near	33,33	74	-	80	31,05	0,93	0,07
	Mid	42,73	58	-	51	48,52	1,14	-0,14
	Far	54,77	45	-	35	70,97	1,30	-0,30
Fe(II) sol diffusion	Initiale	47,50	51,91	-	50	49,36	1,04	-0,04
	1	53,20	46,27	-	45,99	53,52	1,01	-0,01
	2	55,80	44,08	-	45,63	53,93	0,97	0,03
	3	51,50	47,82	-	47,57	51,76	1,01	-0,01
	4	53,70	45,83	-	44,42	55,38	1,03	-0,03
	5	52,30	47,08	-	46,12	53,37	1,02	-0,02
Fe(III)- polvGalA	Complect	3,69	31,69	40,25	-	-	-	-
	Near	3,59	32,58	41,37	47,22	2,48	0,88	0,12
	Mid	3,80	30,77	39,08	41,20	2,84	0,95	0,05
	Far	4,27	27,38	34,78	36,30	3,22	0,96	0,04
Fe(III)- polvGalA	Complect	3,91	29,91	37,98	-	-	-	-
	Near	3,69	31,69	40,25	53,40	2,19	0,75	0,25
	Mid	3,91	29,91	37,98	40,00	2,92	0,95	0,05
	Far	4,52	25,87	32,85	30,40	3,85	1,08	-0,08
Fe(III) sol diffusion	Initiale	2,58	45,35	-	46,25	2,53	0,98	0,02
	1	2,71	43,18	-	61,36	1,91	0,70	0,30
	2	2,76	42,39	-	48,49	2,41	0,87	0,13
	3	2,69	43,52	-	43,78	2,67	0,99	0,01
	4	2,74	42,74	-	44,10	2,65	0,97	0,03
	5	2,77	42,23	-	46,62	2,51	0,91	0,09

Ce tableau décrit les valeurs clés obtenues par la méthode de relaxométrie et les valeurs obtenues par AAS. Les résultats pour Fe(III) dans un gel sont aussi comparés en utilisant un facteur de correction.



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol)



## Slow water dynamics in polygalacturonate hydrogels revealed by NMR relaxometry and molecular dynamics simulation

Philippe R. Bodart<sup>a,\*</sup>, Pierre Fouilloux<sup>a</sup>, Adam Rachocki<sup>b</sup>, Adrien Lerbret<sup>a</sup>, Thomas Karbowiak<sup>a</sup>, Ali Assifaoui<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ. Bourgogne Franche-Comté, Institut Agro, UMR PAM A02.102, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

<sup>b</sup> Institute of Molecular Physics, Polish Academy of Sciences, M. Smoluchowskiego 17, 60-179 Poznan, Poland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

FFC NMR relaxometry  
Polygalacturonate hydrogels  
Diffusion  
Water dynamics  
Levy-walk

### ABSTRACT

Diffusions in gels are of prime importance, but their measurements are mainly focused on the diffusion in the pores or through the mesh of the gels. In this study, we performed a deeper dynamic analysis of the water in close interaction with the fibers structuring two heterogeneous polygalacturonate (polyGalA) hydrogels formed by Ca and Zn ions (crosslinking agents). Nuclear magnetic resonance dispersion (NMRD) profiles recorded in-situ by fast-field cycling relaxometry allow to observe the very slow dynamics of water within the gels. Two distinct interpretations of the NMRD profiles are discussed, the first in regard of rotational and translational dynamics in the fibers and the second with respect to a Levy-walk on the fibers' surface. These discussions are confronted with molecular dynamics simulations on a model Ca-polyGalA fiber.

### 1. Introduction

Polysaccharide-based hydrogels with high water contents, low toxicities and good biocompatibilities have found broad applications as drug delivery vehicles. For example, they can be used to encapsulate proteins, probiotics (Heumann et al., 2020; Maire du Poset, Börjesson, et al., 2020) or micronutrients (e.g. Fe<sup>2+</sup>) in order to release them in the intestine or in the colon (calcium-pectin hydrogels resist to the gastric pH and can be degraded by pectinolytic enzymes present in the colon). Polysaccharide-based hydrogels have also applications as wound dressings or for the regeneration of various tissues such as bone, cartilage, and muscle (Das & Pal, 2015; Li & Mooney, 2016; Maire du Poset, Börjesson, et al., 2020; Matricardi, Di Meo, Coviello, Hennink, & Alhaique, 2013). They are made up of chemically or physically cross-linked networks of polymers, which can be characterized in various ways (degree of crosslinking, hydrodynamic correlation length, diffusion coefficient of water, etc.) (Pilař, Křfz, Meissner, Kadlec, & Přádný, 2009). A deep knowledge of the network structure of these hydrogels is necessary for the design and the control of their mechanical properties and functionalities such as their drug release profile, adsorption of undesirable molecules, swelling, etc.

The microstructure of gels and their diffusive properties can be probed by several methods. The degree of cross-linking, e.g. the

hydrodynamic correlation length (mean distance between adjacent crosslinks), can be determined by force-deflection measurement of elastic moduli, dynamic light scattering (DLS), small angle neutron scattering (SANS), and small angle X-ray scattering (SAXS). Moreover, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), an imaging technique that relies on the bleaching of fluorophores (Hadjiev & Amsden, 2015; Lorén et al., 2015; Lopez-Sanchez, Schuster, Wang, Gidley, & Strom, 2015; Lopez-Sanchez et al., 2017) allows to determine the diffusion coefficients of fluorophores in the range of 10<sup>-13</sup> to 10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> on a micrometer scale. For instance, diffusion coefficients of about 10<sup>-13</sup> m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> have been measured in iota-carrageenan biopolymer films (Karbowiak et al., 2006). However, the FRAP method shows some limitations such as the choice of the probe (size, shape, possible interaction with the sample) and a low sensitivity in probing nanostructure. In gel membranes, the degree of heterogeneity of polymeric networks with macroporous structures has also been characterized by the diffusion coefficients of small molecules (NaCl and trisodium citrate) using a permeability test (Tokuyama, Nakahata, & Ban, 2020). Nuclear magnetic resonance (NMR) is a technique of choice for probing molecular dynamics on time and length scales from 10<sup>-9</sup> to 1 s and 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-4</sup> m, respectively (Kärger et al., 2021; Kimmich & Fatkullin, 2017). Hills, Cano, and Belton (1991) have early evidenced by a T<sub>2</sub> measurement that polysaccharides influence the state of water around them ("bound"

\* Corresponding author.

E-mail address: [Philippe.bodart@u-bourgogne.fr](mailto:Philippe.bodart@u-bourgogne.fr) (P.R. Bodart).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120093>

Received 9 January 2022; Received in revised form 1 September 2022; Accepted 5 September 2022

Available online 8 September 2022

0144-8617/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

water concept) and that the presence of microheterogeneity in the hydrogel gives additional diffusive dephasing contributions. Later, Barbieri, Quaglia, Delfini, and Brosio (1998), using a NMR pulsed-gradient stimulated spin-echo technique, measured a self-diffusion coefficient of water in a poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) hydrogel about 5 times slower than that of bulk water ( $2.3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  at  $25^\circ \text{C}$ ) (Holz, Heil, & Sacco, 2000; Mills, 1973). More recently, Wende, Xue, Nestor, Öhrlund, and Sandström (2020) have probed by high-field proton NMR spectroscopy hydrogels of different degrees of modification and cross-linking, which show various swelling abilities, elastic and viscous properties. They have determined, with a bipolar-pair longitudinal-eddy-current delay diffusion ordered spectroscopy ((BPP-LED) DOSY) experiment, water diffusion coefficients from  $1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  at  $5^\circ \text{C}$  to  $5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  at  $70^\circ \text{C}$ .

In this study, we considered two hydrogels, Ca-polygalacturonate (Ca-polyGalA, hereafter called CaG) and Zn-polyGalA (hereafter referred to as ZnG). These two hydrogels were chosen because calcium and zinc exhibit different preferential modes of association with the carboxylate group of GalA units (bidentate in CaG and monodentate in ZnG), which impact the formulation and the properties of dosage forms (for instance, zinc pectinate beads delay the release of drug in comparison with calcium pectinate beads) (Assifaoui, Chambin, & Cayot, 2011). These hydrogels are made by external gelation, that is, by the diffusion of divalent cations ( $\text{M}^{2+} = \text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$ ) from a large outer reservoir, through a dialysis membrane, into a polyGalA solution. These hydrogels exhibit gradual decreases of the polymer and divalent cation concentrations along the diffusion direction (Maire du Poset, Lerbret, Zitolo, Cousin, & Assifaoui, 2018; Maire du Poset et al., 2019; Mørch, Donati, Strand, & Skjåk-Bræk, 2006; Skjåk-Bræk, Grasdalen, & Smidsmød, 1989; Ström et al., 2007), with a constant molar ratio  $R = [\text{M}^{2+}]/[\text{GalA}]$  equal to 0.25, showing that each  $\text{M}^{2+}$  cation interacts on average with four galacturonate (GalA) units all along the gels (Maire du Poset et al., 2018; Maire du Poset et al., 2019). The concentration distribution of polymer and divalent cation along the diffusion direction gives rise to a mesh-size distribution in the gels along the same direction (Maire du Poset et al., 2019; Skjåk-Bræk et al., 1989; Ström et al., 2007). The microstructures of the gels can be described by various types of associations of polyGalA chains bridged to one another by divalent cations (point-like crosslinks and cooperative associations of two or more polyGalA chains called dimers or multimers, respectively) (Borgogna, Skjåk-Bræk, Paoletti, & Donati, 2013; Huynh, Lerbret, Neiers, Chambin, & Assifaoui, 2016; Maire du Poset et al., 2019; Ventura, Jammal, & Bianco-Peled, 2013).

The aim of this work is to study the water dynamics in these two anisotropic polysaccharide-based hydrogels by using proton fast-field cycling (FFC) NMR relaxometry. This technique allows to measure small diffusion coefficients from  $10^{-14}$  to  $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Flämig, Hofmann, Lichtinger, & Rössler, 2019), a range that has not been probed so far in such gels. Recently, it has been increasingly applied to food, such as gels encountered in food like Turkish delights (Lokum) (Pocan, Ilhan, et al., 2021; Pocan, Knapkiewicz, Rachocki & Oztop, 2021), but also cheese (Kruk, Florek-Wojciechowska, Masiewicz, et al., 2021), and eggs (Kruk, Florek-Wojciechowska, Oztop, et al., 2021). In the present work, complementary molecular dynamics simulations have also been performed to facilitate the interpretation of the experimental NMRD profiles. The very well characterized and controlled structures of these polysaccharide hydrogels allow a deep insight into their molecular dynamics. Our hypothesis is that the proton NMRD profiles recorded for Ca and Zn polygalacturonate gels reflect mainly the dynamic of water molecules in close interaction with the fiber (not the bulk water dynamics between the fibers), which could be relevant for more complex food and pharmaceutical matrices.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample preparation

Polygalacturonic acid, calcium, zinc, and sodium chloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO) and all salts were used as received. Stock solutions of polyGalA (20 g/L) were prepared in a 10 mM sodium chloride solution, and the polyGalA powder was hydrated for at least 30 min. The pH of the solution was then adjusted to 5.5 by addition of sodium hydroxide (1 M NaOH). To remove impurities that might be present in the polyGalA powder, the solution was dialyzed with a membrane (molecular weight cutoff of 3.5 kDa) against the same 10 mM sodium chloride solution (pH 5.5) three times for at least 2 h. A volume ratio of 1:10 was used for the dialysis. Stock solutions of the crosslinking cations (50 mM) were prepared by dissolving the appropriate salt powder ( $\text{CaCl}_2$  or  $\text{ZnCl}_2$ ) in NaCl (10 mM, pH 5.5). The external gelation used in this study followed the protocol presented by Maire du Poset et al. (2018). Briefly, a volume of 284  $\mu\text{L}$  of the polyGalA solution was poured in an open NMR tube of 6 mm diameter (this volume of solution corresponds to a 1 cm height), closed on one end by a dialysis membrane. The tube was then immersed in the divalent cation solution for 24 h to allow cation diffusion through the membrane (Fig. 1). The calcium and zinc polygalacturonate gels obtained at the end of the diffusion process show, along the vertical direction  $z$ , a large longitudinal gradient of polyGalA concentration (Maire du Poset et al., 2019). They have been analyzed by FFC NMR relaxometry less than 1 h after their synthesis, and no washing has been applied to remove any free Ca or Zn ions present within the gel. An absorbent paper was used to remove surface water.

A deuterated CaG gel was also prepared following the protocol previously described. Both polyGalA and crosslinking solutions were prepared in pure  $\text{D}_2\text{O}$ . Fifty milliliters of the crosslinking solution was allowed to dialyze against 284  $\mu\text{L}$  of polyGalA solution. A control measurement showed a very weak proton signal barely discernible in the deuterated gel, allowing us to suppose that protons coming from the GalA backbone can be neglected.

### 2.2. Field cycling NMR relaxometry

Proton spin-lattice relaxation measurements were performed on a field cycling relaxometer from Stelar Company (Meda, Italy) with a magnetic field  $B_0$  covering the proton Larmor frequencies from 0.001 to 40 MHz (Anoardo, Galli, & Ferrante, 2001; Kimmich & Anoardo, 2004; Noack, 1986). The spectrometer operates by switching the current in a solenoidal magnet from a polarizing field ( $B_{pol}$ ), corresponding to a proton Larmor frequency of 24 MHz, to a field of interest ( $B_{rel}$ ) for a variable relaxation period ( $\tau$ ). After each  $\tau$  delay, the  $B_{rel}$  field is switched to the acquisition field ( $B_{acq}$ ), corresponding to a proton Larmor frequency of 16 MHz, at which magnetization is detected after a  $\pi/2$  pulse. The relaxation field  $B_{rel}$  varied from  $2.35 \cdot 10^{-5}$  to 0.47 T, corresponding proton Larmor frequencies ranging from 1 kHz to 20 MHz. The measurements were carried out at a temperature of  $25^\circ \text{C}$ , 8 scans were recorded, with a  $\pi/2$  pulse of 10  $\mu\text{s}$ , a field-switching time of 3 ms, a relaxometer dead time of 18  $\mu\text{s}$ , and a spectral width of 10 MHz. The spin-lattice ( $T_1$ ) relaxation curves – composed of 16 points – were obtained by averaging the recorded FID signals from point numbers 10 to 128. Deuterium spin-lattice relaxation measurement were performed on the same relaxometer with magnetic fields corresponding to deuterium Larmor frequencies of 3.84 and 5.53 MHz for  $B_{pol}$  and  $B_{acq}$  respectively. The relaxation field  $B_{rel}$  varied from  $2.35 \cdot 10^{-4}$  to 0.97 T, corresponding to deuterium Larmor frequencies ranging from 1.5 kHz to 6.12 MHz. Sixteen scans were recorded, with a  $\pi/2$  pulse of 31  $\mu\text{s}$ . All other parameters were identical to those of the proton experiments.

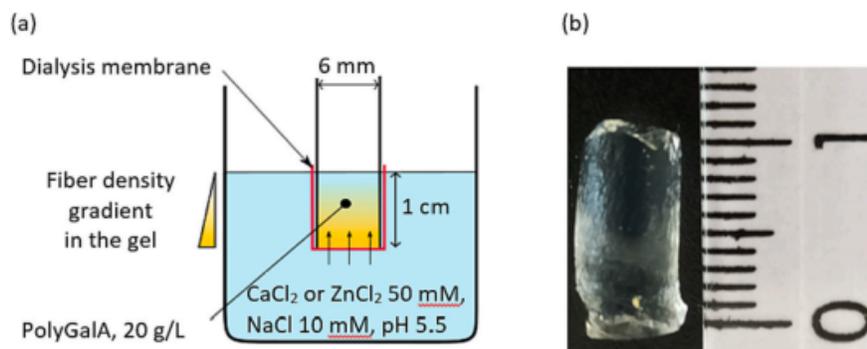


Fig. 1. (a) External gelation protocol of polyGalA gels made by the diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  cations through a dialysis membrane. The longitudinal heterogeneity of the gels is schemed with a yellow color gradient. (b) Picture of the calcium-polyGalA gel (CaG), which is macroscopically homogeneous and totally transparent.

### 2.3. Molecular dynamics simulation

#### 2.3.1. Simulated system

We built a model fiber composed of 16 octameric GalA chains in the  $2_1$  conformation in the presence of 72  $\text{Ca}^{2+}$  cations ( $R = [\text{Ca}^{2+}]/[\text{GalA}] = 0.5625$ ), 16  $\text{Cl}^-$  anions for charge neutrality, and 1100 water molecules ( $[\text{GalA}] = 721$  g/L). For this purpose, we first performed a 50-ns-long (N,V,T) MD simulation of two antiparallel octameric GalA chains in the  $2_1$  conformation bridged together by 4  $\text{Ca}^{2+}$  cations in an “egg-box”-like configuration, as in our previous studies (Assifaoui et al., 2015; Maire du Poset, Zitolo, et al., 2020) (see step I of Fig. S1 in Supplementary Information). The procedure used to build the  $\text{Ca}^{2+}$ -polyGalA complex has been described in details in Assifaoui et al. (2015) and is similar to that employed by Braccini and Pérez (2001). To limit end-chain effects, these GalA chains were made periodic along the Z axis (that is, infinitely long through periodic boundary conditions). Then, we stacked together the final configuration of this GalA dimer (and its bound  $\text{Ca}^{2+}$  cations) to its replica translated by  $6 \text{ \AA}$  along the X axis —  $(6 \text{ \AA}, 0, 0)$  translation vector, and added 8  $\text{Ca}^{2+}$  cations to make bridges between adjacent unbridged GalA chains ( $R = 0.5$ ) (step II of Fig. S1 in Supplementary Information). Next, we replicated three times the tetramer of GalA chains thus formed in the X and Y direction (with translation vectors of  $(12 \text{ \AA}, 0, 0)$ ,  $(0, 20 \text{ \AA}, 0)$  and  $(12 \text{ \AA}, 20 \text{ \AA}, 0)$ , respectively), so that the model GalA fiber was composed of 16 GalA chains bound to 64  $\text{Ca}^{2+}$  cations (step III of Fig. S1 in Supplementary Information). Finally, some of the  $\text{Ca}^{2+}$  cations were translated and 8  $\text{Ca}^{2+}$  were added to form GalA- $\text{Ca}^{2+}$ -GalA bridges across replicas (step IV of Fig. S1 in Supplementary Information). Sixteen  $\text{Cl}^-$  anions were randomly added for charge neutrality. This system was then solvated with 1100 water molecules in an orthorhombic simulation box of side lengths  $L_x = 33 \text{ \AA}$ ,  $L_y = 48 \text{ \AA}$ , and  $L_z = 33.525 \text{ \AA}$ . To allow some reorganization of the conformation of GalA chains, this system was first simulated for 50 ns in the isobaric-isothermal (N, P, T) ensemble using an isotropic pressure coupling with a time constant for coupling  $\tau_p$  of 1 ps. Then, the box dimensions were kept fixed to their average values in the (N, P, T) simulation ( $L_x = 28.647 \text{ \AA}$ ,  $L_y = 52.566 \text{ \AA}$  and  $L_z = 34.269 \text{ \AA}$ ). A harmonic position restraint with a force constant of  $1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$  was applied on each glycosidic atom of polyGalA chains and on  $\text{Ca}^{2+}$  cations to prevent any long-range translation, and this system was simulated for 1  $\mu\text{s}$  in the (N, V, T) ensemble.

#### 2.3.2. Simulation details

Galacturonate (GalA) chains were modeled with the CHARMM36 carbohydrate force field (Guvench et al., 2008, 2011; Guvench, Hatcher, Venable, Pastor, & MacKerell, 2009) and the TIP3P potential (Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey, & Klein, 1983) modified for the CHARMM force field (Mark & Nilsson, 2001) was used to represent water. The Lennard-Jones parameters for  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\epsilon = -0.12 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  and  $R_{\text{min}}/2 = 1.367 \text{ \AA}$ ) were those determined by Marchand and Roux

(1998) except for  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{O}_{\text{carboxylate}}$  interactions, which we modified ( $R_{\text{min}}(\text{Ca}^{2+} - \text{O}_{\text{carboxylate}}) = 3.196 \text{ \AA}$  instead of  $3.067 \text{ \AA}$ ) in order to reproduce the experimental association constant between  $\text{Ca}^{2+}$ - and GalA (Gould & Rankin, 1970). Water molecules were kept rigid with the SETTLE algorithm (Miyamoto & Kollman, 1992), while the LINCS algorithm (Hess, Bekker, Berendsen, & Fraaije, 1997) was used to constrain all covalent bonds involving a hydrogen atom to their nominal length. Newtonian equations of motion were integrated with the Verlet leapfrog algorithm and a time step of 2 fs. Periodic boundary conditions were applied. van der Waals interactions were force switched to zero between 8 and  $10 \text{ \AA}$  and Lorentz-Berthelot mixing rules were used for cross-interaction terms. The short-range electrostatic interactions were cut off at  $10 \text{ \AA}$  and long-range electrostatic interactions were handled by the Particle Mesh Ewald (PME) method (Essmann et al., 1995) with a 4th-order spline interpolation and the fast-Fourier grid spacing was set to  $1 \text{ \AA}$ . All production simulations were performed at 300 K in the canonical (N, V, T) ensemble and temperature was controlled with the Nose-Hoover chain thermostat with a time constant for coupling  $\tau_p$  of 0.5 ps. MD simulations were performed for 1  $\mu\text{s}$  using the GROMACS 2019.6 package (Abraham et al., 2015; Van Der Spoel et al., 2005). Trajectories were saved every ps.

### 2.4. Theoretical description of relaxation mechanisms

#### 2.4.1. Rotational and translational model

PolyGalA gels are free of paramagnetic elements and mainly composed of water (98 % w/w) so that it is reasonable to assume that the relaxation is governed by the dynamics of water molecules that modulate the proton dipolar interaction. In a first hypothesis, two pools of protons are considered: (i) the free water proton pool that is associated with protons showing dynamical properties comparable to those observed for bulk water molecules, and (ii) the hindered water pool, composed of water molecules with dynamics hindered by the gel fibers (Fig. 2). The free water proton pool corresponds to water situated between the crosslinked polyGalA chains (fibers) of the gel, whereas the hindered water pool is associated with the water molecules located in close proximity to the fibers.

In both pools, water molecules are experiencing rotational and translational dynamics. Within the bulk water pool, these dynamics are characterized by correlation times of the order of picoseconds and give rise to a dispersion in the NMRD profile up to the GHz range, i.e., too far above the spectral window used in this study to be observed. For this reason, at low field, the bulk water contribution to the relaxation can be considered as a constant value referred as to  $A$  in Eq. (1). The water molecules belonging to the hindered water pool cannot move freely because of their interactions with the gel fibers, and thus, translational and rotational relaxation mechanisms at a lower time scale have then to be considered. In the gel the overall spin-lattice relaxation rate ( $R_1 \equiv 1/T_1$ ) can then be formulated as follows:

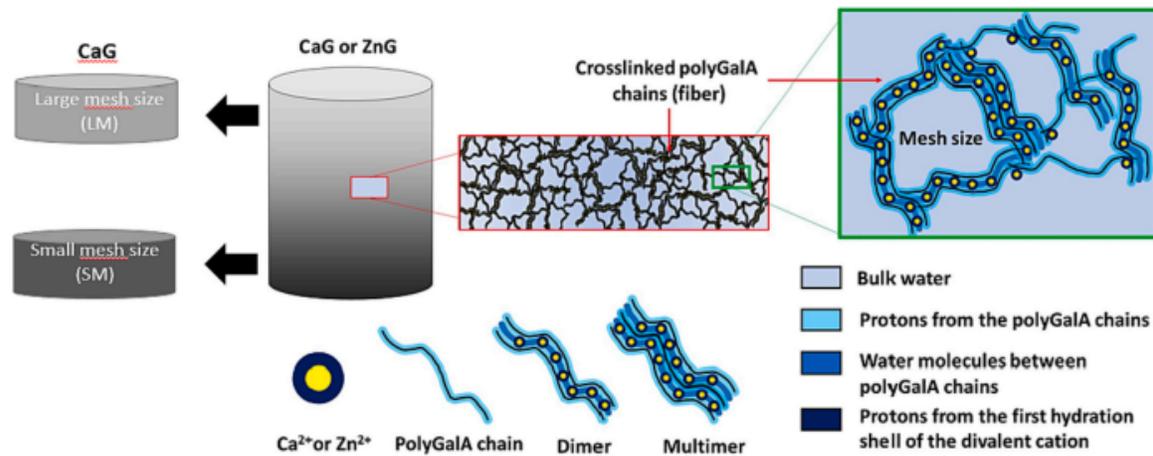


Fig. 2. Schematic representation of the gel morphology, metal cations with their hydration shell, polyGalA chains, and the different water pools.

$$R_1(\nu) = A + R_1^{\text{hind,rot}}(\nu) + R_1^{\text{hind,trans}}(\nu) \quad (1)$$

where  $\nu$  denotes the proton resonance Larmor frequency expressed in Hz,  $A$  is the  $\nu$ -independent bulk water contribution. Assuming the isotropic diffusions of two spins 1/2 (i.e. in a water molecule) the relaxation rate representing the rotational and exchange dynamics of the hindered water molecules can be expressed as (Bloembergen, Purcell, & Pound, 1948; Kowalewski & Mäler, 2018; Kruk, Florek-Wojciechowska, Masiewicz, et al., 2021; Pocan, Ilhan, et al., 2021):

$$R_1^{\text{hind,rot}}(\nu) = C_r \left[ \frac{\tau_r}{1 + (2\pi\nu\tau_r)^2} + \frac{4\tau_r}{1 + (4\pi\nu\tau_r)^2} \right] \quad (2)$$

where the correlation time  $\tau_r$  is expressed as the combination of the correlation time of the rotation of the hydrated ions ( $\tau_{rot}$ ) and of the exchange time corresponding to the residence time ( $\tau_{ex}$ ) of the water molecule in the hydration sphere of the ions:

$$\frac{1}{\tau_r} = \frac{1}{\tau_{rot}} + \frac{1}{\tau_{ex}} \quad (3)$$

When only two protons are interacting, the dipolar coupling constant  $C_r$  is given by (Kruk, 2016):

$$C_r = \frac{3}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} \right)^2 \quad (4)$$

where  $\gamma$  denotes the proton gyromagnetic ratio,  $r$  is the internuclear proton distance, whereas the other symbols designate usual physical constants. In the case of an isotropic diffusion, the relaxation contribution issued from the translational molecular process can be expressed as (Ayant, Belorizky, Aluzon, & Gallice, 1975; Kruk, Florek-Wojciechowska, Oztop, et al., 2021):

$$R_1^{\text{hind,trans}}(\nu) = C_t \int_0^\infty \frac{u^4}{81 + 9u^2 - 2u^4 + u^6} \left( \frac{\tau_t}{u^4 + (2\pi\nu\tau_t)^2} + \frac{4\tau_t}{u^4 + (4\pi\nu\tau_t)^2} \right) du, \quad (5)$$

with

$$C_t = \frac{108}{5} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma^2 \hbar}{d^3} \right)^2 N_H \quad (6)$$

where  $N_H$  is the number of protons per  $m^3$  and  $d$  is the closest approach distance of the interacting water molecules, assumed to correspond to the diameter of a water molecule (2.75 Å).

The translational correlation time,  $\tau_t$  is defined as:

$$\tau_t = \frac{d^2}{D_t} \quad (7)$$

where  $D_t$  is the relative translational diffusion (not self-diffusion) coefficient of the hindered water molecules.

#### 2.4.2. Bulk mediated surface diffusion (Levy-walk)

In a second hypothesis, a Levy-walk of the water molecules on the fiber surface is considered. Levy-walks are used in porous media to explain the slow dynamics observed on NMRD profiles (Stapf, Kimmich, & Seitter, 1995, 1996). This dynamics is related to the bulk-mediated surface diffusion (BMSD) model: molecules or more generally particles can diffuse both on a flat surface and in a thin bulk layer above the surface (Bychuk & O'Shaughnessy, 1994, 1995). It is assumed that the particle is most of the time on the surface but that it may also escape (for a short period of time) from the surface into the bulk layer and come back onto the surface. The succession of desorption and adsorption steps generate the BSMD dynamics.

When the adsorption is strong ( $r \ll Dt$ ), the Levy-walk is based on a surface distribution of the molecules described by a standard bivariate Cauchy distribution:

$$p(r,t) = \frac{1}{2\pi} \frac{ct}{(r^2 + c^2t^2)^{\frac{3}{2}}} \quad (8)$$

where  $r$  is the surface spatial displacement,  $c$  (a velocity) is the ratio of the bulk coefficient diffusion by a factor  $h$  qualified as "adsorption depth":

$$c = \frac{D}{h} \quad (9)$$

The NMR time correlation function is given by (Stapf et al., 1995):

$$G(t) = t \int_0^\infty u \frac{g(u)}{(t^2 + u^2)^{\frac{3}{2}}} du \quad (10)$$

with  $u = \frac{r}{\xi}$ ,  $g(u)$  is the spatial correlation function of the molecule displacement on the surface.

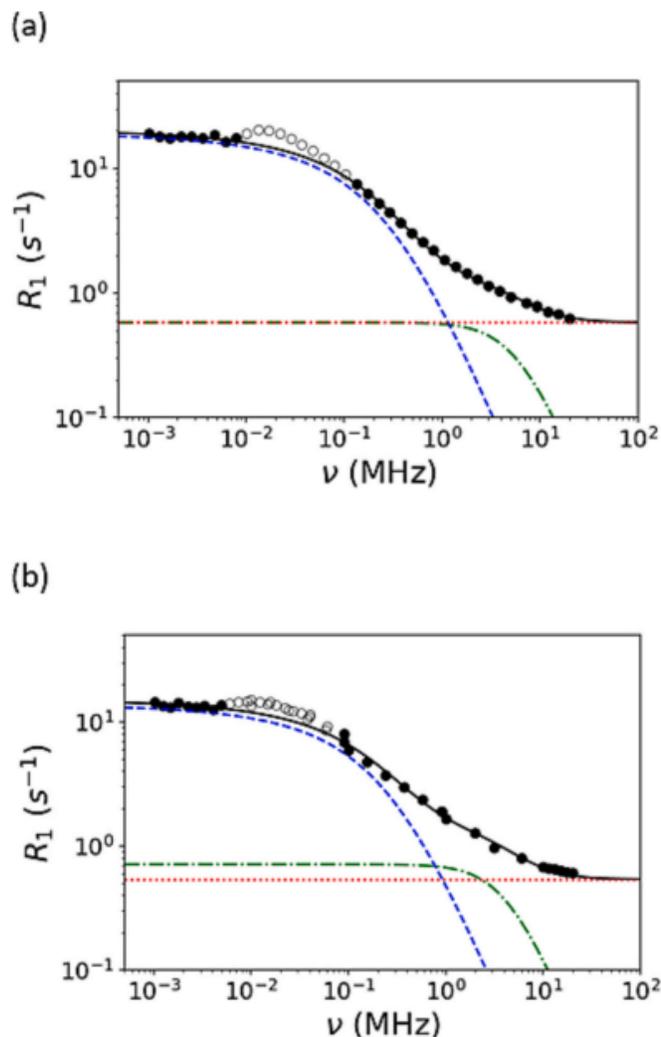
To obtain a characteristic length of the movement on the surface, Stapf et al. (1995, 1996) proposed the following procedure: (i) formal fit of the NMRD profile (with a non-negative least square procedure, NNLS) with a set of functions whose form is identical to Eq. (2), (ii) construction of the time correlation function  $G(t)$ , and (iii) discretization of the integral of Eq. (10) to form a matrix equality which is inverted with a NNLS routine to get the spatial correlation function  $g(u)$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Modeling of the NMRD profiles assuming an internal fiber dynamics

The proton NMRD profiles of CaG and ZnG hydrogels calculated with a monoexponential refinement of the relaxation curves are presented in Fig. 3. In a first approach, these NMRD profiles have been fitted with a simple dynamical model to reproduce isotropic rotation and translation of the water molecules in similarity with the recent the modeling performed on NMRD profiles of gel candies (Pocan, Knapkiewicz, et al., 2021; Pocan, Ilhan, et al., 2021). The calculated parameters are reported in Table 1.

The NMRD profiles of CaG and ZnG (Fig. 3) are very similar to each other, even though ZnG shows slightly lower relaxation rates. In both of them, a relaxation enhancement appears as a hump around  $2 \cdot 10^{-2}$  MHz and is more pronounced for CaG than for ZnG. This relaxation enhancement is not accounted for by the fitting model (Eq. (1)), so that we decided to discard the corresponding experimental points (open circles in Fig. 3) from the fitting procedure. Such a feature has recently been observed in gelatin lokum, but has not been explained so far



**Fig. 3.** Proton NMRD profile of CaG (a) and ZnG (b) hydrogels. Circles are experimental points, open circles have not been fitted. The continuous lines correspond to fitted profiles. Discontinuous lines represent the calculated individual components. The bulk water contribution is shown as a dotted red line, while the rotational and translational contributions are shown as dashed-dotted-green and dashed-blue lines, respectively.

**Table 1**

Parameters obtained from the fit analysis of the data reported in Fig. 3. The numbers in bracket report the refinement error on the precedent digit.  $N_H$  was calculated according to Eq. (6) and  $D_t$  according to Eq. (7). Uncertainties on  $N_H$  and  $D_t$  result from a propagation error.

Sample	$C_r$ ( $10^6$ Hz <sup>2</sup> )	$\tau_r$ ( $10^{-8}$ s)	$C_t$ ( $10^7$ Hz <sup>2</sup> )	$\tau_t$ ( $10^{-6}$ s)	$A$ ( $s^{-1}$ )	$N_H$ ( $10^{26}$ $m^{-3}$ )	$D_t$ ( $10^{-14}$ $m^2 s^{-1}$ )
CaG	7(5)	1.5(9)	9.5(9)	1.5(1)	0.58	1.6(9)	4.9(3)
ZnG	7(5)	2.0(3)	6.5(8)	1.6(2)	0.54	1.1(8)	4.6(6)

(Pocan, Knapkiewicz, et al., 2021).

At first glance, it seems amazing that despite the mesh-size distribution in the gels, the NMRD profiles could be satisfactorily reproduced with the simple proposed model (Eq. (1)), built with only two proton populations (bulk and hindered). For example, there was no need to consider a distribution of correlation times as in the study of gel candies (Pocan, Knapkiewicz, et al., 2021), as if the gel heterogeneity had no impact on the NMRD profiles. At low frequencies, the NMRD profiles are dominated by the translational motion of hindered water molecules, characterized by the correlation time  $\tau_t$  and by  $C_t$ . At intermediate frequencies, the relaxation is governed by the rotational motion of hindered water molecules, quantified by the  $\tau_r$  and  $C_r$  parameters. At higher frequencies, the relaxation originates from the dynamics of bulk water molecules. The relaxation rates measured in this frequency range ( $A = 0.58 s^{-1}$  and  $0.54 s^{-1}$  for CaG and ZnG hydrogels, respectively) are slightly larger than those measured in the stock solutions ( $\sim 0.37 s^{-1}$ ) after the cation diffusion into the polyGalA solution. This increase in relaxation rate between the stock solutions and the gels can be attributed to the meshes of the gels that slightly restrict the dynamics of the bulk water and offer additional sinks of relaxation, as in porous materials (Chui, Phillips, & McCarthy, 1995).

Besides, the translational correlation times obtained correspond to translational diffusion coefficients of the order of  $5 \cdot 10^{-14} m^2 s^{-1}$ . This is a remarkably small value, which cannot be associated with the diffusion of either free water or water molecules from the first hydration shell of Ca or Zn free ions, even if we neglect their exchange with water molecules from the second hydration shell. Indeed, the diffusion coefficients at 25 °C of Ca and Zn ions in  $CaCl_2$  and  $ZnSO_4$  solutions are  $1.14$  and  $0.75 \cdot 10^{-9} m^2 s^{-1}$ , respectively (Chen, 2019), relatively close to that of bulk water at 25 °C ( $2.3 \cdot 10^{-9} m^2 s^{-1}$ ). Moreover, Sandrin et al. (2016) have shown that the fiber structure of the gel does not strongly affect the diffusion coefficient of molecules in the gel (e.g. for a dye with a molecular weight of 0.53 kDa, the diffusion coefficient is  $0.37$  and  $0.27 \cdot 10^{-9} m^2 s^{-1}$  in solution and in the gel respectively). An analogous result has also been found for the diffusion of considerably bigger molecules: using FRAP measurements, Lopez-Sanchez et al. (2017) determined diffusion coefficients of  $1.78 \cdot 10^{-11} m^2 s^{-1}$  and  $\sim 0.7 \cdot 10^{-11} m^2 s^{-1}$  for a FTIC-dextran (Mw = 500 kDa, hydrodynamic radius  $r_h = 13.5$  nm) in water and in a calcium pectinate gel, respectively. A similarly surprising observation can be performed for the rotational correlation time of the hindered water molecules (of about  $10^{-8}$  s), that is, orders of magnitude larger than those of bulk water ( $\sim 10^{-12}$  s). It is worth noting that similar large rotational time have been recently measured by relaxometry in gelly food: for gelatin soft candies ( $0.6\text{--}3 \cdot 10^{-8}$  s), lokum ( $0.3\text{--}1.7 \cdot 10^{-9}$  s), and even for eggs ( $1.8\text{--}3.1 \cdot 10^{-8}$  s) and cheese ( $2\text{--}2.4 \cdot 10^{-6}$  s) (Kruk, Florek-Wojciechowska, Masiewicz, et al., 2021; Kruk, Florek-Wojciechowska, Oztop, et al., 2021; Pocan, Ilhan, et al., 2021; Pocan, Knapkiewicz, et al., 2021).

Many studies suggested that the order of magnitude of water diffusion coefficient in different polymers was in the range  $10^{-15}\text{--}10^{-11} m^2 s^{-1}$  (Schwiderke & di Sarli, 1986; Tian, Du, Abdelmola, Qiang, & Carlsson, 2020; Yang, Xing, Li, & Zhang, 2020). This leads to the assumption that the water molecules responsible for the observed

dispersion are embedded in the polymer fibers forming the gel, in which the rotational dynamics could be strongly reduced, thereby leading to low rotational correlation times of the order of  $10^{-8}$  s. According to the egg-box model (Grant, Morris, Rees, Smith, & Thom, 1973), the simplest gel fiber is composed of two or more polygalacturonate chains bridged together by calcium or zinc ions, which are coordinated to carboxylic and hydroxyl groups of the polymer chains, as well as to a few hydration water molecules (Assifaoui et al., 2015; Maire du Poset, Zitolo, et al., 2020) (usually between 2 and 4, with averages of about 3 for  $\text{Ca}^{2+}$  and 2 for  $\text{Zn}^{2+}$ , according to our previous studies, Fig. 4).

The measured numbers of protons per unit of volume ( $\text{m}^3$ ) involved in the translational relaxation,  $N_H$ , are  $1.6 \cdot 10^{26}$  and  $1.1 \cdot 10^{26}$  for CaG and ZnG hydrogels, respectively (Table 1). Since these hydrogels are essentially composed by polyGalA chains (20 g/L), divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$ ) and water, it is possible to determine the theoretical numbers of protons per  $\text{m}^3$ ,  $N_H(x)$ , associated to each component  $x$  (where  $x$  either stands for polyGalA chains, cation hydration water, and bulk water):

$$N_H(x) = C(x) \times N_A \times n_H(x) \quad (11)$$

where  $C(x)$  is the concentration of the  $x$  component in the gel (mmol/L or  $\text{mol}/\text{m}^3$ ),  $N_A$  is the Avogadro number ( $6.023 \cdot 10^{23}$ ), and  $n_H(x)$  is the number of protons in each molecule of the considered  $x$  component. In each GalA unit, there are 2 protons from the hydroxyl functions and 5 aliphatic protons from the ring (Fig. 4b). Moreover, the number of water molecules found in the first hydration shell of the divalent cations that bridge polyGalA chains is approximately equal to 3 (6 protons) and 2 (4 protons) for  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , respectively (Fig. 4a). The average concentration of polyGalA in CaG and ZnG hydrogels is considered equal to 20 g/L, which corresponds to 114 mM (since the molar weight of the GalA unit is 175 g/mol), and the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  cations is supposed to be 4 times lower than that of GalA units, since each cation is assumed to bind to 4 GalA units on average ( $R = [\text{M}^{2+}] / [\text{GalA}] = 0.25$ , Fig. 4a). Following these assumptions, Table 2 summarizes the different origins and theoretical numbers of protons in the studied gels.

According to Table 2, the total numbers of protons per unit volume in CaG and ZnG are quite similar and close to  $6.6 \cdot 10^{28}/\text{m}^3$ . This means that  $<1\%$  of the sample protons would contribute to the translational relaxation signal observed at low field in the NMRD profiles of Fig. 3. Table 2 suggests that both the protons of the hydration water molecules of cross-linking cations and some of the protons from polyGalA units

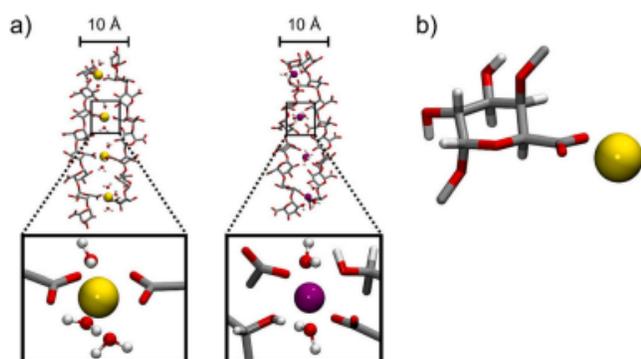


Fig. 4. a) Snapshots of two octameric GalA chains bridged together by four Ca or Zn ions (yellow or purple spheres, respectively). For clarity, only the heavy atoms of GalA chains, the divalent cations as well as the water molecules from their first coordination shell are displayed. Carbon, oxygen, and hydrogen atoms are shown in grey, red, and white, respectively. Examples of the local environments of calcium and zinc ions within ionic bridges are shown in the insets below, with hydrogen atoms from GalA units also displayed. b) Local structure of a GalA unit coordinated to a calcium ion. Each GalA unit contains seven hydrogen atoms, two polar ones from hydroxyl groups and five apolar ones from the GalA ring. (Assifaoui et al., 2015).

Table 2

Origins and numbers of protons,  $N_H(x)$ , present in CaG and ZnG hydrogels. The estimated number of protons per volume unit for each component was determined by using Eq. (11).

$x$	$C(x)$ (g/L)	$C(x)$ (mM)	Origin of protons	$n_H(x)$	$N_H(x)$ (per $\text{m}^3$ )
GalA unit	20	114	H hydroxyl (OH)	2	$1.37 \cdot 10^{26}$
			H aliphatic (C—H)	5	$3.42 \cdot 10^{26}$
Calcium bound		28.5 <sup>(1)</sup>	H from 3 water molecules <sup>(2)</sup>	6	$1.03 \cdot 10^{26}$
Zinc bound		28.5 <sup>(1)</sup>	H from 2 water molecules <sup>(2)</sup>	4	$0.69 \cdot 10^{26}$
Water (bulk)	980	54.4 · 10 <sup>3</sup>		2	$6.55 \cdot 10^{28}$

<sup>1</sup> The concentration of calcium and zinc is assumed to be equal to the  $C(\text{GalA}) \cdot 0.25$ .

<sup>2</sup> The number of protons was determined from Fig. 4a.

contribute to this signal (summing up all protons from GalA units and from cation hydration water molecules actually leads to about 5.8 and  $5.5 \cdot 10^{26} \text{H}/\text{m}^3$ , for CaG and ZnG respectively). Even though the studied gels are heterogeneous on mesoscopic scales, on a local scale the association patterns (fibers) formed by crosslinked polyGalA chains remain the same in the whole hydrogel. The dynamics of water molecules within fibers is not expected to vary with the meso-heterogeneities throughout the sample. This would explain why the NMRD profiles can be well reproduced with only two contributions, whereas a distribution of contributions would be expected for a dynamically heterogeneous gel. Furthermore, it is interesting to note that the apparent minor component A of the calculated NMRD profiles represent  $>99\%$  of the proton population, while the more apparent rotational and translational relaxation components are associated with only a very small fraction of the water present in the gel. Such a small amount of structural water probably explains why it has not been revealed so far in spectroscopic NMR diffusion experiments performed on hydrogels (Barbieri et al., 1998; Hills et al., 1991; Wende et al., 2020).

To further test the hypothesis that the water dynamics observed does not vary with the meso-heterogeneities, Table 3 reports the result of the fits of the NMRD profiles of slices of gel with small (SM) and large (LM) mesh sizes. The SM slice corresponds to the lower quarter of the gel (formed just above the dialysis membrane) and the LM slice corresponds to the upper third of the gel (Fig. 1). To complete the picture, parameters from the fit of a partially dehydrated (PD; weight loss of 42%) gel are also reported. Upon dehydration, this gel shrank significantly, so that the mesh size is expected to decrease. These NMRD profiles and their fit are reproduced in Fig. 5.

The NMRD profiles of these additional samples are subject to a higher noise level because the amount of material is substantially lower than in a complete fresh gel. The increase of the A parameter reveals a more confined bulk water molecules in the SM and PD gels than in the LM or fresh gel. Moreover, the lower dispersion remain reasonably well defined and the diffusion coefficient ( $D_i$ ) remains close to the values

Table 3

Parameters obtained from the fit analysis of the NMRD profiles of a partially dehydrated (PD) gel, slices with small (SM) and large (LM) mesh sizes. As in Table 2, the numbers in bracket report the refinement error on the precedent digit.

Sample	$C_r$ ( $10^6$ Hz <sup>2</sup> )	$\tau_r$ ( $10^{-8}$ s)	$C_t$ ( $10^7$ Hz <sup>2</sup> )	$\tau_t$ ( $10^{-6}$ s)	A ( $\text{s}^{-1}$ )	$N_H$ ( $10^{26}$ $\text{m}^{-3}$ )	$D_t$ ( $10^{-14}$ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )
PD	2(3)	1(3)	3.3(2)	1.28 (8)	0.6 (6)	6(2)	5.9(4)
SM	10 (20)	1(2)	15(3)	1.4(2)	0.6 (6)	3(3)	5.5(8)
LM	6	1(2)	7.6(1)	1.3(2)	0.4 (6)	1.3(1)	5.6(9)

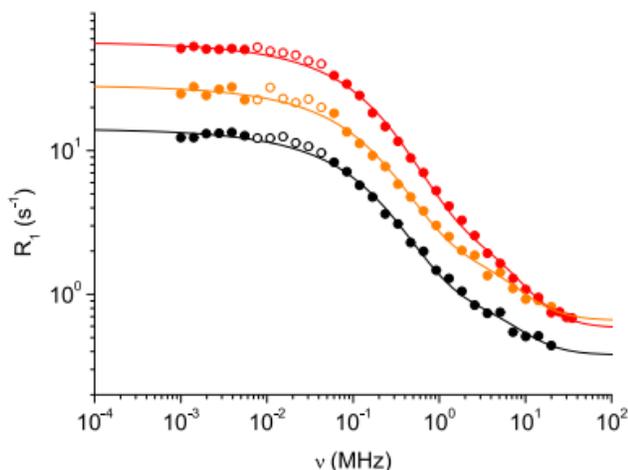


Fig. 5. From bottom to top, NMRD profiles and fit (continuous lines) of the upper third part of the gel with a large mesh size (●), the lower fourth slice of the gel with small mesh size (○), and a partially dehydrated gel (weight loss: 42 % w/w) (●).

obtained for the complete fresh gel, and proton population ( $N_H$ ) stays in the order of  $10^{26}$  atoms/m<sup>3</sup>. These observations suggest that the dynamics revealed by the NMRD profiles are associated with a rather uniform dynamics in the gel despite its heterogeneity.

### 3.2. Molecular dynamics simulation

To test our hypothesis that the NMRD profiles mainly reflect the dynamics of water molecules embedded in the hydrogel fibers, we performed a complementary molecular dynamics simulation of a model fiber composed of sixteen polyGalA chains periodic along the Z axis (see Materials and Methods section and Fig. S1 in Supplementary Information for further details). We then determined the displacement of each water molecule of the simulation box,  $\Delta r(t) = |r(t + \Delta\tau) - r(t)|$ , where  $r(t)$  is the position vector of the water oxygen at time  $t$  and  $\Delta\tau$  the time lag (arbitrarily set to 1 ns) so as to identify water molecules with slow dynamics. Very distinct time-dependences of water displacements have been found (see examples in Fig. S2a in Supplementary Information). Water molecules with low displacements have been defined as “localized” when their displacement remains systematically lower than 2 Å over the whole trajectory and as “jumping” when their displacement remains (i) systematically lower than 7 Å, (ii) lower than 2 Å for at least 5 % of the simulation time, and (iii) between 2 and 7 Å for at least 1 % of the simulation time (this last criterion ensures that a sufficiently high number of jumps and/or sufficiently long residence times in distinct locations are sampled). These two pools of water molecules clearly exhibit slow dynamics (see Fig. S2b in Supplementary Information) and the positions they sample over the simulation trajectory are shown in Fig. 6. They correspond to water molecules that remain confined between or bound to polyGalA chains along the simulation trajectory and thus exhibit slow rotational and translational dynamics. The pool of “localized” water thus defined is composed of 46 molecules (that is, about 4 % of the total water content) that remain either within the hydration shell of calcium cations or simultaneously H-bonded to several carboxylate and hydroxyl groups from the polyGalA chains (Fig. S3a in Supplementary Information), and therefore do not translate over the microsecond-long MD simulation, which prevents any meaningful estimation of their diffusion coefficient from their mean-square displacement. Their dynamics is governed by a wobbling of their electric dipole in a cone along a preferential direction (the average Ca<sup>2+</sup>-O<sub>w</sub> direction or the main axis of polyGalA chains for instance, see Supplementary Information: Supplementary Video 1). Therefore, the rotational

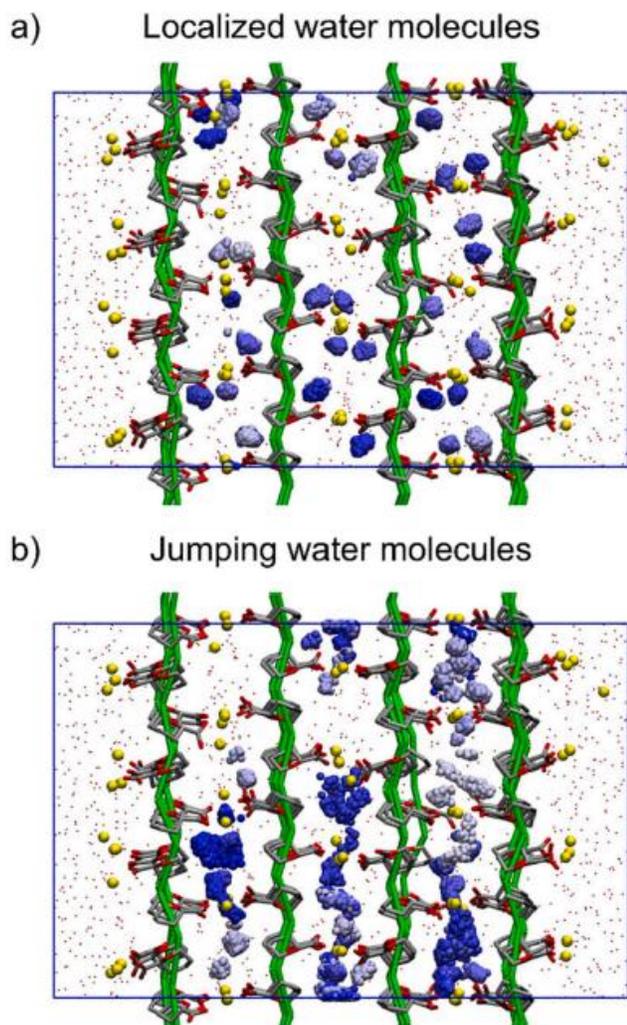
dynamics of their H—H vector (whose orientation with respect to the magnetic field governs the intramolecular NMR relaxation mechanism) is anisotropic (see Supplementary Video 2 in Supplementary Information) and exhibits an average correlation time ( $\sim 0.54 \cdot 10^{-9}$  s) much longer than that of bulk water ( $\tau_1^{\text{H}_2\text{O}} \approx 1.4 \cdot 10^{-12}$  s for the TIP3P water model (van der Spoel, van Maaren, & Berendsen, 1998)), which is very likely to induce a less efficient relaxation sink. A second pool of 24 molecules shows a translational dynamics characterized by jumps between at least two sites (see Supplementary Video 3 in Supplementary Information). The mean square displacements of these “jumping” water molecules at a correlation time of 0.1 μs range from  $0.3 \cdot 10^{-20}$  m<sup>2</sup> to  $15 \cdot 10^{-20}$  m<sup>2</sup>, with an average of  $7 \cdot 10^{-20}$  m<sup>2</sup>, which corresponds to an apparent self-diffusion coefficient  $D$  of  $3.5 \cdot 10^{-13}$  m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> or  $1.2 \cdot 10^{-13}$  m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, assuming either a 1D or a 3D Brownian diffusion ( $\text{MSD}(t) = 2 \cdot D \cdot t$  or  $\text{MSD}(t) = 6 \cdot D \cdot t$ ) (see Fig. S2b and S4a in Supplementary Information). These estimated values are about 2 to 7 times larger than those reported in Table 2 (about  $0.5 \cdot 10^{-13}$  m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> for both CaG and ZnG hydrogels). However, it must be pointed out that the simulation time is obviously too short to probe well enough the translational motions responsible for such a slow diffusion (a simulation time from 10 to 100 μs would probably be necessary for this purpose). Moreover, the recourse to the previous simple equations to estimate the relative or self-diffusion coefficients are questionable in the sense that the underlying hypotheses (hard sphere interaction or Brownian motion) may not be applicable inside the fibers. The rotational dynamics depends on the nature of explored sites (calcium cations, carboxylate and hydroxyl groups of polyGalA chains, etc.), which may imply a change in their local hydrogen bond network (see Fig. S3b and Supplementary Video 3 and Supplementary Video 4 in Supplementary Information). Accordingly, their average rotational correlation time is found about two times shorter than that of localized water molecules ( $\sim 0.25 \cdot 10^{-9}$  s), and much shorter than the correlation times determined from the NMRD profiles ( $1.5\text{--}2 \cdot 10^{-8}$  s, Table 2). Nonetheless, the molecular dynamics simulation performed reveals very heterogeneous translational and rotational dynamics of water molecules that span 3 to 5 orders of magnitude (Figs. S2, S4, and S5 in Supplementary Information) and which are strongly slowed down when water molecules hydrate calcium cations (“bound” state in Fig. S4 in Supplementary Information). Thus, it suggests that the translational and rotational components that emerge in the NMRD profiles of CaG and ZnG hydrogels may be partly ascribed to the slow dynamics of the structural water of the polymer.

In addition, the MD simulation clearly reveals an anisotropic rotation of the water molecules from the hydration shell of Ca<sup>2+</sup> that could not be a priori guessed from the relaxation profiles. Consequently, we refined the fit of the NMRD profiles by considering a uniaxial rotation of the hydration water molecules of the cation. To do so we considered the model developed by Woessner (1962), who calculated the relaxation rates of a rigid pair of coupled protons of a molecule moving like an ellipsoid in a continuous medium. In the general case, the relaxation rate is formulated as the composition of five correlation times:

$$R_1^{\text{H}_2\text{O}} = \frac{3}{20} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} \right)^2 \sum_{k=1}^5 C_k \tau_k \left( \frac{1}{1 + (2\pi\nu\tau_k)^2} + \frac{4}{1 + (4\pi\nu\tau_k)^2} \right) \quad (12)$$

The parameters  $C_k$  and  $\tau_k$  depend on the rotational diffusion constant along each axis of the ellipsoid and on the direction cosines of the internuclear vector with respect to these axes, but their expression is not simple and is reported in supplementary information.

In our particular case, where the dynamics of the internuclear vector would result from a rotation with respect to a single axis perpendicular to the internuclear vector (which is equivalent to a rotation of a disk-shaped ellipsoid where only one rotation with respect to the normal axis of the disk is considered) Eq. (12) is simplified to (see Supplementary Information):



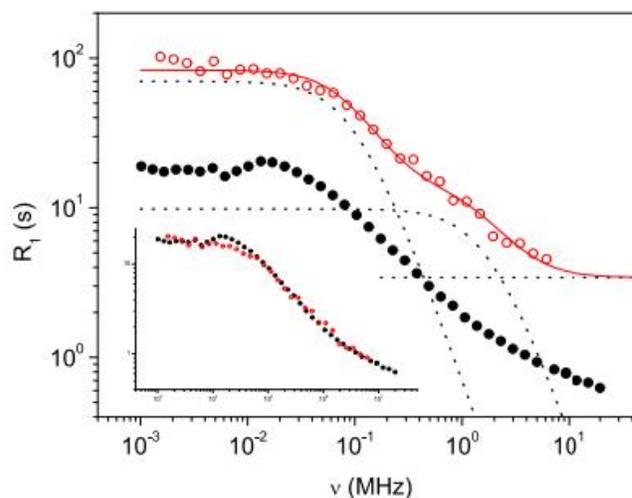
**Fig. 6.** Localized (a) and jumping (b) water molecules in a model polyGalA fiber composed of 16 GalA chains periodic along the Z axis in presence of 72 calcium ions, 16 chloride anions (for charge neutrality) and 1100 water molecules. Each cluster represents 1000 instantaneous positions of water oxygens sampled each ns over the 1- $\mu$ s-long MD simulation and is displayed in various blue colors depending on the water molecule index. For clarity, only the ring and carboxylate group atoms of polyGalA chains are represented, as well as thin green cylinders that link their glycosidic oxygens in the final sampled configuration ( $t = 1 \mu$ s). Calcium ions are shown as small yellow spheres and the oxygen atoms of other water molecules are displayed as red dots. The periodic simulation box is shown in blue.

$$R_1^{BMSD,normal} = C_n \left( \frac{\tau_n}{1 + (2\pi\nu\tau_n)^2} + \frac{4\tau_n}{1 + (4\pi\nu\tau_n)^2} \right) \quad (13)$$

with  $C_n = \frac{9}{40} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} \right)^2$  and  $\tau_n = 1/4R_n$ , where  $R_n$  is the rotational diffusion coefficients about the normal axis of the disk described by the internuclear vector rotation. It is obvious that the mathematical expression of a uniaxial rotational diffusion Eq. (13) is similar to the one of an isotropic rotational diffusion Eq. (2) and the refinement will produce an identical theoretical line, but with a dipolar constant scaled by a factor 3/4.

### 3.3. Deuteron NMRD profile

The deuteron NMRD profile of CaG (Fig. 7) allows for drawing a



**Fig. 7.** Profiles of deuterated ( $\circ$ ) and protonated ( $\bullet$ ) calcium gels. The frequency axis expresses the proton or the deuterium Larmor frequencies. The inset reports the two profiles after a 1/5 scaling of the deuterium profile. The red continuous line is the best fit of the deuterium profile, assuming two rotational diffusions. Dot curves represent the individual components of the fit, from top to bottom the two deuterium rotational diffusions and the bulk contribution (horizontal dot line).

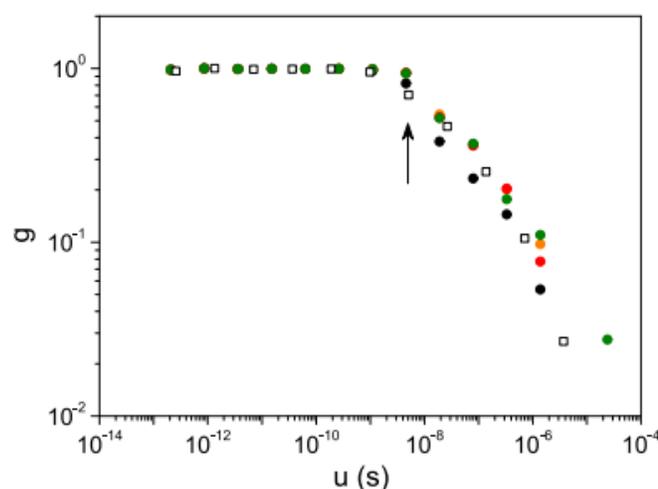
complementary picture. Deuteron relaxation is governed by quadrupole coupling to electric field gradient present at the nucleus position.

At a first glance, the strong similarity between the shape of the two profiles (the vertical shift of the profile of the deuterated sample is due to the very efficient quadrupolar relaxation of deuterium) may indicate no evidence of a translational dynamics of the water molecules (Abragam, 2007). Albeit the reasonable proton population measured in the fiber and the apparent diffusion constant extracted, a translational motion cannot explain the diffusion observed at low frequency (Fig. 3). Instead, a water dynamics at the surface of the fibers could be responsible for the relaxation mechanism observed. Indeed, deuteron relaxation has been remarkably used to model the water dynamics at the surface of proteins or porous materials (Kimmich & Weber, 1993; Stapf et al., 1995, 1996) and Fig. 7 clearly deserves a more detailed analysis.

### 3.4. Modeling of the NMRD profiles with a bulk mediated surface diffusion model

In the case of a water dynamics on the surface, the bulk mediated surface diffusion (BMSD) model was noteworthy used to extract typical lengths (4, 30, 208 nm) of the water displacement on the surface of various porous glasses (Stapf et al., 1996). This mechanism results from the movement of water molecules between different spots on the surface, where the rotational dynamics is restricted. These dynamics are characterized by very long correlation times (up to eight orders longer than in bulk liquids) as we observed ( $\sim 1.5 \cdot 10^{-6}$  s, Table 1 and Table 2). Identically to the description made by Stapf et al. (1996) we applied the BMSD model to the complete gel, to small (SM) and large mesh (LM) size domains, and to the partially dehydrated (PD) gel. The evaluated spatial correlation functions are reported in Fig. 8 and examples of time correlation functions (from MD and a NMRD profile) are represented in Fig. S7 (in Supplementary Information).

For all the samples, the spatial correlation function starts to show a loss of coherence at the inflection point situated at  $4.6 \cdot 10^{-9}$  s. Assuming an "adsorption depth" of roughly two water molecules ( $\sim 5.5 \cdot 10^{-10}$  m) and a diffusion coefficient of  $2.3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , a characteristic length of 19 nm is obtained. For comparison, the same calculation performed with the parameters used by Stapf et al. (1996):  $h = 8 \cdot 10^{-10}$  m,  $D = 1.6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  gives a distance of 11 nm. With a regard on independent



**Fig. 8.** Spatial correlation function  $g(u)$ , evaluated for the complete fresh calcium (CaG ●) and zinc gels (ZnG □). For the calcium gels, additional evaluations of  $g(u)$  issued from gels with distinct mesh sizes are also presented: a slice of the gel with a small mesh (SM) size (●), a large mesh (LM) size slice (●), and a partially dehydrated (PD) sample (●). The vertical arrow indicates the inflection point ( $\sim 4.6 \cdot 10^{-9}$  s).

studies, these distances are very reasonable: SANS experiments have shown that a minimum mesh size would be 7 nm (Maire du Poset et al., 2019) and the distribution of mesh size calculated from inversion of relaxation curve recorded at 20 MHz ranges from 10 to 40 nm (to be published). However, this result merits a more detailed discussion. (i) The two LM and SM slices and the partially dehydrated gel are expected to have different mesh sizes (around 10 nm for SM and 40 nm for LM) which does not appear on Fig. 8. If the distance extracted with the BSMD model is uniform within the gel and does not vary when the gel is partially dehydrated, it may be either associated with the diameter of the fibers (the water molecule would walk around the fiber), or the gel could be considered as uniform matrix (with a constant mesh size around 19 nm but with holes distributed in size along the diffusion direction. Besides, we may remark that the NMRD profiles have not been recorded at high magnetic field, (up to 35 MHz for the partially dehydrated gel) the adjunction of relation points at higher magnetic field should allow for a better resolution of the singularities of the curves of Fig. 8.

It has been shown by molecular dynamics that the probability density function of the residence times of adsorbed molecules  $\Psi_A$  in disordered and ultraconfining materials is expected to obey a statistic given by (Levitz, Korb, & Petit, 2003):

$$\Psi_A(t) = \frac{1}{t_A} e^{-\frac{t}{t_A}} \quad (15)$$

However, probability distributions (Fig. S6 in Supplementary Information) are best reproduced by power laws, suggesting a surface heterogeneity, a complex surface dynamics (Bousige, Levitz, & Coasne, 2021), or maybe the participation of the water molecules confined in the fibers. The calculated mean residence times are 904, 452, and 43 ps for the water molecules hydrating all the calcium atoms, hydrating only the surface calcium atoms, and hydrating the surface of the fiber respectively. These suggest a short residence time of the water molecules on the fiber surface (excluding calcium sites) and a long residence time of the water molecules hydrating the linking calcium atoms inside the fibers.

Eventually, an additional consideration can be mentioned. The deuterium NMRD profile mimics very well the proton profiles and similarly it cannot be fitted with a single rotational contribution, Fig. 7 shows in continuous red line the best fit obtained with two rotational

contributions. The relaxation rate of the bulk is found as  $3.4 \text{ s}^{-1}$ , and the two rotational correlation times are  $1.0(1) \cdot 10^{-6}$  and  $6(3) \cdot 10^{-8}$  s. (see Supplementary Information). Shamshir, Sparrman, and Westlund (2020) have analyzed similar deuterium profiles for acetonitrile obtained in several silica porous systems. They found that the residence time of acetonitrile at a flat surface of the pores is  $< 100$  ps, too short to consider Levy-walks at the surface. They explained the NMR profile by the presence of few  $\beta$  sites considered as small cylindrical cavities at the pores surface in which the residence time of acetonitrile is in the range of 0.2–2 ms. This analysis could be extended to our system for which the two slow rotation populations extracted from the  $^2\text{H}$  NMRD profile could be associated with the two types of water molecules described in the molecular dynamics simulation section. The interior of the fiber would play the role of  $\beta$  sites. Assuming a  $^2\text{H}$  quadrupolar coupling constant of 220 kHz (Franks, 1972) and an asymmetry parameter of 1, the two sites would correspond to  $< 1\%$  of the total number of heavy water molecules present in the gel and population ratio of the two site is close to 1:2 (Table S1 in Supplementary Information) in agreement with the  $N_H$  calculation reported in Table 2.

#### 4. Conclusion

The dynamics of the water molecules present in calcium and zinc polygalacturonate hydrogels were measured by FFC NMR relaxometry and confronted to several dynamic models. A first model considers rotation and translation of water molecules in the fibers and suggests small apparent diffusion coefficients ( $\sim 5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) corresponding to those typically found in polymers. Consistently, the rotational correlation times are about 4 orders of magnitude longer than in bulk water ( $\sim 10^{-8}$  s vs  $\sim 10^{-12}$  s). The molecular dynamics simulation identified two types of water molecules inside the fibers with slow and highly anisotropic dynamics. The deuterium NMRD profile questions the first model. A second model may be considered: a Levi-walk on the surface of the fiber. It suggested a characteristic displacement of water molecules on the fiber surface close to 19 nm but independent of the gel heterogeneity. Eventually, a close inspection of the deuterium NMRD profile reveals that it is composed of two rotational diffusions. The two types of water molecules inside the fiber (referred as localized and jumping molecules in the molecular dynamics section) could be at the origin of the NMRD profile observed. In that case, no translation is necessary to reproduce the profiles. Further numerical and NMR experiments may be necessary to decide what type of dynamics is governing the NMRD profiles (surface relaxation as in the BSMD model or contribution from water molecules present in the fibers), but all results unambiguously converged toward a very slow water dynamics probed by FFC relaxometry.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120093>.

#### CRedit authorship contribution statement

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Philippe R. Bodart performed the NMR experiments, NMRD profile simulation, wrote the original draft preparation and review the draft.

Pierre Fouilloux synthesized the gels and performed the NMR experiments.

Adam Rachocki performed the NMR experiments.

Adrien Lerbret performed molecular dynamical calculations, wrote the original draft preparation, review the draft.

Thomas Karbowiak contributed to materials and analysis tools.

Ali Assifaoui wrote the original draft preparation and review the draft.

## Funding

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne Franche Comté and the “Fonds Européen de Développement Régional” (FEDER).

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

Authors are grateful to COST Action CA15209 European Network on NMR Relaxometry (EURELAX). MD simulations were performed using HPC resources from DNUM-CCUB (Université de Bourgogne). The authors thank the DIVVA platform (Institut Agro Dijon, Université Bourgogne-Franche-Comté) for the access to the Stelar SPINMASTER DUO FFC NMR relaxomete.

The authors are grateful to a reviewer for his very helpful comments regarding the interpretation of the measurements.

## References

- Abragam, A. (2007). *The principles of nuclear magnetism (Reprinted)*. Oxford Univ. Press.
- Abragam, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Anoardo, E., Galli, G., & Ferrante, G. (2001). Fast-field-cycling NMR: Applications and instrumentation. *Applied Magnetic Resonance*, 20(3), 365–404.
- Assifaoui, A., Chambin, O., & Cayot, P. (2011). Drug release from calcium and zinc pectinate beads: Impact of dissolution medium composition. *Carbohydrate Polymers*, 85(2), 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.037>
- Assifaoui, A., Lerbret, A., Huynh, H. T. D., Neiers, F., Chambin, O., Loupica, C., & Cousin, F. (2015). Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in the presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ): A process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit. *Soft Matter*, 11(3), 551–560. <https://doi.org/10.1039/C4SM01839G>
- Ayant, Y., Belorizky, E., Aluzon, J., & Gallice, J. (1975). Calcul des densités spectrales résultant d'un mouvement aléatoire de translation en relaxation par interaction dipolaire magnétique dans les liquides. *Journal de Physique*, 36(10), 991–1004. <https://doi.org/10.1051/jphys:019750036010099100>
- Barbieri, R., Quaglia, M., Delfini, M., & Brosio, E. (1998). Investigation of water dynamic behaviour in poly(HEMA) and poly(HEMA-co-DHPMA) hydrogels by proton T2 relaxation time and self-diffusion coefficient n.m.r. Measurements. *Polymer*, 39(5), 1059–1066. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00403-5)
- Bloembergen, N., Purcell, E. M., & Pound, R. V. (1948). Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Physical Review*, 73(7), 679.
- Borgogna, M., Skjåk-Bræk, G., Paoletti, S., & Donati, I. (2013). On the initial binding of alginate by calcium ions. The tilted egg-box hypothesis. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(24), 7277–7282. <https://doi.org/10.1021/jp4030766>
- Bousige, C., Levitz, P., & Coasne, B. (2021). Bridging scales in disordered porous media by mapping molecular dynamics onto intermittent brownian motion. *Nature Communications*, 12(1), 1043. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21252-x>
- Braccini, L., & Pérez, S. (2001). Molecular basis of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089–1096. <https://doi.org/10.1021/bm010008g>
- Bychuk, O. V., & O'Shaughnessy, B. (1994). Anomalous surface diffusion: A numerical study. *The Journal of Chemical Physics*, 101(11), 772–780. <https://doi.org/10.1063/1.468132>
- Bychuk, O. V., & O'Shaughnessy, B. (1995). Anomalous diffusion at liquid surfaces. *Physical Review Letters*, 74(10), 1795–1798. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.74.1795>
- Chen, X. (2019). A new model in correlating and calculating the diffusion-coefficient of electrolyte aqueous solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 6.
- Chui, M. M., Phillips, R. J., & McCarthy, M. J. (1995). Measurement of the porous microstructure of hydrogels by nuclear magnetic resonance. *Journal of Colloid and Interface Science*, 174(2), 336–344. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1399>
- Das, D., & Pal, S. (2015). Modified biopolymer-dextrin based crosslinked hydrogels Application in controlled drug delivery. *RSC Advances*, 5(32), 25014–25050. <https://doi.org/10.1039/C4RA16103C>
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(19), 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- Fläming, M., Hofmann, M., Lichtinger, A., & Rössler, E. A. (2019). Application of proton field-cycling NMR relaxometry for studying translational diffusion in simple liquids and polymer melts. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 57(10), 805–817. <https://doi.org/10.1002/mrc.4823>
- Franks, F. (1972). *The physics and physical chemistry of water*. New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8334-5>
- Gould, R. O., & Rankin, A. F. (1970). Calcium complexes of uronic acid monomers. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 8, 489. <https://doi.org/10.1039/c29700000489>
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7)
- Guench, O., Greene, S. N., Kamath, G., Brady, J. W., Venable, R. M., Pastor, R. W., & Mackerell, A. D. (2008). Additive empirical force field for hexopyranose monosaccharides. *Journal of Computational Chemistry*, 29(15), 2543–2564. <https://doi.org/10.1002/jcc.21004>
- Guench, O., Hatcher, E., Venable, R. M., Pastor, R. W., & Mackerell, A. D. (2009). CHARMM additive all-atom force field for glycosidic linkages between hexopyranoses. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(9), 2353–2370. <https://doi.org/10.1021/ct900242e>
- Guench, O., Mallajosyula, S. S., Raman, E. P., Hatcher, E., Vanommeslaeghe, K., Foster, T. J., Jamison, F. W., & Mackerell, A. D. (2011). CHARMM additive all-atom force field for carbohydrate derivatives and its utility in polysaccharide and carbohydrate-protein modeling. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(10), 3162–3180. <https://doi.org/10.1021/ct200328p>
- Hadjiev, N. A., & Amsden, B. G. (2015). An assessment of the ability of the obstruction-scaling model to estimate solute diffusion coefficients in hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 199, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.010>
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINC: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
- Heumann, A., Assifaoui, A., Da Silva Barreira, D., Thomas, C., Briandet, R., Laurent, J., Beney, L., Lapaquette, P., Guzzo, J., & Rieu, A. (2020). Intestinal release of biofilm-like microcolonies encased in calcium-pectinate beads increases probiotic properties of lactocaseibacillus paracasei. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 44. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00159-3>
- Hills, B. P., Cano, C., & Belton, P. S. (1991). Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems. *Macromolecules*, 24(10), 2944–2950. <https://doi.org/10.1021/ma00010a047>
- Holz, M., Heil, S. R., & Sacco, A. (2000). Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate 1H NMR PFG measurements. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(20), 4740–4742. <https://doi.org/10.1039/b005319h>
- Huynh, U. T. D., Lerbret, A., Neiers, F., Chambin, O., & Assifaoui, A. (2016). Binding of divalent cations to polygalacturonate: A mechanism driven by the hydration water. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(5), 1021–1032. <https://doi.org/10.1021/acs.jpbc.5b11010>
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Karbowiak, T., Hervet, H., Léger, L., Champion, D., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2006). Effect of plasticizers (Water and Glycerol) on the diffusion of a small molecule in iota-carrageenan biopolymer films for edible coating application. *Biomacromolecules*, 7(6), 2011–2019. <https://doi.org/10.1021/bm060179r>
- Kärger, J., Avramovska, M., Freude, D., Haase, J., Hwang, S., & Valiullin, R. (2021). Pulsed field gradient NMR diffusion measurement in nanoporous materials. *Adsorption*, 27(3), 453–484. <https://doi.org/10.1007/s10450-020-00290-9>
- Kimmich, R., & Anoardo, E. (2004). Field-cycling NMR relaxometry. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 44(3–4), 257–320. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2004.03.002>
- Kimmich, R., & Fatkullin, N. (2017). Self-diffusion studies by intra- and inter-molecular spin-lattice relaxometry using field-cycling: Liquids, plastic crystals, porous media, and polymer segments. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 101, 18–50. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.04.001>
- Kimmich, R., & Weber, H. W. (1993). NMR relaxation and the orientational structure factor. *Physical Review B*, 47(18), 11788–11794. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.47.11788>
- Kowalewski, J., & Mäler, L. (2018). *Nuclear spin relaxation in liquids: Theory, experiments and applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Kruk, D. (2016). *Understanding spin dynamics*. Pan Stanford Publishing.
- Kruk, D., Florek-Wojciechowska, M., Masiewicz, E., Oztop, M., Ploch-Jankowska, A., Duda, P., & Wilczynski, S. (2021). Water mobility in cheese by means of nuclear magnetic resonance relaxometry. *Journal of Food Engineering*, 298, Article 110483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110483>
- Kruk, D., Florek-Wojciechowska, M., Oztop, M., Ilhan, E., & Wiczorek, Z. (2021). Water dynamics in eggs by means of nuclear magnetic resonance relaxometry. *Journal of Magnetic Resonance*, 327, Article 106976. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2021.106976>
- Levitz, P., Korb, J. P., & Petit, D. (2003). Slow dynamics of embedded fluid in mesoscopic confining systems as probed by NMR relaxometry. *The European Physical Journal E*, 12(1), 29–33. <https://doi.org/10.1140/epje/i200310046-2>

- Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- Lopez-Sanchez, P., Martinez-Sanz, M., Bonilla, M. R., Wang, D., Gilbert, E. P., Stokes, J. R., & Gidley, M. J. (2017). Cellulose-pectin composite hydrogels: Intermolecular interactions and material properties depend on order of assembly. *Carbohydrate Polymers*, 162, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.049>
- Lopez-Sanchez, P., Schuster, E., Wang, D., Gidley, M. J., & Strom, A. (2015). Diffusion of macromolecules in self-assembled cellulose/hemicellulose hydrogels. *Soft Matter*, 11(20), 4002–4010. <https://doi.org/10.1039/C5SM00103J>
- Lorén, N., Hagman, J., Jonasson, J. K., Deschout, H., Bernin, D., Cella-Zanacchi, F., Diaspro, A., McNally, J. G., Ameloot, M., Smisdom, N., Nydén, M., Hermansson, A.-M., Rudemo, M., & Braeckmans, K. (2015). Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: Putting theory into practice. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 48(3), 323–387. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000013>
- Maire du Poset, A., Börjesson, M., Rameau, C., Madeleine-Perdrillat, C., Lerbret, A., Loupiac, C., Cousin, F., & Assifaoui, A. (2020). Controlled loading and release of Beta-lactoglobulin in calcium-polygalacturonate hydrogels. *Biomacromolecules*, 21(4), 1417–1426. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01722>
- Maire du Poset, A., Lerbret, A., Boué, F., Zitolo, A., Assifaoui, A., & Cousin, F. (2019). Tuning the structure of galacturonate hydrogels: External gelation by Ca, Zn, or Fe cationic cross-linkers. *Biomacromolecules*, 20(7), 2864–2872. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00726>
- Maire du Poset, A., Lerbret, A., Zitolo, A., Cousin, F., & Assifaoui, A. (2018). Design of polygalacturonate hydrogels using iron(II) as cross-linkers: A promising route to protect bioavailable iron against oxidation. *Carbohydrate Polymers*, 188, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.007>
- Maire du Poset, A., Zitolo, A., Cousin, F., Assifaoui, A., & Lerbret, A. (2020). Evidence for an egg-box-like structure in iron(ii)-polygalacturonate hydrogels: A combined EXAFS and molecular dynamics simulation study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(5), 2963–2977. <https://doi.org/10.1039/C9CP04065J>
- Marchand, S., & Roux, B. (1998). Molecular dynamics study of calbindin D9k in the apo and singly and doubly calcium-loaded states. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 33(2), 265–284. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199811\)10:33:2-265::AID-PROT10>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199811)10:33:2-265::AID-PROT10>3.0.CO;2-I)
- Mark, P., & Nilsson, L. (2001). Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>
- Matricardi, P., Di Meo, C., Coviello, T., Hennink, W. E., & Alhaique, F. (2013). Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1172–1187. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.04.002>
- Mills, R. (1973). Self-diffusion in normal and heavy water in the range 1–45.Deg. *The Journal of Physical Chemistry*, 77(5), 685–688. <https://doi.org/10.1021/j100624a025>
- Miyamoto, S., & Kollman, P. A. (1992). Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8), 952–962. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>
- March, Y. A., Donati, L., Strand, B. L., & Skjåk-Bræk, G. (2006). Effect of  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ , and  $Sr^{2+}$  on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, 7(5), 1471–1480. <https://doi.org/10.1021/bm060010d>
- Noack, F. (1986). NMR field-cycling spectroscopy: Principles and applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 18(3), 171–276. [https://doi.org/10.1016/0079-6565\(86\)80004-8](https://doi.org/10.1016/0079-6565(86)80004-8)
- Pilař, J., Křif, J., Meissner, B., Kadlec, P., & Prádný, M. (2009). Effect of structure of HEMA–DEGMA hydrogel matrix on diffusion coefficients of PEG tracers. Variation of hydrogel crosslink density by change of polymer concentration. *Polymer*, 50(19), 4543–4551. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.07.046>
- Pocan, P., İlhan, E., Florek-Wojciechowska, M., Masiewicz, E., Kruk, D., & Oztop, M. H. (2021). Exploring the water mobility in gelatin based soft candies by means of fast field cycling (FFC) nuclear magnetic resonance relaxometry. *Journal of Food Engineering*, 294, Article 110422. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110422>
- Pocan, P., Knapkiewicz, M., Rachocki, A., & Oztop, M. H. (2021). Detection of authenticity and quality of the turkish delights (Lokum) by means of conventional and fast field cycling nuclear magnetic resonance relaxometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00943>. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00943>
- Sandrin, D., Wagner, D., Sitta, C. E., Thoma, R., Felekyan, S., Hermes, H. E., Janiak, C., de Sousa Amadeu, N., Kühnemuth, R., Löwen, H., Egelhaaf, S. U., & Seidel, C. A. M. (2016). Diffusion of macromolecules in a polymer hydrogel: From microscopic to macroscopic scales. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(18), 12860–12876. <https://doi.org/10.1039/C5CP07781H>
- Schwiderke, E. E., & di Sarli, A. R. (1986). A mathematical basis for calculating the water permeability of organic films supported by metal substrates. *Progress in Organic Coatings*, 14(3), 297–308. [https://doi.org/10.1016/0033-0655\(86\)80004-8](https://doi.org/10.1016/0033-0655(86)80004-8)
- Shamshir, A., Sparman, T., & Westlund, P.-O. (2020). Analysis of the behaviour of confined molecules using 2 HT 1 nuclear magnetic relaxation dispersion. *Molecular Physics*, 118(6), Article e1645367. <https://doi.org/10.1080/00268976.2019.1645367>
- Skjåk-Bræk, G., Grasdalen, H., & Smidsrød, O. (1989). Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydrate Polymers*, 10(1), 31–54. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(89\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(89)90030-1)
- Stapf, S., Kimmich, R., & Seitter, R.-O. (1995). Proton and deuteron field-cycling NMR relaxometry of liquids in porous glasses: Evidence for Levy-walk statistics. *Physical Review Letters*, 75(15), 2855–2858. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.2855>
- Stapf, S., Kimmich, R., & Seitter, R.-O. (1996). Field-cycling NMR relaxometry of liquids confined in porous glass: Evidence for levy-walks. *Magnetic Resonance Imaging*, 14(7–8), 841–846. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(96\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(96)00213-5)
- Ström, A., Ribelles, P., Lundin, L., Norton, I., Morris, E. R., & Williams, M. A. K. (2007). Influence of pectin fine structure on the mechanical properties of Calcium–Pectin and Acid–Pectin gels. *Biomacromolecules*, 8(9), 2668–2674. <https://doi.org/10.1021/bm070192r>
- Tian, Y., Du, E., Abdelmola, F., Qiang, Y., & Carlsson, L. A. (2020). Rapid characterization of water diffusion in polymer specimens using a droplet-based method. *Langmuir*, 36(26), 7309–7314. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00727>
- Tokuyama, H., Nakahata, Y., & Ban, T. (2020). Diffusion coefficient of solute in heterogeneous and macroporous hydrogels and its correlation with the effective crosslinking density. *Journal of Membrane Science*, 595, Article 117533. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117533>
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- van der Spoel, D., van Maaren, P. J., & Berendsen, H. J. C. (1998). A systematic study of water models for molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field. *The Journal of Chemical Physics*, 108(24), 10220–10230. <https://doi.org/10.1063/1.476482>
- Ventura, I., Jammal, J., & Bianco-Peled, H. (2013). Insights into the nanostructure of low-methoxyl pectin–calcium gels. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 650–658. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.055>
- Wende, F. J., Xue, Y., Nestor, G., Öhrlund, Å., & Sandström, C. (2020). Relaxation and diffusion of water protons in BDDE cross-linked hyaluronic acid hydrogels investigated by NMR spectroscopy—Comparison with physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 248, Article 116768. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116768>
- Woessner, D. E. (1962). Nuclear spin relaxation in ellipsoids undergoing rotational brownian motion. *The Journal of Chemical Physics*, 37(3), 647–654. <https://doi.org/10.1063/1.1701390>
- Yang, C., Xing, X., Li, Z., & Zhang, S. (2020). A comprehensive review on water diffusion in polymers focusing on the polymer-metal interface combination. *Polymers*, 12(1), 138. <https://doi.org/10.3390/polym12010138>

## Supporting Information for:

# Probing the slow water dynamics in polygalacturonate hydrogels by NMR relaxometry

**Philippe R. Bodart<sup>a,\*</sup>, Pierre Fouilloux<sup>a</sup>, Adam Rachocki<sup>c</sup>, Adrien Lerbret<sup>a</sup>, Thomas Karbowski<sup>a</sup>, and Ali Assifaoui<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Univ. Bourgogne Franche-Comté, Institut Agro, UMR PAM A02.102, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

<sup>c</sup> Institute of Molecular Physics, Polish Academy of Sciences, M. Smoluchowskiego 17, 60-179 Poznań, Poland.

## MD simulation of a model Ca-polyGalA fiber

### Building of a model fiber

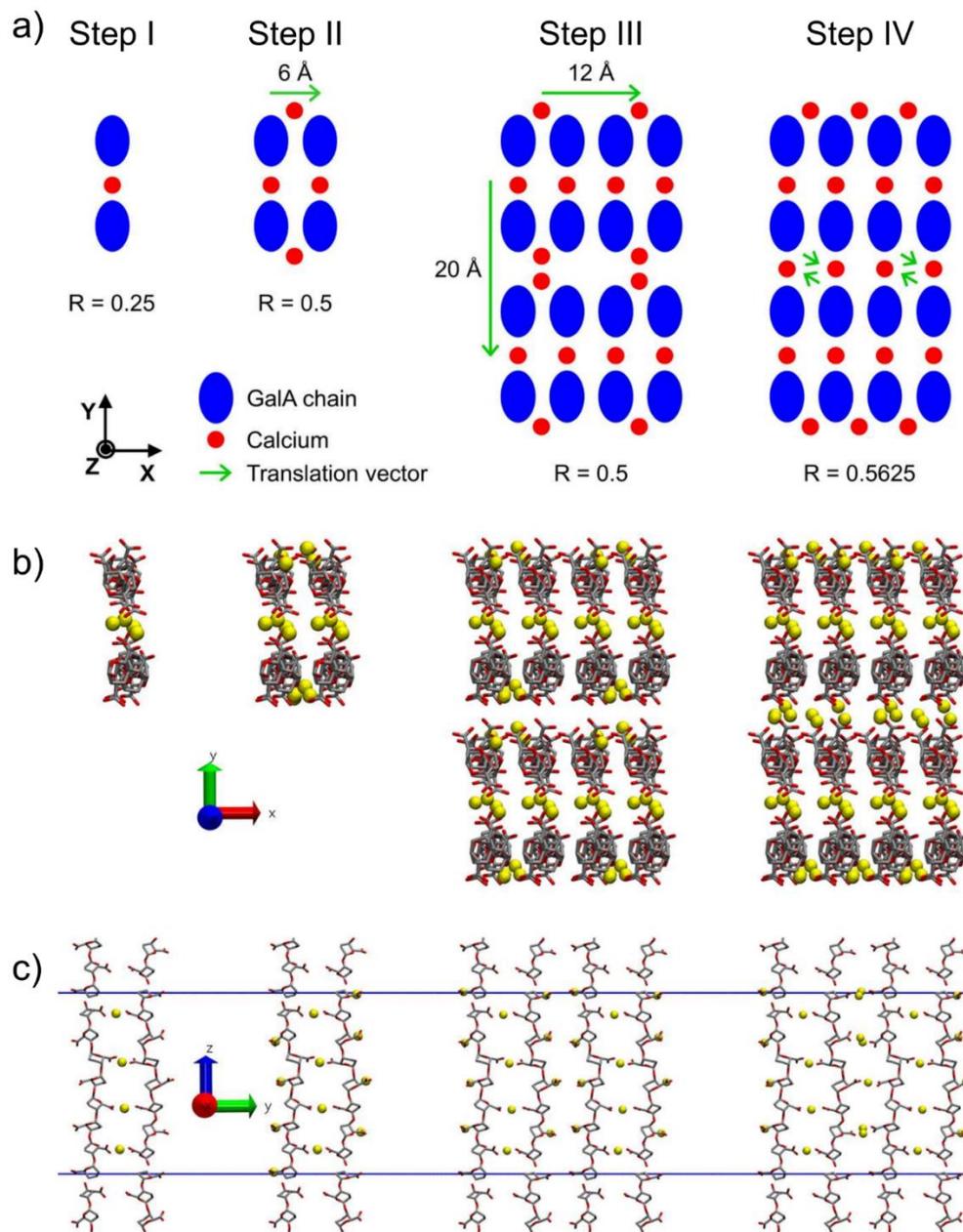


Fig. S19. a) Schematic representation of the four main steps used to build a model polyGalA fiber. A pair of octameric GalA chains periodic along the Z axis in an “egg-box”-like configuration was first built in a similar way as in our previous studies (Assifaoui et al., 2015b; Maire du Poset et al., 2020b) and simulated for a few ns (step I). This GalA dimer and its bound  $\text{Ca}^{2+}$  cations were duplicated and translated along the X axis by 6 Å, and 8 calcium cations were added to make bridges between adjacent unbridged GalA chains (step II). Next, the tetramer of GalA chains was replicated three times with translation vectors of (12 Å, 0, 0), (0, 20 Å, 0), and (12 Å, 20 Å, 0), respectively (step III). Finally, some  $\text{Ca}^{2+}$  cations were translated so as to form bridges between GalA chains across the (Z,X) plane, and 8

Ca<sup>2+</sup> were added to bridge GalA chains across the (Z,Y) plane (step IV). The configurations used to build the model fiber are shown along the (X,Y) and the (Y,Z) planes in (b) and (c), respectively. For clarity, only the heavy atoms from GalA rings, carboxylate groups, and glycosidic linkages are displayed, as well as calcium cations (yellow spheres). The horizontal blue lines in (c) depict the periodicity of GalA chains along the Z axis.

### *Analysis of water dynamics*

As a means to identify water molecules with low mobility, we first determined the displacement of each water molecule,  $|\Delta r(t)| = |r(t+\Delta\tau) - r(t)|$ , where  $r(t)$  is the position vector of the water oxygen at time  $t$  and  $\Delta\tau$  an arbitrary time lag set to 1 ns. Figure S2 evidence that water molecules may exhibit very distinct dynamics. We defined as “localized” water molecules whose displacement remains systematically lower than 2 Å over the whole simulation trajectory and as “jumping” water molecules whose displacement remains (i) systematically lower than 7 Å, (ii) lower than 2 Å for at least 5 % of the simulation time, and (iii) between 2 and 7 Å for at least 1 % of the simulation time (this last criterion ensures that a sufficiently high number of jumps and/or sufficiently long residence times in distinct locations are sampled). The dynamics of these two types of water molecules are much slower than those of water molecules that either do not bind to the polyGalA fiber for most of the simulation trajectory or exchange several times with bulk water (referred to as “Unbound” and “Bound/Unbound” in Fig. S2). Among the 1100 water molecules in the simulation box, 46 and 24 water molecules fulfill the two above defined categories, and examples of such water molecules are shown in Fig. S3. Then, we determined the mean square displacement (MSD) of each water molecule as  $MSD = \langle |r(t) - r(0)|^2 \rangle$ , where the brackets mean averaging over every time origin of the MD simulation. As expected, the MSD of localized water molecules remains almost constant, at a very low value, over the simulation time, whereas the MSD of water molecules that jump between sites within the polyGalA fiber increase after an initial low-value plateau, whose length corresponds to the average residence time in sampled sites. Fig. S2 suggests that the MSD of

water molecules decreases when the overall binding time of water molecules to the polyGalA fiber increases. To confirm this observation, we assumed that water molecules may exist in only two states at a given simulation time: either in the first coordination shell of calcium cations (when the Ca-O<sub>w</sub> distance is lower than 3.1 Å, state I) or not (when the Ca-O<sub>w</sub> distance is greater or equal to 3.1 Å state II). Because water molecules may experience continual exchanges between these two states over the simulation time, we determined the time intervals of the trajectory where each water molecule stayed continuously in one of these two states, except for brief excursions of duration less than 5 ps. The state-dependent MSD may then be computed as:

$$MSD(t) = \frac{1}{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{n(i)} \tau_{\max(i,j)}} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{n(i)} \sum_{\tau=1}^{\tau_{\max(i,j)}} \left( r_{i,j}(t + \tau) - r_{i,j}(\tau) \right)^2 \quad (S1)$$

where  $r_{i,j}$  is the position vector of the oxygen of water molecule  $i$  over the time interval  $j$ ,  $N$  is the total number of water molecules that experience a given state during the simulation,  $n(i)$  is the number of time intervals of the water molecule  $i$  whose length is equal or larger than  $t$ , so that the molecule  $i$  can contribute to the computation of MSD at time  $t$ , and  $\tau_{\max(i,j)}$  denotes the maximum number of time origins used to compute the MSD for the  $j$ th time interval of the molecule  $i$ . Eq. (S1) is very similar to Eq. (3) in (Lerbret et al., 2011), which was successfully used to compute the longitudinal MSD of water confined in MCM-41 mesopores.

As anticipated, the MSD of water molecules remains very low ( $< \sim 4 \text{ \AA}^2$ ) in the bound state (I), while it exhibits an almost Fickian behavior ( $MSD \sim 6.D.t^n$ ,  $D = 1.0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ ,  $n = 0.95$ ) in the “unbound” state (II). These results imply that the MSD of water molecules depend on the fraction of time they spend in these two states: the longer the time spent in the “bound” state, the lower the MSD. However, it must be pointed out that a small fraction of water molecules in the “unbound” state exhibit very low mobilities and actually belong to the “localized” water molecules defined above. They are usually found in the second coordination shell of calcium cations and form multiple hydrogen bonds with carboxylate

and/or hydroxyl groups of polyGalA chains (see Fig. S3a and video V1\_localized\_water\_dipole\_vector). Furthermore, the distribution of residence times of water molecules in the first coordination shell of calcium cations spans the full simulation time scale (from 1 ps up to 1  $\mu$ s, with an average of 0.9 ns, Figure S3b), which corroborates the very heterogeneous dynamics of water molecules observed in Fig. S2. Such a heterogeneous dynamics is further illustrated in Fig. S5, which shows the following individual time autocorrelation functions (ACF) of all water molecules from the simulation box: (i) oxygen mean-square displacement,  $\langle |r(t)-r(0)|^2 \rangle$  (Fig. S4a), (ii) dipole vector,  $\mu$ ,  $\langle \mu(t) \cdot \mu(0) \rangle$  (Fig. S4b), and H-H vector,  $v$ ,  $\langle v(t) \cdot v(0) \rangle$  (Fig. S4c), where the brackets represent averaging over every time origin of the MD simulation. The translational relaxation time of a given water molecule was defined as the time needed for the MSD to reach a threshold value of 7.5  $\text{\AA}^2$ , which corresponds approximately to the square of the first main peak position of the water oxygen radial distribution function,  $g_{O-O}(r)$  in bulk TIP3P water ( $\approx 2.75 \text{\AA}$  (van der Spoel et al., 1998b)). Moreover, the dipole and H-H vector reorientational relaxation times were defined as the times at which the corresponding ACF have decayed by a factor  $e^{-1}$ . For representation purposes in Fig. S5, the relaxation time of a given water molecule was assumed to be 1  $\mu$ s (that is, the simulation time length) in case where the ACF does not reach the corresponding threshold criterion (7.5  $\text{\AA}^2$  for MSD and  $e^{-1}$  for dipole and H-H vector ACF). The distributions of relaxation times for the three computed time ACF are shown in the right panels of Fig. S5 (d-f). 55 and 59 water molecules do not exhibit translational and/or dipole reorientational relaxation, respectively, over the simulation time scale (the 46 “localized” water molecules represent 84 % and 78 %, respectively, of such water molecules). Interestingly, the reorientational relaxation times of the H-H vector are much shorter than those of the water dipole vector, whereas the corresponding relaxation times for bulk water at 300 K are rather similar ( $\tau_1^{HH} \approx 1.4$  ps and  $\tau_1^{\mu} \approx 1.8$  ps for the TIP3P water model with a reaction field permittivity,  $\epsilon_{rf}$ , of 78.5 (van der Spoel et al., 1998b)). This result underlines the strong decoupling of translational and rotational dynamics.

Overall, the present analysis reveals the existence of structural water molecules with very slow dynamics that may account for the translational and rotational relaxation components observed in the NMRD profiles of CaG and ZnG hydrogels (Fig. 3 of the main manuscript).

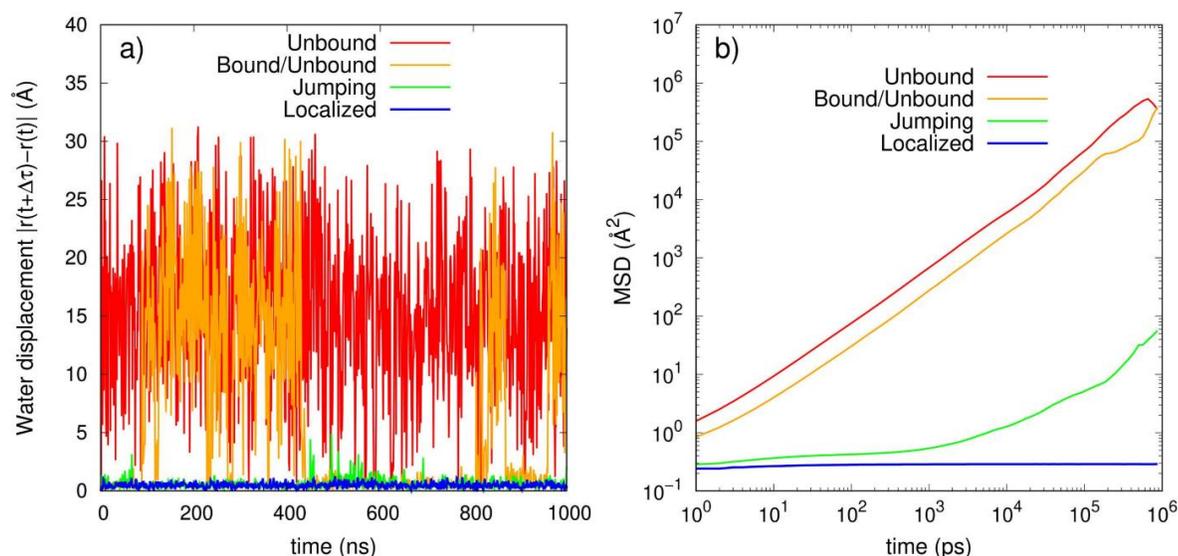


Fig. S20. a) Time dependences of the oxygen displacement of four selected water molecules that exhibit very distinct dynamics, which we referred to as “Unbound” (large displacement over almost the whole simulation time), “Bound/Unbound” (both large and low displacements for significant time periods), “Jumping” (very low ( $< 2$  Å) and low displacement ( $\geq 2$  Å and  $< 7$  Å)), and “Localized” (very low ( $< 2$  Å) displacement). The corresponding time-dependences of their mean-square displacement (MSD) are shown in (b).

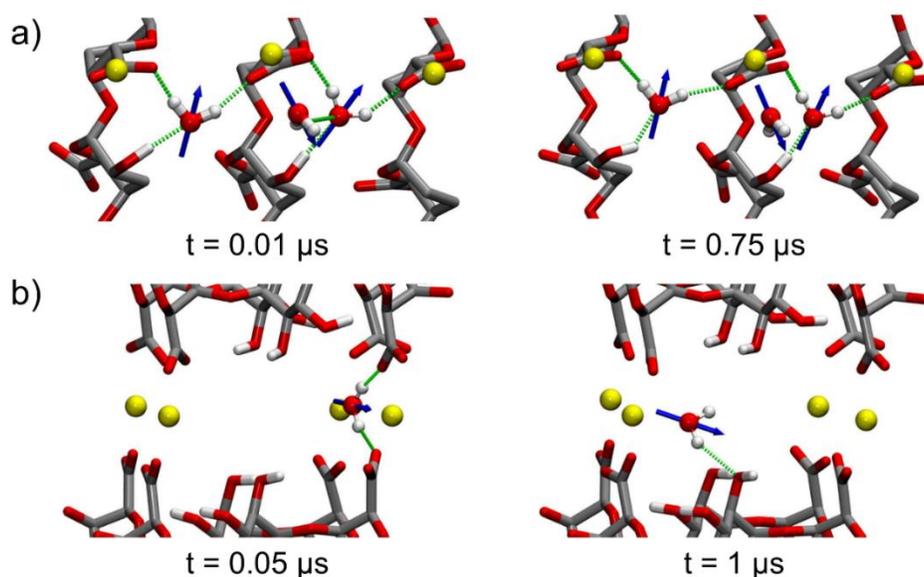


Fig. S3. Snapshots of three localized (a) and one jumping (b) water molecules taken from the MD simulation of the model Ca-GalA fiber. For clarity, only neighboring GalA units and calcium cations are

shown. Hydrogen bonds are displayed as green dashed lines and the dipole vector of water molecules are represented as blue arrows. Snapshots were taken either at the beginning or in the last part of the simulation trajectory to point out any change of position and/or orientation of water molecules over a time scale of several hundreds of ns. The full trajectories of these water molecules are displayed in videos V1\_localized\_water\_dipole\_vector and V3\_jumping\_water\_dipole\_vector).

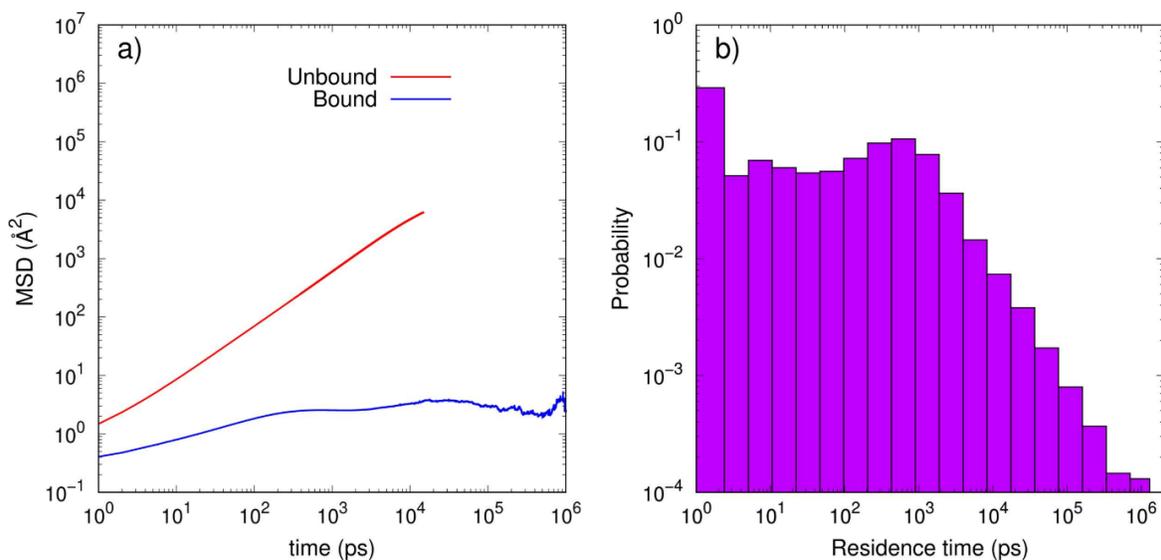
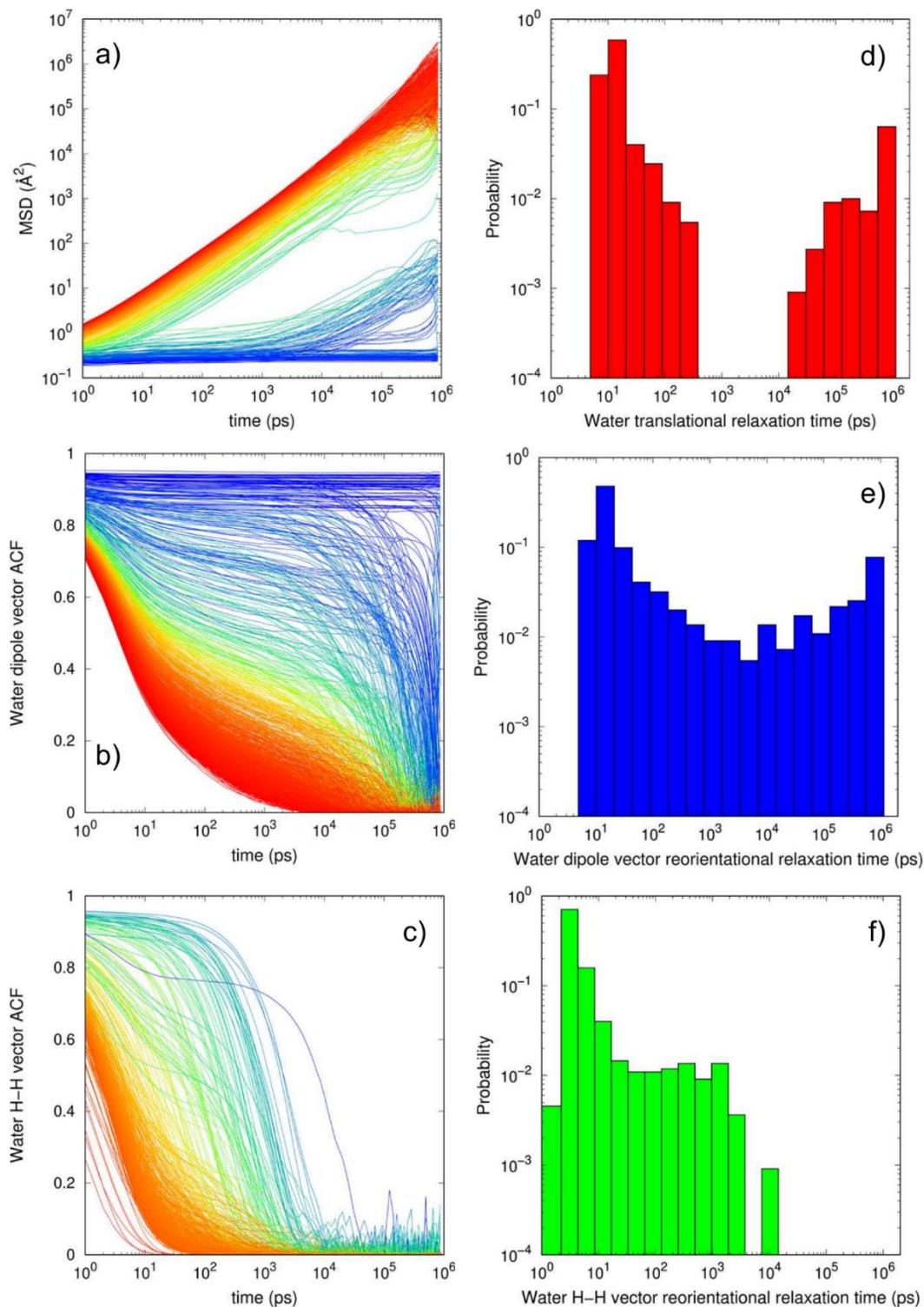
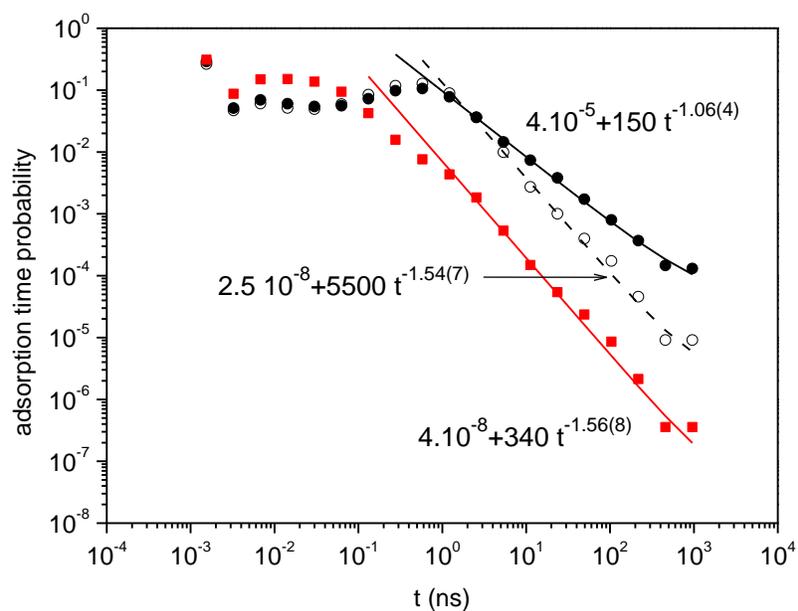


Fig. S4. a) Time dependences of the oxygen mean-square displacement (MSD) of water molecules in the “unbound” ( $\text{Ca-O}_w$  distance  $\geq 3.1$  Å) and “bound” states ( $\text{Ca-O}_w$  distance  $< 3.1$  Å). MSD data for the “unbound” state at times larger than 15 ns are not shown owing to poor statistics (few water molecules remain continuously “unbound” for longer times). b) Distribution of residence times of water molecules in the “bound” state.

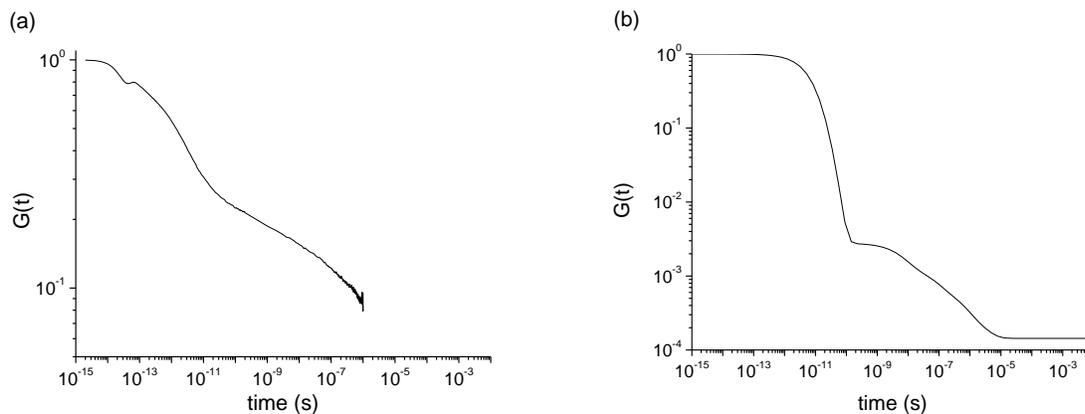


**Fig. S5.** Left panels: Individual time autocorrelation functions (ACF) of all water molecules from the simulated system: a) oxygen mean-square displacement,  $\langle |r(t) - r(0)|^2 \rangle$ , b) dipole vector,  $\mu$ ,  $\langle \mu(t) \cdot \mu(0) \rangle$ , and c) H-H vector,  $v$ ,  $\langle v(t) \cdot v(0) \rangle$ . Right panels: The corresponding distributions of relaxation times are shown in d), e), and f), respectively.



**Fig. S6 Probabilities of residence times of water molecules. (■) all water molecules at the surface of the fibers, (○) water molecules on the calcium atoms situated at the surface of the fibers, (●) water molecules on all calcium atoms. Lines represent best allometric fits with equations reported in the graph. The number in bracket is the incertitude given by the fits.**

The long-time slopes of the surface water distributions (hydrating only the calcium ions or all the atoms of the fiber) are similar, which is probably explained by the fact that they are the molecules of water hydrating calcium ions which contribute the most to long residence times.



**Fig. S7. Time correlation functions calculate by MD simulation (a), extracted from the NMRD profile of a complete fresh Ca gel (b)**

The correlation function calculated from the MD simulation (a) is evaluated by the sum of functions  $G^{(1,1)}$  and  $G^{(2,2)}$  calculated for all the water molecules inside the fiber and in the bulk (Calero et al., 2015). Because of time calculation limit, the correlation function calculated by MD simulation does not last as long as the one evaluated from the NMRD profile. However, a relaxation between  $10^{-13}$  and  $10^{-11}$  associated to bulk water is clearly visible but more pronounced in the NMRD correlation function. In both graph a broad relaxation is observed with a probable inflection point around  $10^{-8}$ s in (a) and possible two small inflections at  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  s in (b). The amplitude difference observed between the two functions is attributed to the limited number of bulk water molecules used for the simulations.

## Model for uniaxial rotational diffusion

### a. General case

Woessner (Woessner, 1962) has considered a rigid two spins system in a molecule moving like an ellipsoid in a continuous fluid. The rotational diffusion coefficients about the three axes of the ellipsoid are:  $R_1$ ,  $R_2$ , and  $R_3$ . The direction cosine of the internuclear vector with respect to the ellipsoid axes are  $l'$ ,  $m'$ , and  $n'$ . The longitudinal relaxation rate is given as:

$$R_1 = \frac{9}{8} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma^4 \hbar^2 r^{-6} [J_1(\omega_0) + J_2(2\omega_0)] [J_1(\omega_0) + J_2(2\omega_0)] \quad (1)$$

(Eq. (1) in Woessner, 1962)

with:

$$J_h(\omega) = K_h \left( \frac{C_+ \tau_+}{1 + \omega^2 \tau_+^2} + \frac{C_- \tau_-}{1 + \omega^2 \tau_-^2} + \frac{C_1 \tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} + \frac{C_2 \tau_2}{1 + \omega^2 \tau_2^2} + \frac{C_3 \tau_3}{1 + \omega^2 \tau_3^2} \right) J_h(\omega) \quad (2)$$

$$= K_h \left( \frac{C_+ \tau_+}{1 + \omega^2 \tau_+^2} + \frac{C_- \tau_-}{1 + \omega^2 \tau_-^2} + \frac{C_1 \tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} + \frac{C_2 \tau_2}{1 + \omega^2 \tau_2^2} + \frac{C_3 \tau_3}{1 + \omega^2 \tau_3^2} \right)$$

(Eq. (40) in Woessner, 1962)

$$K_1 = \frac{2}{15}; K_2 = \frac{8}{15}, \quad (3)$$

(Eq. (34) in Woessner, 1962)

$$\begin{aligned} C_+ &= d - e \\ C_- &= d + e \\ C_1 &= 6m'^2 n'^2 \\ C_2 &= 6l'^2 n'^2 \\ C_3 &= 6l'^2 m'^2 \end{aligned} \quad (4)$$

(Eq. (36) in Woessner, 1962)

$$d = \frac{1}{2}(3(l'^4 + m'^4 + n'^4) - 1) \quad ($$

$$e = \frac{1}{6}[(\delta_1(3l'^4 + 6m'^2 n'^2 - 1) + \delta_2(3m'^4 + 6l'^2 n'^2 - 1) + \delta_3(3n'^4 + 6l'^2 m'^2 - 1))] \quad e = \frac{1}{6}[(\delta_1(3l'^4 + 6m'^2 n'^2 - 1) + \delta_2(3m'^4 + 6l'^2 n'^2 - 1) + \delta_3(3n'^4 + 6l'^2 m'^2 - 1))] \quad ($$

(Eq. (38 & 39) in Woessner, 1962)

$$\delta_i = \frac{R_i - \mathcal{R}}{\sqrt{(\mathcal{R}^2 - \mathcal{L}^2)}} \quad (6)$$

(Eq. (30) in Woessner, 1962)

$$\mathcal{R} = \frac{1}{3}(R_1 + R_2 + R_3) \quad \mathcal{R} = \frac{1}{3}(R_1 + R_2 + R_3) \quad (7)$$

$$\mathcal{L}^2 = \frac{1}{3}(R_1 R_2 + R_1 R_3 + R_2 R_3) \quad \mathcal{L}^2 = \frac{1}{3}(R_1 R_2 + R_1 R_3 + R_2 R_3)$$

(Eq. (26 & 27) in Woessner, 1962)

$$\frac{1}{\tau_{\pm}} = 6 \left( \mathcal{R} \pm \sqrt{(\mathcal{R}^2 - \mathcal{L}^2)} \right) \quad (8)$$

(Eq. (31) in Woessner, 1962)

$$\frac{1}{\tau_1} = 4R_1 + R_2 + R_3 \quad (9)$$

$$\frac{1}{\tau_2} = 4R_2 + R_1 + R_3$$

$$\frac{1}{\tau_3} = 4R_3 + R_1 + R_2$$

(Eq. (37) in Woessner, 1962)

b. *Uniaxial rotation of an internuclear vector orthogonal to the axis of rotation.*

An uniaxial rotation can be produced if two of the rotational diffusion constants are zero; let's consider  $R_2 = R_3 = 0$ . Moreover, if the internuclear vector is perpendicular to the rotational axis, then we have  $l=0$ .

Under such considerations, with recourse to the direction cosine property ( $l^2 + m^2 + n^2 = 1$ ) reduced to  $m^2 + n^2 = 1$ , the preceding equations are considerably simplified.

$$\begin{aligned} C_+ &= -\frac{1}{2} + 2m^4 - 2m^2n^2 + 2n^4 \\ C_- &= -\frac{1}{2} + m^4 + 2m^2n^2 + n^4 = \frac{1}{2} \\ C_1 &= 6m^2n^2 \\ C_2 &= C_3 = 0 \end{aligned} \tag{10}$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{\tau_+} &= \frac{1}{\tau_1} = 4R_1 \\ \frac{1}{\tau_-} &= 0 \\ \frac{1}{\tau_2} &= \frac{1}{\tau_3} = R_1 \end{aligned} \tag{11}$$

The correlation time  $\tau_-$  is infinite, but this does not lead to an indeterminacy in Eq. (2) since

$$\lim_{\tau_- \rightarrow \infty} \frac{\tau_-}{1 + \omega^2 \tau_-^2} = 0.$$

The spectral density function becomes:

$$J_h(\omega) = \frac{3}{2} K_h \frac{\tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} \tag{12}$$

and the longitudinal relaxation rate can then be simply written as:

$$R_1 = \frac{9}{40} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma^4 \hbar^2 r^{-6} \left[ \frac{\tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} + \frac{4\tau_1}{1 + 4\omega^2 \tau_1^2} \right] \left[ \frac{\tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} + \frac{4\tau_1}{1 + 4\omega^2 \tau_1^2} \right] \quad (13)$$

### Deuterium NMRD profile

The NMRS profile of Fig. 6 has been fitted according to:

$$R_1 = f_1 \cdot R_1^{Q,1} + f_2 \cdot R_1^{Q,2} + f_b \cdot R_1^{bulk} \quad (14)$$

where  $f_1$  and  $f_2$  are the fraction of molecules with a slow rotational dynamics and  $f_b$  is the fraction of bulk water. According to the formalism of Abragam, (2007, p. 313), (Kowalewski and Mäler, 2018, p.

192),  $R_1^{Q,i}$  can be written as:

$$R_1^{Q,i} = \frac{3}{40} \lambda^2 \left\{ \frac{\tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} + 4 \frac{\tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} \right\}, \quad (15)$$

with  $\lambda$ , the composite quadrupolar coupling constant defined as:

$$\lambda^2 = \left( 1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \left( \frac{eQ}{\hbar} \frac{\partial^2 V}{\partial z'^2} \right)^2, \quad (16)$$

where  $\frac{eQ}{\hbar} \frac{\partial^2 V}{\partial z'^2}$  is the quadrupolar coupling constant and  $\eta$  the asymmetry parameter.

**Table S1** fraction of water molecules associated with the two slow dynamics, considering isotropic rotation or uniaxial rotation (vide supra model for uniaxial rotational diffusion). Correlation time of populations 1 and 2 are  $10^{-6}$  s and  $5.6 \cdot 10^{-8}$  s respectively.

	population	$\eta = 0$	$\eta = 1$
Uniaxial rotation	1	0.51%	0.38%
	2	1.02%	0.76%
Isotropic rotation	1	0.38%	0.29%
	2	0.76%	0.57%

Table S2.

Chapitre 2 Parameters obtained from the fit analysis of the NMRD profiles of a partially dehydrated (PD) gel, slices with small (SM) and large (LM) mesh size. As in the article the numbers in bracket report the refinement error on the precedent digit.

Sample	$C_r$ ( $10^6$ Hz <sup>2</sup> )	$\tau_r$ ( $10^{-8}$ s)	$C_t$ ( $10^7$ Hz <sup>2</sup> )	$\tau_t$ ( $10^{-6}$ s)	A ( $s^{-1}$ )	$N_H$ ( $10^{26}$ m <sup>-3</sup> )	$D_t$ ( $10^{-14}$ m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
PD	2(3)	1(3)	3.3(2)	1.28(8)	0.6(6)	6(2)	5.9(4)
SM	10(20)	1(2)	15(3)	1.4(2)	0.6(6)	3(3)	5.5(8)
LM	6	1(2)	7.6(1)	1.3(2)	0.4(6)	1.3(1)	5.6(9)

## References

- Abragam, A., 2007. The principles of nuclear magnetism, Reprinted. ed, The international series of monographs on physics. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Abrami, M., Chiarappa, G., Farra, R., Grassi, G., Marizza, P., Grassi, M., 2018. Use of low field NMR for the characterization of gels and biological tissues 13.
- Agulhon, P., Robitzer, M., Habas, J.-P., Quignard, F., 2014. Influence of both cation and alginate nature on the rheological behavior of transition metal alginate gels. *Carbohydr. Polym.* 112, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.097>

- Anémie [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/fr/health-topics/anaemia> (accessed 8.31.22).
- Anoardo, E., Galli, G., Ferrante, G., 2001. Fast-field-cycling NMR: Applications and instrumentation. *Appl. Magn. Reson.* 20, 365–404. <https://doi.org/10.1007/BF03162287>
- Assifaoui, A., Champion, D., Chiotelli, E., Verel, A., 2006. Characterization of water mobility in biscuit dough using a low-field  $^1\text{H}$  NMR technique. *Carbohydr. Polym.* 64, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.020>
- Assifaoui, A., Lerbret, A., Uyen, H.T.D., Neiers, F., Chambin, O., Loupiac, C., Cousin, F., 2015a. Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in the presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ): a process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit. *Soft Matter* 11, 551–560. <https://doi.org/10.1039/C4SM01839G>
- Assifaoui, A., Lerbret, A., Uyen, H.T.D., Neiers, F., Chambin, O., Loupiac, C., Cousin, F., 2015b. Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in the presence of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ): a process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit. *Soft Matter* 11, 551–560. <https://doi.org/10.1039/C4SM01839G>
- Atkins, P.W., De Paula, J., 2006. *Atkins' Physical chemistry*, 8th ed. ed. W.H. Freeman, New York.
- Ayant, Y., Belorizky, E., Aluzon, J., Gallice, J., 1975. Calcul des densités spectrales résultant d'un mouvement aléatoire de translation en relaxation par interaction dipolaire magnétique dans les liquides. *J. Phys.* 36, 991–1004. <https://doi.org/10.1051/jphys:019750036010099100>
- Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., 1985.  $^1\text{H}$  NMRD studies of solutions of paramagnetic metal ions in ethyleneglycol. *Inorganica Chim. Acta* 100, 173–181. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)88305-X](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)88305-X)
- Barbieri, R., Quaglia, M., Delfini, M., Brosio, E., 1998. Investigation of water dynamic behaviour in poly(HEMA) and poly(HEMA-co-DHPMA) hydrogels by proton  $T_2$  relaxation time and self-diffusion coefficient n.m.r. measurements. *Polymer* 39, 1059–1066. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)00403-5)
- Barragán-Ibañez, G., Santoyo-Sánchez, A., Ramos-Peñafiel, C.O., 2016. Iron deficiency anaemia. *Rev. Médica Hosp. Gen. México* 79, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.06.008>
- Bellemjid, N., Assifaoui, A., Moussaif, A., El Abbadi, N., Mesfioui, A., Iddar, A., 2021. Silica-coated calcium pectinate formulations for controlling carbendazim release: water and soil release studies. *J. Environ. Sci. Health Part B* 56, 613–622. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1927603>
- Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., Xia, Z., 1993. Nuclear and electron relaxation of hexaammine(3+). *J. Phys. Chem.* 97, 1134–1137. <https://doi.org/10.1021/j100108a006>
- Bertini, I., Luchinat, C., Parigi, G., Ravera, E., 2017. *NMR of paramagnetic molecules: applications to metalloproteins and models*, Second edition. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Bloembergen, N., Morgan, L.O., 1961. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *J. Chem. Phys.* 34, 842–850. <https://doi.org/10.1063/1.1731684>
- Bloembergen, N., Purcell, E.M., Pound, R.V., 1948. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys. Rev.* 73, 679–712. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.73.679>
- Bodart, P.R., Rachocki, A., Tritt-Goc, J., Michalke, B., Schmitt-Kopplin, P., Karbowski, T., Gougeon, R.D., 2019. Quantification of manganese ions in wine by NMR relaxometry. *Talanta* 120561. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120561>
- Borgia, G.C., Brown, R.J.S., Fantazzini, P., 2000. Uniform-Penalty Inversion of Multiexponential Decay Data. *J. Magn. Reson.* 147, 273–285. <https://doi.org/10.1006/jmre.2000.2197>
- Borgia, G.C., Brown, R.J.S., Fantazzini, P., 1998. Uniform-Penalty Inversion of Multiexponential Decay Data. *J. Magn. Reson.* 132, 65–77. <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1387>

- Borgia, G.C., Brown, R.J.S., Fantazzini, P., 1998. Examples of uniform-penalty inversion of multiexponential relaxation data. *Magn. Reson. Imaging* 16, 549–552. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(98\)00056-3](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(98)00056-3)
- Braccini, I., Pérez, S., 2001. Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup>-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules* 2, 1089–1096. <https://doi.org/10.1021/bm010008g>
- Brax, M., Buchmann, C., Schaumann, G.E., 2018. Effect of mucilage on water properties in the rhizosphere monitored by <sup>1</sup>H-NMR relaxometry. *Microporous Mesoporous Mater.* 269, 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.07.044>
- Brax, M., Köhne, M., Kroener, E., Schaumann, G.E., 2019. Potential of NMR relaxometry to unravel the properties of mucilage in several pore sizes. *Geoderma* 340, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.01.013>
- Brownstein, K.R., Tarr, C.E., 1979a. Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Phys. Rev. A* 19, 2446–2453. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.19.2446>
- Brownstein, K.R., Tarr, C.E., 1979b. Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Phys. Rev. A* 19, 2446–2453. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.19.2446>
- Bychuk, O.V., O'Shaughnessy, B., 1995. Anomalous Diffusion at Liquid Surfaces. *Phys. Rev. Lett.* 74, 1795–1798. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.74.1795>
- Bychuk, O.V., O'Shaughnessy, B., 1994. Anomalous surface diffusion: A numerical study. *J. Chem. Phys.* 101, 772–780. <https://doi.org/10.1063/1.468132>
- Cagle, F.W., Smith, G.F., 1947. 2,2'-Bipyridine Ferrous Complex Ion as Indicator in Determination of Iron. *Anal. Chem.* 19, 384–385. <https://doi.org/10.1021/ac60006a008>
- Calero, C., Martí, J., Guàrdia, E., 2015. <sup>1</sup>H Nuclear Spin Relaxation of Liquid Water from Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* 119, 1966–1973. <https://doi.org/10.1021/jp510013q>
- Carr, H.Y., Purcell, E.M., 1954. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.* 94, 630–638. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.94.630>
- Chen, X., Wang, Y., Wu, L., Zhang, W., Hu, Y., 2019. A new model in correlating and calculating the diffusion-coefficient of electrolyte aqueous solutions. *Fluid Phase Equilibria* 485, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2018.12.011>
- Chui, M.M., Phillips, R.J., McCarthy, M.J., 1995a. Measurement of the Porous Microstructure of Hydrogels by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Colloid Interface Sci.* 174, 336–344. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1399>
- Chui, M.M., Phillips, R.J., McCarthy, M.J., 1995b. Measurement of the Porous Microstructure of Hydrogels by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Colloid Interface Sci.* 174, 336–344. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1399>
- Cistola, D.P., Robinson, M.D., 2016. Compact NMR relaxometry of human blood and blood components. *TrAC Trends Anal. Chem.* 83, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.020>
- Cohen, M.H., Mendelson, K.S., 1982. Nuclear magnetic relaxation and the internal geometry of sedimentary rocks. *J. Appl. Phys.* 53, 1127–1135. <https://doi.org/10.1063/1.330526>
- Conte, P., 2019. Chapter 10 Environmental Applications of Fast Field-cycling NMR Relaxometry, in: *Field-Cycling NMR Relaxometry: Instrumentation, Model Theories and Applications*. The Royal Society of Chemistry, pp. 229–254. <https://doi.org/10.1039/9781788012966-00229>
- Damadian, R., 1971. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* 171, 1151–1153. <https://doi.org/10.1126/science.171.3976.1151>
- Devkota, R., Pilon, M., 2018. FRAP: A Powerful Method to Evaluate Membrane Fluidity in *Caenorhabditis elegans*. *Bio-Protoc.* 8, e2913. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2913>

- Dragan, E.S., Dinu, M.V., 2019. Polysaccharides constructed hydrogels as vehicles for proteins and peptides. A review. *Carbohydr. Polym.* 225, 115210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115210>
- Dubrovskii, S.A., Rakova, G.V., 1997. Elastic and Osmotic Behavior and Network Imperfections of Nonionic and Weakly Ionized Acrylamide-Based Hydrogels. *Macromolecules* 30, 7478–7486. <https://doi.org/10.1021/ma970788e>
- Ekebafé, L.O., Ogbeifun, D.E., Okieimen, F.E., 2011. *Polymer Applications in Agriculture* 23, 9.
- Ernst, R.R., Bodenhausen, G., Wokaun, A., 2004. Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions, Repr. ed, The international series of monographs on chemistry. Clarendon Pr, Oxford.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G., Nishinari, K., Funami, T., 2008. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydr. Polym.* 72, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.021>
- Flory Paul J., 1953. Principles of polymer chemistry / by Paul J. Flory,..., <>George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. Cornell University Press, Ithaca New York.
- Fortune, W.B., Mellon, M.G., 1938. Determination of Iron with o-Phenanthroline: A Spectrophotometric Study. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 10, 60–64. <https://doi.org/10.1021/ac50118a004>
- Franks, F. (Ed.), 1972. The Physics and Physical Chemistry of Water. Springer New York, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8334-5>
- Gallegos, D.P., Smith, D.M., Brinker, C.J., 1988. An NMR technique for the analysis of pore structure: Application to mesopores and micropores. *J. Colloid Interface Sci.* 124, 186–198. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(88\)90339-6](https://doi.org/10.1016/0021-9797(88)90339-6)
- Gardiner, D.J., Bowley, H.J. (Eds.), 1989. Practical Raman spectroscopy: with 11 tables. Springer, Berlin Heidelberg.
- Glaves, C.L., Frye, G.C., Smith, D.M., Brinker, C.J., Datye, A., Ricco, A.J., Martin, S.J., 1989. Pore structure characterization of porous films. *Langmuir* 5, 459–466. <https://doi.org/10.1021/la00086a030>
- Golsanami, N., Sun, J., Zhang, Z., 2016. A review on the applications of the nuclear magnetic resonance (NMR) technology for investigating fractures. *J. Appl. Geophys.* 133, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jappgeo.2016.07.026>
- Gomes, B.F., Burato, J.S. da S., Silva Lobo, C.M., Colnago, L.A., 2016. Use of the Relaxometry Technique for Quantification of Paramagnetic Ions in Aqueous Solutions and a Comparison with Other Analytical Methods. *Int. J. Anal. Chem.* 2016, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/8256437>
- Grant, G.T., Mon, E.R., Rees, S.D.A., 1973. BIOLOGICAL INTERACTIONS BETWEEN POLYSACCHARIDES AND DIVALENT CATIONS: THE EGG-BOX MODEL. *FEBS Lett.* 32, 195–198.
- Greenwood, N.N., Gibb, T.C., 1971. Mössbauer Spectroscopy. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5697-1>
- Gregorova, A., Saha, N., Kitano, T., Saha, P., 2015. Hydrothermal effect and mechanical stress properties of carboxymethylcellulose based hydrogel food packaging. *Carbohydr. Polym.* 117, 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.009>
- Grösch, L., Noack, F., 1976. NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solutions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* 453, 218–232. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(76\)90267-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(76)90267-1)
- Guilherme, M.R., Aouada, F.A., Fajardo, A.R., Martins, A.F., Paulino, A.T., Davi, M.F.T., Rubira, A.F., Muniz, E.C., 2015. Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. *Eur. Polym. J.* 72, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.017>

- Hadjiev, N.A., Amsden, B.G., 2015. An assessment of the ability of the obstruction-scaling model to estimate solute diffusion coefficients in hydrogels. *J. Controlled Release* 199, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.010>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Vibe Scheller, H., 2010. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiol.* 153, 384–395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Helm, L., Merbach, A.E., 1999. Water exchange on metal ions: experiments and simulations. *Coord. Chem. Rev.* 187, 151–181. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)90232-1](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)90232-1)
- Hills, B.P., Cano, C., Belton, P.S., 1991. Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems. *Macromolecules* 24, 2944–2950. <https://doi.org/10.1021/ma00010a047>
- Holz, M., Heil, S.R., Sacco, A., 2000. Temperature-dependent self-diffusion coefficients of water and six selected molecular liquids for calibration in accurate  $^1\text{H}$  NMR PFG measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 4740–4742. <https://doi.org/10.1039/b005319h>
- Huynh, T.D.U., 2016. Structuration de matrices à base de pectine : formulation, caractérisation, fonctionnalités et libération contrôlée lors de l'encapsulation.
- Huynh, U.T.D., Assifaoui, A., Chambin, O., 2017. Pellets based on polyuronates: Relationship between gelation and release properties. *J. Food Eng.* 199, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.004>
- Huynh, U.T.D., Chambin, O., du Poset, A.M., Assifaoui, A., 2018. Insights into gelation kinetics and gel front migration in cation-induced polysaccharide hydrogels by viscoelastic and turbidity measurements: Effect of the nature of divalent cations. *Carbohydr. Polym.* 190, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.046>
- Huynh, U.T.D., Lerbret, A., Neiers, F., Chambin, O., Assifaoui, A., 2016. Binding of Divalent Cations to Polygalacturonate: A Mechanism Driven by the Hydration Water. *J. Phys. Chem. B* 120, 1021–1032. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11010>
- Jaeger, F., Bowe, S., Van As, H., Schaumann, G.E., 2009. Evaluation of  $^1\text{H}$  NMR relaxometry for the assessment of pore-size distribution in soil samples. *Eur. J. Soil Sci.* 60, 1052–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2009.01192.x>
- Jamnongkan, T., Kaewpirom, S., 2010. Potassium Release Kinetics and Water Retention of Controlled-Release Fertilizers Based on Chitosan Hydrogels. *J. Polym. Environ.* 18, 413–421. <https://doi.org/10.1007/s10924-010-0228-6>
- Keeler, J.J., 2009. *Understanding NMR spectroscopy*, Reprinted Febr. 2009. ed. Wiley, Chichester Weinheim.
- Kimmich, R., 1997. *NMR Tomography, Diffusometry, Relaxometry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60582-6>
- Kimmich, R., Weber, H.W., 1993. NMR relaxation and the orientational structure factor. *Phys. Rev. B* 47, 11788–11794. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.47.11788>
- Klein, M., Poverenov, E., 2020. Natural biopolymer - based hydrogels for use in food and agriculture. *J. Sci. Food Agric.* 100, 2337–2347. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10274>
- Koenig, S.H., Baglin, C., Brown, R.D., Fred Brewer, C., 1984. Magnetic field dependence of solvent proton relaxation induced by  $\text{Gd}^{3+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  complexes. *Magn. Reson. Med.* 1, 496–501. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910010408>
- Koenig, S.H., Brown, R.D., 1984. Relaxation of solvent protons by paramagnetic ions and its dependence on magnetic field and chemical environment: implications for NMR imaging. *Magn. Reson. Med.* 1, 478–495. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910010407>
- Kopeček, J., 2009. HYDROGELS FROM SOFT CONTACT LENSES AND IMPLANTS TO SELF-ASSEMBLED NANOMATERIALS. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 47, 5929–5946. <https://doi.org/10.1002/pola.23607>

- Kowalewski, J., Egorov, A., Kruk, D., Laaksonen, A., Nikkhou Aski, S., Parigi, G., Westlund, P.-O., 2008. Extensive NMRD studies of Ni(II) salt solutions in water and water–glycerol mixtures. *J. Magn. Reson.* 195, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2008.08.011>
- Kowalewski, J., Mäler, L., 2018. Nuclear spin relaxation in liquids: theory, experiments, and applications, Second edition. ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York.
- Krause, W. (Ed.), 2002. Contrast agents. 1: Magnetic resonance imaging / vol. ed.: Werner Krause, Topics in current chemistry. Springer, Berlin Heidelberg.
- Kropman, M.F., Bakker, H.J., 2001. Dynamics of Water Molecules in Aqueous Solvation Shells. *Science* 291, 2118–2120. <https://doi.org/10.1126/science.1058190>
- Kruk, D., 2016. Understanding spin dynamics. Pan Stanford Publishing, Singapore.
- Kruk, D., 2015. Understanding Spin Dynamics, 0 ed. Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/b19179>
- Kruk, D., 2007. Theory of evolution and relaxation of multi-spin systems: application to nuclear magnetic resonance and electron spin resonance. arima publ, Bury St Edmunds.
- Kruk, D., Florek – Wojciechowska, M., Masiewicz, E., Oztop, M., Ploch-Jankowska, A., Duda, P., Wilczynski, S., 2021a. Water mobility in cheese by means of Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. *J. Food Eng.* 298, 110483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110483>
- Kruk, D., Florek-Wojciechowska, M., Oztop, M., Ilhan, E., Wiczorek, Z., 2021b. Water dynamics in eggs by means of Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. *J. Magn. Reson.* 327, 106976. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2021.106976>
- Larentzos, J.P., Criscenti, L.J., 2008. A Molecular Dynamics Study of Alkaline Earth Metal–Chloride Complexation in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* 112, 14243–14250. <https://doi.org/10.1021/jp802771w>
- Lee, K.Y., Mooney, D.J., 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 37, 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Lee, P.A., Citrin, P.H., Eisenberger, P., Kincaid, B.M., 1981. Extended x-ray absorption fine structure—its strengths and limitations as a structural tool. *Rev. Mod. Phys.* 53, 769–806. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.53.769>
- Lerbret, A., Lelong, G., Mason, P.E., Saboungi, M.-L., Brady, J.W., 2011. Water Confined in Cylindrical Pores: A Molecular Dynamics Study. *Food Biophys.* 6, 233–240. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9191-y>
- Li, J., Mooney, D.J., 2016. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat. Rev. Mater.* 1, 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- Lin, C.-C., Metters, A.T., 2006. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1379–1408. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>
- Liu, X.D., Bao, D.C., Xue, W.M., Xiong, Y., Yu, W.T., Yu, X.J., Ma, X.J., Yuan, Q., 2003. Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. *J. Appl. Polym. Sci.* 87, 848–852. <https://doi.org/10.1002/app.11537>
- Lopez-Sanchez, P., Martinez-Sanz, M., Bonilla, M.R., Wang, D., Gilbert, E.P., Stokes, Jason.R., Gidley, Michael.J., 2017. Cellulose-pectin composite hydrogels: Intermolecular interactions and material properties depend on order of assembly. *Carbohydr. Polym.* 162, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.049>
- Lopez-Sanchez, P., Schuster, E., Wang, D., Gidley, M.J., Strom, A., 2015. Diffusion of macromolecules in self-assembled cellulose/hemicellulose hydrogels. *Soft Matter* 11, 4002–4010. <https://doi.org/10.1039/C5SM00103J>

- Lorén, N., Hagman, J., Jonasson, J.K., Deschout, H., Bernin, D., Cella-Zanacchi, F., Diaspro, A., McNally, J.G., Ameloot, M., Smisdom, N., Nydén, M., Hermansson, A.-M., Rudemo, M., Braeckmans, K., 2015. Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: putting theory into practice. *Q. Rev. Biophys.* 48, 323–387. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000013>
- Lyu, C., Ning, Z., Wang, Q., Chen, M., 2018. Application of NMR  $T_2$  to Pore Size Distribution and Movable Fluid Distribution in Tight Sandstones. *Energy Fuels* 32, 1395–1405. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b03431>
- Maire du Poset, A., 2018. Hydrogels de polygalacturonate réticulés par les ions  $Fe^{2+}$  : impact du mode d'association local sur les mécanismes de gélification, contrôle de la structure multi-échelle et des propriétés mécaniques.
- Maire du Poset, A., Lerbret, A., Boué, F., Zitolo, A., Assifaoui, A., Cousin, F., 2019. Tuning the Structure of Galacturonate Hydrogels: External Gelation by Ca, Zn, or Fe Cationic Cross-Linkers. *Biomacromolecules* 20, 2864–2872. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00726>
- Maire du Poset, A., Lerbret, A., Zitolo, A., Cousin, F., Assifaoui, A., 2018. Design of polygalacturonate hydrogels using iron(II) as cross-linkers: A promising route to protect bioavailable iron against oxidation. *Carbohydr. Polym.* 188, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.007>
- Maire du Poset, A., Zitolo, A., Cousin, F., Assifaoui, A., Lerbret, A., 2020a. Evidence for an egg-box-like structure in iron(ii)–polygalacturonate hydrogels: a combined EXAFS and molecular dynamics simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 2963–2977. <https://doi.org/10.1039/C6CP06015C>
- Maire du Poset, A., Zitolo, A., Cousin, F., Assifaoui, A., Lerbret, A., 2020b. Evidence for an egg-box-like structure in iron(II)–polygalacturonate hydrogels: a combined EXAFS and molecular dynamics simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 2963–2977. <https://doi.org/10.1039/C9CP04065J>
- Martínez, M.V., Rivarola, C.R., Miras, M.C., Barbero, C.A., 2017. A colorimetric iron sensor based on the partition of phenanthroline complexes into polymeric hydrogels. Combinatorial synthesis and high throughput screening of the hydrogel matrix. *Sens. Actuators B Chem.* 241, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.013>
- Meiboom, S., Gill, D., 1958. Modified Spin - Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.* 29, 688–691. <https://doi.org/10.1063/1.1716296>
- Menakbi, C., Quignard, F., Mineva, T., 2016. Complexation of Trivalent Metal Cations to Mannuronate Type Alginate Models from a Density Functional Study. *J. Phys. Chem. B* 120, 3615–3623. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00472>
- Mills, R., 1973. Self-diffusion in normal and heavy water in the range 1–45 deg. *J. Phys. Chem.* 77, 685–688. <https://doi.org/10.1021/j100624a025>
- Mishra, R.K., Majeed, A.B.A., Banthia, A.K., 2011. Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *Int. J. Plast. Technol.* 15, 82–95. <https://doi.org/10.1007/s12588-011-9016-y>
- Mitreiter, I., Oswald, S.E., Stallmach, F., 2010. Investigation of Iron(III)-Release in the Pore Water of Natural Sands by NMR Relaxometry 6.
- Morris, E.R., Rees, D.A., Thom, D., Boyd, J., 1978. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydr. Res.* 66, 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83247-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83247-4)
- Ohls, K., Bogdain, B., 2016. History of inductively coupled plasma atomic emission spectral analysis: from the beginning up to its coupling with mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 31, 22–31. <https://doi.org/10.1039/C5JA90043C>
- Parodi, F., 1989. Physics and Chemistry of Microwave Processing, in: *Comprehensive Polymer Science and Supplements*. Elsevier, pp. 669–728. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096701-1.00258-5>

- Parvathy, P.C., Jyothi, Alummoottil.N., 2014. Rheological and thermal properties of saponified cassava starch- *g* -poly(acrylamide) superabsorbent polymers varying in grafting parameters and absorbency. *J. Appl. Polym. Sci.* 131, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.40368>
- Peng, J.W., Wagner, G., 1994. [20] Investigation of protein motions via relaxation measurements, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 563–596. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)39022-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)39022-3)
- Pocan, P., Knapkiewicz, M., Rachocki, A., Oztop, M.H., 2021. Detection of Authenticity and Quality of the Turkish Delights (Lokum) by Means of Conventional and Fast Field Cycling Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry. *J. Agric. Food Chem.* [acs.jafc.1c00943](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00943). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00943>
- Purcell, E.M., Torrey, H.C., Pound, R.V., 1946. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.* 69, 37–38. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.69.37>
- Qi, X., Wei, W., Su, T., Zhang, J., Dong, W., 2018. Fabrication of a new polysaccharide-based adsorbent for water purification. *Carbohydr. Polym.* 195, 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.112>
- Rabi, I.I., Zacharias, J.R., Millman, S., Kusch, P., 1938. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Phys. Rev.* 53, 318–318. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.53.318>
- Reed, T.B., 1961. Induction - Coupled Plasma Torch. *J. Appl. Phys.* 32, 821–824. <https://doi.org/10.1063/1.1736112>
- Rees, D.A., 1969. Structure, Conformation, and Mechanism in the Formation of Polysaccharide Gels and Networks, in: Wolfrom, M.L., Tipson, R.S., Horton, D. (Eds.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, pp. 267–332. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60352-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60352-2)
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Vilela, S., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J. Microencapsul.* 23, 245–257. <https://doi.org/10.1080/02652040500286086>
- Robinson, J.W., 1960. Atomic Absorption Spectroscopy 11.
- Rogosnitzky, M., Branch, S., 2016. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals* 29, 365–376. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9931-7>
- Roudaut, G., Farhat, I., Poirier-Brulez, F., Champion, D., 2009. Influence of water, temperature and sucrose on dynamics in glassy starch-based products studied by low field 1H NMR. *Carbohydr. Polym.* 77, 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.029>
- Roy, N., Saha, N., Kitano, T., Saha, P., 2012. Biodegradation of PVP–CMC hydrogel film: A useful food packaging material. *Carbohydr. Polym.* 89, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.008>
- Sakai, T., Matsunaga, T., Yamamoto, Y., Ito, C., Yoshida, R., Suzuki, S., Sasaki, N., Shibayama, M., Chung, U., 2008. Design and Fabrication of a High-Strength Hydrogel with Ideally Homogeneous Network Structure from Tetrahedron-like Macromonomers 41, 6.
- Sandrin, D., Wagner, D., Sitta, C.E., Thoma, R., Felekyan, S., Hermes, H.E., Janiak, C., de Sousa Amadeu, N., Kühnemuth, R., Löwen, H., Egelhaaf, S.U., Seidel, C.A.M., 2016. Diffusion of macromolecules in a polymer hydrogel: from microscopic to macroscopic scales. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 12860–12876. <https://doi.org/10.1039/C5CP07781H>
- Schefer, L., Bulant, A., Zeder, C., Saha, A., Mezzenga, R., 2015. Magnetic Control of Macromolecular Conformations in Supramolecular Anionic Polysaccharide–Iron Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 13289–13292. <https://doi.org/10.1002/anie.201506898>
- Scherer, G.W., 1994. Hydraulic radius and mesh size of gels. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 1, 285–291. <https://doi.org/10.1007/BF00486171>

- Schwiderke, E.E., di Sarli, A.R., 1986. A mathematical basis for calculating the water permeability of organic films supported by metal substrates. *Prog. Org. Coat.* 14, 297–308. [https://doi.org/10.1016/0033-0655\(86\)80004-8](https://doi.org/10.1016/0033-0655(86)80004-8)
- Shamshir, A., Sparrman, T., Westlund, P.-O., 2020. Analysis of the behaviour of confined molecules using  $^2H$  T<sub>1</sub> nuclear magnetic relaxation dispersion. *Mol. Phys.* 118, e1645367. <https://doi.org/10.1080/00268976.2019.1645367>
- Sharma, S., Tiwari, S., 2020. A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 162, 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.110>
- Skjllk-Brek, G., Grasdalen, H., Smidsrod, O., 1989. Inhomogeneous Polysaccharide Ionic Gels. *Carbohydrate polymers* 10., 31–54.
- Solomon, I., 1955. Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys. Rev.* 99, 559–565. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.99.559>
- Stapf, S., Kimmich, R., Seitter, R.-O., 1996. Field-cycling NMR relaxometry of liquids confined in porous glass: Evidence for levy-walks. *Magn. Reson. Imaging* 14, 841–846. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(96\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(96)00213-5)
- Stapf, S., Kimmich, R., Seitter, R.-O., 1995. Proton and Deuteron Field-Cycling NMR Relaxometry of Liquids in Porous Glasses: Evidence for Lévy-Walk Statistics. *Phys. Rev. Lett.* 75, 2855–2858. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.2855>
- Steele, R.M., Korb, J.-P., Ferrante, G., Bubici, S., 2016. New applications and perspectives of fast field cycling NMR relaxometry: New trends in FFC NMR relaxometry. *Magn. Reson. Chem.* 54, 502–509. <https://doi.org/10.1002/mrc.4220>
- Steiner, E., 2011. Relaxométrie du proton pour l'étude de fluides à l'intérieur de milieux poreux.
- Stelar, n.d. Introduction to Fast Field Cycling (FFC) relaxometry [WWW Document]. URL <https://www.stelar.it/ffc-technique> (accessed 9.7.22).
- Stookey, L.L., 1970. Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42, 779–781. <https://doi.org/10.1021/ac60289a016>
- Tian, Y., Du, E., Abdelmola, F., Qiang, Y., Carlsson, L.A., 2020. Rapid Characterization of Water Diffusion in Polymer Specimens Using a Droplet-Based Method. *Langmuir* 36, 7309–7314. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00727>
- Tokuyama, H., Nakahata, Y., Ban, T., 2020. Diffusion coefficient of solute in heterogeneous and macroporous hydrogels and its correlation with the effective crosslinking density. *J. Membr. Sci.* 595, 117533. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117533>
- van den Enden, J.C., Rossell, J.B., Vermaas, L.F., Waddington, D., 1982. Determination of the solid fat content of hard confectionery butters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59, 433–439. <https://doi.org/10.1007/BF02634428>
- van der Spoel, D., van Maaren, P.J., Berendsen, H.J.C., 1998a. A systematic study of water models for molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field. *J. Chem. Phys.* 108, 10220–10230. <https://doi.org/10.1063/1.476482>
- van der Spoel, D., van Maaren, P.J., Berendsen, H.J.C., 1998b. A systematic study of water models for molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field. *J. Chem. Phys.* 108, 10220–10230. <https://doi.org/10.1063/1.476482>
- van Duynhoven, J., Voda, A., Witek, M., Van As, H., 2010. Time-Domain NMR Applied to Food Products, in: *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. Elsevier, pp. 145–197. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(10\)69003-5](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(10)69003-5)
- Ventura, I., Jammal, J., Bianco-Peled, H., 2013. Insights into the nanostructure of low-methoxyl pectin-calcium gels. *Carbohydr. Polym.* 97, 650–658. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.055>

- Wende, F.J., Xue, Y., Nestor, G., Öhrlund, Å., Sandström, C., 2020. Relaxation and diffusion of water protons in BDDE cross-linked hyaluronic acid hydrogels investigated by NMR spectroscopy—Comparison with physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* 248, 116768. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116768>
- Wichterle, O., Lim, D., 1960. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 185, 117–118. <https://doi.org/10.1038/185117a0>
- Williams, F., 2009. *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications, Second Edition* (John A. Weil and James R. Bolton). *J. Chem. Educ.* 86, 33. <https://doi.org/10.1021/ed086p33>
- Woessner, D.E., 1962. Nuclear Spin Relaxation in Ellipsoids Undergoing Rotational Brownian Motion. *J. Chem. Phys.* 37, 647–654. <https://doi.org/10.1063/1.1701390>
- Woods, J., Mellon, M., 1941. Thiocyanate Method for Iron: A Spectrophotometric Study. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 13, 551–554. <https://doi.org/10.1021/i560096a013>
- Yang, C., Xing, X., Li, Z., Zhang, S., 2020. A Comprehensive Review on Water Diffusion in Polymers Focusing on the Polymer–Metal Interface Combination. *Polymers* 12, 138. <https://doi.org/10.3390/polym12010138>
- Zeng, Y., Jia, Y., Yan, T., Zhuang, W., 2021. Binary structure and dynamics of the hydrogen bonds in the hydration shells of ions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23, 11400–11410. <https://doi.org/10.1039/D0CP06397E>
- Zhang, Z., Decker, E.A., McClements, D.J., 2014. Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. *Food Res. Int.* 64, 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.020>







ÉCOLE DOCTORALE  
Environnements - Santé  
Bourgogne | Franche-Comté

**Titre :** Etude d'hydrogels à base de polysaccharidique par relaxométrie RMN : Structure, Dynamique et Quantification

**Mots clés :** Hydrogel, RMN, Relaxométrie, Dynamique, Taille de réseaux, Quantification du fer.

**Résumé :** Ce manuscrit aborde plusieurs utilisations et développements de la résonance magnétique nucléaire dans le domaine temporel (TD-NMR) pour l'étude d'hydrogels polysaccharidiques formulés à partir de polygalacturonate. Après une introduction générale sur les applications technologiques des hydrogels et une brève présentation de la relaxation RMN, trois aspects sont examinés: (1) les profils de diffusion RMN des protons obtenus grâce à l'utilisation de la relaxométrie à cycle de champs rapide (FFC-NMR) permettent d'explorer la dynamique des molécules d'eau dans le gel. Des mouvements très lents sont mis en évidence et comparés à des simulations de dynamique moléculaire. (2) le traitement des courbes de relaxation obtenues à 20 MHz permet d'obtenir des distributions locales de tailles de réseau. Les résultats sont comparés à des données de rhéologie et de diffusion de neutrons aux petits angles provenant de la littérature. La relaxométrie permet de mettre en évidence le caractère hétérogène des hydrogels. (3) la relaxation paramagnétique a permis de quantifier et de différencier in-situ les ions Fe(II) et Fe(III) dans différents gels, ainsi que simultanément dans le même gel.

**Title:** Study of polysaccharide-based hydrogels by NMR relaxometry: Structure, Dynamic and Quantification

**Keywords:** Hydrogel, NMR, Relaxometry, Dynamic, mesh size, quantification

**Abstract:** This manuscript discusses several applications and developments of time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) for the study of polysaccharide hydrogels formulated with polygalacturonate. After providing a general introduction to the technological applications of hydrogels and a basic overview of NMR relaxation, three aspects are investigated. (1) <sup>1</sup>H NMRD profiles obtained using fast field cycling NMR provide insights into the dynamics of water molecules within the gel. Very slow dynamics are observed and compared to molecular dynamics simulations. (2) the analysis of relaxation curves recorded at 20 MHz enables the calculation of mesh-size distributions. These calculations complement rheological results. Relaxometry is able to observe local heterogeneity of hydrogels. (3) Paramagnetic relaxation is employed to quantify and differentiate Fe(II) and Fe(III) species within different gels, including simultaneous detection within the same gel.



Université Bourgogne Franche-Comté  
32, avenue de l'Observatoire  
25000 Besançon