



**HAL**  
open science

# Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes.

Marie-Carole Kouassi

► **To cite this version:**

Marie-Carole Kouassi. Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes.. Chimie organique. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR078 . tel-01710780

**HAL Id: tel-01710780**

**<https://theses.hal.science/tel-01710780>**

Submitted on 16 Feb 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

# THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein du Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces

## Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes

Présentée et soutenue par  
Marie-Carole KOUASSI

Thèse soutenue publiquement le 14 Décembre 2017  
devant le jury composé de

Mme Nadia OULAHAL	Maître de Conférences, Université de Lyon 1	Rapporteur
M. Philippe ROGER	Professeur, Université Paris Sud 11	Rapporteur
Mme Catherine LADAVIERE	Directeur de Recherche CNRS, Université de Lyon 1	Examineur
M. Pascal THEBAULT	Maître de Conférences, Université de Rouen	Examineur
M. Luc PICTON	Professeur, Université de Rouen	Codirecteur de thèse
Mme Virginie DULONG	Ingénieur de Recherche, Université de Rouen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Virginie DULONG et Luc PICTON, laboratoire PBS, UMR 6270





## Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le laboratoire 'Polymères, Biopolymères, Surfaces' UMR 6270 du CNRS de l'université de Rouen Normandie.

Je remercie Monsieur Thierry Jouenne, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie au sein de son unité et Monsieur Didier Lecerf, responsable de l'équipe SCC « Systèmes Colloïdaux Complexes » pour l'accueil au sein de son équipe.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse : Madame Virginie Dulong et Monsieur Luc Picton pour m'avoir guidée tout au long de ce travail. Merci pour tout le soutien et pour toutes les idées constructives apportées mais également merci de m'avoir fait confiance. Encore un merci à Virginie pour ta grande disponibilité et à Luc pour ton optimisme.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : Madame Nadia Oulahal et Monsieur Philippe Roger en tant que rapporteurs. J'associe également à ces remerciements Madame Catherine Ladavière qui a également accepté d'examiner mon travail.

Je remercie tous les membres du Laboratoire qui m'ont aidée dans la réalisation de mes travaux et avec qui j'ai également pu discuter et échanger. Un grand merci à mon référent Pascal Thébault pour sa disponibilité, pour tous ses échanges et ses conseils. J'associe à ces remerciements Christophe Rihouey pour sa gentillesse et pour le temps passé sur mes nombreuses analyses en chromatographie. Un grand merci à Mme Béatrice Labat pour le temps accordé et les essais réalisés en cytotoxicité. Je remercie également Mme Laurence Lecamp de m'avoir aidée pour les essais sous UV.

Je tiens à remercier toute l'équipe BRICS « Biofilms Résistances Interactions Cellules Surfaces » : Emmanuelle, Annick, Bertrand, Julie... pour votre accueil et pour m'avoir permis de réaliser mes expériences en biologie.

A mes collègues de bureau (anciens et actuels) avec qui j'ai passé de beaux moments de rire, de complicité : merci à Julia (ma première jeune encadrante), c'était un plaisir. Merci à Christophe Pottier, à Sarah et à Chahrazed. Merci à Ali pour tous tes conseils et ta grande gentillesse. Et bien sûr à vous les actuels : merci à Ahdi pour ta bonne humeur, pas un jour on l'on ne se taquinait pas. J'avoue que pendant la rédaction, j'y avais mis une petite pause. Merci à toi Hung, toujours prêt à rendre service. Tu es si aimable, ne change rien...

Je tiens à remercier tous les doctorants (anciens et actuels) du laboratoire que j'ai pu côtoyer et qui m'ont également fait partager leur joie de vivre : Brahim, Bassidi, Marion, Charlotte, Jean-Baptiste, Takfarinas, Arlette, Naila, Imen, Tiphaine, Aracelys...

J'associe mes remerciements à tous les membres du laboratoire qui ont contribué à rendre ces moments agréables : Carole, Corinne, Tony, Elie, Gisèle, Eric, Béatrice...et à tous les autres membres.

Je ne peux pas terminer ces petits mots de remerciements sans penser à tous mes proches : un grand merci à toute ma famille qui a cru en moi et qui m'a soutenue moralement. Merci à tous mes amis pour vos mots d'encouragements et pour votre présence...

## Liste des abréviations et symboles

ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)  
ATCC : American Type Culture Collection  
BHI : Brain Heart Infusion  
CAC : Concentration d'agrégation critique  
 $C_{cr}$  : Concentration critique de recouvrement  
CMB : Concentration minimale bactéricide  
CMI : Concentration minimale inhibitrice  
CMP : Carboxyméthylpullulane  
 $\mathcal{D}$  : Dispersité  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DO : Densité optique  
DPPH : 1,1-diphényl-1-picrylhydrazyl  
DP<sub>n</sub> : Degré de polymérisation moyen en nombre  
DS : Degré de substitution  
EDCI : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride  
IR : Spectroscopie Infra-Rouge  
MEM : Milieu essentiel minimum  
 $M_n$  : Masse molaire moyenne en nombre  
 $M_w$  : Masse molaire moyenne en poids  
N(Bu)<sub>4</sub> : tétrabutylammonium  
PBS : Tampon phosphate salin  
q : longueur de persistance  
 $R_g$  : Rayon de giration  
 $R_h$  : Rayon hydrodynamique  
RMN<sup>1</sup>H : Résonance magnétique nucléaire du proton  
SEC/MALLS/DRI/Visco : chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière, un détecteur réfractométrique et un détecteur viscosimétrique  
SEM : Scanning Electron Microscopy  
UV-Visible : Spectroscopie Ultra-Violet-Visible  
[ $\eta$ ] : viscosité intrinsèque



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre A : Etude bibliographique.....</b>	<b>7</b>
<b>1 Contaminations des produits cosmétiques et alimentaires.....</b>	<b>9</b>
1.1 Contaminations bactériennes .....	9
1.1.1 Définitions .....	9
1.1.2 Contaminations dans divers domaines .....	11
1.1.3 Les bactéries dans les formulations aqueuses cosmétiques et alimentaires .....	12
1.2 Les radicaux libres.....	16
1.2.1 Définition .....	16
1.2.2 Effets des radicaux libres sur la santé humaine.....	17
1.3 Les moyens de lutte .....	18
1.3.1 Les conservateurs et les antioxydants .....	18
1.3.2 Toxicité des conservateurs et des antioxydants.....	23
1.3.3 Résistance aux antibactériens.....	23
1.3.4 Alternatives aux conservateurs synthétiques.....	24
<b>2 La nature : source de molécules aux propriétés variées .....</b>	<b>28</b>
2.1 Origines, propriétés et applications .....	28
2.1.1 Animaux .....	28
2.1.2 Microorganismes .....	29
2.1.3 Minéraux .....	30
2.1.4 Algues.....	31
2.2 Dérivés des plantes et utilisations.....	31
2.2.1 Familles chimiques variées et propriétés .....	31
2.2.2 Utilisation actuelle des dérivés des plantes .....	38
2.2.3 Inconvénients des dérivés des plantes .....	39
2.3 Polysaccharides .....	40
2.3.1 Définitions.....	40



2.3.2	Propriétés et utilisations des polysaccharides .....	41
2.3.3	Modification des polysaccharides .....	44
<b>3</b>	<b>Incorporation de molécules dérivées de plantes au sein de structures polymères .....</b>	<b>45</b>
3.1	Polymérisation .....	46
3.1.1	Exemple du gaïacol .....	46
3.1.2	Exemple de l'eugénol.....	48
3.2	Encapsulation au sein de capsules de polymères.....	50
3.3	Incorporation au sein de films polymères.....	52
3.4	Greffage chimique sur des polysaccharides .....	53
<b>4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>56</b>
	<b>Chapitre B : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>69</b>
<b>1</b>	<b>Synthèses chimiques.....</b>	<b>71</b>
1.1	Réactifs et solvants .....	71
1.2	Protocoles des synthèses chimiques .....	72
<b>2</b>	<b>Techniques de caractérisations du greffage chimique .....</b>	<b>74</b>
2.1	Spectroscopie Ultra-Violet –Visible (UV-Visible) .....	74
2.2	Spectroscopie Infra-Rouge (IR).....	74
2.3	Spectroscopie de Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	74
<b>3</b>	<b>Techniques de caractérisations physico-chimique .....</b>	<b>75</b>
3.1	Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco .....	76
3.2	Rhéologie.....	78
3.2.1	Définitions .....	78
3.2.2	Viscosimétrie.....	79
3.2.3	Etude en mode écoulement .....	82
3.3	Fluorescence .....	82
<b>4</b>	<b>Tests antioxydants.....</b>	<b>83</b>
4.1	Principe de la méthode avec le radical DPPH•.....	84

4.2	Principe de la méthode avec le radical cation ABTS .....	87
<b>5</b>	<b>Tests antibactériens.....</b>	<b>88</b>
5.1	Définitions CMI et CMB .....	88
5.2	Détermination des activités antibactériennes (Cas de notre étude) .....	89
<b>6</b>	<b>Cytocompatibilité .....</b>	<b>93</b>
6.1	Live/Dead .....	94
6.2	Alamar Blue.....	94
<b>Chapitre C : Carboxyméthylpullulane greffé aminogaiacol .....</b>		<b>97</b>
<b>1</b>	<b>Le choix des réactifs.....</b>	<b>99</b>
1.1	Le composé naturel.....	99
1.2	Le polysaccharide .....	100
<b>2</b>	<b>Greffage de l'aminogaiacol sur le CMP.....</b>	<b>101</b>
2.1	Greffage de l'aminogaiacol en milieu organique (DMSO).....	102
2.1.1	Réaction de greffage.....	102
2.1.2	Conditions de réaction.....	102
2.1.3	Caractérisations du greffage.....	105
2.1.4	Conclusion sur la caractérisation du greffage .....	109
2.1.5	Tests de solubilité de l'aminogaiacol .....	109
2.2	Greffage de l'aminogaiacol en milieu aqueux.....	110
2.2.1	Réaction de greffage.....	110
2.2.2	Conditions de réactions .....	111
2.2.3	Caractérisation du greffage .....	112
2.2.4	Conclusion sur la caractérisation du greffage .....	120
2.3	Conclusion générale sur les synthèses des CMP greffés aminogaiacol .....	120
<b>3</b>	<b>Etudes physico-chimiques .....</b>	<b>122</b>
3.1	Milieu dilué et semi-dilué.....	122
3.1.1	Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco .....	122
3.1.2	Etude viscosimétrique .....	127

3.1.3	Fluorescence.....	132
3.2	Mesures rhéologiques : Etude en écoulement .....	134
3.3	Conclusion sur les propriétés physico-chimiques .....	138
<b>4</b>	<b>Propriétés antioxydantes .....</b>	<b>139</b>
4.1	Aminogaiacol vs radical DPPH' .....	139
4.2	CMP et dérivés CMP-G <sub>x</sub> vs radical DPPH' .....	141
4.2.1	CMP vs radical DPPH' .....	141
4.2.2	CMP-G <sub>x</sub> vs radical DPPH• .....	142
<b>5</b>	<b>Propriétés antibactériennes.....</b>	<b>146</b>
5.1	Aminogaiacol vs <i>S.aureus</i> .....	147
5.1.1	Dilutions et ensemencements .....	147
5.1.2	Lecture des densités optiques (DO) .....	147
5.1.3	Dénombrement sur boîtes de gélose.....	148
5.2	CMP et dérivés CMP-G <sub>x</sub> vs <i>S.aureus</i> .....	152
5.2.1	CMP vs <i>S.aureus</i> .....	152
5.2.2	CMP-G <sub>x</sub> vs <i>S.aureus</i> .....	153
5.3	Conclusion et discussion sur les propriétés antioxydantes et antibactériennes .....	158
<b>6</b>	<b>Cytocompatibilité .....</b>	<b>160</b>
6.1	Test Live/Dead : mise en évidence de la viabilité des cellules .....	160
6.2	Test Alamar Blue® : mise en évidence de l'activité métabolique des cellules.....	162
<b>7</b>	<b>Conclusions générales .....</b>	<b>163</b>
<b>Chapitre D : Solutions proposées pour améliorer les propriétés visées.....</b>		
<b>171</b>		
<b>1</b>	<b>Synthèses de nouveaux dérivés greffés .....</b>	<b>173</b>
1.1	Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (polysaccharide CMP) .....	174
1.2	Stratégie 2 : diminution de la masse molaire (polysaccharide CMP dégradé) .....	174
1.2.1	Synthèse du <sup>d</sup> CMP.....	174
1.2.2	Synthèse des <sup>d</sup> CMP-G <sub>x</sub> .....	176

1.3	Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (polysaccharide Alginate) .....	176
1.4	Conclusion sur les synthèses chimiques.....	179
<b>2</b>	<b>Caractérisation du greffage .....</b>	<b>180</b>
2.1	Spectroscopie UV– Visible .....	180
2.2	Spectroscopie IR.....	181
2.3	Spectroscopie RMN <sup>1</sup> H .....	183
2.4	Conclusion sur la caractérisation du greffage.....	186
<b>3</b>	<b>Etudes physico-chimiques .....</b>	<b>186</b>
3.1	Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G).....	186
3.1.1	Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco .....	186
3.1.2	Etude viscosimétrique .....	189
3.1.3	Fluorescence.....	191
3.1.4	Mesures rhéologiques : Etude en écoulement .....	193
3.1.5	Conclusion sur les propriétés physico-chimiques .....	195
3.2	Stratégie 2 : diminution de la masse molaire ( <sup>d</sup> CMP et <sup>d</sup> CMP-G) .....	195
3.2.1	Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco .....	195
3.2.2	Fluorescence.....	203
3.3	Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G) .....	204
3.3.1	Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco .....	204
3.3.2	Etude viscosimétrique .....	213
3.3.3	Fluorescence.....	217
3.3.4	Mesures rhéologiques : Etude en écoulement .....	219
3.4	Conclusion sur la partie physico-chimique .....	221
<b>4</b>	<b>Propriétés antioxydantes .....</b>	<b>223</b>
4.1	Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G).....	223
4.2	Stratégie 2 : diminution de la masse molaire ( <sup>d</sup> CMP et <sup>d</sup> CMP-G) .....	226
4.3	Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G) .....	228
4.4	Conclusion sur les propriétés antioxydantes .....	230

<b>5 Propriétés antibactériennes.....</b>	<b>231</b>
5.1 Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G).....	231
5.1.1 CMP vs <i>S.aureus</i> .....	231
5.1.2 CMP-G <sub>0.05</sub> vs <i>S.aureus</i> .....	231
5.2 Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G) .....	235
5.2.1 Alginate vs <i>S.aureus</i> .....	235
5.2.2 Alg-G <sub>x</sub> vs <i>S.aureus</i> .....	236
5.3 Conclusion sur les propriétés antibactériennes.....	238
<b>6 Cytocompatibilité .....</b>	<b>238</b>
6.1 Test Live/Dead : mise en évidence de la viabilité des cellules .....	239
6.2 Test Alamar Blue® : mise en évidence de l'activité métabolique des cellules.....	240
<b>7 Conclusions générales .....</b>	<b>241</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>245</b>
<b>ANNEXE 1 .....</b>	<b>251</b>
<b>ANNEXE 2 .....</b>	<b>271</b>
<b>ANNEXE 3 .....</b>	<b>295</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**



Dans les secteurs cosmétiques et alimentaires, les produits formulés notamment à base aqueuse sont en forte croissance au niveau mondial. Ils sont de plus en plus impliqués dans notre vie quotidienne. Tout au long de leur durée de consommation, ces produits sont constamment exposés à des facteurs environnementaux tels que l'humidité, la température, le pH, l'oxygène ou encore les microorganismes qui représentent des sources de contaminations. Ces dernières peuvent affecter la qualité des cosmétiques ou des aliments et conduire à une détérioration anticipée et par conséquent à une durée limitée de leur conservation et de leur utilisation. D'autre part, elles peuvent également être le moteur de nombreuses maladies et représentent ainsi un défi majeur de santé publique.

Les conservateurs sont donc des additifs essentiels dans la composition de la plupart des formulations cosmétiques et alimentaires. Ils vont permettre d'assurer leur stabilité et de prolonger leur durée de vie grâce à des propriétés spécifiques : antibactériennes, antioxydantes et/ou antifongiques. Classiquement, des molécules de synthèse sont utilisées comme conservateurs. Cependant, à ce jour, ces composés sont de plus en plus controversés en raison de leur possible caractère nocif qui est souligné dans de nombreuses études scientifiques : les parabènes sont par exemple suspectés d'être cancérogènes ou encore des perturbateurs endocriniens. Face aux impacts potentiellement néfastes de ces additifs sur la santé de l'homme mais également sur l'environnement, la demande sociétale se tourne de plus en plus vers des solutions d'origine naturelle. Afin de s'adapter et d'innover tout en rassurant le public, les industries et les chercheurs universitaires sont à la quête d'alternatives aux molécules synthétiques. Les recherches actuelles se sont développées vers des produits aux vertus multiples provenant d'origines variées : plantes, animaux ou encore les microorganismes.

Ce projet de thèse s'insère dans ce contexte et concerne l'élaboration de conservateurs à partir de composés d'origine naturelle, destinés principalement aux domaines des formulations aqueuses cosmétiques et/ou alimentaires. Les travaux de recherche s'intitulent : ***Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes.***

Le choix des molécules actives naturelles s'oriente vers des dérivés d'origine végétale. Les plantes possèdent des métabolites dit « primaires » tels que les protéines, les glucides, les lipides qui sont impliqués dans leur processus de croissance par exemple. Elles renferment



également des métabolites dits « secondaires » qui sont constitués d'un ensemble de familles de molécules aux propriétés antibactériennes, antioxydantes, antifongiques ou autres. Ces derniers exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement en leur permettant par exemple de se défendre contre des prédateurs ou des maladies. A ce jour, les dérivés actifs des végétaux sont utilisés dans peu de secteurs en raison de certains inconvénients tels que leur caractère hydrophobe ou encore allergisant.

Afin de dépasser ces facteurs limitants et d'élargir leurs champs d'applications, précisément dans le cas de formulations aqueuses cosmétique et/ou alimentaire, ces molécules peuvent être incorporées au sein de polymères notamment hydrosolubles. Ces derniers sont des macromolécules de fortes masses molaires et représentent de bons candidats pour jouer le rôle de matrice. Dans le cadre de nos travaux, nous avons opté pour des polysaccharides qui présentent l'avantage d'être issus de ressources naturelles, renouvelables et souvent hydrosolubles.

Les études bibliographiques recensent à ce jour quatre méthodes d'incorporation de composés naturels au sein de structure polymère : la polymérisation, l'encapsulation, l'insertion au sein de films polymères et le greffage chimique.

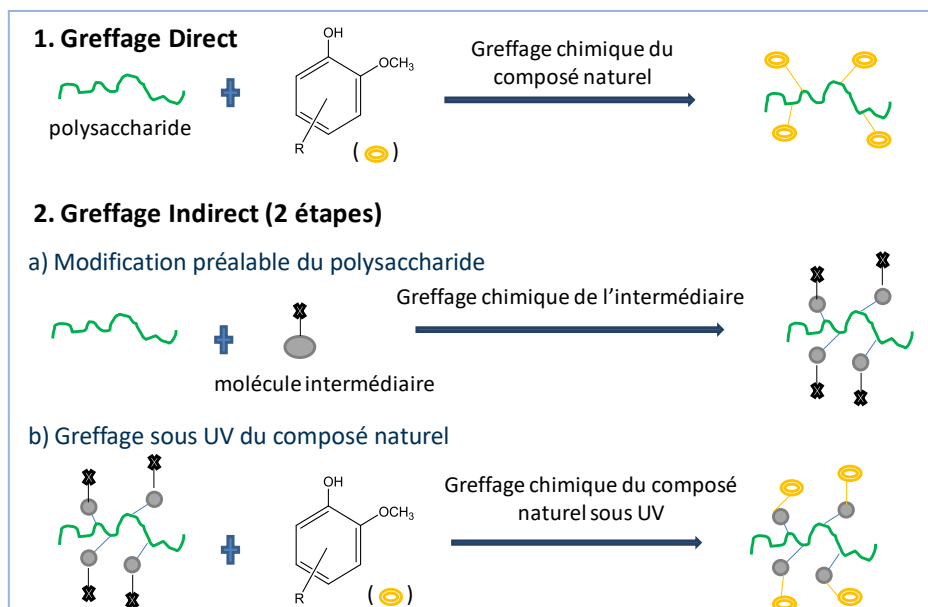
Tout au long de nos recherches, les systèmes visés seront préparés à base de polysaccharides (carboxyméthylpullulane, alginate) modifiés chimiquement par le greffage de molécules d'origine végétale à structure chimique phénolique (aminogaiacol, eugénol). Nous visons un double enjeu au niveau des propriétés des dérivés créés. D'une part, l'objectif premier est de concevoir des polysaccharides greffés actifs, présentant précisément des propriétés antibactériennes et/ou antioxydantes. Ces activités seront apportées par la présence des dérivés issus de plantes. D'autre part, la matrice polysaccharide devrait permettre de contrôler la rhéologie des formulations aqueuses en apportant des propriétés viscosifiantes ou gélifiantes.

Nous avons envisagé le greffage chimique selon deux voies (illustrées ci-dessous):

Voie 1 : Cette méthode, appelée aussi greffage direct, consiste à immobiliser l'actif d'origine naturelle de manière covalente sur le squelette carboné de la matrice polysaccharide.

Voie 2 : Cette méthode, appelée aussi greffage indirect, permet d'envisager un bras espaceur entre le squelette polymère et l'actif. Elle s'effectue en deux étapes : une étape préliminaire nécessaire pour fixer de manière covalente une molécule intermédiaire sur le squelette

carboné de la matrice, puis dans un second temps, le greffage covalent sous UV de la molécule végétale active. Cette voie a été choisie car le rayonnement UV est à ce jour peu employé comme méthode de greffage chimique d'une molécule sur un polysaccharide.



Par ailleurs, il est à préciser que la mobilité du composé actif immobilisé est susceptible d'être différente selon chacune de ces approches. Ce paramètre est susceptible d'influencer les propriétés recherchées notamment le pouvoir antibactérien des systèmes synthétisés.

La voie 2 est à ce jour la moins aboutie. Nous avons choisi de présenter ces résultats préliminaires en annexe de ce manuscrit. La voie 1, quant à elle constitue le cœur de nos travaux qui seront discutés tout au long de ce mémoire.

Le projet présenté dans la suite du manuscrit se répartit ainsi selon quatre chapitres :

- ❖ La première partie (chapitre A) sera consacrée à une étude de l'état de l'art;
- ❖ Dans le chapitre B intitulé « Matériels et méthodes », nous présenterons tous les réactifs ainsi que les techniques de caractérisation physico-chimique employées pour étudier le comportement des dérivés greffés en solution. Les méthodes choisies pour l'évaluation des propriétés biologiques et antioxydantes des produits seront également explicitées.
- ❖ Les résultats et discussions feront l'objet des chapitres C et D.
  - Dans le chapitre C, nous détaillerons les réactions effectuées avec le composé actif aminogaiacol et le carboxyméthylpullulane (CMP) comme polysaccharide. Nous

aborderons les synthèses, les caractérisations structurales ainsi que les caractérisations en solutions aqueuses. Enfin nous évaluerons les propriétés antioxydantes et antibactériennes.

- Dans le chapitre D et sur la base des conclusions du chapitre C, nous proposerons une série d’alternatives visant une amélioration des propriétés des systèmes étudiés. Notamment avec des CMP faiblement greffés mais aussi en utilisant un autre polysaccharide : l’alginate, présentant une conformation plus rigide en solution que les dérivés du pullulane.
- ❖ En annexe nous retrouverons
  - Des compléments d’information au niveau des matériels et méthodes et des résultats (annexe 1)
  - Les résultats préliminaires de la voie 2 (annexe 2)
  - Un article concernant ce travail publié dans ‘*Biomacromolecules*’ en 2017 et une liste des conférences (orales ou posters) (annexe 3).

Ces travaux de recherche ont été financés par la Région Normandie. Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS, UMR 6270), dirigé par le Pr. Thierry Jouenne, au sein de l’équipe Systèmes Colloïdaux Complexes (SCC) dirigée par le Pr. Didier Le Cerf. Cette thèse a été effectuée sous la direction du Dr. Virginie Dulong et la co-direction du Pr. Luc Picton.

# Chapitre A : Etude bibliographique

<b>1</b>	<b><u>Contaminations des produits cosmétiques et alimentaires</u></b>	<b>9</b>
1.1	<u>Contaminations bactériennes</u>	9
1.1.1	<u>Définitions</u>	9
1.1.2	<u>Contaminations dans divers domaines</u>	11
1.1.3	<u>Les bactéries dans les formulations aqueuses cosmétiques et alimentaires</u>	12
1.2	<u>Les radicaux libres</u>	16
1.2.1	<u>Définition</u>	16
1.2.2	<u>Effets des radicaux libres sur la santé humaine</u>	17
1.3	<u>Les moyens de lutte</u>	18
1.3.1	<u>Les conservateurs et les antioxydants</u>	18
1.3.2	<u>Toxicité des conservateurs et des antioxydants</u>	23
1.3.3	<u>Résistance aux antibactériens</u>	23
1.3.4	<u>Alternatives aux conservateurs synthétiques</u>	24
<b>2</b>	<b><u>La nature : source de molécules aux propriétés variées</u></b>	<b>28</b>
2.1	<u>Origines, propriétés et applications</u>	28
2.1.1	<u>Animaux</u>	28
2.1.2	<u>Microorganismes</u>	29
2.1.3	<u>Minéraux</u>	30
2.1.4	<u>Algues</u>	31
2.2	<u>Dérivés des plantes et utilisations</u>	31
2.2.1	<u>Familles chimiques variées et propriétés</u>	31
2.2.2	<u>Utilisation actuelle des dérivés des plantes</u>	38
2.2.3	<u>Inconvénients des dérivés des plantes</u>	39
2.3	<u>Polysaccharides</u>	40
2.3.1	<u>Définitions</u>	40
2.3.2	<u>Propriétés et utilisations des polysaccharides</u>	41

2.3.3	<u>Modification des polysaccharides</u> .....	44
<b>3</b>	<b><u>Incorporation de molécules dérivées de plantes au sein de structures polymères</u></b> ....	<b>45</b>
3.1	<u>Polymérisation</u> .....	46
3.1.1	<u>Exemple du gaiacol</u> .....	46
3.1.2	<u>Exemple de l'eugéno</u> l.....	48
3.2	<u>Encapsulation au sein de capsules de polymères</u> .....	50
3.3	<u>Incorporation au sein de films polymères</u> .....	52
3.4	<u>Greffage chimique sur des polysaccharides</u> .....	53
<b>4</b>	<b><u>Conclusion</u></b> .....	<b>56</b>

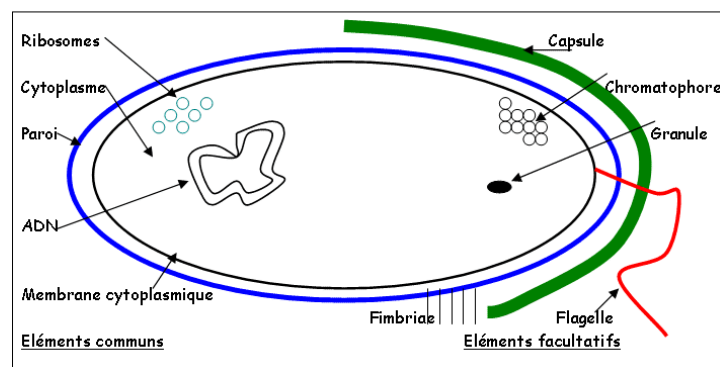
Dans cette étude bibliographique, nous présenterons dans un premier temps les deux types majeurs de détériorations affectant les produits cosmétiques et alimentaires : les contaminations bactériennes et les dégradations par les radicaux libres, en commençant par définir ces termes. Nous évoquerons également les effets néfastes qui en découlent et nous exposerons les différents moyens actuels mis à disposition pour éviter et/ou limiter ces contaminations en examinant leurs avantages et leurs inconvénients. Ces points faibles qui seront relatés conduisent les scientifiques à la recherche d'alternatives que nous étudierons en détails. Nous verrons ainsi les solutions à disposition au sein des ressources d'origine naturelle. Puis nous détaillerons les différentes possibilités d'incorporation de ces dérivés au sein de matrices polymères.

## 1 Contaminations des produits cosmétiques et alimentaires

### 1.1 Contaminations bactériennes

#### 1.1.1 Définitions

Découvertes en 1677 par le microscopiste hollandais Antoine Van Leeuwenhoek, les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires appartenant au règne des procaryotes (cellule sans noyau). Une cellule bactérienne est constituée d'un chromosome habituellement circulaire et formé d'une double hélice d'acide désoxyribonucléique (ADN) située dans le cytoplasme. Elle est également pourvue d'une enveloppe rigide (paroi) ; c'est un élément essentiel qui assure par exemple sa forme et le maintien de la pression osmotique interne. D'autres éléments facultatifs peuvent également être présents mais ne sont pas retrouvés chez toutes les bactéries comme par exemple la capsule, le flagelle ou encore le chromatophore. Un schéma simplifié d'une cellule bactérienne est fourni Figure A-1.



**Figure A-1** : Schéma simplifié d'une cellule bactérienne

Source : <http://www.biodeug.com/licence-12-microbiologie-chapitre-1-structure-des-micro-organismes/>

Il existe plusieurs types de bactéries qui peuvent être classifiés selon des critères variés tels que : la morphologie, le mode respiratoire, la température de croissance et autres. L'un des critères couramment utilisé repose sur la différence de composition au niveau de la paroi de ces êtres vivants. Elle est mise en avant par la méthode de la coloration de Gram. Les bactéries à Gram négatif (Gram-) possèdent une paroi composée d'une membrane externe (lipopolysaccharides) et d'une fine couche de peptidoglycane (glucides et peptides). Celles à Gram positif (Gram+) se différencient par une paroi dense constituée d'une couche épaisse de peptidoglycane et d'acide téichoïque<sup>1</sup>.

L'une des particularités de ces microorganismes est leur capacité à se reproduire de façon autonome, de manière asexuée et par scissiparité. C'est une division binaire qui s'effectue à partir d'une cellule mère et qui va conduire à la formation de deux cellules filles qui lui sont identiques (matériel génétique, morphologie). Chaque nouvelle cellule pourra également être dupliquée. Ainsi de suite, il y aura croissance et multiplication de colonies (plusieurs cellules) de bactéries dans des milieux propices à leur survie.

Ces organismes unicellulaires vivent principalement selon deux modes. Ils peuvent être retrouvés à l'état planctonique (sous forme de colonies libres), mobiles en milieu liquide. Mais par ailleurs, ils prolifèrent également sur des surfaces naturelles ou synthétiques, agrégés en micro-colonies au sein d'une matrice polymère extracellulaire : on parle dans ce cas de biofilm. Aparna *et al.*<sup>2</sup> mentionnent cinq étapes requises pour le développement d'un biofilm : (a) l'attachement réversible, (b) l'adhésion irréversible, (c) la maturation primaire, (d) la maturation et (e) le détachement.

Les facteurs physico-chimiques influençant le développement et la survie de ces espèces sont : la température, le pH, la présence d'eau, la teneur en oxygène ou encore la composition du milieu (apport en nutriments). A titre d'exemple, certaines bactéries (mésophiles) croissent à une température proche de celle du corps humain 37°C. D'autres appelées psychrophiles prolifèrent mieux à des températures de croissance plus faibles (proches de 0°C). Les thermophiles au contraire utilisent des températures plus élevées (45-70°C). Par conséquent, les bactéries sont des espèces ubiquitaires, retrouvées dans toutes les niches écologiques, notamment chez les animaux et les hommes ; précisément elles vivent à l'intérieur de ces êtres vivants (intestins, voies respiratoires) ou encore sur leur peau. Dans les endroits colonisés, ces êtres vont pouvoir jouer des rôles bénéfiques et/ou induire des maladies en tant qu'agents pathogènes.

Par exemple, chez l'humain, le microbiote intestinal apparait comme un élément essentiel de l'organisme avec lequel il vit en symbiose. Il est défini comme « un écosystème complexe »

composé d'un ensemble d'êtres unicellulaires, principalement de bactéries mais aussi de virus, de champignons et d'archées<sup>3</sup>. Ces êtres sont hébergés dans l'appareil digestif. Cet écosystème joue des rôles majeurs pour la santé de l'hôte dans lequel il est présent. Plus précisément, il exerce des fonctions physiologiques bénéfiques en participant au développement et à la maturation du système immunitaire<sup>4</sup>. Il contribue également à de nombreuses activités métaboliques dans l'organisme par des processus de dégradation et/ou de fermentation de divers composés (glucides, protéines)<sup>5</sup>. Une diversité des métabolites ainsi créés sera pour la plupart absorbée et utilisée par l'hôte par exemple comme source d'énergie. Cependant, de nombreuses études mettent en avant l'implication du microbiote intestinal dans diverses pathologies. Parmi ces dernières, il est à noter des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin mais également le cas de cancers, l'obésité et certaines maladies cardiovasculaires<sup>6</sup>.

En s'intéressant plus particulièrement aux bactéries dites pathogènes, ces dernières peuvent contaminer des milieux et des surfaces variées dans de nombreux domaines. Elles sont responsables de maladies plus ou moins graves chez l'homme et représentent un défi majeur de santé publique. De plus, elles peuvent être à l'origine de problèmes techniques dans de nombreux secteurs industriels.

### **1.1.2 Contaminations dans divers domaines**

Divers secteurs industriels tels que le maritime, le pétrole, l'industrie du papier, les entreprises de traitement et de distribution de l'eau ou encore le secteur alimentaire sont fortement impactés par le développement de biofilm au sein de leurs équipements<sup>7</sup>. Cela entraîne de lourdes conséquences techniques au niveau des matériaux utilisés ainsi qu'au niveau des coûts et des rendements de production.

Dans les secteurs maritimes et pétroliers, les surfaces d'équipements telles que : les coques de navires, les capteurs océanographiques, les plateformes offshore sont en contact avec l'eau au cours de leur utilisation. Elles sont ainsi sujettes à la colonisation sous forme de biofilm de macro et micro-organismes marins<sup>8</sup> dont les bactéries. Ces bio-salissures peuvent entraîner des effets négatifs sur les performances des appareillages<sup>9,10</sup> utilisés ou encore en accélérant leur processus de corrosion. Dans les travaux de C. Compere<sup>9</sup>, il a été observé que le coefficient d'échange de transfert de chaleur d'un tube de titane exposé à de l'eau de mer (pendant 30 jours) diminuait de 50%. Cette baisse d'échange thermique a été provoquée suite à la formation d'un biofilm de 100 µm d'épaisseur à l'intérieur du tube.



Par ailleurs, les contaminations bactériennes sont également la cause de maladies chez l'homme. Dans le domaine médical, il existe de nombreuses infections dites « nosocomiales »<sup>11</sup>. Elles sont contractées dans des hôpitaux le plus souvent suite à des interventions chirurgicales (pose d'implants par exemple) ou des soins et traitements en service de réanimation<sup>12</sup>. Elles constituent une préoccupation primordiale de santé publique. En France, « une enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux » datant de 2012 a montré que chaque année, un patient hospitalisé sur vingt (soit 5%) contracte une infection dans un établissement de soin. Cela représente environ 800 000 infections par an, qui seraient la cause directe de 4 000 décès. De plus, les traitements et les moyens de lutte contre ces infections entraînent des coûts importants<sup>13</sup>. Les responsables sont les germes pathogènes (bactéries, virus, levures) dont majoritairement les bactéries. Les trois agents infectieux le plus souvent identifiés sont : *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (Gram+), *Escherichia coli* (Gram-), et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-). A titre d'exemple, *Staphylococcus aureus* est impliqué dans de nombreuses pathologies nosocomiales telles que des infections de plaies chroniques, respiratoires (pneumopathie)<sup>14</sup>, oculaires ou encore des endocardites<sup>15</sup>. Ces maladies sont contractées suite à la formation de biofilm sur les surfaces de dispositifs médicaux invasifs<sup>16,17</sup> tels que les cathéters veineux ou encore des valves cardiaques mécaniques.

Nous allons maintenant nous intéresser aux contaminations de produits quotidiennement utilisés par les humains, précisément dans les domaines alimentaires et cosmétiques.

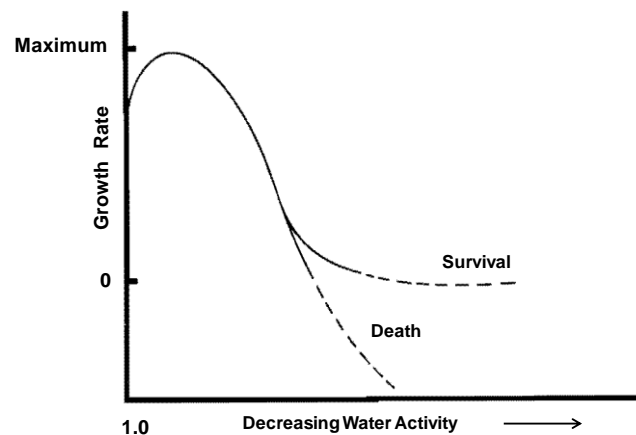
### **1.1.3 Les bactéries dans les formulations aqueuses cosmétiques et alimentaires**

Les aliments consommés par les hommes sont variés et se divisent en sept grands groupes : les produits laitiers et sucrés, les féculents, les fruits et légumes, les viandes et poissons, les lipides et les boissons. Dans le but d'innover et de s'adapter à la demande des consommateurs, de nombreuses industries développent et commercialisent des produits comestibles à partir de divers aliments par exemple sous forme de formulations aqueuses. Ces dernières se présentent comme des mélanges liquides homogènes ou des émulsions stables présentant des textures variées (crèmes pâtisseries, cocktails de fruit, soupes).

La plupart des aliments comestibles, dont les formulations aqueuses, sont sujets à des contaminations biologiques d'origine bactérienne. Ces dernières peuvent survenir lors de la production, du traitement industriel, du conditionnement et de la distribution, de l'utilisation ou encore de la conservation des produits<sup>18,19</sup>. Elles sont favorisées par la présence d'éléments

minéraux (l'eau, le sel) et organiques (les glucides, acides aminés) à l'intérieur des produits alimentaires. En effet, ces composés sont essentiels à la nutrition des bactéries et influencent leur croissance au sein des produits<sup>20</sup>. Selon la revue de W. H. Sperber<sup>21</sup>, d'une manière générale une réduction de l'activité de l'eau est néfaste à la croissance des bactéries. L'activité de l'eau ( $a_w$ ) se définit comme un paramètre caractérisant la disponibilité d'eau libre dans un produit. C'est une valeur sans unité comprise entre 0 (sécheresse absolue) et 1 (100% humidité relative). Comme illustré sur la Figure A-2, l'auteur précise que dans un premier temps, la diminution de  $a_w$  (<1), entraîne un accroissement bactérien dans le milieu. Un taux maximum de développement est ensuite atteint pour des valeurs d' $a_w$  comprises entre [0.990-0.995] dans le cas de nombreuses bactéries. En second lieu, pour des valeurs de  $a_w$  de plus en plus faibles, le taux de croissance diminue jusqu'à ce que le minimum d'activité d'eau (variable selon les espèces) soit atteint.

A titre d'exemple, *S.aureus* (Gram+) présente un maximum  $a_w = 0,99$  et un minimum  $a_w = 0,83$ . *Salmonella* (Gram -) présente un  $a_w$  maximal (> 0,99) et un minimum égal à 0,94<sup>20</sup>.



**Figure A-2 :** Influence de l'activité de l'eau sur le taux de croissance de bactéries (d'après W.H. Sperber<sup>21</sup>)

D'autres facteurs importants tels que le pH ou encore la température peuvent également jouer un rôle sur la prolifération bactérienne. D'une manière générale, un pH acide (< 4,6) tue ou inhibe la croissance des bactéries. Cependant tous ces paramètres restent variables selon l'espèce étudiée. Des exemples de bactéries ainsi que leurs conditions (pH et température) minimales et optimales de croissance sont regroupés dans le Tableau A-1. Les informations apportées ont été tirées du rapport de IFT/FDA (The Institute of Food Technologists / US Food and Drug Administration)<sup>20</sup>.

**Tableau A-1 : Exemples de pH et de température minimales et optimales de croissance de quelques bactéries pathogènes<sup>20</sup>**

	pH minimum	pH optimum	Température (°C) minimum	Température (°C) optimum
<i>S.aureus</i> (Gram+)	4	[6-7]	7	[35-40]
<i>B.cereus</i> (Gram+)	4,9		5	[28-40]
<i>E.coli</i> (Gram-)	4,4		7	[35-40]
<i>Campylobacter</i> (Gram-)	4,9	[6,5-7,5]	32	[42-45]

La consommation de nourriture ou de boissons contaminées entraîne deux grands types de maladies<sup>22,23</sup>. D'une part, les infections alimentaires qui sont causées par l'ingestion des agents pathogènes dans l'organisme humain. D'autre part, les intoxications qui sont provoquées par la libération de toxines produites par les bactéries<sup>24</sup> à l'intérieur des aliments. Suite à une étude de l'institut de veille sanitaire (InVS)<sup>25</sup>, en France les agents infectieux (bactéries, virus, parasites) sont la cause d'environ 239 000 à 269 000 cas d'infections alimentaires. Le nombre total annuel d'hospitalisations se situe entre 10 188 et 17 771. Celui des décès se situe entre 228 et 691 dont environ 84 à 94% sont en lien direct avec les bactéries.

Les germes responsables le plus souvent rencontrés sont *Salmonellose* (Gram-)<sup>26</sup>, *Escherichia coli* (Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram+)<sup>27</sup>. Les travaux de Argudín *et al.*<sup>28</sup> mettent en avant la capacité de *S.aureus* à synthétiser une large variété d'entérotoxines. Ces dernières seraient la cause de troubles intestinaux lors de leur diffusion dans le système digestif du consommateur. Des exemples d'agents infectieux et de types de maladies alimentaires sont résumés dans le Tableau A-2.

De nombreux produits cosmétiques sont utilisés quotidiennement. Ces derniers sont également concernés par la problématique des contaminations d'origine bactérienne. Elles peuvent survenir au moment de la fabrication et/ou de l'utilisation<sup>29,30,31</sup> des produits d'hygiène, de soins, de beauté. En effet, au cours de leur utilisation, ce sont les contacts entre le produit et le doigt du consommateur ou encore avec le milieu environnant qui favorisent la contamination des cosmétiques. Ces produits se présentent sous des formes variables dont la plupart sont des mélanges à base d'eau (gel douche, crèmes de soins, lotions, shampoing et autres). Muhammed *et al.*<sup>30</sup> ont détecté la présence d'espèces variées telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* ou encore

*Staphylococcus epidermidis* au sein de mascaras, de crayons à lèvres et de crayons pour les yeux. Le nombre de bactéries comptées varie entre  $9,1.10^3$  et  $1,5.10^5$  UFC (unité formant colonie) / mL. Osungunna *et al.*<sup>31</sup> ont également isolé *S.aureus* (33%), *Klebsiella* (26%) et *P.aeruginosa* (20%), suite à une étude de la qualité bactériologique de 15 lotions et crèmes sélectionnées. Comme abordé dans le cas des aliments, la présence de nutriments, l'activité de l'eau, le pH ou encore la température peuvent également être cités en tant que paramètres influençant les contaminations bactériennes des cosmétiques<sup>32</sup>.

Les microorganismes pathogènes au sein des cosmétiques sont également à l'origine de divers types de maladies. La peau étant l'un des organes le plus souvent en contact avec le produit, de nombreuses infections de types cutanées<sup>33</sup> peuvent être citées (Tableau A-2). Les bactéries en cause sont les staphylocoques et streptocoques. Il est également possible de citer des infections de type oculaire (Tableau A-2).

**Tableau A-2 : Exemples de maladies et d'infections alimentaires et cosmétiques causées par des bactéries pathogènes.**

Bactéries pathogènes	Maladies alimentaires (Symptômes)	Infections cosmétiques
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxications alimentaires (Diarrhées, crampes abdominales, nausées, vomissements)	Infection de la peau : Impétigo, Furoncle, Cellulite, Folliculite, Abcès.
	Références : <sup>34, 35</sup>	Références : <sup>36, 37</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Infection des yeux : Kératites, ulcère, abcès cornéen, endophtalmie Infection de la peau : Ecthyma gangrenosum
		Références : <sup>38, 39</sup>
<i>Escherichia coli</i>	Intoxications alimentaires : Gastroentérite, entérite, colite hémorragique (Diarrhées, déshydratation, fatigue, vomissements)	Infection de la peau : Cellulite
	Références : <sup>40, 41</sup>	Références : <sup>42, 33</sup>
<i>Salmonella</i>	Salmonellose, Gastroentérite (Diarrhées, crampes abdominales, nausées, vomissements)	-
	Références : <sup>43, 44</sup>	

Par ailleurs, il faut également noter qu'en plus des contaminations d'origine biologique des formulations aqueuses cosmétiques et alimentaires, il existe également des contaminations

d'origine chimique, principalement causées par des espèces appelées « radicaux libres ». Nous allons par la suite nous intéresser à ces dernières ainsi qu'aux conséquences entraînées par leur présence sur la santé humaine.

## 1.2 Les radicaux libres

### 1.2.1 Définition

Les radicaux libres sont des molécules chimiques instables et réactives qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés). Il existe différents types d'espèces radicalaires dont les principales sont les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN)<sup>45</sup>. Le terme ERO regroupe plusieurs dérivés de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyle ( $RO^{\cdot}$ ) ou encore le peroxyde ( $ROO^{\cdot}$ ). On peut citer dans le cas des ERN, le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) ou encore le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\cdot}$ ). Toutes ces substances sont produites au moyen de divers métabolismes physiologiques à l'intérieur de l'organisme (source endogène)<sup>46</sup>, précisément dans les cellules. Leur synthèse est réalisée essentiellement de manière enzymatique. Par exemple, le radical d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), peut être formé au moyen de plusieurs systèmes d'oxydases (enzymes) cellulaires. V. Dhawan<sup>47</sup> précise dans ses travaux que l'oxydase NADPH (forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) ainsi que l'oxydase xanthine sont les deux sources majeures de l'espèce  $O_2^{\cdot-}$ . Il indique également que la Nitric Oxide Synthase (NOS), qui est un autre type d'enzyme, permet la production de monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ).

Par ailleurs, les radicaux libres peuvent provenir de sources externes. Ils sont présents en tant que polluants dans l'atmosphère. Ils peuvent provenir de la fumée des cigarettes. Ils sont également générés suite à des rayonnements (UV, X ou  $\gamma$ ) ou encore par des métaux lourds (Cd, Hg, Pb)<sup>48,49</sup>.

D'une manière générale, la production endogène des radicaux est permanente mais faible. Le niveau de ces espèces créées est contrôlé grâce à des antioxydants qui peuvent être classés en deux groupes : enzymatique ou non enzymatique<sup>48</sup>. Les principaux antioxydants sont présents à l'intérieur du corps (cellules), par exemple, le superoxyde dismutase (SOD), le glutathion (GSH), la catalase (CAT). Par ailleurs, d'autres antioxydants importants proviennent de sources externes, telles que les nutriments apportés par l'alimentation<sup>50</sup> (ex : les vitamines).

### 1.2.2 Effets des radicaux libres sur la santé humaine

La présence de radicaux libres au sein de l'organisme peut être bénéfique ou au contraire source de danger pour la santé de l'homme. Quelques études établissent une corrélation entre la concentration d'espèces radicalaires dans le corps et les rôles que ces molécules exercent sur ce dernier<sup>46,51</sup>.

A. Favier<sup>51</sup> explique qu'à de faibles doses, les molécules radicalaires remplissent diverses fonctions utiles en participant par exemple à la défense immunitaire contre les agents pathogènes (bactéries) ou encore à la destruction par apoptose de cellules tumorales. Cependant, en raison de facteurs externes tels que la pollution (comme cités plus hauts) ou encore d'un déficit en apport d'antioxydant, la production des radicaux peut devenir trop forte et non maîtrisée. L'excès de ces molécules est appelé « stress oxydant ». Ce phénomène est le moteur de dommages causés aux molécules biologiques (ADN, protéines, lipides)<sup>52</sup> ce qui conduit à de nombreuses maladies<sup>53</sup>. A titre d'exemple, il est possible de citer le diabète, les cancers, des pathologies cardiovasculaires (cardiopathie ischémique) ou encore neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de Parkinson, cancer)<sup>46,54</sup>. Il est à noter qu'il existe également un lien étroit entre stress oxydant et vieillissement cellulaire<sup>55</sup>.

En terme de données chiffrées, une étude de l'institut de veille sanitaire<sup>56</sup> montre qu'en 2008, en France, les cancers constituent les premières causes de décès estimés à 160 769 décès (29,6%) sur un total de 543 139. Les maladies cardiovasculaires (149 541 décès, soit 27,5%) occupent le second rang. La maladie d'Alzheimer contribuant pour 3,2% (17 283) et le diabète pour 2,2% (11 713) se placent respectivement en quatrième et cinquième position.

En conclusion, la présence de micro-organismes (bactéries) et de radicaux libres au sein des formulations aqueuses alimentaires et cosmétiques entraîne des conséquences défavorables pour la santé du consommateur. Ils sont à l'origine de nombreuses infections et maladies plus ou moins graves chez l'homme. Par ailleurs, il faut également noter que la présence de ces contaminants génère la dégradation anticipée des produits utilisés en altérant leurs propriétés organoleptiques comme par exemple: l'odeur, le goût ou encore l'apparence.

Nous allons discuter dans la partie suivante des solutions actuelles employées pour lutter contre les contaminations biologiques et chimiques des formulations aqueuses alimentaires et cosmétiques.

## 1.3 Les moyens de lutte

### 1.3.1 Les conservateurs et les antioxydants

Des substances variées et regroupées sous le terme « d'additifs » peuvent être ajoutées à la composition de toutes formulations aqueuses au cours de leur fabrication ou de leur transformation. Ces composés additionnés apportent des fonctions particulières aux produits finis et peuvent être divisés en plusieurs catégories. Les principales sont les suivantes :

- les colorants qui apportent une coloration ;
- les agents de texture (gélifiants, épaississants) qui permettent d'améliorer la tenue et la présentation du produit ;
- les tensioactifs qui peuvent jouer le rôle d'agent stabilisant, émulsifiant ou encore mouillant ;
- les conservateurs qui ont pour rôle d'empêcher la présence et la prolifération de micro-organismes ;
- les antioxydants qui aident à éviter ou réduire les phénomènes d'oxydation provoqués par les radicaux libres.

Les conservateurs antimicrobiens et les antioxydants sont les moyens de lutte employés contre les contaminations biologiques et chimiques des formulations aqueuses cosmétiques et alimentaires. Le choix de ces composés se fait selon plusieurs critères<sup>57</sup>. Le premier est la législation. Les molécules utilisées sont insérées en faibles proportions aux mélanges selon des réglementations bien définies. En Europe, le règlement européen (CE) n° 1223/2009 regroupe sur une liste positive (annexe V)<sup>58</sup> les noms ainsi que les concentrations maximales de tous les conservateurs antimicrobiens admis au sein de divers produits cosmétiques. Comme exemples, les acides organiques tels que l'acide salicylique ou encore l'acide sorbique sont autorisés dans les préparations prêtes à l'emploi à des concentrations maximales respectives de 0,5 % et de 0,6 %. Les esters de parahydroxybenzoates d'alkyles (parabènes) sont admis à une concentration de 0,4 % et les formaldéhydes à 0,2 %. Au-delà des quantités requises, ces composés peuvent être toxiques pour le consommateur. De même, le règlement n° 1333/2008 présente (annexe II)<sup>59</sup> les noms d'additifs alimentaires (y compris les conservateurs et les antioxydants) admis dans différentes catégories de denrées alimentaires.

Par ailleurs, un conservateur doit respecter d'autres caractéristiques importantes telles que :

- le spectre d'activité : il doit être le plus large possible (bactéries (Gram+ et Gram-), (champignons, levures);

- le milieu à protéger : le conservateur doit posséder des affinités avec le milieu dans lequel il est utilisé. Notamment dans le cas des formulations aqueuses, la solubilité du conservateur dans l'eau est importante. Un paramètre tel que le pH de la formulation ne doit pas affecter l'activité du composé actif;
- la compatibilité avec la présence des autres ingrédients : la présence de certaines matières premières ne doit également pas modifier son activité;
- la compatibilité avec le procédé de fabrication (ex : montée en température);
- la nocivité : le conservateur employé mais également les produits de dégradation de ce composé doivent être non toxiques et non allergéniques pour le consommateur. La législation fixe les concentrations maximales d'utilisation des conservateurs (détaillées dans les listes positives) et garantissent ainsi la non-toxicité du produit. Il est à noter que ces listes sont en constante évolution.

De nombreux exemples de conservateurs et d'antioxydants autorisés et employés dans les secteurs cosmétiques et alimentaires peuvent être cités. Ces molécules sont obtenues par synthèse mais sont également souvent retrouvées dans la nature. Le Tableau A-3 présente quelques exemples de familles de conservateurs et d'antioxydants couramment employés dans les produits cosmétiques et alimentaires.

Ces substances vont jouer leur rôle spécifique selon des mécanismes variés<sup>60,61</sup>. J.-Y. Maillard<sup>60</sup> décrit trois types d'interactions pouvant exister entre les antimicrobiens et les cellules bactériennes. Notamment, les interactions (a) avec les composants cellulaires externes, (b) avec la membrane cytoplasmique ou encore (c) avec les constituants internes de la membrane cytoplasmique. A titre d'exemple, les acides organiques et les parabènes perturbent le fonctionnement de la membrane cytoplasmique précisément en augmentant son potentiel membranaire et sa perméabilité. Par conséquent, il y aura perte de composés intracellulaires tels que les ions potassium ( $K^+$ ) ou encore les acides aminés. L'auteur précise que ces pertes peuvent refléter un effet bactériostatique (inhibiteur) des antimicrobiens plutôt qu'un effet bactéricide (mort cellulaire). De plus, les acides organiques et les parabènes sont également capables de réagir avec des constituants cellulaires tels que les acides nucléiques et par conséquent perturber la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou encore de l'acide ribonucléique (ARN). L'auteur indique que les sels d'ammonium quaternaires et les biguanides (chlorhexidine) augmentent la perméabilité de la membrane externe dans le cas des bactéries de type Gram-. Ils perturbent aussi le fonctionnement de la membrane cytoplasmique, par exemple en inhibant son activité enzymatique. De plus, ces composés



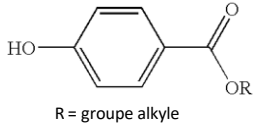
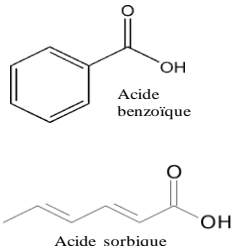
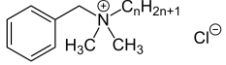
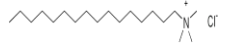
cationiques interagissent avec les constituants du cytoplasme en entraînant la coagulation de ce dernier.

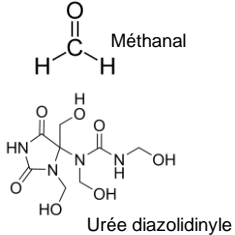
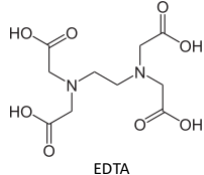
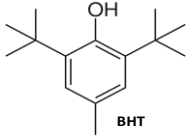
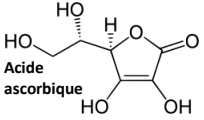
Dans le cas des antioxydants, Choe *et al.*<sup>62</sup> indiquent également des mécanismes variés tels que : le piégeage de radicaux libres, la chélation d'ions métalliques, le piégeage de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) ou de photosensibilisants. Par exemple, les composés phénoliques (le butylhydroxytoluène BHT et le butylhydroxyanisole BHA ou encore l'acide ascorbique piègent les radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène de ses fonctions hydroxyle (O-H). Les auteurs précisent que l'efficacité de piégeage dépend de plusieurs paramètres notamment : l'énergie de dissociation de la liaison O-H, le pH relatif à la constante d'acidité ( $K_a$ ), le potentiel de réduction ou encore la stabilité des radicaux antioxydants formés. Plus précisément, une faible énergie de dissociation de la liaison O-H, un pH neutre ou basique ou encore un faible potentiel réducteur sont favorables à l'activité de l'antioxydant. Des substituants (ex : carboxylique -COOH) en position para de la fonction hydroxyle favorisent plutôt la stabilité de l'antioxydant en comparaison avec l'espèce antioxydante sous forme radicalaire correspondante. Par conséquent, les propriétés de piégeage via la donation d'un hydrogène sont moins efficaces avec ce type de substituants.

Comme autre exemple, l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) et l'acide citrique sont des agents chélatants de métaux les plus communs dans le domaine alimentaire. Les flavonoïdes, les polyphénols, les lignanes peuvent également chélater des métaux.

Les propriétés antibactériennes et antioxydantes de ces diverses molécules (Tableau A-3) leur confèrent des applications dans un grand nombre de secteurs y compris la cosmétique et l'alimentaire. Leur utilisation est bénéfique pour maintenir la qualité des produits et permettre aussi une consommation prolongée. Cependant, des inconvénients, notamment leur caractère toxique, peuvent être soulignés et posent de plus en plus de problèmes. Cet aspect sera abordé dans la partie suivante.

Tableau A-3 : Exemples de conservateurs antimicrobiens et d'antioxydants couramment employés dans les produits cosmétiques et alimentaires.

Groupes chimiques	Source naturelle	Exemples de Structure chimique	Utilisations (cosmétique / alimentaire)		Activités	Références
Les Parahydroxy-benzoates d'alkyles (Parabènes) (éthyle, méthyle, propyle, butyle parabène)	Fruits, légumes (mûre, cassis oignons, carotte)	 <p>R = groupe alkyle</p>	maquillages (mascara, poudres) crème hydratante déodorants	sauces salades, crèmes, gelées, boissons	Antimicrobien Actif contre les bactéries (Gram+ et Gram-) Actif contre les champignons	63, 64
Les acides organiques et leurs sels (ex: acide sorbique, acide benzoïque, acide salicylique)	Plantes (le benjoin, les canneberges, le sorbier, la reine des près)	 <p>Acide benzoïque</p> <p>Acide sorbique</p>	shampoings, gel douches	boissons, viandes, crevettes	Antimicrobien Actif contre les bactéries (Gram+ et Gram-) Actifs contre les levures et les champignons	65, 66
Les cationiques - Les sels d'ammonium quaternaires (ex : le chlorure de cetrimonium, le chlorure de benzalkonium)  - Les sels de biguanides (ex : la Chlorhexidine)	-	<p><b>Chlorure de benzalkonium</b></p>  <p>n = 8, 10, 12, 14, 16, 18</p> <p><b>Chlorure de cetrimonium</b></p> 	shampoings, gel douche	-	Antimicrobien Actif contre les bactéries (Gram+ et Gram-) Actif contre les levures, champignons, virus	67, 68, 69

Groupes chimiques	Source naturelle	Exemples de Structure chimique	Utilisations (cosmétique / alimentaire)		Activités	Références
<p>Les aldéhydes et les générateurs de formaldéhyde (ex : méthanal, quaternium 15, urée diazolidinyle)</p>	<p>Environnement : le méthanal (issu de la combustion incomplète du bois)</p>	 <p>Méthanal Urée diazolidinyle</p>	<p>vernis à ongle, shampooing, lotions et crème hydratante, savons liquides, gels douches</p>	<p>-</p>	<p>Antimicrobien Actif contre les bactéries (Gram+ et Gram-)  Actif contre les levures, champignons, virus</p>	<p>70</p>
<p>Les agents chélatants (ex : l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA))</p>	<p>-</p>	 <p>EDTA</p>		<p>céréales, mayonnaise, conserve</p>	<p>Antimicrobien Antioxydant</p>	<p>71, 72</p>
<p>Le butylhydroxyanisole (BHA) Le butylhydroxytoluène (BHT)</p>	<p>-</p>	 <p>BHT</p>	<p>lotions, crèmes, gel pour les cheveux</p>	<p>huile végétale, pomme de terre</p>	<p>Antioxydant</p>	<p>73,74</p>
<p>Acide ascorbique (vitamine C) Vitamine E</p>	<p>Fruits, légumes (kiwi, orange, poivrons, noisette)</p>	 <p>Acide ascorbique</p>	<p>shampooing crème hydratante poudre, spray</p>	<p>huile végétale, céréales</p>	<p>Antioxydant</p>	<p>75, 76</p>

### 1.3.2 Toxicité des conservateurs et des antioxydants

Depuis quelques années, l'utilisation de certains conservateurs et d'antioxydants synthétiques est un sujet controversé. En effet, de nombreuses études mettent en avant la possible toxicité de ces molécules vis-à-vis de la santé humaine.

En prenant l'exemple des parabènes, ces composés sont soupçonnés d'être des perturbateurs endocriniens<sup>77</sup>. Darbre *et al.*<sup>77</sup> précisent que les composés de la famille des parabènes exercent une activité oestrogénique. Ces molécules vont pouvoir agir comme des ligands en se liant aux récepteurs des œstrogènes (hormones sexuelles) puis imiter les actions de ces dernières dans le corps. L'auteur indique que ces propriétés oestrogéniques ont largement été démontrées dans la littérature suite à de nombreux essais *in vitro* (24 sur un total de 25) et *in vivo* (23/30) réalisés sur des animaux (souris, rats) ou des tissus humains. Il met également en relation ces activités et leur possible influence sur le développement de cancers du sein ou de la peau. Les antioxydants tels que le BHA et le BHT sont suspectés d'être cancérigènes. Ito *et al.*<sup>78</sup> ont testé le pouvoir cancérigène du BHA sur des rats mâles et femelles. Ces derniers ont suivi un régime alimentaire contenant du BHA (forte dose) pendant plusieurs semaines. Ils ont été comparés avec des rats témoins, ayant consommés des nourritures dépourvues de BHA. Au bout de 112 semaines, tous les rats encore vivants ont été tués et examinés. Les auteurs ont observé dans le cas des animaux dont les aliments contenaient du BHA, la présence de tumeurs (hyperplasie, carcinome, papillome) dans leur pré-estomac. Dans le cas des rats témoins (mâles ou femelles), aucun changement n'a été observé au niveau de leur pré-estomac.

Un autre problème récurrent et concernant les conservateurs et les antioxydants est leur caractère allergène. Gultekinet *et al.*<sup>79</sup> expliquent que la consommation d'aliments contenant du BHA et du BHT pourrait conduire au déclenchement de l'urticaire. Le contact direct de la peau avec des produits contenant ces molécules entrainerait l'eczéma de contact. Les formaldéhydes ainsi que les produits libérateurs de formaldéhyde (ex : le quaternium 15, la diazolidinyl urée, le 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-Diol (Bronopol)) sont également connus comme des allergènes<sup>80,81</sup>.

### 1.3.3 Résistance aux antibactériens

Par ailleurs, de nombreux secteurs sont touchés par le problème de la multi-résistance des bactéries face aux antimicrobiens. Depuis longtemps, l'usage abusif et/ou les prescriptions incorrectes d'antibiotiques dans le domaine médical ainsi que la forte utilisation de ces derniers (agents préventifs) dans l'alimentation animale au sein des élevages

contribuent à une augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques<sup>82</sup>. Parmi les pathogènes Gram+, les exemples de *S.aureus* résistant à l'antibiotique méticilline ou encore les espèces Entérocoques résistantes à plusieurs antibiotiques dont la vancomycine peuvent être cités. Les Gram- tels que *P.aeruginosa* ou *Acinetobacter* représentent des menaces encore plus sérieuses car ils ont acquis des résistances à presque tous types d'antibiotiques actuellement disponibles. Par conséquent, les traitements de nombreuses maladies infectieuses deviennent inefficaces. Cela entraîne des taux de mortalité et des coûts économiques importants<sup>83</sup>.

Ces caractères d'adaptation des bactéries s'étendent également à des molécules biocides qui sont utilisées comme conservateurs ou désinfectants dans les domaines cosmétiques et alimentaires. Selvaraj *et al.*<sup>84</sup> démontrent le caractère de résistance de 9 souches testées Gram- (ex : *E.coli*) et Gram+ (ex : *S.aureus*) sur un total de 12 souches faces aux composés de la famille des parabènes (méthyle, éthyle, propyle et butyle parabène). Sundheim *et al.*<sup>85</sup> mettent en avant la résistance de *S.aureus* et de *P.aeruginosa* face au chlorure de benzalkonium.

Au vu des raisons évoquées, de toxicité des conservateurs d'une part et de la résistance des bactéries d'autre part, les scientifiques sont à la recherche d'alternatives aux molécules synthétiques dans divers domaines, dont la cosmétique et l'alimentaire. Il existe d'autres méthodes de conservation d'aliments et de produits cosmétiques qui seront décrites par la suite.

#### 1.3.4 Alternatives aux conservateurs synthétiques

La stabilité microbiologique d'un produit cosmétique ou alimentaire peut être assurée par différentes méthodes autres que l'utilisation de conservateurs chimiques. Ce sont pour la plupart des traitements physiques qui sont employés au cours de la production afin d'éliminer la quasi-totalité des microorganismes des produits finis. Ils reposent sur différentes techniques notamment : l'élimination de l'eau, la conservation par la chaleur, par le froid, l'ionisation et autres. Certains de ces procédés sont présentés par la suite.

##### - Élimination partielle ou totale de l'eau

Comme abordé dans les parties précédentes, la présence d'eau dans les aliments et les produits cosmétiques favorise les contaminations bactériennes. Une solution pour empêcher ces dernières est d'abaisser la teneur en eau (déshydratation partielle), autrement dit, de diminuer l'activité de l'eau ( $a_w$ ). Pour ce faire, certaines molécules humectantes telles que les glycols ou encore la glycérine sont parfois ajoutées dans les produits cosmétiques car elles

permettent d'abaisser leur  $a_w$ <sup>86</sup>. De plus, certains produits peuvent être fabriqués sans eau (déshydratation totale) comme par exemple des boissons en poudre, la purée, des soupes, du café ou encore du thé lyophilisé. Néanmoins, la déshydratation n'est pas toujours applicable. En effet, l'eau reste un élément important, naturellement présent dans la plupart des aliments. Elle influence leur structure, leur apparence et leur goût. Elle est également le constituant majeur de tous les cosmétiques et joue la plupart du temps le rôle de solvant.

- Conservation thermique

On peut également citer comme autre méthode de conservation, les procédés de stérilisation par la chaleur tels que l'UHT (Ultra Haute Température) et la pasteurisation. Dans le cas de l'UHT par exemple, un chauffage est réalisé entre 135 et 150°C pendant 1 à 5 s, suivi d'un refroidissement rapide et d'un conditionnement aseptique. Il est souvent utilisé pour les produits laitiers, des jus de fruits et des cosmétiques sous forme de fluides. Comme autre exemple de procédé utilisant la chaleur, on peut citer l'appertisation (mise en conserve) qui s'applique dans le domaine alimentaire. Les aliments (légumes, fruits, viandes et autres) sont placés dans des récipients étanches aux liquides ou aux gaz. Ils sont chauffés à des températures élevées (>100°C) afin de détruire la présence de microorganismes. Ces produits se conservent sur une longue durée (plusieurs années). Cependant, il faut noter que ces procédés ayant recours à l'utilisation de températures élevées peuvent entraîner des modifications de la composition chimique des produits traités ou encore altérer leur qualité sensorielle (l'odeur, le goût).

La conservation par le froid permet d'inhiber ou de bloquer la croissance des bactéries. L'exemple de la surgélation consiste à refroidir rapidement les aliments (ex : fruits, légumes) qui viennent d'être fraîchement cueillis à des températures très basses (-18 à -30°C). Cette technique présente l'avantage de ne pas altérer les éléments nutritionnels (vitamines, minéraux) des produits alimentaires. Cependant, une fois que les aliments sont décongelés, les micro-organismes qui ne sont pas détruits peuvent croître à des températures qui leur sont favorables.

- Conservation non-thermique

Par ailleurs, d'autres techniques non-thermiques peuvent être choisies telles que le traitement à haute pression (400 - 600 MPa)<sup>87</sup>. Il est utilisable uniquement sur des aliments solides ou liquides possédant une teneur importante d'humidité (environ 40% d'eau libre). Ce procédé peut conduire à la dénaturation des protéines des aliments.

Les techniques de filtrations membranaires sont également utilisées dans les domaines cosmétiques ou alimentaires et précisément sur des solutions liquides (eau, lotions, boissons, lait...). Il existe différents procédés de filtration qui varient en fonction de la taille des pores des membranes séparatives : l'osmose inverse, la nanofiltration, l'ultrafiltration et la microfiltration. Cette dernière (taille des pores 0,2 – 5 µm) est souvent employée pour assurer la qualité microbiologique des produits. Elle est réalisée à des températures comprises entre 40-50°C et à pression faible (~1 bar)<sup>88</sup>. C'est une méthode efficace qui permet d'enlever les bactéries (rétention sur la membrane séparative) présentes dans les liquides à stériliser. A la différence par exemple de l'UHT, la microfiltration permet de conserver les qualités sensorielles des produits. Cependant, d'un point de vue technique et industriel, l'accumulation de particules sur les membranes peut entraîner un colmatage de ces dernières et réduire les performances de la filtration. Le nettoyage et l'entretien régulier des membranes est long et coûteux.

Les traitements par irradiation de rayonnements UV ou encore ionisants (rayons gamma, particules bêta) peuvent également être employés<sup>89,90</sup>. Cependant ces techniques modifient également la composition chimique des produits ainsi que leurs propriétés organoleptiques. Elles conduisent à la perte d'éléments nutritionnels (altération des vitamines, dénaturation des protéines, enzymes, acides aminés).

Les conditions d'emballage permettent également de conserver les aliments ou les cosmétiques. Dans l'alimentation, le conditionnement sous vide peut être utilisé. Ce dernier consiste à placer les produits (fromages, poissons, viandes...) dans des emballages hermétiques puis à faire le vide à l'intérieur de l'emballage, ce qui entraîne une baisse du taux d'oxygène. Cette méthode empêche la dégradation des aliments causée par des réactions d'oxydation et également permet d'éviter la croissance de microorganismes aérobies (qui ont besoin d'oxygène pour se développer). Cependant, toutes les bactéries n'ont pas forcément besoin d'oxygène pour croître. Ces dernières peuvent alors contaminer les aliments emballés sous vide. Dans le domaine cosmétique, l'utilisation de flacons « airless » pour des produits avec des textures variées (fluide, crème) protègent ces derniers et limitent les contaminations dues au contact entre le contenu et l'air extérieur.

Par ailleurs, il faut également ajouter que pour des enjeux environnementaux mais aussi en raison de la possible toxicité des conservateurs de synthèses déjà évoquée ainsi que des effets néfastes qui en découlent : les secteurs de l'alimentaire et de la cosmétique biologiques sont en plein essor. De plus en plus de consommateurs alarmés se tournent vers l'utilisation de produits « bio » dépourvus de substances chimiques en attendant d'être

rassurés par les nombreuses recherches actuelles qui sont menées sur la toxicité des produits de synthèse ou qui visent à trouver des alternatives.

### Comment peut-on définir les aliments et les cosmétiques de type « bio » ?

Les produits alimentaires « bio » sont issus de l'agriculture biologique labélisée (AB). Elle est définie par le décret n° 81-227 du 10 mars 1981 comme : « une agriculture n'utilisant pas de produits chimiques de synthèse »<sup>91</sup>. Les techniques de production de ces produits « bio » sont définies par des cahiers des charges. Les aliments sont cultivés sans produits chimiques, sans organismes génétiquement modifiés (OGM) ou encore sans engrais modifiés. Tous les animaux sont nourris par des produits agricoles « bio ».

Les cosmétiques « bio » sont constitués d'ingrédients d'origine naturelle, principalement issus du monde végétal tels que les extraits de fruits, les huiles végétales (huile d'olive, argan, avocat) et les eaux florales. Ils sont plus concentrés en actifs que des cosmétiques classiques. Les fabricants limitent ou excluent l'utilisation de molécules telles que les parabènes ayant des effets nocifs sur le consommateur (allergie, cancer...), les matières premières non renouvelables (résidus de la pétrochimie) ainsi que les ingrédients obtenus par des procédés de fabrication non respectueux de l'environnement. Cependant des conservateurs plus doux peuvent être utilisés. Au niveau européen, tous les produits cosmétiques certifiés « bio » portent la mention Cosmetic Organic Standard (COSMOS) depuis janvier 2017 et répondent à des critères d'exigences. Ce type de cosmétiques doit contenir :

- 95 à 100% d'ingrédients naturels ;
- 95 à 100% d'ingrédients bio sur les ingrédients végétaux ;
- un maximum de 5% d'ingrédients approuvés dans une liste positive.

La teneur en ingrédients bio sur la totalité des ingrédients est de 20%. Tous les ingrédients acceptés doivent être biodégradables.

Il faut cependant noter que les produits « bio » présentent un problème de conservation notamment pour tous les produits riches en eau. Les aliments et cosmétiques bio possèdent une durée de vie plus limitée que les classiques. D'autres aspects tels que la forte concentration en principes actifs naturels (fragrances parfois trop marquées) ou encore des textures moins contrôlées comparées à celles des produits classiques peuvent être soulignés.

En conclusion, à ce jour, il existe différents moyens de luttés qui sont utilisés pour réduire les contaminations bactériennes ainsi que celles causées par les radicaux libres au sein des produits cosmétiques et alimentaires :



- l'utilisation d'agents conservateurs antimicrobiens et antioxydants synthétiques.

Ces derniers apparaissent très efficaces, cependant l'usage abusif au fil des années conduit à un problème de résistance de souches bactériennes (Gram+ et Gram-). De plus, certains de ces actifs sont suspectés d'avoir des effets néfastes sur la santé humaine en raison de leur possible caractère allergène, cancérigène ou encore perturbateur endocrinien. Ces polémiques inquiètent de plus en plus les consommateurs et favorisent l'utilisation de produits « bio » en attendant des solutions.

- les méthodes de conservations variées (élimination totale ou partielle de l'eau, conservation thermique, non-thermique).

Ces techniques de conservation qui ont été présentées ne sont pas applicables à tous types de produits alimentaires et cosmétiques (dont les formulations aqueuses) et s'avèrent également parfois moins efficaces que les conservateurs chimiques.

Pour toutes ces raisons, les scientifiques sont à la recherche d'autres alternatives. Nous aborderons en détails dans la partie suivante une solution aux conservateurs synthétiques qui suscite de plus en plus l'intérêt des scientifiques : l'utilisation de molécules d'origine naturelle pour la conservation.

## **2 La nature : source de molécules aux propriétés variées**

### **2.1 Origines, propriétés et applications**

Les animaux, les plantes, les minéraux ou encore les microorganismes (bactéries, champignons) renferment de nombreux composés à structures chimiques diverses<sup>92</sup>, souvent appelés métabolites secondaires<sup>93</sup>. Ces molécules possèdent des propriétés variées intéressantes (antimicrobienne, antioxydante, antivirale et autres) et sont parfois impliquées dans le mécanisme de défense<sup>94,95</sup> de l'organisme qui les contient. Afin de tirer profit de ces éléments bioactifs, de nombreuses recherches sont menées sur ces derniers en vue d'applications variées dans des secteurs tels que le médical, la cosmétique ou encore l'alimentaire.

#### **2.1.1 Animaux**

La plupart des molécules actives présentes chez les animaux sont retrouvées principalement sous formes de peptides (assemblage d'acide aminés) et de protéines (composées de polypeptides). Ces derniers proviennent de différentes sources comme par exemple les œufs, les cellules (épithéliales, macrophages, leucocytes et autres) ou encore les

organes (peau, muscle, intestin et autres) chez les bovins, la volaille, le porc ou le mouton<sup>96</sup>. Ces composés présentent des activités variées comme des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes ou encore antitumorales<sup>97</sup>. Plusieurs exemples de peptides et de protéines antimicrobiens à large spectre d'activité ont été mis en avant dans la littérature. Ils sont actifs contre les bactéries de type Gram+ et Gram- et agissent également contre les champignons et les virus. Il est possible de citer comme exemple : la pleurocidine<sup>98</sup>, les défensines<sup>99</sup>.

La caséine et le lactosérum (ou 'whey') sont les deux protéines principales retrouvées dans le lait chez les mammifères. Elles représentent également des sources abondantes de composés actifs (peptides, enzymes, protéines). Mohanty *et al.*<sup>100</sup> précisent que des peptides actifs peuvent être libérés à partir des protéines de lait par différents mécanismes (*in vivo* ou *in vitro*). Par exemple, au cours de la digestion du lait, ces molécules (ex : lactoferrine) sont formées à l'intérieur de l'organisme suite à l'action d'enzymes protéases (ex : pepsine, trypsine) sur les protéines. Elles vont être capables d'influencer les réponses physiologiques du corps humain (digestion, activité cardiovasculaire, système immunitaire) et ceci grâce à leurs propriétés antibactériennes, antioxydantes ou encore anti-hypertensives. Des essais cliniques *in vivo* et *in vitro* ont été réalisés et mettent en avant des composés actifs retrouvés dans le lactosérum (lactoferrine, immunoglobines) comme potentiels agents thérapeutiques dans le cas de traitements du cancer, de maladies cardiovasculaires, d'hépatites ou encore pour la perte de poids<sup>101</sup>.

### 2.1.2 Microorganismes

Dès le XX<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses molécules produites par des bactéries et des champignons telles que la pénicilline, la streptomycine, le chloramphénicol ou encore la tétracycline ont été découvertes. Ces dernières ont démontré des activités antibactériennes et de ce fait ont été largement utilisées en tant qu'antibiotiques<sup>102</sup> dans le domaine médical. En raison de la multi-résistance émergente des pathogènes face aux antibiotiques<sup>82</sup>, de nouvelles molécules sont recherchées comme alternatives dans le domaine médical ou comme agent de conservation dans le secteur alimentaire. Plus récemment, les bactéries ont suscité l'attention des chercheurs. En effet, ces micro-organismes (Gram- et Gram+) produisent des bactériocines qui constituent un groupe hétérogène de peptides avec des tailles, des structures et des modes d'actions variés<sup>103</sup>. Plusieurs bactériocines sont actives contre les pathogènes présents dans les aliments<sup>104</sup>. Parmi les plus étudiées, la nisine, la lacticine ou encore la pediocine peuvent être citées. Par exemple la nisine, (peptide de petite taille (34 acides aminés)) produit suite à la fermentation du lait à l'aide de la bactérie *Lactococcus lactis* (Gram+) est surtout connue pour son activité inhibitrice ou bactéricide contre les bactéries de

type Gram+ telles que *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* ou encore *Listeria*. Elle s'adsorbe à la surface de la cellule bactérienne et déstabilise la structure de la membrane cytoplasmique, en favorisant la perte de composés essentiels à la cellule<sup>105</sup>. Cependant, elle n'est pas active contre les Gram- ni contre les champignons ou encore les virus. La nisine est fabriquée industriellement et largement utilisée comme agent de conservation dans l'alimentation, notamment dans les produits laitiers : le fromage fondu ou en bloc, les crèmes desserts, la crème fraîche<sup>104</sup> ou encore dans les viandes et boissons.

En addition aux bactériocines, les microorganismes sont également capables de produire d'autres types de molécules actives notamment les acides organiques<sup>106</sup>. Parmi eux, comme exemple : l'acide acétique est le résultat de la fermentation de l'éthanol à l'aide de bactéries acétiques (Gram-). Il est également possible de citer l'acide lactique obtenu par la transformation de lactose grâce aux bactéries lactiques (Gram+). L'acide citrique quant à lui peut être synthétisé par des champignons (ex: *Aspergillus niger*) à partir de glucose. In *et al.*<sup>107</sup> ont mis en évidence les activités antibactériennes de ces trois composés face à quatre bactéries du genre *Shigella* (Gram-) souvent responsables de maladies alimentaires en raison de leur présence dans des fruits et légumes frais. Les activités antibactériennes de cette famille de composés ont de plus été démontrées face à des bactéries pathogènes classiques (Gram+ et Gram-) telles que *S.aureus* et *E.coli*<sup>108</sup>.

### 2.1.3 Minéraux

Les éléments constitués d'un ou de plusieurs minéraux peuvent être classés en plusieurs groupes tels que : les oxydes (ex : le rutile) ; les sulfates (la zincosite) ; les chlorures (la halite), les nitrates (le salpêtre) ou encore les phyllosilicates (le talc). Ils présentent des propriétés physiques (mécanique, optique, thermique), physico-chimiques (solubilité) variées<sup>109</sup> ainsi que diverses propriétés thérapeutiques<sup>110,111</sup>. Ils sont employés pour tous ces atouts en tant qu'excipients (lubrifiants, pigments, émulsifiants et autres) ou encore en tant que composés actifs dans des produits pharmaceutiques et cosmétiques (suspensions, solutions, lotions, poudres, crèmes). Carretero *et al.*<sup>110</sup> explicitent dans leurs travaux, les différentes activités thérapeutiques exercées par les minéraux. Lorsqu'ils sont administrés par voie orale, ils remplissent des fonctions telles que : antidiarrhéique, laxatif, protecteur de l'appareil digestif. Lorsqu'ils sont appliqués localement, ils agissent comme des antiseptiques, des désinfectants et protègent la peau contre des agents chimiques ou physiques extérieurs. Dans les produits cosmétiques, ils peuvent agir comme protecteurs solaires en empêchant la pénétration de rayonnement UV au travers de la peau.

Seil *et al.*<sup>112</sup> ont aussi exploré leur potentielle utilisation dans le domaine médical en mettant en avant des propriétés antibactériennes contre les Gram+ et Gram-.

#### 2.1.4 Algues

Les algues renferment également de nombreux composés à structures chimiques variables tels que : des phlorotannins, des acides gras, des peptides, des polysaccharides ou encore des terpènes. La plupart de ces molécules participent à la survie des végétaux aquatiques en assurant leur adaptation dans les environnements marins et leur défense contre des microorganismes pathogènes (bactéries, virus, moisissures) auxquels ils sont exposés grâce à des mécanismes variés<sup>113</sup>. De nombreuses propriétés de ces molécules : antibactériennes, antifongiques, antivirales ou encore antioxydantes sont mises en avant dans la littérature<sup>114,115</sup>. Ces dernières années, de nombreuses recherches s'orientent vers l'utilisation de ces composés actifs dans des applications industrielles variées. Thomas *et al.*<sup>116</sup> proposent différents exemples de molécules retrouvées dans les algues qui présentent des propriétés intéressantes en vue d'utilisations futures dans les secteurs cosmétiques et pharmaceutiques. Ils soulignent les effets anti-inflammatoires des dérivés phlorotannins qui permettraient de traiter la dermatite atopique qui est une pathologie allergique touchant la peau. Ils proposent également l'utilisation d'un polysaccharide sulfaté (le fucoïdane) comme un potentiel agent thérapeutique pour empêcher et traiter le photoveillissement de la peau causé par les rayonnements UV. Dussault *et al.*<sup>117</sup> ont évalué l'activité de différents extraits d'algues consommés dans les îles du Pacifique contre des pathogènes d'origine alimentaire (Gram+ et Gram-) tels que *S.aureus*, *L.monocytogenes* ou encore *E.coli*. Ils ont ainsi pu retenir certains extraits (*Ulva* et *Padina*) comme potentiels agents de conservation dans l'alimentation.

Les plantes terrestres représentent également une source importante de composés actifs. Nous allons détailler dans la partie suivante les différentes familles de molécules retrouvées dans les plantes ainsi que les propriétés variées qu'elles possèdent.

## 2.2 Dérivés des plantes et utilisations

### 2.2.1 Familles chimiques variées et propriétés

Les métabolites secondaires des plantes sont rencontrés dans divers organes tels que les feuilles, les fruits ou encore les racines. Ils sont extraits sous forme d'huiles essentielles (mélange complexe de composés à structures chimiques variées) ou de composés individuels

à l'aide de différentes méthodes. Azmir *et al.*<sup>118</sup> indiquent plusieurs techniques d'extractions. Les plus conventionnelles sont : l'extraction au Soxhlet, la macération et l'hydrodistillation. Ces méthodes requièrent la plupart du temps l'utilisation de solvants organiques à polarités variées tels que l'éthanol, l'acétone, le chloroforme ou encore le dichlorométhanol. Cependant, elles présentent des limites comme par exemple un temps d'extraction long, l'exigence de solvants très purs et coûteux, une faible sélectivité d'extraction ou encore de faibles rendements. Pour se défaire de tous ces inconvénients, d'autres techniques non conventionnelles telles que l'extraction assistée par ultrasons ou par enzymes ou encore l'extraction par un fluide supercritique peuvent également être employées.

Des méthodes d'analyses modernes<sup>119</sup> comme la chromatographie liquide haute performance (HPLC), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), l'infrarouge ou encore la RMN permettent de séparer, d'identifier et de déterminer les structures chimiques exactes des composés actifs présents dans les végétaux. La plupart de ces molécules présentent un caractère hydrophobe. Croteau *et al.*<sup>120</sup> distinguent trois principales familles chimiques : les terpènes et les terpénoïdes ; les alcaloïdes ; les composés phénoliques.

#### - **Terpènes et les terpénoïdes**

Les terpènes sont les constituants majeurs retrouvés dans les huiles essentielles. Ce sont des hydrocarbures dont le squelette est formé de  $n$  multiples d'unités de répétition isoprène  $(C_5H_8)_n$ . Ces motifs sont reliés entre eux de différentes manières (tête à tête, tête à queue, tête à milieu) pour donner naissance à des composés cycliques ou non appartenant à des familles variées. On distingue par exemple les monoterpènes de formule  $C_{10}H_{16}$  ( $n = 2$ ), les sesquiterpènes  $C_{15}H_{24}$  ( $n = 3$ ) ou encore les diterpènes  $C_{20}H_{32}$  ( $n = 4$ ).

Les terpénoïdes sont des molécules dérivées de terpènes qui diffèrent les unes des autres par la présence de groupes fonctionnels (aldéhydes, cétones, esters ou alcools) mais aussi pour la plupart par leur structure multicyclique.

Ces molécules notamment les mono et sesquiterpènes de faibles masses molaires présentent un caractère volatil et possèdent des propriétés odoriférantes. Il est possible de citer comme molécules : le menthol (feuille de menthe), le thymol (thym), le limonène (citron et orange) ou encore le géraniol (essence de rose, de lavande). Si la plupart des terpènes sont insolubles dans l'eau, les dérivés terpénoïdes avec la présence de groupes oxygénés possèdent une meilleure solubilité dans l'eau<sup>121,122</sup>.

Les terpènes et les terpénoïdes sont également connus pour leurs propriétés biologiques et antioxydantes<sup>123,124</sup>. Aleksic *et al.*<sup>124</sup> mentionnent des propriétés antimicrobiennes dans le cas des monoterpènes (ex : le limonène) et antivirales pour les sesquiterpènes (ex : le germacrène-D). De plus, ils précisent dans le cas des terpénoïdes, des propriétés antibactériennes exercées par des monoterpènes oxygénés (ex : le linalol) et des activités antimicrobiennes exercées par les sesquiterpènes oxygénés (ex : le géraniol). Trombetta *et al.*<sup>125</sup> ont démontré l'activité antibactérienne de trois monoterpènes (acétate de linalyle, (+) menthol, thymol) contre *S.aureus* et *E.coli*. Les auteurs ont également explicité le mécanisme d'action de ces composés en prouvant leur capacité à interagir avec les lipides de la membrane des bactéries. Ceci pourrait entraîner l'augmentation de la perméabilité de la membrane et la perte des matériels intracellulaires.

#### - Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques basiques qui contiennent tous au moins un voire plusieurs atomes d'azote, retrouvés sous la forme primaire, secondaire ou tertiaire. Ils présentent une diversité de structure<sup>126</sup> avec un ou plusieurs cycles. Ils sont classifiés chimiquement en deux grands groupes : les alcaloïdes hétérocycliques, dont le ou (les) atome(s) d'azote sont à l'intérieur du cycle et les alcaloïdes non-hétérocycliques dont les atomes d'azote ne sont pas inclus dans les noyaux cycliques<sup>126</sup>. Ils peuvent être également regroupés selon leur origine biosynthétique, précisément en fonction des acides aminés précurseurs à partir desquels ils sont obtenus. Parmi ces derniers, sont retrouvés le plus souvent : l'histidine, le tryptophane, la phénylalanine, l'ornithine ou encore la lysine.

D'un point de vue propriétés physiques, la plupart des alcaloïdes sont des solides cristallins, non-colorés. D'autres se présentent sous forme de liquides volatils (ex : la nicotine) ou non-volatils (ex : la pilocarpine). La plupart de ces composés sont hydrophobes et extraits à l'aide de solvants tels que le chloroforme, le benzène ou encore l'éther<sup>127</sup>.

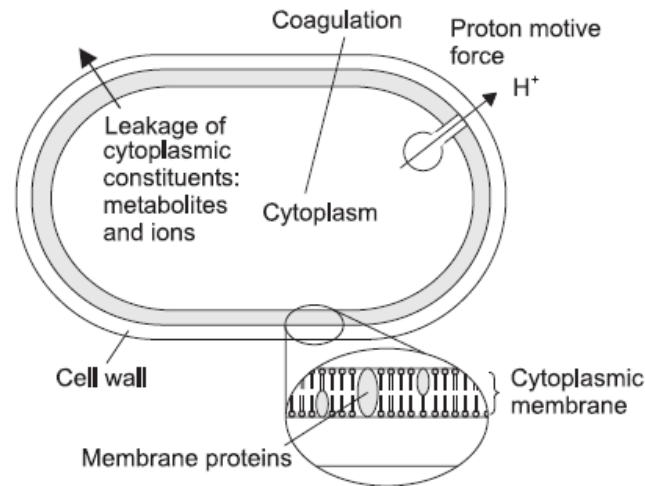
Ils sont connus pour leurs nombreuses propriétés pharmacologiques<sup>126,128</sup>. Cushnie *et al.*<sup>126</sup> indiquent des effets analgésiques (ex : la codéine), antihypotensif (ex : l'éphédrine), antitumoral (ex : la vinblastine) ou encore antipaludique (ex : la quinine). De plus, les auteurs ont mis en avant des activités antibactériennes (Gram- et Gram+) d'alcaloïdes appartenant à des familles différentes, ainsi que des mécanismes d'action variés. A titre d'exemple, la classe des isoquinolines (dérivés de la tyrosine) semblent agir en inhibant le processus de division cellulaire des bactéries.

## - Les composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent une diversité structurale chimique. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un cycle benzénique (6 carbones) sur lequel sont directement reliées une ou plusieurs fonctions hydroxyle (OH) sous forme libre ou engagée dans un groupement éther ou ester. Ils sont tous regroupés sous le nom de polyphénols et varient du simple composé phénolique aux molécules phénoliques complexes. Parmi les polyphénols simples, formés d'un ou de plusieurs cycles, sont retrouvés : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les coumarines. Les polyphénols complexes sont des molécules hautement polymérisées telles que la lignine ou les tanins<sup>129,130</sup>. De part la présence de structures aromatiques, ces composés présentent un caractère hydrophobe mais également un caractère hydrophile en raison de la présence de fonctions hydroxyle<sup>131</sup>. Galanakis *et al.*<sup>132</sup> précisent que les composés phénoliques ont une préférence de solubilité dans les solvants avec une polarité intermédiaire (les alcools et l'acétone) comparé aux solvants très polaires (l'eau) ou moins polaires (dichlorométhane).

La plupart des composés phénoliques sont largement connus pour leurs propriétés antioxydantes. Pereira *et al.*<sup>133</sup> explicitent les mécanismes antioxydants au moyen de différentes voies. Ces composés peuvent agir en tant que donneurs d'atome d'hydrogène vis-à-vis d'espèces radicalaires réactives. Ils sont également capables d'agir en tant qu'agents chélatants d'ions métalliques ou encore interagir avec des enzymes qui sont impliquées dans la production de radicaux libres. Les polyphénols présentent également des activités biologiques. Li *et al.*<sup>134</sup> mettent en avant des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses ou antimicrobiennes. En s'intéressant particulièrement aux polyphénols simples, notamment aux composés phénoliques formés d'un seul cycle tels que : le carvacrol, le thymol ou encore l'eugénol, plusieurs études ont mis en avant leur potentiel antibactérien face à des souches bactériennes Gram+ et Gram-. Les essais biologiques ont été réalisés soit sur des huiles essentielles (riches en composés phénoliques) ou directement à partir des composés individuels<sup>135</sup>. Les mécanismes d'action de ce type de molécules sont explicités par différents auteurs<sup>136,137</sup>. Les idées mises en avant sont complémentaires et conduisent à des conclusions similaires détaillées par la suite.

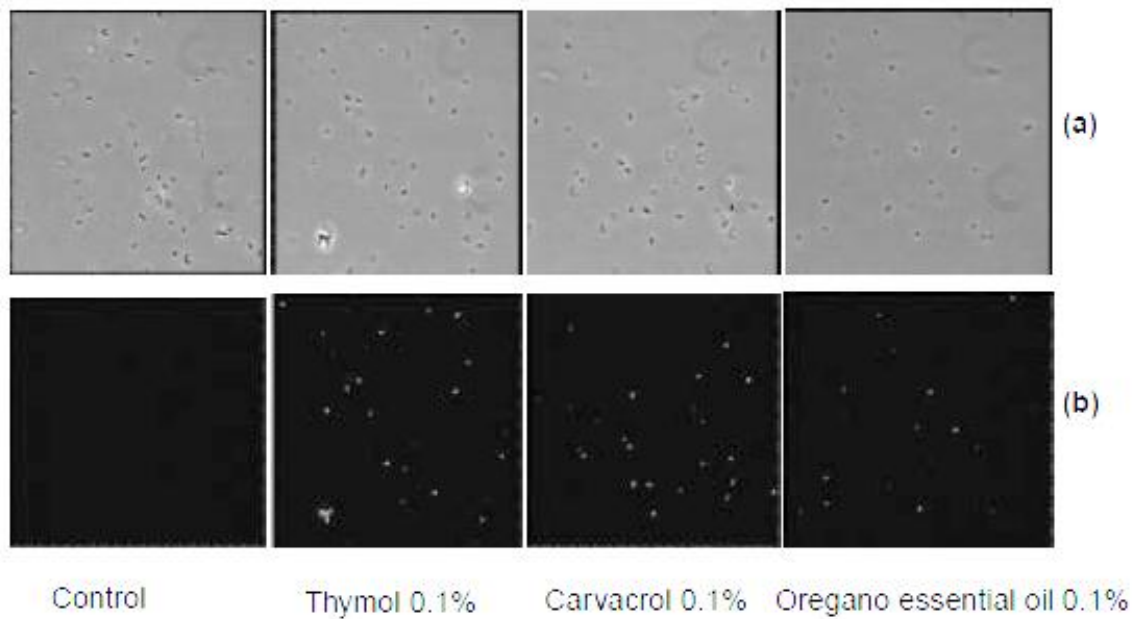
D'une manière générale, Burt<sup>136</sup> considère que le mécanisme d'action des huiles essentielles possédant un pourcentage élevé en monophénol est similaire à celui d'un composé monophénol seul. Ces derniers sont capables d'agir sur différents sites au niveau de la cellule bactérienne comme présenté sur la Figure A-3.



**Figure A-3** : Sites d'action et mécanismes d'action des composants des huiles essentielles dans la cellule bactérienne (d'après Burt S.<sup>136</sup>).

Le paramètre important qui est à souligner dans le mécanisme d'action des composés phénoliques simples est leur caractère hydrophobe<sup>136</sup>. Ce critère favorise le passage de la molécule au travers de la paroi cellulaire et la pénétration de cette dernière à l'intérieur de la membrane plasmique de la cellule bactérienne. L'interaction d'un monophénol avec la membrane conduit à la déformation (ou désorganisation) de structures telles que les phospholipides (bicouche phospholipidique) ou encore les chaînes d'acides gras. La membrane est ainsi déstabilisée et devient plus perméable. Lambert *et al.*<sup>137</sup> confirment l'augmentation de la perméabilisation de la membrane plasmique due à la présence de monophénols par différents tests. Ils ont par exemple étudié à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (CLSM) la possible pénétration d'un marqueur fluorescent (le bromure d'éthidium EB) au travers de la membrane de cellules bactériennes *P.aeruginosa* et ce, précisément en absence ou en présence d'huiles essentielles d'origan, de thymol ou de carvacrol. Les auteurs ont conclu qu'en présence d'agents antibactériens après comparaison avec le contrôle (sans agent actif), l'EB était capable de traverser la membrane pour aller marquer les cellules mortes (cellules observables par CLSM). Dans le cas du contrôle, aucune cellule n'a été observée en présence de l'EB comme représenté sur la Figure A-4. Cela sous-entend que l'EB n'a pas pu traverser la membrane (encore intacte) de la cellule bactérienne *P.aeruginosa*.



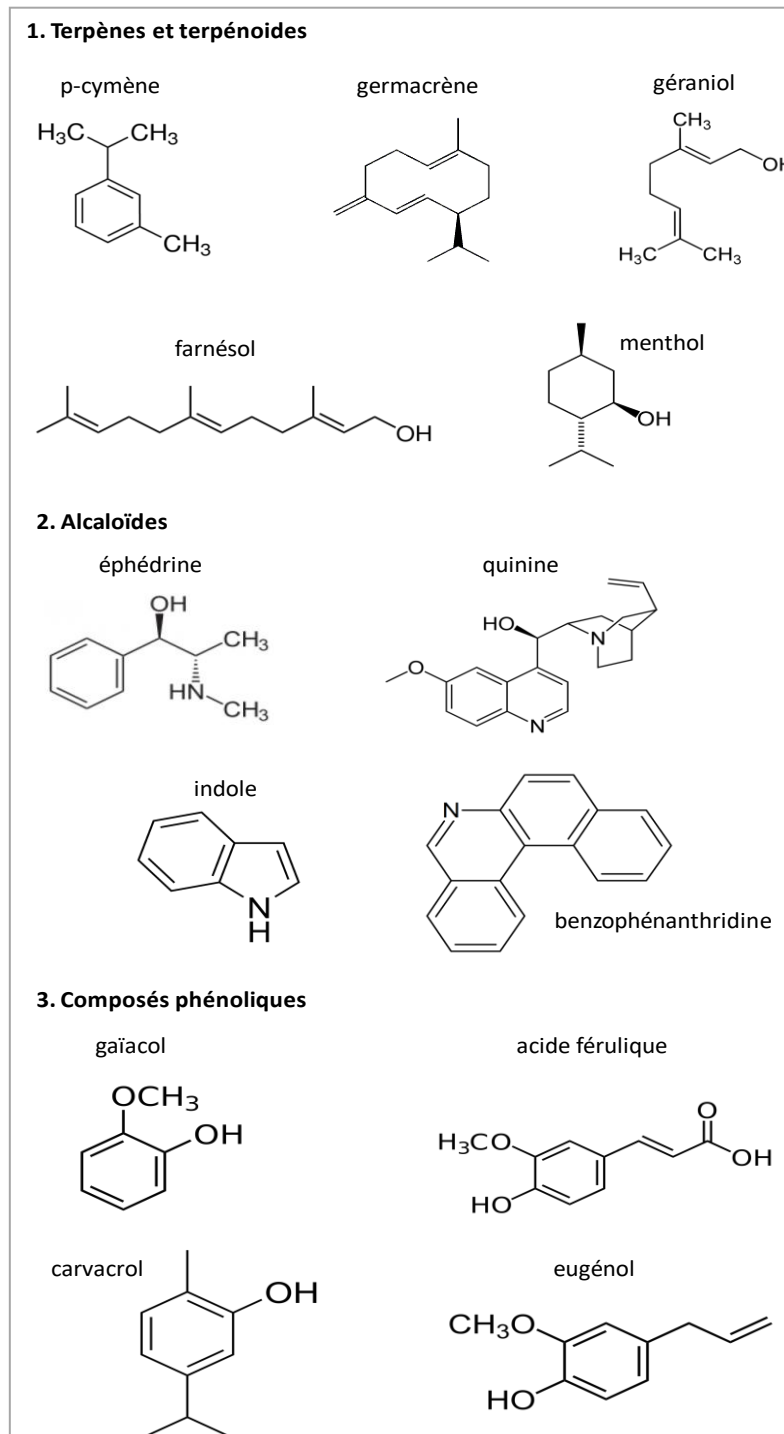


**Figure A-4 :** Résultats illustrant l'effet de l'exposition de l'huile essentielle d'origan (0,1%), du thymol (0,1%) et du carvacrol (0,1%) sur la perméabilité de la membrane de cellules individuelles de *Pseudomonas aeruginosa* dans le milieu de culture Tryptone Soya Broth, TBS (pH 7,0) par CSLM ; contraste de phase (a) et images d'épigluorescent (b) ± ligne d'excitation 488 nm (colorant nucléaire fluorescent : bromure d'éthidium ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) (d'après Lambert *et al*<sup>137</sup>).

Par ailleurs, la déstabilisation de la membrane conduit également à une baisse du potentiel membranaire ou encore à une diminution de la force proton motrice (ainsi que de la production de l'adénosine triphosphate ATP). Il peut également se produire une fuite d'ions (ex : potassium  $\text{K}^+$ ), d'acide nucléique ou encore d'acide aminés de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane.

Le tableau A-4 regroupe quelques exemples de structures de terpènes et terpénoïdes, d'alcaloïdes et de composés phénoliques.

**Tableau A-4 : Exemples de structures de terpènes et terpénoides, d'alcaloïdes et de composés phénoliques.**



Nous allons par la suite nous intéresser aux domaines actuels d'utilisation des divers actifs issus des végétaux.

## 2.2.2 Utilisation actuelle des dérivés des plantes

Les plantes, les huiles essentielles (mélange de composés) ainsi que les composés individuels qu'elles renferment sont utilisés à des fins multiples en raison de leurs propriétés variées comme abordé précédemment.

### - Nutrition

Le constituant principal d'origine végétale pour l'alimentation humaine est sans conteste l'amidon en tant que source de sucres lents nécessaires à l'apport énergétique quotidien. On trouve l'amidon (amylopectine et amylose) dans la plupart des céréales, tubercules et légumineuses. Mais par ailleurs l'homme consomme également un large éventail de fruits et légumes importants dans l'équilibre alimentaire. Ce sont les polyphénols qui sont le plus retrouvés dans ces aliments et jouent des rôles bénéfiques pour la santé humaine grâce notamment à leurs propriétés antioxydantes. Ces composés peuvent également être utilisés sous forme de compléments alimentaires.

Les herbes et les épices qui renferment des aromates (notamment les terpènes) sont également employés à ce jour pour agrémenter et parfumer les plats cuisinés.

### - Fins médicinales

Depuis l'antiquité, plusieurs peuples (Grecs, Romains, Chinois...) utilisaient de manière traditionnelle (empirique) les plantes afin de se soigner<sup>138</sup>. De nombreux recueils indiquent les bienfaits de ces dernières ainsi que leur mode d'utilisation. Ce n'est qu'à partir du XIX<sup>ème</sup> siècle que la médecine connaît un essor et identifie les principes actifs permettant de guérir les maux des hommes. La plupart des composés découverts sont des alcaloïdes comme par exemple la morphine (pavot à opium) isolée par Friedrich Wilhelm Sertürner<sup>139</sup>, ou encore la quinine (écorce de quinquina) isolée par Pelletier et Caventou<sup>140</sup>. On retrouve également des composés phénoliques tels que l'acide salicylique (écorce de saule blanc) découverte par Pierre-Joseph Leroux<sup>141</sup>. Certaines de ces molécules aux propriétés thérapeutiques sont encore employées en médecine moderne à ce jour en tant que médicament. Notamment la quinine pour traiter le paludisme ou encore l'acide acétylsalicylique (aspirine) dérivé de l'acide salicylique. Depuis, de nouvelles molécules continuent d'être extraites et employées.

Cependant, il existe aujourd'hui d'autres moyens pour tirer profit et se soigner avec les végétaux. La phytothérapie est une branche de la médecine qui utilise des plantes dites « médicinales » afin de traiter ou de soulager des maux de tous les jours (insomnie, toux,

angine, troubles digestifs...). Cette branche s'inspire de la médecine traditionnelle et des nombreux principes actifs isolés en médecine moderne.

Les plantes ou partie de la plante (feuilles, fleurs, herbes...) sont utilisées par exemple sous forme de gélule ou de tisane.

#### - **Le bien-être**

L'aromathérapie est une discipline qui met en avant l'utilisation d'extraits aromatiques de plantes, précisément des huiles essentielles. Ces dernières sont utilisées pour la santé physique et mentale, afin de procurer à l'utilisateur une sensation de bien-être. Les huiles essentielles sont vendues en pharmacie ou chez des herboristes. Elles peuvent être appliquées en usages externes : massage, diffuseur électrique, spray. Pour des usages internes, elles sont administrées par voie orale après avoir été dispersées dans du miel ou de l'huile alimentaire... Mais les champs d'applications restent encore restreints.

#### - **Autres**

A titre d'exemple, certains composés phénoliques tels que l'eugénol (extrait de clou de girofle) servent d'agents antiseptiques locaux ou encore anesthésiques et sont utilisés en dentisterie. Les huiles essentielles peuvent également être insérées au sein de cosmétiques tels que les pâtes dentifrices, les bains de bouches pour leur parfum et/ou leurs propriétés antibactériennes.

Aujourd'hui, les champs d'applications des dérivés des plantes restent encore restreints, notamment en tant que conservateurs en cosmétique et alimentaire et ce en raison de certains inconvénients qu'ils présentent. Ces points faibles seront abordés dans la partie suivante.

### **2.2.3 Inconvénients des dérivés des plantes**

Les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des actifs des végétaux peuvent être bénéfiques en vue d'applications de ces molécules en tant qu'agents conservateurs au sein d'aliments et de cosmétiques. Cependant leur introduction en tant que composés libres dans les produits de consommation n'est pas toujours facile à mettre en œuvre en raison de quelques inconvénients.

La plupart de ces composés possèdent en effet une faible solubilité dans l'eau ce qui est un facteur limitant notamment dans des formulations aqueuses cosmétiques et/ou alimentaires. De plus, les molécules phénoliques de faibles masses molaires sont considérées comme chimiquement instables dans des environnements variés. Dias *et al.*<sup>142</sup> soulignent

plusieurs facteurs conduisant à la détérioration de ces composés phénoliques actifs lorsqu'ils sont insérés directement dans les produits. Il est possible de citer : les étapes de fabrication et de traitements des produits, les procédés thermiques, les étapes de stockage (effet du pH<sup>143</sup> et la température<sup>144</sup>), la pression en oxygène, l'activité de l'eau, la possible interaction des composés actifs avec d'autres molécules contenues dans les formulations.

Munin *et al*<sup>145</sup> mentionnent le gout amer retrouvés chez quelques molécules dérivées de plantes qui n'est également pas avantageux d'un point de vue organoleptique pour des applications en alimentaires.

Quelques études ont également démontré le potentiel effet toxique des molécules végétales, notamment le caractère allergène<sup>146</sup> de certains composés phénoliques. La consommation d'aliments dans lesquels ils sont présents va conduire, chez des sujets sensibles, à l'apparition de certains symptômes allergiques. Parmi ces derniers, la fatigue chronique, l'insomnie, les douleurs abdominales, la diarrhée, la nausée, l'asthme, les problèmes dermatologiques ou encore des troubles menstruels.

En somme, les dérivés actifs des plantes présentent des propriétés intéressantes (antibactériennes, antivirales, antifongiques, antioxydantes et autres) mais également certains inconvénients (faible stabilité, faible durabilité, hydrophobie, toxicité). Ces derniers limitent leurs secteurs d'applications. L'une des alternatives est l'incorporation de ces molécules notamment de faibles masses molaires au sein de structures polymères. Le choix de ces dernières se tourne de plus en plus vers des polymères naturels, plus précisément des polysaccharides.

Nous allons par la suite définir les polysaccharides et aborder certaines propriétés qu'ils possèdent et qui leur permet de trouver aujourd'hui des applications dans des secteurs variés dont l'alimentaire et la cosmétique.

## **2.3 Polysaccharides**

### **2.3.1 Définitions**

Les polysaccharides sont des polymères (macromolécules) naturels. Ils sont d'origine végétale (amidon), animale (chitosane), bactérienne (xanthane) ou fongique (pullulane).

Ils sont constitués d'unités monosaccharides ou oses (sucres), reliées entre elles par des liaisons osidiques et répétées  $n$  fois. Une classification chimique permet de distinguer deux grands types de polysaccharides :

- les homopolysaccharides formés d'un seul type de monosaccharide;
- les hétéropolysaccharides constitués de plusieurs unités d'oses différents.

Certains polysaccharides tels que le pullulane, le dextrane sont neutres ; d'autres sont chargés (polyélectrolytes). Parmi les polyélectrolytes, on retrouve principalement les polysaccharides anioniques (chargés négativement) portant sur leur squelette carboné des fonctions acide carboxylique tels que l'alginate ou l'acide hyaluronique mais aussi parfois des fonctions sulfates comme les carraghénanes. Les polysaccharides cationiques (chargés positivement) sont beaucoup plus rares, citons le chitosane qui possèdent des fonctions amine facilement protonables mais qui est un polysaccharide artificiel car obtenu après traitement de la chitine neutre et insoluble dans l'eau. D'un point de vue structural, les polysaccharides peuvent être soit linéaires tels que le pullulane, le chitosane ou encore l'acide hyaluronique, soit ramifiés tels que l'amylopectine, le dextrane, le xanthane.

La plupart de ces macromolécules naturelles sont hydrosolubles car portant un grand nombre de fonction hydroxyle, cependant certains polysaccharides sont très peu ou pas solubles dans l'eau en raison de structures particulières (ex : cristallinité de la cellulose) ou de fonction chimique spécifique ex : (acétylamine dans la chitine).

A titre d'exemple, la cellulose est le polymère naturel le plus abondant dans la nature. C'est un homopolysaccharide linéaire constitué d'unités glucose reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ -(1,4)-glycosidiques. Il possède des fonctions hydroxyle neutres (Figure A-5). Sa solubilité dans l'eau est considérablement limitée en raison de la grande stéréorégularité de l'enchaînement des sucres et des nombreuses liaisons hydrogène intermoléculaires conférant une grande cristallinité à ces structures.

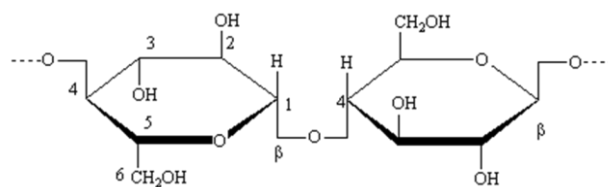


Figure A-5 : Structure chimique de la cellulose

### 2.3.2 Propriétés et utilisations des polysaccharides

Les polysaccharides présentent des critères intéressants qui suscitent un grand intérêt pour leur application dans des secteurs variés : agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, industrie du papier, du textile et autres.

Ce sont des polymères naturels, hydrosolubles, biodégradables et biocompatibles<sup>147,148</sup>. Ils sont connus et utilisés dans l'alimentaire pour leurs propriétés remarquables en solution, notamment épaississantes (ex : le xanthane, la gomme de guar, la carboxyméthylcellulose) et gélifiantes (ex : l'alginate, la pectine, l'agar)<sup>149</sup>. Saha *et al.*<sup>149</sup> précisent d'une part que l'épaississement d'une solution de polysaccharide nécessite l'établissement d'enchevêtrements non-spécifiques entre les chaînes du polysaccharide qui se présentent sous formes de pelotes statistiques en solution. Ce processus dépend d'une manière générale de plusieurs paramètres tels que : la nature du polysaccharide, la concentration d'étude, la masse molaire, la température et/ou le pH. En dessous de la concentration critique de recouvrement en polymère notée  $C^*$  (régime dilué), les pelotes (constituées d'une chaîne de polysaccharide) sont libres de leur mouvement en solution. Au-dessus de  $C^*$ , les pelotes commencent à entrer en contact. Cette transition marque le début du procédé d'épaississement. Avec la concentration en polysaccharide qui augmente, les chaînes possèdent des mouvements de plus en plus restrictifs et ralentis, elles vont s'enchevêtrer. Le comportement épaississant peut alors être évalué par des mesures rhéologiques. A une concentration en polysaccharide  $C < C^*$ , un comportement newtonien de la solution (indépendant du cisaillement) est généralement observé. A  $C > C^*$ , un comportement rhéofluidifiant est souvent observé (la viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente).

La formation d'un gel physique implique quant à elle l'établissement d'interactions spécifiques entre les chaînes de polymères conduisant à la création de zones de jonctions. Un réseau tridimensionnel est ainsi obtenu qui contient une très grande quantité de solvant dans ses interstices. Les auteurs soulignent que la gélification d'hydrocolloïdes (ici polysaccharides) peut s'établir selon trois mécanismes différents : la gélification ionotropique, la gélification à froid ou à chaud. Par exemple, l'alginate est un polysaccharide anionique (portant des fonctions  $\text{COO}^-$ ) qui a la capacité de former des gels en présence de cations divalents (ex :  $\text{Ca}^{2+}$ ). Cette gélification de type ionotropique est établie suite à des interactions entre les fonctions  $\text{COO}^-$  du polysaccharide et les charges positives des cations. Cela conduit à la formation de structures organisées et appelées le plus souvent « boîtes à œufs ».

En dehors des aspects épaississants ou gélifiants, de nombreux polysaccharides présentent des activités biologiques. Liu *et al.*<sup>150</sup> mentionnent des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses, antivirales, antioxydantes notamment pour plusieurs polysaccharides provenant de diverses espèces d'algues. On peut citer comme exemple d'antioxydants, le fucoïdane ou encore l'alginate provenant d'algues brunes. Des études ont également rapporté l'activité antimicrobienne de polysaccharides présents chez certains

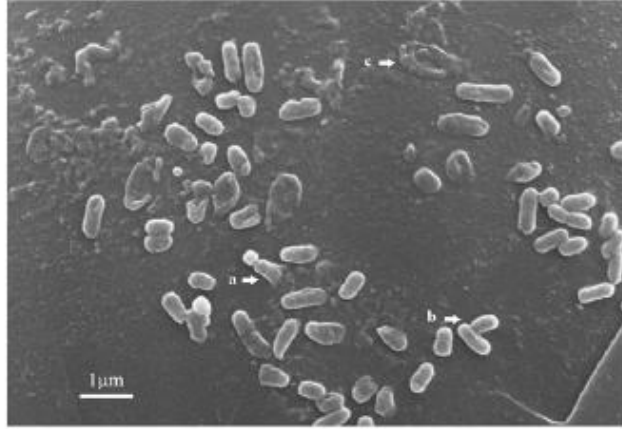
animaux. L'exemple du chitosane, extrait de la carapace des crustacés est bien documenté dans la littérature. Il est actif contre des pathogènes classiques tels que *S.aureus*, *E.coli* mais également contre des champignons<sup>151</sup>. Comment les auteurs expliquent-ils ces propriétés antimicrobiennes (précisément antibactériennes) du chitosane ?

D'une manière générale, les cellules des bactéries (gram+ et gram-) possèdent des surfaces chargées négativement. Plus précisément dans le cas des gram+, les auteurs indiquent la présence d'un polymère anionique (l'acide téichoïque) au niveau de la paroi. Chez les gram-, au niveau de la membrane externe, il y'a présence de lipopolysaccharides (LPS) contenant des groupements anioniques phosphates et carboxyliques. Kong *et al.*<sup>151</sup> précisent que le mode d'action du chitosane dépend de plusieurs paramètres tels que des facteurs environnementaux (ex : le pH), intrinsèques au chitosane (densité de charge positive, masse molaire  $M_w$ , capacité d'agent chélatant) ou encore de l'état physique du chitosane. Plus précisément, pour un pH inférieur au pKa du chitosane, le paramètre clé pour l'activité antibactérienne est l'établissement d'interactions électrostatiques entre les groupements ammonium positifs ( $\text{NH}_3^+$ ) du chitosane et les groupements anioniques des surfaces des cellules bactériennes. Pour un pH > pKa, ce sont les effets hydrophobes et la capacité d'agent chélatant (jouer par le chitosane) qui permettront l'activité antibactérienne de ce dernier.

De plus, le chitosane peut agir de différentes manières sur les cellules bactériennes : soit en restant à la surface de ces dernières ou encore en pénétrant à l'intérieur des cellules. Pour aller plus loin, les auteurs évoquent différents modes d'actions en prenant en considération l'état physique du polymère mais également sa masse molaire  $M_w$ . Dans le cas du chitosane (ou d'un dérivé du chitosane) soluble dans l'eau et présentant de faibles masses molaires, le polymère testé est capable de pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne et d'aller interagir avec les composés cellulaires tels que l'ADN ou encore l'ARN messager (inhibition de la synthèse de l'ARNm). Dans le cas du chitosane soluble (haute masse molaire) ou sous forme solide (microsphère ou nanoparticules), le mode d'action se fait au niveau de la surface cellulaire et peut conduire à une modification de la perméabilité cellulaire. Le chitosane peut également former une couche imperméable autour de la cellule bactérienne, bloquant ainsi le transport des solutés essentiels dans la cellule. Un exemple d'image illustrant l'action d'une microsphère de chitosane (CMs) sur des cellules bactériennes *E.coli* est présenté Figure A-6 (image obtenue par SEM : microscope électronique à balayage). Les auteurs expliquent dans ce cas que les cellules bactériennes présentent à la surface de la microsphère adoptent différents états. Précisément, certaines sont encore intactes, d'autres cellules laissent des constituants intracellulaires s'échapper vers l'extérieur et pour finir quelques cellules se sont



déjà rompues en laissant uniquement la membrane à la surface de la microsphère du chitosane. Les auteurs concluent que ces différents états montrent que les CMs détruisent les bactéries par un effet inhibiteur de contact interfacial qui s'établit à la surface des microsphères CMs.



**Figure A-6** : Photographies SEM des cellules *E.coli* traitées avec des CMs (97,5%)

### 2.3.3 Modification des polysaccharides

La présence de groupements neutres ou chargés sur le squelette carboné des polysaccharides ouvre la voie à diverses modifications chimiques. L'objectif de ces dernières est d'obtenir des systèmes de polymères avec des propriétés nouvelles ou améliorées comparées à celles du polymère non modifié (ex : propriétés amphiphiles et/ou thermosensibles). Ces systèmes pourront être utilisés pour des applications variées.

La modification chimique de polymères (notamment de polysaccharide) est un champ d'expertise du laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces (PBS) qui a été mis en avant au travers de diverses études. Ainsi, des études sur l'élaboration de systèmes présentant un caractère amphiphile ont été menées. Elles sont la plupart du temps établies par greffage covalent chimique de chaînes alkyles hydrophobes (courtes  $C_8$  ou plus longues  $C_{16}$ ) sur des polysaccharides (pullulane, carboxyméthylpullulane)<sup>152,153</sup>. Les études physico-chimiques des comportements en solution (régime dilué et/ou concentré) de ce type de produits greffés démontrent l'existence de caractères associatifs en raison de la présence d'associations intra et/ou intermoléculaires entre greffons hydrophobes alkyles. Ces comportements sont contrôlés par le taux d'incorporation des molécules hydrophobes et/ou par la longueur des chaînes, par la nature du polysaccharide (rigidité, caractère neutre ou chargé), mais aussi par les facteurs extrinsèques (pH, salinité,...). Les systèmes associatifs créés peuvent être utilisés dans des

domaines comme l'alimentaire ou la cosmétique (propriétés épaississantes) ou encore dans le domaine pharmaceutique en assurant le transport de principes actifs.

Le greffage covalent chimique d'enzyme (la pullulanase) sur un polysaccharide (l'alginate) a déjà été réalisé au sein du laboratoire dans le but d'élaborer un nouveau type de systèmes pouvant trouver des applications industrielles variables (biocapteurs dans le médical, biocatalyseur industriel)<sup>154</sup>. En comparaison avec l'enzyme non greffée, l'immobilisation a permis d'améliorer d'une part la stabilité de la pullulanase et d'autre part de conserver une partie de l'activité initiale de l'enzyme greffée à une température élevée et sur un temps variable.

Des réticulations chimiques de polysaccharides ou de polysaccharides amphiphiles ont également déjà été établies. Elles ont été effectuées par voie chimique (ex : via une enzyme ou avec l'acide adipique dihydrazide ADH)<sup>155,156</sup> et permettent d'obtenir des hydrogels utilisables par exemple dans le domaine pharmaceutique pour l'encapsulation et la libération de principes actifs, dans le biomédical (ingénierie tissulaire) ou encore en cosmétique. Comme autre exemple, des synthèses de polysaccharides amphiphiles possédant des propriétés thermo-sensibles et/ou pH-sensibles ont également déjà été étudiées<sup>157,158</sup>. Pour ce faire, des méthodes de greffage ou de copolymérisation ont été employées. Dulong *et al.*<sup>157</sup> ont par exemple greffé un polyéther amine (jeffamine) possédant des propriétés thermosensibles sur un polysaccharide (le carboxyméthylpullulane), non thermosensible.

Nous allons par la suite nous intéresser aux différentes méthodes utilisées afin d'incorporer les molécules végétales actives au sein de structures polymères (dont les polysaccharides).

### **3 Incorporation de molécules dérivées de plantes au sein de structures polymères**

Plusieurs méthodes sont à ce jour décrites dans la littérature afin d'introduire des dérivés issus de plantes au sein de structures polymères :

- la polymérisation ou la copolymérisation des molécules actives;
- l'encapsulation de ces composés au sein de particules de polymères;
- l'incorporation de ces actifs au sein de films polymères;
- le greffage chimique de ces molécules sur des polysaccharides.

Nous allons nous intéresser par la suite plus précisément à l'incorporation de composés de type phénoliques.

### 3.1 Polymérisation

#### 3.1.1 Exemple du gaïacol

Le gaïacol (Schéma A-1) est un composé naturel, issu de la combustion de la lignine ou encore extrait du bois de gaïac. C'est un composé aromatique naturel avec une structure de type phénolique. Il est connu et utilisé depuis des années comme expectorant<sup>159</sup>, arôme, analgésique ou anesthésique. F.R. Walters évoque déjà les propriétés antiseptiques du gaïacol dans une correspondance publiée dans 'The Lancet' en 1896. A.H. Carter<sup>160</sup> met en avant un pouvoir antipyrétique (contre la fièvre). Il possède également des activités antibactériennes<sup>161</sup>, antifongiques<sup>162</sup> et est un remarquable agent antioxydant<sup>163</sup>.

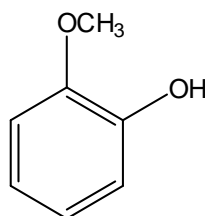
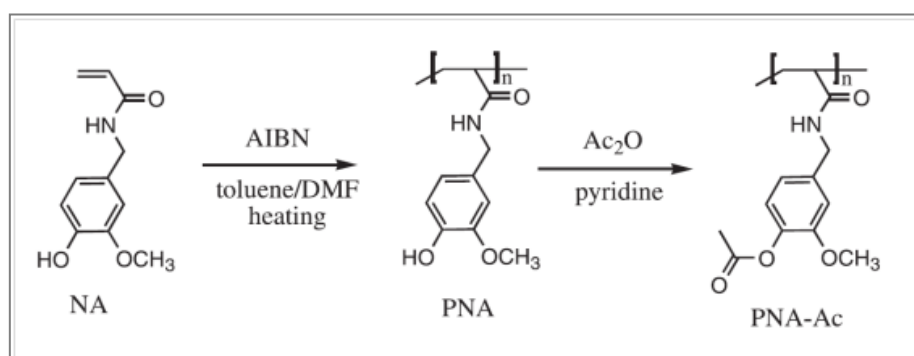


Schéma A-1 : Structure du gaïacol

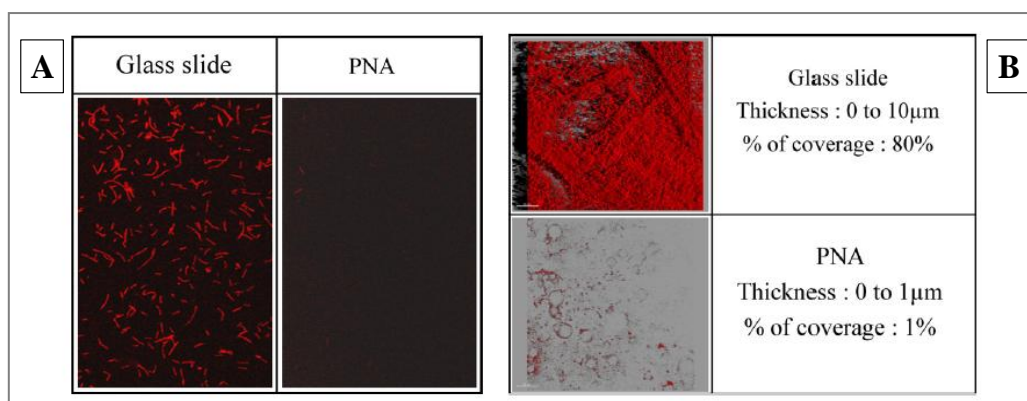
A l'exemple d'autres molécules à faibles masses molaires possédant des propriétés biologiques, le gaïacol en raison de sa volatilité, sa faible durabilité, son caractère hydrophobe ou encore sa toxicité est peu utilisé. Afin de limiter sa toxicité et d'élargir ses champs d'applications, l'équipe du Pr. Philippe Roger a synthétisé un polymère à base de gaïacol en vue de l'utiliser en tant que matériau antibactérien pour des revêtements de surfaces dans des domaines variés (ex : alimentaires, médical)<sup>164</sup>.

La polymérisation n'était pas réalisable à partir de la molécule de gaïacol, utilisée telle qu'elle comme monomère. En effet, cette dernière ne possède aucune fonction chimique susceptible de participer à ce type de réaction. Les auteurs ont donc modifié au préalable le gaïacol afin de lui apporter des fonctions acrylamide polymérisables. Par la suite, la polymérisation radicalaire du dérivé acrylamide du gaïacol (NA) a été menée selon des conditions variables (température, temps, concentration en amorceur (2,2'-Azobisisobutyronitrile, AIBN)) (Schéma A-2). Ces conditions variées ont conduit à l'obtention de polymères avec des masses molaires moyennes en nombre ( $M_n$ ) comprises entre 3000 et 11 000 g/mol ainsi que des polydispersités comprises entre 1,3 et 1,8. Les activités antibactériennes du polymère à base de gaïacol ainsi obtenu : le PNA (poly[N-(4-hydroxy-3-methoxy-benzyl)-acrylamide]), ont pu

être mises en évidence par des essais de tests anti-adhésion (Figure A-7A) et anti-biofilm (Figure A-7B) vis-à-vis de *Bacillus subtilis* (Gram+). Ces tests ont montré que le PNA est hautement efficace vis-à-vis de *B.subtilis*. En effet sur la Figure A-7A, on constate que le support en verre témoin, c'est-à-dire non recouvert par du PNA, contient une population de bactéries élevée alors que dans le cas du support en verre recouvert de PNA, aucune bactérie n'est observée. De plus, le PNA possède un puissant effet anti-biofilm. En effet, les supports en présence de PNA ont été recouverts par 1% de la population *B.subtilis* (après 3 jours de culture), cependant aucun biofilm n'a été formé (Figure A-7B). Dans le cas du support témoin, il y a 80 % de recouvrement de la surface par un biofilm *B.subtilis* avec une épaisseur de film comprise entre [0-10]  $\mu\text{m}$ . Les auteurs précisent que les mécanismes d'actions de la molécule libre de gäiacol en comparaison avec le PNA sont différents. Dans le cas du gäiacol, ils assimilent le mode d'action au mécanisme général des composés phénoliques. Quelques étapes clés sont : la déstabilisation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force proton motrice, de la circulation d'électrons ou encore la coagulation des constituants cellulaires. L'activité de ce type de système (molécules polymérisées) s'exerce uniquement si les bactéries entrent en contact avec le matériau. Les auteurs précisent qu'en général c'est un effet bactériostatique qui est observé car la diffusion de la molécule polymérisée au travers de la membrane bactérienne est limitée à la différence du composé libre. Cependant, un effet biocide (mort de la cellule) peut être observé pour certains matériaux comme par exemple pour des surfaces de polymères contenant des fonctions ammoniums quaternaires. Dans ce cas-là, ce sont les charges positives qui jouent un rôle important dans le mécanisme d'action en interagissant (interactions électrostatiques) avec les constituants de la membrane de la cellule bactérienne. Dans le cas du PNA, les auteurs mettent en avant des interactions plutôt de type hydrophobe et hydrogène entre la molécule polymérisée et la membrane de *B.subtilis* résultant en une perte d'intégrité de la membrane.



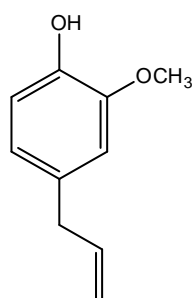
**Schéma A-2** : Polymérisation du dérivé de gäiacol NA (N-(4-hydroxy-3-méthoxy-benzyl)-acrylamide) (D'après Liu et al.<sup>164</sup>).



**Figure A-7 :** (A) : Test anti-adhésion en présence des bactéries *B.subtilis* (temps d'adhésion 3h) – Images de microscopie laser confocale à balayage (CLSM) après coloration à l'acridine orange. (B) : test anti-biofilm – Images CLSM après 3 jours de culture des bactéries *B. subtilis* (D'après Liu et al.<sup>164</sup>).

### 3.1.2 Exemple de l'eugénol

Comme à l'exemple du gaiacol, l'eugénol (Schéma A-3) est un composé phénolique présentant des activités antibactériennes, antioxydantes et antifongiques<sup>165,166</sup>.



**Schéma A-3 :** Structure de l'eugénol

En tant que composé à faible masse molaire présentant des activités biologiques mais également des limites d'utilisation, il a fait l'objet d'études visant à introduire des molécules d'eugénol dans un système polymère. Les auteurs L. Rojo *et al.*<sup>167</sup> avaient pour objectif d'élaborer de nouveaux matériaux polymères aux propriétés antibactériennes notamment pour des applications biomédicales (ex : implants oculaires en ophtalmologie). Pour ce faire, ils ont synthétisé des copolymères en partant de monomères acryliques (2-hydroxyethylmethacrylate HEMA) et de monomères dérivés de l'eugénol eugenylmethacrylate(EgMA) et ethoxyeugenylmethacrylate (EEgMA) (Schéma A-4).

Les activités biologiques de ces produits élaborés ont été évaluées face aux bactéries *S.mutans* (CECT 479) et *E.coli* (DH5R) respectivement des souches Gram+ et Gram-. La technique utilisée est la méthode de contact sur gélose agar. Cette dernière est réalisée en milieu solide. Pour ce faire, des gouttes de cultures de bactéries (2 µL) sont au préalable déposées sur des boîtes contenant du milieu de culture agar, soit le LB-agar (Luria Broth Agar). Par la suite,

des disques de polymères stériles (15 mm de diamètre et 1 mm d'épaisseur) sont placés sur les boîtes d'agar (au préalableensemencées). Pour finir, ces dernières ont été incubées à 37°C pendant 24 h ou 48 h.

Le polymère PHEMA n'a démontré aucune activité face aux deux souches bactériennes. En effet, les auteurs précisent qu'il y a présence de bactéries autour du disque de PHEMA mais également en dessous du disque (Figure A-8). Les copolymères p(HEMA-co-EgMA) et p(HEMA-co-EEgMA) ont au contraire démontré des activités antibactériennes, précisément de type bactériostatique au contact des bactéries étudiées. Visuellement (Figure A-8), on remarque une inhibition de la croissance des bactéries *S.mutans* et *E.coli* en comparaison avec le disque témoin PHEMA. Cependant, il n'y a pas formation de halo d'inhibition (Figure A-8). L.Rojo *et al.*<sup>167</sup> indiquent que les propriétés antibactériennes sont apportées intrinsèquement par la présence de molécules dérivées de l'eugénol liées à une partie de la chaîne principale du copolymère formé. Ils justifient l'effet bactériostatique (et non bactéricide) des copolymères en raison de l'impossibilité des molécules actives à pénétrer au travers de la membrane des cellules bactériennes. Par ailleurs, les polymères p(HEMA-co-EEgMA) ont démontré une inhibition plus forte que les p(HEMA-co-EgMA) en raison de la plus grande mobilité du monomère EEgMA comparée à celle de l'EgMA.

Les auteurs ajoutent que les activités des groupes eugénol dépendent fortement des contacts établis par ces derniers avec les bactéries. Ils précisent que ces interactions peuvent être reliées à l'énergie de surface des matériaux. En effet, une énergie élevée (caractère hydrophile important) entraîne une faible adhésion des bactéries à la surface des matériaux alors qu'un caractère hydrophobe important favoriserait les interactions. Ils concluent sur une possible amélioration des activités observées dans le cas des copolymères testés par à une augmentation de la quantité en dérivés eugénol hydrophobes.

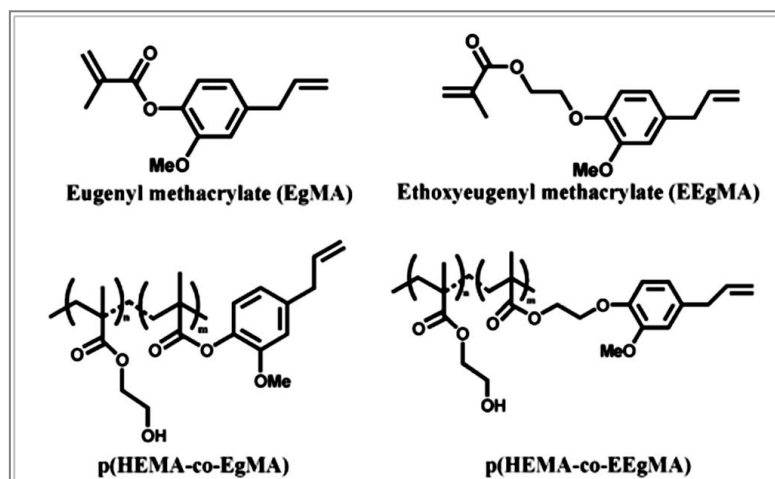
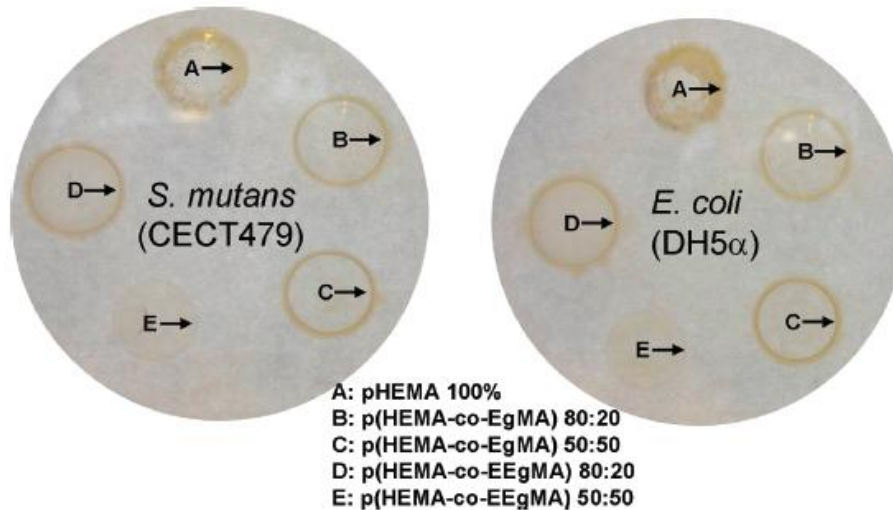


Schéma A-4 : Structure des monomères et des copolymères à base d'eugénol. (D'après L.Rojo *et al.*<sup>167</sup>)



**Figure A-8 :** Formation des colonies *S.mutans* (gauche) et *E.coli* (droite) (les zones marrons en dessous et autour des échantillons polymères) observées après 48 h d'incubation à 37°C. Les flèches indiquent la fin des échantillons de polymères. (D'après L.Rojo *et al.*<sup>167</sup>).

### 3.2 Encapsulation au sein de capsules de polymères

L'encapsulation de composés phénoliques ou d'extraits de plantes au sein de nano- (<100 nm), micro- (1-1000  $\mu\text{m}$ ) ou macro-particules (> 1000  $\mu\text{m}$ )<sup>168</sup> de polymères est également une autre méthode qui est largement utilisée. Elle peut être réalisée selon des procédés variés. Munin *et al.*<sup>145</sup> classifient dans une revue les différents procédés d'encapsulation en trois grands groupes :

- les méthodes physiques : spray-drying, fluide supercritique;
- les méthodes physico-chimiques : spray-cooling, gélation ionique, coacervation simple ou complexe;
- les méthodes chimiques : polycondensation interfaciale, polymérisation interfaciale...

Pour chacun de ces procédés, les auteurs ont répertoriés divers travaux disponibles dans la littérature qui avaient pour but d'encapsuler des polyphénols. D'une manière générale, ces études ont été menées afin d'élaborer des systèmes en vue de futures applications dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et/ou alimentaire.

Les polymères employés sont de natures diverses. Parmi eux, sont retrouvés des polysaccharides tels que le chitosane, l'alginate, la gomme arabique, le carraghénane. Des polymères synthétiques comme le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) ont également été mentionnés.

Les polyphénols utilisés vont des plus simples (ex : acide gallique, curcumin) aux plus complexes (ex : tanins condensés). Des extraits de plantes (ex : extraits de pépins de raisins)

ou encore des huiles (huile d'olive vierge) contenant des polyphénols ont également été inclus au sein des particules de polymères. Les propriétés recherchées pour les systèmes encapsulés sont essentiellement des activités antioxydantes mais peuvent également être antibactériennes<sup>169,170</sup>.

Jia *et al*<sup>171</sup> détaillent également l'encapsulation de polyphénols (ou de mélange de composés phénoliques) au sein de diverses matrices de protéines (ex : lactosérum, caséine, protéines de soja...) en explicitant plusieurs travaux répertoriés dans la littérature.

Globalement, l'utilisation de ces nouveaux systèmes permet d'encapsuler une quantité importante de polyphénols (50 – 90 %) en fonction de la méthode et de la matrice de polymère utilisées. Dans la plupart des études, les propriétés antioxydantes des actifs une fois encapsulés sont maintenues<sup>171</sup>.

Par ailleurs, afin d'exercer son activité, il est nécessaire que la molécule active encapsulée puisse être libérée vers le milieu environnant. Cette étape de libération est en général établie selon divers mécanismes : la diffusion du soluté, le gonflement de la matrice polymère ou encore la dégradation du matériel. Keawchaon *et al.*<sup>169</sup> ont préparé des nanoparticules de chitosane chargées en carvacrol. Ils ont étudiés la cinétique et le mécanisme de libération du composé phénolique encapsulé dans divers milieux tampons : acétate (pH=3) ou phosphate (pH=7 et pH=10). Les auteurs mettent avant un mécanisme de libération du composé phénolique principalement par diffusion et suivant un comportement de type Fickien. Ils soulignent le fait que le taux de libération (cinétique) et la quantité en carvacrol libéré sont affectés par la nature et le pH du milieu.

Ils ont également testé l'activité antibactérienne du carvacrol encapsulé sur diverses souches (Gram+ et Gram-) telles que *E.coli* et *S.aureus* et ce par la méthode de dilution. Cette technique est réalisée en milieu liquide. Pour ce faire, les auteurs ont préparé des solutions de nanoparticules chargées à différentes concentrations dans le milieu de culture Mueller Hinton (MH). Ils ont par la suite ajouté une quantité de colonies de bactéries (ex : *E.coli* ou *S.aureus*) avec un ensemencement fixé à  $10^6$  ufc (unité formant colonies) /mL dans chacune des solutions. Ces dernières ont été par la suite incubées à 37°C pendant 24 h. Le composé encapsulé s'est révélé autant actif que le carvacrol non encapsulé et ce avec une valeur de CMI (concentration minimale inhibitrice) déterminée à 0,257 mg.ml<sup>-1</sup>. Les auteurs précisent que le mécanisme d'action du carvacrol implique l'interaction de ce composé hydrophobe avec les composants phospholipides de la membrane des microorganismes. Cela conduit à des



dommages au niveau de la structure de la membrane et entraîne l'expansion, la déstabilisation, l'augmentation de la fluidité et de la perméabilité de la membrane.

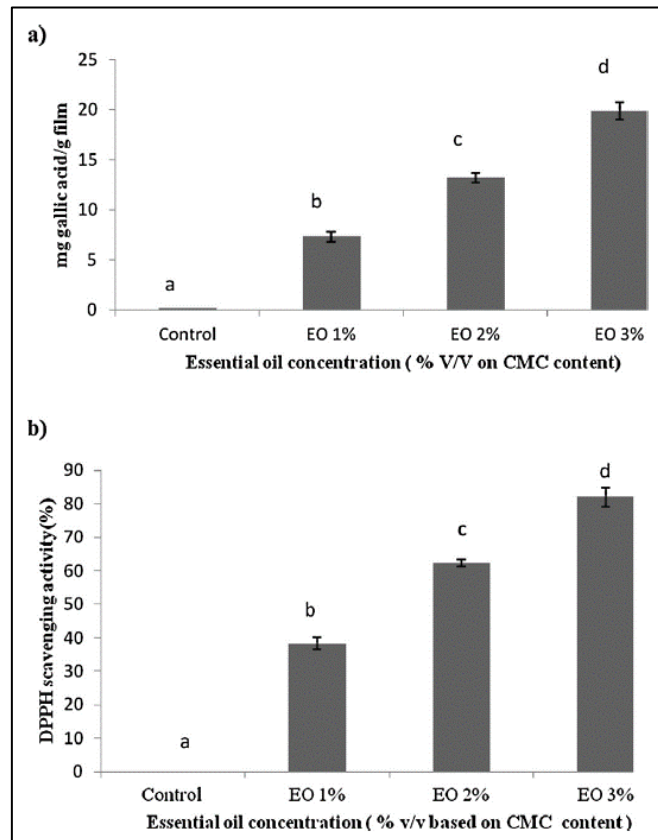
### 3.3 Incorporation au sein de films polymères

L'incorporation au sein de films polymères, de composés actifs (type phénoliques), d'huiles essentielles ou encore d'extraits naturels contenant des composés phénoliques et provenant des plantes est très étudiée. Les polymères les plus souvent utilisés sont des polysaccharides ou des protéines en raison de leur caractère biodégradable, notamment la cellulose<sup>172</sup>, le chitosane<sup>173</sup> ou encore la caséine et le lactosérum<sup>174</sup>. La plupart des études concernant ces films ciblent des applications dans le domaine alimentaire (emballages actifs).

A titre d'exemple, Dashipour *et al.*<sup>175</sup> ont élaboré des films à base de carboxyméthylcellulose (CMC) en y incorporant des proportions variables (1%, 2%, 3%) en huile essentielle de *Zataria multiflora* (ZEO). Ils ont évalué les propriétés antibactériennes des films par la méthode de diffusion de disque sur cinq souches bactériennes (Gram+ et Gram-) notamment *S.aureus*, *B.cereus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* et *Salmonella typhimurium*. Cette technique est réalisée en milieu solide avec le MHA (Mueller Hinton Agar). Pour ce faire, les cultures de bactéries (100 µL) sont au préalable étalées sur le milieu de culture. Par la suite, les films (en présence et en absence de ZEO) sont découpés sous forme de disques (10 mm) puis déposés sur les boîtesensemencées. Ces dernières ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Le lendemain, des mesures des halos (zones) d'inhibition ont été effectuées. Dans le cas des films témoins (sans ZEO), aucun halo d'inhibition n'a été formé autour du film. Au contraire, les films enrichis en ZEO étaient actifs contre toutes les souches bactériennes testées. Les diamètres des zones d'inhibition augmentaient avec la concentration en huile ZEO. Les auteurs précisent que la nature lipophile des huiles essentielles leur permet d'aller agir sur la membrane des cellules bactériennes. Cela conduit à des dommages morphologiques, à la perturbation de l'intégrité de la membrane et à la perte du matériel contenu dans les cellules.

De plus, les activités antioxydantes des films témoins et enrichis en huile ZEO ont été évaluées face au radical  $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH). Après comparaison avec le film témoin (sans ZEO), les auteurs indiquent que les films enrichis possèdent des activités antioxydantes qui augmentent avec la concentration en huile ZEO. Pour aller plus loin, après détermination de la quantité totale de composés phénoliques présents dans les différentes concentrations d'huiles incorporées et testées, Dashipour *et al.*<sup>175</sup> démontrent que les

composés phénoliques sont responsables du pouvoir antioxydant des huiles ZEO. Les résultats illustrant les propriétés antioxydantes obtenues sont présentés Figure A-9.



**Figure A-9 :** (a) : Quantité totale en composés phénoliques (exprimée en mg équivalents d'acide gallique par gramme de film) présente dans les différentes concentrations en huile. (b) Pourcentages de piégeage du radical DPPH des films CMC contenant des concentrations variables de ZEO, contrôle (sans ZEO) (Dashipour *et al.*<sup>175</sup>).

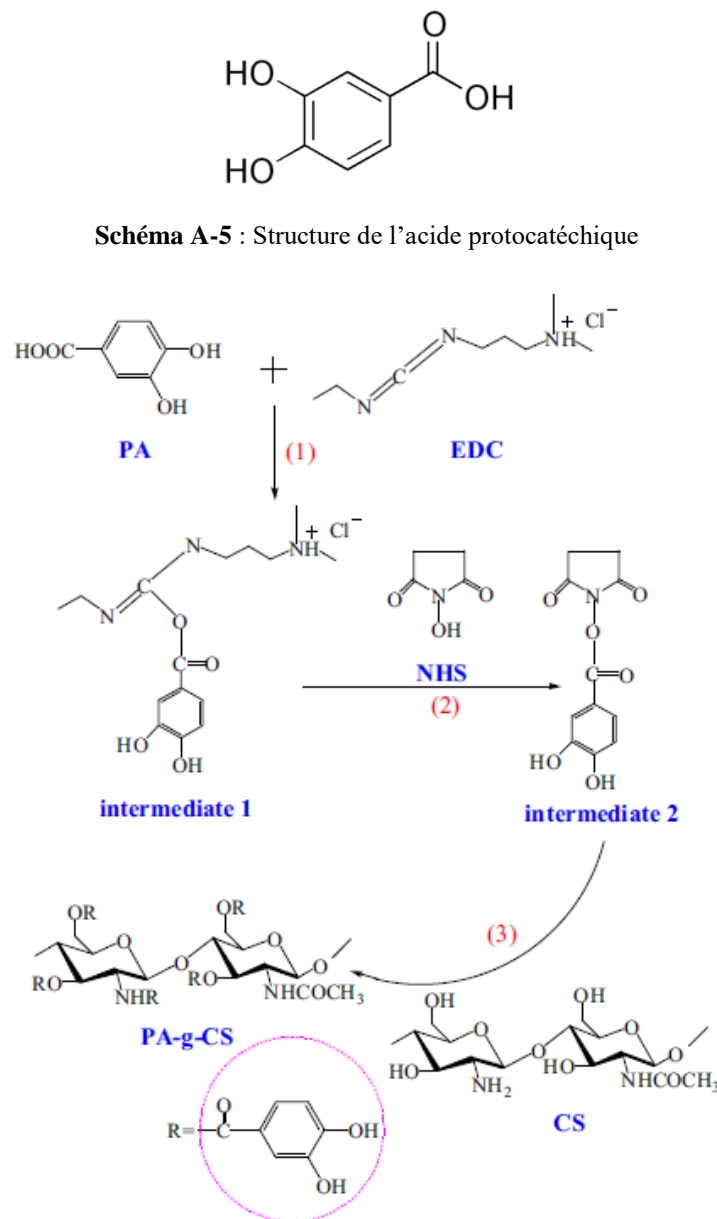
### 3.4 Greffage chimique sur des polysaccharides

Le greffage chimique d'une molécule phénolique sur un polysaccharide est une voie également explorée. Cependant, peu de polysaccharides ont à ce jour été utilisés. Le choix se tourne la majeure partie du temps vers le chitosane, un polysaccharide cationique connu également pour ses propriétés intrinsèques antimicrobiennes et antioxydantes<sup>176,177</sup>, ce qui ne permet pas toujours d'évaluer l'activité propre amenée par la molécule greffée. Par ailleurs le chitosane présente une faible solubilité dans l'eau à pH neutre et cet inconvénient limite son application dans un grand nombre de domaines.

Ainsi quelques exemples de greffages chimiques de composés dérivés de plantes (précisément des acides phénoliques) sur ce polymère sont illustrés dans la littérature, notamment, des études ont été menées avec l'acide férulique<sup>178,179</sup>, l'acide caféique<sup>179,180</sup> ou encore l'acide protocatéchique<sup>181</sup>. Les principaux objectifs de ces travaux sont : (a) d'améliorer la solubilité du chitosane et/ou (b) d'améliorer ses propriétés antioxydantes pour

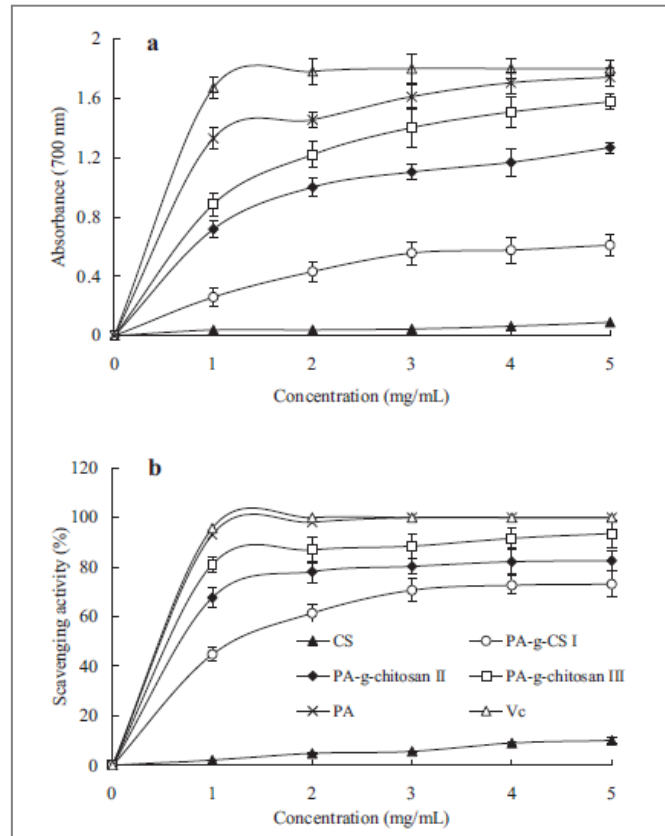
des applications en alimentaire, pharmacie, cosmétique. Plusieurs méthodes sont à ce jour sélectionnées pour réaliser les greffages chimiques. La plus classique est le couplage via un agent carbodiimide, que l'on connaît bien également au laboratoire. Des méthodes enzymatiques et radicalaires sont également employées.

Liu *et al.*<sup>181</sup> ont greffé l'acide protocatéchique (PA) (schéma A-5) sur le chitosane (CS) en utilisant les agents de couplage EDC/NHS (N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide/N-Hydroxysuccinimide). Le schéma de la réaction est présenté Figure A-10.



**Figure A-10** : Schéma du mécanisme de réaction pour la synthèse du PA-g-CS activée par EDC/NHS : (1) les groupements carboxyle du PA réagissent avec l'EDC pour produire l'intermédiaire 1 (O-acylisourée) ; (2) l'intermédiaire 1 réagit ensuite avec le NHS pour produire l'ester intermédiaire 2 actif ; (3) l'ester actif réagit pour finir avec l'amine et les groupes hydroxyle présents sur le chitosane pour donner des liens amides et ester dans le produit (PA-g-CS). (D'après Liu *et al.*<sup>181</sup>).

Les dérivés greffés (PA-g-CS) ont été préparés selon des proportions molaires en réactifs (CS : PA : EDC : NHS) variables. Précisément, les produits PA-g-CS I (1: 1: 1: 1), PA-g-CS II (1: 3: 3: 3) et PA-g-CS III (1: 5: 5: 5) ont été synthétisés. Les degrés de substitution déterminés sont exprimés en mg de PA équivalent par g de PA-g-CS sec (mg PAE/g) et égaux à 0,64 ; 190,11 and 279,69 respectivement pour les PA-g-CS I, II et III. Les activités antioxydantes ont été évaluées à l'aide de deux méthodes : le pouvoir réducteur et le radical DPPH, et comparées à celles de la molécule de départ. L'acide protocatéchique s'est révélé être un fort agent antioxydant. Tous les produits ont démontré des propriétés antiradicalaires plus importantes que le chitosane non greffé (Figure A-11). Les auteurs précisent que ces dernières augmentent avec le taux de greffage en acide protocatéchique. Le mécanisme d'action proposé pour un produit PA-g-CS en présence du radical DPPH est présenté Figure A-12.



**Figure A-11 :** (a) : Pouvoir réducteur (b) Piégeage du radical DPPH des produits PA, CS, PA-g-CS I, PA-g-CS II et PA-g-CS III (D'après Liu *et al.*<sup>181</sup>).

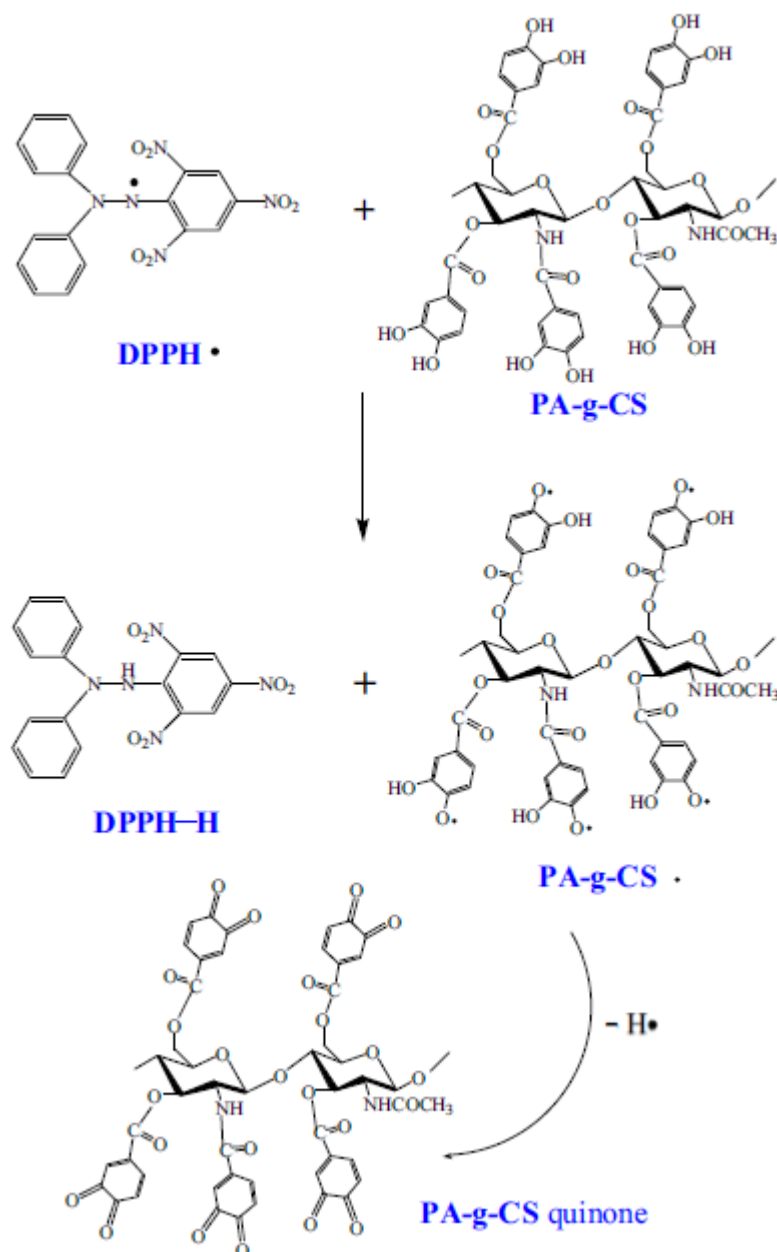


Figure A-12 : Mécanisme antioxydant de piégeage du radical DPPH par PA-g-CS

## 4 Conclusion

Tout au long de ce chapitre, nous avons pu mettre en avant deux types de contaminations, de nature biologique (bactéries) et chimique (radicaux libres), qui sont les sources de problèmes majeurs dans les secteurs cosmétique et alimentaire. La présence de ces contaminants conduit à une détérioration anticipée des produits utilisés mais également entraîne des conséquences (infections et maladies) plus ou moins graves sur la santé des consommateurs voire de l'environnement. Nous avons également présenté les moyens employés à ce jour pour éviter (ou limiter) ces phénomènes : l'utilisation de conservateurs synthétiques. Cependant, ces derniers sont soupçonnés d'entraîner des effets néfastes sur la

santé des utilisateurs. Cela incite les scientifiques à rechercher des alternatives qui se tournent vers des molécules d'origines naturelles variées (microorganismes, animaux, plantes). Certaines plantes possèdent des composés actifs (terpènes et terpénoïdes, alcaloïdes, polyphénols) présentant de nombreuses vertus dont les propriétés antibactériennes et/ou antioxydantes recherchées. Cependant, des inconvénients de ces composés tels que leur caractère hydrophobe ou encore leur faible stabilité limitent leurs champs d'applications. Ainsi, comme solution, de nombreuses études visent à incorporer ces actifs au sein de structure polymères. Les polymères « naturels » sont les plus sollicités, notamment des polysaccharides et des protéines en raison de leur caractère biodégradable et biocompatible. Pour ce faire, plusieurs stratégies sont alors adoptées : la polymérisation, l'encapsulation, l'incorporation de ces actifs au sein de films et le greffage chimique.

C'est cette dernière stratégie que nous avons retenue dans le cadre de nos recherches : le greffage chimique. Parmi tous les composés actifs décrits et retrouvés chez les plantes, nous avons orienté le choix vers des molécules à structures phénoliques. En effet, des études comparatives<sup>182,183</sup> sur les différentes familles de composés actifs (terpènes et terpénoïdes, alcaloïdes et composés phénoliques) mettent en avant celle des composés phénoliques. Ces derniers combinent plusieurs propriétés (antibactériennes, antioxydantes, antifongiques...) en raison de leur structure phénolique. Cet aspect sera détaillé par la suite dans le chapitre C.

Les composés choisis (aminogaiacol et l'eugénol) seront greffés de manière chimique covalente sur des polysaccharides (carboxyméthylpullulane, alginate) afin d'élaborer des systèmes aux propriétés recherchées notamment : antibactériennes et/ou antioxydantes de part la présence des molécules phénoliques mais également viscosifiantes ou gélifiantes de part la présence du polysaccharide.

## Références bibliographiques

- (1) Silhavy, T.; Kahne, D.; Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press May **2010**, pp 1–16.
- (2) Aparna, M. S.; Yadav, S. Biofilms: Microbes and Disease. *Brazilian J. Infect. Dis.* **2008**, *12* (6), 526–530.
- (3) Landman, C.; Quévrain, E. Le Microbiote Intestinal : Description, Rôle et Implication Physiopathologique. *La Rev. Médecine Interne* **2016**, *37* (6), 418–423.
- (4) Hooper, L. V.; Littman, D. R.; Macpherson, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science (80-. )*. **2012**, *336* (6086), 1268–1273.
- (5) Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Kinross, J.; Burcelin, R.; Gibson, G.; Jia, W.; Pettersson, S. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science (80-. )*. **2012**, *336* (6086), 1262–1267.
- (6) Rahmouni, O.; Dubuquoy, L.; Desreumaux, P.; Neut, C. Microbiote Intestinal et Développement Des Maladies Inflammatoires Chroniques de L'intestin. *médecine/sciences* **2016**, *32* (11), 968–973.
- (7) Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **2008**, *18* (9), 1049–1056.
- (8) Callow, M. E.; Callow, J. E. Marine Biofouling: A Sticky Problem. *Biologist (London)*. **2002**, *49* (1), 10–14.
- (9) Compere, C. Biofilms En Milieu Marin. *Tech. Sci. méthodes* **1999**, No. 11, 48–54.
- (10) Benbouzid, M.; Titah-Benbouzid, H. Marine Renewable Energy Converters Biofouling: A Critical Review on Impacts and Prevention. *Proc. 11th Eur. Wave Tidal Energy Conf.* **2015**, No. September, 1–8.
- (11) Les Infections Nosocomiales. *Médecine & Droit* **2005**, *2005* (70), 15–22.
- (12) Espinasse, F.; Page, B.; Cottard-Boulle, B. Risques Infectieux Associés Aux Dispositifs Médicaux Invasifs. *Rev. Francoph. des Lab.* **2010**, *2010* (426), 51–63.
- (13) Astagneau, P.; Brücker, G. Coût Des Infections Nosocomiales. *J. Pédiatrie Puériculture* **1998**, *11* (6), 348–353.
- (14) Valour, F.; Chebib, N.; Gillet, Y.; Reix, P.; Laurent, F.; Chidiac, C.; Ferry, T. Infections Broncho-Pulmonaires À Staphylococcus Aureus. *Rev. Pneumol. Clin.* **2013**, *69* (6), 368–382.
- (15) Archer, N. K.; Mazaitis, M. J.; Costerton, J. W.; Leid, J. G.; Powers, M. E.; Shirtliff, M. E. *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *Virulence* **2011**, *2* (5), 445–459.
- (16) Donlan, R. M. Biofilms and Device-Associated Infections. In *Emerging Infectious Diseases*; 2001; Vol. 7, pp 277–281.
- (17) Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284* (5418), 1318–1322.
- (18) Nerín, C.; Aznar, M.; Carrizo, D. Food Contamination during Food Process. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *48*, 63–68.
- (19) Bouillet, A.; Duchêne, M.; Deroanne, C. Conservation En Congélation et Réfrigération de La Viande Hachée de Boeuf et de Porc: Évolution de La Flore Microbienne et Des Propriétés Physico-Chimiques En Cours de Stockage. *Int. J. Refrig.* **1982**, *5* (6), 343–347.
- (20) IFT. Factors That Influence Microbial Growth. *Compr. Rev. food Sci. food Saf.* **2003**, *2* (s2), 21–32.
- (21) Sperber, W. H. Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria - a Review. *J. Food Prot.* **1983**, *46* (2), 142–150.
- (22) Redel, H. Foodborne Infections and Intoxications. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19* (12), 2067–2067.

- (23) Buzby J., Roberts T., Lin J., M. J. *Bacterial Foodborne Disease Medical Costs and Productivity Losses*; United States Department of Agriculture, Economic Research Service, 1997; Vol. 741.
- (24) Thatcher, F. S. Food-Borne Bacterial Toxins. *Can. Med. Assoc. J.* **1966**, 94 (12), 582–590.
- (25) Vaillant, V.; de Valk, H.; Baron, E. Morbidité et Mortalité Dues Aux Maladies Infectieuses D 'origine Alimentaire En France. **2003**, 1–192.
- (26) Baird-Parker, A. . Foodborne Salmonellosis. *Lancet* **1990**, 336 (8725), 1231–1235.
- (27) Addis, M.; Sisay, D. A Review on Major Food Borne Bacterial Illnesses. *J. Trop. Dis.* **2015**, 3 (4), 1–7.
- (28) Argudín, M. Á.; Mendoza, M. C.; Rodicio, M. R. Food Poisoning and Staphylococcus Aureus Enterotoxins. *Toxins (Basel)*. **2010**, 2 (7), 1751–1773.
- (29) Siegert, W. Microbiological Quality Management for the Production of Cosmetics and Toiletries. *Sofw-journal* **2012**.
- (30) Muhammed, H. J. Bacterial and Fungal Contamination in Three Brands of Cosmetic Marketed in Iraq. *Iraqi J. Pharm. Sci.* **2011**, 20 (1), 38–42.
- (31) Osungunna, M. O.; Oluremi, B. B.; Adetuyi, A. Bacteriological and Antibiotic Sensitivity Patterns of Bacterial Isolates from Creams and Lotions Hawked in Sagamu, Ogun State. *Pakistan J. Nutr.* **2010**, 9 (8), 773–775.
- (32) Berthele, H.; Sella, O.; Lavarde, M.; Mielcarek, C.; Pense-Lheritier, A.-M.; Pirnay, S. Determination of the Influence of Factors (Ethanol, pH and  $a_w$ ) on the Preservation of Cosmetics Using Experimental Design. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2014**, 36 (1), 54–61.
- (33) Ki, V.; Rotstein, C. Bacterial Skin and Soft Tissue Infections in Adults: A Review of Their Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Site of Care. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. = J. Can. des Mal. Infect. la Microbiol. medicale* **2008**, 19 (2), 173–184.
- (34) Kadariya, J.; Smith, T. C.; Thapaliya, D. Staphylococcus Aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014, 827965.
- (35) Le Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M. Staphylococcus Aureus and Food Poisoning. *Genet. Mol. Res.* **2003**, 2 (1), 63–76.
- (36) Riain, U. N. Primary Care Management of Bacterial Skin Infections. *Prescriber* **2006**, 17 (16), 15–21.
- (37) Waldenburger, S.; Vogel, U.; Goebeler, M.; Kolb-Mäurer, A. Community-Acquired Skin Infections Caused by *Staphylococcus Aureus*: What Is the Role of the Pantone-Valentine Leukocidin Toxin? *JDDG J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* **2014**, 12 (1), 59–66.
- (38) Hazlett, L. D. Corneal Response to Pseudomonas Aeruginosa Infection. *Prog. Retin. Eye Res.* **2004**, 23 (1), 1–30.
- (39) Biscaye, S.; Demonchy, D.; Afanetti, M.; Dupont, A.; Haas, H.; Tran, A. Ecthyma Gangrenosum, a Skin Manifestation of Pseudomonas Aeruginosa Sepsis in a Previously Healthy Child. *Medicine (Baltimore)*. **2017**, 96 (2), e5507.
- (40) Jay, J. M. Foodborne Gastroenteritis Caused by Escherichia Coli. In *Modern Food Microbiology*; Springer US: Boston, MA, **2000**; pp 531–547.
- (41) Cohen, M. B.; Giannella, R. A. Hemorrhagic Colitis Associated with Escherichia Coli O157:H7. *Adv. Intern. Med.* **1992**, 37, 173–195.
- (42) Sunder, S.; Haguenoer, E.; Bouvet, D.; Lissandre, S.; Bree, A.; Perrotin, D.; Helloin, E.; Lanotte, P.; Schouler, C.; Guillon, A. Life-Threatening Escherichia Coli Cellulitis in Patients with Haematological Malignancies. *J. Med. Microbiol.* **2012**, 61 (Pt\_9), 1324–1327.
- (43) Crum-Cianflone, N. F. Salmonellosis and the Gastrointestinal Tract: More than Just



- Peanut Butter. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2008**, *10* (4), 424–431.
- (44) Urfer, E.; Rossier, P.; Méan, F.; Krending, M.-J.; Burnens, A.; Bille, J.; Francioli, P.; Zwahlen, A. Outbreak of Salmonella Braenderup Gastroenteritis due to Contaminated Meat Pies: Clinical and Molecular Epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **2000**, *6* (10), 536–542.
- (45) Phaniendra, A.; Jestadi, D. B.; Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **2015**, *30* (1), 11–26.
- (46) Pham-Huy, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, *4* (2), 89–96.
- (47) Dhawan, V. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. *Stud. Respir. Disord.* **2014**, 151–161.
- (48) Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, *5* (1), 9–19.
- (49) Charpin, D.; Paireon, J. C.; Annesi-Maesano, I.; Caillaud, D.; de Blay, F.; Dixsaut, G.; Housset, B.; Meurice, J. C.; Roussel, I.; Zmirou, D.; et al. La Pollution Atmosphérique et Ses Effets Sur La Santé Respiratoire. Document D'experts Du Groupe Pathologies Pulmonaires Professionnelles Environnementales et Iatrogéniques (PAPPEI) de La Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF). *Rev. Mal. Respir.* **2016**, *33* (6), 484–508.
- (50) Mut-Salud, N.; Álvarez, P. J.; Garrido, J. M.; Carrasco, E.; Aránega, A.; Rodríguez-Serrano, F. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation 2016, p 6719534.
- (51) Favier, A. Le Stress Oxydant Intérêt Conceptuel et Expérimental Dans La Compréhension. *Le Stress oxydant Intérêt conceptuel expérimental dans la compréhension* **2003**, No. 11–12, 108–115.
- (52) Therond, P. Dommages Créés Aux Biomolécules (Lipides, Protéines, ADN) Par Le Stress Oxydant. *Ann. Pharm. Françaises* **2006**, *64* (6), 383–389.
- (53) Favier, A. Stress Oxydant et Pathologies Humaines. *Ann. Pharm. Françaises* **2006**, *64* (6), 390–396.
- (54) Rahman, K. Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. *Clin. Interv. Aging* **2007**, *2* (2), 219–236.
- (55) Roussel, A.-M.; Ferry, M. Stress Oxydant et Vieillesse. *Nutr. Clin. Métabolisme* **2002**, *16* (4), 285–291.
- (56) Aouba, A. Données Sur La Mortalité En France : Principales Causes de Décès En 2008 et Évolutions Depuis 2000. *Bull. épidémiologique Hebd.* **2011**, *22*, 249–255.
- (57) Marie-claude, M. *Introduction À La Dermopharmacie et À La Cosmétologie*; Éd. Médicales internationales, 2003.
- (58) CE. European Commission, Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November, 2009 on Cosmetic Products. *Off. J. the European Union* **2009**, *342*, 59–209.
- (59) CE. Règlement (CE) N O 1333/2008 Du Parlement Européen et Du Conseil Du 16 Décembre 2008 Sur Les Additifs Alimentaires. *J. Off. des Communautés Eur. du 11.2.1989 (JO L 354)*. **2008**, *71*, 1–115.
- (60) Maillard, J. Y. Bacterial Target Sites for Biocide Action. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **2002**, *92 Suppl* (31), 16S–27S.
- (61) Brewer, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10* (4), 221–247.
- (62) Choe, E.; Min, D. B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2009**, *8* (4), 345–358.

- (63) Jeong, J.-J.; Kim, D.-H. Effects of Cosmetics and Their Preservatives on the Growth and Composition of Human Skin Microbiota. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **2015**, *41* (2), 127–134.
- (64) Márquez-Sillero, I.; Aguilera-Herrador, E.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Determination of Parabens in Cosmetic Products Using Multi-Walled Carbon Nanotubes as Solid Phase Extraction Sorbent and Corona-Charged Aerosol Detection System. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (1), 1–6.
- (65) Collinge, A.; Noirfalise, A. Dosage de Sept Agents Conservateurs Dans Les Denrées Alimentaires Par Chromatographie Liquide a Haute Performance. *Anal. Chim. Acta* **1981**, *132*, 201–204.
- (66) Hazan, R.; Levine, A.; Abeliovich, H. Benzoic Acid, a Weak Organic Acid Food Preservative, Exerts Specific Effects on Intracellular Membrane Trafficking Pathways in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70* (8), 4449–4457.
- (67) Opstrup, Johansen, Bossi, Lundov, G. Chlorhexidine in Cosmetic Products - a Market Survey. *Allergy* **2014**, *72* (1), 55–58.
- (68) Condell, O.; Iversen, C.; Cooney, S.; Power, K. A.; Walsh, C.; Burgess, C.; Fanning, S. Efficacy of Biocides Used in the Modern Food Industry to Control Salmonella Enterica, and Links between Biocide Tolerance and Resistance to Clinically Relevant Antimicrobial Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78* (9), 3087–3097.
- (69) Breen, P. Method for the Broad Spectrum Prevention and Removal of Microbial Contamination of Food Products by Quaternary Ammonium Compounds, 2000.
- (70) Sasseville, D. Hypersensitivity to Preservatives. *Dermatol. Ther.* **2004**, *17* (3), 251–263.
- (71) Santos, A. L. S.; Sodre, C. L.; Valle, R. S.; Silva, B. A.; Abi-Chacra, E. A.; Silva, L. V.; Souza-Goncalves, A. L.; Sengenito, L. S.; Goncalves, D. S.; Souza, L. O. P.; et al. Antimicrobial Action of Chelating Agents: Repercussions on the Microorganism Development, Virulence and Pathogenesis. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (17), 2715–2737.
- (72) Tamjidi, F.; Shahedi, M.; Varshosaz, J.; Nasirpour, A. EDTA and A-tocopherol Improve the Chemical Stability of Astaxanthin Loaded into Nanostructured Lipid Carriers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116* (8), 968–977.
- (73) Akkbik, M.; Assim, Z. Bin; Ahmad, F. B. Optimization and Validation of RP-HPLC-UV/Vis Method for Determination Phenolic Compounds in Several Personal Care Products. *Int. J. Anal. Chem.* **2011**, *2011* (2), 858153.
- (74) Domingos, A. K.; Saad, E. B.; Vechiatto, W. W. D.; Wilhelm, H. M.; Ramos, L. P. The Influence of BHA, BHT and TBHQ on the Oxidation Stability of Soybean Oil Ethyl Esters (Biodiesel). *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18* (2), 416–423.
- (75) Ganceviciene, R.; Liakou, A. I.; Theodoridis, A.; Makrantonaki, E.; Zouboulis, C. C. Skin Anti-Aging Strategies. *Dermatoendocrinol.* **2012**, *4* (3), 308–319.
- (76) Barrita, J.; Sánchez, M. Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases. *Oxidative Stress Chronic Degener. Dis. - A Role Antioxidants* **2013**, 450–484.
- (77) Darbre, P. D.; Harvey, P. W. Paraben Esters: Review of Recent Studies of Endocrine Toxicity, Absorption, Esterase and Human Exposure, and Discussion of Potential Human Health Risks. *J. Appl. Toxicol.* **2008**, *28* (5), 561–578.
- (78) Ito, N.; Fukushima, S.; Tsuda, H. Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by Bha, Bht, and Other Antioxidants. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **1985**, *15* (2), 109–150.
- (79) Gultekin, F.; Doguc, D. K. Allergic and Immunologic Reactions to Food Additives. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2013**, *45* (1), 6–29.
- (80) Sasseville, D. Hypersensitivity to Preservatives. *Dermatol. Ther.* **2004**, *17* (3), 251–

- 263.
- (81) Aalto-Korte, K.; Kuuliala, O.; Suuronen, K.; Alanko, K. Occupational Contact Allergy to Formaldehyde and Formaldehyde Releasers. *Contact Dermatitis* **2008**, *59* (5), 280–289.
- (82) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P T* **2015**, *40* (4), 277–283.
- (83) Levy, S. B.; Marshall, B. Antibacterial Resistance Worldwide: Causes, Challenges and Responses. *Nat. Med.* **2004**, *10* (12s), S122–S129.
- (84) Selvaraj, K. K.; Sivakumar, S.; Sampath, S.; Shanmugam, G.; Sundaresan, U.; Ramaswamy, B. R. Paraben Resistance in Bacteria from Sewage Treatment Plant Effluents in India. *Water Sci. Technol.* **2013**, *68* (9), 2067.
- (85) Sundheim, G.; Langsrud, S.; Heir, E.; Holck, A. L. Bacterial Resistance to Disinfectants Containing Quaternary Ammonium Compounds. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **1998**, *41* (3–4), 235–239.
- (86) Kerdudo, A.; Fontaine-Vive, F.; Dingas, A.; Faure, C.; Fernandez, X. Optimization of Cosmetic Preservation: Water Activity Reduction. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2015**, *37* (1), 31–40.
- (87) Muntean, M.-V.; Marian, O.; Barbieru, V.; Cătunescu, G. M.; Ranta, O.; Drocas, I.; Terhes, S. High Pressure Processing in Food Industry – Characteristics and Applications. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2016**, *10*, 377–383.
- (88) Madaeni, S. S.; Yasemi, M.; Delpisheh, A. Milk Sterilization Using Membranes. *J. Food Process Eng.* **2011**, *34* (4), 1071–1085.
- (89) Dionísio, A. P.; Gomes, R. T.; Oetterer, M. Ionizing Radiation Effects on Food Vitamins: A Review. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2009**, *52* (5), 1267–1278.
- (90) Choudhary, R.; Bandla, S. Ultraviolet Pasteurization for Food Industry. *Int. J. Food Sci. Nutr. Eng.* **2012**, *2* (1), 12–15.
- (91) Décret n°81-227 du 10 mars 1981 relatif à l'homologation des cahiers des charges définissant les conditions de production de l'agriculture n'utilisant pas de produits chimiques de synthèse | Legifrance <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000310810> (accessed May 5, 2017).
- (92) Gyawali, R.; Ibrahim, S. A. Natural Products as Antimicrobial Agents. *Food Control* **2014**, *46*, 412–429.
- (93) Demain, A. L.; Fang, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2000**, *69*, 1–39.
- (94) Hancock, R. E.; Scott, M. G. The Role of Antimicrobial Peptides in Animal Defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (16), 8856–8861.
- (95) Bahar, A. A.; Ren, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. **2013**, *6* (12), 1543–1575.
- (96) Brogden, K. A.; Ackermann, M.; McCray, P. B.; Tack, B. F. Antimicrobial Peptides in Animals and Their Role in Host Defences. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *22* (5), 465–478.
- (97) Bhat, Z. F.; Kumar, S.; Bhat, H. F. Bioactive Peptides of Animal Origin: A Review. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52* (9), 5377–5392.
- (98) Cole, A. M.; Weis, P.; Diamond, G. Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (18), 12008–12013.
- (99) Oppenheim, J. J.; Biragyn, A.; Kwak, L. W.; Yang, D. Roles of Antimicrobial Peptides such as Defensins in Innate and Adaptive. *immunity. Ann. Rheum. Dis.* **2003**, *62* (Suppl 2), ii17–ii21.
- (100) Mohanty, D. P.; Mohapatra, S.; Misra, S.; Sahu, P. S. Milk Derived Bioactive Peptides

- and Their Impact on Human Health – A Review. *Saudi J. Biol. Sci.* **2016**, *23* (5), 577–583.
- (101) Marshall, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. *Altern. Med. Rev.* **2004**, *9* (2), 136–156.
- (102) Clardy, J.; Fischbach, M. A.; Currie, C. R. The Natural History of Antibiotics. *Curr. Biol.* **2009**, *19* (11), R437–41.
- (103) Hassan, M.; Kjos, M.; Nes, I. F.; Diep, D. B.; Lotfipour, F. Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113* (4), 723–736.
- (104) Gálvez, A.; López, R. L.; Abriouel, H.; Valdivia, E.; Omar, N. Ben. Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2008**, *28* (2), 125–152.
- (105) Gharsallaoui, A.; Oulahal, N.; Joly, C.; Degraeve, P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56* (8), 1262–1274.
- (106) Sauer, M.; Porro, D.; Mattanovich, D.; Branduardi, P. Microbial Production of Organic Acids: Expanding the Markets. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26* (2), 100–108.
- (107) In, Y.-W.; Kim, J.-J.; Kim, H.-J.; Oh, S.-W. Antimicrobial Activities of Acetic Acid, Citric Acid and Lactic Acid against *Shigella* Species. *J. Food Saf.* **2013**, *33* (1), 79–85.
- (108) Raftari, M.; Jalilian, F. A.; Abdulmir, A. S.; Son, R.; Sekawi, Z.; Fatimah, A. B. Effect of Organic Acids on *Escherichia Coli* O157:H7 and *Staphylococcus Aureus* Contaminated Meat. *Open Microbiol. J.* **2009**, *3*, 121–127.
- (109) Carretero, M. I.; Pozo, M. Clay and Non-Clay Minerals in the Pharmaceutical Industry: Part I. Excipients and Medical Applications. *Appl. Clay Sci.* **2009**, *46* (1), 73–80.
- (110) Carretero, M. I.; Pozo, M. Clay and Non-Clay Minerals in the Pharmaceutical and Cosmetic Industries Part II. Active Ingredients. *Appl. Clay Sci.* **2010**, *47* (3), 171–181.
- (111) Laudato, M.; Pescitellia, L.; Capasso, R. Natural Products of Mineral Origin. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8* (3), 419–423.
- (112) Seil, J. T.; Webster, T. J. Antimicrobial Applications of Nanotechnology: Methods and Literature. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 2767–2781.
- (113) Shannon, E.; Abu-Ghannam, N. Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. *Marine Drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) April 22, 2016.
- (114) Falaise, C.; François, C.; Travers, M. A.; Morga, B.; Haure, J.; Tremblay, R.; Turcotte, F.; Pasetto, P.; Gastineau, R.; Hardivillier, Y.; et al. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Marine Drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) September 2, 2016.
- (115) Sathya, R.; Kanaga, N.; Sankar, P.; Jeeva, S. Antioxidant Properties of Phlorotannins from Brown Seaweed *Cystoseira Trinodis* (Forsskål) C. Agardh. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S2608–S2614.
- (116) Thomas, N. V.; Kim, S.-K. Beneficial Effects of Marine Algal Compounds in Cosmeceuticals. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (1), 146–164.
- (117) Dussault, D.; Vu, K. D.; Vansach, T.; Horgen, F. D.; Lacroix, M. Antimicrobial Effects of Marine Algal Extracts and Cyanobacterial Pure Compounds against Five Foodborne Pathogens. *Food Chem.* **2016**, *199*, 114–118.
- (118) Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *J. Food Eng.* **2013**, *117* (4), 426–436.
- (119) Sasidharan, S.; Chen, Y.; Saravanan, D.; Sundram, K. M.; Yoga Latha, L. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *African*

- J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM* **2011**, 8 (1), 1–10.
- (120) Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Secondary Metabolites. *Biochem. Mol. Biol. Plants* **2000**, 7 (7), 1250–1318.
- (121) Fichan, I.; Larroche, C.; Gros, J. B. Water Solubility, Vapor Pressure, and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids. *J.Chem.Eng.Data* **1999**, 44 (1), 56–62.
- (122) Cal, K. Aqueous Solubility of Liquid Monoterpenes at 293 K and Relationship with Calculated Log P Value. *Yakugaku Zasshi* **2006**, 126 (4), 307–309.
- (123) Aleksic, V.; Knezevic, P. Antimicrobial and Antioxidative Activity of Extracts and Essential Oils of *Myrtus Communis* L. *Microbiol. Res.* **2014**, 169 (4), 240–254.
- (124) Joshi, S.; Chanotiya, C. S.; Agarwal, G.; Prakash, O.; Pant, A. K.; Mathela, C. S. Terpenoid Compositions, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Rhizome Essential Oils of Different *Hedychium* Species. *Chem. Biodivers.* **2008**, 5 (2), 299–309.
- (125) Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49 (6), 2474–2478.
- (126) Cushnie, T. P. T.; Cushnie, B.; Lamb, A. J. Alkaloids: An Overview of Their Antibacterial, Antibiotic-Enhancing and Antivirulence Activities. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, 44 (5), 377–386.
- (127) Yubin, J.; Miao, Y.; Bing, W.; Yao, Z. The Extraction, Separation and Purification of Alkaloids in the Natural Medicine. *J. Chem. Pharm. Res.* **2014**, 6 (1), 338–345.
- (128) Moloudizargari, M.; Mikaili, P.; Aghajanshakeri, S.; Asghari, M. H.; Shayegh, J. Pharmacological and Therapeutic Effects of *Peganum Harmala* and Its Main Alkaloids. *Pharmacogn. Rev.* **2013**, 7 (14), 199–212.
- (129) Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chem.* **2006**, 99 (1), 191–203.
- (130) Wahle, K. W. J.; Brown, I.; Rotondo, D.; Heys, S. D. Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, 698, 36–51.
- (131) Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, 50 (3), 586–621.
- (132) Galanakis, C. M.; Goulas, V.; Tsakona, S.; Manganaris, G. A.; Gekas, V. A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *Int. J. Food Prop.* **2013**, 16 (2), 382–396.
- (133) Pereira, D. M.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* **2009**, 14 (6), 2202–2211.
- (134) Li, A.-N.; Li, S.; Zhang, Y.-J.; Xu, X.-R.; Chen, Y.-M.; Li, H.-B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* **2014**, 6 (12), 6020–6047.
- (135) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils – A Review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46 (2), 446–475.
- (136) Burt, S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—a Review. *Food Microbiol.* **2004**, 94 (3), 223–253.
- (137) Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P. J.; Nychas, G. J. E. A Study of the Minimum Inhibitory Concentration and Mode of Action of Oregano Essential Oil, Thymol and Carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, 91 (3), 453–462.
- (138) Petrovska, B. B. Historical Review of Medicinal Plants’ Usage. *Pharmacogn. Rev.* **2012**, 6 (11), 1–5.
- (139) Krishnamurti, C.; Rao, S. C. The Isolation of Morphine by Serturmer. *Indian J. Anaesth.* **2016**, 60 (11), 861–862.
- (140) Achan, J.; Talisuna, A. O.; Erhart, A.; Yeka, A.; Tibenderana, J. K.; Baliraine, F. N.;

- Rosenthal, P. J.; D'Alessandro, U. Quinine, an Old Anti-Malarial Drug in a Modern World: Role in the Treatment of Malaria. *Malar. J.* **2011**, *10*, 144.
- (141) Lafont, O. Du Saule À L'aspirine. *Rev. Hist. Pharm. (Paris)*. **2007**, *94* (354), 209–216.
- (142) Dias, M. I.; Caleja, C.; Ferreira, I. C. F. R.; Barreiro, M. F. The Use of Encapsulation to Guarantee the Stability of Phenolic Compounds. In *New Polymers for Encapsulation of Nutraceutical Compounds*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2017; pp 121–143.
- (143) Friedman, M.; Jürgens, H. S. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (6), 2101–2110.
- (144) Chang, Q.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S.; Ho, W. K. K. Effect of Storage Temperature on Phenolics Stability in Hawthorn (*Crataegus Pinnatifida* Var. Major) Fruits and a Hawthorn Drink. *Food Chem.* **2006**, *98* (3), 426–430.
- (145) Munin, A.; Edwards-Lévy, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* **2011**, *3* (4), 793–829.
- (146) Ber, A. Neutralization of Phenolic (Aromatic) Food Compounds in a Holistic General Practice. *Journal of Orthomolecular Psychiatry*. American Assn of Orthomolecular Medicine 1983, pp 283–291.
- (147) Shelke, N. B.; James, R.; Laurencin, C. T.; Kumbar, S. G. Polysaccharide Biomaterials for Drug Delivery and Regenerative Engineering. *Polym. Adv. Technol.* **2014**, *25* (5), 448–460.
- (148) Laurienzo, P.; Paola. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (9), 2435–2465.
- (149) Saha, D.; Bhattacharya, S. Hydrocolloids as Thickening and Gelling Agents in Food: A Critical Review. *J. Food Sci. Technol.* **2010**, *47* (6), 587–597.
- (150) Liu, J.; Willför, S.; Xu, C. A Review of Bioactive Plant Polysaccharides: Biological Activities, Functionalization, and Biomedical Applications. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre* **2015**, *5* (1), 31–61.
- (151) Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144* (1), 51–63.
- (152) Simon, S.; Dugast, J. .; Le Cerf, D.; Picton, L.; Muller, G. Amphiphilic Polysaccharides. Evidence for a Competition between Intra and Intermolecular Associations in Dilute System. *Polymer (Guildf)*. **2003**, *44* (26), 7917–7924.
- (153) Bataille, I.; Huguet, J.; Muller, G.; Mocanu, G.; Carpov, A. Associative Behaviour of Hydrophobically Modified Carboxymethylpullulan Derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *20* (3), 179–191.
- (154) Ali, G.; Dulong, V.; Gasmi, S. N.; Rihouey, C.; Picton, L.; Le Cerf, D. Covalent Immobilization of Pullulanase on Alginate and Study of Its Hydrolysis of Pullulan. *Biotechnol. Prog.* **2015**, *31* (4), 883–889.
- (155) Dulong, V.; Hadrich, A.; Picton, L.; Le Cerf, D. Enzymatic Cross-Linking of Carboxymethylpullulan Grafted with Ferulic Acid. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 78–87.
- (156) Dulong, V.; Le Cerf, D.; Picton, L.; Muller, G. Carboxymethylpullulan Hydrogels with a Ionic And/or Amphiphilic Behavior: Swelling Properties and Entrapment of Cationic And/or Hydrophobic Molecules. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *274* (1–3), 163–169.
- (157) Dulong, V.; Mocanu, G.; Picton, L.; Le Cerf, D. Amphiphilic and Thermosensitive Copolymers Based on Pullulan and Jeffamine®: Synthesis, Characterization and Physicochemical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (2), 1522–1531.
- (158) Belbekhouche, S.; Ali, G.; Dulong, V.; Picton, L.; Le Cerf, D. Synthesis and Characterization of Thermosensitive and pH-Sensitive Block Copolymers Based on

- Polyetheramine and Pullulan with Different Length. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86* (1), 304–312.
- (159) Paul, D.; Dobberstein, R. Expectorants, Antitussives, and Related Agents. *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.* **2000**, No. 3.
- (160) Carter, A. H. Antipyretic Effects of External Applications of Guaiacol. *Br. Med. J.* **1894**, *2* (1749), 6–7.
- (161) Cooper, R. A. Inhibition of Biofilms by Glucose Oxidase, Lactoperoxidase and Guaiacol: The Active Antibacterial Component in an Enzyme Alginate. *Int. Wound J.* **2013**, *10* (6), 630–637.
- (162) Zabka, M.; Pavela, R. Antifungal Efficacy of Some Natural Phenolic Compounds against Significant Pathogenic and Toxinogenic Filamentous Fungi. *Chemosphere* **2013**, *93* (6), 1051–1056.
- (163) Yu, L.; Ren, J.-X.; Nan, H.-M.; Liu, B.-F. Identification of Antibacterial and Antioxidant Constituents of the Essential Oils of *Cynanchum Chinense* and *Ligustrum Compactum*. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29* (18), 1779–1782.
- (164) Liu, H.; Lepoittevin, B.; Roddier, C.; Guerineau, V.; Bech, L.; Herry, J. M.; Bellon-Fontaine, M. N.; Roger, P. Facile Synthesis and Promising Antibacterial Properties of a New Guaiacol-Based Polymer. *Polymer (Guildf)*. **2011**, *52* (9), 1908–1916.
- (165) Rehab, M. A. E.-B.; Zeinab, S. H. Eugenol and Linalool: Comparison of Their Antibacterial and Antifungal Activities. *African J. Microbiol. Res.* **2016**, *10* (44), 1860–1872.
- (166) Gülçin, İ. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Food* **2011**, *14* (9), 975–985.
- (167) Rojo, L.; Barcenilla, J. M.; Vázquez, B.; González, R.; San Román, J. Intrinsically Antibacterial Materials Based on Polymeric Derivatives of Eugenol for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (9), 2530–2535.
- (168) Peña, B.; Casals, M.; Torras, C.; Gumí, T.; Garcia-Valls, R. Vanillin Release from Polysulfone Macrocapsules. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48* (3), 1562–1565.
- (169) Keawchaon, L.; Yoksan, R. Preparation, Characterization and in Vitro Release Study of Carvacrol-Loaded Chitosan Nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *84* (1), 163–171.
- (170) Arasoğlu, T.; Derman, S.; Mansuroğlu, B.; Uzunoğlu, D.; Koçyiğit, B.; Gümüş, B.; Acar, T.; Tuncer, B. Preparation, Characterization, and Enhanced Antimicrobial Activity: Quercetin-Loaded PLGA Nanoparticles against Foodborne Pathogens. *Turkish J. Biol.* **2017**, *41* (1), 127–140.
- (171) Jia, Z.; Dumont, M.-J.; Orsat, V. Encapsulation of Phenolic Compounds Present in Plants Using Protein Matrices. *Food Biosci.* **2016**, *15*, 87–104.
- (172) Sanla-Ead, N.; Jangchud, A.; Chonhenchob, V.; Suppakul, P. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-Based Packaging Films. *Packag. Technol. Sci.* **2012**, *25* (1), 7–17.
- (173) Ponce, A. G.; Roura, S. I.; del Valle, C. E.; Moreira, M. R. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Edible Coatings Enriched with Natural Plant Extracts: In Vitro and in Vivo Studies. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *49* (2), 294–300.
- (174) Wagh, Y. R.; Pushpadass, H. A.; Emerald, F. M. E.; Nath, B. S. Preparation and Characterization of Milk Protein Films and Their Application for Packaging of Cheddar Cheese. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51* (12), 3767–3775.
- (175) Dashipour, A.; Razavilar, V.; Hosseini, H.; Shojae-Aliabadi, S.; German, J. B.; Ghanati, K.; Khakpour, M.; Khaksar, R. Antioxidant and Antimicrobial Carboxymethyl Cellulose Films Containing *Zataria Multiflora* Essential Oil. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 606–613.
- (176) Rabea, E. I.; Badawy, M. E. T.; Stevens, C. V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. Chitosan

- as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. American Chemical Society **2003**, pp 1457–1465.
- (177) Ngo, D.-H.; Kim, S.-K. Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. In *Advances in food and nutrition research*; **2014**; Vol. 73, pp 15–31.
- (178) Aljawish, A.; Chevalot, I.; Jasniewski, J.; Revol-Junelles, A.-M.; Scher, J.; Muniglia, L. Laccase-Catalysed Functionalisation of Chitosan by Ferulic Acid and Ethyl Ferulate: Evaluation of Physicochemical and Biofunctional Properties. *Food Chem.* **2014**, *161*, 279–287.
- (179) Liu, J.; Wen, X.; Lu, J.; Kan, J.; Jin, C. Free Radical Mediated Grafting of Chitosan with Caffeic and Ferulic Acids: Structures and Antioxidant Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *65*, 97–106.
- (180) Aytakin, A. O.; Morimura, S.; Kida, K. Synthesis of Chitosan–caffeic Acid Derivatives and Evaluation of Their Antioxidant Activities. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *111* (2), 212–216.
- (181) Liu, J.; Meng, C.; Yan, Y.; Shan, Y.; Kan, J.; Jin, C. Protocatechuic Acid Grafted onto Chitosan: Characterization and Antioxidant Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 518–526.
- (182) Dorman, H. J.; Deans, S. G. Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88* (2), 308–316.
- (183) Brewer, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10* (4), 221–247.





## Chapitre B : Matériels et Méthodes

<b><u>1 Synthèses chimiques</u></b> .....	<b>71</b>
1.1 Réactifs et solvants .....	71
1.2 Protocoles des synthèses chimiques .....	72
<b><u>2 Techniques de caractérisations du greffage chimique</u></b> .....	<b>74</b>
2.1 Spectroscopie Ultra-Violet –Visible (UV-Visible) .....	74
2.2 Spectroscopie Infra-Rouge (IR).....	74
2.3 Spectroscopie de Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	74
<b><u>3 Techniques de caractérisations physico-chimique</u></b> .....	<b>75</b>
3.1 Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco .....	76
3.2 Rhéologie.....	78
3.2.1 Définitions.....	78
3.2.2 Viscosimétrie.....	79
3.2.3 Etude en mode écoulement .....	82
3.3 Fluorescence .....	82
<b><u>4 Tests antioxydants</u></b> .....	<b>83</b>
4.1 Principe de la méthode avec le radical DPPH•.....	84
4.2 Principe de la méthode avec le radical cation ABTS .....	87
<b><u>5 Tests antibactériens</u></b> .....	<b>88</b>
5.1 Définitions CMI et CMB .....	88
5.2 Détermination des activités antibactériennes (Cas de notre étude) .....	89
<b><u>6 Cytocompatibilité</u></b> .....	<b>93</b>
6.1 Live/Dead .....	94
6.2 Alamar Blue.....	94



# 1 Synthèses chimiques

## 1.1 Réactifs et solvants

### Synthèses :

Les polysaccharides utilisés sont : le pullulane qui provient du producteur nippon Hayashibara Biochemical Laboratory (Okayama, Japon), le carboxyméthylpullulane (synthétisé au sein du laboratoire) et l'alginate (M/G = 1,2) qui provient de chez Cargill (France).

Le dérivé phénolique utilisé est l'aminogaiacol (5-Amino-2-methoxyphénol) qui provient de Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne). Le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI) a été fourni par Sigma-Aldrich (France). La soude (NaOH) et l'acide chlorhydrique (HCl) proviennent de chez VWR (France).

Les solvants utilisés sont : l'eau milli-Q et l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 M. L'eau a été purifiée au sein du laboratoire avec un système de filtration Millipore produisant de l'eau ultra-pure de qualité Milli-Q (Millipore, USA).

Tous les réactifs ont été utilisés sans purification préalable.

### Caractérisation et évaluation des propriétés :

Les solvants utilisés : le D<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O; 99,9 atom % D, Sigma-Aldrich, France) pour la spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H, l'eau milli-Q, les tablettes de tampon phosphate salin PBS (Sigma-Aldrich, France) et le chlorure de sodium NaCl (Merck KGaA) pour toutes les autres caractérisations.

Tests antioxydants: 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, France) et le sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) (AlfaAesar, France).

Fluorescence : pyrène (Acros organics, USA)

Tests antibactériens : La souche bactérienne utilisée dans le cadre des tests antibactériens est *Staphylococcus aureus* souche ATCC 29213. Les milieux de culture BHI et BHI agar (Brain Heart Infusion, Sigma-Aldrich, France) ont été choisis pour la nutrition et le développement de la bactérie *S.aureus*.

Culture cellulaire : Les cellules de souris fibroblastes (L929 - ATCC® CCL-1) ont été employées pour des essais de cytotoxicité. Le milieu de culture utilisé pour la croissance des cellules fibroblastes est le milieu essentiel minimum ( $\alpha$ -MEM). Il a été complété avec 10% de serum foetal de bovin (FBS, Invitrogen), 100 mg.ml<sup>-1</sup> de streptomycine (Sigma), 100 mM de penicillin (Sigma), 2 mM de L-glutamine (Sigma), appelé milieu de culture complet.

## 1.2 Protocoles des synthèses chimiques

### Exemple du protocole de la synthèse du CMP greffé aminogaiacol noté CMP-NH-GA<sub>1</sub> dans le DMSO

La veille, le CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> est placé sous vide à 40°C pendant une nuit. Pour réaliser la synthèse, 0,605g (1,35 mmol) de CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> sont dissous dans 30ml de DMSO. La solution de CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> est ensuite transvasée dans un ballon de réaction de 250 ml puis chauffée à 60°C à l'aide d'un bain d'huile. Après 20min (temps de dissolution complète du CMP-COON(Bu)<sub>4</sub>), 0,27686g (1,34 mmol) de DCCI dans 5 ml de DMSO sont ajoutés à la solution de CMP-COON(Bu)<sub>4</sub>. Le mélange est laissé sous agitation à 60°C pendant 3h. L'aminogaiacol (0,37267 g, 2,68 mmol dissous dans 5 mL de DMSO) est alors ajouté en excès par rapport au CMP-N(Bu)<sub>4</sub> dans le mélange. Le tout est laissé sous agitation à 60°C pour une durée de 6 jours.

Une fois la réaction terminée, la solution de synthèse est précipitée dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) afin de transformer les sels ammoniums -COON(Bu)<sub>4</sub> n'ayant pas réagi au cours de la synthèse en sels de sodium -COONa. Le produit de synthèse est ensuite précipité dans de l'acétone puis filtré sous vide. Il est récupéré par la suite, remis en solution dans l'eau milli-Q puis dialysé contre de l'eau milli-Q avant d'être lyophilisé.

Dans le cas du solvant DMSO, 4 synthèses ont été réalisées. Le protocole reste le même pour ces 4 synthèses cependant des conditions telles que la forme sous laquelle le CMP de départ se trouve ou encore les quantités en réactifs varient. Ces conditions nous mènent à des résultats différents.

Remarques : Etapes de transformation du CMP-COONa en CMP-COOH (1) puis en CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> (2)

#### **Etape 1 :**

Pour ce faire, une solution de CMP-COONa est préparée à 25 g.L<sup>-1</sup> soit 6 g / 240 ml d'eau milli-Q. Après dissolution complète, la solution est ensuite passée (par petits ajouts) sur une résine échangeuse de cations au préalable régénérée. Le pH de la solution en sortie de colonne est souvent vérifié. Par la suite, 240 mL d'eau sont également ajoutés (par petites fractions) sur la résine échangeuse de cations contenue dans une colonne afin de récupérer tout le produit. On récupère suite à ce passage une solution du CMP-COOH (~ 240 mL) avec un pH égale à 2.

**Étape 2 :**

Par la suite, une solution de sel de tétrabutylammonium est additionnée à celle du CMP-COOH jusqu'à atteindre la neutralité (pH = 7). Après congélation et lyophilisation, le CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> est récupéré.

**Exemple du protocole de la synthèse du CMP-G avec un DS(Ga) théorique égal à 0,25**

La veille, l'aminogaiacol (1,05 mmol) a été dissous dans 80 ml d'acide chlorhydrique HCl 0,05 mol.L<sup>-1</sup> toute une nuit. La solution est colorée en marron clair. En parallèle, une solution de CMP (1 g ; 4,2 mmol) dans 50 mL d'eau milli-Q a également été préparée. Le lendemain, la solution d'aminogaiacol est ajoutée lentement à celle du CMP. Le pH du mélange est ensuite ajusté à 4,5 à l'aide d'une solution de HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Par la suite, l'EDCI (0,24 g ; 1,3 mmol) dans 2 ml d'eau milli-Q est additionné au mélange précédent. Le tout est laissé sous agitation, à température ambiante et pendant 24 h.

A la fin de la réaction, le pH est ajusté à 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. La solution est dialysée (membrane de dialyse Spectra-Por 12-14 kD) en premier lieu pendant 24 h contre de la soude NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> afin d'éliminer l'aminogaiacol libre qui n'aurait pas réagi. Les eaux de dialyse se colorent progressivement en marron clair. La dialyse est poursuivie pendant environ 1 semaine contre de l'eau milli-Q jusqu'à atteindre une conductivité faible (voisine de celle de l'eau milli-Q). Une fois la purification terminée, les solutions sont congelées puis lyophilisées pendant une semaine. Le dérivé CMP-G obtenu est de coloration marron très claire et est stocké à 4°C.

## 2 Techniques de caractérisations du greffage chimique

Tous les principes des techniques employées pour la caractérisation du greffage (UV, IR et RMN) sont présentés en annexe B-1.

### 2.1 Spectroscopie Ultra-Violet –Visible (UV-Visible)

Le spectrophotomètre utilisé pour la caractérisation des échantillons est le Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Agilent, USA). Les solutions de tous les échantillons analysés (polysaccharides précurseurs et dérivés greffés) ont été préparées à une concentration égale à  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  dans de l'eau milli-Q. Elles étaient toutes homogènes. Pour effectuer une mesure, la solution est introduite dans une cuve en quartz bien propre puis placée dans l'appareil avec en parallèle une autre cuve contenant uniquement le solvant de préparation. Un balayage dans le domaine du proche UV (de 400 à 190 nm) est réalisé. La vitesse de balayage a été fixée à 400 nm/min.

### 2.2 Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

Les spectres IR (transmittance (%) = f (nombre d'onde  $\sigma \text{ (cm}^{-1}\text{))})$  de tous les produits (précurseurs et dérivés) ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Nicolet IS50 FT-IR (Thermo Scientific, USA). Pour chaque échantillon d'étude, le spectre IR est obtenu à l'aide du logiciel OMNIC en mode transmission après réalisation de 128 scans. Le domaine d'étude du nombre d'onde  $\sigma$  est compris entre 500 et  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . Pour effectuer une analyse, tous les produits ont directement été déposés (sans préparation préalable) sous forme solide sur le cristal de l'appareil.

### 2.3 Spectroscopie de Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses RMN- $^1\text{H}$  ont été effectuées à l'aide du spectrophotomètre Bruker Advance AC-P 300 MHz spectrometer (USA). Des solutions de polymères greffés et non greffés sont préparées dans du  $\text{D}_2\text{O}$  à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  en présence d'un étalon interne (acétate de sodium) dans certains cas. Il est nécessaire d'utiliser un solvant deutéré afin d'éviter le masquage des protons du polymère que l'on cherche à détecter par ceux du solvant.

Les analyses sont réalisées au moyen de 16 scans avec rotation du tube. Tous les spectres sont traités à l'aide du logiciel MestRenova et fournissent les déplacements chimiques (en ppm) ainsi que les intégrations sous l'air des pics des atomes d'hydrogène constituant la molécule

d'étude. Les intensités des pics des spectres obtenus sont proportionnelles au nombre de protons et à la concentration de l'échantillon.

La spectroscopie RMN est une méthode quantitative qui dans notre cas permet de quantifier les greffons aminogaiacol apportés au polysaccharide d'étude (CMP ou alginate).

Le degré de substitution en aminogaiacol DS(Ga) est défini comme le nombre de mole d'aminogaiacol par nombre de mole d'unité monosaccharide ; notamment, l'unité anhydroglucose dans le cas d'un dérivé greffé obtenu à partir d'un CMP, l'unité acide mannuronique ou guluronique dans le cas des dérivés obtenus avec l'alginate.

Les degrés DS(Ga) expérimentaux sont calculés à l'aide de l'équation B1 après intégration des protons aromatiques de l'aminogaiacol (3 protons) et ceux de l'acétate de sodium (3 protons) utilisé comme étalon interne.

$$DS(Ga) = \frac{m(\text{acétate}) * I(\text{NH}_2\text{GA}) * M(\text{dérivé greffé})}{M(\text{acétate}) * I(\text{acétate}) * m(\text{dérivé greffé})} \quad \text{Eq. B1}$$

avec :

$I(\text{acétate})$  = aire du pic correspondant aux 3 protons de l'acétate de sodium

$I(\text{NH}_2\text{GA})$  = aire du pic correspondant aux 3 protons aromatiques de l'aminogaiacol

$m(\text{acétate})$  = masse exacte en acétate de sodium pesée pour la préparation du tube RMN

$m(\text{dérivé greffé})$  = masse exacte en polymère greffé (CMP-G ou Alg-G) pesée pour la préparation du tube RMN

$M(\text{acétate})$  = Masse molaire de l'acétate de sodium

$M(\text{dérivé greffé})$  = Masse molaire en polymère greffé (CMP-G ou Alg-G)

$M(\text{CMP-G}) = 162 + 80 * DS(\text{COONa}) + 99,15 * DS(\text{Ga})$

avec DS(COONa), le degré de substitution en fonctions carboxylate

$M(\text{Alg-G}) = 198 + 99,15 * DS(\text{Ga})$ .

### 3 Techniques de caractérisations physico-chimique

Les propriétés macroscopiques d'une solution de polymère sont expliquées par l'organisation microscopique des chaînes de polymères en solution. Ces caractéristiques diffèrent en fonction de la nature du polymère mais également des concentrations d'études des solutions.

La caractérisation physico-chimique conduit à la détermination de grandeurs caractéristiques propres à un polymère notamment les masses molaires moyennes en nombre ( $M_n$ ) et en poids ( $M_w$ ), la viscosité intrinsèque ( $[\eta]$ ) mais également des paramètres renseignant sur la forme ou les dimensions des chaînes (Rayon de giration  $R_g$ , Rayon hydrodynamique  $R_h$ ). Elles permettent de mieux appréhender ou comprendre le comportement du polymère d'étude en solution et ce, en vue de futures applications.



La caractérisation physico-chimique d'un polymère en solution peut être réalisée à l'aide de plusieurs techniques. Nous décrivons par la suite les méthodes qui ont été employées tout au long de nos travaux.

### 3.1 Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco

#### Principe :

#### Chromatographie d'exclusion de la lumière (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique est une technique basée sur la séparation des macromolécules en fonction de leur taille ou de leur volume hydrodynamique (volume occupé par les polymères en solution). L'élution des macromolécules est effectuée au travers d'une colonne composée d'un gel poreux (tailles de pores variables) de polymères réticulés. Les macromolécules migrent dans ce gel avec l'éluant et vont être plus ou moins retenues en fonction de leur dimension ou volume hydrodynamique. En effet, les plus volumineuses seront éluées très rapidement alors que les molécules de dimensions inférieures à la taille des pores seront retardées. Une bonne séparation (sans interaction de l'échantillon avec la phase stationnaire) conduira à la détermination de la masse molaire de l'échantillon grâce à une courbe d'étalonnage conventionnelle en traçant  $\log(M) = f(V_e)$ . Cependant, afin de pouvoir associer le volume d'élution ( $V_e$ ) à la masse molaire, les molécules étalons choisies doivent être de même nature et de même conformation que l'échantillon étudié.

Pour s'affranchir de l'étalonnage, la SEC peut être couplée à la diffusion de lumière statique multi angles (MALLS). Cette méthode d'analyse permet l'accès à la masse molaire absolue de chacune des fractions éluées par la SEC et renseigne également sur les tailles et conformations des chaînes en solution.

#### La diffusion de lumière statique multi angles (MALLS)

Lorsqu'un rayonnement lumineux de longueur d'onde  $\lambda_0$  rencontre une particule en solution, il peut alors être diffusé à la même fréquence et à plusieurs angles  $\theta$  dans toutes les directions de l'espace. On parle alors de diffusion de la lumière statique multi angles (MALLS).

La diffusion s'opère en général en milieu dilué. En effet, dans ce régime, les particules sont considérées comme isolées et les interactions entre objets diffusants sont minimisées.

Pour une solution de particules, les études par diffusion de lumière vont permettre de recueillir des intensités diffusées par les particules à une concentration donnée et sous

plusieurs angles. Il va alors être possible d'accéder à des paramètres intrinsèques tels que :  $M_w$ ,  $R_g$  (dans certains cas) ou encore au paramètre thermodynamique de solvation ( $A_2$ ) en utilisant l'équation de la diffusion de la lumière (Eq B2) et par le tracé du diagramme de Zimm. Tous les rappels théoriques sont fournis en annexe B-2.

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda_0^2} R_g^2 \sin^2 \left( \frac{\theta}{2} \right) + \dots \right) + 2A_2C + \dots \quad \text{Eq B2}$$

avec :

K : la constante optique;  
 C : la concentration en polymère;  
 $\Delta R(\theta)$  : le rapport de Rayleigh;  
 $M_w$  : la masse molaire moyenne en poids du polymère;  
 $R_g$  : rayon de giration;  
 $A_2$  : le second coefficient du viriel;  
 $\lambda_0$  : longueur d'onde du faisceau incident.

Dans le cas du couplage avec la SEC, chaque fraction éluée en continu et de très faible concentration passe dans la cellule cylindrique du détecteur MALLS et reçoit un rayonnement laser ( $\lambda \sim 700$  nm). La diffusion multi-angles est détectée grâce à 18 photodiodes placées autour de la cellule. Un détecteur réfractométrique (DRI) placé en aval du système permet de remonter à la concentration massique de chacune des fractions éluées. Il est alors possible de disposer de la distribution des masses molaires et des rayons de giration (si la taille de la molécule analysée est suffisante pour assurer une diffusion anisotrope de la lumière) ainsi qu'aux grandeurs moyennes en nombre et en poids.

A ce couplage SEC/MALLS peut également être ajouté un détecteur viscosimétrique (Visco) qui permet de déterminer la viscosité intrinsèque ( $[\eta]$ ) de chaque fraction éluée de l'échantillon. La relation de Einstein-Simha (Eq B3) permet alors de remonter au rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) à partir de  $[\eta]$  si la conformation de la molécule est supposée sphérique.

$$R_h = \left( \frac{3[\eta]M}{4\pi \cdot 2.5N_A} \right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Eq B3}$$

avec

$[\eta]$  : la viscosité intrinsèque;  
 M : la Masse molaire;  
 $N_A$  : le nombre d'Avogadro;  
 2.5 correspond à la valeur d'un facteur  $\upsilon$  considérée ici pour une conformation sphérique.

En somme, la triple détection conduit à la connaissance des grandeurs caractéristiques de polymères en solutions notamment les masses molaires  $M_n$  et  $M_w$ , la viscosité intrinsèque  $[\eta]$ , les rayons  $R_h$  et  $R_g$ .

### Appareillage utilisé

Un schéma de l'appareillage est fourni en annexe B-3. Le dispositif expérimental de la SEC utilisé comporte un dégazeur (Shimadzu LC-10AI, Japon) une pompe (LC 10 AI Shimadzu) à un débit de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , un préfiltre de porosité  $0,45\mu\text{m}$ , une vanne d'injection et deux colonnes montées en série après une précolonne (colonne de garde Shodex OHPAK SB 804 HQ et une colonne Shodex OHPAK SB 806 HQ (Shodex, Japon)). Les colonnes sont constituées d'un gel poreux de polyhydroxyméthylmétacrylate.

Les mesures de diffusion de la lumière ont été réalisées avec un spectrophotomètre DAWN HELEOS (Wyatt Technology corp., Santa Barbara, Californie, Etats-Unis) constitué d'une cellule K5 de  $66 \mu\text{L}$  et 18 photodiodes (normalisée avec le détecteur à  $90^\circ\text{C}$  en utilisant la protéine albumine sérum de bovin) et d'un laser Ga-As ( $\lambda = 690 \text{ nm}$ ).

La concentration de chaque fraction éluée a été déterminée avec le détecteur DRI (RID-10A Shimadzu, Japon) en utilisant une valeur d'indice d'incrément  $dn/dc$  égale à  $0,140 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  dans le cas du CMP<sup>1</sup> et des dérivés greffés et également dans le cas de l'Alginate<sup>2</sup> et des dérivés greffés.

Le détecteur viscosimétrique utilisé est le ViscoStar II (Wyatt Technology, Inc., Etats-Unis).

### Conditions d'analyses

L'éluant utilisé est le tampon phosphate PBS ( $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,4) filtré à l'aide d'un filtre  $0,1 \mu\text{m}$  (Millipore, Etats-Unis), dégazé en ligne (DGU-20A3 Shimadzu, Japon) et élué à un débit de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Les solutions de polymères ont été préparées à  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans du solvant tampon phosphate PBS puis placées sous agitation pendant 24 h à  $25^\circ\text{C}$ .  $100 \mu\text{L}$  de solution de polymère filtrée ( $0,45\mu\text{m}$ , Millipore, USA) sont ensuite injectés à l'aide d'un injecteur automatique ((SIL - 20A, Shimadzu, Japon) dans l'appareillage. Les données obtenues sont analysées en utilisant le diagramme de Zimm de 1<sup>er</sup> ordre adapté avec le logiciel Astra 6.1.1.17.

## **3.2 Rhéologie**

### **3.2.1 Définitions**

La dissolution d'un polymère dans un solvant conduit à l'augmentation de la viscosité de la solution (solvant et polymère). Lorsqu'un tel fluide est soumis à un ensemble de forces, il est susceptible de se déformer. Dans le cas d'un écoulement laminaire, où le matériau est assimilé

à un ensemble de couches adjacentes parallèles entre elles, la déformation ( $\gamma$ ) est illustrée par le glissement des différentes couches les unes sur les autres sans qu'il y ait transfert de matière d'une couche à l'autre.

La rhéologie ou encore « science de l'écoulement » permet l'étude des déformations ( $\gamma$ ) ou plus précisément de la vitesse de déformation ( $\dot{\gamma}$ ) d'un polymère en solution suite à l'application d'une contrainte ( $\sigma$ ) sur le fluide. En d'autres termes, ces études vont conduire à la détermination de la viscosité (résistance à l'écoulement d'un fluide) de la solution définie par :

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad \text{Eq. B4}$$

avec :

$\eta$  : la viscosité, exprimée en Pa.s (SI);

$\sigma$  : la contrainte, exprimée en Pa (SI);

$\dot{\gamma}$  : la vitesse de déformation ou vitesse de cisaillement ou gradient de vitesse, exprimée en  $s^{-1}$ .

L'évolution de la viscosité avec le gradient de cisaillement traduit différents comportements : newtoniens, rhéofluidifiants, rhéoépaississant, fluides plastiques. Ces derniers sont décrits et illustrés en annexe B-4. Par ailleurs, il faut noter que la viscosité de la solution est fonction d'autres paramètres tels que : la masse molaire du polymère, la concentration d'étude ou encore la température.

### 3.2.2 Viscosimétrie

En régime dilué, les mesures de viscosités absolues (newtoniennes) de solutions d'un polymère à différentes concentrations permettent de déterminer les différentes viscosités définies ci-dessous :

➤ la viscosité relative  $\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$  Eq. B5

➤ la viscosité spécifique  $\eta_{spe} = \eta_{rel} - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$  Eq. B6

➤ la viscosité réduite  $\eta_{red} = \frac{\eta_{spe}}{C} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C}$  Eq. B7

➤ la viscosité inhérente  $\eta_{inh} = \frac{\ln\left(\frac{\eta}{\eta_0}\right)}{C}$  Eq. B8

avec :

$\eta$  : la viscosité de la solution;

$\eta_0$  : la viscosité du solvant;

C : concentration en polymère.

En utilisant les relations d'Huggins (Eq. B9) ou de Kramer (Eq. B10), il est alors possible de remonter à la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  qui est caractéristique d'un couple polymère/solvant à une température donnée. Ce paramètre reflète la conformation des chaînes isolées en solution, leur volume hydrodynamique.

$$\eta_{\text{spe}}/C = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \quad \text{Eq. B9}$$

$$1/C \cdot \ln \eta/\eta_0 = [\eta] + K_K [\eta]^2 C \quad \text{Eq. B10}$$

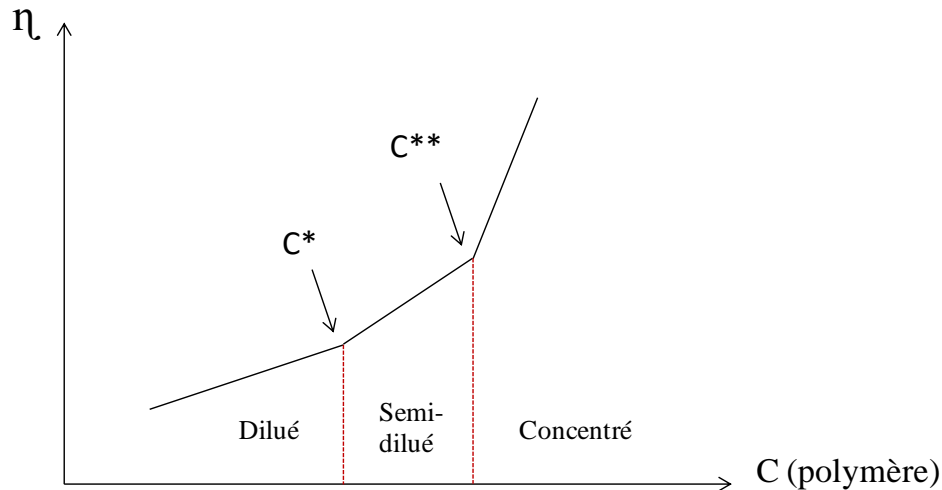
avec :

$K_H$  : constante de Huggins

$K_K$  : constante de Kramer

Nous avons utilisé la relation de Huggins afin de remonter aux valeurs de  $[\eta]$  et  $K_H$  dans le cas des polymères d'étude. La constante de Huggins donne des informations sur les interactions polymère-polymère. La détermination de ces paramètres se fait en formulant l'hypothèse d'être dans le cas d'un fluide newtonien (viscosité indépendante du gradient de cisaillement). Pour ce faire, on travaille généralement à cisaillement faible et constant.

Comme déjà abordé, la détermination des grandeurs intrinsèques d'un polymère est réalisée en régime dilué. Dans ce domaine, les chaînes de macromolécules sont considérées comme isolées, libres de leur mouvement. Par ailleurs, il existe d'autres domaines de concentrations à prendre en compte dans l'étude d'un polymère en solution. Les concentrations  $C^*$  (concentration de recouvrement) et  $C^{**}$  (concentration d'enchevêtrement) marquent les limites entre les différents régimes de concentrations pouvant exister : dilué, semi-dilué et concentré. Ces derniers sont illustrés en annexe B-5. Les valeurs de ces concentrations varient en fonction de la nature du polymère d'étude. D'une manière générale, l'évolution de la viscosité en fonction de la concentration d'un polymère peut être représentée de la manière suivante (Figure B-1) :



**Figure B-1 :** Evolution générale de la viscosité en fonction de la concentration pour un polymère

Il est possible d'accéder aux ruptures de pentes  $C^*$  et  $C^{**}$  pour un polymère donné, grâce à la représentation bilogarithmique  $\eta_{spe} = f(C)$ . En somme, les études par viscosimétrie permettent d'accéder à des paramètres tels que la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  et les concentrations  $C^*$  et  $C^{**}$  délimitant les régimes de concentrations d'un polymère en solution.

#### Conditions d'analyses :

Les mesures de viscosité ont été réalisées à l'aide d'un viscosimètre Low Shear LS400 (France) de type couette. C'est un viscosimètre de type rotatif. Il est composé de deux cylindres concentriques. L'un des cylindres est en rotation et le second reste immobile. La solution à caractériser est introduite entre les deux cylindres. Les mesures sont effectuées à 25°C (circulation d'eau thermostatée).

Les polymères non greffés (CMP ou Alginate) ainsi que les dérivés greffés ont été préparés à des concentrations variables soit (2,5 - 60 g.L<sup>-1</sup>) dans le cas du CMP et de ces dérivés greffés et entre (1 - 10 g.L<sup>-1</sup>) dans le cas de l'alginate et des dérivés obtenus. Le solvant utilisé est le tampon phosphate à 0,15 M. Les solutions sont analysées après 24 h d'agitation. Le comportement newtonien a été vérifié à différents cisaillements 1 s<sup>-1</sup>, 2 s<sup>-1</sup> et 5 s<sup>-1</sup>. Les résultats présentés dans la suite du manuscrit concernent les mesures effectuées en régime newtonien à 1s<sup>-1</sup>.

### 3.2.3 Etude en mode écoulement

L'étude du comportement des solutions de polymère en régimes semi-dilué et concentré peut être effectué selon différents modes : en mode écoulement, en mode oscillation ou encore en mode fluage. Les mesures en mode oscillation et fluage renseignent sur le comportement viscoélastique du matériau. Nous nous sommes intéressés dans notre étude au mode écoulement. Dans ce cas, nous suivons l'évolution de la viscosité apparente en fonction du gradient de cisaillement.

#### Conditions d'analyses :

L'appareil utilisé est le rhéomètre Discovery HR2 de TA Instrument (U.K). Deux géométries ont été employées : la géométrie double cylindres concentriques de taille standard (aluminium – gap 500  $\mu\text{m}$ ) et la géométrie cône-plan (diamètre 4 cm, angle 2°, gap 57  $\mu\text{m}$ ). La température des mesures est fixée à 25°C.

Les solutions ont été préparées à différentes concentrations. Dans le cas du CMP et des dérivés obtenus, les analyses ont été réalisées à 50, 100 et 150  $\text{g.L}^{-1}$  dans le solvant considéré PBS 0,15 M. Dans le cas de l'Alginate et des dérivés greffés, les concentrations préparées étaient de 10, 20 et 30  $\text{g.L}^{-1}$  dans le PBS 0,15 M. Le logiciel d'analyse utilisé est Trios v4.1.1. Les fluides analysés étaient de type newtonien ou non newtonien en fonction du polymère utilisé et des concentrations d'étude.

### 3.3 Fluorescence

Le principe de la fluorescence est rappelé en annexe B-1.

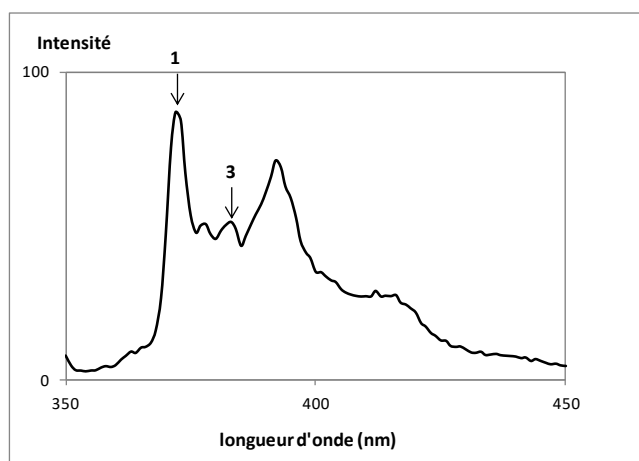
#### Conditions d'analyses :

Les mesures sont réalisées sur des solutions de polymères greffés et non greffés à l'aide d'une sonde fluorescente hydrophobe : le pyrène. Nous réalisons des analyses en fluorescence afin d'obtenir des informations sur la polarité de l'environnement local occupé par le pyrène en solution. Cet environnement ne dépend pas uniquement de la polarité du solvant d'étude mais peut varier en raison du caractère amphiphile des polysaccharides greffés (molécule naturelle hydrophobe, polysaccharide hydrophile).

Le spectrophotomètre utilisé est le Fluoromax-4 (Horiba Jobin Yvon, Japon). Il est équipé d'une lampe au xénon. Pour réaliser une analyse, les solutions de polymères (1 mL) ont été

préparées à des concentrations comprises entre  $[0,05 - 12]$  g.L<sup>-1</sup>. Le solvant utilisé est NaCl 0,15 M. Par la suite, 1 mL de pyrène ( $4 \times 10^{-7}$  M dans NaCl) est ajouté dans chacune des solutions. Les mélanges sont placés sous agitation, dans le noir et pendant 24 h. Le lendemain, chaque solution d'étude est introduite dans une cuve puis placée dans le spectrofluorimètre pour analyse. La longueur d'onde d'excitation du pyrène présent dans les solutions est fixée à 332 nm. L'émission de la lumière fluorescente est enregistrée entre 350 et 450 nm. La température des mesures est contrôlée par un bain thermostaté à 25°C.

Le spectre d'émission du pyrène dans du NaCl présente 5 pics (Figure B-2). Le rapport  $I_1/I_3$  de l'intensité du pic 1 ( $I_1$ , 373 nm) et de l'intensité du pic 3 ( $I_3$ , 382 nm) permet de suivre l'évolution de la polarité de l'environnement occupé par le pyrène en solution en présence du CMP (et de ses dérivés greffés) ou de l'Alginate (et de ses dérivés greffés). La baisse de la valeur du rapport  $I_1/I_3$  illustre le passage du pyrène d'un milieu polaire (ici NaCl) vers un environnement non polaire (zones créées par les greffons hydrophobes, par exemple).



**Figure B-2:** Exemple de spectre d'émission du pyrène ( $4.10^{-7}$  M) en milieu aqueux NaCl 0,15 M

## 4 Tests antioxydants

L'activité antioxydante d'un composé peut être évaluée par piégeage de radicaux au moyen de diverses méthodes<sup>3</sup>. Les radicaux les plus souvent utilisés sont les ions ferriques (méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter)), les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) ainsi que le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle). Nous avons choisi de travailler avec le radical DPPH• car il est couramment utilisé dans le cas des composés de types phénoliques<sup>3,4</sup> et avec le radical cation ABTS.



#### 4.1 Principe de la méthode avec le radical DPPH•

C'est une méthode colorimétrique. Elle permet de suivre le changement de coloration du radical DPPH• une fois qu'il est en présence d'un agent antioxydant.

La structure chimique du radical DPPH• est fournie schéma B-1. Il possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Ce dernier a la possibilité d'être délocalisé et rend ainsi le radical DPPH• stable. C'est la délocalisation qui apporte la coloration au radical.

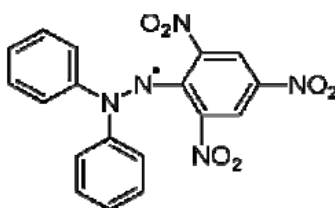


Schéma B-1 : Structure chimique du radical libre DPPH•

Un agent antioxydant va permettre le piégeage des radicaux libres DPPH• en provoquant la baisse de la coloration de la solution de radical. Cette diminution visuelle peut être confirmée par des lectures d'absorbances par spectroscopie UV-Visible, précisément, sur des solutions de DPPH• en absence et en présence d'un agent antioxydant. Il est alors possible de remonter au pourcentage de piégeage des radicaux DPPH•. Ce dernier est déterminé grâce à l'équation B11 :

$$\% \text{ de piégeage de radicaux} = \frac{\text{Absorbance (DPPH)} - \text{Absorbance (antioxydant + DPPH)}}{\text{Absorbance (DPPH)}} * 100 \quad \text{Eq.B11}$$

L'activité antioxydante d'un composé est également souvent exprimée au moyen de la concentration inhibitrice IC<sub>50</sub>. Elle correspond à la concentration minimale pour laquelle le pourcentage de piégeage des radicaux (ici DPPH•) est égale à 50 %. Plus cette concentration est faible et plus le produit testé possède un fort pouvoir antioxydant.

#### Conditions d'analyses :

Les tests antioxydants en présence du DPPH• ont été réalisés sur l'aminogaiacol libre ainsi que sur le CMP et les dérivés CMP-G<sub>x</sub> mais également sur l'Alginate et les dérivés Alg-G<sub>x</sub>. Pour chacun des tests, une solution de DPPH est préparée à 100 µmol.L<sup>-1</sup> dans de l'éthanol. Elle est colorée en violet.

Dans le cas de l'aminogaiacol, pour réaliser un test, nous avons effectué un mélange dans des proportions (50:50 V/V) de solution de NH<sub>2</sub>GA (1 mL) (Tableau B-1) et de solution DPPH• (100 µmol.L<sup>-1</sup> dans de l'éthanol, 1mL). Cette dilution ramène donc les concentrations de départ en réactifs à des concentrations plus faibles (divisées par 2). Les mélanges sont ensuite placés sous agitation dans le noir pendant 5 min.

Dans le cas du CMP et des dérivés greffés CMP-G<sub>x</sub>, nous avons réalisé un protocole similaire, cependant pour éviter la précipitation des polysaccharides en présence d'éthanol, nous avons préparé des mélanges dans des proportions (75:25 V/V) respectivement de solution de produit à tester (1,5 mL) et de solution de DPPH• (200 µmol.L<sup>-1</sup> dans de l'éthanol, 0,5 mL). Les mélanges sont ensuite placés sous agitation dans le noir pendant 5 min. Des essais ont également été effectués à 10, 20 et 30 min.

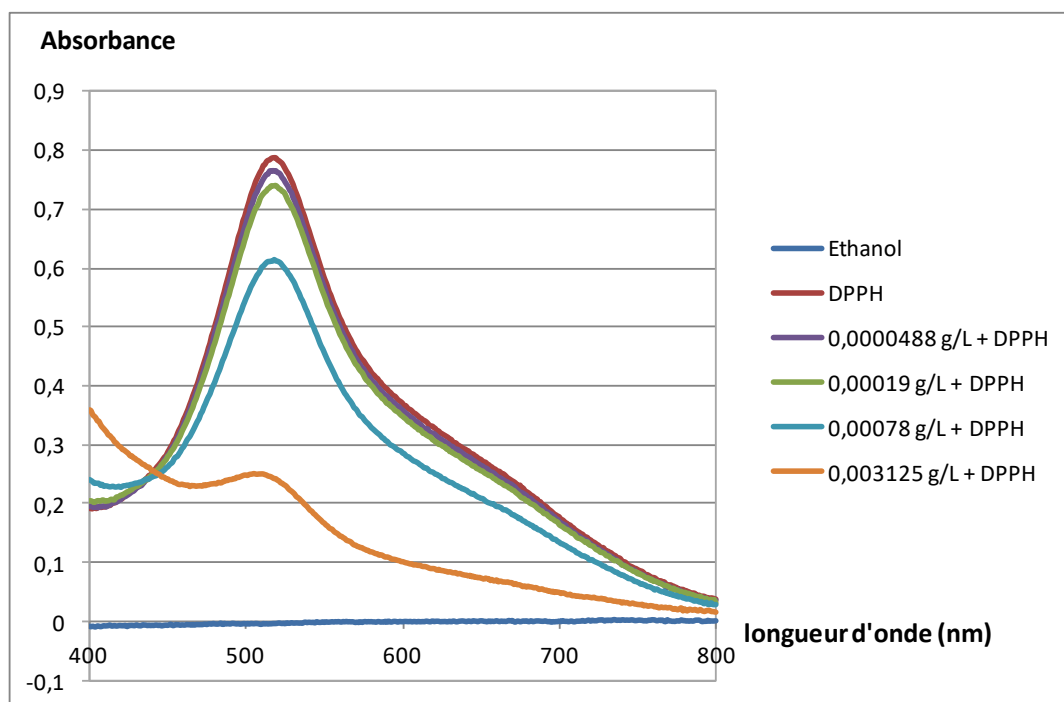
Pour l'Alginate et les dérivés greffés Alg-G<sub>x</sub>, des mélanges en proportions (90:10 V/V) respectivement de la solution de produit à tester (1,8 mL) et de la solution de DPPH• (500 µmol.L<sup>-1</sup> dans de l'éthanol, 0,2 mL).

On atteint, quel que soit l'essai réalisé, une concentration finale en DPPH• de 50 µM. Toutes les concentrations en produits testés sont résumées dans le tableau B-1.

Les analyses UV sont réalisées par balayage sur le domaine [400-800] nm. Des exemples de spectres obtenus dans le cas des tests réalisés avec l'aminogaiacol (à différentes concentrations) sont présentés sur la Figure B-3.

**Tableau B-1 : Conditions de préparation de tous les produits testés pour les essais antioxydants.**

Produits testés	Solvant	[produit] <sub>initial</sub> (g/L)	[produit] <sub>mélange</sub> (g/L)	[DPPH] <sub>mélange</sub>
NH <sub>2</sub> GA	Ethanol	[0,0976 – 1,562] 10 <sup>-3</sup>	[0,0488 – 3,125] 10 <sup>-3</sup>	50 µM
CMP	NaCl 0,15 M	[3,33 – 10]	[2,5 – 7,5]	
CMP-G <sub>x</sub>				
Alginate	NaCl 0,15 M	[1,11 – 3,33]	[1 - 3]	
Alg-G <sub>x</sub>				



**Figure B-3** : Courbes de l'aminogaiacol (différentes concentrations en  $\text{g.L}^{-1}$ ) en présence du radical  $\text{DPPH}\cdot$  obtenues en UV-visible dans le solvant éthanol.

Remarque : Les produits greffés (contenant de l'aminogaiacol) présentent une coloration brune plus ou moins foncée. Cette dernière varie avec le degré de substitution en aminogaiacol DS(Ga) mais également avec la concentration en échantillon d'analyse.

Afin de s'affranchir de l'effet de la coloration lors de la lecture des absorbances, pour tout dérivé greffé, une solution servant de témoin de coloration est préparée en parallèle, dans les mêmes conditions de solvant et de concentration en dérivé greffé, mais cette fois-ci en absence du radical  $\text{DPPH}\cdot$ .

Nous avons donc tenu compte de l'absorbance du témoin de coloration dans le calcul du pourcentage de piégeage des radicaux  $\text{DPPH}\cdot$ . L'équation B12 devient alors :

$$\% \text{ de piégeage de radicaux} = \frac{\text{Absorbance (DPPH)} - \text{Absorbance (antioxydant)}}{\text{Absorbance (DPPH)}} * 100 \quad \text{Eq.B12}$$

avec :

Absorbance (antioxydant) = Absorbance (antioxydant +  $\text{DPPH}\cdot$ ) – Absorbance (témoin coloration).

Remarques :

Dans le cas de l'aminogaiacol, les absorbances sont relevées à 517 nm (maximum d'absorption du radical  $\text{DPPH}\cdot$  dans l'éthanol).

Dans le cas des polymères greffés et précurseurs, les absorbances ont été lues à 543 nm (maximum d'absorption du radical DPPH• dans un mélange PBS/Ethanol).

## 4.2 Principe de la méthode avec le radical cation ABTS

Des tests antioxydants ont également été réalisés en utilisant le radical cation ABTS<sup>+•</sup>. Comme à l'exemple du DPPH•, c'est une méthode colorimétrique qui va permettre de suivre la décoloration d'une solution d'ABTS en présence d'un agent antioxydant. Nous travaillons cette fois-ci à une longueur d'onde plus importante (734 nm). La structure chimique du radical cation ABTS<sup>+•</sup> est présentée sur le schéma B-2.

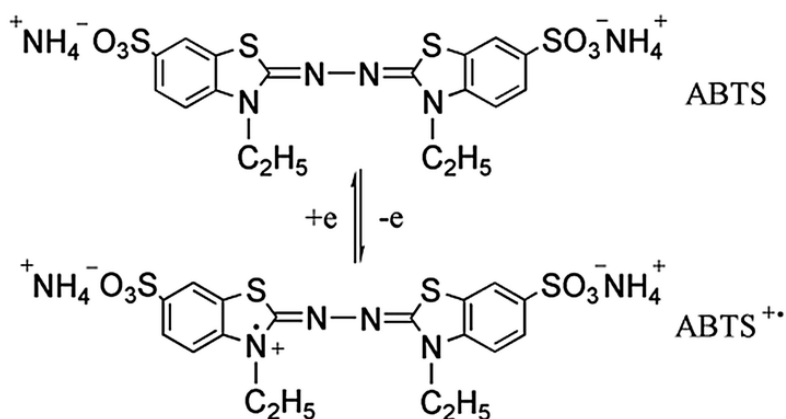


Schéma B-2: Structure chimique du radical cation ABTS

### Conditions d'analyses :

Au préalable, le radical cation ABTS<sup>+•</sup> est obtenu après mise en contact de l'ABTS avec un oxydant : le persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Pour ce faire, 384 mg d'ABTS ont été dissous dans 100 mL de persulfate de potassium (2,45 mM dans du NaCl 0,15 M). La solution est laissée sous agitation dans le noir pendant 12 à 16 h et à température ambiante. La solution obtenue est colorée en vert foncé. Par la suite, cette dernière a été diluée dans du NaCl 0,15 M afin d'obtenir une solution présentant une absorbance à 734 nm voisine de 1, soit précisément 0,98 ± 0,01 à 734 nm.

Le pouvoir antioxydant de l'aminogaiacol a été testé face au radical cation ABTS<sup>+•</sup>. Pour ce faire, des solutions mères de NH<sub>2</sub>GA ont été préparées dans de l'éthanol et sur un domaine de concentrations compris entre [0,625 – 30] x 10<sup>-3</sup> g.L<sup>-1</sup>. Par la suite, nous avons effectué un mélange dans des proportions (10:90 V/V) de solution mère de NH<sub>2</sub>GA (0,2 mL) et de

solution ABTS<sup>•+</sup> (1,8 mL). Cette dilution ramène donc les concentrations de départ en aminogaiacol à des concentrations finales comprises entre  $[0,0625 - 3,0] \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$  et quasi-similaires à celles testées en présence du DPPH<sup>•</sup>. Les mélanges sont ensuite placés sous agitation dans le noir pendant 5 min.

Les analyses UV sont réalisées par balayage sur le domaine [400-800] nm. Les absorbances sont relevées à 734 nm (maximum d'absorption du radical ABTS<sup>•+</sup> dans le mélange NaCl/Ethanol (90/10)). Les pourcentages de piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> ont été calculés au moyen de l'équation B.13

$$\% \text{ de piégeage de radicaux} = \frac{\text{Absorbance (ABTS)} - \text{Absorbance (antioxydant)}}{\text{Absorbance (ABTS)}} * 100 \quad \text{Eq.B13}$$

## 5 Tests antibactériens

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'une molécule se fait par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et/ou de la concentration minimale bactéricide (CMB) du composé d'étude. Ces dernières sont propres à une molécule donnée et peuvent légèrement varier en fonction de plusieurs paramètres (ex : la souche bactérienne utilisée, l'ensemencement CFU (colonies de bactéries formant unité)) fixés.

### 5.1 Définitions CMI et CMB

La CMI est définie comme la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 24 h d'incubation à 37°C. C'est la concentration immédiatement supérieure à celle où le trouble (dû à la présence de bactéries) disparaît.

La méthode de dilution est utilisée pour accéder à cette concentration.

La CMB est définie comme la plus petite concentration d'antibiotique ne laissant subsister 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 24 h d'incubation à 37°C. Elle correspond à une activité antibactérienne égale à 99,99 %.

La méthode de dilution suivie de la méthode de comptage sont dans ce cas utilisées.

## 5.2 Détermination des activités antibactériennes (Cas de notre étude)

Les tests ont été menés selon deux méthodes (i) la méthode de dilution avec lecture de la densité optique (DO) des solutionsensemencées, appelée méthode des DO suivie de (ii) la méthode d'étalement sur gélose pour le dénombrement des colonies, appelée méthode de comptage.

La molécule d'aminogaiacol non greffée, les polysaccharides précurseurs et greffés ont été étudiés. Toutes les solutions des dérivés greffés étaient colorées en raison de la coloration propre de l'aminogaiacol. Ces colorations étaient gênantes et augmentaient avec la concentration en produit. La viscosité des solutions était également prononcée aux concentrations les plus élevées. Tous ces paramètres perturbent et rendent la détermination visuelle des CMI difficile. Nous avons donc choisi de nous intéresser uniquement à la détermination des CMB. Pour se faire, nous avons déterminé les activités antibactériennes (exprimées en (%)) de chacun des produits analysés.

Les différentes étapes nécessaires pour déterminer les activités antibactériennes (%) d'un composé donné sont détaillées ci-dessous :

### Préculture :

Pour tout test, nous réalisons au préalable une préculture. Cette étape permet l'obtention d'une quantité suffisante de bactéries pour les essais à réaliser. Pour ce faire, nous préparons une solution avec la souche de bactérie d'intérêt (*S.aureus*) dans un milieu de culture favorable à sa croissance (le BHI).

Au préalable la souche bactérienne *S.aureus* était conservée et maintenue dans un mélange de milieu nutritif BHI et de glycérol à 50% et stockée à -20°C. La veille des manipulations, une aliquote est prélevée etensemencée dans 15 mL de BHI, le tout est maintenu à 37°C pendant 18 h sous agitation.

### Méthode de dilution :

Pour la méthode des DO, le protocole suivi au cours des tests consiste à mettre en présence un inoculum bactérien dans des solutions de milieu de culture approprié et en présence de l'antibiotique (molécule naturelle ou dérivé greffé) à des concentrations variables pendant 24 h à 37°C.

- *Préparation des gammes de dilutions du composé à tester*

1. Une solution mère de produit à tester est préparée dans du tampon PBS 0,15 M (cas des dérivés greffés) ou dans de l'éthanol (cas de la molécule d'aminogaïacol). Ensuite, une gamme de dilution (dilution par 2) est réalisée dans le milieu BHI.
2. Une gamme similaire servant de référence a été préparée dans les mêmes proportions en solvant mais cette fois-ci dépourvue de la molécule active. Elle servira pour le calcul des activités antibactériennes et nous permet également de voir s'il y a un éventuel effet du solvant (PBS ou éthanol) sur la croissance bactérienne.
3. Dans le cas des produits greffés (présence aminogaïacol), en raison de la coloration prononcée des solutions avec la concentration en produit, nous avons réalisé une gamme de témoin de coloration pour la lecture des DO. Elle a été préparée de la même manière que la gamme du produit à tester. Cependant elle ne sera pas ensemencée par la suite.

D'autres pots témoins ensemencés / non ensemencés sont réalisés :

- milieu de culture seul (BHI) : vérification d'une éventuelle contamination du milieu au cours des tests, lecture de DO.
- milieu de culture seul (BHI) + bactéries : vérification de la bonne croissance des bactéries, lecture de DO.

Les conditions de préparation (concentrations testées) des gammes de dilutions de l'aminogaïacol, du CMP et des dérivés CMP-G<sub>x</sub> ainsi que de l'alginate et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> sont détaillées en annexe B-6. Le schéma B-3 illustre la préparation des gammes de dilutions dans le cas de dérivés CMP-G<sub>x</sub>.

- *Culture*

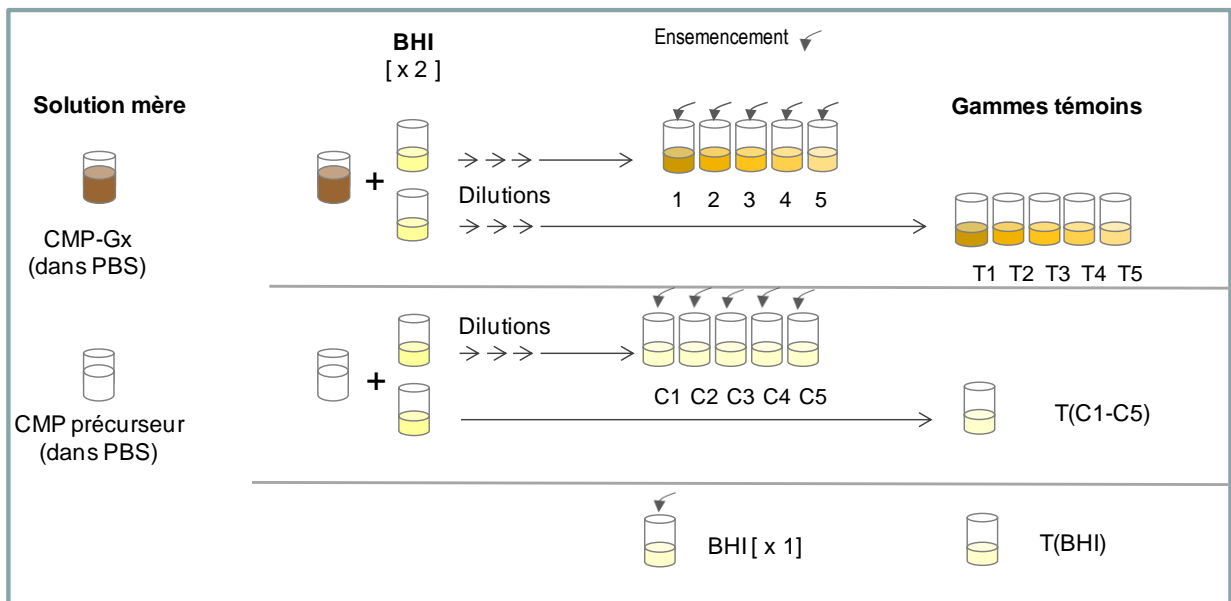
Chacune des solutions (en présence d'antibactérien) et des solutions de références (sans antibactérien) est par la suite ensemencée (ajout inoculum bactérien). Nous avons introduit 100 µL d'inoculum bactérien pour un volume final de 2 mL de solution à tester afin d'atteindre un ensemencement fixé à 10<sup>6</sup> UFC/mL (unité formant colonie/mL). Des détails sont apportés en annexe B-6.

Les solutions ensemencées et témoins ont été par la suite incubées pendant 24 h et à 37°C.

## - Lecture des DO

Le lendemain, les lectures des DO ont été réalisées à 595 nm. Dans le cas de la gamme des produits greffés, la première mesure de DO est faite sur la gamme témoin de coloration. Pour chacune des concentrations en produit greffé témoin, la valeur sera amenée à la valeur zéro. Puis, la DO de la concentration similaire en dérivé greffé (pot ensemencé) sera ensuite mesurée. Il est ainsi possible de neutraliser l'effet propre de la coloration des solutions sur la valeur des DO.

D'une manière générale, les lectures des DO nous ont parfois aidés à sélectionner les concentrations en produit apparaissant comme actives vis à vis des bactéries. En effet, le pot témoin BHI ensemencé (sans produit antibactérien) montre un trouble caractéristique visuel en sortie d'incubation et une valeur de DO voisine de 2. Pour tous les pots de la gamme du produit testé présentant des valeurs de DO inférieures à 2 c'est à dire au voisinage de 1 voire moins, nous avons procédé ensuite au dénombrement sur gélose. Les résultats obtenus par DO sont qualitatifs.



**Schéma B-3 :** Exemple d'illustration du protocole de préparation des gammes de dilution pour les dérivés greffés CMP-G<sub>x</sub>. Gamme produit CMP-G<sub>x</sub>, Gamme témoin coloration (T1 à T5), Gamme de référence (CMP avec les concentrations C1 à C5).



**Méthode de comptage :**

La méthode de comptage consiste à effectuer de nouvelles dilutions à partir des solutions sélectionnées (par lecture de DO), suivies d'étalements (dépôt de gouttes dans notre cas) sur gélose BHI agar. La préparation des boîtes de gélose est illustrée en annexe B-6.

Pour ce faire, des dilutions successives (8 en général) de facteur 10 (ce qui correspond alors à 8.log) ont été réalisées à partir de chaque solution sélectionnée. Nous avons procédé de la même manière pour les solutions de référence correspondantes. Pour chacune des nouvelles dilutions obtenues, un dépôt d'une goutte de 20 µL est effectué sur gélose BHI Agar (réalisé en duplicat). Toutes les boîtes de gélose ensemencées sont par la suite placées sous incubation à 37°C pendant 24 h.

Le lendemain, les bactéries qui se sont développées sur les boîtes de géloses sont comptées (dans le cas des références ainsi que pour les produits d'étude). Pour un nombre de colonies compris entre 30 et 300, le comptage devient significatif. Aux dilutions d'intérêts et à partir du nombre de colonies comptées (pour les 20 µL de dépôt), il est possible de remonter à la quantité d'UFC /mL présente dans le pot initial avant dilution à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\frac{\text{ufc}}{\text{ml}} = \text{ufc (comptées)} * \frac{1}{f} * \frac{1}{V_{\text{déposé (en mL)}}} \quad \text{Eq.B14}$$

Avec f : facteur de dilution. Exemple  $f = 10^{-4}$  si les colonies ont pu être dénombrées à la dilution 4.

$$V_{\text{déposé}} = 20\mu\text{L} = 20 \cdot 10^{-3} \text{ mL}$$

Nous pouvons ainsi accéder à des activités antibactériennes (en %) et voir à des CMB.

Les activités antibactériennes (pourcentages d'inhibition) sont calculées en utilisant comme référence le solvant correspondant ou la solution du polysaccharide précurseur, à partir de l'équation B15.

$$\text{activité antibactérienne (\%)} = \frac{\text{UFC/mL(référence)} - \text{UFC/mL (produit)}}{\text{UFC/mL (référence)}} * 100 \quad \text{Eq.B15}$$

## 6 Cytocompatibilité

La cytotoxicité de l'aminogaiacol, des polysaccharides greffés et non greffés a été évaluée sur des cellules de souris fibroblastes (L929 - ATCC® CCL-1), au moyen de deux méthodes : le test Live/Dead et le test à l'Alamar Blue®.

### Culture des cellules fibroblastes

Au préalable, les cellules sont cultivées dans un milieu de culture  $\alpha$ -MEM complétement avec 10% de serum foetal de bovin (FBS, Invitrogen), 100 mg.ml<sup>-1</sup> de streptomycine (Sigma), 100 mM de penicillin (Sigma), 2 mM de L-glutamine (Sigma), appelé milieu de culture complet. Elles sont cultivées en routine dans des flacons de cultures de type T75 (75 cm<sup>2</sup>) disposés dans un incubateur à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité. Au cours de leur culture, les cellules ont régulièrement été examinées en utilisant un microscope inversé (Motic) à contraste de phase. Arrivées à environ 80 % de sous-confluence, les cellules sont détachées des flacons grâce à une solution enzymatique de Trypsine/EDTA (éthylène diamine tétraacétique) (0.25% - 1 mM) pendant 2-3 minutes à température ambiante puisensemencées à une densité de 30 000 cellules.cm<sup>-2</sup> sur des supports de verre (lamelle de microscopie de Ø 16 mm) préalablement stérilisés et déposés dans des plaques de culture 12 puits.

### Préparations des solutions des produits à tester

Les solutions de polysaccharides CMP et dérivés ainsi que de l'Alginate et dérivés sont préparées dans du milieu de culture  $\alpha$ -MEM (non supplémenté) à une concentration de 7,5 g.L<sup>-1</sup> dans le cas du CMP et dérivés CMP-G<sub>x</sub> et de 3 g.L<sup>-1</sup> concernant l'Alginate et les dérivés Alg-G<sub>x</sub>.

Une solution d'aminogaiacol a été en premier lieu préparée à 200 mM dans de l'éthanol. Par la suite, des dilutions ont été effectuées dans le milieu de culture pour atteindre une concentration finale en NH<sub>2</sub>GA égale à 1 mM et permettant de réduire la concentration finale d'éthanol à 0,5 % (v/v), concentration non toxique pour les cellules.

Pour tous les tests, nous avons préparé en parallèle des solutions témoins :

- Milieu de culture complet (Contrôle négatif) : vérification de la viabilité et de la bonne croissance des cellules;
- DMSO 10 % (Contrôle positif): milieu toxique pour les cellules;

- Ethanol 0,5% : contrôle « solvant » dans le cas des tests avec NH<sub>2</sub>GA.

## 6.1 Live/Dead

La viabilité des cellules a été évaluée grâce au kit Live/Dead (Molecular Probes) contenant 2 marqueurs fluorescents : la calcéine-AM et l'hétérodimère éthidium.

Dans ce test, les cellules vivantes sont colorées par la calcéine-AM et apparaissent en vert en microscopie à fluorescence. Ce marqueur a la capacité de pouvoir traverser la membrane cellulaire et pénétrer dans la cellule. Dans le cas unique où cette dernière est vivante, il y aura transformation enzymatique de la molécule calcéine non fluorescente en calcéine fluorescente (apparaissant en vert). Pour les cellules mortes, l'hétérodimère éthidium est utilisé et colore les cellules en rouge après passage au travers des membranes endommagées.

Les cellules ont donc étéensemencées sur les lamelles de verre à une densité de 30 000 cellules.cm<sup>-2</sup> pendant 24 h puis, les différents produits sont mis en contact pendant les 24 h suivantes. Les cellules sont alors colorées par le kit Live/Dead pendant 15 min à l'obscurité, selon les recommandations du fabricant, puis rapidement observées sous un microscope à épifluorescence (Scope.A1 Zeiss). Des photos sont prises à l'aide d'une caméra CCD (motic) montée sur le microscope.

## 6.2 Alamar Blue

L'activité métabolique des cellules L929 est étudiée après 48 h de contact avec les produits d'étude en utilisant le test à l'Alamar Blue<sup>®</sup> (AB) (AbD Serotec). Ce réactif (résuzarine) est utilisé comme indicateur des réactions d'oxydation et de réduction cellulaires. Plus particulièrement, la métabolisation du réactif est directement proportionnelle à l'activité proliférative des cellules. Un milieu de culture contenant 10 % d'AB, préalablement préchauffé à 37°C, est alors ajouté aux cellules pendant 2 h 30. Par la suite, des mesures d'absorbance ont été réalisées à 570 et 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Spectronic Unicam – UV 300). Tous les tests ont été réalisés en triplicat.

- (1) Dulong, V.; Hadrich, A.; Picton, L.; Le Cerf, D. Enzymatic Cross-Linking of Carboxymethylpullulan Grafted with Ferulic Acid. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 78–87.
- (2) Colinet, I.; Dulong, V.; Hamaide, T.; Le Cerf, D.; Picton, L. New Amphiphilic Modified Polysaccharides with Original Solution Behaviour in Salt Media. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *75* (3), 454–462.
- (3) Wojdyło, A.; Oszmiański, J.; Czemerys, R. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in 32 Selected Herbs. *Food Chem.* **2007**, *105* (3), 940–949.
- (4) Poudel, P. R.; Tamura, H.; Kataoka, I.; Mochioka, R. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Skins and Seeds of Five Wild Grapes and Two Hybrids Native to Japan. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21* (8), 622–625.



## Chapitre C : Carboxyméthylpullulane greffé aminogaiacol : synthèse, caractérisations et propriétés

<b>1</b>	<b><u>Le choix des réactifs</u></b> .....	<b>99</b>
1.1	<u>Le composé naturel</u> .....	99
1.2	<u>Le polysaccharide</u> .....	100
<b>2</b>	<b><u>Greffage de l'aminogaiacol sur le CMP</u></b> .....	<b>101</b>
2.1	<u>Greffage de l'aminogaiacol en milieu organique (DMSO)</u> .....	102
2.1.1	<u>Réaction de greffage</u> .....	102
2.1.2	<u>Conditions de réaction</u> .....	102
2.1.3	<u>Caractérisations du greffage</u> .....	105
2.1.4	<u>Conclusion sur la caractérisation du greffage</u> .....	109
2.1.5	<u>Tests de solubilité de l'aminogaiacol</u> .....	109
2.2	<u>Greffage de l'aminogaiacol en milieu aqueux</u> .....	110
2.2.1	<u>Réaction de greffage</u> .....	110
2.2.2	<u>Conditions de réactions</u> .....	111
2.2.3	<u>Caractérisation du greffage</u> .....	112
2.2.4	<u>Conclusion sur la caractérisation du greffage</u> .....	120
2.3	<u>Conclusion générale sur les synthèses des CMP greffés aminogaiacol</u> .....	120
<b>3</b>	<b><u>Etudes physico-chimiques</u></b> .....	<b>122</b>
3.1	<u>Milieu dilué et semi-dilué</u> .....	122
3.1.1	<u>Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco</u> .....	122
3.1.2	<u>Etude viscosimétrique</u> .....	127
3.1.3	<u>Fluorescence</u> .....	132
3.2	<u>Mesures rhéologiques : Etude en écoulement</u> .....	134
3.3	<u>Conclusion sur les propriétés physico-chimiques</u> .....	138
<b>4</b>	<b><u>Propriétés antioxydantes</u></b> .....	<b>139</b>
4.1	<u>Aminogaiacol vs radical DPPH</u> .....	139
4.2	<u>CMP et dérivés CMP-G<sub>x</sub> vs radical DPPH</u> .....	141
4.2.1	<u>CMP vs radical DPPH</u> .....	141
4.2.2	<u>CMP-G<sub>x</sub> vs radical DPPH</u> .....	142

<b><u>5</u></b>	<b><u>Propriétés antibactériennes</u></b> .....	<b>146</b>
5.1	<u>Aminogaiacol vs <i>S.aureus</i></u> .....	147
5.1.1	<u>Dilutions et ensemencements</u> .....	147
5.1.2	<u>Lecture des densités optiques (DO)</u> .....	147
5.1.3	<u>Dénombrement sur boîtes de gélose</u> .....	148
5.2	<u>CMP et dérivés CMP-G<sub>x</sub> vs <i>S.aureus</i></u> .....	152
5.2.1	<u>CMP vs <i>S.aureus</i></u> .....	152
5.2.2	<u>CMP-G<sub>x</sub> vs <i>S.aureus</i></u> .....	153
5.3	<u>Conclusion et discussion sur les propriétés antioxydantes et antibactériennes</u> .....	158
<b><u>6</u></b>	<b><u>Cytocompatibilité</u></b> .....	<b>160</b>
6.1	<u>Test Live/Dead : mise en évidence de la viabilité des cellules</u> .....	160
6.2	<u>Test Alamar Blue® : mise en évidence de l'activité métabolique des cellules</u> .....	162
<b><u>7</u></b>	<b><u>Conclusions générales</u></b> .....	<b>163</b>

Dans ce chapitre, nous présenterons en premier lieu les réactifs utilisés dans le cadre des synthèses chimiques menées. Nous détaillerons par la suite dans une partie de « synthèses » les différentes voies utilisées afin d'optimiser les conditions expérimentales de la réaction de greffage de l'aminogaïacol sur le carboxyméthylpullulane. Les réactions présentées seront accompagnées de résultats sur la caractérisation des produits greffés élaborés. Par la suite, dans une seconde partie, les comportements des dérivés greffés seront étudiés en solution aqueuse, dans des régimes de concentrations différents. Les résultats obtenus suite à l'évaluation des propriétés antioxydantes, antibactériennes ainsi que des tests de cytotoxicité de tous les produits seront finalement décrits et discutés.

## 1 Le choix des réactifs

### 1.1 Le composé naturel

L'aminogaïacol a été choisi comme composé naturel. C'est un dérivé de la molécule végétale : le gaïacol. Comme évoqué dans la partie bibliographique, le gaïacol possède une structure de type phénolique (monophénol) et des activités variées : antiseptique, antioxydant, antifongique et autres. L'aminogaïacol possède le même squelette chimique que le gaïacol mais avec en plus une fonction amine  $-NH_2$  en position méta de la fonction hydroxyle (Schéma C-1). Ce composé se présente sous forme de poudre colorée noire. Il est hydrophobe et peu soluble dans l'eau à pH neutre.

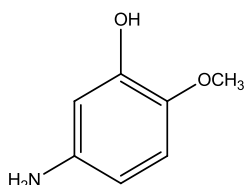
Il a été choisi pour deux raisons principales.

- La première est sa structure phénolique qui lui confère des propriétés antibactériennes et antioxydantes. En effet, ce type de composés possède un large spectre d'activités antibactériennes (gram + et gram -). Dorman *et al.*<sup>1</sup> ont testé l'activité antibactérienne de divers composés (21 au total) dont les terpènes et les composés phénoliques (monophénols) face à plusieurs espèces de bactéries. Ils ont placé en haut du classement, des monophénols tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol. De plus, les auteurs ont également prouvé qu'il existe une corrélation entre la structure chimique de la molécule active et son activité antibactérienne exercée. Précisément, la présence du cycle benzénique mais aussi des fonctions hydroxyle semblent être des caractéristiques importantes et favorables à l'activité. De plus, les polyphénols (simple et complexe) sont également connus comme de remarquables agents antioxydants<sup>2</sup>. La présence du groupement hydroxyle est nécessaire dans le mécanisme d'action contre les radicaux. Comme évoqué dans la partie bibliographique, ces composés



phénoliques agissent comme des donneurs de protons afin de piéger les radicaux libres.

- Une seconde raison du choix de l'aminogaiacol est la présence d'une fonction amine qui ouvre la possibilité à des réactions de greffage chimique notamment sur les fonctions carboxylique de polymères en particulier de polysaccharides.



**Schéma C-1:** Structure chimique de l'aminogaiacol

## 1.2 Le polysaccharide

Le polysaccharide sélectionné est le carboxyméthylpullulane. C'est un dérivé du pullulane.

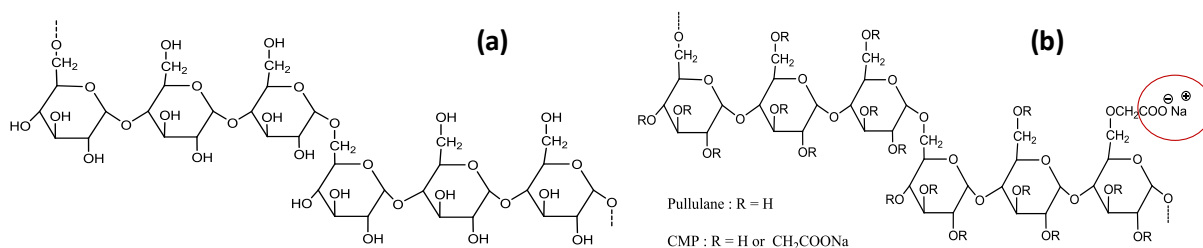
Le pullulane est un polysaccharide produit par une levure : *Aureobasidium pullulans*. C'est précisément un homopolysaccharide neutre et linéaire de formule  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Il est composé d'unités maltotrioses liées par des liens glycosidiques en  $\alpha$ -1,6. Les unités maltotrioses sont constituées de trois unités anhydroglucose liées en  $\alpha$ -1,4. Sa structure est détaillée dans le Schéma C-2. La masse molaire d'un motif anhydroglucose ( $M_0$ ) est  $162 \text{ g.mol}^{-1}$ . Ce polymère est hydrosoluble et insoluble dans des solvants comme le méthanol, l'éthanol ou l'acétone. Il est inodore, de coloration blanche, non toxique, biodégradable<sup>3</sup> et biocompatible<sup>4</sup>. Il trouve ainsi des applications variées en agro-alimentaire ou encore dans le biomédical. En Europe, l'usage du pullulane est accepté dans les enveloppes des compléments alimentaires (E1204) présentés sous forme de gélules et de comprimés, ainsi que dans certaines confiseries.

De par la présence de trois fonctions hydroxyle par motif anhydroglucose, le pullulane (P-OH) peut être modifié chimiquement. La littérature met en avant divers types de réactions conduisant à des dérivés de pullulane avec des propriétés nouvelles ou améliorées. On peut citer par exemple l'éthérisation (P-OR), l'estérification (P-OCOR) (avec R, groupement alkyle), la sulfonation (P-O-SO<sub>3</sub>Na), la copolymérisation et bien d'autres<sup>5</sup>.

Dans notre étude, nous avons choisi de réaliser sur le pullulane, une réaction d'éthérisation précisément de type carboxyméthylation. Cette dernière conduit à l'obtention d'un dérivé carboxyméthylpullulane dans lequel certains atomes d'hydrogène des fonctions hydroxyle (OH) du pullulane ont été remplacés par des groupes -OCH<sub>2</sub>COONa (Schéma C-2). La

présence de groupements carboxylate (COONa) réactifs est nécessaire pour les réactions de greffage envisagées.

Le carboxyméthylpullulane (CMP) a été préparé au sein du laboratoire. Ce dernier possède une longue expérience de cette synthèse<sup>6,7,8</sup> et a souvent utilisé le CMP comme modèle. Le protocole de synthèse (réaction d'un monochloracétate de sodium en milieu NaOH/isopropanol) utilisé est détaillé en annexe C-1. La caractérisation du CMP s'établit par la quantification du greffage des groupes carboxylate (COONa) apportés au pullulane. Elle se fait notamment par détermination du degré de substitution en fonction carboxylate (DS(COONa)) grâce à un dosage conductimétrique (annexe C-1). Ce DS peut théoriquement varier de 0 à 3. Dans la suite du rapport, le CMP synthétisé et utilisé présente un degré de substitution en fonctions carboxylates égal à 0,96 (environ 1). Ce qui signifie qu'il y a présence de quasiment une fonction carboxylate par unité anhydroglucose. La solubilité dans l'eau du carboxyméthylpullulane est également élevée.



**Schéma C-2 :** Structures chimiques du pullulane (a) et du carboxyméthylpullulane (b)

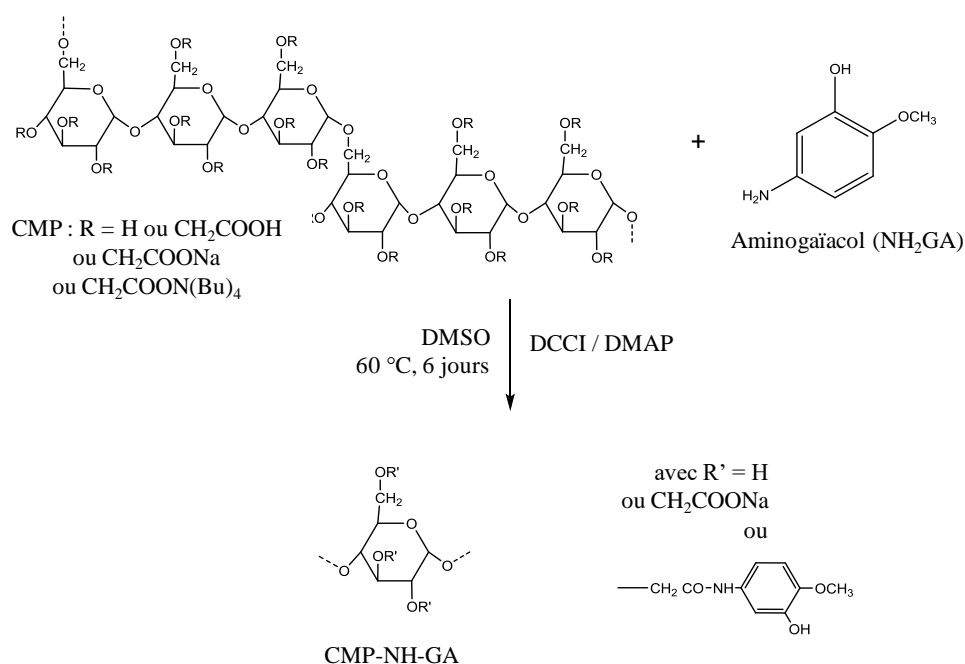
## 2 Greffage de l'aminogaiacol sur le CMP

La molécule d'aminogaiacol est hydrophobe (très peu soluble dans l'eau à pH neutre) et le carboxyméthylpullulane (CMP), synthétisé sous la forme de sel de sodium (CMP-COONa), est hydrosoluble. En tenant compte des critères de solubilité de chacun des réactifs (aminogaiacol et CMP), il était nécessaire de trouver un solvant approprié pour mener à bien la réaction. Nous avons en premier lieu choisi de travailler en milieu organique avec le solvant DMSO, solvant mixte des deux réactifs, en présence d'un activateur classique de type carbodiimide. Cette modification a déjà été utilisée au sein du laboratoire<sup>6,9,10</sup>.

## 2.1 Greffage de l'aminogaïacol en milieu organique (DMSO)

### 2.1.1 Réaction de greffage

La réaction de greffage de l'aminogaïacol sur le CMP a été réalisée dans le DMSO pendant 6 jours et à 60°C. Le greffage de l'aminogaïacol sur le CMP se fait par établissement de liaisons covalentes amide (-CO-NH-) par réaction entre la fonction amine (-NH<sub>2</sub>) de l'aminogaïacol et la fonction carboxylate (-COO<sup>-</sup>) du CMP. Les agents de couplage : le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) seul ou en présence de la diméthylaminopyridine (DMAP) ont également été utilisés pour les synthèses. Ils permettent d'activer les fonctions carboxyliques du CMP. Le mécanisme réactionnel d'activation de ces fonctions en présence de DCCI et de DMAP est précisé en annexe C-2. Ils permettent par ailleurs d'obtenir de meilleurs rendements. La réaction de greffage de l'aminogaïacol sur le carboxyméthylpullulane proposée est représentée ci-dessous (Schéma C-3). Un exemple de protocole de la synthèse est détaillé dans la partie Matériels et méthodes (synthèses chimiques).



**Schéma C-3** : Réaction de greffage de l'aminogaïacol sur le CMP en milieu DMSO, à 60°C et pendant 6 jours

### 2.1.2 Conditions de réaction

Nous avons réalisé plusieurs essais de greffage (4 au total) en variant les conditions de réaction comme décrit ci-dessous :

1- Le polysaccharide CMP a été utilisé sous différentes formes notamment : le sel de sodium (CMP-COONa), le sel de tétrabutylammonium (CMP-COON(Bu)<sub>4</sub>) ou encore sous forme acide CMP-COOH. Ces différentes formes permettent de jouer sur la solubilité du polysaccharide et/ou sur l'accessibilité aux fonctions carboxylates utiles pour la réaction. Le CMP est généralement utilisé sous la forme CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> ou CMP-COOH pour réaliser des réactions de greffage en milieu DMSO<sup>6,9,10</sup> car ces deux réactifs sont solubles dans ce solvant organique. Cependant le groupement tétrabutylammonium est encombrant et peut rendre l'accès au site réactionnel (-COO-) difficile contrairement au contre ion H<sup>+</sup>. Nous avons également utilisé le CMP-COONa qui est moins soluble dans le DMSO. Notamment, ce produit gonfle dans le DMSO ce qui suppose une réaction plus difficile qu'en milieu homogène. Cependant, sous la forme de sel de sodium, le site réactionnel est dégagé.

Remarque : Le CMP synthétisé à partir du pullulane est obtenu sous la forme (CMP-COONa). Le passage de ce dernier sous la forme acide (CMP-COOH) ou sous la forme de sel de tétrabutylammonium (CMP-N(Bu)<sub>4</sub>) nécessite la réalisation de protocoles opératoires détaillés en annexe C-3.

2- Ne connaissant pas la faisabilité et l'efficacité de cette réaction, l'aminogaïacol a été introduit en excès (par rapport au CMP) et ce pour tous les essais. Cela sous-entend que nous avons envisagé une réaction de tous les groupements carboxylates (-COO-) présents sur le squelette carboné du CMP avec les groupements amine de l'aminogaïacol. Pour rappel, le degré de substitution en fonctions carboxylates du CMP (DS(COONa)) est égal à 0,96. Dans les conditions choisies (excès d'aminogaïacol), il serait alors possible d'obtenir expérimentalement un degré de substitution en aminogaïacol noté DS<sub>exp</sub>(Ga) maximal égal à 0,96 (~1). Le DS(Ga) est défini comme le nombre de mole d'aminogaïacol par nombre de mole d'unité anhydroglucose du CMP.

3- L'activateur DCCI a dans un premier temps été utilisé dans les mêmes proportions que le CMP (toutes les fonctions acide carboxylique sont activées) puis dans un second temps en large excès par rapport aux fonctions acide carboxylique, afin d'éviter un risque de perte de son efficacité par désactivation (hydrolyse).

Toutes les conditions de réactions employées sont présentées dans le tableau C-1.

**Tableau C-1 : Conditions de réactions utilisées pour le greffage de l'aminogaiacol sur le CMP en milieu DMSO (pour ces essais, l'aminogaiacol est toujours en excès).**

N° Synthèse	Précurseur <sup>a</sup>	$\frac{n(\text{NH}_2\text{GA})}{n(\text{CMP})}$	$\frac{n(\text{DCCI})}{n(\text{CMP})}$	$\frac{n(\text{DMAP})}{n(\text{CMP})}$	t (jours) T (°C)	Rendement massique (%)
1	CMP-COON(Bu) <sub>4</sub>	2	1	-	6 jours 60°C	67
2	CMP-COON(Bu) <sub>4</sub>	2	2	-	6 jours 60°C	75
3	CMP-COONa	2	2	0,4	6 jours 60°C	34
4	CMP-COOH	2	2	0,4	6 jours 60°C	76

<sup>a</sup> le DS en fonctions acide carboxylique du précurseur est de 0,96

Pour les deux premiers essais, le CMP utilisé est sous sa forme de sel de tétrabutylammonium (CMP-COON(Bu)<sub>4</sub>) mais avec des proportions en DCCI différentes. En effet, pour l'essai 1, l'activateur a été introduit dans les mêmes proportions molaires que le CMP. Pour l'essai 2, l'activateur a été introduit en excès par rapport au CMP (rapport molaire = 2). On remarque cependant que le rendement de la réaction reste pratiquement le même entre les deux synthèses (67% pour l'essai 1 contre 75% pour l'essai 2).

Dans le cas des essais 3 et 4, le CMP utilisé est respectivement sous sa forme de sel de sodium (CMP-COONa) et sous sa forme acide (CMP-COOH). Par ailleurs du DMAP a été ajouté comme activateur pour essayer d'améliorer le rendement de réaction. Pour l'essai 3, le rendement obtenu est faible (34%) mais pour l'essai 4, le rendement a été amélioré (76%). L'insolubilité partielle du CMP-COONa peut expliquer ce faible rendement. L'utilisation du CMP sous sa forme acide, présentant une meilleure solubilité dans le DMSO, permet l'obtention d'un meilleur rendement.

Les produits issus des essais 1, 2 et 3 sont solubles dans l'eau. Le dérivé obtenu suite à la synthèse 4 n'était pas soluble dans l'eau, peut-être trop greffé. Ce produit non hydrosoluble ne pouvant pas être utilisé dans nos applications futures a été abandonné.

Concernant l'aspect, les produits CMP-NH-GA<sub>1</sub> et CMP-NH-GA<sub>2</sub> obtenus suite aux essais 1 et 2, ils se présentent sous la forme de coton (car ils ont été lyophilisés) et colorés en brun foncé de manière homogène. Le produit CMP-NH-GA<sub>3</sub> de la réaction 3 possède une légère

coloration brune non répartie de manière homogène (parties blanches et noires) dans l'ensemble du produit. Celui obtenu pour la synthèse 4 est sous forme de blocs solides durs, cassants et noirs (sans doute trop greffé). Il n'a pas pu être lyophilisé comme les 3 autres en raison de son insolubilité dans l'eau.

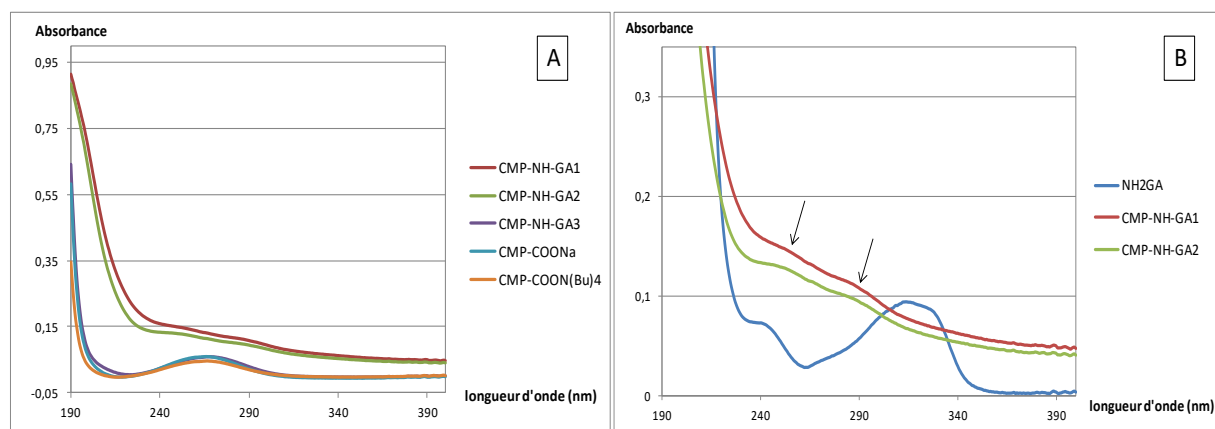
Nous nous intéresserons par la suite uniquement à la caractérisation structurale des dérivés greffés solubles dans l'eau notamment le CMP-NH-GA<sub>1</sub>, CMP-NH-GA<sub>2</sub> et CMP-NH-GA<sub>3</sub>.

### 2.1.3 Caractérisations du greffage

Des techniques qualitatives et quantitatives ont été utilisées afin de caractériser les greffages effectués. Plus précisément, pour détecter et quantifier les greffons hydrophobes NH<sub>2</sub>GA présents dans chacun des dérivés CMP-NH-GA élaborés.

#### 2.1.3.1 Spectroscopie UV-Visible

Le greffon aminogaïacol possède un noyau aromatique et une fonction amine qui sont des groupements chromophores, détectables en UV. Des solutions des précurseurs CMP et de chaque dérivé CMP-NH-GA<sub>1,2,3</sub> ont été préparées dans l'eau à une concentration fixe : 0,1 g.L<sup>-1</sup>. Elles ont été par la suite analysées dans le domaine UV. Les spectres obtenus sont présentés sur la Figure C-1.



**Figure C-1 :** A) Spectres UV des CMP-NH-GA<sub>1,2,3</sub> dans l'eau à C = 0,1 g/L et des CMP précurseurs B) Comparaison des spectres UV des CMP-NH-GA<sub>1</sub> et CMP-NH-GA<sub>2</sub> dans l'eau avec le spectre de l'aminogaïacol dans mélange eau/éthanol (1% v/v) à 10<sup>-5</sup> M (0,0014 g.L<sup>-1</sup>).

Sur la Figure C-1A) sont représentés les spectres des trois produits CMP-NH-GA<sub>1</sub>, CMP-NH-GA<sub>2</sub> et CMP-NH-GA<sub>3</sub>. Les spectres des CMP précurseurs : CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> et CMP-COONa sont additionnés pour comparaison. D'une part, il apparaît de manière claire que l'allure de la courbe du produit CMP-NH-GA<sub>3</sub> (en mauve) se confond parfaitement à celles des précurseurs. Concernant les deux autres produits, une différence d'allure de leur spectre

est observable comparée à celle des précurseurs. De plus, les courbes des dérivés CMP-NH-GA<sub>1</sub> et CMP-NH-GA<sub>2</sub> présentent des allures qui sont similaires entre elles.

Afin de mieux interpréter ces spectres qui se démarquent des autres, sur la Figure C-1B) sont représentées les courbes des dérivés CMP-NH-GA<sub>1</sub>, CMP-NH-GA<sub>2</sub> avec en plus un exemple de courbe de l'aminogaiacol à 10<sup>-5</sup> M préparé dans un mélange eau/éthanol 1%. Il est possible d'attribuer de manière qualitative les deux légers épaulements (marqués par des flèches), présents sur chacune des courbes des CMP-NH-GA<sub>1</sub> et CMP-NH-GA<sub>2</sub> à la présence d'aminogaiacol. Cependant, on remarque que la bande bien définie à 320 nm apparaissant dans le cas de l'aminogaiacol se retrouve à 290 nm (sous forme d'épaulement) sur les courbes des dérivés greffés (effet hypsochrome). Cela pourrait s'expliquer, d'une part par le fait que le solvant de l'aminogaiacol seul (eau/éthanol à 1 %) n'est pas le même que celui des dérivés CMP-NH-GA<sub>1,2</sub> (eau). D'autre part, par le fait que l'environnement de la molécule NH<sub>2</sub>GA est différent une fois greffée. On passe d'une fonction amine à une fonction amide.

En tout état de cause, il apparaît que la quantité d'aminogaiacol présente dans les produits reste très faible et non quantifiable.

### 2.1.3.2 Spectroscopie RMN<sup>1</sup>H

Les produits CMP-NH-GA ainsi que les réactifs de départ ont été caractérisés par RMN<sup>1</sup>H. Les spectres sont donnés dans les Figures C-2.1 et C-2.2.

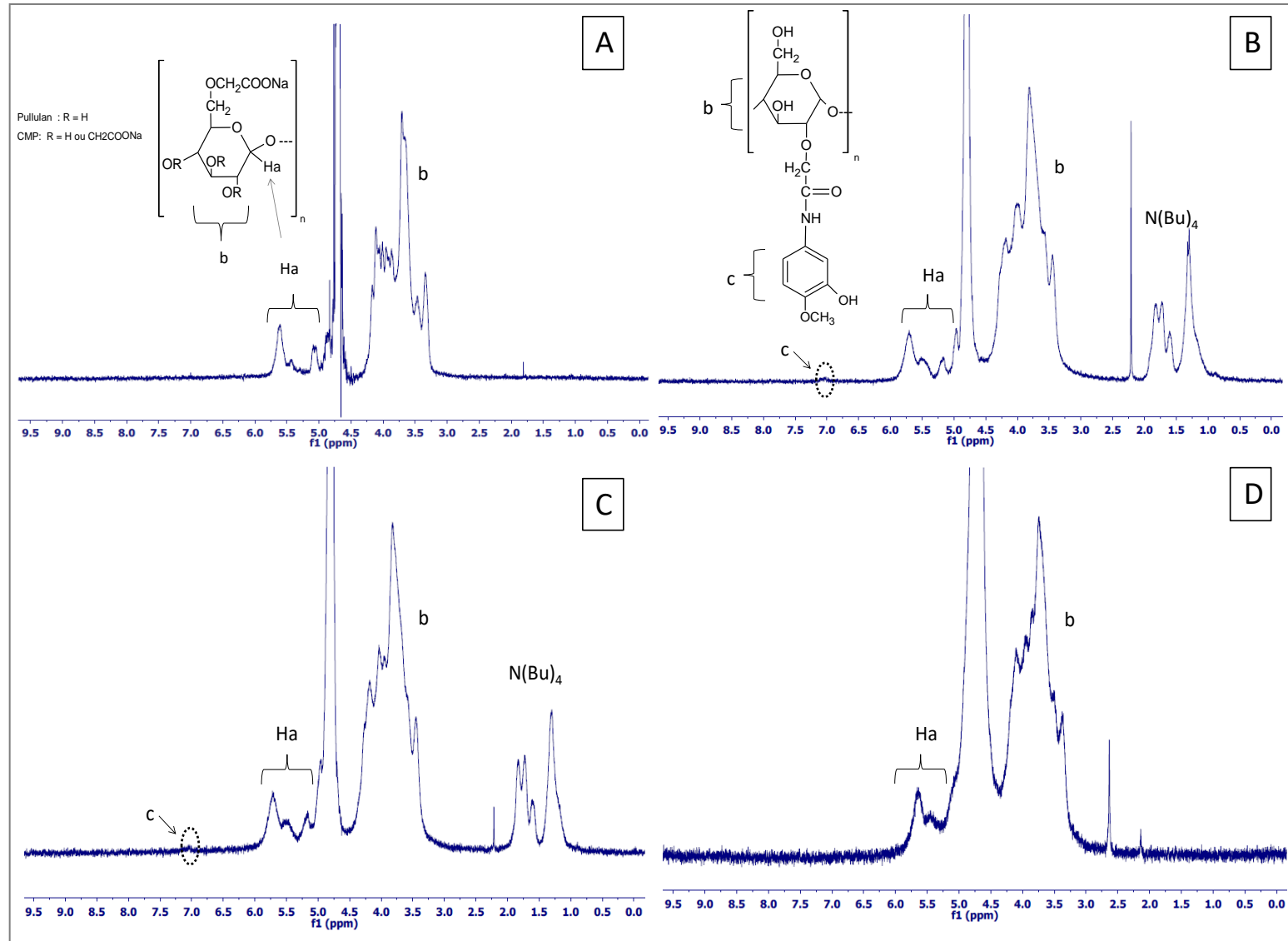
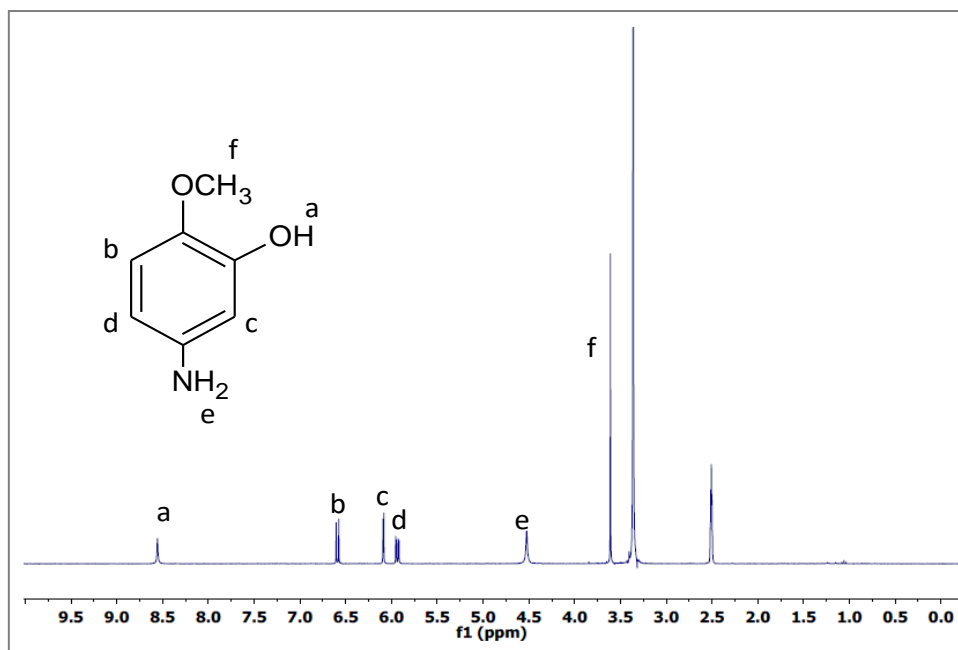


Figure C-2.1 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  du CMP (A) ; des dérivés CMP-NH-GA<sub>1</sub> (B), CMP-NH-GA<sub>2</sub> (C) et CMP-NH-GA<sub>3</sub> (D) dans du  $\text{D}_2\text{O}$  à  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .





**Figure C-2.2 :** Spectre RMN $^1\text{H}$  de l'aminogaiacol dans du DMSO-d6.

- Concernant le spectre du CMP (Figure C-2.1 A), les pics des protons compris dans l'intervalle [3,1 – 4,5] ppm correspondent à tous les protons du squelette carboné du CMP, exceptés les protons anomériques (annotés  $\text{H}_a$ ). Ces derniers sont retrouvés entre [5 – 6] ppm.
- Pour les spectres des produits CMP-NH-GA $_1$  et CMP-NH-GA $_2$  (Figures C-2.1 B et C-2.1 C), les premiers pics compris entre [1-2 ppm] correspondent aux protons du sel de tetrabutylammonium  $\text{N}(\text{Bu})_4$ . Il faut rappeler que pour la réalisation des synthèses n°1 et 2, le réactif de départ est le CMP sous sa forme CMP-COON $(\text{Bu})_4$ . Dans une des étapes de purification (annexe C-3), il a été question d'éliminer ces sels ammoniums par ajout de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) en excès. Au vu des pics ( $\text{N}(\text{Bu})_4$ ) observés sur les spectres des produits CMP-NH-GA $_1$  et CMP-NH-GA $_2$  ci-dessus, l'élimination des sels n'a donc été que partielle. Les pics (annotés b) retrouvés entre [3 – 4,5] ppm sur les spectres des produits CMP-NH-GA $_1$  et CMP-NH-GA $_2$  apparaissent sous la forme d'un massif et correspondent aux pics des protons du pullulane. Entre [5,3 – 6] ppm, sont retrouvés les pics caractéristiques des protons anomériques du pullulane (annotés  $\text{H}_a$ ). Ce sont les 2 protons en  $\alpha$ -1,4 et le proton en  $\alpha$ -1,6 des unités maltotriose du pullulane. Par ailleurs, sur les spectres des produits CMP-NH-GA $_1$  et CMP-NH-GA $_2$ , un petit pic annoté par la lettre c ( $\delta \sim 7$  ppm) est détecté. Cependant l'intensité est très faible (bruit de fond) par rapport aux intensités des autres pics du spectre. Ce pic pourrait être attribué aux pics des protons aromatiques (annotés b, c et d) présents sur le spectre de l'aminogaiacol

(Figure C-2.2). Ce résultat semble indiquer un très faible taux d'incorporation de  $\text{NH}_2\text{GA}$  sur le CMP confirmant ainsi les conclusions qualitatives apportées par la spectroscopie UV.

- Le spectre du dérivé CMP-NH-GA<sub>3</sub> (Figure C-2.1 D), est similaire à celui de son précurseur CMP-COONa (Fig C-2.1 A). Aucun nouveau pic n'a été détecté semblant indiquer l'absence de greffage.

#### 2.1.4 Conclusion sur la caractérisation du greffage

Les caractérisations des produits hydrosolubles CMP-NH-GA<sub>1,2,3</sub> ont été effectuées par spectroscopie UV et RMN<sup>1</sup>H. Concernant les dérivés CMP-NH-GA<sub>1,2</sub>, les résultats obtenus ont permis de détecter la présence d'aminogaïacol (UV et RMN<sup>1</sup>H), cependant les quantités restent très faibles et non quantifiables. Dans le cas du dérivé CMP-NH-GA<sub>3</sub>, les résultats laissent penser que la réaction de greffage n'a pas fonctionné.

Afin d'améliorer la synthèse de greffage, nous avons décidé de changer de solvant. Nous avons eu le choix entre l'utilisation d'un mélange de solvant (aqueux/organique) au vu de la différence de solubilité des réactifs CMP-COONa et aminogaïacol ou d'un milieu aqueux acidifié. Dans ce dernier cas, quelques études menées notamment au sein du laboratoire<sup>8,11</sup> proposent la réaction de couplage entre une amine et une fonction acide carboxylique présente sur un polysaccharide hydrosoluble en utilisant un agent activateur de type carbodiimide et hydrosoluble. Notamment le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI) ou un mélange d'activateurs EDCI/NHS (N-hydroxysuccinimide). Ce type de réaction est en général effectué dans des conditions de pH acide (aux alentours de 4,5).

Nous avons donc décidé au préalable de tester la solubilité de l'aminogaïacol en fonction du pH avant de faire un choix quant au solvant à utiliser pour la réaction de greffage (milieu aqueux acide ou mélange de solvants). Les résultats sur les tests de solubilité de l'aminogaïacol sont présentés par la suite.

#### 2.1.5 Tests de solubilité de l'aminogaïacol

Des tests de solubilité de l'aminogaïacol ( $\text{NH}_2\text{GA}$ ) ont été effectués en fonction du pH. Pour ce faire, une solution de  $\text{NH}_2\text{GA}$  à  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (1,168 g ; 8,4 mmol) dans 120 ml d'HCl 0,67 M ou 120 mL de NaOH 0,67 M ont été préparées et laissées sous agitation pendant 24 h. Cette concentration en aminogaïacol n( $\text{NH}_2\text{GA}$ ) correspond à une réaction de greffage pour laquelle

l'aminogaïacol serait introduit en excès (soit  $n(\text{NH}_2\text{GA}) = 2 \times n(\text{CMP})$ ) avec une concentration en CMP de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

Une fois la solution préparée, le pH est mesuré, puis des ajouts d'HCl ou de soude sont effectués afin de varier le pH sur les domaines acide et basique. A chaque nouveau pH (valeur stable), des remarques sur l'aspect visuel des solutions sont apportées. Le tableau C-2 regroupe les remarques visuelles apportées pour chacune des solutions.

**Tableau C-2 : Aspects visuels de la solution d'aminogaïacol à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  à pH variables**

pH	1,4	2	3	3,61	4,5	5,49
Aspect des solutions dans les cuves	Solution brune homogène (léger dépôt)	Solution brune homogène (léger dépôt)	Solution brune homogène (léger dépôt)	Solution brune homogène (léger dépôt)	Solution brune homogène (léger dépôt)	Solution brune hétérogène
pH	7,01	8,06	9,03	10,06	10,95	
Aspect des solutions dans les cuves	Solution brune foncée hétérogène	Solution brune foncée hétérogène	Solution brune foncée homogène	Solution brune foncée homogène	Solution brune foncée homogène	

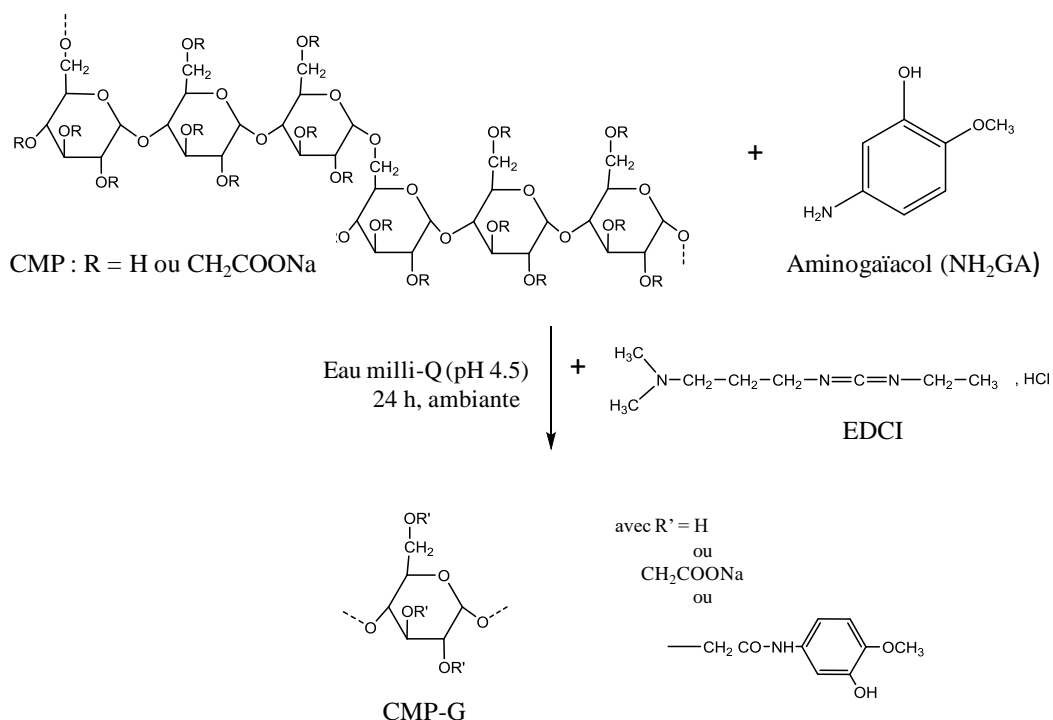
D'une manière générale, l'aminogaïacol possède une meilleure solubilité en milieu acide et basique. En raison de l'ionisation même partielle des fonctions alcool et amine. Pour des milieux faiblement acide ou faiblement basique voir neutre ( $\text{pH} = [5,5 - 8]$ ), la solubilité de l'aminogaïacol comme attendue est très affectée : les solutions sont hétérogènes.

Ce résultat nous permet donc d'envisager une modification en milieu aqueux acide.

## 2.2 Greffage de l'aminogaïacol en milieu aqueux

### 2.2.1 Réaction de greffage

La réaction de greffage de l'aminogaïacol ( $\text{NH}_2\text{GA}$ ) sur le CMP a été réalisée en milieu aqueux à pH acide (4,5), à température ambiante et pendant 24 h. Elle est effectuée en présence de l'agent activateur hydrosoluble des fonctions acide carboxylique du CMP ( $\text{EDCI}^{12}$ ). Une liaison covalente amide est créée entre la fonction amine de l'aminogaïacol et la fonction carboxylate du CMP. La réaction de greffage de l'aminogaïacol sur le carboxyméthylpullulane est représentée ci-dessous (schéma C-4).



**Schéma C-4 :** Réaction de greffage de l'aminogaïacol sur le CMP activé par l'agent EDCI, en milieu aqueux acide, à température ambiante et pendant 24 h.

### 2.2.2 Conditions de réactions

L'aminogaïacol a été greffé sur le CMP selon des proportions variées. Nous avons au préalable réalisé un essai de greffage en introduisant de l'aminogaïacol en excès par rapport au CMP soit  $n(\text{NH}_2\text{GA}) = 2 \times n(\text{CMP})$  comme décrit dans le tableau C-3. Cependant le dérivé obtenu n'était pas soluble dans l'eau. Ce résultat est une première indication qualitative quant aux succès de la réaction de greffage, notre composé insoluble est probablement trop greffé au regard de sa balance hydrophile-lipophile. Nous avons donc visé, par la suite, des degrés de substitution théoriques en NH<sub>2</sub>GA variables de 0,25 ; 0,50 et 1 (notés DS<sub>théo</sub>(Ga)) (Tableau C-3). Ces conditions de réactions devraient permettre d'obtenir des dérivés hydrosolubles. Un exemple de protocole de synthèse est fourni dans la partie Matériels et méthodes (synthèses chimiques). Nous avons également évalué la reproductibilité de la réaction en réalisant plusieurs essais (environ sept pour chaque degré) DS<sub>théo</sub>(Ga) fixé : 0,25 ; 0,50 et 1.

Tous les dérivés CMP-G obtenus sont effectivement solubles dans l'eau (Tableau C-3) et présentent une coloration prononcée selon le DS(Ga) : du brun (DS<sub>théo</sub>(Ga) = 0,25) au brun foncé (DS<sub>théo</sub>(Ga) = 1). A la fin de la réaction (au bout des 24 h), le pH de la solution obtenue est ajusté à 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. La solution est par la suite dialysée (membrane de dialyse Spectra-Por 12-14 kD) en premier lieu pendant 24 h contre de la soude

NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> afin d'éliminer tout l'aminogaiacol libre qui n'aurait pas réagi. Les eaux de dialyse se colorent progressivement en brun. La dialyse est poursuivie pendant environ 1 semaine contre de l'eau milli-Q jusqu'à atteindre une conductivité faible (voisine de celle de l'eau milli-Q). Une fois la purification terminée, les solutions sont congelées puis lyophilisées pendant une semaine. Les dérivés CMP-G récupérés sont par la suite stockés à 4°C.

Quels que soient les DS(Ga) théoriques visés (0,25 ; 0,50 et 1), les rendements massiques en produits synthétisés sont voisins de 60%. Ces rendements massiques sont bons compte-tenu de la méthode de purification utilisée, notamment des étapes de dialyse contre différents solvants comme décrit ci-dessus, ils semblent également indiquer une bonne reproductibilité de la réaction.

**Tableau C-3 : Conditions de synthèse de greffage de l'aminogaiacol sur le CMP**

<b>DS<sub>théo</sub>(Ga)<sup>a</sup></b>	<b>EDCI/CMP<sup>b</sup></b>	<b>Rendements massiques<sup>c</sup> (%)</b>	<b>Solubilité dans l'eau</b>
0,25	0,30	58 ± 3,1	oui
0,50	0,60	66 ± 2,2	oui
1	1,20	62 ± 2,1	oui
« 2 »	1,20	95	non

<sup>a</sup> Ratio molaire NH<sub>2</sub>GA/CMP

<sup>b</sup> Ratio molaire EDCI/CMP

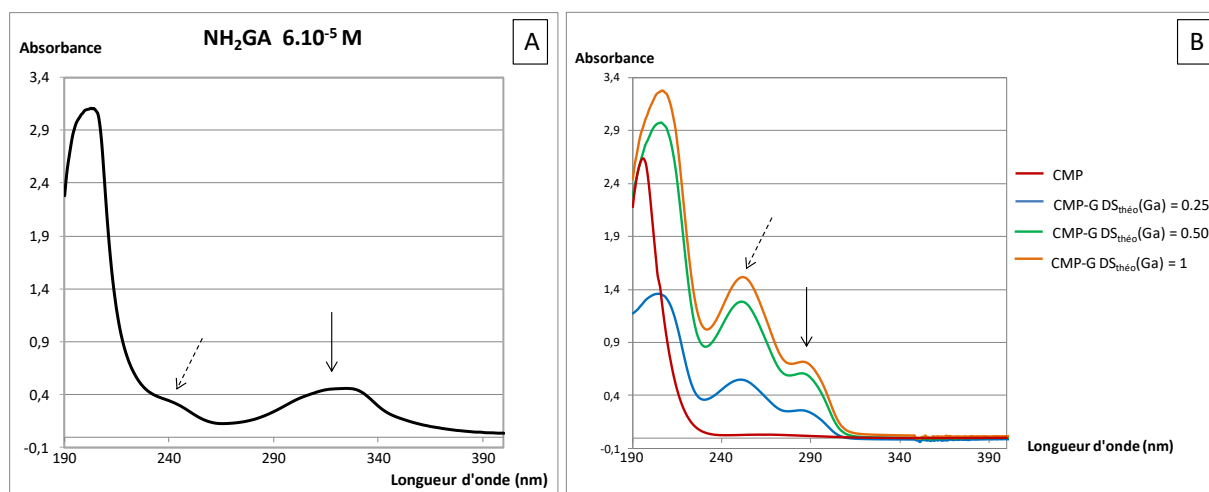
<sup>c</sup> Moyennes déterminés à l'aide de 7 synthèses différentes

### 2.2.3 Caractérisation du greffage

Des techniques qualitatives et quantitatives ont été utilisées pour détecter et quantifier les greffons hydrophobes NH<sub>2</sub>GA présents dans chacun des dérivés CMP-G élaborés.

#### 2.2.3.1 Spectroscopie UV - Visible

Des solutions du précurseur CMP et de chaque dérivé CMP-G ont été préparées dans l'eau à une concentration fixe : 0,1g.L<sup>-1</sup>. Elles ont été par la suite analysées dans le domaine UV. Les spectres obtenus sont présentés sur la Figure C-3.



**Figure C-3 :** Spectres UV : A) Exemple de spectre obtenu pour une solution d'aminogaïacol dans un mélange eau/éthanol (6% v/v) à  $6.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> (0,008 g.L<sup>-1</sup>). B) CMP (rouge) et CMP-G obtenus pour les différents  $DS_{théo}(Ga) = 0,25$  (bleu) ; 0,5 (vert) et 1 (orange) avec  $C = 0,1$ g.L<sup>-1</sup> dans l'eau.

Le spectre de l'aminogaïacol (Figure C-3A) présente trois bandes d'absorption. Une première très intense à 200 nm suivi d'une bande peu intense qui apparaît sous forme d'épaulement à 244 nm. A 322 nm, on observe une troisième bande moyennement intense. Pour comparaison, le spectre UV de la molécule de benzène dans du cyclohexane présente trois bandes d'intensités comparables précisément à 185, 205 et 260 nm<sup>13</sup>. Dans le cas de la molécule d'aminogaïacol, les pics apparaissent à des longueurs d'onde plus importantes (effet bathochrome). Cela peut être expliqué qualitativement en raison de la présence de substituants (groupement –OH, –NH<sub>2</sub> et –OCH<sub>3</sub>) mais également de l'utilisation d'un solvant différent.

Sur la Figure C-3B sont représentés : le spectre du CMP qui présente un maximum d'absorption à 197 nm et une bande d'absorption de très faible intensité entre [230 - 300] nm, et les spectres des dérivés CMP-G qui possèdent trois bandes d'absorption à 206 ; 251 et 287 nm.

En comparant les spectres entre eux, on constate que les pics caractéristiques de l'aminogaïacol sont présents sur les spectres des produits CMP-G. Cependant un décalage du pic de l'aminogaïacol (à 322 nm) est observé vers une plus faible longueur d'onde (290 nm) (effet hypsochrome). Cela s'explique, d'une part par le fait que le solvant de l'aminogaïacol seul (eau/éthanol à 6 % v/v) n'est pas le même que celui des dérivés CMP-G (eau). D'autre part par le fait que l'environnement de la molécule NH<sub>2</sub>GA est différent une fois greffée. De plus, on passe d'une fonction amine à une fonction amide. Ces résultats indiquent néanmoins qualitativement la présence des greffons gaïacol sur le CMP. On constate également qu'à une concentration fixe (0,1 g.L<sup>-1</sup>), la réponse UV caractéristique du gaïacol (vers 250 et 290 nm)

augmente avec le  $DS_{théo}(Ga)$ . Ceci indique que la réaction est satisfaisante d'un point de vue qualitatif.

### 2.2.3.2 Spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge est utilisée pour confirmer le greffage de l'aminogaiacol sur le CMP par détection des liens amide formés (dérivés CMP-G). La Figure C-4 représente le spectre infrarouge (transmittance = f (nombre d'onde)) de l'aminogaiacol. La Figure C-5 regroupe les différents spectres IR obtenus pour le CMP ainsi que pour les dérivés CMP-G avec des  $DS_{théo}(Ga)$  variables.

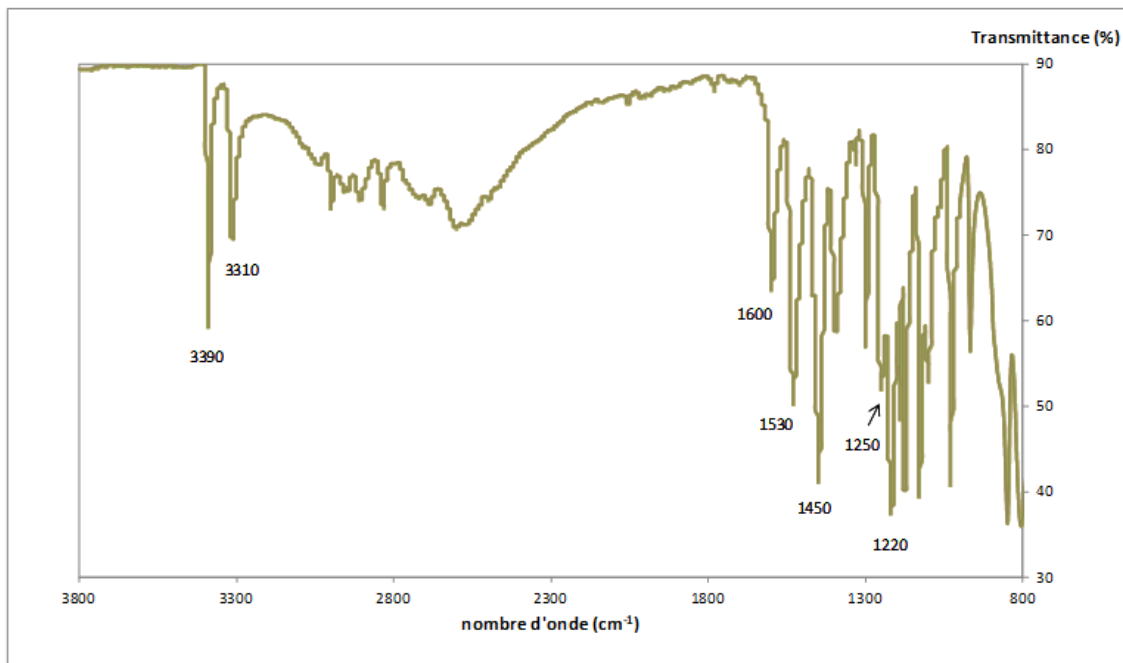
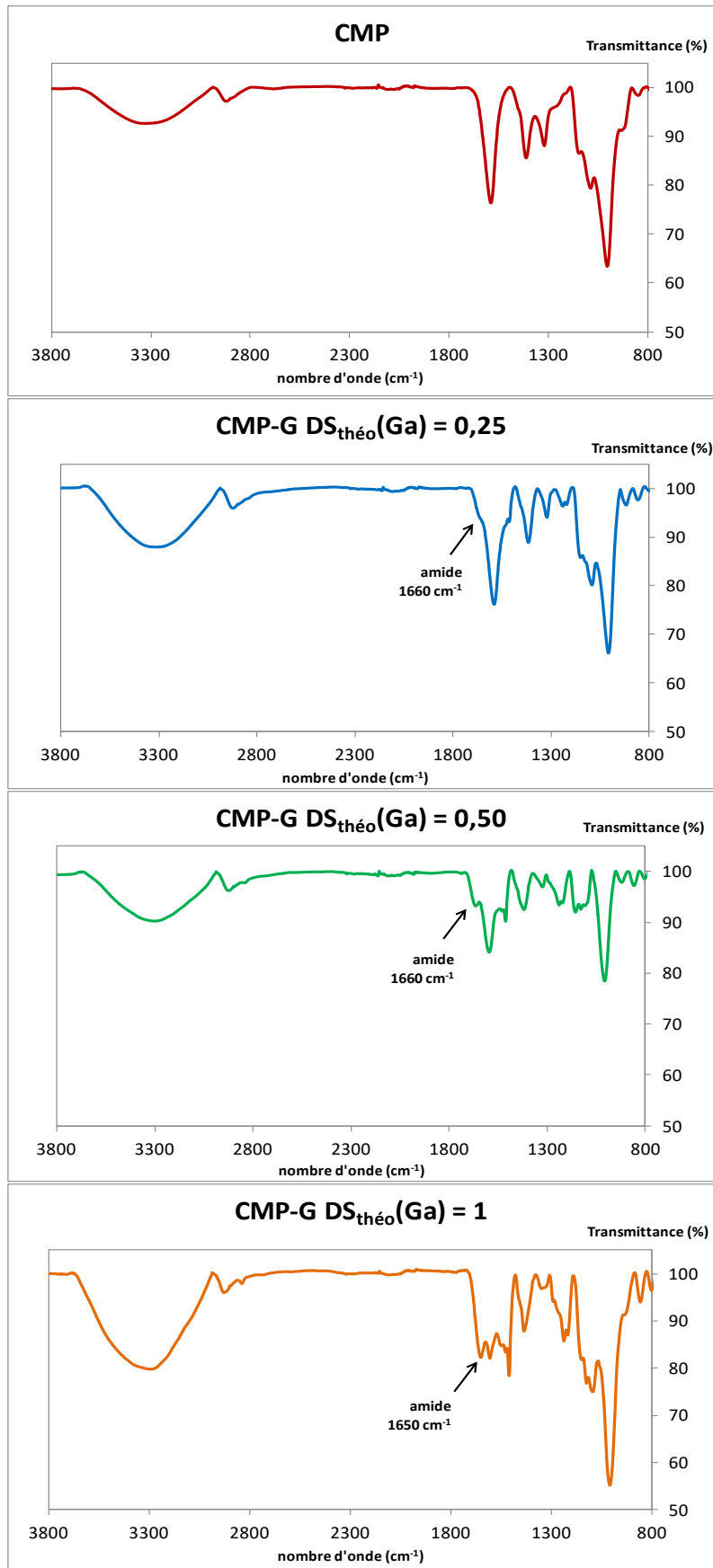


Figure C-4 : Spectre IR de l'aminogaiacol



**Figure C-5** : Spectre IR du CMP (rouge) et des produits CMP-G avec les DS(Ga) théoriques = 0,25 (bleu) ; 0,5 (vert) et 1 (orange).



Le spectre IR de l'aminogaïacol (Figure C-4) possède des pics caractéristiques à  $3390\text{ cm}^{-1}$  (élongation N-H), à  $3310\text{ cm}^{-1}$  (élongation O-H),  $1600\text{ cm}^{-1}$  (amine aromatique ; Ar-NH<sub>2</sub>),  $1390\text{ cm}^{-1}$  (Ar-OH),  $1530$  et  $1450\text{ cm}^{-1}$  (élongation C=C),  $1250\text{ cm}^{-1}$  (élongation C-N de la liaison Ar-NH<sub>2</sub>) et  $1220\text{ cm}^{-1}$  (élongation C-O de la liaison Ar-OH).

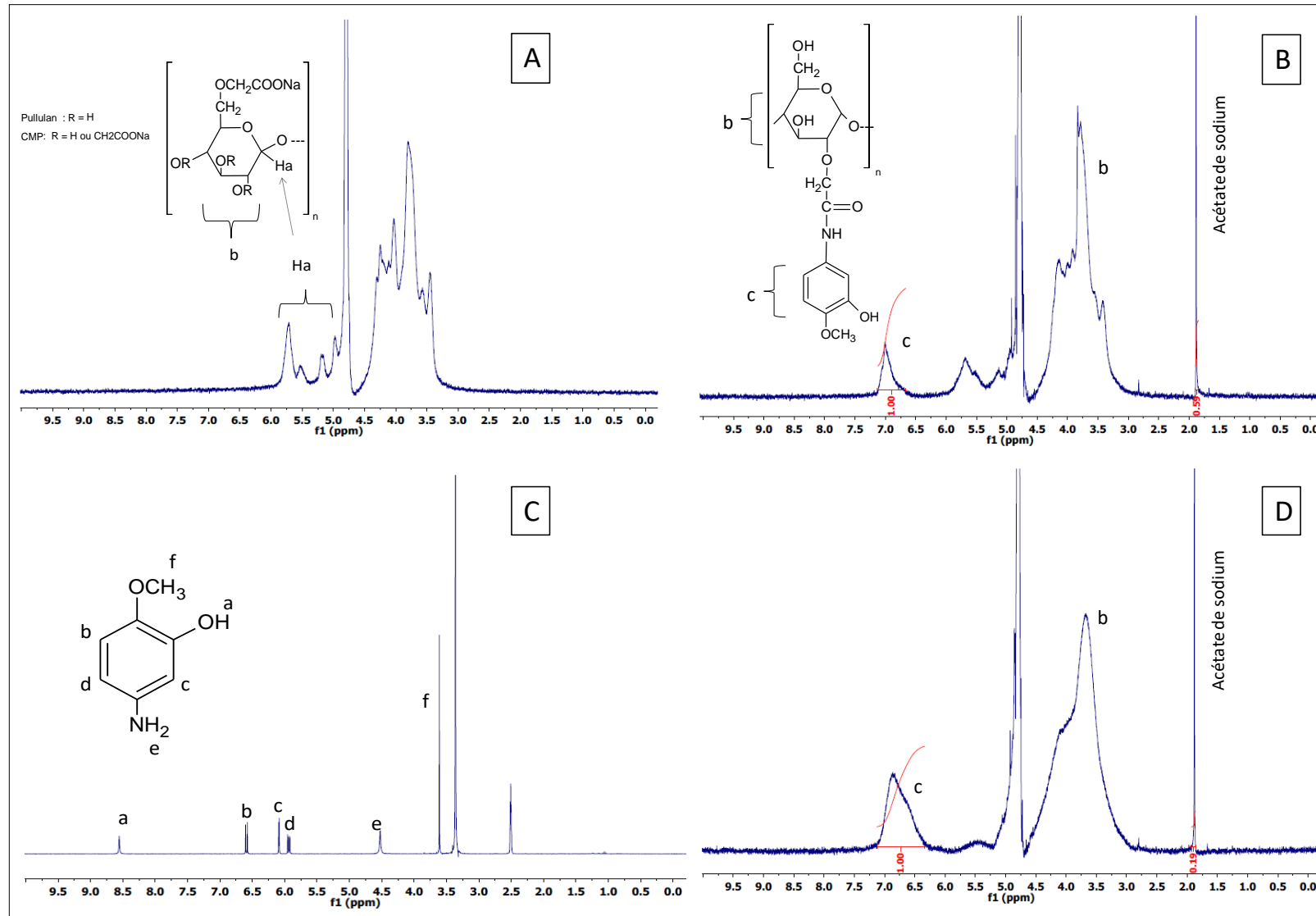
Le spectre IR du CMP (Figure C-5) présente des pics caractéristiques des liaisons O-H entre  $3660$  et  $3000\text{ cm}^{-1}$ , de la liaison C=O du groupement carboxylate à  $1590\text{ cm}^{-1}$  et de la fonction éther C-O-C à  $1010\text{ cm}^{-1}$ .

Dans le cas des spectres des dérivés CMP-G (Figure C-5), il y a apparition de nouveaux pics comparé à ceux du CMP. Plus précisément, les bandes à  $1240\text{ cm}^{-1}$  et  $1510\text{ cm}^{-1}$  correspondent respectivement à l'élongation du C-O (du groupement phénol Ar-OH) et au C=C (du cycle aromatique) de l'aminogaïacol. De plus, un épaulement aux alentours de  $1650\text{ cm}^{-1}$  est visible sur les spectres des CMP-G, correspondant aux vibrations d'élongation de la fonction amide, précisément du groupement carboxyle (C=O). Cette valeur a également été déterminée pour une fonction amide créée suite au greffage d'un polyéther amine sur un CMP<sup>8</sup>.

Confirmant les résultats obtenus en UV, les spectres IR des CMP greffés indiquent bien le succès du greffage. On constate également que plus le degré de substitution  $DS_{\text{théo}}(\text{Ga})$  augmente plus l'intensité de l'épaulement devient visible et marquée.

### 2.2.3.3 Spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H

La spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H a été réalisée en présence d'un étalon interne (acétate de sodium) afin de quantifier le greffage des dérivés CMP-G<sub>x</sub>.



**Figure C-6 :** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du CMP (A) ; des dérivés CMP-G avec les DS(Ga) théoriques égaux à 0,25 (B) et 1 (D) dans du  $\text{D}_2\text{O}$  à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  en présence d'acétate de sodium ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Spectre de l'aminogaiacol (C) dans du  $\text{DMSO-d}_6$ .

- Concernant le spectre du CMP (Figure C-6A), comme déjà mentionné, les pics des protons compris dans l'intervalle [3,1 – 4,5] ppm correspondent à tous les protons du squelette carboné du CMP, exceptés les protons anomériques (annotés **H<sub>a</sub>**). Ces derniers sont retrouvés entre [5 – 6] ppm.
- Le spectre de l'aminogaiacol (Figure C-6C) dans le DMSO-d<sub>6</sub> possède plusieurs pics. Plus précisément, le proton de la fonction hydroxyle (-OH) est retrouvé à 8,6 ppm, les protons présents sur le cycle aromatique (**3 H**) sortent entre [5,9 – 6,7] ppm. A 4,5 ppm apparaissent les deux protons de la fonction amine (-NH<sub>2</sub>) et le singulet à 3,6 ppm est attribué aux trois hydrogène du groupement O-CH<sub>3</sub>.
- Les spectres des dérivés CMP-G (Figures C-6B et C-6D) présentent bien sur des similitudes avec celui du CMP : les pics caractéristiques sont retrouvés entre [3,1 – 4,5] ppm et entre [5 – 6] ppm. Par ailleurs, on constate l'apparition d'un nouveau pic entre [6,2 – 7] ppm. Ce dernier peut être attribué à la présence de protons de type aromatiques (**3 H**). Ceux-ci sont propres aux greffons aminogaiacol et confirment bien la présence de ces molécules au sein des produits formés. Par comparaison avec le spectre de l'aminogaiacol, il faut également noter que les pics correspondant aux protons du noyau aromatique de l'aminogaiacol greffé présentent un décalage au niveau des leurs déplacements chimiques : [6,2 – 7] ppm au lieu de [5,9 – 6,7] ppm. Cela peut être expliqué par l'utilisation de solvants différents : D<sub>2</sub>O dans le cas des dérivés CMP-G et DMSO-d<sub>6</sub> dans le cas de l'aminogaiacol.

Il a également été observé dans la littérature que des dérivés chitosane greffés avec des composés de types phénoliques<sup>14,15</sup> présentent sur leur spectre RMN-<sup>1</sup>H des pics de protons aromatiques sortant dans des zones similaires, entre [6 – 8] ppm.

La spectroscopie RMN a permis de détecter la présence des greffons aminogaiacol mais cette technique est également utilisée pour quantifier le greffage. Pour ce faire, nous avons déterminé les DS(Ga) expérimentaux (noté DS<sub>exp</sub>(Ga)). Nous rappelons que le calcul des DS(Ga) par RMN-<sup>1</sup>H a été explicité dans la partie Matériel et méthode.

Le tableau C-4 regroupe les DS(Ga) expérimentaux moyens obtenus (à l'aide de 7 synthèses) pour chaque DS(Ga) théorique visé ainsi que les pourcentages d'aminogaiacol contenu dans les dérivés (en g/100g de dérivé). Le détail de tous les DS(Ga) expérimentaux obtenus pour chaque synthèse réalisée est fourni dans le tableau C-5.

**Tableau C-4 : DS(Ga) expérimentaux moyens des dérivés CMP-G calculés par RMN**

	<b>DS<sub>théo</sub>(Ga)<sup>a</sup></b>	<b>DS<sub>exp</sub>(Ga)<sup>b</sup></b>	<b>% (g/100 g) aminogaiacol dans le produit CMP-G</b>
CMP-G <sub>0.16</sub>	0,25	0,16 ± 0.02	8,7
CMP-G <sub>0.37</sub>	0,50	0,37 ± 0.03	18,7
CMP-G <sub>0.58</sub>	1	0,58 ± 0.08	27,2

<sup>a</sup> Ratio molaire NH<sub>2</sub>GA/CMP.

<sup>b</sup> Moyennes déterminés à l'aide de 7 synthèses différentes (voit Tableau C-5)

**Tableau C-5 : DS(Ga) expérimentaux déterminés par RMN pour chacun des DS(Ga) théoriques à l'aide de 7 synthèses différentes.**

<b>DS<sub>théo</sub>(Ga)</b>	<b>0,25</b>	<b>0,50</b>	<b>1</b>
<b>DS<sub>exp</sub>(Ga)</b>	0,14	0,37	0,46
	0,16	0,33	0,50
	0,18	0,42	0,55
	0,19	0,33	0,59
	0,17	0,34	0,65
	0,17	0,39	0,66
	0,14	0,36	0,64

On constate une bonne efficacité de la réaction, comprise entre 58 % (DS<sub>théo</sub>(Ga)=1) et 74 % (DS<sub>théo</sub>(Ga)=0,50) (Tableau C-4). De plus, le tableau C-5 montre que pour chaque DS(Ga) théorique visé, les DS(Ga) expérimentaux déterminés sont assez proches, ce qui illustre bien la bonne reproductibilité de la réaction.

Nous avons déterminé un taux de greffage maximal en aminogaiacol (soit 27,2 g/ 100 g de produit greffé CMP-G<sub>0.58</sub>). Ce dernier est plus important que ceux obtenus suite au greffage de l'acide caféique sur le chitosane (7,34 g/ 100g produit greffé) ou encore de l'acide

férulique sur le chitosane (6,67 g/ 100 g greffé)<sup>14</sup>. Les synthèses de greffage des acides phénoliques (acide caféique ou d'acide férulique) sur le chitosane ont été réalisées par voie radicalaire en utilisant l'acide ascorbique et le peroxyde d'hydrogène comme système rédox. Les réactifs ont été introduits dans les proportions massiques suivantes : 0,8 g acide phénolique et 0,25 g chitosane, ce qui est équivalent après calcul à un rapport molaire ( $n(\text{acide phénolique}) / n(\text{chitosane})$ ) d'environ 4, soit un excès en acide phénolique. Les réactions ont été effectuées dans une solution aqueuse d'acide acétique à 2 % sous atmosphère inerte (azote) et pendant 12 h.

En utilisant une méthode de couplage similaire à nos travaux (via un agent carbodiimide), Liu *et al.*<sup>15</sup> ont greffé l'acide protocatéchique sur le chitosane avec un taux de greffage maximal égal à 27,97 g /100 g, quasi-similaire à nos résultats.

#### 2.2.4 Conclusion sur la caractérisation du greffage

Les caractérisations des produits CMP-G par spectroscopie (UV, IR, RMN) apportent des résultats complémentaires et illustrent le succès des greffages réalisés. En effet, ces techniques ont permis (i) de détecter la présence des molécules d'aminogaïacol liée de façon covalente (lien amide détecté par IR) au polysaccharide. Nous rappelons que les étapes de purifications utilisées notamment la dialyse contre de la soude NaOH 0,1 M pendant 24 h ont permis d'éliminer l'aminogaïacol encore libre dans les solutions obtenues après réaction. Les méthodes de caractérisation ont également permis (ii) de quantifier le greffage.

La réaction menée est reproductible et la voie de couplage choisie (activateur de type carbodiimide) s'est avérée efficace en fournissant des taux de greffage expérimentaux en aminogaïacol ( $DS_{\text{exp}}(\text{Ga})$ ) élevés.

### 2.3 Conclusion générale sur les synthèses des CMP greffés aminogaïacol

Le greffage de l'aminogaïacol a été effectué dans des solvants différents en raison de la différence de solubilité des réactifs : aminogaïacol et CMP. Nous avons en premier lieu choisi le DMSO comme milieu réactionnel. Des essais de greffage de l'aminogaïacol en milieu DMSO ont été réalisés en partant de CMP sous forme de différents sels afin de jouer sur la solubilité du polysaccharide et/ou sur l'accessibilité aux fonctions carboxylate lors de la réaction. L'aminogaïacol a été ajouté en excès par rapport au CMP soit avec un nombre de

mole  $n(\text{NH}_2\text{GA})$  qui était 2 fois supérieur à celui du CMP ( $n(\text{CMP})$ ) pour tous les essais réalisés. La réaction s'est déroulée en présence d'agents activateurs (DCCI et DMAP) afin de faciliter le greffage et/ou d'améliorer les rendements. Tous les produits synthétisés étaient solubles dans l'eau à l'exception du dérivé obtenu à partir du CMP sous la forme CMP-COOH (soit le produit CMP-NH-GA<sub>4</sub>). La caractérisation des produits solubles a permis dans certains cas de détecter la présence de greffons aminogaiacol mais en quantité trop faible et non quantifiable. La synthèse de greffage de l'aminogaiacol en milieu DMSO n'a pas conduit à des résultats satisfaisants.

Nous avons donc cherché à améliorer par la suite la synthèse en changeant la nature du solvant de réaction. Après avoir remarqué que l'aminogaiacol était soluble en milieu acide, nous avons décidé d'effectuer le greffage de l'aminogaiacol en milieu acide aqueux. Notamment, des essais ont été réalisés en milieu acide (pH 4,5) aqueux, en partant du CMP sous la forme CMP-COONa, en présence d'agent activateur EDCI et en variant le degré  $\text{DS}_{\text{théo}}(\text{Ga})$  soit égal à « 2 » (excès) ; 1 ; 0,5 et 0,25. Tous les produits synthétisés étaient solubles dans l'eau à l'exception du dérivé obtenu avec un nombre de mole  $n(\text{NH}_2\text{GA})$  en excès soit avec le  $\text{DS}_{\text{théo}}(\text{Ga})$  égal à « 2 ». La caractérisation des produits solubles a permis de détecter et de quantifier les greffons aminogaiacol. La reproductibilité de la synthèse en milieu aqueux a également été évaluée et prouvée.

Le mode de synthèse en milieu aqueux est à privilégier par rapport aux synthèses en milieu organique pour plusieurs raisons : l'efficacité du greffage, la durée de réaction est plus courte, la température plus faible, l'utilisation de solvant et d'activateur non toxiques.

**Remarque :** Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement aux dérivés greffés solubles et synthétisés en milieu aqueux. Tous les produits seront annotés CMP-G<sub>x</sub> avec x correspondant au  $\text{DS}_{\text{exp}}(\text{Ga})$  moyen obtenu par RMN.

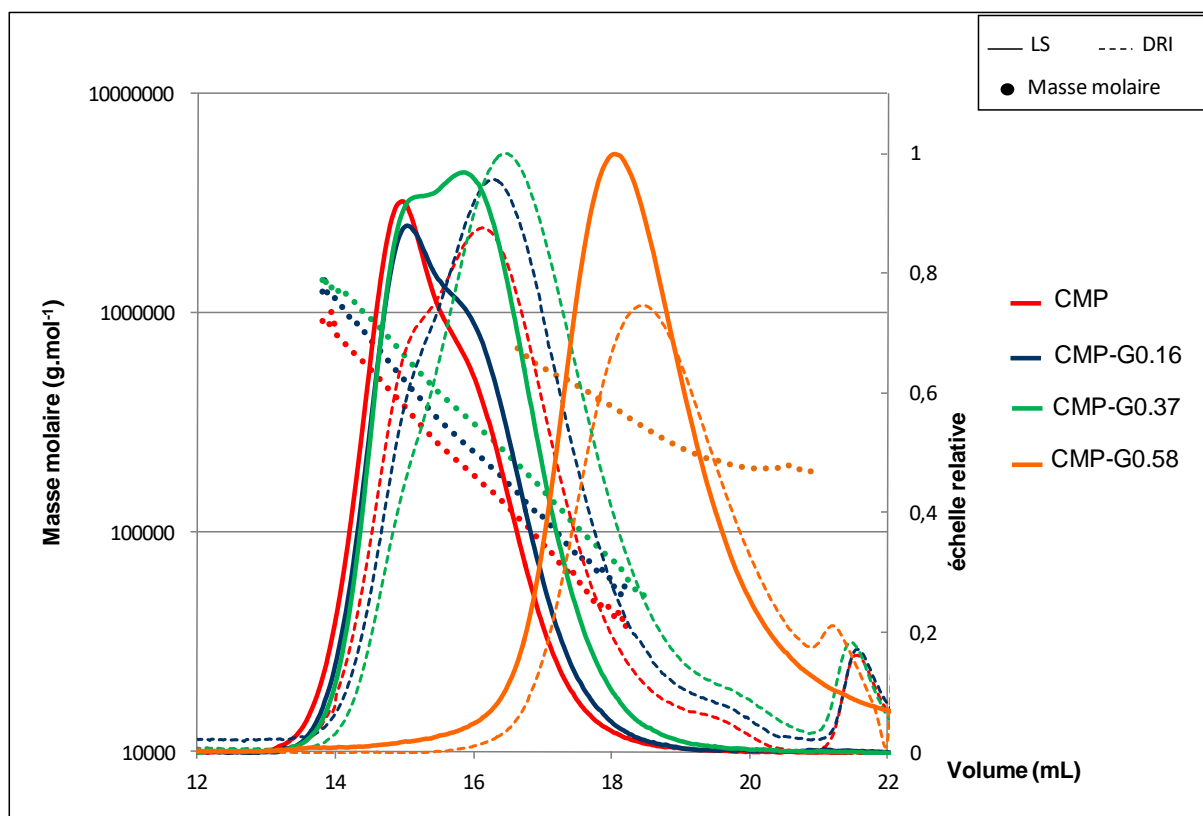
Au vu des applications visées en formulation aqueuse, des analyses physico-chimiques sur le CMP et les produits greffés CMP-G<sub>x</sub> ont été réalisées afin d'étudier leur comportement en milieux dilué, semi-dilué et concentré. Les études menées sont décrites dans la suite du rapport.

### 3 Etudes physico-chimiques

#### 3.1 Milieu dilué et semi-dilué

##### 3.1.1 Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco

Le couplage SEC/MALLS/DRI/Visco a permis de déterminer des grandeurs physico-chimiques intrinsèques et caractéristiques ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $R_h$ ,  $[\eta]$ ) du CMP précurseur et de chaque polymère greffé CMP-G<sub>x</sub> en solution, en régime dilué. La Figure C-7 présente les profils d'élution des dérivés CMP-G<sub>x</sub> et de leur précurseur CMP à 1 g.L<sup>-1</sup> en milieu phosphate salin (PBS) 0,15 M pH 7,4 ainsi que la distribution des masses molaires. Le tableau C-6 regroupe toutes les informations recueillies concernant les grandeurs macromoléculaires des échantillons. Le calcul de la quantité de polymère analysé (aire sous le pic du signal réfractométrique) ramené à la quantité injectée montre que les fractions en produit récupérés sont en général de l'ordre de 90% pour un échantillon donné. Les résultats sont donc représentatifs de la totalité de l'échantillon injecté.



**Figure C-7.** Profils d'élutions des dérivés CMP-G<sub>x</sub> dans du PBS à 0,15 M; CMP DS 0,96 (rouge), CMP-G<sub>0.16</sub> (bleu), CMP-G<sub>0.37</sub> (vert), CMP-G<sub>0.58</sub> (orange). Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes obtenues par le détecteur réfractométrique (DRI) : trait discontinu. Distribution des masses molaires (rond plein).

Les profils d'éluion présentent les signaux obtenus en diffusion de lumière (LS) qui sont proportionnels à la masse molaire et à la concentration des fractions éluées et les courbes obtenues par le réfractomètre différentiel (DRI), uniquement proportionnelles à la concentration des fractions éluées.

L'allure des courbes (DRI et LS) des CMP-G<sub>x</sub> est différente de celle du précurseur CMP. On observe globalement des profils qui se déplacent vers les forts volumes d'éluion lorsque le DS(Ga) augmente. L'effet semble particulièrement sensible pour l'échantillon le plus modifié. En se basant sur le principe de séparation des macromolécules en fonction de leur taille (SEC), cette évolution est signe d'une diminution notable des volumes hydrodynamiques des CMP-G<sub>x</sub>. Nous pouvons l'expliquer de deux manières : (a) par une diminution des masses molaires en nombre et en poids ( $M_n$  et  $M_w$ ) en raison d'une potentielle dégradation du polysaccharide au cours de la réaction de greffage ou (b) par la compaction des pelotes due à l'apparition d'associations hydrophobes principalement intramolécules en régime dilué entre les greffons aminogaïacol. L'observation des distributions des masses molaires sur la Figure C-7 semble orienter vers la 2<sup>ème</sup> hypothèse (b).

Pour une meilleure compréhension du comportement des échantillons en solution, nous allons nous intéresser aux grandeurs macromoléculaires recueillies suite aux analyses (tableau C-6).

**Tableau C-6 : Grandeurs macromoléculaires caractéristiques des polymères CMP et CMP-G<sub>x</sub> déterminés par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco à une concentration en échantillon C = 1,0 g L<sup>-1</sup> et dans un milieu PBS 0,15 M.**

	$M_n$ (g mol <sup>-1</sup> )	$M_w$ (g mol <sup>-1</sup> )	$M_o^{(a)}$ (g mol <sup>-1</sup> )	DP <sub>n</sub> apparent ( $M_n/M_o$ )	$R_h^{(n)}$ (nm)	x pente $R_g$ vs $M^{(b)}$	$[\eta]_n$ (mL g <sup>-1</sup> )	Masse récupérée (%)
CMP	143 000 (± 1,6 %)	229 000 (± 0,4 %)	239	598	12,6 (± 0,5 %)	0,69 (± 0,2%)	100 (± 1,0 %)	96
CMP-G <sub>0,16</sub>	166 000 (± 1,6 %)	262 000 (± 0,6 %)	255	651	12,3 (± 0,5 %)	0,61 (± 0,3%)	77 (± 1,1 %)	90
CMP-G <sub>0,37</sub>	181 000 (± 1,4 %)	294 000 (± 0,6 %)	276	656	10,9 (± 0,6 %)	0,57 (± 0,5%)	52 (± 1,3 %)	92
CMP-G <sub>0,58</sub>	279 000 (± 2,1 %)	307 000 (± 1,7 %)	297	939	8,9 (± 1,9 %)	0,49 (± 4,5 %)	16 (± 5,2 %)	75

<sup>a</sup> :  $M_o$  est la masse molaire de l'unité de répétition déterminée par le calcul :  $162 + 80DS_{COONa} + 99,15 DS(Ga)$ .

<sup>b</sup> : pente de la courbe  $R_g$  vs  $M$  déterminée pour des valeurs de  $R_g$  (supérieures à 10 nm).

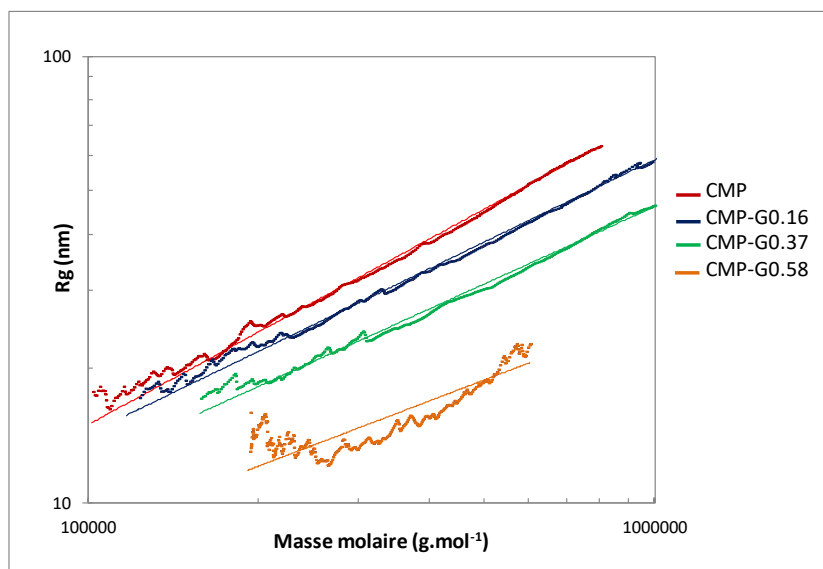


On constate que les masses molaires  $M_n$  et  $M_w$  des dérivés CMP-G<sub>x</sub> augmentent comparées à celles du précurseur CMP, ce qui semble bien exclure la première hypothèse de dégradation. L'augmentation de ces masses molaires n'est pas uniquement la conséquence de l'augmentation naturelle après greffage de la masse  $M_0$  du motif de répétition (monomère) qui devrait alors conduire à des valeurs de  $DP_n$  (degré de polymérisation moyen en nombre) constantes. En effet, on remarque que les valeurs des  $DP_n$  calculées augmentent avec le DS(Ga), il s'agit donc ici de  $DP_n$  apparents. Ce résultat s'explique donc par la présence de structures agrégées et met en évidence un caractère associatif des CMP-G<sub>x</sub> (association entre greffons aminogaiacol). La présence d'agrégats en faible quantité et très compacts est donc la conséquence d'interactions intermoléculaires qui s'établissent probablement en faible nombre par rapport aux associations intramoléculaires logiquement plus favorables en régime dilué. Par ailleurs et confirmant les observations rapportées plus haut quant aux déplacements des pics vers les forts volumes d'élution (i.e. faibles volumes hydrodynamiques), on note que les viscosités intrinsèques ( $[\eta]$ ) et les rayons hydrodynamiques ( $R_h$ ) diminuent considérablement et ce d'autant plus que le  $DS_{exp}(Ga)$  augmente. Ces évolutions témoignent ainsi de l'existence de structures de plus en plus denses et compactes des pelotes CMP-G<sub>x</sub> en solution. Cette conformation est la conséquence d'interactions essentiellement intra voire intermoléculaires (agrégats compacts en faible quantité) entre greffons hydrophobes.

Les dimensions des macromolécules en solution sont en général également illustrées par les valeurs des rayons de giration ( $R_g$ ). Cependant ces dernières ne sont pas fournies dans le tableau C-6 car elles n'ont pas été accessibles par la technique de diffusion de lumière sur l'ensemble du domaine des courbes d'élution. Précisément, aux forts volumes d'élution, la diffusion d'intensité de lumière des particules devient isotrope (pas de dépendance angulaire) en raison des tailles trop petites (inférieures à 10 nm) dues à l'apparition des structures compactes des pelotes CMP-G<sub>x</sub>.

Pour confirmer la conformation compacte, il est cependant possible de donner une représentation  $R_g = f(M)$  en échelle bi-logarithmique dans le cas de chacun des échantillons et pour des valeurs de  $R_g$  supérieures à 10 nm. Les courbes correspondantes sont présentées sur la Figure C-8. Elles varient de manière linéaire traduisant bien une relation en loi d'échelle du type  $R_g \sim M^x$  avec 'x' la pente caractéristique de la conformation adoptée par les polymères en solution. La conformation est plutôt rigide pour des pentes proches de 1, en pelote statistique flexible pour des pentes proches de 0,6-0,7 et en conformation globulaire pour des pentes proches de 0,3. Ici, les valeurs des pentes 'x' (Figure C-8 et Tableau C-6) sont

comprises entre  $[0,5 - 0,7]$ . Cela illustre plutôt une conformation de pelote statistique assez flexible. Cependant, on constate une diminution de 'x' lorsque le  $DS_{exp}(Ga)$  augmente, ce qui semble bien confirmer l'hypothèse de compaction qui a déjà été mise en avant.



**Figure C-8 :** Représentation bilogarithmique  $R_g = f(M)$  pour le CMP (rouge) et les dérivés CMP-G<sub>0.16</sub> (bleu), CMP-G<sub>0.37</sub> (vert) et CMP-G<sub>0.58</sub> (orange) dans le solvant PBS 0,15 M, à 25°C et à  $C = 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

#### Discussion sur la conformation compacte des dérivés CMP-G<sub>x</sub> en solution :

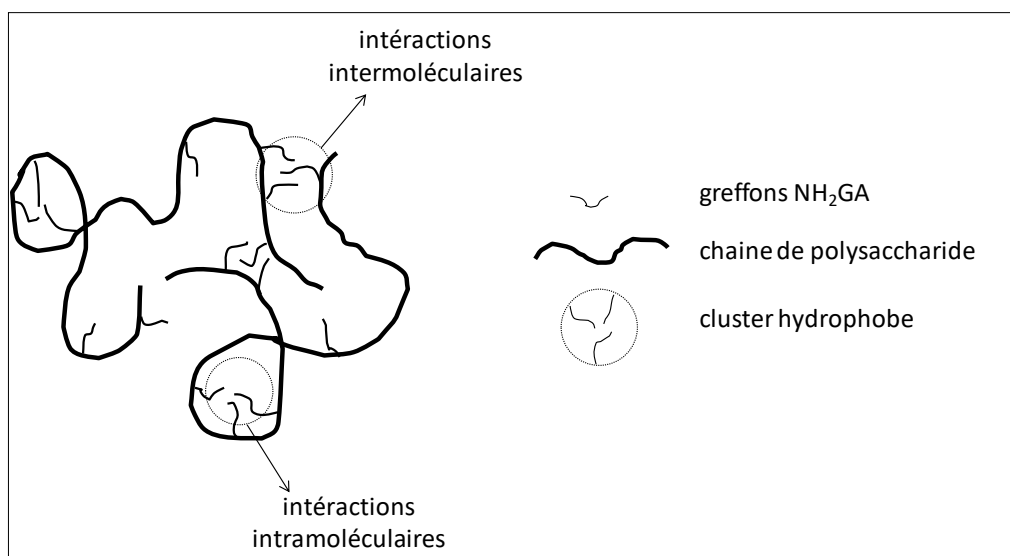
Le comportement des produits CMP-G<sub>x</sub> en solution est différent de celui du CMP précurseur. Cela est favorisé par le caractère amphiphile des dérivés greffés : l'hydrophilie est apportée par le polysaccharide et l'hydrophobie par les molécules aminogaiacol greffées. Thermodynamiquement, ces greffons cherchent à se rapprocher entre eux de manière à limiter le plus possible le contact avec l'eau. Ils vont donc établir des associations intra- et intermoléculaires en solution (comme évoqué plus haut) et créer ainsi des zones ou micro-domaines (clusters) hydrophobes.

Dans le cas des dérivés CMP-G<sub>x</sub>, les interactions entre greffons  $NH_2GA$  hydrophobes entraînent la compaction des pelotes des dérivés CMP-G<sub>x</sub> en solution. En tenant compte du fait que les macromolécules sont en milieu dilué (en théorie 'isolées les unes des autres'), cela sous-entend une prédominance des associations intramoléculaires. Il y a donc des chaînes individuelles de polysaccharides compactes en solution. Cependant, il faut noter que les associations intermoléculaires (même si elles sont potentiellement peu favorables) existent également en milieu dilué<sup>16</sup>. Il y a donc aussi présence de quelques agrégats très compacts eux

aussi en solution, expliquant l'augmentation des masses molaires observée pour les échantillons greffés.

Par ailleurs, on peut souligner le fait que l'établissement des arrangements hydrophobes est aussi renforcé dans les conditions d'analyses car les échantillons sont étudiés en milieu salin. En effet, la présence de sel favorise un écrantage des groupements carboxylate du CMP conduisant à une diminution des répulsions électrostatiques et favorisant ainsi le rapprochement des chaînes de polysaccharides par association hydrophobe.

Une illustration du comportement des dérivés CMP- $G_x$  en solution est fournie schéma C-5.



**Schéma C-5** : Illustration du caractère associatif d'un dérivé CMP- $G_x$  en milieu dilué

Le caractère associatif de polymères greffés en solution aqueuse a déjà été très étudié sur d'autres systèmes avec des polysaccharides et/ou des groupements hydrophobes différents. Comme exemples, on peut citer : (1) des systèmes CMP greffés avec des chaînes linéaires alkyles ( $C_8$ ) et des taux variables de greffons hydrophobes compris entre 7 et 45 %<sup>16</sup> ou encore (2) des polyesters aliphatiques (poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL)) greffés sur de l'alginate avec des taux de greffage compris entre 3,5 et 15 %<sup>17</sup>. Il a été démontré d'une manière générale que plusieurs paramètres entrent en jeu pour permettre l'établissement de ces interactions hydrophobes notamment : la nature du polysaccharide (neutre ou chargé)<sup>10</sup>, la nature des greffons (chaîne alkyle courte ou longue)<sup>16,6</sup> et/ou les proportions en greffons<sup>16,6,18,19</sup> ou encore le solvant d'étude (eau ou milieu salin)<sup>17,20,21,22</sup>.

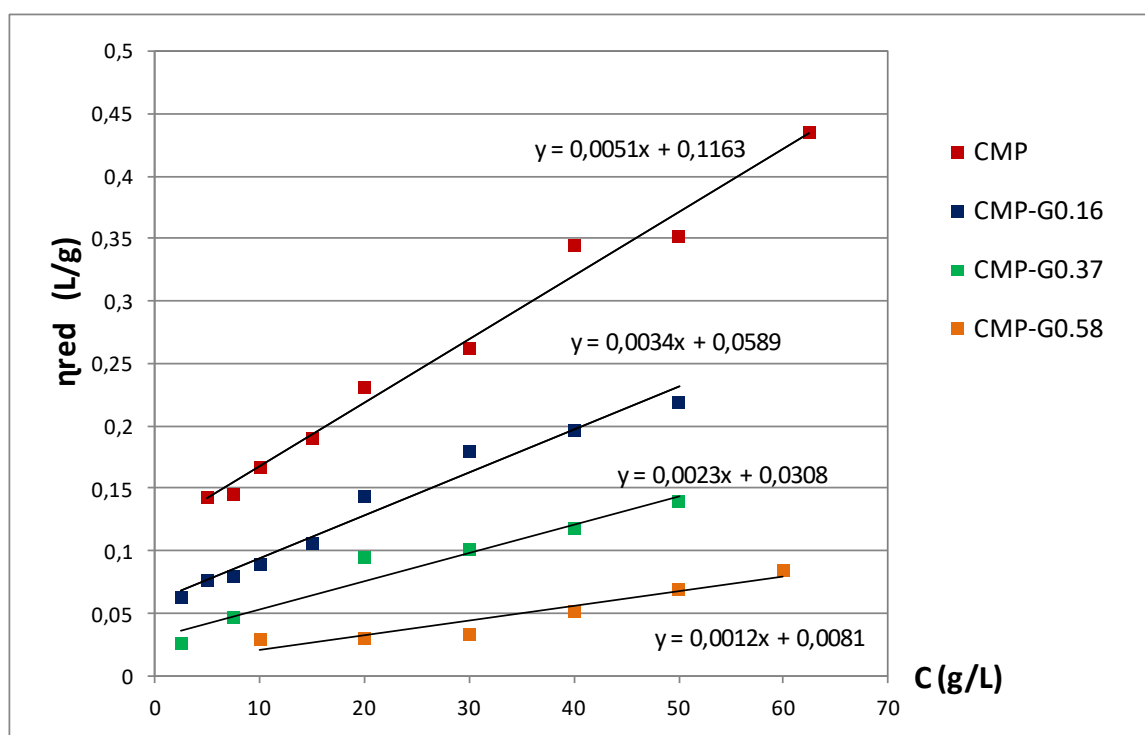
### 3.1.2 Etude viscosimétrique

Les mesures de viscosités des solutions CMP et CMP-G<sub>x</sub> en milieu PBS 0,15 M ont été réalisées à différentes concentrations et à un cisaillement faible et fixé 1 s<sup>-1</sup> à 25°C (LS400 Lamy Rheology, France), après avoir vérifié le caractère newtonien des solutions d'études. Comme détaillé dans la partie matériels et méthodes, ces mesures nous permettent de remonter aux viscosités intrinsèques [η] ainsi qu'aux concentrations de recouvrement C\* et C\*\*, délimitant les régimes dilué, semi-dilué et concentré. Par la suite nous nous sommes intéressés uniquement aux concentrations C\*.

#### 3.1.2.1 Détermination des viscosités intrinsèques [η]

La Figure C-9 illustre les représentations de Huggins  $\eta_{red} = f(C)$  (Eq.1) obtenues pour le CMP et les dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Nous rappelons que la viscosité intrinsèque [η] représente l'ordonnée à l'origine des droites.

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{spe}}{C} = [\eta] + K_H[\eta]^2 C \quad \text{Eq.C1}$$



**Figure C-9.** Représentation de la viscosité réduite  $\eta_{red}$  en fonction de la concentration en polymère pour le CMP précurseur et les dérivés CMP-G<sub>x</sub> dans le solvant PBS 0,15 M à 25°C et à un cisaillement fixé à 1s<sup>-1</sup>.

On remarque que les viscosités des dérivés greffés restent faibles comparées à celles du précurseur CMP sur tout le domaine de concentration d'étude [2,5 - 60 g.L<sup>-1</sup>]. A concentration

fixe, on observe une baisse de la viscosité qui est accentuée par l'augmentation du taux de greffage en aminogaiacol DS(Ga).

D'une manière générale, l'extrapolation des droites à concentration nulle ( $C = 0$ ) conduit à la valeur de la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  du produit d'étude. La pente permet de calculer la constante de Huggins. Les valeurs des viscosités intrinsèques  $[\eta]$  ainsi que les coefficients de Huggins ( $K_H$ ) déterminées à partir des équations de droites sont présentées dans le tableau C-7.

**Tableau C-7 : Valeurs des viscosités intrinsèques  $[\eta]$  et des coefficients de Huggins ( $K_H$ ) du CMP et des dérivés CMP-G<sub>x</sub>.**

	CMP	CMP-G <sub>0.16</sub>	CMP-G <sub>0.37</sub>	CMP-G <sub>0.58</sub>
$[\eta]$ mL/g	116	60	31	8
$K_H$	0,4	1	2,4	18
$[\eta]_n$ mL/g <sup>(a)</sup>	100	77	52	16

<sup>a</sup>: Viscosités intrinsèques déterminées par SEC/MALLS/DRI

Le CMP étudié (DS(COONa) = 0,96) possède une viscosité intrinsèque  $[\eta]$  en milieu salin (PBS 0,15 M) égale à 116 mL.g<sup>-1</sup> et une valeur de  $K_H$  égale à 0,4. Pour comparaison, Simon *et al.*<sup>16</sup> ont déterminé une valeur  $[\eta] = 220$  mL.g<sup>-1</sup> avec  $K_H = 0,2$  dans le cas d'un CMP (DS(COONa) = 0,85) et en milieu salin NaCl de force ionique légèrement plus faible 0,1 M. La valeur de  $K_H$  déterminée (0,4) pour le CMP d'étude est en général observée dans le cas de polymère non associatif<sup>19</sup> et en bonnes conditions de solvation<sup>23</sup>.

En comparaison avec le CMP, on observe une baisse notable des valeurs de viscosités intrinsèques  $[\eta]$  des dérivés CMP-G<sub>x</sub> accentuée lorsque le DS(Ga) devient important. Rappelons que la viscosité intrinsèque reflète le volume hydrodynamique des chaînes isolées de polymères en solution. Cela illustre et confirme bien des tailles de pelotes en solution de plus en plus petites avec le DS(Ga) qui augmente. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par le couplage SEC/MALLS/DRI/Visco. On constate qu'il existe de légères différences au niveau des valeurs des viscosités intrinsèques déterminées par viscosimétrie et celles obtenues en SEC/MALLS/DRI/Visco. Cela peut être expliqué par le fait qu'avec le viscosimètre Low shear (LS400), les valeurs des viscosités ont été déterminées par extrapolation (Loi de Huggins) et en travaillant en batch (coexistence de chaînes compactes isolées et d'agrégats).

De plus, il faut également noter une forte augmentation de la valeur du paramètre de Huggins  $K_H$  avec le DS(Ga). De nombreuses études expliquent ces fortes valeurs de  $K_H$  par la présence de fortes interactions polymère-polymère, ce qui tend bien à confirmer nos conclusions précédentes quant à une tendance à l'agrégation des polymères greffés<sup>24,16,25</sup>.

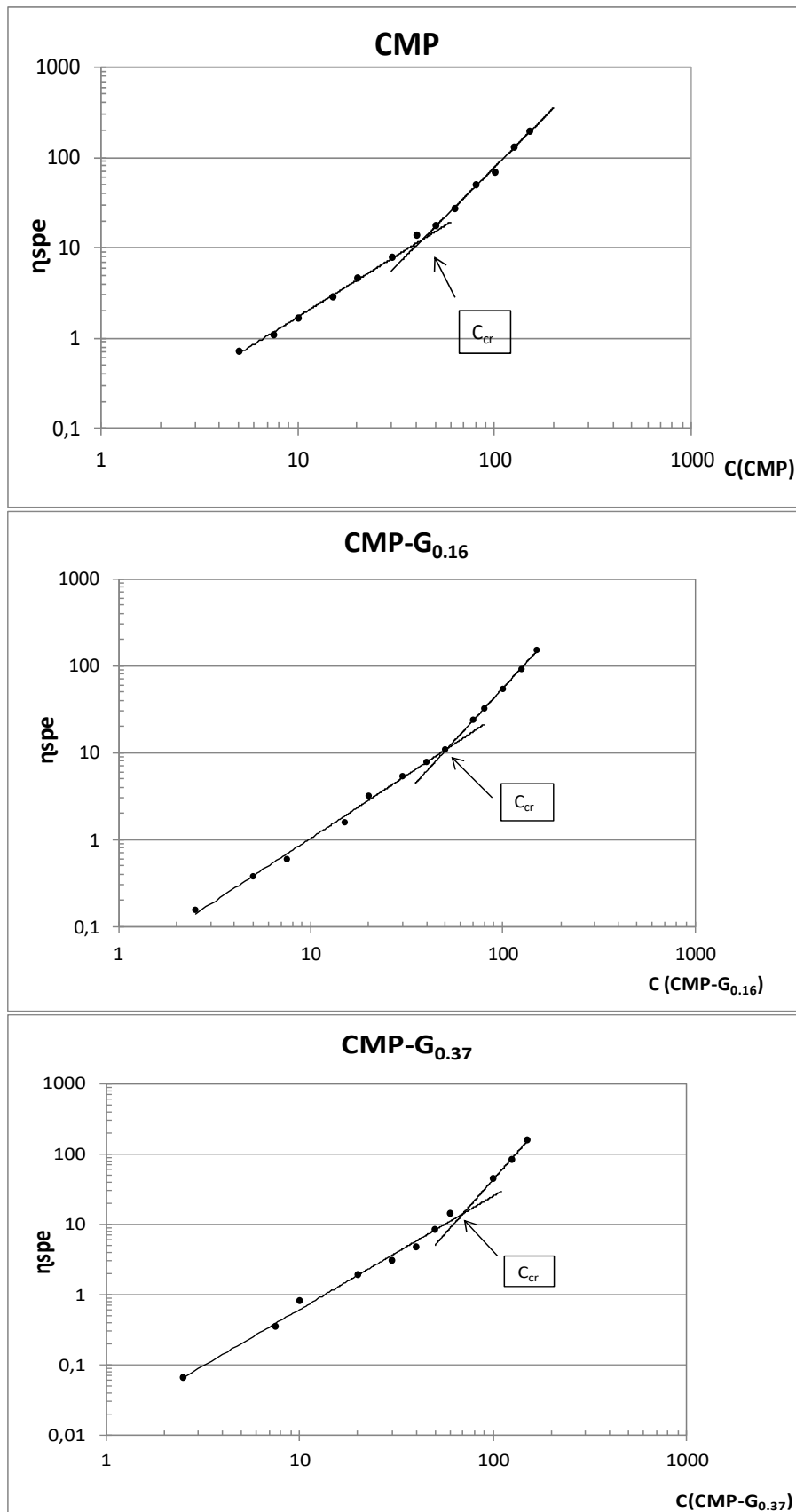
Tous ces résultats soutiennent l'hypothèse de la présence en solution de chaînes compactes et d'agrégats très compacts comme abordé précédemment.

### 3.1.2.2 Détermination des concentrations critiques de recouvrement

La concentration critique de recouvrement  $C^*$  est définie comme la concentration à laquelle les macromolécules occupent tout le volume de la solution et commencent à entrer en contact. Elle délimite le régime dilué et semi-dilué.

Dans le cas du CMP et précisément en régime dilué, on peut considérer que toutes les chaînes isolées en solution sont sous forme de pelotes statistiques et possèdent des tailles quasi similaires (à la notion de dispersité en taille près). La notion de  $C^*$  est alors uniquement reliée à l'occupation stérique du volume de la solution par les chaînes de polymère. Lorsqu'on s'intéresse aux dérivés greffés, comme démontré dans les parties précédentes, la présence des greffons aminogaiacol influe sur la conformation des chaînes isolées en solution en raison d'interactions hydrophobes. En effet, il y a coexistence de chaînes individuelles et d'agrégats compacts en solution. Ce qui conduit à une dispersité plus importante des tailles des pelotes statistiques. Dans notre cas, les conformations compactes traduisant des volumes hydrodynamiques plus faibles devraient logiquement s'accompagner de  $C^*$  plus importantes. Plus important encore, l'occupation du volume de la solution par les chaînes de polymère serait conditionnée par un aspect stérique (comme pour le précurseur) mais pourrait également l'être aussi par l'établissement d'associations hydrophobes intermoléculaires de plus en plus fréquentes à mesure que la concentration en polymère augmente. Nous avons même montré dans une étude précédente (CMP greffé avec des chaînons alkyles  $C_8$ ) qu'il fallait aussi envisager dans certains cas la bascule entre associations intramoléculaires et associations intermoléculaires quand la concentration augmente<sup>16</sup>. En tenant compte de ces facteurs, il serait alors plus juste de parler, dans le cas des dérivés CMP- $G_x$ , d'une concentration critique  $C_{cr}$  au lieu d'une concentration  $C^*$ . Pour faciliter la suite du rapport, nous parlerons pour tous les produits de  $C_{cr}$ .

La Figure C-10 illustre les représentations en échelles bilogarithmiques des viscosités spécifiques  $\eta_{spe} = f(C)$  obtenues pour les CMP et dérivés CMP- $G_x$ .

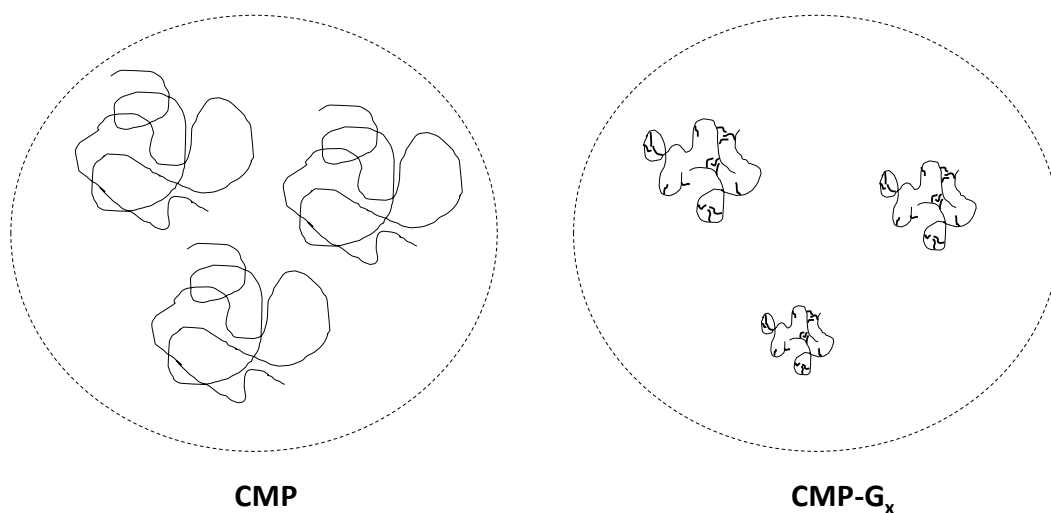


**Figure C-10.** Représentation de Utracki and Simha. Viscosité spécifique  $\eta_{spe}$  en fonction de la concentration (en g.L<sup>-1</sup>) en polymère CMP et CMP-G dérivés (CMP-G<sub>0.16</sub> et CMP-G<sub>0.37</sub>) dans le solvant PBS 0,15 M à 25°C.

On note également que les viscosités des dérivés greffés sont toujours inférieures, à concentration égale, à celles du CMP en régimes dilué et semi-dilué.

Remarque : Nous n'avons pas atteint la  $C_{cr}$  du CMP- $G_{0,58}$  dans les conditions de concentrations d'études.

Les concentrations critiques  $C_{cr}$  déterminées sont égales à 42, 55 et 67  $g.L^{-1}$  respectivement pour le CMP, le CMP- $G_{0,16}$  et le CMP- $G_{0,37}$ . On observe alors une augmentation des  $C_{cr}$  avec le DS(Ga). Cette évolution était prévisible et est en accord avec les premières conclusions. En effet, les tailles des pelotes CMP- $G_x$  sont plus petites que celles du CMP. Elles occupent alors moins d'espace en solution comparées aux pelotes du CMP. Il faudrait donc plus de macromolécules (concentration plus importante) dans le cas d'un CMP- $G_x$  en solution avant qu'elles ne puissent entrer en contact (illustration schéma C-6). En revanche, ces résultats indiquent aussi que les connexions intermoléculaires ne semblent pas s'établir facilement et que les pelotes (ou agrégats) restent bien compactes même quand la concentration en polymère augmente. En d'autres termes il ne semble pas se produire de bascule intra/inter dans les domaines de concentration étudiés. Ce résultat pourrait être en faveur d'un comportement de type polysavon ('polysoap') que nous discuterons plus tard avec les résultats en rhéologie.



**Schéma C-6 :** Exemple d'illustration des pelotes du CMP et de celles d'un dérivé CMP- $G_x$  en solution à une concentration fixe  $C (< C_{cr})$ .

Les dérivés CMP- $G_x$  étudiés présentent bien un caractère associatif, mis en avant par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco et par viscosimétrie en régime dilué et semi-dilué. Au vu des résultats obtenus ( $R_h$ ,  $[\eta]$ ,  $C_{cr}$ ), il semble que les interactions intramoléculaires soient prédominantes en régimes dilué et semi-dilué. Ce type de comportement de dérivés greffés a



déjà été mis en avant avec des groupements hydrophobes quasi-similaires sur le CMP. Précisément, Carpov *et al.*<sup>26</sup> ont greffé des groupements amines aromatiques (le 1-aminopyrène ou adénine) sur un carboxyméthylpullulane avec des degrés de substitutions faibles ( $\leq 6\%$ ). Suite à des études par viscosimétrie, ils ont mis en avant des viscosités des dérivés greffés inférieures à celle du précurseur CMP et ce, en régimes dilué et semi-dilué (solvant NaCl 0,1 M).

Par ailleurs, dans le cas de chaînes perfluorées linéaires courtes ( $C_8$  ou  $C_{10}$ ) greffées sur un CMP avec des taux de greffage faibles ( $\sim 5\%$ ), Glinel *et al.*<sup>10</sup> mettent en avant en régime dilué, des viscosités intrinsèques des produits greffés faibles comparées à celle du CMP. Les auteurs montrent au contraire qu'en régime semi-dilué, les viscosités des solutions de dérivés greffés augmentent de manière drastique comparées à celle du CMP (mise en avant d'interactions intermoléculaires). Les études ont été réalisées en milieu salin NaCl 0,1 M.

Comme autre exemple, dans le cas de dérivés CMP greffés par des chaînes linéaires longues ( $C_{16}$ ) avec des degrés de substitution faibles (4,5 et 6,8 %), Bataille *et al.*<sup>6</sup> observent des viscosités intrinsèques qui augmentent par rapport à celle du précurseur (larges agrégats). Les études ont été effectuées en milieu salin NaCl 0,1 M.

D'une manière générale, on comprend que les comportements en milieu salin de dérivés greffés obtenu à partir d'un CMP dépendent de plusieurs paramètres. Comme par exemple, la nature du greffon (aromatique, linéaire), la longueur des chaînes de greffons ou encore le régime de concentrations.

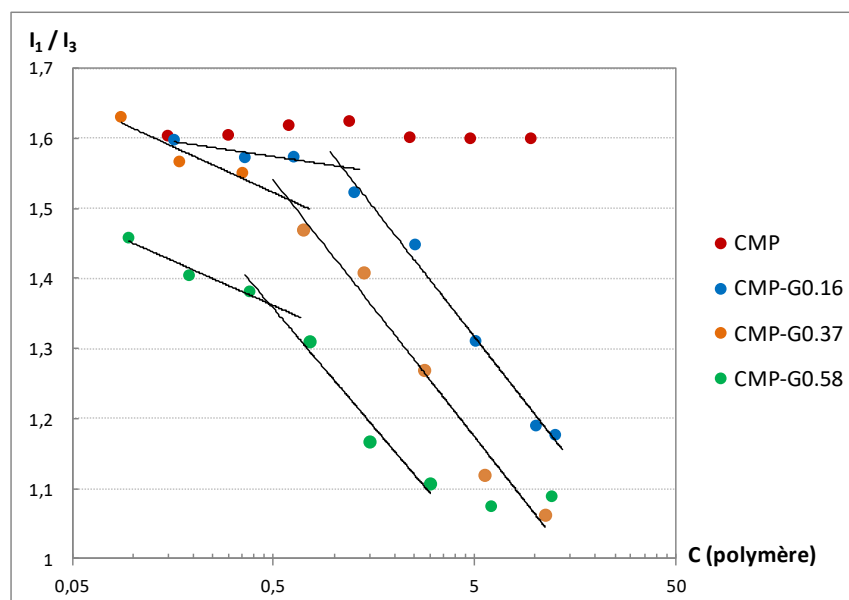
### 3.1.3 Fluorescence

Afin de confirmer le caractère associatif des dérivés CMP- $G_x$ , nous avons également réalisé des mesures par spectroscopie de fluorescence au pyrène. Elles ont été effectuées sur des solutions de CMP et des dérivés CMP- $G_x$  en présence du pyrène à  $4 \cdot 10^{-7}$  M. Les solutions de polymères (1 mL) sont préparées dans les domaines de concentrations [0,05 – 12] g.L<sup>-1</sup>. Le solvant utilisé est NaCl 0,15 M.

A titre indicatif, le pyrène est une sonde fluorescente qui émet 5 pics distincts dont le rapport du 1<sup>er</sup> pic au 3<sup>ème</sup> ( $I_1/I_3$ ) est caractéristique de l'environnement du pyrène. D'une manière générale, une valeur élevée du rapport  $I_1/I_3$  du pyrène traduit la présence d'un environnement polaire. Lorsque le rapport diminue, la sonde fluorescente se retrouve alors dans un environnement de plus en plus apolaire. A titre d'exemple, une valeur de  $I_1/I_3$  de l'ordre de

1,6 est observée dans le cas de l'eau. On obtient un rapport égal à 1,1 dans l'éthanol et voisin de 0,6 dans le cas de solvant hydrocarboné<sup>19</sup>.

L'évolution du rapport  $I_1/I_3$  des pics du pyrène en fonction de la concentration en polymère est présentée sur la Figure C-11.



**Figure C-11** : Evolution du rapport  $I_1/I_3$  des bandes d'intensité du pyrène en fonction de la concentration (en  $\text{g.L}^{-1}$ ) en polymère, dans le solvant NaCl 0,15 M, à 25°C pour le CMP et les dérivés CMP-G<sub>x</sub>: CMP (rouge); CMP-G<sub>0.16</sub> (bleu); CMP-G<sub>0.37</sub> (orange); CMP-G<sub>0.58</sub> (vert).

En présence du CMP, le rapport  $I_1/I_3$  du pyrène est proche de 1,6 et reste logiquement constant quelle que soit la concentration en CMP. Cela témoigne de la présence du pyrène dans un environnement polaire.

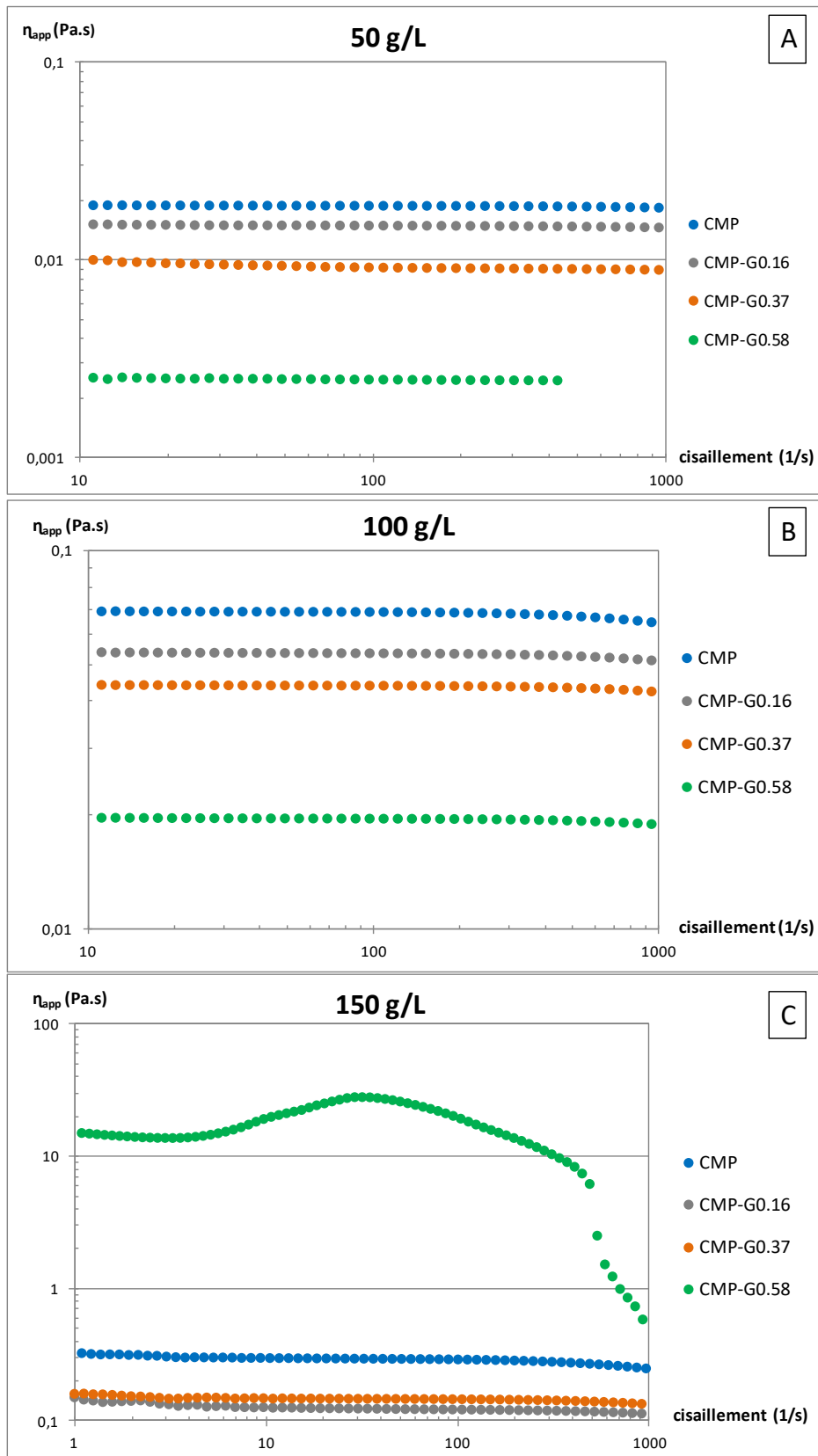
A l'opposé, ce rapport varie avec la concentration en dérivés greffés, on observe précisément deux tendances. Pour les plus faibles concentrations en polymère CMP-G<sub>x</sub>, (a) une faible diminution du rapport  $I_1/I_3$  qui varie peu avec la concentration en polymère greffé. Pour les concentrations plus importantes, (b) on constate une diminution beaucoup plus marquée et progressive du rapport  $I_1/I_3$ . Plus précisément, en présence des dérivés CMP-G<sub>x</sub>, on passe d'une valeur initiale (faible concentration) voisine de 1,6 (excepté pour le plus fort taux de greffage pour lequel la valeur initiale est autour de 1,45) à une valeur finale voisine de 1,1. Cette évolution traduit bien le passage du pyrène d'un environnement polaire vers un milieu plus apolaire. Ce comportement pourrait traduire la présence en solution des clusters hydrophobes (déjà évoqués).

La rupture de pente dans l'évolution du rapport  $I_1/I_3$  des pics du pyrène en fonction de la concentration en polymère est souvent assimilée, dans le cas des dérivés amphiphiles (comme CMP-G<sub>x</sub>) à une concentration d'agrégation critique (CAC)<sup>27,28</sup>. On considère alors que la CAC correspond à la formation de zones hydrophobes stables, conséquence des interactions intra et/ou intermoléculaires entre greffons NH<sub>2</sub>GA.

Les CAC déterminées sont égales à 1,2 ; 0,6 et 0,15 g L<sup>-1</sup> respectivement pour les dérivés CMP-G<sub>0,16</sub>, CMP-G<sub>0,37</sub> and CMP-G<sub>0,58</sub>. On constate donc une diminution sensible des CAC lorsque le DS(Ga) augmente. Il y a donc une corrélation directe entre CAC et nombre de greffons sur la chaîne de polymère. A l'instar des tensioactifs et de la concentration micellaire critique (CMC), il faut ici une concentration en polymère (i.e. en greffons) thermodynamiquement suffisante pour induire la formation de ces interactions. Ainsi plus le nombre de greffons sur la chaîne est important (i.e. DS(Ga)), plus il est thermodynamiquement aisé d'établir les associations hydrophobes en milieux aqueux.

### 3.2 Mesures rhéologiques : Etude en écoulement

Les mesures rhéologiques en mode écoulement ont été effectuées sur le CMP et les dérivés CMP-G<sub>x</sub> à 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> en milieu semi-dilué. Nous avons utilisé la géométrie double cylindre concentrique à 50 et 100 g.L<sup>-1</sup>. Au vu de l'aspect plus visqueux des solutions à 150 g.L<sup>-1</sup>, nous avons choisi la géométrie cône plan. Les courbes d'écoulement sont présentées sur la Figure C-12 sur un domaine de cisaillement compris entre [1-1000] s<sup>-1</sup>.

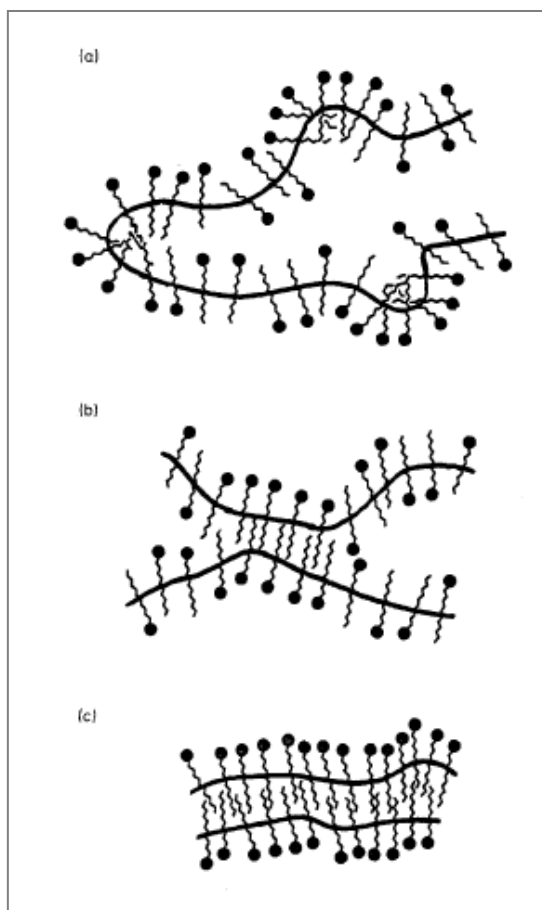


**Figure C-12 :** Viscosité apparente des solutions de CMP et dérivés CMP-G<sub>x</sub> en fonction du taux de cisaillement. A) 50 g.L<sup>-1</sup> géométrie double cylindrique ; B) 100 g.L<sup>-1</sup> géométrie double cylindrique ; C) 150 g.L<sup>-1</sup> géométrie cône plan avec CMP (bleu), CMP-G<sub>0.16</sub> (gris), CMP-G<sub>0.37</sub> (orange), CMP-G<sub>0.58</sub> (vert).

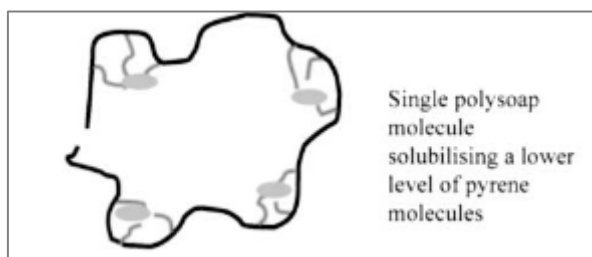
Le CMP et les dérivés CMP-G<sub>x</sub> présentent un caractère newtonien quelle que soit la concentration d'étude et quel que soit le cisaillement appliqué, à l'exception du CMP-G<sub>0.58</sub> à 150 g.L<sup>-1</sup>.

D'une manière générale, à l'exception du CMP le plus greffé à 150 g.L<sup>-1</sup>, les viscosités des dérivés CMP-G<sub>x</sub> restent toujours inférieures à celle du précurseur CMP. On constate également qu'elles diminuent lorsque le taux de greffage DS(Ga) augmente. Il faut noter que le CMP-G<sub>0.58</sub> se démarque le plus avec des valeurs de viscosités très faibles comparées à celles du CMP (environ une décade) à 50 et 100 g.L<sup>-1</sup>. Ce type de comportement rhéologique se rapproche clairement de celui d'un polysavon.

Le concept des polysavons a été introduit par Ulrich P. Strauss dans les années 1950. Les polysavons (ou polysoaps) sont définis comme des polymères amphiphiles (souvent polyélectrolytes) possédant un taux important de greffons hydrophobes plutôt courts et présentant de très faibles viscosités, même à des concentrations élevées en comparaison avec leur précurseur. Ils sont encore appelés « polymères intramoléculaires » ou « polymères micellaires ». Ils possèdent une grande flexibilité ce qui favorise de forts repliements des chaînes de macromolécules en solution. Cela entraîne la formation de micro-domaines hydrophobes causés par des associations hydrophobes principalement de type intramoléculaires<sup>29,30,31,32</sup>. Anton *et al.*<sup>33</sup> mettent en avant trois types de modèles illustrant ces interactions hydrophobes intramoléculaires de polysavons. Ces derniers sont présentés sur le schéma C-7. Le CMP-G<sub>0.58</sub> illustre bien le cas d'un polymère flexible greffé avec une quantité importante de groupements hydrophobes courts d'aminogaiacol. Un autre exemple de schéma illustrant les interactions intramoléculaires hydrophobes conduisant au repliement d'une chaîne d'un polysavon en solution est également présenté (schéma C-8).



**Schéma C-7 :** Modèles de « micelles de polymères » formées par des polysavons. (a) micelle locale, (b) micelle régionale, (c) micelle moléculaire. D’après Anton *et al.*<sup>33</sup>



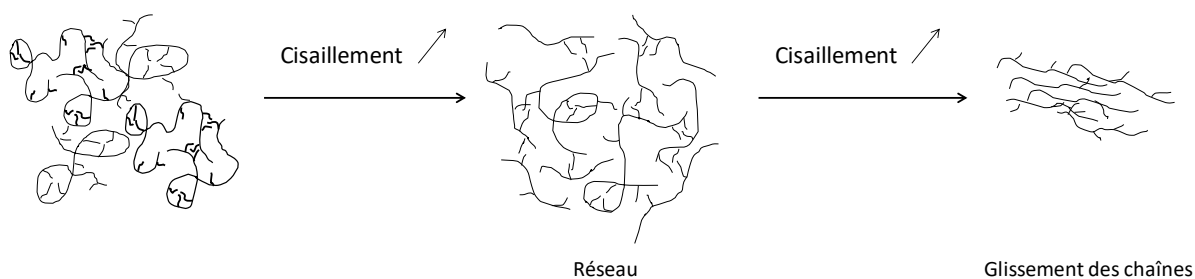
**Schéma C-8 :** Représentation schématique des propriétés en solution du polysavon chitosane greffé par un composé ammonium quaternaire palmitoyl glycol (d’après Uchegbu *et al.*<sup>34</sup>).

Par ailleurs, à  $150 \text{ g.L}^{-1}$ , le CMP-G<sub>0.58</sub> met en avant un caractère rhéologique surprenant et différent des autres dérivés. Sa viscosité est supérieure à celle du CMP précurseur et de ses homologues moins greffés. Ce comportement traduit qu’à cette concentration l’établissement de connexions intermoléculaires devient possible. Plus étonnant encore, pour de faibles valeurs de cisaillements ( $5 - 30 \text{ s}^{-1}$ ), la viscosité apparente du CMP-G<sub>0.58</sub> augmente sensiblement, ce qui traduit un caractère rhéoépaississant (a). Pour des cisaillements plus importants, une baisse de viscosité est observée, cette évolution plus classique est attribuée à un fluide de type rhéofluidifiant (b).

Ces deux comportements témoignent de réarrangements au sein de la structure du CMP-G<sub>0.58</sub> sous l'effet du cisaillement qui peuvent être expliqués de la manière suivante :

(a) le caractère rhéoépaississant pourrait être la conséquence du cisaillement faible qui permettrait l'orientation des chaînes et la déstructuration des interactions intramoléculaires rendues ainsi disponibles pour établir des associations intermoléculaires. Il en résulterait la formation d'un réseau expliquant l'augmentation de la viscosité.

(b) le caractère rhéofluidifiant doit être logiquement la conséquence aux forts cisaillements de la déstructuration du réseau physique précédemment organisé autour des associations intermoléculaires (au cours de la phase rhéoépaississante). Le schéma C-9 illustre le comportement du CMP-G<sub>0.58</sub> à 150 g.L<sup>-1</sup> qui vient d'être décrit.



**Schéma C-9 :** Illustration du comportement du dérivé CMP-G<sub>0.58</sub> en solution sous l'effet du cisaillement.

### 3.3 Conclusion sur les propriétés physico-chimiques

Les études physico-chimiques nous ont permis de mettre en avant un caractère associatif des dérivés greffés amphiphiles en milieu salin dans les régimes dilué et semi-dilué. Ce comportement est la conséquence de la présence d'interactions intra et intermoléculaires conduisant à l'établissement de domaines hydrophobes (clusters) en solution.

D'une manière générale, il faut noter que les associations intramoléculaires semblent prédominantes en milieu dilué mais également en régime semi-dilué. Cela conduit à des conformations des dérivés sous forme de pelotes statistiques denses, compactes et de tailles inférieures à celle du CMP. Il en résulte des valeurs de viscosités faibles des solutions de CMP-G<sub>x</sub> comparées à celle du CMP. Ce comportement observé est marqué lorsque le DS(Ga) augmente et traduit bien des polymères greffés de type polysavon.

Cependant, le dérivé CMP-G<sub>0.58</sub> s'est démarqué des autres produits avec un gain de viscosité important comparé au CMP à 150 g.L<sup>-1</sup> et un comportement rhéoépaississant aux faibles gradients de cisaillement assez atypique.

Ces propriétés physicochimiques pourraient avoir leur importance dans l'interprétation des résultats concernant les études des propriétés antioxydantes et antibactériennes qui sont maintenant abordées.

## 4 Propriétés antioxydantes

Les activités antioxydantes de la molécule non greffée (aminogaïacol), du CMP et des produits greffés (CMP-G<sub>x</sub>) ont été évaluées face au radical DPPH•.

### 4.1 Aminogaïacol vs radical DPPH•

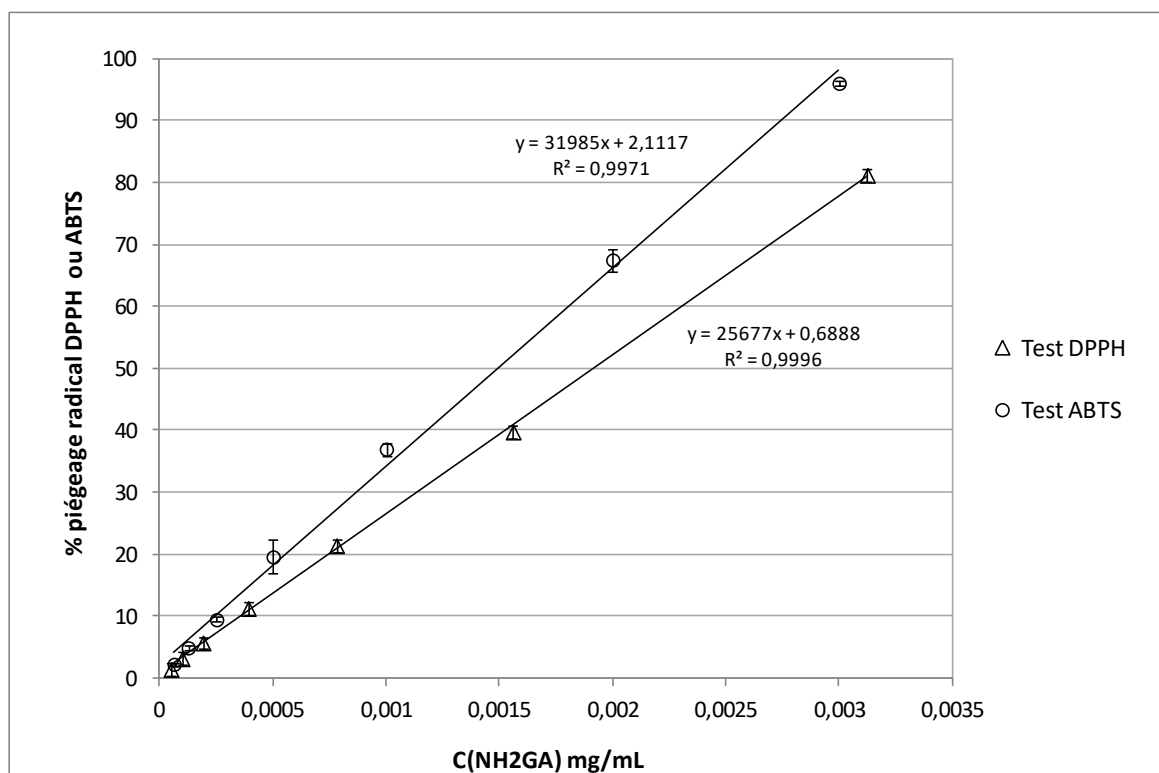
Les propriétés antioxydantes de l'aminogaïacol ont été évaluées vis-à-vis du radical DPPH• pour des valeurs de concentrations (C(NH<sub>2</sub>GA)) comprises entre [0,0488 – 3,125] µg.mL<sup>-1</sup> en milieu éthanol.

Les pourcentages de piégeage du radical DPPH• déterminés sont fournis sur la Figure C-13. Rappelons que le calcul du pourcentage a été explicité dans la partie Matériel et Méthodes et se traduit par l'équation Eq.C2.

$$\% \text{ de piégeage de radicaux DPPH} = \frac{\text{Absorbance (DPPH)} - \text{Absorbance (antioxydant + DPPH)}}{\text{Absorbance (DPPH)}} * 100 \quad \text{Eq. C2}$$

Nous avons également évalué les propriétés antioxydantes de l'aminogaïacol face au radical cation ABTS•+. Le domaine de concentration en aminogaïacol (C(NH<sub>2</sub>GA)) étudié est similaire à celui utilisé pour les tests qui ont été réalisés en présence du radical DPPH•. Les pourcentages de piégeage du radical cation ABTS déterminés au moyen de calculs similaires sont également fournis sur la Figure C-13.





**Figure C-13 :** Pourcentages moyens de piégeage du radical DPPH• par l'aminogaïacol. Analyse au temps  $t = 5$  min (mesures réalisées en triplicat).

On constate que les pourcentages de piégeage du radical DPPH• et du radical cation ABTS•+ augmentent avec la concentration en aminogaïacol ( $C(\text{NH}_2\text{GA})$ ). Ces évolutions s'établissent de manière linéaire sur le domaine de concentrations d'étude (voir Figure C-14).

L'activité antioxydante d'un composé est souvent exprimée au moyen de la concentration inhibitrice à 50% ( $\text{IC}_{50}$ ). A cette concentration, le pourcentage de piégeage du radical DPPH• (ou du radical cation ABTS) atteint est de 50 %. Dans notre cas, la  $\text{IC}_{50}$  en aminogaïacol notée  $\text{IC}_{50}(\text{NH}_2\text{GA})$  est égale à  $1,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (soit  $13,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) dans le cas du radical DPPH•. Une  $\text{IC}_{50}(\text{NH}_2\text{GA})$  du même ordre de grandeur et égale à  $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (soit  $10,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) à été déterminée dans le cas du radical cation ABTS•+.

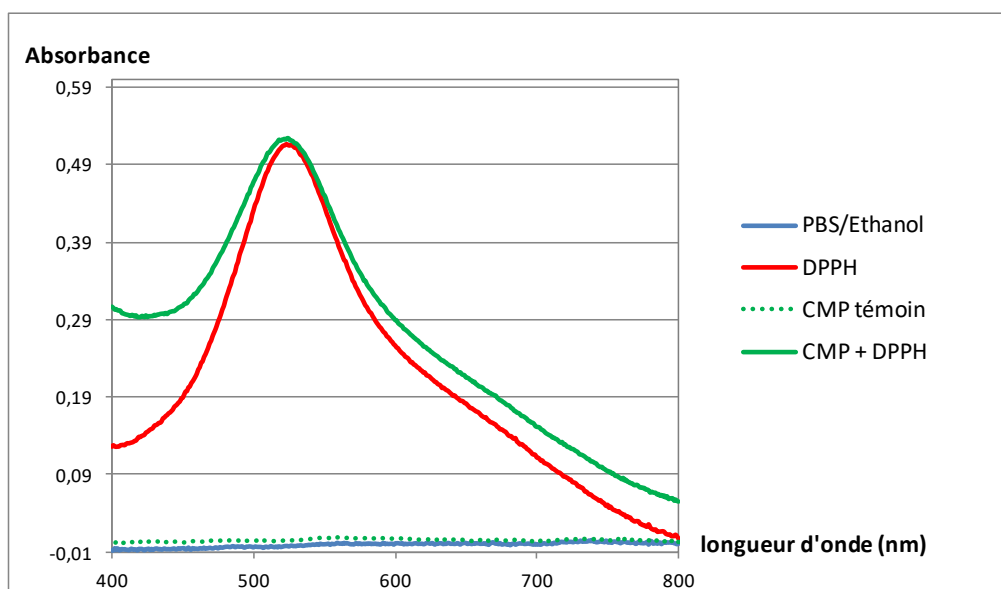
L'aminogaïacol possède donc un fort pouvoir antioxydant en comparaison avec des molécules à structures chimiques de type phénoliques proches de la sienne. Précisément, la molécule  $\text{NH}_2\text{GA}$  est environ deux fois plus active que son précurseur le gaïacol<sup>35</sup> ( $\text{IC}_{50} = 4,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ou  $33,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou encore comparé à l'acide férulique<sup>36</sup> ( $\text{IC}_{50} = 5,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ou  $27,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) face au radical DPPH•. Elle est également environ 6 fois plus efficace que l'eugénol<sup>37</sup> ( $11,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ou  $71,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) face au radical DPPH•.

Par la suite, nous présenterons les résultats obtenus suite à l'évaluation de l'activité antioxydante du CMP et des dérivés CMP-G<sub>x</sub> face au radical DPPH•.

## 4.2 CMP et dérivés CMP-G<sub>x</sub> vs radical DPPH•

### 4.2.1 CMP vs radical DPPH•

L'activité antioxydante du CMP a été évaluée vis-à-vis du radical DPPH• pour des valeurs de concentrations en CMP égales à 2,5 ; 5 et 7,5 g.L<sup>-1</sup>. Des exemples de courbes obtenues suite aux mesures d'absorbances des solutions (CMP + DPPH•) dans un mélange PBS 0,15 M / Ethanol (50/50) par UV-visible sont présentés Figure C-14.

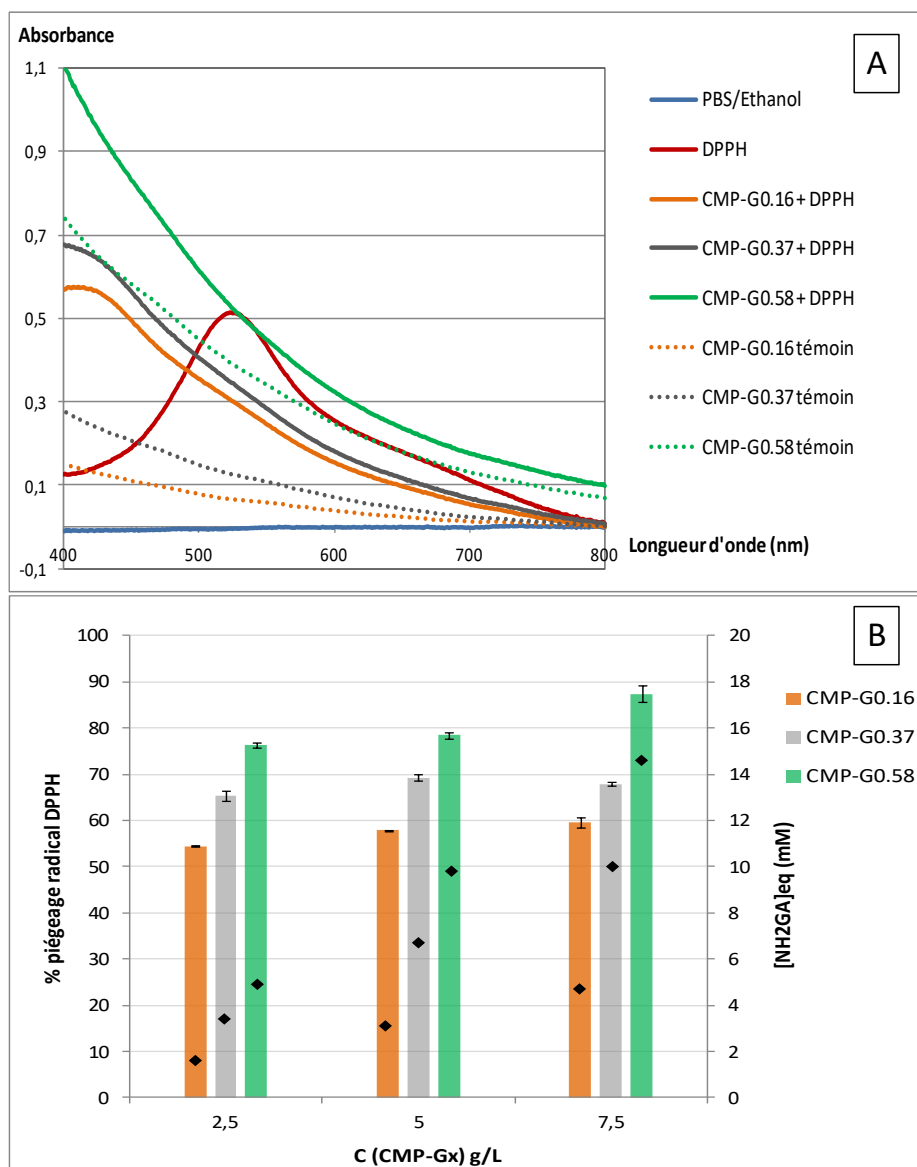


**Figure C-14 :** Courbes du CMP en présence du DPPH• obtenues en UV-visible dans un mélange PBS/Ethanol. Radical DPPH• (en rouge), CMP (en vert, pointillés), CMP en présence du radical DPPH• (en vert, trait plein). C (CMP) = 2,5 g.L<sup>-1</sup>

La courbe du radical DPPH• présente une bande d'absorption entre [420 - 600] nm. On remarque que la courbe du [CMP + DPPH] présente une bande similaire à celle du radical DPPH• ainsi qu'une valeur maximale d'absorbance identique et égale à 0,52 à 517 nm. Le CMP ne présente donc aucune activité antioxydante vis-à-vis du radical DPPH• à 2,5 g.L<sup>-1</sup>. Nous avons obtenus des résultats similaires aux autres concentrations testées. Il faut par ailleurs noter que ces résultats ont été confirmés par des observations visuelles. En effet, il n'y a eu aucun changement de coloration du radical DPPH• en présence du polymère CMP. Toutes les solutions préparées avec le radical DPPH• (en présence et en absence du CMP) et analysées en UV étaient colorées en mauve.

#### 4.2.2 CMP-G<sub>x</sub> vs radical DPPH•

Les propriétés antioxydantes des dérivés CMP-G<sub>x</sub> ont été étudiées aux mêmes concentrations que pour le CMP soit 2,5 ; 5 et 7,5 g.L<sup>-1</sup>. Pour rappel, les mesures d'absorbances par UV-visible ont été effectuées sur des solutions (CMP-G<sub>x</sub> + DPPH) mais également sur des solutions témoins de colorations (rappel partie Matériels et méthodes). Des exemples de courbes obtenues sont présentées Figure C-15 (A).



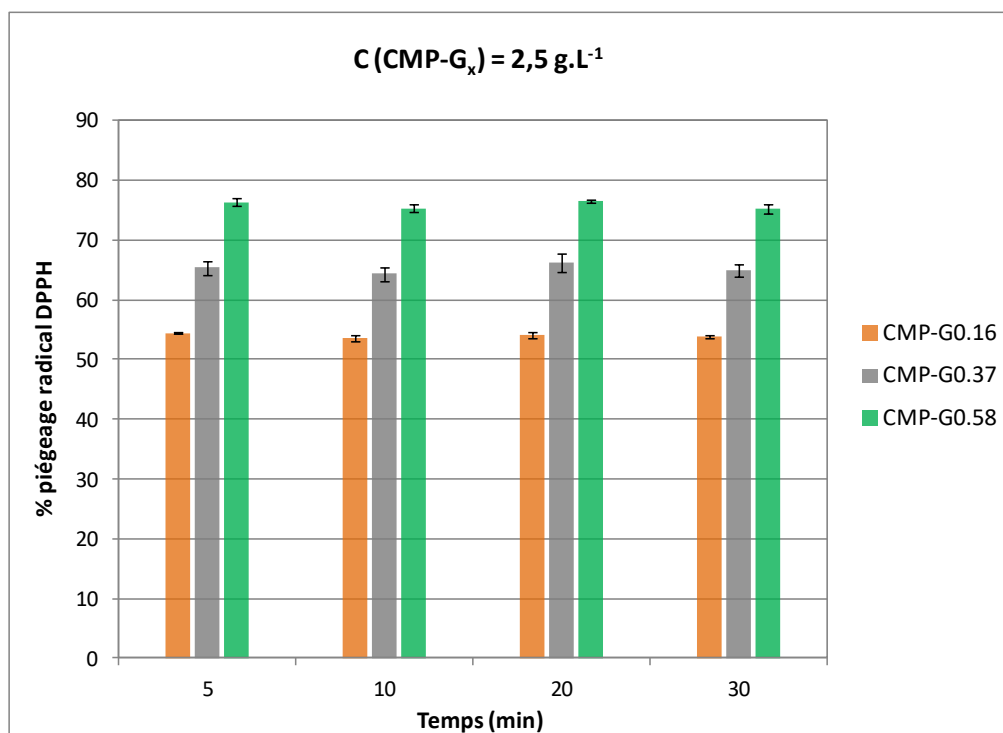
**Figure C-15** : Courbes des dérivés CMP-G<sub>x</sub> en présence du radical DPPH• obtenues en UV-visible dans un mélange PBS/Ethanol A) radical DPPH• (en rouge), témoins de coloration (en pointillés) CMP-G<sub>x</sub> en présence du DPPH• (trait plein). B) pourcentages de piégeage du radical DPPH• en présence des dérivés CMP-G<sub>x</sub>. (mesures réalisées en triplicat). Concentrations équivalentes en NH<sub>2</sub>GA notées [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> (♦) sur l'axe de droite. Analyse au temps t = 5 min

Sur la Figure C-15 (A), les courbes des produits greffés (CMP-G<sub>x</sub> + DPPH) ne présentent pas de pics similaires à celui du radical DPPH•. Précisément, le maximum d'absorption à 543 nm

qui est observé dans le cas du DPPH• en solvant PBS/Ethanol n'apparaît plus sous forme de pic. Bien qu'il se situe dans la montée du pic d'absorption des solutions de polymères elles-mêmes, on peut noter que ce pic a diminué et n'apparaît plus que sous la forme d'un épaulement (surtout pour les dérivés CMP-G<sub>0.16</sub> et CMP-G<sub>0.37</sub>). Par ailleurs, de manière visuelle, on remarque que la coloration du DPPH en présence des dérivés CMP-G<sub>x</sub> disparaît pour laisser place à une couleur quasiment proche de celle des produits greffés (brune plus ou moins foncée). Les CMP-G<sub>x</sub> présentent donc bien des propriétés antioxydantes. Le CMP n'étant pas antioxydant, les activités des CMP-G<sub>x</sub> sont uniquement apportées par la présence des greffons NH<sub>2</sub>GA. Les pourcentages de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration en CMP-G<sub>x</sub> ont été calculés en tenant compte des témoins de coloration et sont présentés Figure C-15 (B).

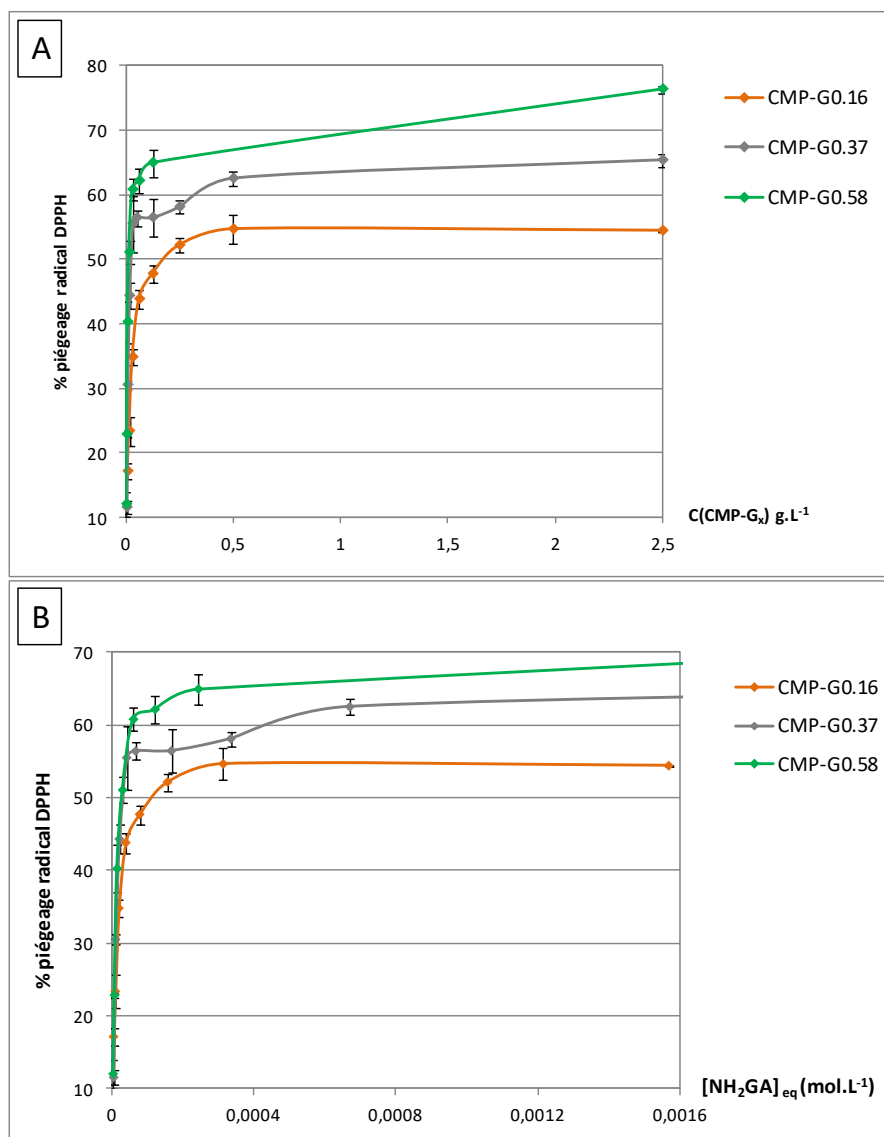
On constate qu'à concentration fixe en CMP-G<sub>x</sub>, les pourcentages déterminés augmentent avec le degré de substitution en aminogaiacol DS(Ga). Pour un DS(Ga) fixe, le pourcentage de piégeage du radical DPPH• varie très peu (plateau) quelle que soit la concentration en produit testée. A 7,5 g.L<sup>-1</sup>, les pourcentages de piégeage maximum déterminés (après 5 min d'analyse) sont égaux à 59,7±1,1 %, 67,9±0,4 % et 87,4±1,8 % respectivement pour les dérivés CMP-G<sub>0.16</sub>, CMP-G<sub>0.37</sub> et CMP-G<sub>0.58</sub>.

Remarque : L'effet du temps d'analyse sur les activités antioxydantes des dérivés CMP-G<sub>x</sub> a également été étudié. Des tests à partir des produits CMP-G<sub>x</sub> ont été réalisés à des concentrations identiques (2,5 ; 5 et 7,5 g.L<sup>-1</sup>) en faisant varier le temps d'analyse : 10, 20 et 30 min. Des exemples de pourcentages déterminés à différents temps et à concentration fixe en dérivé CMP-G<sub>x</sub> (2,5 g.L<sup>-1</sup>) sont présentés sur la Figure C-16. On remarque que les pourcentages obtenus restent quasiment-similaires et indépendants du temps. Ces évolutions ont été vérifiées à 5 et 7,5 g.L<sup>-1</sup> en dérivé CMP-G<sub>x</sub>.



**Figure C-16** : Pourcentages de piégeage du radical DPPH• des dérivés CMP-G<sub>x</sub> en fonctions du temps d'analyse, C(CMP-G<sub>x</sub>) égale à 2,5 g.L<sup>-1</sup>. (mesures réalisées en triplicat)

Afin de mieux apprécier le pouvoir antioxydant des CMP-G<sub>x</sub>, nous nous sommes par la suite intéressés à la détermination des IC<sub>50</sub> de chacun des dérivés. Les mesures d'absorbance par UV ont été effectuées sur des solutions (CMP-G<sub>x</sub> + DPPH•) avec des concentrations en CMP-G<sub>x</sub> comprises entre [0,002 – 0,5] mg.mL<sup>-1</sup> dans un milieu (PBS 0,15 M /Ethanol 50/50 V/V). Les pourcentages de piégeage du radical DPPH• obtenus aux concentrations en produits CMP-G<sub>x</sub> d'étude sont fournis sur la Figure C-17.



**Figure C-17.** A) Pourcentages moyens de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration en produits CMP-G<sub>x</sub>. -B) Pourcentages moyens de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration équivalente en NH<sub>2</sub>GA, [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub>. Analyse au temps t = 5 min (mesures réalisées en triplicat).

D'une manière générale, sur la Figure C-17 A), on constate que les pourcentages de piégeage du radical DPPH• augmentent avec la concentration en dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Cette hausse se fait de manière rapide dans un premier temps puis finit par atteindre un palier. Ce qui explique la faible variation de pourcentages aux concentrations 2,5 ; 5 et 7,5 g.L<sup>-1</sup> (abordé précédemment).

Les concentrations IC<sub>50</sub> déterminées sont égales à 179 µg.mL<sup>-1</sup>, 24 µg.mL<sup>-1</sup> et 13 µg.mL<sup>-1</sup> respectivement pour le CMP-G<sub>0.16</sub>, CMP-G<sub>0.37</sub> et le CMP-G<sub>0.58</sub>. IC<sub>50</sub> diminue donc logiquement lorsque le DS(Ga) augmente. Les dérivés CMP-G<sub>x</sub> démontrent de fortes activités antioxydantes comparées à des systèmes de chitosane greffés qui ont été étudiés dans la

littérature. Comme exemple, Aytakin *et al.*<sup>38</sup> ont greffé l'acide caféique sur le chitosane. Le dérivé obtenu contient 13,6 g d'acide caféique pour 100g de dérivé greffé. Ce produit est comparable au CMP-G<sub>0,37</sub> en s'intéressant à la quantité de composé phénolique greffé (18,7 g/100 g pour le CMP-G<sub>0,37</sub>). Les auteurs ont trouvé une IC<sub>50</sub> égale à 90 µg.mL<sup>-1</sup>.

Liu *et al.*<sup>39</sup> ont greffé l'acide férulique sur le N,O-carboxyméthyl chitosan avec un taux de greffage égal 36,7g / 100 g de produit. Ce taux d'incorporation est plus important que celui déterminé dans notre cas pour le dérivé le plus greffé CMP-G<sub>0,58</sub> (27,2 g /100g). Cependant, les auteurs ont trouvé une IC<sub>50</sub> égale à 590 µg.mL<sup>-1</sup>, donc une efficacité antioxydante considérablement plus faible que celles trouvées pour nos dérivés. .

Nous avons également représenté sur la Figure C-17 B), les pourcentages de piégeage du radical DPPH• en fonction cette fois-ci de la concentration équivalente en aminogaïacol [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> présente dans les différents produits CMP-G<sub>x</sub> (aux différentes concentrations C(CMP-G<sub>x</sub>) testées). A concentration [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> fixe pour tous les dérivés, on remarque qu'il y a une augmentation des activités antioxydantes avec le DS(Ga). Ces activités semblent donc être fonction du caractère associatif des produits CMP-G<sub>x</sub>, elles augmentent lorsque ce dernier est marqué. Autrement dit, il se pourrait que la présence de greffons aminogaïacol engagés dans des clusters renforce le piégeage des radicaux DPPH•. Ce qui pourrait paraître normal puisque le radical DPPH• devrait pouvoir diffuser partout y compris au sein des associations. De plus, il faut noter que les IC<sub>50</sub> des dérivés CMP-G<sub>x</sub> déterminées correspondent à des concentrations équivalentes en NH<sub>2</sub>GA égales à 112,5 µmol.L<sup>-1</sup>, 72,5 µmol.L<sup>-1</sup> et 25,4 µmol.L<sup>-1</sup> respectivement pour le CMP-G<sub>0,16</sub>, CMP-G<sub>0,37</sub> et le CMP-G<sub>0,58</sub>. Ces dernières sont toutes supérieures à IC<sub>50</sub> de l'aminogaïacol non greffée (13,7 µmol.L<sup>-1</sup>). Nous pouvons donc conclure que le NH<sub>2</sub>GA est moins actif une fois greffé.

## 5 Propriétés antibactériennes

Les activités antibactériennes du NH<sub>2</sub>GA, du CMP et des produits greffés (CMP-G<sub>x</sub>) ont été évaluées face à la bactérie *S.aureus* à un ensemencement fixé à 10<sup>6</sup> UFC/mL et au moyen d'une méthode de comptage (méthode de dilution suivi du dénombrement)<sup>40</sup>. Pour rappel, le protocole suivi a été explicité dans la partie Matériels et méthodes.

## 5.1 Aminogaiacol vs *S.aureus*

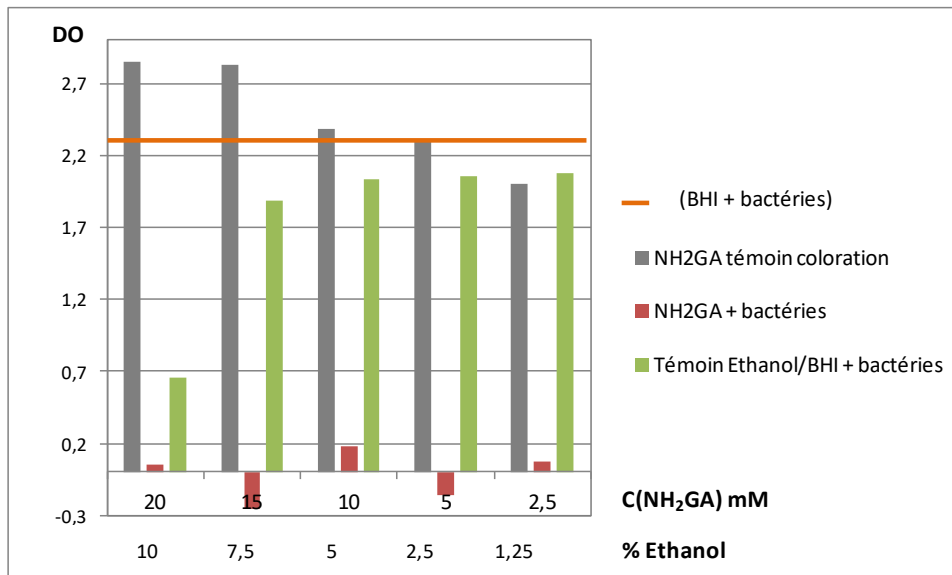
### 5.1.1 Dilutions et ensemencements

Les gammes de dilution (NH<sub>2</sub>GA, témoin coloration et référence) ont été préparées dans un mélange BHI/éthanol. Les concentrations en aminogaiacol sont comprises entre [20 - 2,5] mM pour des pourcentages d'éthanol respectifs compris entre [10 - 1,25] %.

La gamme de référence est réalisée dans les mêmes conditions (solvant, ensemencement) que la gamme d'aminogaiacol mais dépourvue de ce composé. La gamme de dilution en aminogaiacol ainsi que la gamme de référence ont été ensemencées à 10<sup>6</sup> UFC/mL. La gamme témoin de coloration en NH<sub>2</sub>GA (similaire à la gamme aminogaiacol) n'a pas été ensemencée. Elle servira par la suite de blanc (coloration) lors de la lecture des densités optiques comme précisé dans la partie Matériels et méthodes.

### 5.1.2 Lecture des densités optiques (DO)

Les résultats obtenus suite à la lecture des DO pour chaque gamme de dilution sont présentés Figure C-18.



**Figure C-18.** Lectures des densités optiques (DO) obtenues pour chacune des gammes de dilutions après 24 h d'incubation et à 37°C. Gamme témoin coloration (en gris), gamme NH<sub>2</sub>GA ensemencée (en rouge), gamme témoin éthanol/BHI ensemencée (en vert), pot BHI ensemencé (en orange).

La DO du système BHI + bactéries *S. aureus* témoigne d'une bonne croissance des bactéries dans le milieu de culture avec une valeur de DO voisine de 2,3.

En s'intéressant à la gamme témoin éthanol/BHI et précisément à 10% d'éthanol, la valeur de DO obtenue est basse et peu différente de celle du milieu témoin BHI non ensemencé. La croissance bactérienne est donc ralentie à ce taux d'éthanol. Cependant, l'éthanol n'interfère



plus dans les résultats des dilutions suivantes : on peut en effet observer une bonne croissance bactérienne pour les concentrations de 7,5 à 1,25 % d'éthanol car la DO atteint des valeurs proches de 2.

La gamme témoin coloration montre des valeurs de DO importantes, essentiellement causées par la coloration en NH<sub>2</sub>GA. Elles diminuent avec la concentration en NH<sub>2</sub>GA.



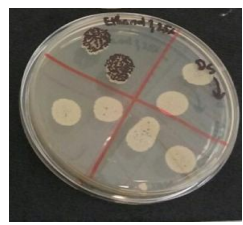
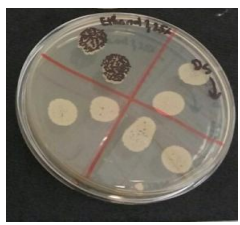



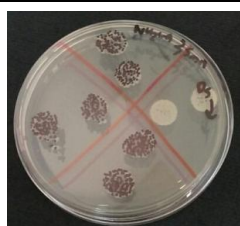
Les lectures de DO de chacune des solutions de la gamme NH<sub>2</sub>GA + bactéries *S. aureus* sont effectuées après avoir retranché le blanc (coloration) en utilisant la concentration en NH<sub>2</sub>GA correspondante de la gamme témoin de coloration. Des valeurs basses, voire négatives pour les trois premières concentrations en NH<sub>2</sub>GA sont observées. Cependant, il faut noter que l'arrêt de croissance à 20 mM peut également être dû à la proportion élevée en éthanol (10%). A cette concentration en NH<sub>2</sub>GA, il n'est alors pas possible d'attribuer une baisse de la DO à l'effet de l'éthanol et/ou à l'effet de l'aminogäicol. Nous nous sommes donc intéressés par la suite aux concentrations inférieures à 20 mM.

### 5.1.3 Dénombrement sur boites de gélose

La méthode de dénombrement a été effectuée pour les solutions dont les concentrations en aminogäicol étaient égales à 15, 10, 5 et 2,5 mM ainsi que pour les solutions de référence (BHI/éthanolensemencées) avec des pourcentages respectifs en éthanol : 7,5 ; 5 ; 2,5 et 1,25%. Les résultats obtenus sont regroupés Figure C-19. Seules les boites (donc les dilutions) où les comptages sont significatifs sont représentées.

Pour rappel, l'activité antibactérienne est calculée selon l'Eq. C3

$$\text{activité antibactérienne (\%)} = \frac{\text{UFC/mL(référence)} - \text{UFC/mL (produit)}}{\text{UFC/mL (référence)}} * 100 \quad \text{Eq. C3}$$

Pourcentages d'éthanol dans la gamme de référence	Ethanol 7,5%	Ethanol 5%	Ethanol 2,5%	Ethanol 1,25%
Photos des boîtes de pétri après 24 h à 37°C				
Concentrations en NH <sub>2</sub> GA	15 mM	10 mM	5 mM	2,5 mM
Photos des boîtes de pétri après 24 h à 37°C				
UFC/mL référence	$5,8 \times 10^{11}$	$8,4 \times 10^{11}$	$7,3 \times 10^{11}$	$7,3 \times 10^{11}$
UFC/mL NH <sub>2</sub> GA	0	5	$5,3 \times 10^6$	$5,3 \times 10^9$
Activité antibactérienne (%)	<b>&gt;99,9999</b>	<b>99,9999</b>	<b>99,9993</b>	<b>99,27</b>

**Figure C-19.** Photos des boîtes de pétri après 24 h et à 37°C pour les dilutions 5 (D5) à 8 (D8). Activités antibactériennes (%) calculées pour les différentes concentrations en NH<sub>2</sub>GA.

Remarque :

Sur chacune des photos, la notation D5 signifie la Dilution numéro 5. Elle est accompagnée d'une flèche indiquant le sens des dilutions (Dilution 5 à 8).

Sur les boîtes de pétri, en jaune apparaissent les colonies de bactéries. Elles sont non discernables car très nombreuses. Pour les dilutions où les colonies deviennent discernables et comptables, un feutre noir a été utilisé afin de marquer et compter toutes les colonies visibles. Rappelons également que les formules utilisées pour les calculs des UFC/mL et des activités antibactériennes sont explicitées dans la partie Matériels et méthodes (Test antibactériens).

Au vu des valeurs de pourcentages obtenues (Figure C-19), on peut conclure que l'aminogaiacol possède un fort pouvoir antibactérien aux concentrations d'étude. En effet, à 15 mM en NH<sub>2</sub>GA, aucune bactérie n'est observable sur les boîtes de gélose et ce quelle que soit la dilution d'étude. Nous avons également vérifié ce résultat sans aucune dilution

(dilution 0) comme présenté ci-dessous sur la Figure C-20. Sur cette dernière, on constate en effet qu'à 7,5% d'éthanol (en haut sur la boîte de Petri), les colonies de bactéries sont très nombreuses et non discernables. Tandis qu'en présence de la molécule NH<sub>2</sub>GA à 15 mM (7,5 % éthanol), aucune bactérie n'est observable sur les boîtes de gélose (en bas sur la boîte de Petri). Il y a donc éradication totale des bactéries soit une activité antibactérienne > 99,9999% uniquement causée par la présence d'aminogaïacol (NH<sub>2</sub>GA) à 15 mM.

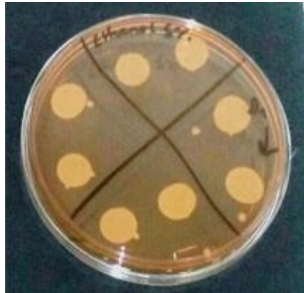


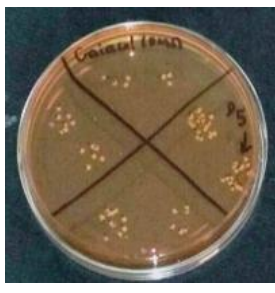


**Figure C-20 :** Photos des boîtes de gélose en présence de l'aminogaïacol à 15 mM (en bas de la boîte de Petri) et de la référence Ethanol (7,5%) /BHI (en haut de la boîte de Petri) sans aucune dilution

A 5 et 10 mM en NH<sub>2</sub>GA, les activités antibactériennes déterminées sont élevées et supérieures à 99,999 %. Peu de bactéries (voire aucune) sont présentes sur les boîtes de gélose. Enfin, à 2,5 mM, le dénombrement des bactéries a été possible et l'activité antibactérienne a été calculée et est égale à 99,27 %.

La CMB (concentration minimale bactéricide) de l'aminogaïacol contre *S.aureus* à un ensemencement de 10<sup>6</sup> UFC/ml est déterminée à 10 mM.

Pour comparaison, nous avons évalué expérimentalement dans les mêmes conditions de concentrations, de solvant et d'ensemencement (10<sup>6</sup> UFC/ml) l'activité du gaïacol. Aucune CMB n'a pu être atteinte aux concentrations d'études [15 - 2,5] mM, même si à 10 mM en gaïacol, nous avons déterminé une activité antibactérienne égale à 99,98 %. Les photos sont présentées sur la Figure C-21.

Pourcentages d'éthanol dans la gamme de référence	Ethanol 7,5%	
Photos des boîtes de pétri après 24 h à 37°C	D1 à D4	D5 à D8
		
Concentrations en gaïacol	15 mM	
Photos des boîtes de pétri après 24 h à 37°C	D1 à D4	D5 à D8
		
UFC/mL référence	$7,6 \times 10^{11}$	
UFC/mL gaïacol	$1,2 \times 10^8$	
<b>Activité antibactérienne (%)</b>	<b>99,98</b>	

**Figure C-21** : Photos des boîtes de gélose en présence de gaïacol à 15 mM et de la référence Ethanol (7,5%) /BHI après 24 h d'incubation à 37°C.

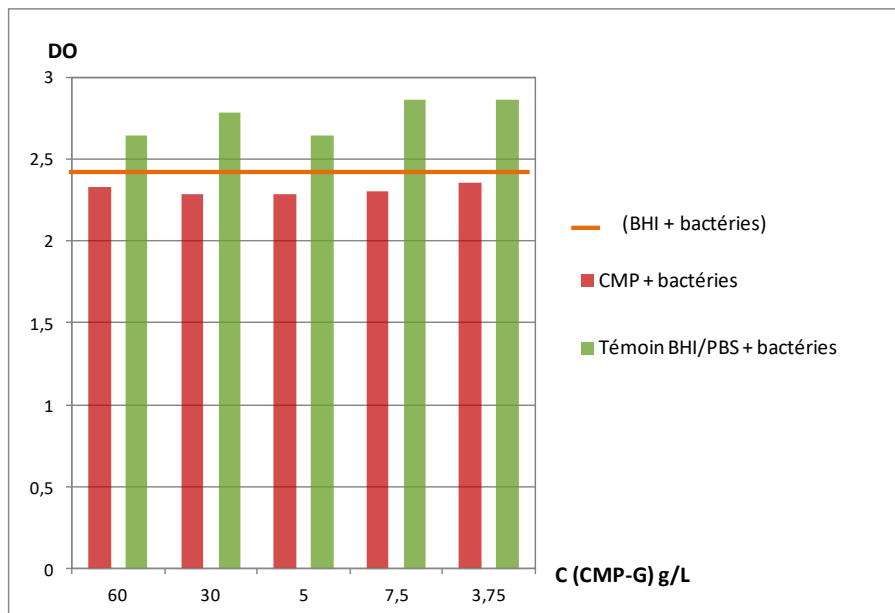
L'aminogaïacol est donc plus actif que la molécule de gaïacol. Ceci pourrait être dû à la présence de groupement amine qui est connu pour ses propriétés antibactériennes sous sa forme protonée<sup>41</sup>. Des molécules de structures chimiques phénoliques proches du gaïacol et de l'aminogaïacol tels que le créosol, l'eugénol ou encore l'acide férulique possèdent des CMB respectivement égales à  $6,2 \text{ mM}^{42}$ ,  $25 \text{ mM}^{43}$   $25,7 \text{ mM}^{44}$ . L'aminogaïacol possède donc une activité antibactérienne supérieure à celle de ces dérivés phénoliques.

## 5.2 CMP et dérivés CMP-G<sub>x</sub> vs *S.aureus*

### 5.2.1 CMP vs *S.aureus*

Une gamme de dilution du CMP a été réalisée dans un mélange BHI/PBS. Les concentrations testées sont comprises entre [60 – 3,75] g.L<sup>-1</sup>. Les solutions ne sont pas colorées. La gamme de référence utilisée a été préparée dans les mêmes conditions mais dépourvue de CMP.

Les lectures des DO nous ont permis de montrer que le CMP ne possède aucune activité antibactérienne aux concentrations d'étude. Les résultats obtenus aux concentrations comprises entre [60 – 3,75] g.L<sup>-1</sup> sont fournis sur la Figure C-22. Quelle que soit la concentration en CMP, les valeurs de DO restent élevées (supérieures à 2) et voisines de celle du pot BHIensemencé.



**Figure C-22 :** Lectures des densités optiques (DO) obtenues pour chacune des gammes de dilutions du CMP après 24 h d'incubation et à 37°C. Gamme CMPensemencée (en rouge), gamme témoin BHI/PBSensemencée (en vert), pot BHIensemencé (en orange).

La valeur de DO lue dans le cas du pot BHIensemencé (~2,4) témoigne d'une bonne croissance des bactéries. La gamme de référence PBS/BHI démontre des valeurs de DO élevées et voisines de celles du pot témoin BHIensemencé.

Quelle que soit la concentration en CMP, les valeurs de DO restent élevées (supérieures à 2). Au vu des hautes valeurs des DO, voisines de celle du pot témoin BHIensemencé, on conclut que le CMP ne possède pas d'activité antibactérienne. Aucun comptage n'a été réalisé.

Le CMP sera utilisé par la suite comme gamme de référence dans le cas des tests des dérivés CMP-G<sub>x</sub>.

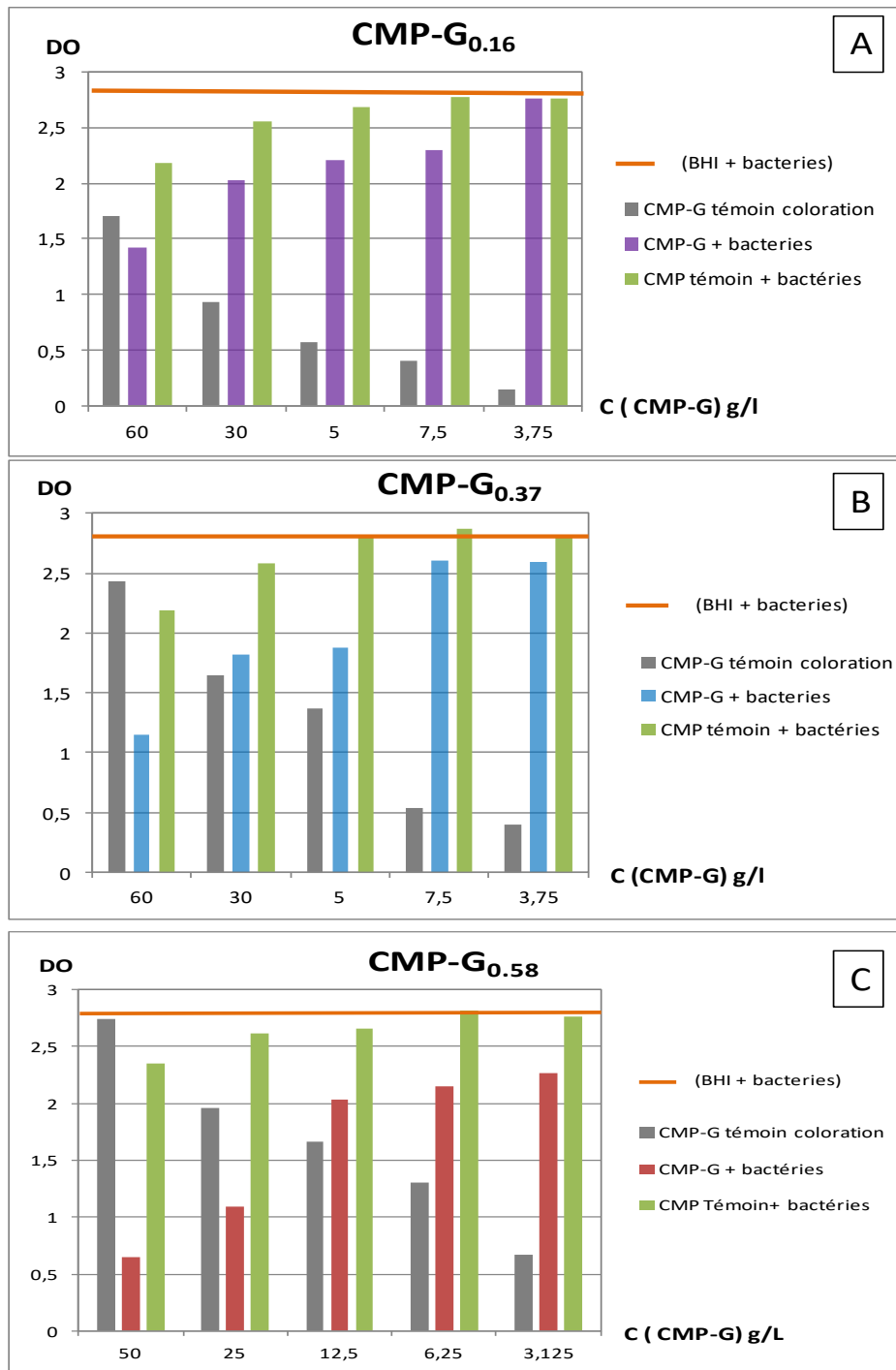
### 5.2.2 CMP-G<sub>x</sub> vs *S.aureus*

Les gammes des dérivés CMP-G<sub>x</sub> ont été préparées dans un mélange BHI/PBS. Les concentrations sont comprises entre [60 – 3,75] g.L<sup>-1</sup> dans le cas des CMP-G<sub>0.16</sub> et CMP-G<sub>0.37</sub> et entre [50 – 3,125] g.L<sup>-1</sup> pour le CMP-G<sub>0.58</sub>. Nous avons travaillé à des concentrations plus faibles dans le cas du dérivé le plus greffé car à 60 g.L<sup>-1</sup>, nous avons observé la formation d'un précipité dans le mélange BHI/PBS pour ce produit. Cette limite de solubilité peut être expliquée en raison de la force ionique qui devient sans doute trop élevée (sels apportés par les milieux PBS et BHI). A faible force ionique et dans le cas de polymère anionique amphiphile notamment ici le CMP-G<sub>0.58</sub>, la présence de sels va entraîner un écrantage des fonctions carboxylate du CMP qui conduira à renforcer le rapprochement entre greffons hydrophobes. Le polymère reste toutefois soluble. A plus forte force ionique un effet de 'salting-out' conduit à une déshydratation du polymère et ce d'autant plus que l'amphiphilie est importante. Les interactions polymère-polymère vont prédominer menant à la précipitation du polymère.

En parallèle pour chaque dérivé :

- une gamme de référence est réalisée dans les mêmes conditions (solvant, ensemencement, concentration) en utilisant le précurseur CMP ;
- une gamme témoin de coloration CMP-G<sub>x</sub> seul non ensemencée a également été préparée.

Les résultats obtenus suite aux lectures des DO dans le cas de chacun des dérivés sont présentés sur la Figure C-23.



**Figure C-23 :** Lectures des densités optiques (DO) obtenues pour chacune des gammes de dilutions du CMP après 24 h d'incubation et à 37°C. Gamme référence (CMP témoin + bactéries) (vert), gamme témoin coloration CMP-G<sub>x</sub> (gris), gamme (CMP-G<sub>x</sub> + bactéries) : CMP-G<sub>0.58</sub> (rouge), CMP-G<sub>0.37</sub> (bleu), CMP-G<sub>0.16</sub> (violet), BHIensemencé (en orange).


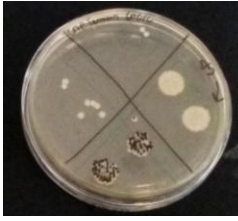



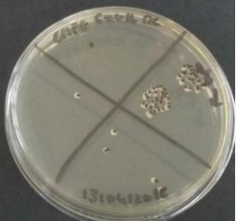
La DO du pot BHI + bactéries *S. aureus* témoigne d'une bonne croissance des bactéries dans le milieu de culture avec une valeur de DO voisine de 2,7.

Les valeurs des DO des gammes de référence (CMP témoin + bactéries) sont élevées (>2) et restent quasiment constantes quelle que soit la concentration en CMP.

Concernant la gamme témoin coloration, on constate que les DO diminuent avec la concentration en CMP-G<sub>x</sub>. Cette évolution est logique.

Les lectures des DO des gammes CMP-G<sub>x</sub> + bactéries *S. aureus* sont effectuées après avoir retranché la DO du blanc (coloration) de la concentration en CMP-G<sub>x</sub> correspondante de la gamme témoin de coloration. On remarque que les valeurs des DO augmentent lorsque la concentration en dérivé CMP-G<sub>x</sub> diminue. Ces résultats qualitatifs nous ont permis de sélectionner les concentrations 60, 30 et 15 g.L<sup>-1</sup> pour les CMP-G<sub>0.16</sub> et CMP-G<sub>0.37</sub> et les concentrations 50, 25 et 12,5 g.L<sup>-1</sup> dans le cas du CMP-G<sub>0.58</sub> afin de procéder au dénombrement.

La méthode de dénombrement a donc été réalisée aux concentrations choisies. Les images des boîtes de gélose correspondant aux concentrations les plus élevées pour chacun des dérivés CMP-G<sub>x</sub> sont présentées sur la Figure C-24. Les calculs des activités antibactériennes des CMP-G<sub>x</sub> ont été effectués avec une valeur moyenne de CFU/mL obtenue dans le cas de la référence CMP, soit  $3,7 \times 10^9$  CFU/mL. Les données qui en découlent sont regroupées dans le tableau C-8.

Référence	C(CMP) = 50g.L <sup>-1</sup>	C(CMP) = 60 g.L <sup>-1</sup>	C(CMP) = 60g/l
Photos des boîtes de pétri après 24h à 37°C			
Produit	C (CMP-G <sub>0.58</sub> ) = 50 g.L <sup>-1</sup>	C (CMP-G <sub>0.37</sub> ) = 60 g.L <sup>-1</sup>	C (CMP-G <sub>0.16</sub> ) = 60g/L
Photos des boîtes de pétri après 24h à 37°C			
Activité antibactérienne (%)	92,5	92,1	85,1

**Figure C-24 :** Photos des boîtes de pétri après 24 h et à 37°C et activités antibactériennes (%) déterminées pour les dérivés CMP-G<sub>x</sub> aux concentrations les plus élevées testées. Les dilutions 5 (D5) à 8 (D8) sont présentées.



On remarque qu'à la dilution 5, dans le cas de référence CMP, aucune colonie n'est discernable (non comptable). Au contraire, en présence des dérivés CMP-G<sub>x</sub>, il a été possible de différencier les colonies de bactéries et de les compter. Les activités antibactériennes déterminées sont présentées dans le tableau C-8.

**Tableau C-8 : Activité antibactérienne (%) des produits CMP-G<sub>x</sub>**

	[CMP-G <sub>x</sub> ] g.L <sup>-1</sup>	[NH <sub>2</sub> GA] <sub>eq</sub> mM	Activité antibactérienne (%) <sup>a</sup>
CMP-G <sub>0.58</sub>	50	98	92,5 ± 4,1
	25	49	91,5 ± 1,3
	12,5	24	86,9 ± 3,7
CMP-G <sub>0.37</sub>	60	81	92,1 ± 4,5
	30	40	81,2 ± 1,3
	15	20	72,2 ± 8,2
CMP-G <sub>0.16</sub>	60	38	85,1 ± 8,8
	30	16	80,0 ± 8,9
	15	9,4	41,0 ± 12,6

<sup>a</sup> : moyenne déterminée sur trois tests

Tous les détails (CFU/mL) et activités antibactériennes (valeurs des trois tests) sont regroupés en annexe C-3.

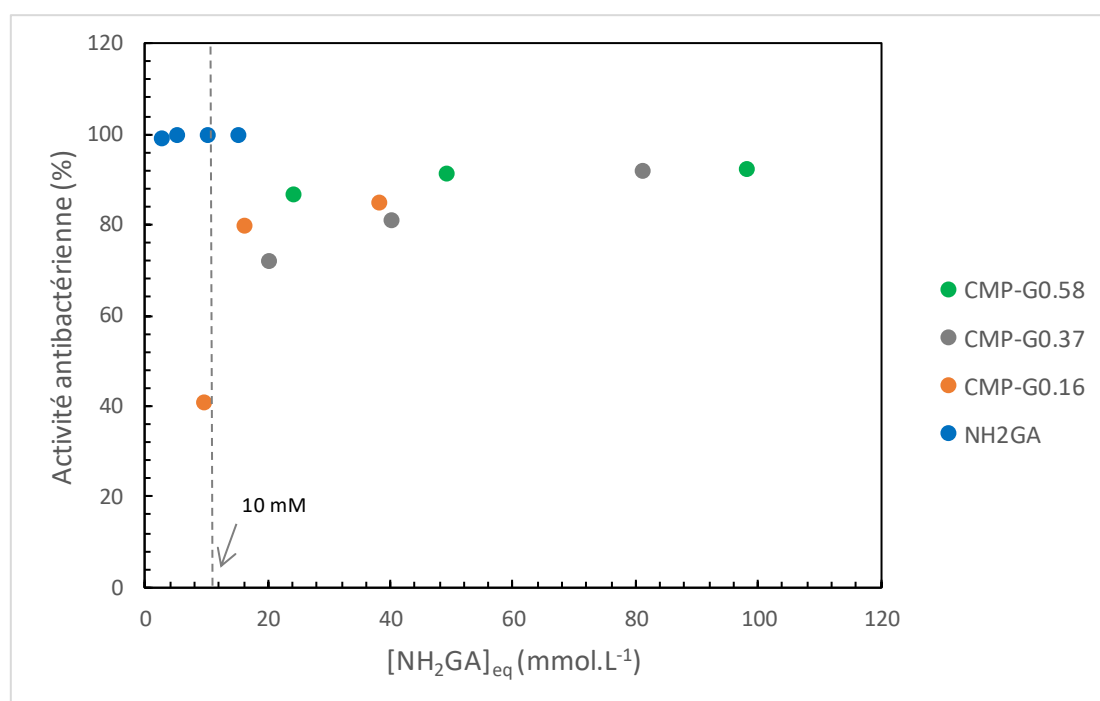
Les dérivés CMP-G<sub>x</sub> possèdent des propriétés antibactériennes vis-à-vis de *S.aureus* et à un ensemencement fixé à 10<sup>6</sup> CFU/mL. Le CMP n'étant pas antibactérien, ces activités sont apportées par la molécule greffée. Pour un dérivé CMP-G<sub>x</sub>, globalement, on remarque que les activités augmentent légèrement avec la concentration en CMP-G<sub>x</sub>. Cependant, peu de différences notables sont observées en comparant les valeurs des activités obtenues pour chaque gamme de produits. Elles sont de l'ordre de 80-90 %. L'activité antibactérienne semble peu dépendante du DS(Ga).

Les activités antibactériennes les plus importantes sont obtenues aux plus hautes concentrations en produits testées mais restent inférieures à 99,99%. Les CMB des dérivés

CMP-G<sub>x</sub> ne sont donc pas accessibles aux concentrations d'études. Elles sont donc supérieures à 50 g.L<sup>-1</sup> pour le CMP-G<sub>0.58</sub> et à 60 g.L<sup>-1</sup> pour les produits CMP-G<sub>0.37</sub> et CMP-G<sub>0.16</sub>.

Cependant, il serait difficile de travailler à des concentrations plus importantes en raison de la viscosité et/ou de l'insolubilité des produits greffés en milieu BHI/PBS.

Nous avons également représenté les activités antibactériennes des dérivés CMP-G<sub>x</sub> en fonction de la concentration [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> (Figure C-25) pour une meilleure analyse des résultats.



**Figure C-25 :** Activités antibactériennes des dérivés CMP-G<sub>x</sub> exprimées en fonction de la concentration équivalente en aminogaiacol [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> pour chaque concentration en dérivé CMP-G<sub>x</sub> testée.

Sur la Figure C-25, on remarque que pour des [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> > CMB(NH<sub>2</sub>GA) (10 mM), les activités des dérivés greffés varient peu avec le DS(Ga) et sont de l'ordre de 80-90%. En s'intéressant à un dérivé (ex : CMP-G<sub>0.58</sub>), on remarque également que les activités sont quasiment constantes malgré les concentrations [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> qui augmentent. Plus précisément, à 24 mM en NH<sub>2</sub>GA, l'activité déterminée pour le CMP-G<sub>0.58</sub> est égale à 86,9%. Pour une concentration [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> environ 5 fois plus importante (soit 98 mM), l'activité déterminée pour le CMP-G<sub>0.58</sub> est égale à 92,5%. On peut conclure au vu de ces analyses que les greffons aminogaiacol ne semblent pas être disponibles. Cela pourrait être expliqué par le caractère

associatif des dérivés CMP-G<sub>x</sub> (au préalable mis en avant en physico-chimie) et illustrant la présence d'interactions hydrophobes (clusters). Ces derniers sembleraient être défavorables à l'activité antibactérienne des greffons et donc des dérivés CMP-G<sub>x</sub>.

Par ailleurs, un autre point important peut être souligné : quelle que soit la concentration en produit greffé [CMP-G<sub>x</sub>], les concentrations équivalentes en aminogaïacol [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> sont supérieures à la CMB de l'aminogaïacol non greffé. Nous pouvons donc conclure que le NH<sub>2</sub>GA perd une partie de son activité une fois greffé.

### 5.3 Conclusion et discussion sur les propriétés antioxydantes et antibactériennes

L'aminogaïacol non greffé a démontré des activités antioxydantes (IC<sub>50</sub> = 1,9 µg.mL<sup>-1</sup> ou 13,7 µmol.L<sup>-1</sup>) et antibactériennes (CMB = 10 mM ou 1,39 g.L<sup>-1</sup>).

Comme attendu, le CMP ne possède aucune des propriétés recherchées (antioxydante et antibactérienne). Cependant, le greffage de l'aminogaïacol (à faible et à fort DS(Ga)) sur le CMP conduit à l'obtention de dérivés actifs. Les activités mises en avant deviennent importantes lorsque le DS(Ga) augmente. Plus précisément, les dérivés CMP-G<sub>x</sub> se sont révélés efficaces vis-à-vis du radical DPPH• avec des IC<sub>50</sub> (CMP-G<sub>0.16</sub>) = 179 µg.mL<sup>-1</sup>, IC<sub>50</sub> (CMP-G<sub>0.37</sub>) = 24 µg.mL<sup>-1</sup> et IC<sub>50</sub> (CMP-G<sub>0.58</sub>) = 13 µg.mL<sup>-1</sup>. Il semble même que le caractère antioxydant augmente avec le caractère associatif (i.e. la présence de micro-domaines hydrophobes)

Par ailleurs, ces produits greffés sont également antibactériens vis-à-vis de la souche bactérienne *S.aureus* avec des activités antibactériennes globalement comprises entre [80-90]% pour tous les produits et toutes les concentrations testées. Ces dernières semblent peu dépendantes du DS(Ga) et pour un DS(Ga) fixe, elles sont également peu dépendantes de la concentration équivalente en aminogaïacol [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub>. Les CMB respectives des CMP-G<sub>x</sub> n'ont pas pu être déterminées aux concentrations d'étude. Il semble que cette fois le caractère associatif représente une limitation dans l'activité antibactérienne en raison de la disponibilité plus faible des greffons impliqués dans les micro-domaines.

Quel que soit le test effectué à partir des dérivés CMP-G<sub>x</sub>, nous avons constaté que l'aminogaïacol une fois greffé était moins actif comparé au NH<sub>2</sub>GA libre.

Au vu de toutes ces conclusions, deux hypothèses peuvent être formulées :

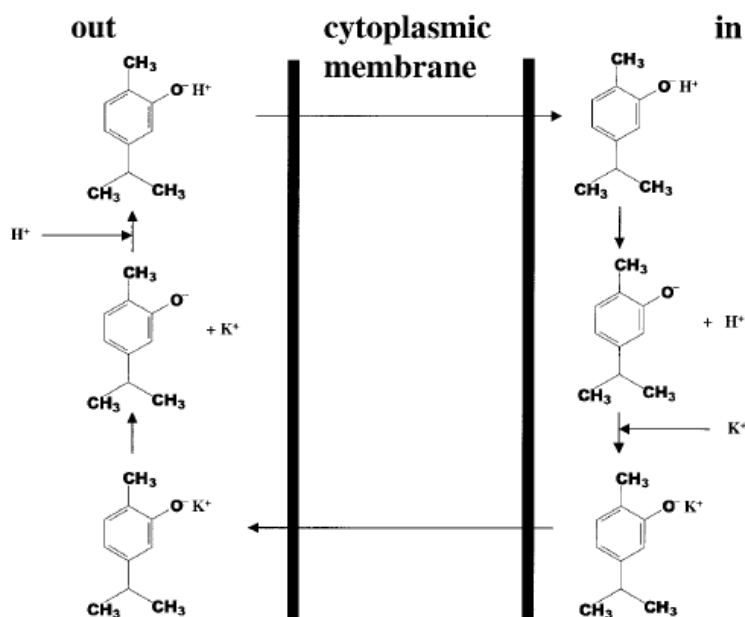
1. Il serait possible d'établir une corrélation entre propriétés (antibactériennes ou antioxydantes) et le caractère amphiphile et associatif des dérivés CMP-G<sub>x</sub> (mis en évidence précédemment).

En effet les structures agrégées ou collapsées de CMP-G<sub>x</sub> impliquent l'association des greffons d'aminogaïacol au sein de micro-domaines ou clusters hydrophobes. La présence de ces derniers sembleraient être favorable pour le piégeage des radicaux DPPH• (propriétés antioxydantes). Cependant, un effet opposé est observé concernant les activités antibactériennes. De par la présence de clusters, les groupements antibactériens de type gaïacol seraient alors moins disponibles pour agir sur la membrane des bactéries et empêcher leur prolifération.

Par ailleurs, dans le cas des propriétés antibactériennes, une seconde hypothèse peut être apportée pour expliquer les résultats obtenus :

2. La mobilité réduite de la molécule une fois greffée pourrait affecter l'activité des greffons.

En effet, ce paramètre semble être nécessaire pour l'activité antibactérienne d'un tel composé (monophénol). Ultee *et al.*<sup>45</sup> ont étudié le mécanisme d'action du pouvoir antibactérien du carvacrol face à *Bacillus cereus*. Les auteurs mettent en avant l'importance de la structure chimique du composé, notamment la présence du cycle benzène et des fonctions hydroxyle dans son activité antibactérienne. Le mécanisme proposé est illustré sur la Figure C-26. Le site d'action de la molécule est la membrane cytoplasmique de la bactérie. Les auteurs précisent que le carvacrol sous une forme non dissociée diffuse au travers de la membrane cytoplasmique de la bactérie pour aller vers le cytoplasme dans lequel il se dissocie. Par la suite, le carvacrol repart du cytoplasme cette fois-ci en portant un ion potassium K<sup>+</sup> (ou autre) en passant par la membrane cytoplasmique de la bactérie pour aller vers l'environnement externe.



**Figure C-26 :** Vue d'ensemble schématique de l'hypothèse formulée sur l'activité du carvacrol (D'après Ultee *et al.*<sup>45</sup>)

Par ailleurs, au vu des applications désirées, il était nécessaire d'évaluer la cytocompatibilité des dérivés élaborés. Nous détaillons dans la partie suivante les résultats obtenus suite aux tests de cytotoxicité réalisés.

## 6 Cytocompatibilité

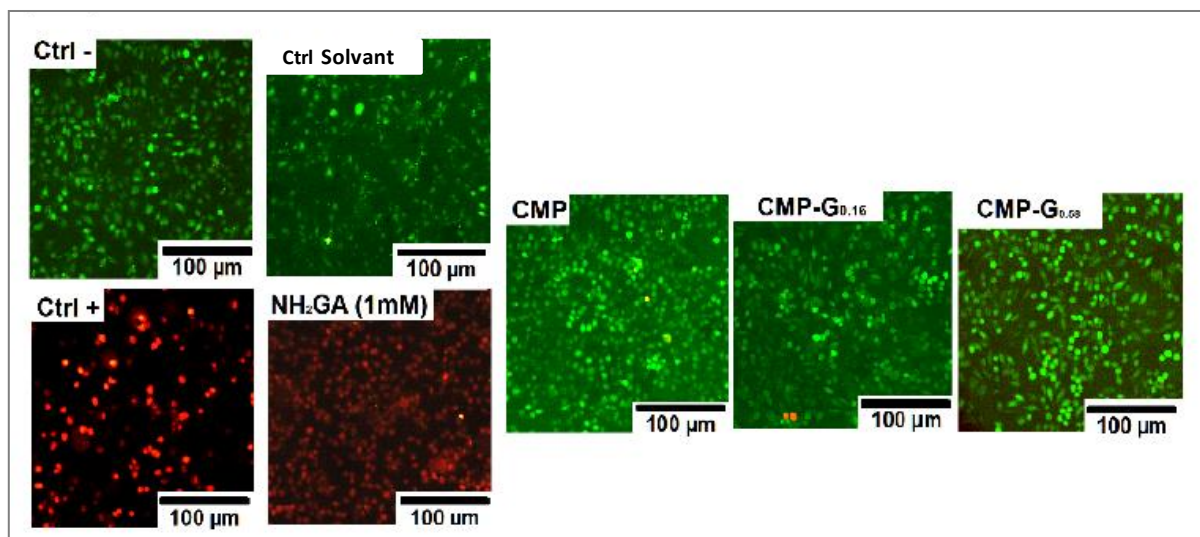
La cytotoxicité de l'aminogaiacol, du CMP et des dérivés greffés CMP-G<sub>x</sub> (CMP-G<sub>0,16</sub> et CMP-G<sub>0,58</sub>) a été évaluée sur des cellules fibroblastes L929 de souris au moyen de deux tests : le Live/Dead et l'Alamar Blue®. Ces méthodes ont été détaillées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

Dans le cas de l'aminogaiacol, nous avons effectué les essais à 1 mM en raison de la solubilité limitée de l'aminogaiacol à des concentrations supérieures dans le milieu de culture  $\alpha$ -MEM (minium essential media) avec 0,5% d'éthanol.

Dans le cas du CMP et des dérivés CMP-G<sub>x</sub>, les tests sont réalisés à 7,5 g.L<sup>-1</sup>, soit la plus haute concentration testée dans le cadre des tests antioxydants.

### 6.1 Test Live/Dead : mise en évidence de la viabilité des cellules

Les résultats obtenus suite aux tests Live/Dead sont présentés ci-dessous sur la Figure C-27.



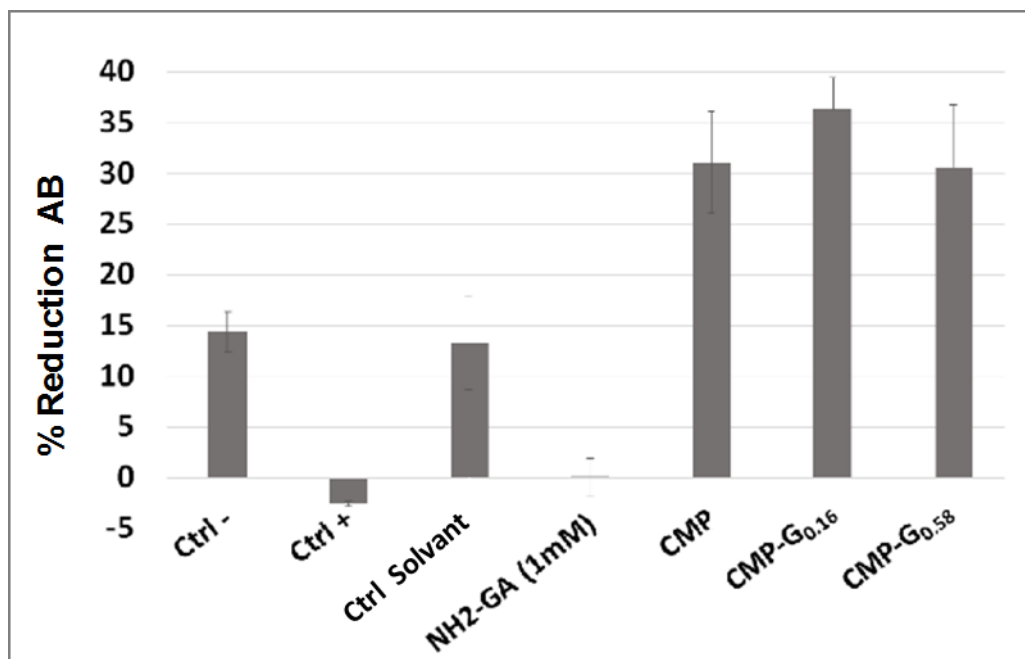
**Figure C-27 :** Evaluation de la cytotoxicité des solutions CMP et dérivés  $\text{CMP-G}_x$  ( $\text{CMP-G}_{0.16}$  et  $\text{CMP-G}_{0.58}$ ) ( $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Contrôles (Ctrl): positif (DMSO 10%), négatif (milieu de culture complet), solvant (Ethanol 0,5% v/v), et aminogaiacol (1 mM  $\text{NH}_2\text{GA}$ ). Images obtenues par le test Live/Dead après 24 h de contact avec les cellules fibroblastes. Cellules vivantes (vert) / Cellules mortes (rouge).

Dans un premier temps, on remarque que l'aminogaiacol seul démontre un effet cytotoxique sur les cellules. En effet, en présence de  $\text{NH}_2\text{GA}$  à 1 mM, les cellules meurent et apparaissent en rouge. Cela est dû exclusivement à la présence de l'aminogaiacol car le contrôle solvant correspondant (éthanol 0,5% v/v) ne possède aucun effet cytotoxique sur les cellules, qui apparaissent alors en vert. L'aminogaiacol non greffé est donc cytotoxique. D'autre part, en présence du CMP et des dérivés  $\text{CMP-G}_{0.16}$  et  $\text{CMP-G}_{0.58}$ , les cellules démontrent une bonne viabilité.

Il faut également préciser qu'à la concentration d'étude en  $\text{CMP-G}_x$  ( $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), les concentrations équivalentes en aminogaiacol sont égales à 4,7 mM et 14,6 mM, respectivement pour les  $\text{CMP-G}_{0.16}$  and  $\text{CMP-G}_{0.58}$ . Ces dernières sont donc supérieures à la concentration d'étude de  $\text{NH}_2\text{GA}$  non greffé (soit 1 mM). On peut donc conclure que l'immobilisation par greffage chimique de l'aminogaiacol sur le polysaccharide CMP limite la cytotoxicité du composé naturel. Cette conclusion peut être soutenue par l'hypothèse d'une mobilité réduite de l'aminogaiacol une fois greffé et/ou en raison de la transformation des fonctions amine en groupement amide suite à la réaction de greffage chimique. En effet, la fonction amine est connue pour ses propriétés antibactériennes<sup>41,46</sup>. Naha *et al*<sup>46</sup> ont testé la cytotoxicité de dendrimères de polyamidoamine (PNAPAM) avec l'Alamar blue®. Ils prouvent qu'il existe une relation entre la cytotoxicité et le nombre de groupements amine présents à la surface des PNAPAM. Plus précisément, plus il y a de fonctions amine, plus la toxicité des dendrimères augmente.

## 6.2 Test Alamar Blue® : mise en évidence de l'activité métabolique des cellules

Les résultats obtenus suite aux tests Alamar Blue sont présentés ci-dessous sur la Figure C-28.



**Figure C-28** : Evaluation de la cytotoxicité des solutions CMP et dérivés CMP-G<sub>x</sub> ((CMP-G<sub>0.16</sub> et CMP-G<sub>0.58</sub>) (7,5 g.L<sup>-1</sup>). Contrôles (Ctrl): positif (DMSO 10%), négatif (milieu de culture complet), solvant (Ethanol 0,5% v/v), et aminogaiacol (1 mM NH<sub>2</sub>GA). Activité métabolique des cellules L929 après 48 h de contact obtenue par le test Alamar Blue® (AB). Les données sont exprimées en moyennes ± SEM (n=3).

Les premières conclusions apportées par le Live/Dead sont également confirmées avec le test à l'Alamar Blue®. Ce réactif est utilisé comme indicateur des réactions d'oxydation et de réduction ayant lieu notamment durant la prolifération des cellules. Les cellules vivantes sont capables de transformer la résazurine (bleue) en un produit métabolique, la résosfurine (rose) et fluorescent. On s'intéresse donc ici au pourcentage de réduction de l'Alamar Blue®. Dans le cas de l'aminogaiacol, on observe un pourcentage de réduction AB quasi-inexistant. Le métabolisme des cellules est donc affecté par la présence de NH<sub>2</sub>GA (similaire au contrôle positif). Au contraire, les cellules possèdent un excellent métabolisme lorsqu'elles sont en contact avec le CMP ou les dérivés greffés CMP-G<sub>x</sub>. De plus, en comparaison avec le contrôle négatif, on constate également que les pourcentages de réduction d'Alamar Blue® sont doublés en présence du CMP et des CMP-G<sub>x</sub>. Cela montre que ces polysaccharides permettent d'améliorer la prolifération cellulaire.

Cependant, il faut noter que la toxicité de l'aminogaïacol non greffé pourrait devenir un problème à prendre en considération si on envisage un relargage possible de ce composé au cours de l'utilisation. Notamment, en raison d'une réaction d'hydrolyse. Toutefois, il convient de rappeler que nous avons choisi de lier chimiquement le  $\text{NH}_2\text{GA}$  sur le CMP via un lien amide. En effet, cette fonction est considérablement moins hydrolysable (et ce en conditions acide et basique extrêmes) qu'une fonction ester par exemple et apparaît plus résistante qu'un lien peptidique<sup>47,48</sup>.

## 7 Conclusions générales

Les travaux de recherche exposés dans ce chapitre avaient pour objectif de synthétiser des systèmes à base de polysaccharide et de molécule d'origine végétale, le tout présentant des propriétés antibactériennes et/ou antioxydantes d'une part mais également des propriétés viscosifiantes.

Le greffage de l'aminogaïacol sur le CMP a été réalisé en milieu organique DMSO dans un premier temps puis en milieu aqueux. Cette seconde voie, plus respectueuse de l'environnement, s'est avérée être la plus efficace. Elle a été effectuée précisément en milieu aqueux acidifié permettant la solubilisation de l'aminogaïacol en faisant varier les conditions de synthèse, notamment le taux de greffage en aminogaïacol DS(Ga).

Les techniques de spectroscopie (UV-visible et IR) ont permis de caractériser les dérivés  $\text{CMP-G}_x$  élaborés par détection qualitative des greffons aminogaïacol. Leur quantification a été effectuée par spectroscopie RMN- $^1\text{H}$  à l'aide d'un étalon interne. Les résultats obtenus ont permis de conclure sur le succès, l'efficacité (entre 60 et 70%) et la reproductibilité de la réaction menée : trois gammes de  $\text{CMP-G}_x$  ont ainsi été obtenues avec des degrés de substitution moyens variables ( $\text{CMP-G}_{0.16}$ ,  $\text{CMP-G}_{0.37}$  et  $\text{CMP-G}_{0.58}$ ).

Les analyses physico-chimiques en milieu dilué ( $C < C_{cr}$ ) et semi-dilué ( $C > C_{cr}$ ) ont été effectuées au moyen de diverses techniques : couplage SEC/MALS/DRI/Visco, viscosimétrie, spectroscopie de fluorescence (en présence de pyrène) et rhéologie. Il a été démontré que les dérivés  $\text{CMP-G}_x$  amphiphiles possèdent un caractère associatif en milieu salin. Ce comportement est la conséquence de la présence d'interactions intra- et dans une moindre mesure intermoléculaires entre les greffons aminogaïacol. Ainsi, les dérivés  $\text{CMP-G}_x$  possèdent des tailles (Rayon hydrodynamique  $R_h$ ) et des viscosités intrinsèques ( $[\eta]$ ) d'autant



plus faibles que le DS(Ga) augmente, en comparaison avec leur précurseur CMP. Ce qui traduit la prédominance d'interactions majoritairement intramoléculaires en régime dilué. L'augmentation des valeurs de concentrations  $C_{cr}$  des dérivés greffés ainsi que les études en rhéologie démontrent la persistance des associations intramoléculaires en régime semi-dilué.

Ainsi les dérivés CMP-G<sub>x</sub> amphiphiles présentent un comportement classique de polysavons avec des propriétés rhéologiques affaiblies comparées à celles du CMP précurseur et un comportement newtonien sur la gamme de gradient de cisaillement étudiée. On note toutefois un comportement différent pour le CMP-G<sub>0.58</sub> (le plus greffé) qui présente, seulement à la concentration maximale étudiée (i.e. 150 g.L<sup>-1</sup>), une viscosité supérieure à celle de son homologue CMP. Plus atypique encore, à cette concentration, ce dérivé montre en prime un comportement rhéoépaississant aux faibles gradients de cisaillement (probablement une transition des interactions intra/inter) suivi d'une forte rhéofluidité (rupture des associations sous cisaillement plus classique). Ainsi l'objectif rhéologique envisagé, c'est-à-dire une amélioration des propriétés de texture par rapport au CMP précurseur, n'a pas été atteint aux concentrations d'étude, excepté peut être dans le cas du dérivé CMP-G<sub>0.58</sub> à 150 g.L<sup>-1</sup>.

On peut toutefois noter que ces dérivés pourraient présenter un grand intérêt dans le domaine galénique ou cosmétique pour une utilisation en tant que système de séquestration/libération contrôlées d'actifs.

Concernant les activités chimiques et biologiques recherchées, les résultats obtenus avec l'aminogaïacol libre révèlent un fort pouvoir antioxydant et aussi antibactérien de ce composé. Le CMP n'a, quant à lui, démontré aucune activité. En revanche, le greffage de l'aminogaïacol sur le CMP conduit à l'obtention de dérivés présentant les activités antioxydantes et antibactériennes désirées. L'objectif principal a donc été atteint. De plus, tous les dérivés greffés par de l'aminogaïacol se sont avérés être biocompatibles vis-à-vis des cellules fibroblastes contrairement à l'aminogaïacol libre qui présente un effet cytotoxique. Il faut néanmoins souligner le fait que l'aminogaïacol une fois greffé est moins actif que le composé sous forme libre.

Pour essayer d'expliquer ce phénomène, en particulier dans le cas des activités antimicrobiennes, nous avons proposé d'une part (i) une possible corrélation entre la mobilité réduite des greffons aminogaïacol et la baisse des propriétés. D'autre part, (ii) une corrélation entre le caractère associatif des dérivés CMP-G<sub>x</sub> (présence d'agrégats hydrophobes) et cette même mobilité qui semblerait être défavorable aux propriétés antibactériennes.

En conclusion, les nouveaux dérivés synthétisés présentent bien les activités antioxydantes et antibactériennes recherchées. En revanche, les propriétés rhéologiques améliorées n'ont pas été obtenues en raison du caractère de type polysavon des dérivés. En fait, la flexibilité du polymère et le nombre peut-être trop important de greffons par chaîne ( $DS(Ga)$ ) conduisent à des repliements de type collapse qui limitent à la fois la rhéologie mais aussi probablement les performances en activité antibactérienne. Nous avons donc recherché un certain nombre de pistes qui pourraient permettre d'orienter le comportement des dérivés greffés en solution vers celui d'un polymère associatif plus classique et non d'un polysavon :

Stratégie 1 : Diminution du taux de greffage  $DS(Ga)$

Synthèse d'un dérivé  $CMP-G_x$  avec un taux de greffage en aminogaiacol encore plus faible, notamment  $DS_{théo}(Ga) = 0,15$ .

Stratégie 2 : Réduction de la longueur des chaînes du CMP

Synthèse de dérivés  $CMP-G_x$  à partir d'un CMP dégradé (de masse molaire plus faible) en visant des  $DS_{théo}(Ga)$  variables.

Ces deux premières alternatives devraient permettre de limiter notamment les associations intra et donc d'améliorer l'activité antibactérienne des dérivés greffés, mais la seconde solution ne semble évidemment pas idéale pour le contrôle de la rhéologie.

Stratégie 3 : Choisir un polysaccharide anionique plus rigide que le CMP : l'alginate

Synthèse de dérivés à base d'alginate ( $Alg-G_x$ )

En effet, il est possible d'imaginer que la flexibilité/rigidité soit un paramètre capital dans la faculté à s'associer notamment en terme de balance intra/intermoléculaire ».

Dans le chapitre D de ce manuscrit, nous allons nous intéresser à chacune de ces perspectives proposées.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CHAPITRE C**

- (1) Dorman, H. J.; Deans, S. G. Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88* (2), 308–316.
- (2) Brewer, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10* (4), 221–247.
- (3) Rekha, M. R.; Sharma, C. P. Pullulan as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications: A Perspective. *Trends Biomater. Artif. Organs* **2007**, *20* (2), 111–116.
- (4) Mishra, B.; Vuppu, S.; Rath, K. The Role of Microbial Pullulan, a Biopolymer in Pharmaceutical Approaches: A Review. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2011**, *1* (6), 45–50.
- (5) Kumar, D.; Saini, N.; Pandit, V.; Ali, S.; Ali, S. An Insight To Pullulan: A Biopolymer in Pharmaceutical Approaches. *Int. J. Basic Appl. Sci.* **2012**, *1* (3), 202–219.
- (6) Bataille, I.; Huguet, J.; Muller, G.; Mocanu, G.; Carpov, A. Associative Behaviour of Hydrophobically Modified Carboxymethylpullulan Derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *20* (3), 179–191.
- (7) Dulong, V.; Le Cerf, D.; Picton, L.; Muller, G. Carboxymethylpullulan Hydrogels with a Ionic And/or Amphiphilic Behavior: Swelling Properties and Entrapment of Cationic And/or Hydrophobic Molecules. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *274* (1–3), 163–169.
- (8) Dulong, V.; Mocanu, G.; Picton, L.; Le Cerf, D. Amphiphilic and Thermosensitive Copolymers Based on Pullulan and Jeffamine®: Synthesis, Characterization and Physicochemical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (2), 1522–1531.
- (9) Duval-Terrié, C.; Huguet, J.; Muller, G. Self-Assembly and Hydrophobic Clusters of Amphiphilic Polysaccharides. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *220* (1), 105–115.
- (10) Glinel, K.; Huguet, J.; Muller, G. Comparison of the Associating Behaviour between Neutral and Anionic Alkylperfluorinated Pullulan Derivatives. *Polymer (Guildf)*. **1999**, *40* (25), 7071–7081.
- (11) Dulong, V.; Hadrich, A.; Picton, L.; Le Cerf, D. Enzymatic Cross-Linking of Carboxymethylpullulan Grafted with Ferulic Acid. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 78–87.
- (12) Nakajima, N.; Ikada, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6* (1), 123–130.
- (13) Antosiewicz, J. M.; Shugar, D. UV-Vis Spectroscopy of Tyrosine Side-Groups in Studies of Protein Structure. Part 1: Basic Principles and Properties of Tyrosine Chromophore. *Biophys. Rev.* **2016**, *8* (2), 151–161.

- (14) Liu, J.; Wen, X.; Lu, J.; Kan, J.; Jin, C. Free Radical Mediated Grafting of Chitosan with Caffeic and Ferulic Acids: Structures and Antioxidant Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *65*, 97–106.
- (15) Liu, J.; Meng, C.; Yan, Y.; Shan, Y.; Kan, J.; Jin, C. Protocatechuic Acid Grafted onto Chitosan: Characterization and Antioxidant Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 518–526.
- (16) Simon, S.; Dugast, J. .; Le Cerf, D.; Picton, L.; Muller, G. Amphiphilic Polysaccharides. Evidence for a Competition between Intra and Intermolecular Associations in Dilute System. *Polymer (Guildf)*. **2003**, *44* (26), 7917–7924.
- (17) Colinet, I.; Dulong, V.; Hamaide, T.; Le Cerf, D.; Picton, L. New Amphiphilic Modified Polysaccharides with Original Solution Behaviour in Salt Media. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *75* (3), 454–462.
- (18) Duval, C.; Le Cerf, D.; Picton, L.; Muller, G. Aggregation of Amphiphilic Pullulan Derivatives Evidenced by on-Line Flow Field Flow Fractionation/multi-Angle Laser Light Scattering. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *753* (1), 115–122.
- (19) Sinquin, A.; Hubert, P.; Dellacherie, E. Amphiphilic Derivatives of Alginate: Evidence for Intra- and Intermolecular Hydrophobic Associations in Aqueous Solution. *Langmuir* **1993**, *9* (12), 3334–3337.
- (20) Vadodaria, S. S.; English, R. J. Aqueous Solutions of HEC and hmHEC: Effects of Molecular Mass versus Hydrophobic Associations on Hydrodynamic and Thermodynamic Parameters. *Cellulose* **2016**, *23* (2), 1107–1121.
- (21) Grigoras, A. G.; Constantin, M.; Grigoras, V. C.; Dunca, S. I.; Ochiuz, L. Studies on Physico-Chemical and Antibacterial Properties of Grafted Pullulans Solutions. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (9), 1249–1254.
- (22) Nichifor, M.; Stanciu, M. C.; Ghimici, L.; Simionescu, B. C. Hydrodynamic Properties of Some Cationic Amphiphilic Polysaccharides in Dilute and Semi-Dilute Aqueous Solutions. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (4), 1887–1894.
- (23) Pamies, R.; Hernández Cifre, J. G.; del Carmen López Martínez, M.; García de la Torre, J. Determination of Intrinsic Viscosities of Macromolecules and Nanoparticles. Comparison of Single-Point and Dilution Procedures. *Colloid Polym. Sci.* **2008**, *286* (11), 1223–1231.
- (24) Charpentier-Valenza, D.; Merle, L.; Mocanu, G.; Picton, L.; Muller, G. Rheological Properties of Hydrophobically Modified Carboxymethylcelluloses. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *60* (1), 87–94.
- (25) Pelletier, S.; Hubert, P.; Lapique, F.; Payan, E.; Dellacherie, E. Amphiphilic Derivatives of Sodium Alginate and Hyaluronate: Synthesis and Physico-Chemical Properties of Aqueous Dilute Solutions. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *43* (4), 343–349.

- (26) Carpov, a.; Mocanu, G.; Chapelle, S.; Merle, L.; Muller, G. Chemically Modified Pullulans II. New Hydrophobically Substituted Derivatives. *Can. J. Chem.* **1995**, *73* (11), 1933–1940.
- (27) de Oliveira Pedro, R.; Schmitt, C. C.; Neumann, M. G. Syntheses and Characterization of Amphiphilic Quaternary Ammonium Chitosan Derivatives. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *147*, 97–103.
- (28) Du, H.; Yang, X.; Pang, X.; Zhai, G. The Synthesis, Self-Assembling, and Biocompatibility of a Novel O-Carboxymethyl Chitosan Cholate Decorated with Glycyrrhetic Acid. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *111*, 753–761.
- (29) Strauss, U. P.; Gershfeld, N. L. The Transition from Typical Polyelectrolyte to Polysoap. I. Viscosity and Solubilization Studies on Copolymers of 4-Vinyl-N-Ethylpyridinium Bromide and 4-Vinyl-N-N-Dodecylpyridinium Bromide. *J. Phys. Chem.* **1954**, *58* (9), 747–753.
- (30) Laschewsky, A. Molecular Concepts, Self-Organisation and Properties of Polysoaps. In *Polysoaps/Stabilizers/Nitrogen-15 NMR*; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, **1995**; Vol. 124, pp 1–86.
- (31) Borisov, O. V.; Halperin, A. Micelles of Polysoaps. *Langmuir* **1995**, *11* (8), 2911–2919.
- (32) Kötz, J.; Kosmella, S.; Beitz, T. Self-Assembled Polyelectrolyte Systems. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26* (8), 1199–1232.
- (33) Anton, P.; Köberle, P.; Laschewsky, A. Recent Developments in the Field of Micellar Polymers. *Die Makromol. Chemie* **1993**, *194* (1), 1–27.
- (34) Uchegbu, I. F.; Sadiq, L.; Arastoo, M.; Gray, A. I.; Wang, W.; Waigh, R. D.; Schätzleinä, A. G. Quaternary Ammonium Palmitoyl Glycol Chitosan—a New Polysoap for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2001**, *224* (1), 185–199.
- (35) Yu, L.; Ren, J.-X.; Nan, H.-M.; Liu, B.-F. Identification of Antibacterial and Antioxidant Constituents of the Essential Oils of *Cynanchum Chinense* and *Ligustrum Compactum*. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29* (18), 1779–1782.
- (36) Olga, G.; Styliani, C.; Ioannis, R. G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic Acid in Hp-B-Cyclodextrin. *Food Chem.* **2015**, *185*, 33–40.
- (37) Pérez-Rosés, R.; Risco, E.; Vila, R.; Peñalver, P.; Cañigüeral, S. Biological and Nonbiological Antioxidant Activity of Some Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (23), 4716–4724.
- (38) Aytekin, A. O.; Morimura, S.; Kida, K. Synthesis of Chitosan–caffeic Acid Derivatives and Evaluation of Their Antioxidant Activities. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *111* (2), 212–216.

- (39) Liu, J.; Lu, J.; Kan, J.; Tang, Y.; Jin, C. Preparation, Characterization and Antioxidant Activity of Phenolic Acids Grafted Carboxymethyl Chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *62*, 85–93.
- (40) Lequeux, I.; Ducasse, E.; Jouenne, T.; Thebault, P. Addition of Antimicrobial Properties to Hyaluronic Acid by Grafting of Antimicrobial Peptide. *Eur. Polym. J.* **2014**, *51*, 182–190.
- (41) Savage, P. B.; Li, C.; Taotafa, U.; Ding, B.; Guan, Q. Antibacterial Properties of Cationic Steroid Antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *217* (1), 1–7.
- (42) Sá, M. B.; Ralph, M. T.; Nascimento, D. C. O.; Ramos, C. S.; Barbosa, I. M. S.; Sá, F. B.; Lima-Filho, J. V. Phytochemistry and Preliminary Assessment of the Antibacterial Activity of Chloroform Extract of *Amburana Cearensis* (Allemão) A.C. Sm. against *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase-Producing Strains. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2014**, *2014*, 786586.
- (43) Rehab, M. A. E.-B.; Zeinab, S. H. Eugenol and Linalool: Comparison of Their Antibacterial and Antifungal Activities. *African J. Microbiol. Res.* **2016**, *10* (44), 1860–1872.
- (44) Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M. J.; Simões, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microb. Drug Resist.* **2013**, *19* (4), 256–265.
- (45) Ultee, A.; Bennik, M. H. J.; Moezelaar, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus Cereus* The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus Cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68* (4), 1561–1568.
- (46) Naha, P. C.; Davoren, M.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J. Reactive Oxygen Species (ROS) Induced Cytokine Production and Cytotoxicity of PAMAM Dendrimers in J774A.1 Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *246* (1–2), 91–99.
- (47) Singh, L.; Ram, R. N. Chemoselective Hydrolysis of Amides in the Presence of Esters by Copper(II)/Glyoxal: Metal Complexation as the Core Motif for Selective Amide Activation. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (4), 710–711.
- (48) Buwalda, S. J.; Dijkstra, P. J.; Calucci, L.; Forte, C.; Feijen, J. Influence of Amide versus Ester Linkages on the Properties of Eight-Armed PEG-PLA Star Block Copolymer Hydrogels. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (1), 224–232.



## Chapitre D : Solutions proposées pour améliorer les propriétés visées

<b>1</b>	<b><u>Synthèses de nouveaux dérivés greffés</u></b>	<b>173</b>
1.1	<u>Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (polysaccharide CMP)</u>	174
1.2	<u>Stratégie 2 : diminution de la masse molaire (polysaccharide CMP dégradé)</u>	174
1.2.1	<u>Synthèse du <sup>d</sup>CMP</u>	174
1.2.2	<u>Synthèse des <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub></u>	176
1.3	<u>Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (polysaccharide Alginate)</u>	176
1.4	<u>Conclusion sur les synthèses chimiques</u>	179
<b>2</b>	<b><u>Caractérisation du greffage</u></b>	<b>180</b>
2.1	<u>Spectroscopie UV– Visible</u>	180
2.2	<u>Spectroscopie IR</u>	181
2.3	<u>Spectroscopie RMN<sup>1</sup>H</u>	183
2.4	<u>Conclusion sur la caractérisation du greffage</u>	186
<b>3</b>	<b><u>Etudes physico-chimiques</u></b>	<b>186</b>
3.1	<u>Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G)</u>	186
3.1.1	<u>Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco</u>	186
3.1.2	<u>Etude viscosimétrique</u>	189
3.1.3	<u>Fluorescence</u>	191
3.1.4	<u>Mesures rhéologiques : Etude en écoulement</u>	193
3.1.5	<u>Conclusion sur les propriétés physico-chimiques</u>	195
3.2	<u>Stratégie 2 : diminution de la masse molaire (<sup>d</sup>CMP et <sup>d</sup>CMP-G)</u>	195
3.2.1	<u>Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco</u>	195
3.2.2	<u>Fluorescence</u>	203
3.3	<u>Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G)</u>	204
3.3.1	<u>Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco</u>	204
3.3.2	<u>Etude viscosimétrique</u>	213
3.3.3	<u>Fluorescence</u>	217
3.3.4	<u>Mesures rhéologiques : Etude en écoulement</u>	219
3.4	<u>Conclusion sur la partie physico-chimique</u>	221
<b>4</b>	<b><u>Propriétés antioxydantes</u></b>	<b>223</b>



4.1	<u>Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G)</u> .....	223
4.2	<u>Stratégie 2 : diminution de la masse molaire (<sup>d</sup>CMP et <sup>d</sup>CMP-G)</u> .....	226
4.3	<u>Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G)</u> .....	228
4.4	<u>Conclusion sur les propriétés antioxydantes</u> .....	230
<b>5</b>	<b><u>Propriétés antibactériennes</u></b> .....	<b>231</b>
5.1	<u>Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G)</u> .....	231
5.1.1	<u>CMP vs <i>S.aureus</i></u> .....	231
5.1.2	<u>CMP-G<sub>0.05</sub> vs <i>S.aureus</i></u> .....	231
5.2	<u>Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G)</u> .....	235
5.2.1	<u>Alginate vs <i>S.aureus</i></u> .....	235
5.2.2	<u>Alg-G<sub>x</sub> vs <i>S.aureus</i></u> .....	236
5.3	<u>Conclusion sur les propriétés antibactériennes</u> .....	238
<b>6</b>	<b><u>Cytocompatibilité</u></b> .....	<b>238</b>
6.1	<u>Test Live/Dead : mise en évidence de la viabilité des cellules</u> .....	239
6.2	<u>Test Alamar Blue® : mise en évidence de l'activité métabolique des cellules</u> .....	240
<b>7</b>	<b><u>Conclusions générales</u></b> .....	<b>241</b>

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'il était possible de greffer un dérivé du gâïacol (l'aminogâïacol) sur un polysaccharide anionique (le CMP). Plusieurs taux d'incorporation ont été obtenus avec des degrés de substitution en aminogâïacol DS(Ga) allant de 0,15 à 0,6 environ. La caractérisation physico-chimique a montré une forte tendance à l'agrégation des dérivés greffés due à l'association hydrophobe des greffons aminogâïacol en solution aqueuse. Ces associations étaient plutôt de type intramoléculaire même à plus forte concentration en polymère greffé. Elles conduisaient à des comportements des dérivés CMP-G<sub>x</sub> de type polysavon avec des propriétés rhéologiques amoindries par rapport au CMP précurseur. Les propriétés antioxydantes, antibactériennes et l'absence de cytotoxicité de ces dérivés greffés ont été démontrées. Ainsi, nous avons en partie atteint nos objectifs de départ. Cependant le caractère de type polysavon limite i) le contrôle rhéologique (qui était un objectif de ce travail) et ii) probablement aussi la disponibilité des greffons et donc leur efficacité vis-à-vis notamment des propriétés antibactériennes.

Afin de proposer des alternatives visant à pallier ces limites, nous proposons 3 stratégies visant à réduire l'effet polysavon en jouant :

- 1) sur le taux d'incorporation des greffons et en particulier en diminuant le taux de greffage ;
- 2) sur la masse molaire de la chaîne de CMP et en particulier en diminuant cette masse molaire ;
- 3) sur la rigidité de la chaîne principale en particulier en choisissant un polysaccharide plus rigide que le pullulane et ses dérivés, nous avons choisi l'alginate. (Cette approche permettra en outre de généraliser cette approche de greffage à d'autres polysaccharides anioniques).

Dans ce chapitre, nous présenterons les synthèses, les caractérisations structurales et physico-chimiques déclinées pour chacune des stratégies envisagées. Puis nous évaluerons les propriétés antioxydantes et antibactériennes des nouveaux dérivés greffés. Enfin nous évaluerons la biocompatibilité de ces derniers par des tests de cytotoxicité.

## 1 Synthèses de nouveaux dérivés greffés

Dans la suite de ce travail, nous avons utilisé la même molécule active d'origine végétale, à savoir l'aminogâïacol pour les trois stratégies envisagées. Pour la première stratégie (diminuer le DS(Ga) des dérivés CMP-G<sub>x</sub>), le CMP présenté au chapitre C a été utilisé. Pour la deuxième (réduire la longueur de la chaîne), nous avons dégradé le CMP précurseur afin

d'obtenir des chaînes de polysaccharide plus courtes. Enfin, pour la troisième stratégie (utiliser un polysaccharide plus rigide), nous avons décidé de travailler avec l'alginate.

### 1.1 Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (polysaccharide CMP)

Pour rappel, le greffage de l'aminogalactose sur le CMP est effectué en milieu aqueux acide (à  $\text{pH} = 4,5$ ), en présence d'agent carbodiimide EDCI, à une température ambiante et sur une durée de synthèse de 24 h.

Le  $\text{DS}(\text{Ga})$  théorique visé est cette fois-ci égale à 0,15. Les proportions en réactifs utilisées sont regroupées dans le tableau D-1. Plusieurs synthèses ont été réalisées dans ces conditions de greffage et les rendements massiques obtenus sont proches avec une moyenne égale à 67 %. Nous avons également déterminé des rendements massiques de l'ordre de 60 % dans le cas des  $\text{DS}_{\text{théo}}(\text{Ga})$  visés et égaux à 0,25, 0,50 et 1 (présentés dans le chapitre C). Le dérivé greffé obtenu est soluble dans l'eau et coloré en brun.

**Tableau D-1 : Conditions de synthèse du CMP-G<sub>x</sub> avec un  $\text{DS}(\text{Ga})$  théorique fixé à 0,15**

$\text{DS}_{\text{théo}}(\text{Ga})^a$	EDCI/CMP <sup>b</sup>	Rendements massiques (%)	Solubilité dans l'eau
0,15	0,18	68	oui
		62	
		71	
		$67 \pm 5,0^c$	

<sup>a</sup> Ratio molaire  $\text{NH}_2\text{GA}/\text{CMP}$

<sup>b</sup> Ratio molaire EDCI/CMP

<sup>c</sup> Moyenne des rendements massiques présentés

### 1.2 Stratégie 2 : diminution de la masse molaire (polysaccharide CMP dégradé)

#### 1.2.1 Synthèse du <sup>d</sup>CMP

Le CMP a été dégradé au laboratoire à partir du CMP précurseur. Il existe différentes méthodes pour diminuer la longueur des chaînes et la masse molaire d'un polysaccharide telles que la dégradation enzymatique, les ultrasons ou encore l'hydrolyse acide. En s'inspirant des travaux réalisés par Julia Bréham lors de sa thèse<sup>1</sup>, nous avons choisi l'hydrolyse acide comme approche de dégradation du CMP. Dans cette étude J. Bréham a conduit cette hydrolyse sur du CMP à partir d'une solution à  $25 \text{ g.L}^{-1}$  acidifiée à  $\text{pH} = 2$  à

l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 4 M et chauffé à 80 °C. En premier lieu, elle a réalisé une étude cinétique de dégradation. Des prélèvements à intervalles réguliers ont été effectués et analysés par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière, un détecteur réfractométrique et un détecteur viscosimétrique (SEC/MALS/dRI/Visco) pour déterminer la masse molaire moyenne du CMP à différents temps d'études [0-180 h]. Par la suite J. Bréham a choisi de conduire la réaction d'hydrolyse du CMP sur une durée fixe (72 h). A la fin de la réaction, une dialyse (seuil de coupure des membranes de 3500 g.mol<sup>-1</sup>) a été réalisée afin d'éliminer les sels résiduels. Puis, les CMP dégradés ont été lyophilisés. Les caractéristiques des échantillons dégradés possédant différents degrés de substitution en fonction carboxylique DS(COOH) sont présentés dans le Tableau D-2 (extrait de la thèse de J. Bréham). Il apparaît ainsi qu'un CMP de DS 1 présente les caractéristiques suivantes :  $M_n$  de 14 000 g.mol<sup>-1</sup> (soit un  $DP_n$  proche de 60), une  $M_w$  de 20 000 g.mol<sup>-1</sup> et une dispersité ( $\mathcal{D}$ ) de 1,4. On remarque que les masses molaires obtenues sont faibles et les chaînes de polysaccharides sont de dispersité faible. De plus, suite à des analyses RMN<sup>13</sup>C sur des CMP avant et après hydrolyse, J. Bréham précise que la structure chimique du CMP n'est pas altérée.

Par ailleurs, afin de comparer les différentes méthodes de dégradation, J. Bréham a également montré que la dégradation par ultrasons menée sur un CMP greffé en C<sub>8</sub> (10%) conduit à un échantillon présentant des masses molaires de l'ordre de 45 000 g.mol<sup>-1</sup> (plus importante que dans le cas de l'hydrolyse acide). Par ailleurs, il faut noter que la technique de dégradation par voie enzymatique est facilement réalisable sur du pullulane à partir par exemple de l'enzyme pullulanase. J. Bréham l'a également effectuée. Les oligosaccharides obtenus possédaient cependant des dispersités élevées (> 5). Il faut noter que la voie enzymatique (avec la pullulanase) n'est pas applicable sur des dérivés du pullulane comme le CMP<sup>2</sup>. Ali *et al.*<sup>2</sup> ont montré que l'activité de cette enzyme décroît considérablement sur le CMP, et ce pour des CMP possédant des DS(COOH) élevés (voisin de 1).

**Tableau D-1 : Caractéristiques des CMPs obtenus après hydrolyse (Thèse J. Bréham)<sup>1</sup>.**

CMP	$M_n$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$M_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$\mathcal{D}$	$DP_n$
DS 0,2	7 500	9 400	1,3	42
DS 0,5	12 000	15 000	1,2	59
DS 1	14 000	20 000	1,4	58

Pour notre étude nous avons choisi de dégrader le CMP par hydrolyse acide. L'hydrolyse a

été réalisée en milieu acide (pH = 2) et à 80 °C. Le protocole est présenté en annexe D-1. Suite à l'analyse du CMP dégradé (noté <sup>d</sup>CMP) par couplage SEC/MALLS/DRI, nous avons obtenu les résultats suivants :  $M_n$  (<sup>d</sup>CMP) = 24 000 g.mol<sup>-1</sup>,  $\bar{D} = 1,2$  et  $DP_n = 100$ . La longueur des chaînes a bien été diminuée et pourrait conduire à des chaînes plus rigides que le CMP. Nous étudierons plus en détails la conformation du CMP dégradé dans la partie physico-chimique.

### 1.2.2 Synthèse des <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub>

Les mêmes conditions de réactions que lors de l'étude sur le CMP précurseur ont été utilisées pour greffer l'aminogaiacol cette fois-ci sur le <sup>d</sup>CMP. Des degrés de substitution DS<sub>théo</sub>(Ga) variés et égaux à 0,15 ; 0,50 et 1 ont été visés (tableau D-3). Le protocole de synthèse d'un dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub> reste similaire à celui d'un CMP-G<sub>x</sub>.

**Tableau D-3 : Conditions de synthèse de dérivés <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub> avec des DS(Ga) théoriques variables**

DS <sub>théo</sub> (Ga) <sup>a</sup>	EDCI/CMP <sup>b</sup>	Rendements massiques <sup>c</sup> (%)	Solubilité dans l'eau
0,15	0,18	66 ± 5,0	oui
0,50	0,60	60 ± 1,0	non
1	1,20	65 ± 1,0	non

<sup>a</sup> Ratio molaire NH<sub>2</sub>GA/CMP.

<sup>b</sup> Ratio molaire EDCI/CMP.

<sup>c</sup> Moyenne déterminée à l'aide de 2 synthèses différentes.

On constate que pour des DS<sub>théo</sub>(Ga) égaux à 0,50 et 1, les dérivés <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub> obtenus ne sont pas solubles dans l'eau. Ces résultats indiquent une différence importante avec les CMP non dégradés. Plusieurs hypothèses peuvent se présenter : soit les DS(Ga) vrais sont différents selon la masse molaire du CMP, soit les conditions de solubilité dépendent de la masse molaire, soit le greffage n'est plus considéré comme statistique en raison des trop faibles masses molaires. Le seul produit soluble est obtenu à partir du DS<sub>théo</sub>(Ga) = 0,15 et de couleur brun clair.

### 1.3 Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (polysaccharide Alginate)

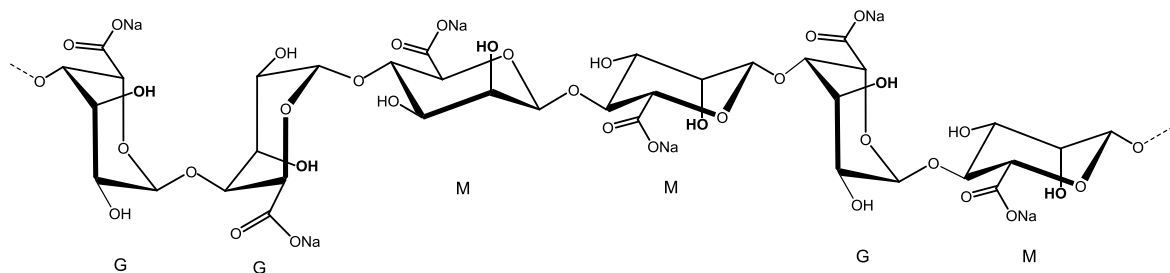
L'Alginate est un polysaccharide extrait principalement des algues brunes (ex : *Laminaria Digitata*) mais il peut également provenir de la biosynthèse de bactéries (ex : *Pseudomonas*

*aeruginosa*)<sup>3</sup>. Il peut se présenter sous formes d'alginate de sodium ou d'ammonium par exemple. Par la suite, nous avons travaillé avec un alginate de sodium. C'est une poudre légèrement jaunâtre et soluble dans l'eau.

D'un point de vue chimique, c'est un copolymère linéaire formé de deux unités monomères : le  $\beta$ -D-mannuronate de sodium (M) et le  $\alpha$ -L-gulonate de sodium (G) reliées entre elles par des liens  $\alpha(1,4)$  et  $\beta(1,4)$ . La masse molaire d'un motif de répétition est de  $198 \text{ g.mol}^{-1}$ .

L'arrangement entre ces unités peut s'effectuer de différentes manières : l'organisation consécutive de blocs M ou de blocs G ou l'alternance des deux motifs (MGMGMG)<sup>4</sup>. La proportion des unités M et G (rapport M/G) varie en fonction de la source d'extraction. Dans notre cas, l'alginate de sodium utilisé (de chez SKW Biosystems, France) possède un rapport M/G égal à 1,2 et a été extrait de l'espèce d'algues brunes *Laminaria Digitata*.

L'alginate est un polysaccharide anionique portant des fonctions carboxylate à pH neutre. Sous forme carboxylique, il devient insoluble dans l'eau pour des pH acides ( $\text{pH} < 4$  en général). La structure de ce polyélectrolyte est présentée sur le schéma D-1.



**Schéma D-1 :** Structure chimique de l'alginate de sodium

L'alginate est non toxique, biodégradable et biocompatible<sup>4</sup>. Il trouve des applications variées dans des domaines tels que l'alimentaire en tant qu'additif (E401) ou encore dans le biomédical<sup>4</sup> car il possède des propriétés physico-chimiques intéressantes. Il est notamment utilisé pour ses propriétés texturantes. En effet, il a la particularité de former des gels en présence de cations divalents, notamment avec le calcium<sup>4,5</sup>.

De plus, sa solubilité dans l'eau et la présence de fonctions actives telles que les fonctions carboxylate permettent d'utiliser la chimie mise en place sur le CMP. L'alginate a également été sélectionné en raison de ses propriétés d'agent texturant en solution aqueuse au vu de l'aspect rhéologique désiré. Il est plus visqueux en solution comparé au CMP. Les mesures de viscosités réalisées sur des solutions de ces deux polysaccharides à une concentration identique de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  nous conduisent à des valeurs de  $0,009 \text{ Pa.s}^{-1}$  (CMP) et à  $4 \text{ Pa.s}^{-1}$

(Alginate). C'est ce qui a motivé notre choix de l'alginate qui est considéré comme un polysaccharide semi-flexible, en tout cas plus rigide que le pullulane.

La rigidité d'une chaîne de polysaccharide peut être illustrée par sa longueur de persistance ( $q$ ). Elle est définie comme le segment de rigidité, c'est-à-dire la plus petite longueur d'une chaîne pouvant être considérée comme rigide. Dans le cas de l'alginate, la longueur ( $q$ ) d'une chaîne est en général comprise entre [14 - 16] nm et précisément égale à 15 nm à une force ionique de 0,17 M<sup>6,7</sup>. Cette rigidité s'explique par l'enchaînement en  $\beta$  des unités saccharidiques et aussi par la présence du caractère polyélectrolyte même si cette contribution de répulsions diminue fortement en présence de sel. Le pullulane, issu d'enchaînements de type  $\alpha$ , possède quant à lui des chaînes beaucoup plus flexibles avec une longueur de persistance  $q = 1,3$  nm<sup>6</sup>. Nous n'avons pas trouvé la valeur de la longueur de persistance des chaînes de CMP mais en dépit de la présence de charge, les liaisons  $\alpha$  permettent d'estimer sa longueur de persistance bien inférieure à celle de l'alginate.

Les conditions de réactions (solvant, température, temps) utilisées pour modifier le CMP ont été conservées pour les réactions de greffage de l'aminogaiacol sur l'alginate. Plusieurs degrés de substitution théoriques DS(Ga) ont été visés comme présenté ci-dessous (tableau D-4).

**Tableau D-4 : Conditions de synthèse des dérivés Alg-G<sub>x</sub> avec des DS(Ga) théoriques variables**

DS <sub>théo</sub> (Ga) <sup>a</sup>	EDCI/Alg <sup>b</sup>	Rendements massiques <sup>c</sup> (%)	Solubilité dans l'eau
0,15	0,18	82 ± 5,3	oui
0,25	0,30	85 ± 5,0	oui
0,50	0,60	78 ± 2,0	non
1	1,20	72 ± 3,0	non

<sup>a</sup> Ratio molaire NH<sub>2</sub>GA/Alg.

<sup>b</sup> Ratio molaire EDCI/Alg.

<sup>c</sup> Moyenne déterminée à l'aide de 2 synthèses différentes.

On remarque que pour des DS(Ga) théoriques égaux à 0,50 et 1, les dérivés Alg-G<sub>x</sub> obtenus ne sont pas solubles dans l'eau. Les produits solubles présentent une coloration brune qui augmente légèrement avec le DS(Ga).

Un exemple de protocole de synthèse est fourni en annexe D-2. Concernant la purification des produits synthétisés, nous avons en premier lieu réalisé un protocole de purification similaire à celui utilisé dans le cas des dérivés greffés obtenus avec le CMP : une dialyse contre de la soude 0,1 M (24 h) suivie d'une dialyse contre de l'eau. Cependant, ces étapes de dialyses se sont avérées drastiques dans le cas de l'alginate. En effet, une forte dégradation du polysaccharide alginate ( $DP_n$  divisé par 4) a été observée suite aux caractérisations par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco (résultats non abordés par la suite). Il est possible que les enchainements des sucres en  $\beta$  de l'alginate soient plus fragiles à l'hydrolyse alcaline que les enchainements en  $\alpha$  présents sur les dérivés du pullulane. En effet, Guarino *et al.*<sup>8</sup> expliquent la possible dégradation de l'alginate en milieu basique (pH >10) en raison d'une réaction de type  $\beta$ -élimination.

Par la suite, nous avons décidé de changer de méthode de purification comme décrit ci-dessous :

A la fin de la réaction, le produit obtenu est précipité puis lavé avec de l'éthanol. Après avoir été bien séché à l'air libre puis sous vide, le dérivé obtenu est mis en solution dans environ 250 mL d'eau milli-Q. La solution est ensuite dialysée (membrane de dialyse Spectra-Por 12-14 kD) en premier lieu contre de la soude NaOH 0,01 mol.L<sup>-1</sup> pendant 1 h puis contre de l'eau pendant deux jours avec des changements réguliers. Cette opération est répétée une fois. La dialyse est ensuite poursuivie contre de la soude NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pendant 1 h puis contre de l'eau jusqu'à atteindre une conductivité d'eau de dialyse faible, voisine de celle de l'eau milli-Q. Il faut noter que les passages dans la soude sont réalisés sur des temps courts afin de limiter le plus possible la dégradation de l'alginate. Une fois la purification terminée, les solutions sont congelées puis lyophilisées pendant une semaine.

Nous verrons par la suite que ces nouvelles étapes de purification conduisent néanmoins à une dégradation de l'alginate mais beaucoup moins importante. Par ailleurs, les rendements massiques obtenus et fournis dans le tableau D-4 sont plus élevés (de l'ordre de 80%) comparés à ceux déterminés dans le cas des dérivés CMP-G<sub>x</sub> (de l'ordre de 60%).

#### 1.4 Conclusion sur les synthèses chimiques

Les conditions des synthèses de tous les nouveaux dérivés sont similaires à celles utilisées dans le cas des dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Les rendements massiques sont voisins de 60-70% pour les



produits obtenus avec le CMP (haute masse molaire) et le CMP dégradé (<sup>d</sup>CMP). Dans le cas de l'alginate, ils sont de l'ordre de 80 %.

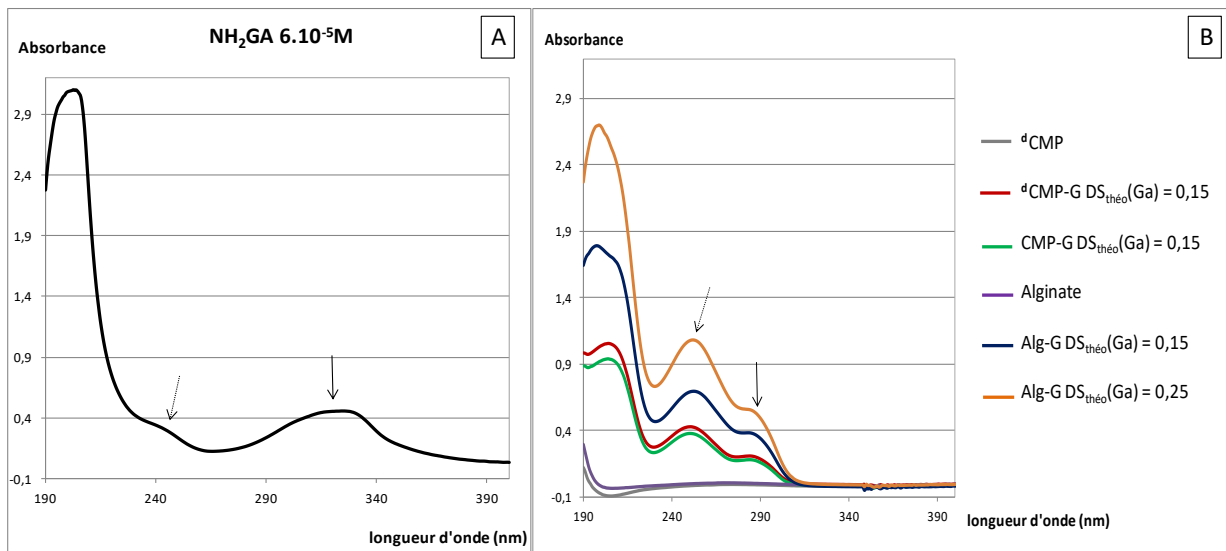
En comparaison avec les dérivés CMP-G<sub>x</sub> et pour des taux de greffage DS<sub>théo</sub>(Ga) similaires, les produits obtenus à partir du CMP dégradé ou de l'Alginate ne présentent pas les mêmes propriétés de solubilité dans l'eau. En effet, une limite de solubilité est observée pour des DS<sub>théo</sub>(Ga) de 0,50 et 1 pour le CMP dégradé alors que pour le CMP précurseur, les dérivés synthétisés à des DS<sub>théo</sub>(Ga) similaires étaient tous solubles dans l'eau. Les produits non hydrosolubles ne seront pas caractérisés par la suite.

## 2 Caractérisation du greffage

Tous les dérivés greffés décrits plus haut et solubles dans l'eau ont été caractérisés par spectroscopie UV-Visible, IR et RMN<sup>1</sup>H.

### 2.1 Spectroscopie UV- Visible

Les produits ont été dissous dans de l'eau milli-Q à une concentration fixée à 0,1 g.L<sup>-1</sup>. Les spectres UV obtenus sont présentés sur la Figure D-1.



**Figure D-1 :** Spectres UV : A) aminogaiacol dans un mélange de solvant eau/éthanol 6 % à  $6 \cdot 10^{-5}$  M ( $0,008 \text{ g.L}^{-1}$ ). B) le <sup>d</sup>CMP (gris) ; <sup>d</sup>CMP-G avec le DS(Ga) théorique = 0,15 (rouge), CMP-G avec le DS(Ga) théorique = 0,15 (vert), l'alginate (violet), les dérivés Alg-G avec les DS(Ga) théoriques égaux à 0,15 (bleu) et 0,25 (orange). Concentration échantillon :  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  dans l'eau.

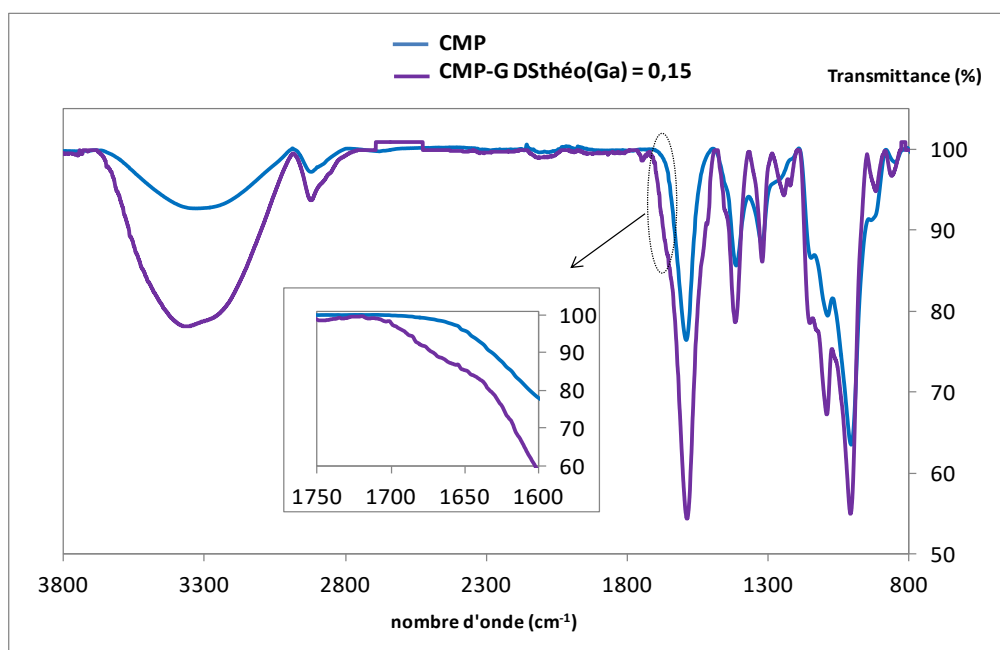
Dans un premier temps, on constate que les pics caractéristiques de l'aminogaiacol sont présents sur les spectres des nouveaux dérivés synthétisés CMP-G<sub>x</sub> avec un DS<sub>théo</sub>(Ga) égal à 0,15 et <sup>d</sup>CMP-G avec un DS<sub>théo</sub>(Ga) égal à 0,15.

Les spectres du <sup>d</sup>CMP et de l'alginate ne possèdent aucun pic sur le domaine de longueur d'onde d'étude. De manière qualitative, on remarque que les produits CMP-G<sub>x</sub> avec un DS<sub>théo</sub>(Ga) égal à 0,15 et <sup>d</sup>CMP-G avec un DS<sub>théo</sub>(Ga) égal à 0,15 semblent présenter une quantité similaire en aminogaiacol. Les degrés de substitution expérimentaux DS<sub>exp</sub>(Ga) seront par la suite déterminés de manière exacte par RMN-<sup>1</sup>H.

Les dérivés synthétisés Alg-G<sub>x</sub> avec des DS<sub>théo</sub>(Ga) égaux à 0,15 et 0,25 présentent sur leur spectre des pics caractéristiques de l'aminogaiacol. De plus, à concentration fixe (0,1 g.L<sup>-1</sup>), la quantité en aminogaiacol présente dans chacun des dérivés Alg-G<sub>x</sub> augmente avec le DS<sub>théo</sub>(Ga).

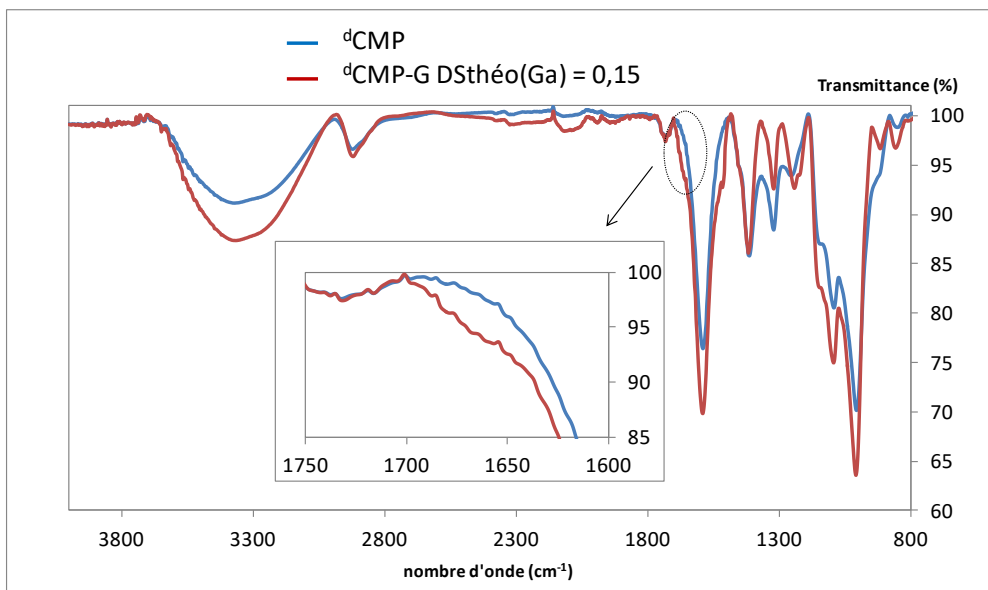
## 2.2 Spectroscopie IR

Des exemples de spectres IR des dérivés greffés solubles obtenus à partir du CMP dégradé (<sup>d</sup>CMP) et de l'alginate sont présentés sur les Figures D-2 et D-3 et D-4.

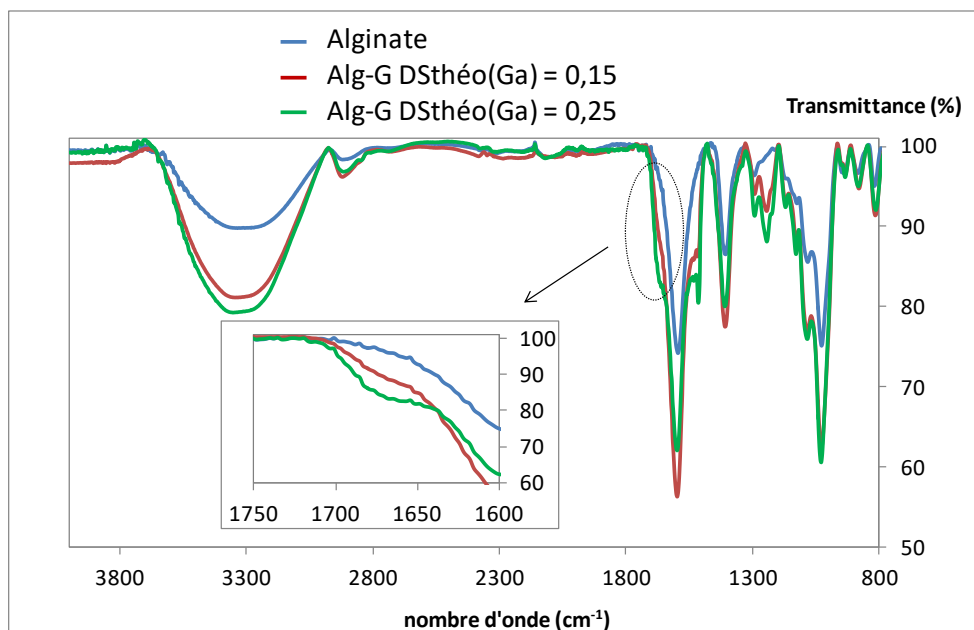


**Figure D-2** : Spectre IR du CMP (bleu) et du dérivé CMP-G avec le DS<sub>théo</sub>(Ga) = 0,15 (violet).

Comme à l'exemple de ses homologues plus greffés CMP-G<sub>x</sub> (chapitre C), le dérivé CMP-G avec le DS<sub>théo</sub>(Ga) = 0,15 présente un nouveau pic qui apparaît sous forme d'épaulement vers 1670 cm<sup>-1</sup>, caractéristique de la fonction amide créée.



**Figure D-3 :** Spectre IR du <sup>d</sup>CMP (bleu) et du dérivé <sup>d</sup>CMP-G avec le  $DS_{théo}(Ga) = 0,15$  (rouge).

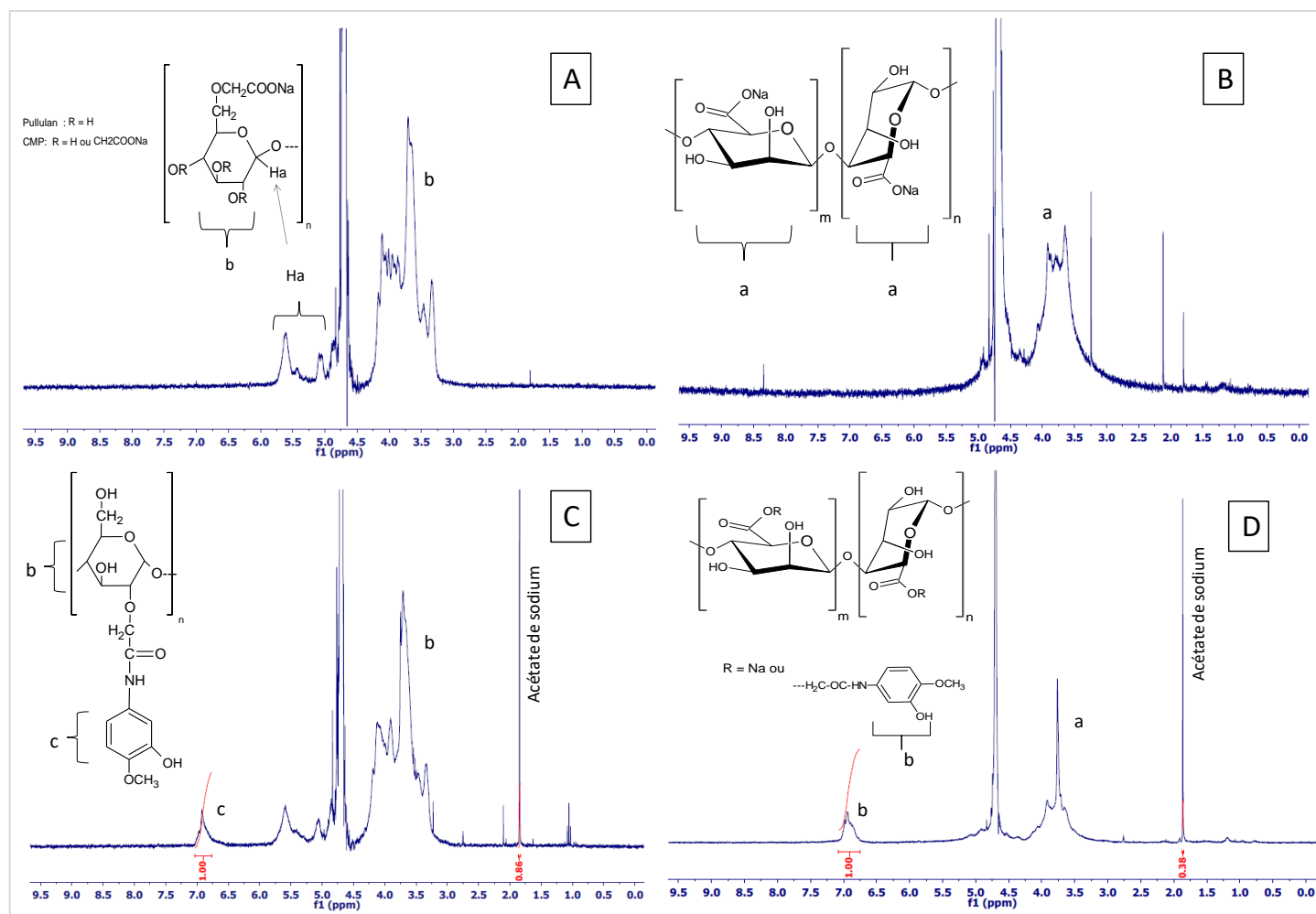


**Figure D-4 :** Spectre IR de l'Alginate (bleu) et des dérivés Alg-G avec le  $DS_{théo}(Ga) = 0,15$  (rouge), et  $DS_{théo}(Ga) = 0,25$  (vert).

En comparaison avec les spectres des précurseurs <sup>d</sup>CMP et alginate, les dérivés greffés présentent un nouveau pic qui apparaît sous forme d'épaulement à  $1670\text{ cm}^{-1}$ . Ce dernier est caractéristique de la fonction amide créée. De manière qualitative, on constate que l'intensité des épaulements augmente avec le  $DS(Ga)$ . La spectroscopie IR permet donc de confirmer les greffages en aminoglycol réalisés.

### 2.3 Spectroscopie RMN<sup>1</sup>H

La spectroscopie RMN<sup>1</sup>H a été utilisée pour la quantification des greffages effectués avec la même méthodologie que celle mise en place pour les dérivés CMP du chapitre C. Des exemples de spectres RMN<sup>1</sup>H du CMP dégradé (<sup>d</sup>CMP) et du dérivé <sup>d</sup>CMP-G avec le  $DS_{\text{théo}}(\text{Ga}) = 0,15$  obtenu ainsi que de l'alginate et un des dérivés greffés Alg-G sont présentés sur la Figure D-5.



**Figure D-5 :** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du CMP dégradé (A) ; de l'Alginate (B), du dérivé  $^d\text{CMP-G}$  avec le  $\text{DS}_{\text{théo}}(\text{Ga}) = 0,15$  (C) et du dérivé Alg-G avec le  $\text{DS}_{\text{théo}}(\text{Ga}) = 0,25$  (D). Solvant  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $C = 10 \text{ g.L}^{-1}$  en présence d'acétate de sodium ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Comme à l'exemple des dérivés CMP-G<sub>x</sub>, les spectres des produits Alg-G et <sup>d</sup>CMP-G présentent un nouveau pic entre [6,5 - 7] ppm sur leur spectre. Ce dernier est caractéristique de la présence de protons aromatiques de l'aminogaïacol greffé. Les DS(Ga) expérimentaux déterminés sont regroupés dans le tableau D-5.

**Tableau D-5 : DS(Ga) expérimentaux des dérivés CMP-G, <sup>d</sup>CMP-G, Alg-G calculés par RMN**

		Essais	DS(Ga) <sup>a</sup> théorique	DS(Ga) Expérimental (RMN)	Efficacité de <sup>b</sup> la réaction (%)
<b>Stratégie 1</b>	<b>CMP-G<sub>0,15</sub></b>	1	0,15	0,052	34,7
		2		0,046	30,7
		3		0,049	32,7
<b>Stratégie 2</b>	<sup>d</sup> CMP-G <sub>0,15</sub>	1	0,15	0,059	39,3
		2		0,054	36,0
	<sup>d</sup> CMP-G <sub>0,50</sub>	1	0,50	- *	-
	<sup>d</sup> CMP-G <sub>1</sub>	1	1	- *	-
<b>Stratégie 3</b>	<b>Alg-G<sub>0,15</sub></b>	1	0,15	0,059	39,3
		2		0,057	38,0
	<b>Alg-G<sub>0,25</sub></b>	1	0,25	0,10	40,0
	<b>Alg-G<sub>0,50</sub></b>	1	0,50	- *	-
	<b>Alg-G<sub>1</sub></b>	1	1	- *	-

<sup>a</sup> Ratio molaire NH<sub>2</sub>GA/CMP

<sup>b</sup> Ratio moyen DS(Ga) expérimental / DS(Ga) théorique

\* Produits insolubles dans l'eau.

On constate que les réactions de greffages effectuées sont reproductibles. Dans le cas du DS<sub>théo</sub>(Ga) fixé à 0,15, les efficacités de réactions sont de l'ordre de 30-40% quel que soit le polysaccharide employé. Pour un DS<sub>théo</sub>(Ga) fixé à 0,25, la réaction de greffage menée avec l'alginate semble moins efficace (efficacité égale à 40%) en comparaison avec celle menée avec le CMP de grande masse molaire (efficacité égale à 60%, voir chapitre C).

## 2.4 Conclusion sur la caractérisation du greffage

Les différentes caractérisations des dérivés greffés obtenus à partir du CMP précurseur, du CMP dégradé (<sup>d</sup>CMP) et de l'alginate illustrent le succès des réactions de greffage de l'aminogaiacol réalisées. D'une manière générale, les réactions sont reproductibles. L'efficacité des réactions est cependant plus faible (de l'ordre de 30-40%) comparée aux réactions effectuées avec des DS<sub>theo</sub>(Ga) plus grands (de l'ordre de 60%).

**Remarque :** Les dérivés solubles seront annotés CMP-G<sub>x</sub>, <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub> ou Alg-G<sub>x</sub> dans la suite du manuscrit, x correspondant au degré de substitution expérimental en aminogaiacol moyen (DS<sub>exp</sub>(Ga)) déterminé par RMN-<sup>1</sup>H. Plus précisément le dérivé correspondant au CMP précurseur greffé par 5% d'aminogaiacol et permettant d'explorer la stratégie 1 sera noté **CMP-G<sub>0.05</sub>**. Le dérivé issu du CMP de plus faible masse molaire et permettant d'explorer la stratégie 2 sera noté <sup>d</sup>**CMP-G<sub>0.06</sub>**. Enfin, les dérivés préparés à partir de l'alginate, le polysaccharide de rigidité plus importante (stratégie 3), seront notés **Alg-G<sub>0.06</sub>** et **Alg-G<sub>0.10</sub>**. Tous ces produits seront caractérisés en solution (études physico-chimiques) et leur propriétés antioxydantes, antibactériennes et de cytotoxicité seront étudiées.

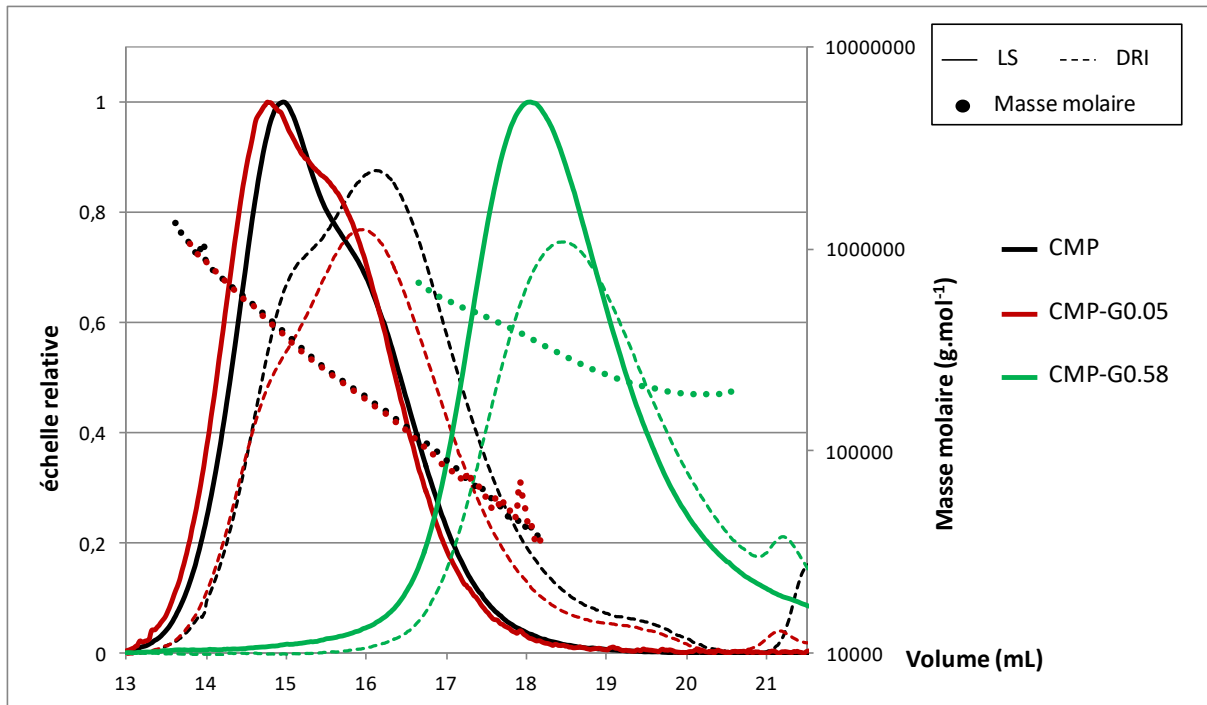
## 3 Etudes physico-chimiques

Dans cette partie, nous allons présenter les résultats obtenus suite aux différentes études physico-chimiques menées sur les nouveaux dérivés synthétisés : CMP-G<sub>0.05</sub>, <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> et Alg-G<sub>x</sub>.

### 3.1 Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G)

#### 3.1.1 Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco

Le chromatogramme obtenu dans le cas du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> est présenté sur la Figure D-6. Pour comparaison, nous avons ajouté les courbes du CMP précurseur et du CMP-G<sub>0.58</sub> (le plus greffé).



**Figure D-6** : Profils d'élutions du CMP (noir), du CMP-G<sub>0.05</sub> (rouge), du CMP-G<sub>0.58</sub> (vert) à 1 g.L<sup>-1</sup>, solvant PBS 0,15 M. Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes (DRI) : trait discontinu. Distribution des masses molaires (rond).

L'allure des courbes (DRI et LS) du CMP et du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> ainsi que les distributions des masses molaires sont quasiment similaires. De plus, ces deux échantillons sont élués dans la même zone, soit entre [13 - 18] mL. On note toutefois un léger décalage du signal LS vers les volumes élevés dans le cas du CMP-G<sub>0.05</sub>. Ceci pouvant traduire une très légère tendance à l'agrégation. En comparaison, l'échantillon CMP-G<sub>0.58</sub> décrit dans le chapitre précédent présentait, on le rappelle, une conformation très compacte traduite par un sensible décalage des chromatogrammes vers les forts volumes d'élution (i.e. les petits volumes hydrodynamiques), soit entre [15 - 21] mL.

Les grandeurs macromoléculaires intrinsèques au dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> sont présentées ci-dessous (tableau D-6). Pour une meilleure comparaison, nous avons également ajouté les résultats qui avaient été obtenus pour les autres dérivés CMP-G<sub>x</sub> (abordés dans le chapitre C).



**Tableau D-6 : Grandeurs macromoléculaires caractéristiques du polymère CMP et de tous les dérivés CMP-G<sub>x</sub> déterminés par SEC/MALLS/DRI/Visco à une concentration en échantillon de 1 g.L<sup>-1</sup> et dans un milieu PBS 0,15 M.**

	$M_n$ (g mol <sup>-1</sup> )	$M_w$ (g mol <sup>-1</sup> )	$M_o^a$ (g mol <sup>-1</sup> )	$DP_n$ apparent ( $M_n/M_o$ )	$R_{h(n)}$ (nm)	x pente $R_g$ vs $M^b$	a pente [ $\eta$ ] vs $M^c$	[ $\eta$ ] <sub>n</sub> (mL g <sup>-1</sup> )	Masse récupérée
CMP	143 000 (± 1,6 %)	229 000 (± 0,4 %)	239	598	12,6 (± 0,5 %)	0,69 (± 0,2%)	0,79 (± 0,1%)	100 (± 1,0 %)	96
<b>CMP-G<sub>0,05</sub></b>	<b>150 000</b> <b>(± 4,3 %)</b>	<b>241 000</b> <b>(± 1,2%)</b>	<b>244</b>	<b>615</b>	<b>12,3</b> <b>(± 1,0%)</b>	<b>0,70</b> <b>(± 0,6%)</b>	<b>0,76</b> <b>(± 0,1%)</b>	<b>90</b> <b>(± 0,9 %)</b>	<b>99</b>
CMP-G <sub>0,16</sub>	166 000 (± 1,6 %)	262 000 (± 0,6 %)	255	651	12,3 (± 0,5 %)	0,61 (± 0,3%)	0,75 (± 0,1%)	77 (± 1,1 %)	90
CMP-G <sub>0,37</sub>	181 000 (± 1,4 %)	294 000 (± 0,6 %)	276	656	10,9 (± 0,6 %)	0,57 (± 0,5%)	0,74 (± 0,2%)	52 (± 1,3 %)	92
CMP-G <sub>0,58</sub>	279 000 (± 2,1 %)	307 000 (± 1,7 %)	297	939	8,9 (± 1,9 %)	0,49 (± 4,5 %)	0,75 (± 1,1%)	16 (± 5,2 %)	75

<sup>a</sup>:  $M_o$  est la masse molaire de l'unité de répétition déterminée par le calcul :  $162 + 80DS_{COONa} + 99,15 DS(Ga)$ .

<sup>b</sup>: pente de la courbe  $R_g$  vs  $M$  déterminée pour des valeurs de  $R_g$  (supérieures à 10 nm).

<sup>c</sup>: pente de la courbe [ $\eta$ ] vs  $M$ ; coefficient de Mark Houwink

En comparaison avec les données du CMP, on constate d'une part une très légère augmentation des masses molaires moyennes  $M_n$  et  $M_w$  du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> ainsi que du  $DP_n$  apparent. D'autre part, le rayon  $R_h$  et la viscosité [ $\eta$ ] du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> diminuent très légèrement. Ces évolutions montrent qu'il existe quelques interactions intra et intermoléculaires entre greffons hydrophobes même à très faible taux de greffage ( $DS(Ga) = 0,05$ ). Cependant, le caractère associatif du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> est beaucoup moins marqué devant celui des dérivés CMP-G<sub>x</sub> présentant des  $DS(Ga)$  plus importants.

On rappelle que les rayons  $R_g$  des dérivés CMP-G<sub>x</sub> n'étaient pas accessibles par la technique de diffusion de lumière sur l'ensemble du domaine des courbes d'éluion. La représentation  $R_g = f(M)$  en échelle bi-logarithmique dans le cas du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> et pour des valeurs de  $R_g$  supérieures à 10 nm est fournie en annexe D-3. La conformation du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> est décrite au travers des paramètres 'x' équivalent à la pente des représentations bilogarithmiques ( $R_g = f(M)$ ) et 'a' équivalent à la pente des représentations de Mark-Houwink ( $[\eta] = f(M)$ ). On remarque que le dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> adopte une conformation quasiment similaire à celle du CMP (valeurs de 'x' et 'a' du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> sont

sensiblement égales à celles du CMP). Précisément, une conformation de type pelote statistique flexible (avec  $x \sim 0.7$ ) et en bon solvant ( $'a'$  autour de 0.8).

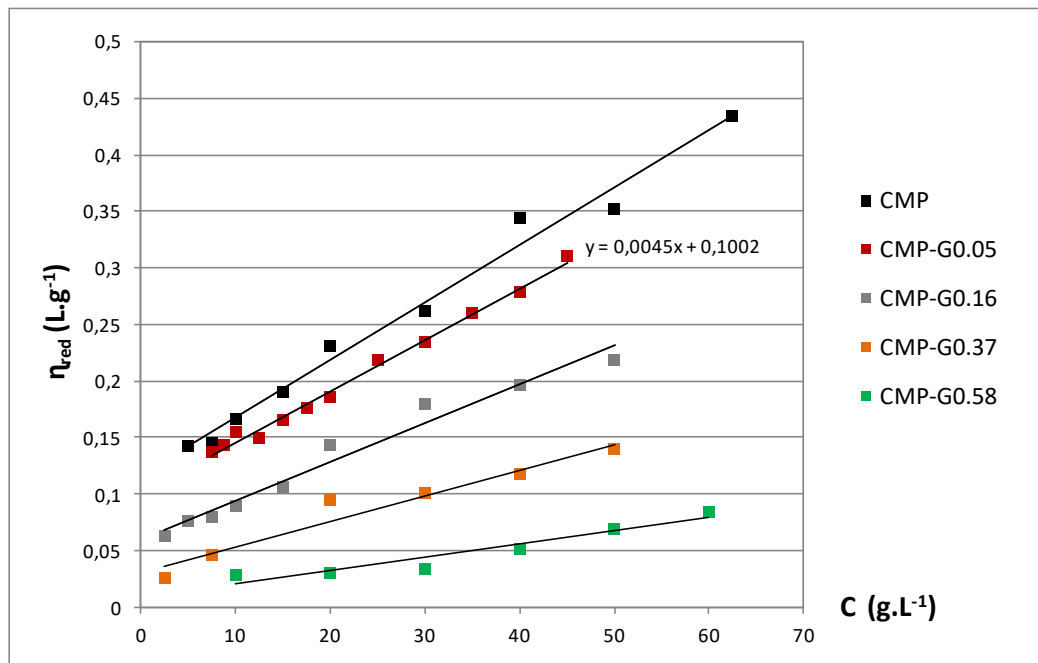
La diminution du degré de substitution en aminogaiacol greffé sur le CMP a donc permis d'obtenir un dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> très peu ou pas associatif en milieu salin dilué.

### 3.1.2 Etude viscosimétrique

Les mesures de viscosités des solutions du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> ont été réalisées dans les mêmes conditions que le CMP et tous les autres dérivés CMP-G<sub>x</sub> (milieu PBS 0,15 M et à un cisaillement fixé 1 s<sup>-1</sup> à 25°C) dans le régime newtonien.

#### Détermination de la viscosité intrinsèque et de la concentration critique C<sub>cr</sub> du CMP-G<sub>0,05</sub>

La Figure D-7 illustre les représentations de Huggins  $\eta_{red} = f(C)$  obtenues pour le dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> ainsi que pour le CMP et tous les autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>.



**Figure D-7** : Représentation de la viscosité réduite  $\eta_{red}$  en fonction de la concentration en polymères pour le CMP-G<sub>0,05</sub> (rouge), le CMP précurseur et tous les dérivés CMP-G<sub>x</sub> dans le solvant PBS 0,15 M à 25°C et à un cisaillement fixé à 1 s<sup>-1</sup>.

La droite obtenue pour le dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> suit une évolution logique comparée aux comportements du CMP et des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Les valeurs de la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  et du coefficient de Huggins ( $K_H$ ) du CMP-G<sub>0,05</sub> déterminées à partir de l'équation

correspondante sont présentées dans le tableau D-7. Ce tableau indique également les valeurs des viscosités intrinsèques  $[\eta]_n$  déterminées par SEC/MALLS/DRI/Visco.

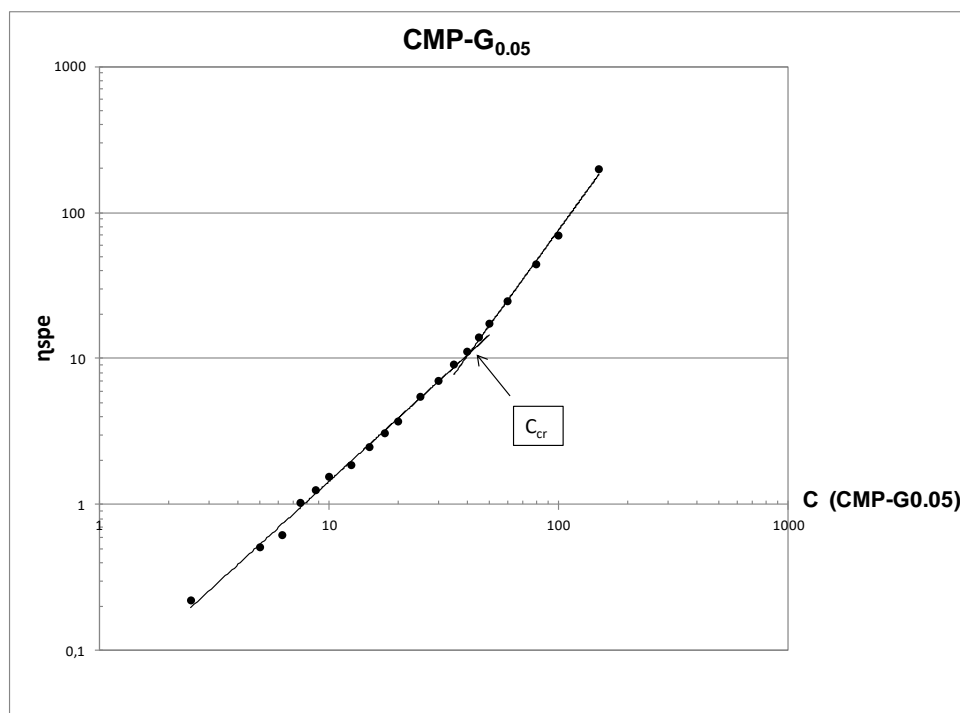
**Tableau D-7 : Viscosité  $[\eta]$  et coefficient de Huggins ( $K_H$ ) du CMP-G<sub>0.05</sub>**

	CMP	CMP-G <sub>0.05</sub>	CMP-G <sub>0.16</sub>	CMP-G <sub>0.37</sub>	CMP-G <sub>0.58</sub>
$[\eta]$ mL.g <sup>-1</sup>	116	<b>100</b>	60	31	8
$K_H$	0,4	<b>0,44</b>	1	2,4	18
$[\eta]_n$ mL.g <sup>-1 a</sup>	100	<b>90</b>	77	52	16

<sup>a</sup> Viscosité intrinsèque déterminée par SEC/MALLS/DRI/Visco

Le CMP-G<sub>0.05</sub> présente une valeur de viscosité  $[\eta]$  à faible cisaillement égale à 100 mL.g<sup>-1</sup> et légèrement plus faible que celle du CMP. D'une manière générale, plus le DS(Ga) augmente, plus les valeurs de viscosités intrinsèques ( $[\eta]$ ) diminuent. La même évolution des viscosités intrinsèques  $[\eta]_n$  déterminées par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco est observée et confirme bien une diminution de la taille des pelotes statistiques avec l'augmentation du DS(Ga). La constante d'Huggins du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> ( $K_H = 0,44$ ) est quasi similaire à celle du CMP et montre que le produit greffé est dans un bon état de solvation. Ces résultats confirment bien la très faible tendance à l'agrégation du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub>. Le CMP-G<sub>0.05</sub> présente donc comme souhaité, un faible pouvoir associatif.

La représentation bilogarithmique de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en polymère ( $\eta_{spe} = f(C)$ ) obtenue pour le produit CMP-G<sub>0.05</sub> est donnée sur la Figure D-8. La concentration critique de recouvrement  $C_{cr}$  du CMP-G<sub>0.05</sub> a été déterminée à 40 g.L<sup>-1</sup>. Rappelons que les  $C_{cr}$  du CMP, du CMP-G<sub>0.16</sub> et du CMP-G<sub>0.37</sub> sont respectivement égales à 42, 55 et 67 g.L<sup>-1</sup>. La concentration  $C_{cr}$  du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> est sensiblement égale à celle du CMP et bien inférieure aux  $C_{cr}$  des dérivés les plus greffés. Ces évolutions sont en accord avec le faible caractère associatif du dérivé faiblement greffé.

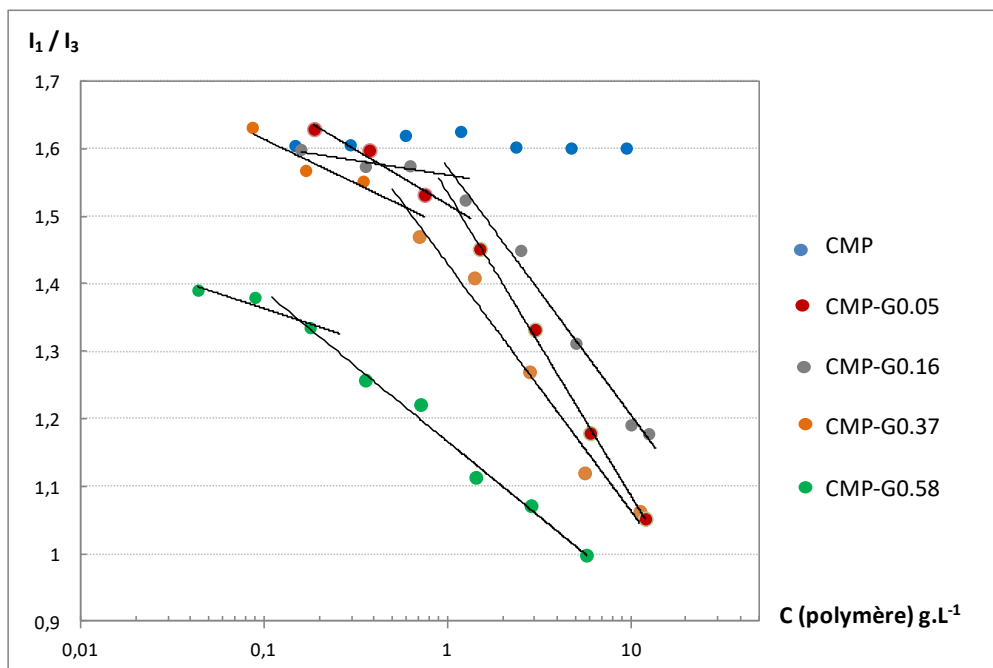


**Figure D-8 :** Représentation de Utracki and Simha. Viscosité spécifique  $\eta_{spe}$  en fonction de la concentration (en  $\text{g.L}^{-1}$ ) en polymère CMP-G<sub>0.05</sub> dans le solvant PBS 0,15 M à 25°C.

### 3.1.3 Fluorescence

Le comportement légèrement associatif du produit CMP-G<sub>0.05</sub> a également été mis en avant par fluorescence. Des solutions de ce dérivé ont été préparées entre  $[0,09-12] \text{ g.L}^{-1}$  dans du NaCl 0,15 M, en présence de pyrène ( $4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ).

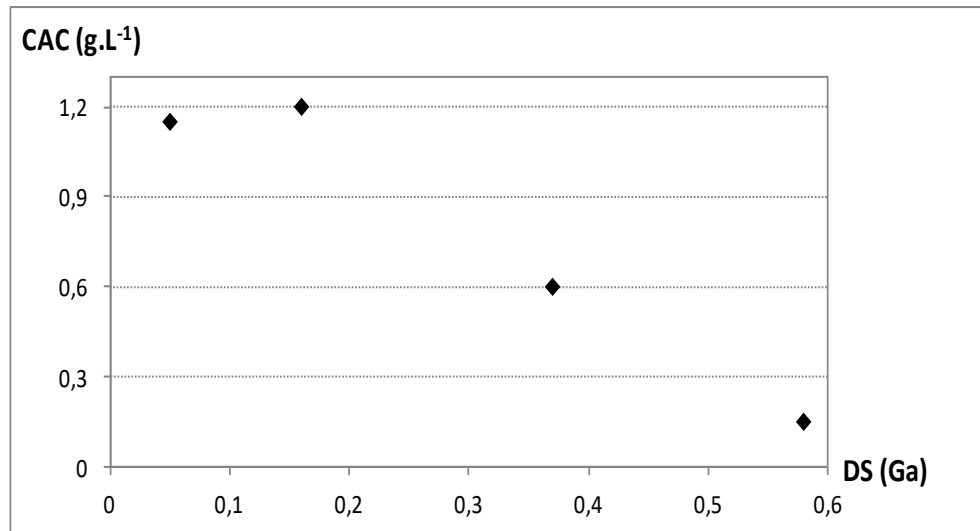
L'évolution des rapports d'intensité  $I_1/I_3$  du pyrène en fonction de la concentration du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> ainsi que du CMP et des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub> sont présentés sur la Figure D-9. La concentration d'agrégation critique (CAC) du CMP-G<sub>0.05</sub> déterminée est égale à  $1,15 \text{ g.L}^{-1}$ .



**Figure D-9 :** Rapport  $I_1/I_3$  de l'intensité des bandes du spectre d'émission du pyrène ( $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ ) en fonction de la concentration en polymère pour le CMP (bleu), le CMP-G<sub>0.05</sub> (rouge) et tous les autres dérivés CMP -G<sub>x</sub>. Mesures à 25°C dans NaCl 0,15 M.

Comme à l'exemple des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub> étudiés, on remarque que le rapport d'intensité  $I_1/I_3$  du pyrène diminue progressivement lorsque la concentration  $C(\text{CMP-G}_{0.05})$  augmente. Plus précisément, on passe d'une valeur voisine de 1,6 à une valeur finale voisine de 1,1. Cette évolution traduit bien le passage du pyrène d'un environnement polaire vers un environnement apolaire. Malgré son faible pouvoir associatif observé au niveau macroscopique, le dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> est donc capable de présenter la formation de zones hydrophobes au niveau moléculaire microscopique.

L'évolution générale des CAC de tous les dérivés CMP-G<sub>x</sub> (DS(Ga) = 0,05 ; 0,16 ; 0,37 et 0,58) est représentée sur la Figure D-10. Rappelons qu'il a été démontré dans le chapitre C que le CMP ne présente pas de caractère associatif (pas de CAC).



**Figure D-10 :** Evolution de la concentration d'agrégation critique CAC en fonction du DS(Ga) des dérivés CMP-G<sub>x</sub> dans NaCl 0,15M

On observe deux tendances :

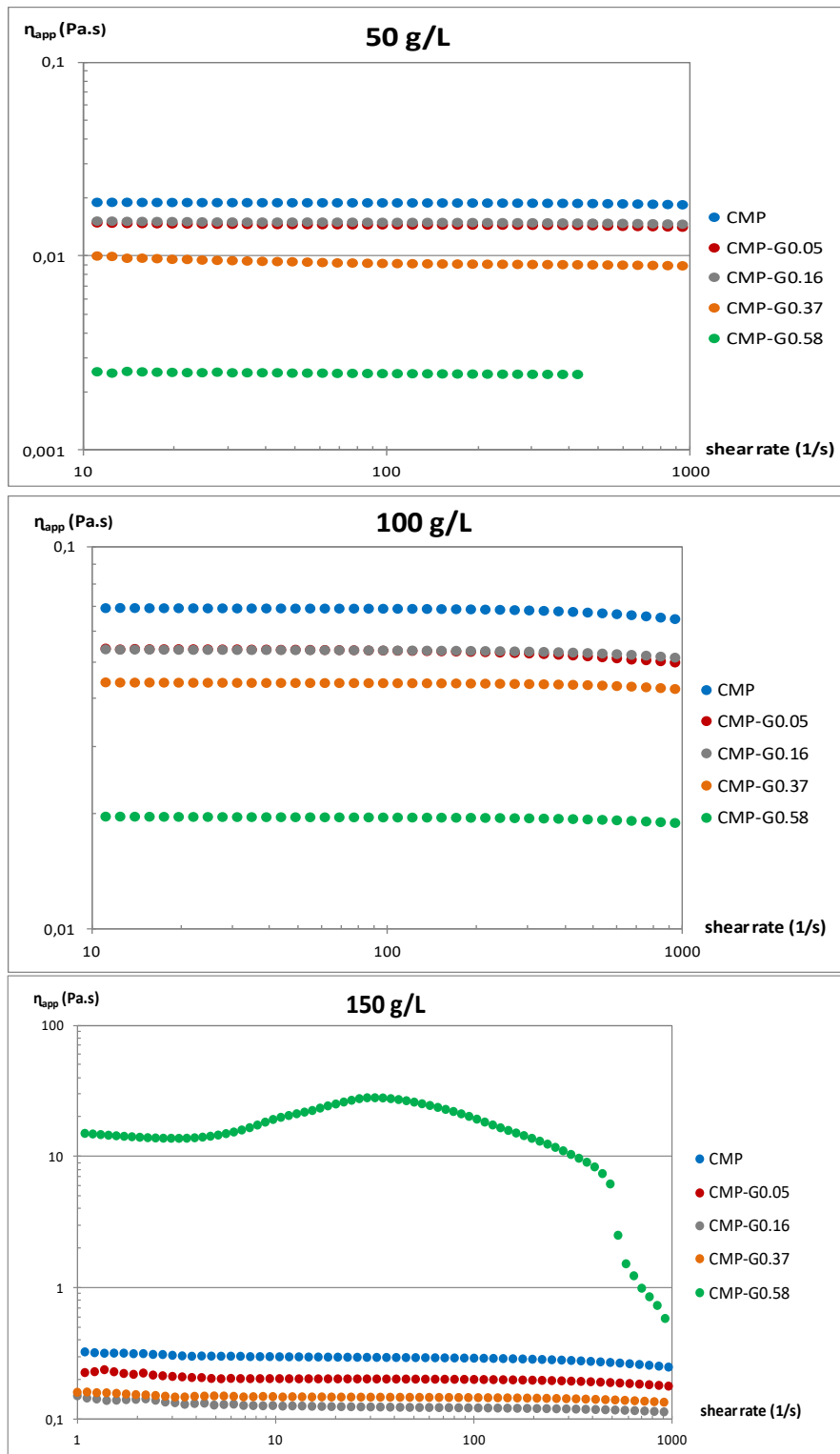
(1) aux faibles valeurs de DS(Ga), on remarque un plateau. La CAC est alors indépendante du DS(Ga). Le dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> possède une CAC égale à 1,15 g.L<sup>-1</sup>. Elle est sensiblement égale à celle du CMP-G<sub>0,16</sub> (1,2 g.L<sup>-1</sup>), malgré le taux DS(Ga) différent. On pourrait donc penser que l'établissement de clusters hydrophobes ne nécessite pas l'implication d'un nombre trop important de greffons aminoglycol.

(2) Pour des valeurs de DS(Ga) > 0,16, il y a diminution de la CAC lorsque le DS(Ga) augmente. On constate que cette baisse est établie de manière quasi-linéaire ( $y = -2,5x + 1,575$  avec  $R^2 = 0,993$ ). Cette méthode permet ainsi de prévoir une CAC en fonction du DS(Ga) d'un dérivé CMP-G<sub>x</sub>. Il faut aussi noter que les mesures de SEC/MALLS/DRI/Visco ont été effectuées à 1 g.L<sup>-1</sup> pour tous les dérivés CMP-G<sub>x</sub>. A cette concentration, la CAC est atteinte seulement pour les deux dérivés les plus greffés, d'où les fortes diminutions des rayons hydrodynamiques et des coefficients 'x' des droites R<sub>g</sub> vs M. Le caractère associatif du dérivé faiblement greffé (CMP-G<sub>0,05</sub>) est ainsi très faible en régime très dilué (i.e.  $C < C_{cr}$ ) mais apparaît toutefois quand on concentre la solution.

### 3.1.4 Mesures rhéologiques : Etude en écoulement

Les mesures rhéologiques en mode écoulement ont été effectuées sur des solutions du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> dans les mêmes conditions que le CMP et les autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>, notamment

à 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup>. Les courbes obtenues pour le CMP-G<sub>0.05</sub> sont présentées sur la Figure D-11 et accompagnées des courbes du CMP et des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub> pour comparaison.



**Figure D-11 :** Viscosité apparente de la solution de CMP-G<sub>0.05</sub> (rouge) à 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup>, CMP (bleu) et des dérivés CMP-G<sub>0.16</sub> (gris), CMP-G<sub>0.37</sub> (orange), CMP-G<sub>0.58</sub> (vert).

Le CMP-G<sub>0.05</sub> présente un caractère newtonien à 50, 100 et 150 g.L<sup>-1</sup> et ce sur l'ensemble du domaine d'étude. De plus, quelle que soit la concentration d'étude, la viscosité du CMP-G<sub>0.05</sub> est légèrement inférieure à celle du CMP. En régime concentré, le CMP-G<sub>0.05</sub> présente encore des associations intramoléculaires qui diminuent légèrement ses propriétés rhéologiques comparées au précurseur CMP. D'un point de vue rhéologique la stratégie 1 (de diminution du taux de greffage DS(Ga)) ne conduit donc pas aux objectifs recherchés.

### 3.1.5 Conclusion sur les propriétés physico-chimiques

Le greffage de l'aminogaiacol à faible taux (DS(Ga) = 5 %) conduit à l'obtention d'un dérivé présentant un comportement faiblement associatif en milieu salin dilué et semi-dilué. Le comportement de CMP-G<sub>0.05</sub> au regard de son taux de greffage, s'insère logiquement dans les tendances observées avec les autres dérivés présentés dans le chapitre C. Ainsi, le caractère associatif augmente bien lorsque le DS(Ga) augmente (exemple avec la diminution des tailles ( $R_h$ ) et de viscosités intrinsèques suivant le DS(Ga)). La fluorescence indique bien la présence du caractère associatif du CMP-G<sub>0.05</sub> avec une CAC globalement plus importante que pour les dérivés plus greffés. Finalement en régime plus concentré, la rhéologie confirme le caractère associatif favorisé par des interactions intramoléculaires entre greffons aminogaiacol. L'amélioration de la rhéologie n'est donc pas atteinte avec cette stratégie 1 (de diminution du taux de greffage DS(Ga)). La viscosité du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> est proche de celle du précurseur.

Nous allons par la suite étudier le comportement du dérivé synthétisé à partir du CMP dégradé, soit le <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> en solution saline et en milieu dilué.

## 3.2 Stratégie 2 : diminution de la masse molaire (<sup>d</sup>CMP et <sup>d</sup>CMP-G)

### 3.2.1 Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco

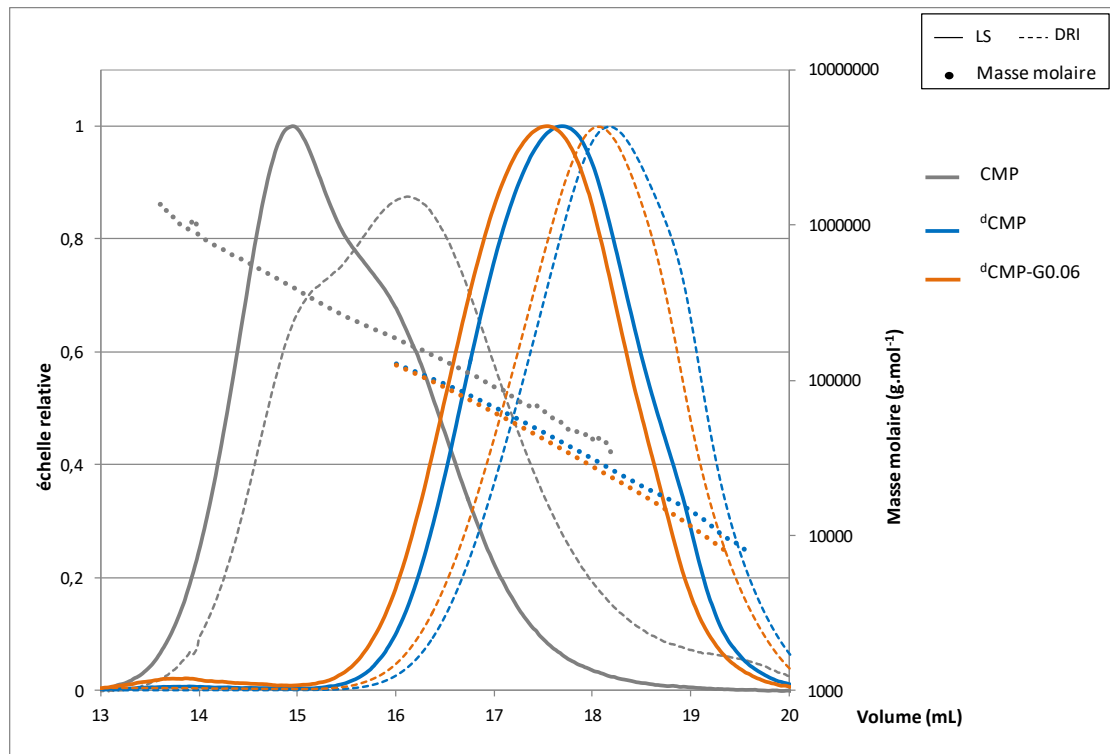
Rappelons que dans le cas de la stratégie 2, nous avons choisi de réaliser une dégradation du CMP afin d'obtenir un CMP dégradé (<sup>d</sup>CMP) présentant des masses molaires réduites et donc des longueurs de chaînes plus courtes en comparaison avec le CMP précurseur (haute masse molaire). Il faut noter que la diminution des masses molaires pourrait s'accompagner d'une éventuelle rigidification de la conformation du CMP. Ainsi, afin d'évaluer les éventuels effets de la dégradation sur la conformation du <sup>d</sup>CMP et/ou du greffage sur la conformation du dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>, nous allons réaliser par la suite des études conformationnelles. Pour ce faire, à partir des diverses informations accessibles par les analyses en SEC/MALLS/DRI/Visco, nous allons réaliser des analyses détaillées et comparatives sur les



échantillons CMP (haute masse molaire), CMP dégradé ( $^d\text{CMP}$ ) et le dérivé greffé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$ .

- ❖ Analyses des distributions des masses molaires du CMP, du  $^d\text{CMP}$  et du dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$ .

Les chromatogrammes du CMP dégradé ( $^d\text{CMP}$ ) et du dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  sont présentés sur la Figure D-12. Les résultats qui en découlent sont regroupés plus loin dans le tableau D-8.



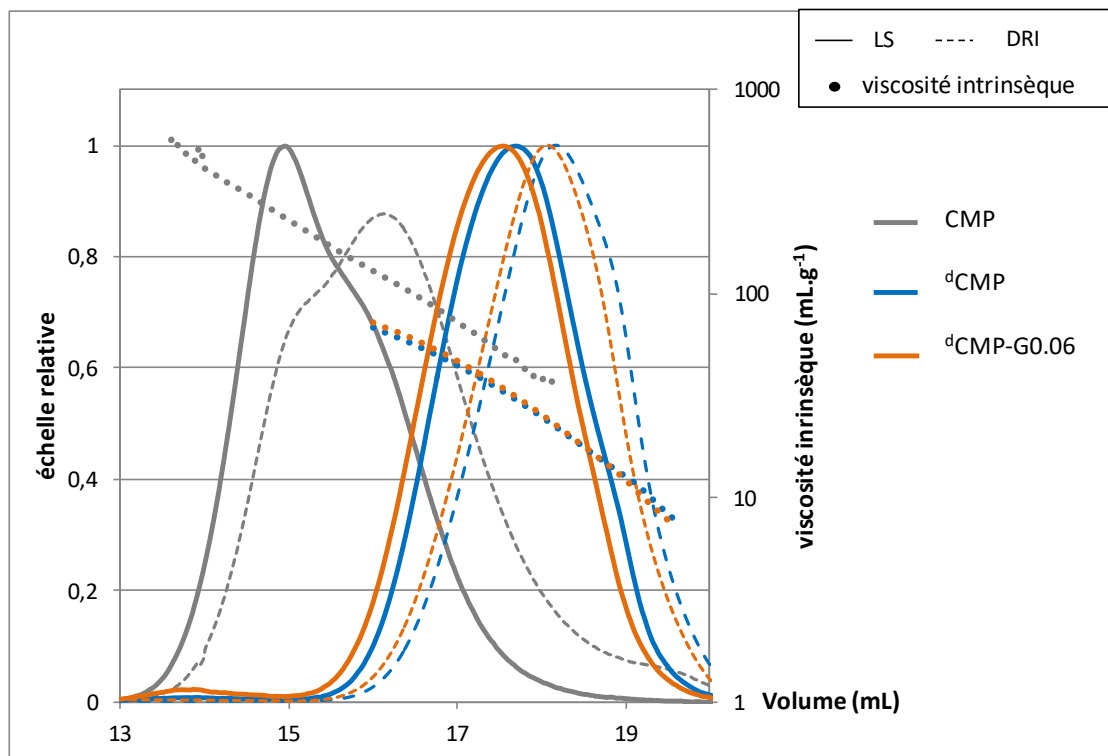
**Figure D-12 :** Profils d'élutions du CMP (gris) à  $C = 1 \text{ g.L}^{-1}$ , du  $^d\text{CMP}$  (bleu) et du  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  (orange) à  $C = 15 \text{ g.L}^{-1}$ . Solvant PBS 0,15 M. Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes (DRI) : trait discontinu. Distribution des masses molaires (rond).

Dans un premier temps, en s'intéressant au CMP et au  $^d\text{CMP}$ , on remarque que les chromatogrammes (DRI et LS) du  $^d\text{CMP}$  (Figure D-12) sortent vers les forts volumes d'élution en comparaison avec le CMP. Cela illustre des volumes hydrodynamiques (tailles) du  $^d\text{CMP}$  plus petits comparés au CMP. On remarque également que quel que soit le volume d'élution, les masses molaires du CMP sont bien supérieures à celles du  $^d\text{CMP}$ . Ces observations sont confirmées par les valeurs des masses molaires moyennes  $M_n$  et  $M_w$  et des  $\text{DP}_n$ , regroupées dans le tableau D-8. En effet, on observe une diminution des masses molaires  $M_n$  et  $M_w$  et également des valeurs de  $\text{DP}_n$  dans le cas du  $^d\text{CMP}$ . Plus précisément, le  $\text{DP}_n$

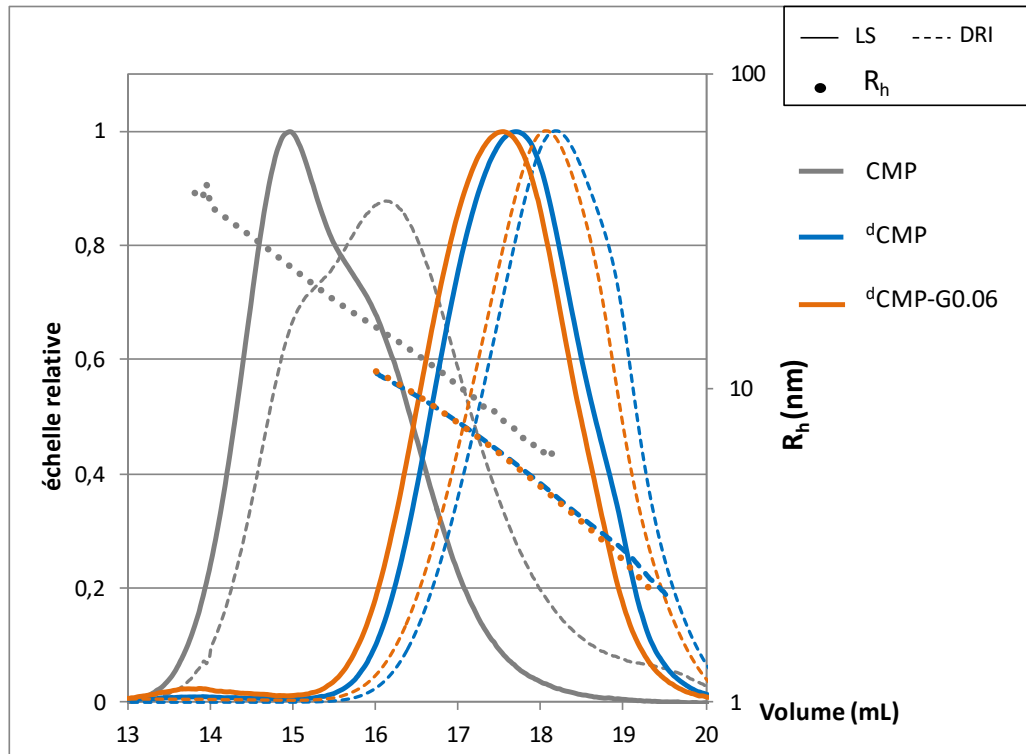
(~longueur des chaînes) du CMP est environ 6 fois plus important que celui du  $^d\text{CMP}$ . Cela illustre des chaînes du  $^d\text{CMP}$  plus courtes. Toutes ces évolutions confirment qu'il y a bien eu dégradation du CMP.

Dans un second temps, concernant le  $^d\text{CMP}$  et le dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$ , on remarque que ces deux produits présentent des allures de courbes (DRI et LS) ainsi que des distributions de masses molaires assez similaires. On remarque toutefois un léger décalage des chromatogrammes du dérivé greffé vers les plus faibles volumes d'éluion donc vers des volumes hydrodynamiques légèrement supérieurs. Ceci pourrait se traduire par une très légère tendance à l'agrégation.

- ❖ Analyses des distributions des viscosités intrinsèques  $[\eta]$  et des rayons hydrodynamiques ( $R_h$ ) du CMP, du  $^d\text{CMP}$  et du dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  (Figures D-13 et D-14).



**Figure D-13 :** Profils d'éluions du CMP (gris) à  $C = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , du  $^d\text{CMP}$  (bleu) et du  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  (orange) à  $C = 15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Solvant PBS 0,15 M. Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes (DRI) : trait discontinu. Distribution des viscosités intrinsèques  $[\eta]$  (rond).



**Figure D-14 :** Profils d'éluions du CMP (gris) à  $C = 1 \text{ g.L}^{-1}$ , du  ${}^d\text{CMP}$  (bleu) et du  ${}^d\text{CMP-G}_{0.06}$  (orange) à  $C = 15 \text{ g.L}^{-1}$ . Solvant PBS 0,15 M. Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes (DRI) : trait discontinu. Distribution des rayons hydrodynamiques  $R_h$  (rond).

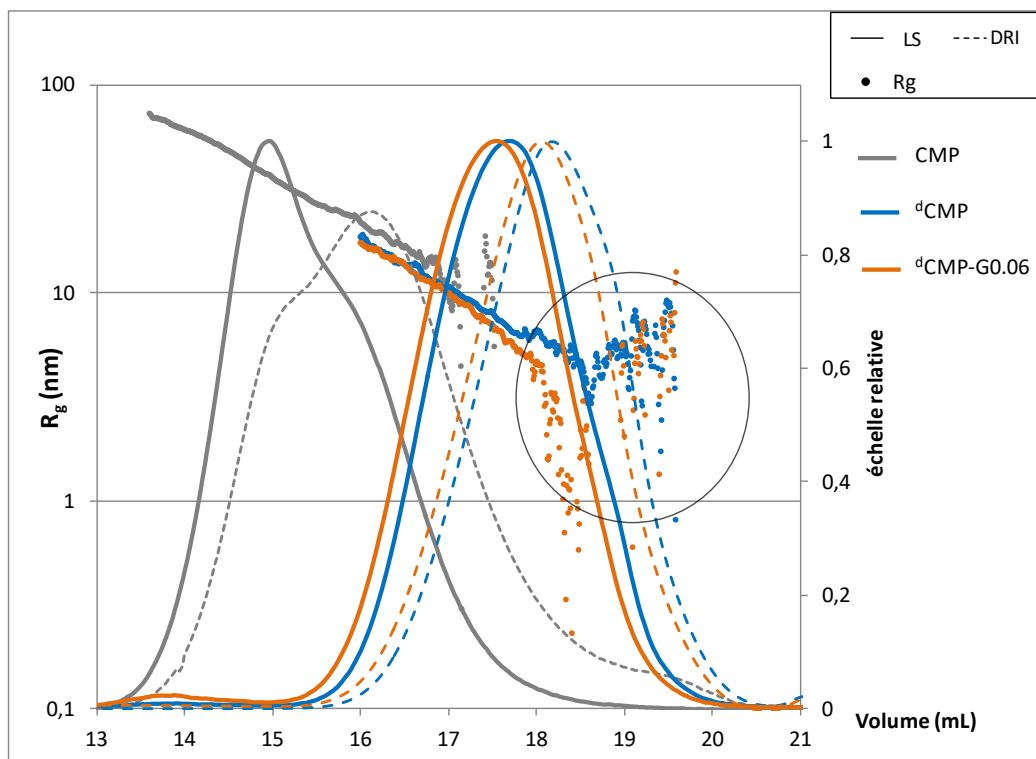
Les analyses du CMP (haute masse molaire) et du  ${}^d\text{CMP}$  (faible masse molaire) ont été réalisées sur une même colonne (adaptée aux polymères de fortes masses molaires). Afin d'avoir une bonne séparation des chaînes du  ${}^d\text{CMP}$  et des allures de signaux (LS et DRI) bien définis, le  ${}^d\text{CMP}$  a été préparé à une concentration plus importante que le CMP soit  $15 \text{ g.L}^{-1}$ . Le  ${}^d\text{CMP}$  présente bien des  $[\eta]$  et des  $R_h$  plus faibles que le précurseur CMP et ce sur tout le domaine d'éluion (Figure D-13 et D-14). Les valeurs moyennes des  $[\eta]$  et des  $R_h$  du CMP et du  ${}^d\text{CMP}$  sont regroupées dans le tableau D-8 et confirment ces observations. Notamment, le  ${}^d\text{CMP}$  possède une valeur moyenne  $R_h$  (~3 fois plus petite) et une viscosité  $[\eta]$  (~5 fois plus faible) du  ${}^d\text{CMP}$  comparée au CMP.

Dans le cas du  ${}^d\text{CMP}$  et du dérivé  ${}^d\text{CMP-G}_{0.06}$ , peu de différences sont observées au niveau des distributions de  $[\eta]$  et de  $R_h$ . Cela montre que la présence des greffons aminoglycol en faible proportions (6%) semble peu (voire pas) affecter la conformation du polysaccharide. Ces résultats sont confirmés par les valeurs moyennes de  $R_h$  présentées dans le tableau D-8.

Par ailleurs, la nature de la conformation (pelote, bâtonnet rigide, sphère dure) adoptée par un polymère en solution et/ou l'état de solvation du polymère peut être illustré au travers des valeurs des pentes caractéristiques 'x' de la représentation bi-logarithmique ( $R_g = f(M)$ ) ou encore du coefficient de Mark-Houwink, soit 'a' de la représentation ( $[\eta] = f(M)$ ). Nous allons par suite nous intéresser à ces coefficients pour avoir plus d'informations sur le type de conformation adopté par les produits CMP,  ${}^d\text{CMP}$  et le dérivé  ${}^d\text{CMP-G}_{0,06}$ .

Nous allons en premier lieu regarder les distributions des rayons  $R_g$ .

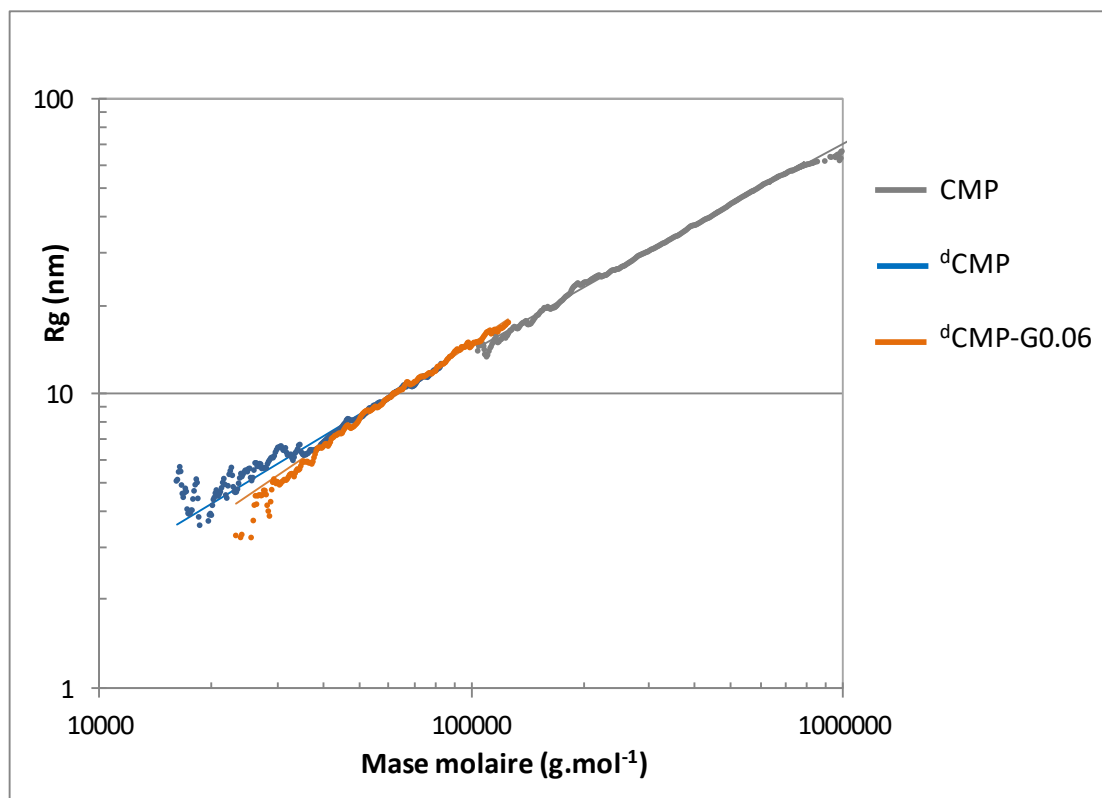
- ❖ Distributions des rayons de giration  $R_g$  du CMP, du  ${}^d\text{CMP}$  et du dérivé  ${}^d\text{CMP-G}_{0,06}$  (Figure D-15)



**Figure D-15 :** Profils d'élutions du CMP (gris) à  $C = 1 \text{ g.L}^{-1}$ , du  ${}^d\text{CMP}$  (bleu) et du  ${}^d\text{CMP-G}_{0,06}$  (orange) à  $C = 15 \text{ g.L}^{-1}$ . Solvant PBS 0,15 M. Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes (DRI) : trait discontinu. Distribution des rayons de giration  $R_g$  (rond).

On constate que dans le cas des échantillons dégradés  ${}^d\text{CMP}$  et du dérivé  ${}^d\text{CMP-G}_{0,06}$ , les rayons de giration ne sont pas accessibles sur tout le domaine d'élution. Précisément, aux forts volumes d'élution, la diffusion d'intensité de lumière des particules devient isotrope (pas de dépendance angulaire) en raison des tailles trop petites (inférieures à 10 nm). En s'intéressant au domaine d'élution où la diffusion est anisotrope, il est possible de donner une représentation  $R_g = f(M)$  en échelle bi-logarithmique dans le cas de chacun des échantillons

et pour des valeurs de  $R_g$  supérieures à 10 nm. Ces représentations sont fournies sur la Figure D-16.

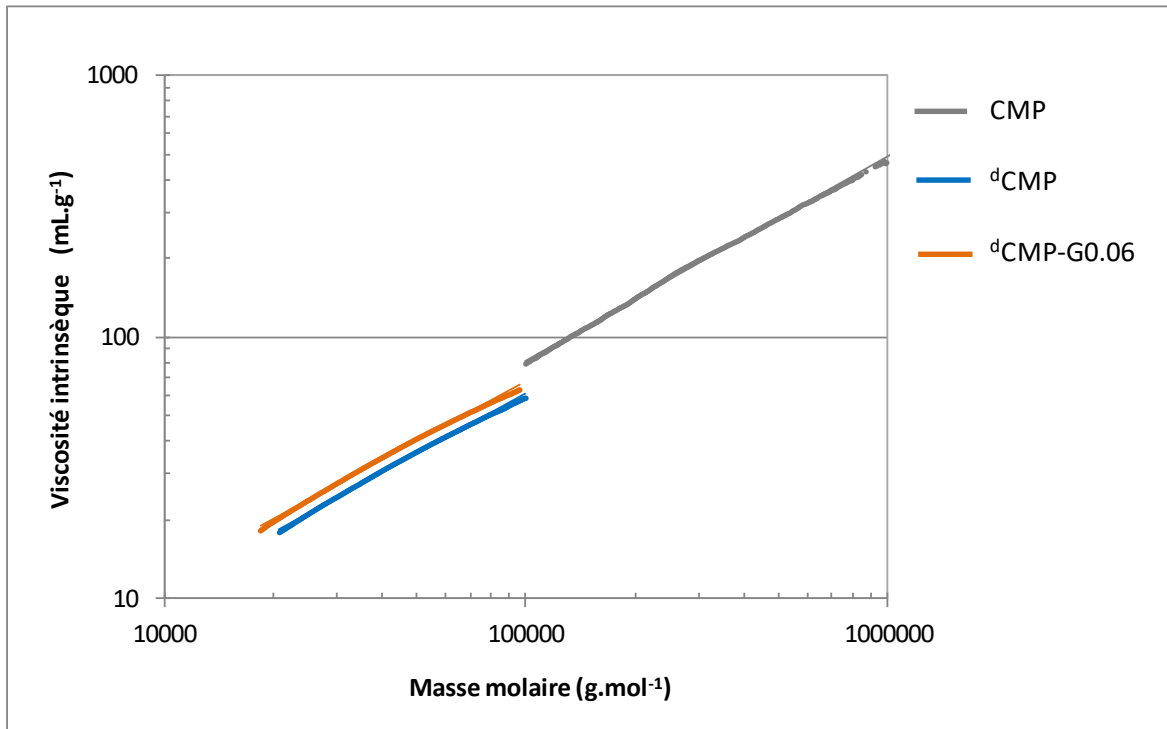


**Figure D-16 :** Représentation bilogarithmique  $R_g = f(M)$  pour le CMP (gris), le  ${}^d\text{CMP}$  (bleu) et le dérivé  ${}^d\text{CMP-G}_{0.06}$  (orange) dans le solvant PBS 0,15 M, à 25°C.

Les courbes obtenues varient de manière linéaire, traduisant bien une relation en loi d'échelle du type  $R_g \sim M^x$  avec 'x' la pente caractéristique de la conformation adoptée par les polymères en solution. Il est possible de noter au vu des représentations  $R_g$  vs  $M$  obtenues (Figure D-16) que les pentes des droites semblent peu différentes pour tous les produits : CMP, du  ${}^d\text{CMP}$  et du dérivé  ${}^d\text{CMP-G}_{0.06}$ . Ces remarques sont confirmées par les valeurs des pentes 'x' présentées dans le tableau D-8. Les pentes des échantillons dégradés augmentent légèrement comparé au CMP. Cependant, d'une manière générale, elles sont comprises entre [0,7 - 0,9]. Cela illustre des conformations de type pelotes statistiques assez flexibles en solution pour les échantillons CMP, du  ${}^d\text{CMP}$  et du dérivé  ${}^d\text{CMP-G}_{0.06}$ .

Intéressons-nous maintenant au coefficient de Mark-Houwink, soit 'a'. Les représentations ( $[\eta] = f(M)$ ) sont fournies ci-dessous.

- ❖ Représentation de Mark-Houwink pour les échantillons CMP, <sup>d</sup>CMP et du dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> (Figure D-17)



**Figure D-17** : Représentation de Mark-Houwink  $[\eta] = f(M)$  pour le CMP (gris), le <sup>d</sup>CMP (bleu) et le dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> (orange) dans le solvant PBS 0,15 M, à 25°C.

Les courbes obtenues varient de manière linéaire, traduisant bien une relation en loi d'échelle du type  $[\eta] \sim M^a$  avec 'a' la pente illustrant la conformation et l'état de solvation des échantillons. D'une manière générale une valeur de  $a = 0,5$  témoigne d'une pelote en solvant thêta. Lorsque 'a' est compris entre  $[0,5 - 0,8]$ , cela illustre une conformation de type pelote statistique en bon solvant. Une conformation de type bâtonnet rigide est attribuée à des valeurs de 'a' supérieures à 1. Dans notre cas, les valeurs des pentes 'a' fournies dans le tableau D-8 sont quasiment similaires et de l'ordre de 0,7. Le CMP, le <sup>d</sup>CMP et le dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> se présentent donc sous forme de pelote statistique et en bonnes conditions de solvation. Ces résultats confirment les premières conclusions apportées par les représentations  $R_g = f(M)$ .

**Tableau D-8 : Grandeurs macromoléculaires caractéristiques du CMP à 1 g L<sup>-1</sup> et des produits <sup>d</sup>CMP et dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0,06</sub> à C = 15.g L<sup>-1</sup> déterminés par SEC/MALLS/DRI/Visco dans un milieu PBS 0,15 M.**

	M <sub>n</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )	M <sub>0</sub> <sup>a</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	DP <sub>n</sub> apparent (M <sub>n</sub> /M <sub>0</sub> )	R <sub>h(n)</sub> (nm)	x pente R <sub>g</sub> vs M <sup>b</sup>	a pente [η] vs M <sup>c</sup>	[η] <sub>n</sub> (mL.g <sup>-1</sup> )	Masse récupérée
CMP	143 000 (± 1,6 %)	229 000 (± 0,4 %)	239	598	12,6 (± 0,5 %)	0,69 (± 0,2%)	0,79 (± 0,1%)	100 (± 1,0 %)	96
<sup>d</sup> CMP	24 000 (± 0,3 %)	34 000 (± 0,2 %)	239	100	4,1 (± 0,1 %)	0,77 (± 1,4%)	0,73 (± 0,1%)	19 (± 0,2 %)	99
<sup>d</sup> CMP-G <sub>0,06</sub>	23 000 (± 0,5 %)	34 000 (± 0,2 %)	244	94	4,1 (± 0,2 %)	0,86 (± 1,2%)	0,72 (± 0,1%)	21 (± 0,3 %)	82

<sup>a</sup>: M<sub>0</sub> est la masse molaire de l'unité de répétition déterminée par le calcul : 162 + 80DS<sub>COONa</sub> + 99,15 DS(Ga).

<sup>b</sup>: pente de la courbe R<sub>g</sub> vs M déterminée pour des valeurs de R<sub>g</sub> (supérieures à 10 nm).

<sup>c</sup>: pente de la courbe [η] vs M ; coefficient de Mark Houwink

En conclusion sur les résultats apportés par le couplage SEC/MALLS/DRI/Visco, nous avons pu confirmer qu'il y a bien eu dégradation du polysaccharide CMP. Le <sup>d</sup>CMP présente effectivement des masses molaires moyennes M<sub>n</sub> et M<sub>w</sub> et de tailles (R<sub>h</sub>, [η]) bien inférieures comparées à celles du CMP précurseur. Les valeurs des pentes 'x' (R<sub>g</sub>~M<sup>x</sup>) et 'a' ([η]~M<sup>a</sup>) sont très proches voir quasiment identiques. Les échantillons adoptent une conformation similaire de type pelote statistique en bon solvant. On comprend ainsi que la dégradation ne conduit pas à une modification de conformation et plus précisément que le <sup>d</sup>CMP conserve un caractère flexible. En tenant compte de la taille d'un sucre anhydroglucose (soit 0,515 nm<sup>3</sup>) mais également de la longueur de persistance du CMP (~ q (pullulane) soit 1,3 nm), on déduit que la longueur de persistance (partie rigide d'une chaîne de polysaccharide) met en jeu environ 3 sucres anhydroglucose. Au vu de la valeur de DP<sub>n</sub> trouvée dans le cas du <sup>d</sup>CMP (soit 100 unités anhydroglucose), le nombre de segments de rigidité reste suffisamment important pour assurer le maintien de la flexibilité du <sup>d</sup>CMP.

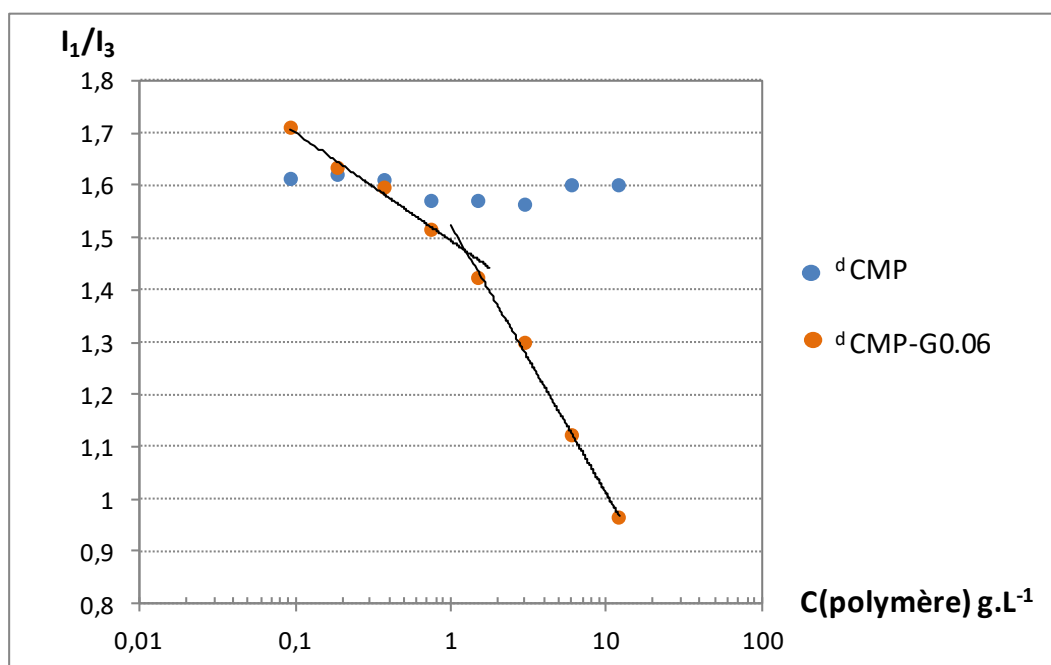
Le dérivé modifié dégradé (<sup>d</sup>CMP-G<sub>0,06</sub>) présente des masses molaires et des tailles (R<sub>h</sub>, [η]) très proches de celles de son homologue précurseur <sup>d</sup>CMP. Les valeurs des pentes 'x' (R<sub>g</sub>~M<sup>x</sup>) et 'a' de ces deux produits sont également proches ([η]~M<sup>a</sup>). Le greffage (à faible taux) n'entraîne donc aucun changement quant à la conformation du <sup>d</sup>CMP. Tous ces résultats confirment le très faible (ou l'absence de) pouvoir associatif à faible taux de greffage (6%). Cependant, il serait difficile de généraliser ce résultat obtenu « faible pouvoir associatif » à

des taux de greffage plus importants. On rappelle que les greffages (avec des  $DS_{théo}(Ga) > 0,15$ ) ont conduit à l'obtention de dérivés  $^dCMP-G$  non solubles dans l'eau.

Nous avons par la suite effectué des mesures en fluorescence sur le  $^dCMP-G_{0,06}$  afin d'avoir plus d'informations sur l'éventuel caractère associatif de ce dérivé.

### 3.2.2 Fluorescence

Des mesures de fluorescence ont été menées sur des solutions du dérivé  $^dCMP-G_{0,06}$  à des concentrations comprises entre  $[0,09 - 12] \text{ g.L}^{-1}$ . Les solutions ont été préparées dans du NaCl 0,15 M en présence de pyrène ( $4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ). Le rapport d'intensité  $I_1/I_3$  du pyrène en fonction de la concentration en polymère ( $^dCMP$  ou  $^dCMP-G_{0,06}$ ) est représenté sur la Figure D-18.



**Figure D-18 :** Rapport  $I_1/I_3$  de l'intensité des bandes du spectre d'émission du pyrène ( $4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) en fonction de la concentration en polymère (en  $\text{g.L}^{-1}$ ) pour  $^dCMP$  (bleu) et le dérivé  $^dCMP-G_{0,06}$  (orange). Mesures à  $25^\circ\text{C}$  dans du NaCl 0,15 M.

En premier lieu, on constate que le rapport  $I_1/I_3$  du  $CMP$  dégradé précurseur reste indépendant de la concentration (environ 1,6) traduisant un environnement logiquement hydrophile. Concernant le dérivé  $^dCMP-G_{0,06}$ , on remarque une baisse du rapport  $I_1/I_3$  et l'apparition d'une rupture de pente (CAC) lorsque la concentration en dérivé  $^dCMP-G_{0,06}$  augmente. Cette évolution traduit tout l'existence de domaines hydrophobes causés par des interactions entre greffons aminoglycol. Nous avons déterminé une CAC égale à  $1,25 \text{ g.L}^{-1}$  pour le dérivé  $^dCMP-G_{0,06}$ . Pour rappel, le dérivé  $CMP-G_{0,05}$  non dégradé présente une CAC égale  $1,15 \text{ g.L}^{-1}$ .



Cependant, il faut souligner que les associations entre greffons entraînant la formation de zone hydrophobes observées (baisse  $I_1/I_3$ ) sont assez marginales puisque les masses molaires déterminées par SEC/MALLS/DRI ne montrent pas d'agrégation importante alors que les analyses ont été effectuées à  $15 \text{ g.L}^{-1}$  soit bien supérieures à la CAC ici déterminée.

Par ailleurs, le comportement du dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0,06}$  n'a pas été étudié en milieu semi-dilué en raison de la très faible viscosité de ce produit en solution. L'objectif rhéologique n'était pas visé en utilisant ce polysaccharide.

### 3.3 Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G)

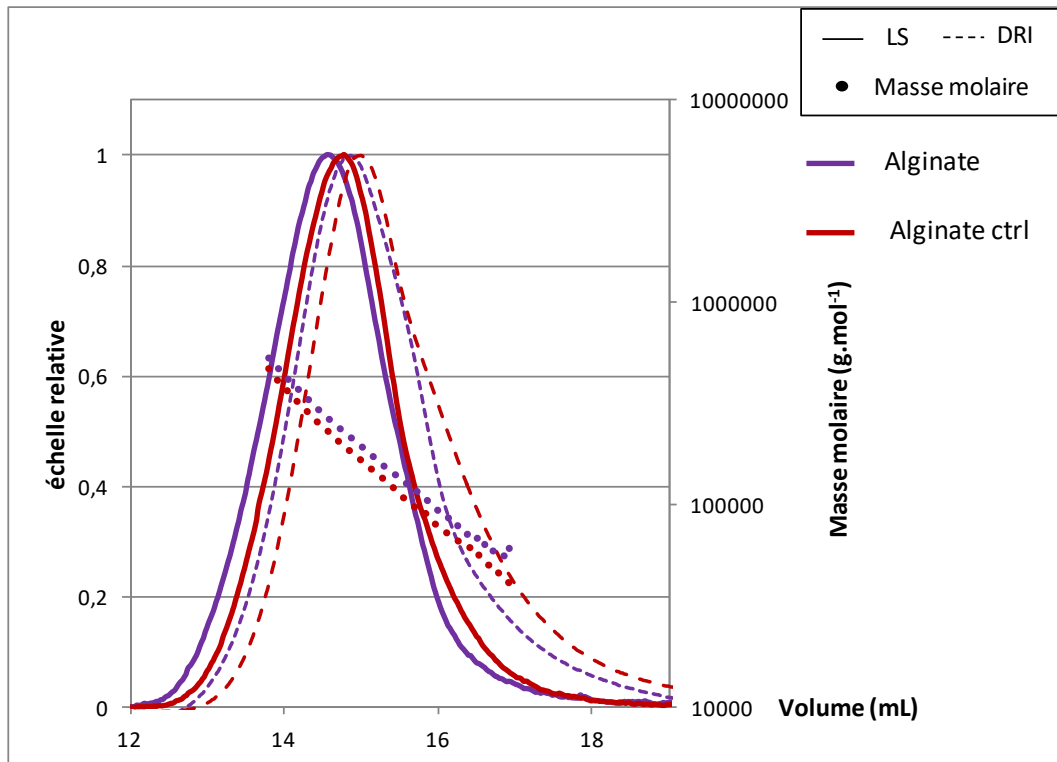
#### 3.3.1 Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco

Rappelons que dans le cas de la stratégie 3, nous avons choisi d'utiliser l'alginate comme polysaccharide. Ce dernier est considéré comme un polymère semi-flexible avec une longueur de persistance égale à 15 nm en milieu salin. Cette valeur est plus grande que celle du pullulane soit 1,3 nm, qu'on assimile également par la suite à celle du CMP en milieu salin. Cela témoigne d'un caractère de l'alginate plus rigide que le CMP et pourrait permettre de limiter le pouvoir associatif de type intramoléculaire des dérivés amphiphiles Alg-G<sub>x</sub>.

Comme déjà mentionné dans la partie « Synthèse », la purification des dérivés Alg-G<sub>x</sub> a été établie selon plusieurs étapes : successions de dialyses contre NaOH 0,01 M, contre de l'eau milli-Q, contre NaOH 0,1 M et pour finir contre de l'eau milli-Q (rappel protocole plus haut partie « synthèse »). Au vu de la présence de liaisons  $\beta(1,4)$  dans la structure de l'alginate (schéma D-1), ce dernier pourrait être sujet à une dégradation en milieu basique comme déjà mentionné<sup>8</sup>.

Pour étudier l'hypothèse d'une possible dégradation, nous avons focalisé notre attention sur le processus de purification par dialyse. En effet, une dégradation pendant le greffage sur les alginates est peu probable. Colinet *et al.*<sup>10</sup> avaient prouvé qu'une solution d'alginate dans les conditions de réactions utilisées (milieu acide à pH 3,6 et en présence d'EDCI (pendant 24 h)) ne conduisait pas à la dégradation du polysaccharide. Nous avons donc étudié un échantillon d'alginate n'ayant suivi que les étapes de purification appelé par la suite : Alginate ctrl.

Les chromatogrammes obtenus pour l'Alginate et l'Alginate ctrl sont présentés sur la Figure D-19. Les résultats qui en découlent sont regroupés tableau D-9.



**Figure D-19 :** Profils d'élutions de l'Alginate et de l'Alginate ctrl dans du PBS à 0,15 M; Alginate (violet), Alginate ctrl (rouge) Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes obtenues par le détecteur réfractomètre (DRI) : trait discontinu. Distribution des masses molaires (rond plein).

Les profils (LS et DRI) de l'alginate et de l'alginate ctrl sont quasiment similaires. On observe cependant un léger décalage vers les plus forts volumes d'élution dans le cas de l'alginate ctrl. Cette première observation illustre une probable dégradation de l'alginate. On constate que les valeurs des masses molaires moyennes  $M_n$  et  $M_w$  ainsi que le  $DP_n$  (tableau D-9) de l'alginate ctrl sont plus faibles que celles de l'Alginate. Ces évolutions montrent qu'il y a donc eu dégradation du polysaccharide alginate en raison des étapes de purification.

Au vu de cette remarque, il sera opportun d'utiliser l'alginate ctrl comme précurseur pour les polymères greffés Alg- $G_x$  qui seront analysés par la suite. En effet, ces produits ont subi le même traitement basique alors que l'alginate précurseur n'a subi aucun traitement.

**Tableau D-9 : Grandeurs macromoléculaires caractéristiques des polymères CMP, Alginate (ctrl) et dérivés Alg-G<sub>x</sub> déterminés par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco à une concentration en échantillon C = 1,0 g L<sup>-1</sup> et dans un milieu PBS 0,15 M.**

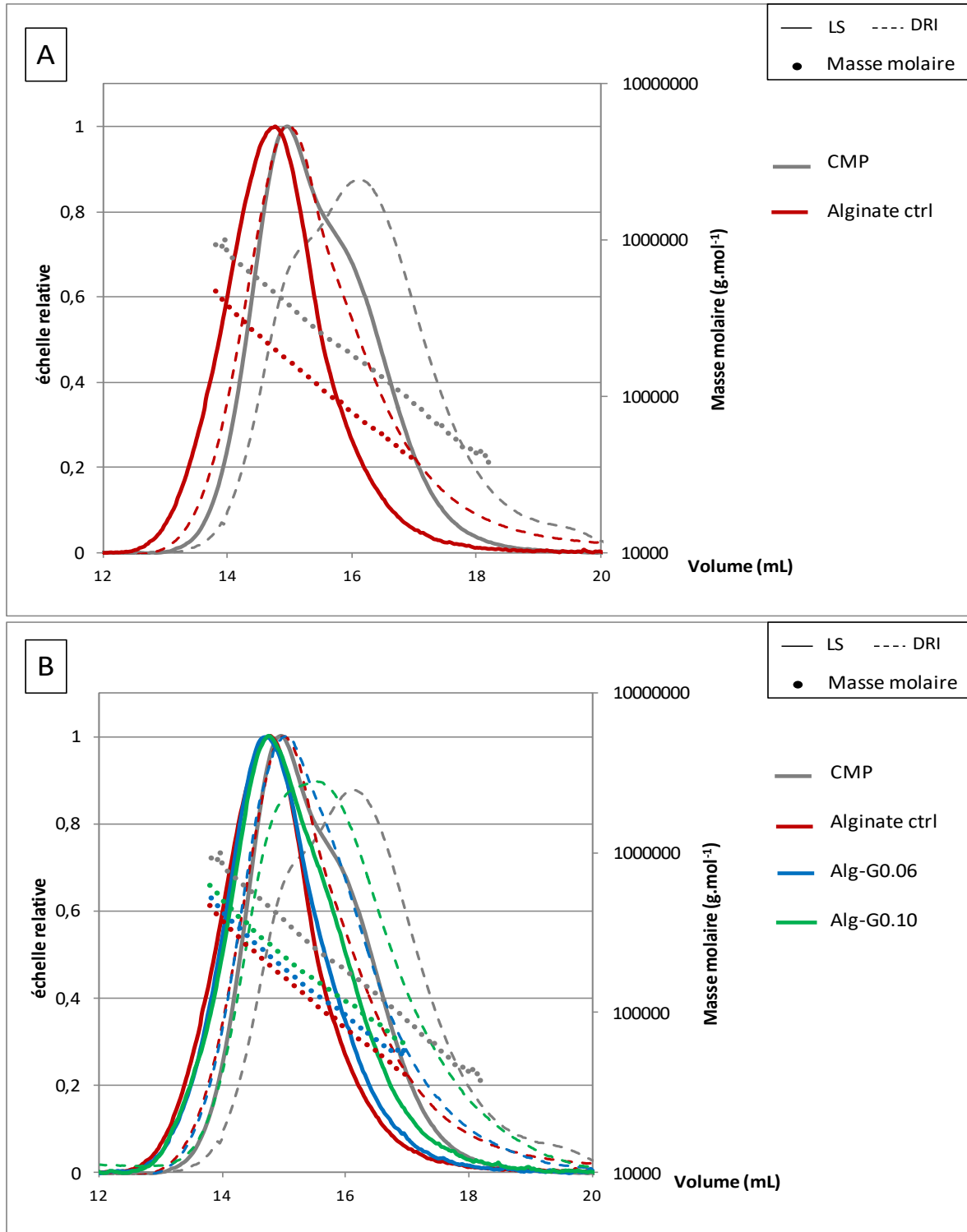
	M <sub>n</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>0</sub> <sup>a</sup> (g mol <sup>-1</sup> )	DP <sub>n</sub> apparent (M <sub>n</sub> /M <sub>0</sub> )	R <sub>h(n)</sub> (nm)	[η] <sub>n</sub> (mL g <sup>-1</sup> )	Masse récupérée
Alginate	159 000 (± 1,5 %)	212 000 (± 0,6 %)	198	843	23,9 (± 0,4 %)	592 (± 0,2 %)	71
Alginate ctrl	119 000 (± 0,9 %)	163 000 (± 0,4 %)	198	601	20,0 (± 0,4 %)	453 (± 0,2 %)	84

<sup>a</sup>: M<sub>0</sub> est la masse molaire de l'unité de répétition déterminée par le calcul : 198 + 99,15 DS(Ga).

A l'exemple des analyses détaillées effectuées dans le cas de la stratégie 2, nous allons maintenant réaliser des études conformationnelles comparatives entre le CMP (haute masse molaire), l'alginate ctrl et les dérivés greffés Alg-G<sub>x</sub>.

- ❖ Distributions des masses molaires du CMP, de l'alginate ctrl et des dérivés greffés Alg-G<sub>x</sub>.

Les chromatogrammes du CMP, de l'alginate ctrl et des dérivés greffés Alg-G<sub>x</sub> sont présentés sur la Figure D-20. Les résultats qui en découlent sont regroupés plus loin dans le tableau D-10.



**Figure D-20 :** Profils d'élutions du CMP, de l'Alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> dans du PBS à 0,15M; CMP (gris), Alginate ctrl (rouge), Alg-G<sub>0.06</sub> (bleu), Alg-G<sub>0.10</sub> (vert). Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes obtenues par le détecteur réfractomètre (DRI) : trait discontinu. Distribution des masses molaires (rond plein).

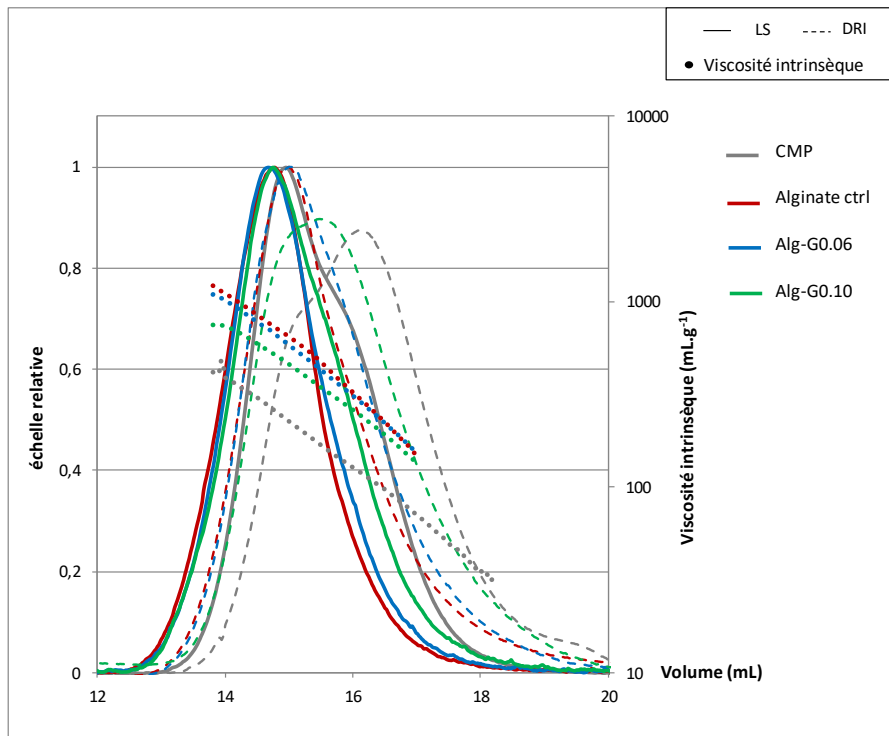
En s'intéressant au CMP et à l'alginate ctrl (Figure D-20 A), on remarque que les courbes de l'alginate ctrl (LS et DRI) sortent à des volumes sensiblement plus importants que ceux du

CMP. Cela illustre des volumes hydrodynamiques (tailles) de l'alginate ctrl en solution plus grands comparés au CMP. Pourtant le CMP présente des masses molaires plus importantes que celles de l'alginate ctrl ( $M_n=143\ 000\text{g.mol}^{-1}$  contre  $119\ 000\text{g.mol}^{-1}$ ), il est donc clair que l'alginate est plus rigide que le CMP. Confirmant cette observation, on constate aussi qu'à volume d'élution identique, par exemple 16 mL, soit à volume hydrodynamique identique, la masse molaire du CMP est autour de  $190\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$  contre  $80\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$  pour l'alginate. Cela montre bien que le CMP présente une structure plus dense que celle de l'alginate en rapport avec sa plus grande flexibilité.

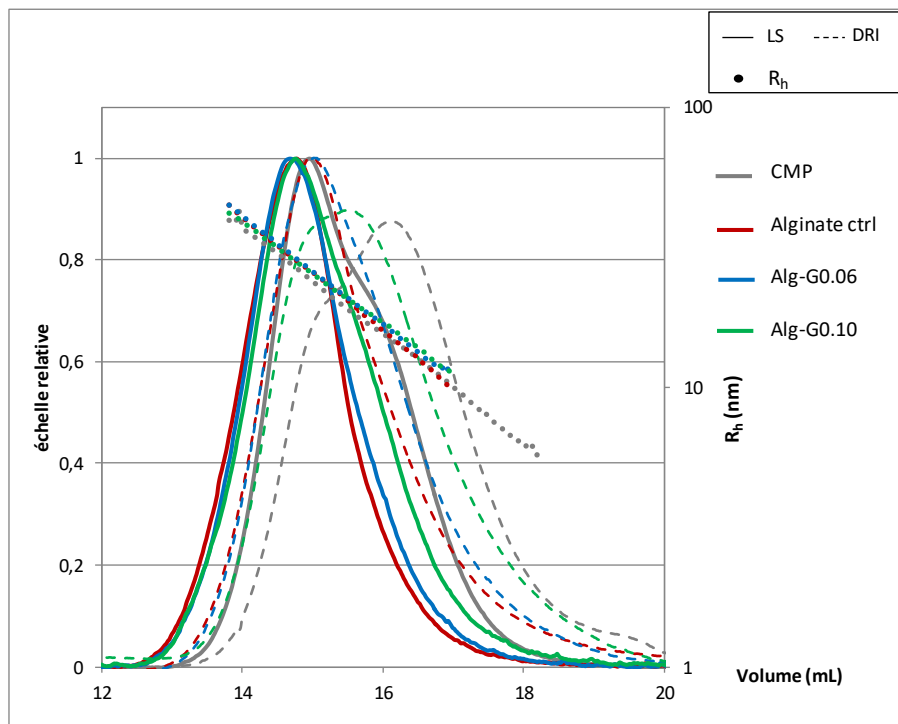
Par ailleurs, en comparaison avec les courbes de l'alginate ctrl, les profils des dérivés Alg-G<sub>x</sub> sont légèrement déportés vers les forts volumes d'élution (les faibles volumes hydrodynamiques) lorsque le DS(Ga) augmente. Si cet effet est faible pour le dérivé le moins greffé (Alg-G<sub>0.06</sub>), il est plus sensible pour le dérivé Alg-G<sub>0.10</sub>. Cette observation peut s'expliquer par une dégradation du polymère et/ou par les associations hydrophobes déjà discutées pour les CMP greffés. On constate également à volume d'élution fixe, une légère augmentation des masses molaires avec le DS(Ga). Les masses molaires moyennes  $M_n$  et  $M_w$  sont regroupées dans le tableau D-10. Ces augmentations semblent exclure une dégradation et indiquer une agrégation due aux associations hydrophobes des greffons, accompagnée d'une légère compaction des structures.

Intéressons-nous maintenant aux distributions des viscosités intrinsèques et des rayons hydrodynamiques de tous les échantillons. Elles sont présentées sur les Figures D-21 et D-22.

- ❖ Distributions des viscosités intrinsèques et des rayons hydrodynamiques  $R_h$  du CMP, de l'alginate ctrl et des dérivés greffés Alg-G<sub>x</sub>



**Figure D-21** : Profils d'élutions du CMP, de l'Alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> dans du PBS à 0,15 M; CMP (gris), Alginate ctrl (rouge), Alg-G<sub>0.06</sub> (bleu), Alg-G<sub>0.10</sub> (vert). Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes obtenues par le détecteur réfractomètre (DRI) : trait discontinu. Distribution des viscosités intrinsèques (rond plein).



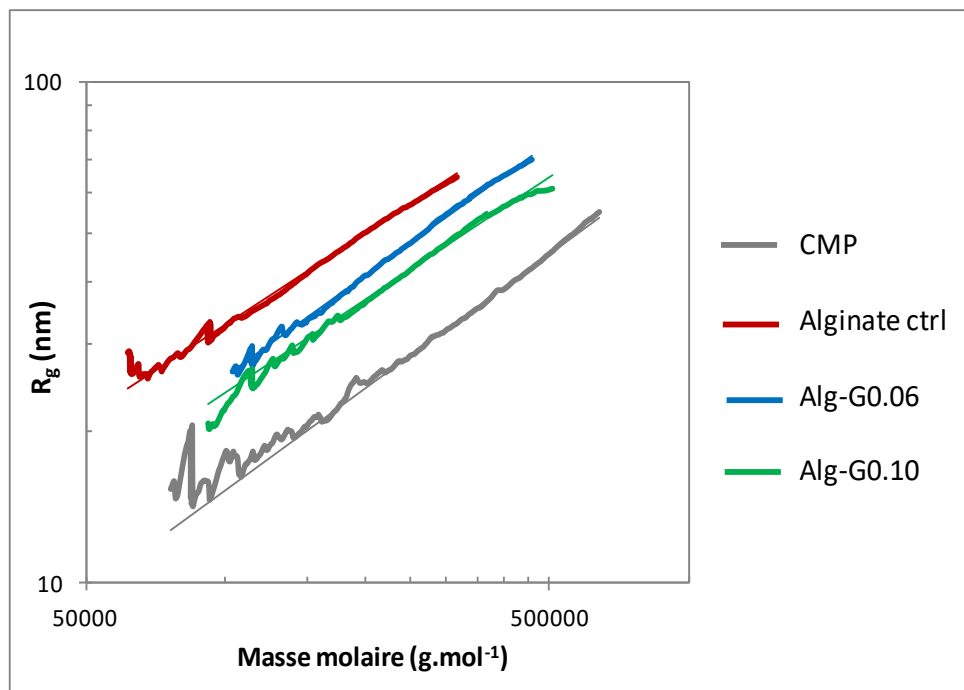
**Figure D-22** : Profils d'élutions du CMP, de l'Alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> dans du PBS à 0,15 M; CMP (gris), Alginate ctrl (rouge), Alg-G<sub>0.06</sub> (bleu), Alg-G<sub>0.10</sub> (vert). Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes obtenues par le détecteur réfractomètre (DRI) : trait discontinu. Distribution des rayons hydrodynamiques R<sub>h</sub> (rond plein).

On remarque d'une part que le CMP présente des viscosités plus faibles ainsi que des rayons  $R_h$  sensiblement inférieurs comparés à l'alginate ctrl (Figures D-21 et 22, Tableau D10). Ces évolutions témoignent également du caractère moins flexible de l'alginate ctrl comparé au CMP.

D'autre part, les dérivés Alg- $G_x$  présentent des valeurs de viscosités intrinsèques légèrement plus faibles que celle de l'Alginate ctrl indiquant également la présence de probables associations intramoléculaires. Peu de différences sont observées au niveau des rayons  $R_h$ . Les faibles taux d'incorporation d'aminogaïcol conduisent à un caractère associatif peu marqué, il est difficile de conclure ici sur l'effet de la plus grande rigidité de l'alginate quant à la limitation des associations intramoléculaires.

Nous allons maintenant nous intéresser aux conformations adoptées par chacun des produits en solution.

- ❖ Représentation bi-logarithmique  $R_g$  vs  $M$  du CMP, de l'alginate ctrl et des dérivés greffés Alg- $G_x$



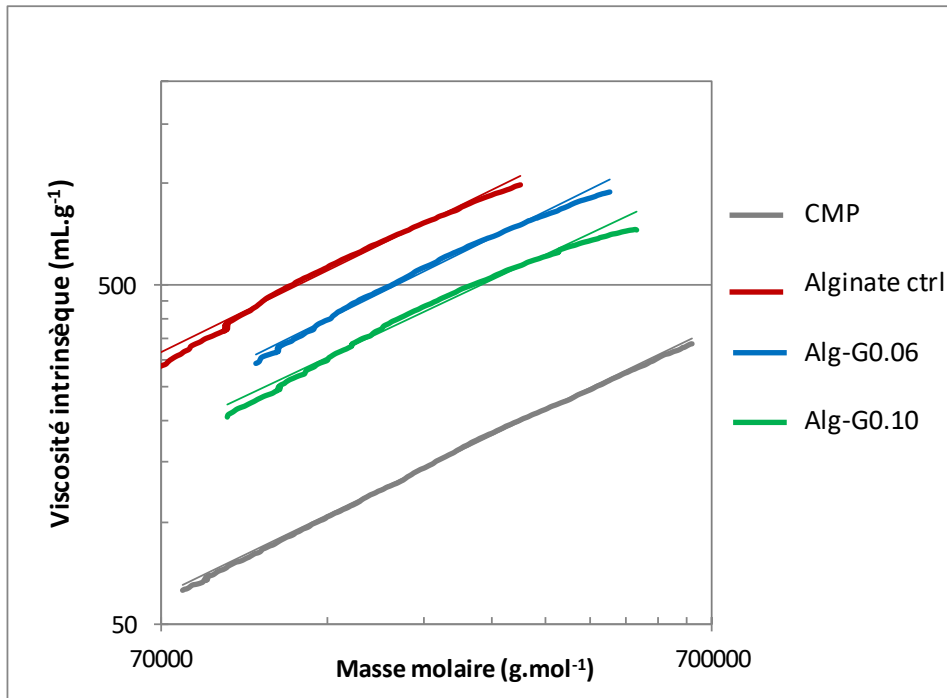
**Figure D-23 :** Représentation bilogarithmique  $R_g = f(M)$  pour le CMP (gris), Alginate ctrl (rouge), Alg-G<sub>0.06</sub> (bleu), Alg-G<sub>0.10</sub> (vert). dans le solvant PBS 0,15 M, à 25°C.

Les courbes obtenues varient de manière linéaire, traduisant bien une relation en loi d'échelle du type  $R_g \sim M^x$ . Les valeurs des pentes 'x' de tous les produits sont présentées dans le tableau D-10. Le CMP, l'alginate ctrl et les dérivés Alg- $G_x$  présentent des valeurs 'x' très proches et

comprises entre [0,6 - 0,7]. Cela illustre des conformations de type pelotes statistiques en solution pour tous les produits.

Intéressons-nous maintenant au coefficient de Mark-Houwink, soit 'a' ( $[\eta] = f(M)$ ). Ces représentations ( $[\eta] = f(M)$ ) sont fournies ci-dessous.

- ❖ Représentation de Mark-Houwink pour les échantillons CMP, alginate (ctrl) et les dérivés greffés Alg-G<sub>x</sub> (Figure D-24)



**Figure D-24 :** Représentation de Mark-Houwink  $[\eta] = f(M)$  pour le CMP (gris), Alginate ctrl (rouge), Alg-G<sub>0.06</sub> (bleu), Alg-G<sub>0.10</sub> (vert) dans le solvant PBS 0,15 M, à 25°C.

Les courbes obtenues varient de manière linéaire, traduisant bien une relation en loi d'échelle du type  $[\eta] \sim M^a$ . Dans notre cas, les valeurs des pentes 'a' fournies dans le tableau D-10 sont quasiment similaires et de l'ordre de 0,8. Le CMP, l'alginate ctrl et les dérivés Alg-G<sub>x</sub> sont sous forme de pelote statistique et en bonnes conditions de solvation. Ces résultats confirment les premières conclusions apportées par les représentations  $R_g = f(M)$ .



**Tableau D-10 : Grandeurs macromoléculaires caractéristiques des polymères CMP, Alginate ctrl et dérivés Alg-G<sub>x</sub> déterminés par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco à une concentration en échantillon C = 1,0 g L<sup>-1</sup> et dans un milieu PBS 0,15 M.**

	M <sub>n</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>0</sub> <sup>a</sup> (g mol <sup>-1</sup> )	DP <sub>n</sub> apparent (M <sub>n</sub> /M <sub>0</sub> )	R <sub>h(n)</sub> (nm)	x pente R <sub>g</sub> vs M <sup>b</sup>	a pente [η] vs M <sup>c</sup>	[η] <sub>n</sub> (mL g <sup>-1</sup> )	Masse récupérée
CMP	143 000 (± 1,6 %)	229 000 (± 0,4 %)	239	598	12,6 (± 0,5 %)	0,69 (± 0,2%)	0,79 (± 0,1%)	100 (± 1,0 %)	96
Alginate ctrl	119 000 (± 0,9 %)	163 000 (± 0,4 %)	198	601	20,0 (± 0,4 %)	0,60 (± 0,4%)	0,72 (± 0,1%)	453 (± 0,2 %)	84
Alg-G <sub>0,06</sub>	144 000 (± 2,0 %)	193 000 (± 1,1 %)	204	706	20,0 (± 0,7 %)	0,69 (± 0,7%)	0,78 (± 0,1%)	383 (± 0,3 %)	84
Alg-G <sub>0,10</sub>	147 000 (± 1,6 %)	195 000 (± 1,1%)	208	707	18,7 (± 0,7 %)	0,65 (± 1,3%)	0,82 (± 0,1%)	301 (± 0,2 %)	92

<sup>a</sup>: M<sub>0</sub> est la masse molaire de l'unité de répétition déterminée par le calcul : 198 + 99,15 DS(Ga).

<sup>b</sup>: pente de la courbe R<sub>g</sub> vs M déterminée pour des valeurs de R<sub>g</sub> (supérieures à 10 nm).

<sup>c</sup>: pente de la courbe [η] vs M ; coefficient de Mark Houwink

En conclusion sur les résultats apportés par le couplage SEC/MALLS/DRI/Visco, les comparaisons des grandeurs intrinsèques au CMP et à l'Alginate ctrl notamment axées sur la taille des pelotes statistiques (R<sub>h</sub>, [η]) illustrent des chaînes de CMP en solution moins expansées que celles de l'alginate ctrl. De plus, le CMP possède une viscosité [η] environ 5 fois plus faible que celle de l'alginate, indiquant clairement la plus grande rigidité de l'alginate. Cependant, les valeurs des pentes 'x' (R<sub>g</sub>~M<sup>x</sup>) et 'a' ([η]~M<sup>a</sup>) sont très proches. Ces résultats montrent que ces 2 polysaccharides en solution ont des conformations de pelotes statistiques mais ils n'ont pas permis de différencier un polymère semi-flexible (alginate ctrl) d'un polymère flexible (CMP).

Les dérivés Alg-G<sub>x</sub> présentent des masses molaires légèrement plus élevées et des tailles (R<sub>h</sub>, [η]) plus faibles que le précurseur alginate ctrl. Ces évolutions sont plus marquées dans le cas du dérivé Alg-G<sub>0,10</sub>. Cela illustre un caractère associatif des dérivés Alg-G<sub>x</sub> en milieu dilué qui semblent se rapprocher de celui observé dans le cas des dérivés CMP-G<sub>x</sub> (CMP-G<sub>0,05</sub> et CMP-G<sub>0,16</sub>). Par ailleurs, les valeurs de 'a' et 'x' de l'alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> sont quasi-similaires et illustrent des conformations de type pelote statistique en bon solvant.

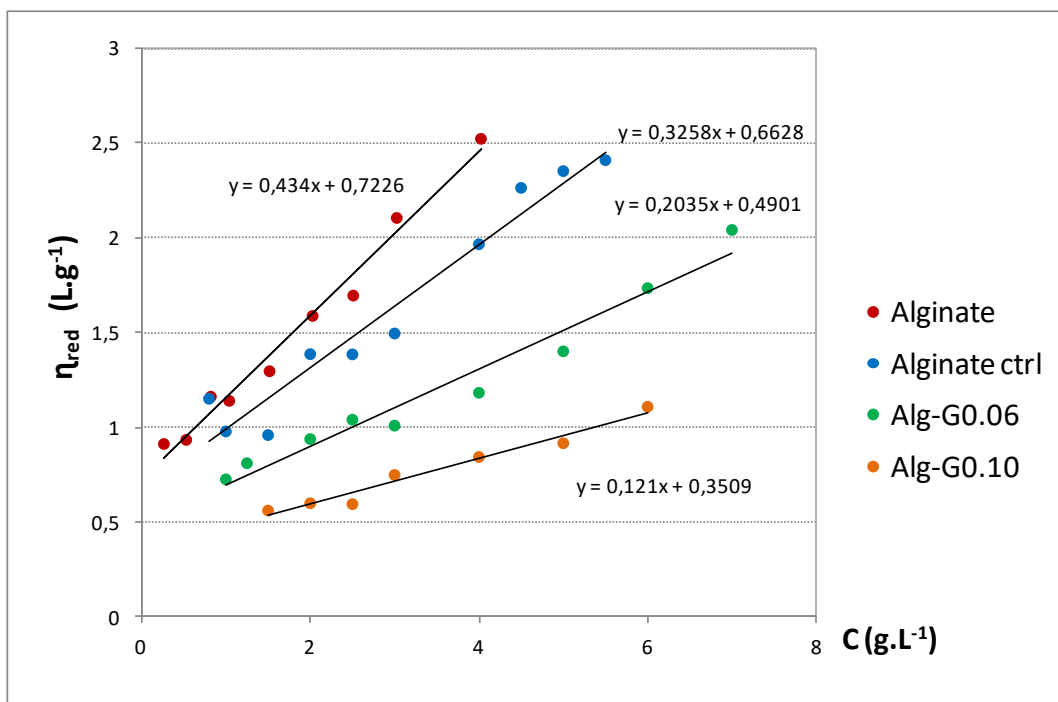
Ainsi, dans le cas de la stratégie 3, l'utilisation d'un polysaccharide (semi-flexible) ne conduit pas forcément à abaisser le pouvoir associatif des dérivés greffés.

### 3.3.2 Etude viscosimétrique

Des mesures de viscosités des solutions de l'alginate, de l'alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> ont été réalisées dans les mêmes conditions que le CMP et des dérivés CMP-G<sub>x</sub> à l'aide du viscosimètre Low Shear LS400. Nous avons travaillé à des concentrations plus faibles que le CMP en raison du caractère visqueux de l'alginate qui est plus prononcé.

#### Détermination des viscosités intrinsèques

La Figure D-25 illustre les représentations de Flory-Huggins  $\eta_{red} = f(C)$  obtenues pour l'Alginate, l'Alginate ctrl et les dérivés Alg-G<sub>x</sub>.



**Figure D-25 :** Représentation de la viscosité réduite  $\eta_{red}$  en fonction de la concentration (g.L<sup>-1</sup>) en polymères dans le cas de l'alginate, l'alginate ctrl et les dérivés Alg-G<sub>x</sub> dans le solvant PBS 0,15 M à 25°C et à un cisaillement fixé à 1 s<sup>-1</sup>.

Quelle que soit la concentration d'étude, on remarque que les viscosités obtenues dans le cas de l'alginate ctrl sont plus faibles que celle de l'alginate, ce qui est cohérent et confirme encore la dégradation du polysaccharide suite aux étapes de purification.

A concentration fixe en polymère, on remarque que les viscosités de l'alginate ctrl sont supérieures à celles des dérivés Alg-G<sub>x</sub> et ce, sur tout le domaine de concentration d'étude. De plus, les viscosités des dérivés diminuent lorsque le DS(Ga) augmente. Ces résultats confirment l'existence d'associations intramoléculaires entre greffons hydrophobes. Les valeurs des viscosités intrinsèques  $[\eta]$  et des coefficients de Huggins ( $K_H$ ) déterminées à partir

des équations de droites sont présentées dans le tableau D-11. Les viscosités intrinsèques  $[\eta]$  obtenues par les analyses SEC/MALLS/DRI/Visco sont également fournies.

**Tableau D-11 : Valeurs des viscosités intrinsèques  $[\eta]$  et des coefficients de Huggins ( $K_H$ ) du CMP, de l'Alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub>.**

	CMP	Alginate	Alginate ctrl	Alg-G <sub>0.06</sub>	Alg-G <sub>0.10</sub>
$[\eta]$ ml/g	116	723	663	490	351
$K_H$	0,4	0,83	0,74	0,84	0,98
$[\eta]_n$ ml/g <sup>a</sup>	100	592	453	383	301

<sup>a</sup>: Viscosités intrinsèques déterminées par SEC/MALLS/DRI

En premier lieu, on remarque que le CMP possède une viscosité intrinsèque  $[\eta]$  plus faible que l'alginate ctrl mais également que les dérivés Alg-G<sub>x</sub>.

L'alginate ctrl possède une valeur de  $[\eta]$  plus faible que l'alginate ce qui reste logique. En comparaison avec l'alginate ctrl, on constate que les valeurs des viscosités intrinsèques  $[\eta]$  des dérivés Alg-G<sub>x</sub> diminuent lorsque le DS(Ga) augmente. Cela illustre donc des structures en solution de plus en plus compactes avec le DS(Ga) qui augmente. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par le couplage SEC/MALLS/DRI/Visco. Dans le cas de l'alginate et de l'alginate ctrl, les valeurs de  $K_H$  sont de l'ordre de 0,8 et cela témoigne d'un bon état de solvation<sup>11</sup>. En comparaison avec l'alginate ctrl, on remarque que les constantes  $K_H$  des dérivés Alg-G<sub>x</sub> augmentent légèrement jusqu'à atteindre dans le cas de l'Alg-G<sub>0.10</sub> une valeur de  $K_H$  sensiblement égal à 1. Cela met en avant l'existence d'interactions polymère-polymère.

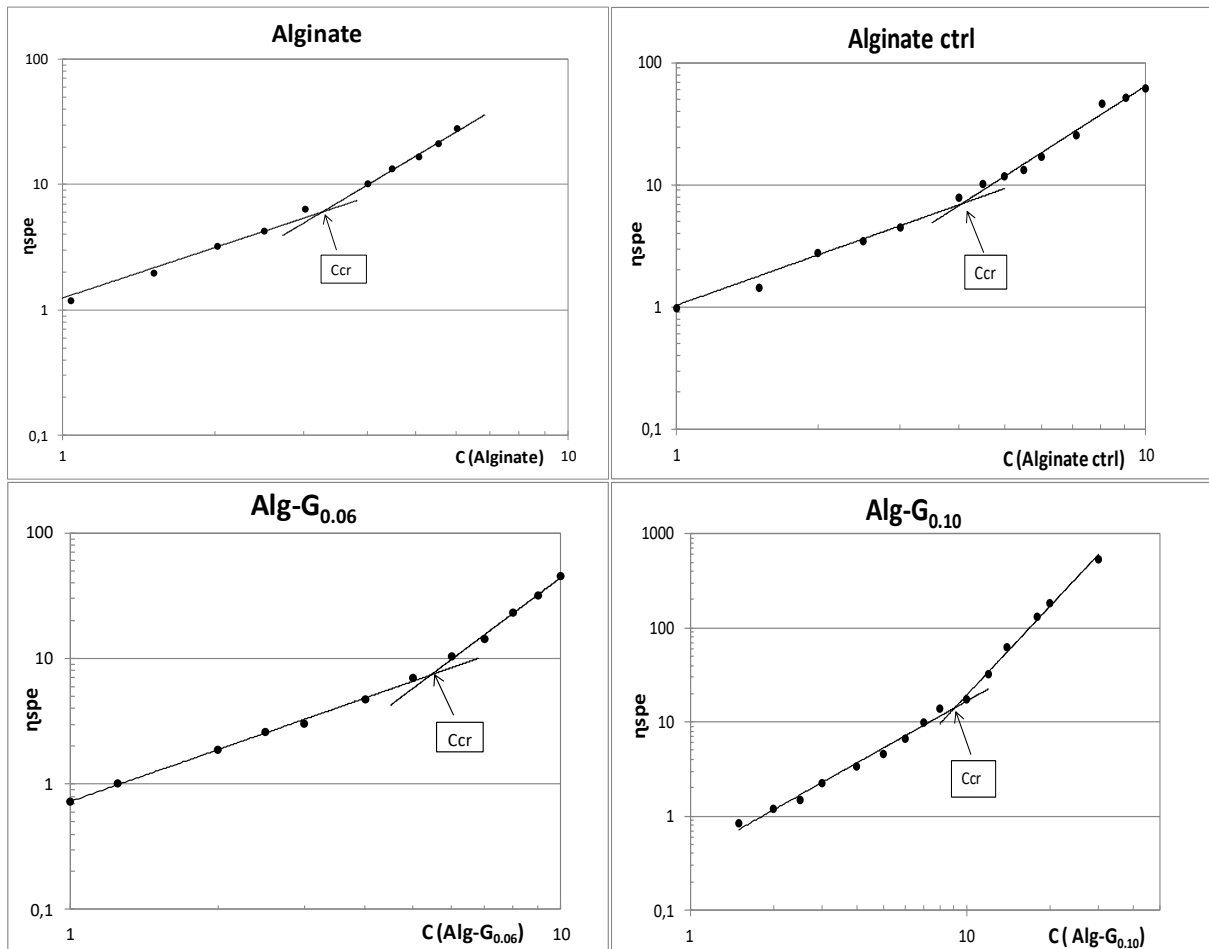
De nouveau, on peut comparer ces résultats avec ceux obtenus pour les dérivés CMP greffés de fortes masses molaires (Tableau D-6). Il apparaît que le caractère associatif des dérivés Alg-G<sub>x</sub> est sensiblement similaire à ceux des dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Pour l'illustrer, le greffage modifie de manière similaire les viscosités des précurseurs. Plus précisément, on obtient par exemple dans le cas des dérivés greffés (CMP-G<sub>0.05</sub> et Alg-G<sub>0.06</sub>) des viscosités  $[\eta]$  déterminées par SEC/MALLS/DRI/Visco plus faibles (environ 1,2 fois) que celles de leurs précurseurs respectifs (CMP et alginate ctrl).

Par ailleurs, pour comparaison avec la littérature, Pelletier *et al.*<sup>11</sup> ont synthétisé un dérivé alginate amphiphile greffé avec des longues chaînes alkyles (C<sub>18</sub>). Le taux de greffage était faible (1,3%). En milieu salin (NaCl 0,15 M), ils ont observé une valeur de  $[\eta]$  du dérivé greffé plus faible comparée au précurseur alginate. Les auteurs ont également indiqué une

forte tendance à l'agrégation de l'alginate amphiphile Alg-C<sub>18</sub>-1.3 avec une valeur de  $K_H = 3,7$ , plus marquée que dans le cas des dérivés Alg-G<sub>x</sub>. Ils ont mis en avant des interactions intra et intermoléculaires en régime dilué.

#### Détermination des concentrations critiques de recouvrement $C_{cr}$

La Figure D-26 illustre les représentations bi-logarithmiques des viscosités spécifiques  $\eta_{spe} = f(C)$  obtenues pour l'Alginate, l'Alginate ctrl et les dérivés Alg-G<sub>x</sub>. Le tableau D-12 regroupe les concentrations critiques déterminées pour chacun des produits d'analyse.



**Figure D-26 :** Représentation de Utracki and Simha. Viscosité spécifique  $\eta_{spe}$  en fonction de la concentration (en g.L<sup>-1</sup>) en polymère Alginate, Alginate ctrl et dérivés Alg-G<sub>x</sub> (Alg-G<sub>0.06</sub> et Alg-G<sub>0.10</sub>) dans le solvant PBS 0,15 M à 25°C.

Les viscosités des dérivés Alg-G<sub>x</sub> mesurées et utilisées pour réaliser ces représentations (Utracki and Simha Figure D-26) sont inférieures à celles de l'Alginate et de l'Alginate ctrl et ce quel que soit le domaine de concentration d'étude.

**Tableau D-12 : Concentration critique de recouvrement  $C_{cr}$  de l'Alginate, l'alginate ctrl et des dérivés Alg- $G_x$**

	Alginate	Alginate ctrl	Alg- $G_{0.06}$	Alg- $G_{0.10}$
$C_{cr}$ (g.L <sup>-1</sup> )	3,2	4	5	9
		CMP	CMP- $G_{0.05}$	CMP- $G_{0.16}$
$C_{cr}$ (g.L <sup>-1</sup> )		42	40	55

En premier lieu, on remarque que les valeurs des  $C_{cr}$  obtenues dans le cas de l'alginate et des dérivés greffés sont beaucoup plus faibles que celles obtenues pour le CMP et ses dérivés. Au regard des masses molaires proches et des viscosités intrinsèques très différentes entre les 2 polysaccharides, ce résultat était attendu et bien conforme à la rigidité plus importante de l'alginate (enchaînement de sucres en  $\alpha(1,4)$  et  $\beta(1,4)$ ) comparée à la plus grande flexibilité du pullulane (enchaînements en  $\alpha(1,4)$  et  $\alpha(1,6)$ ). La concentration critique de recouvrement de l'alginate a été déterminée à 3,2 g.L<sup>-1</sup> dans du PBS 0,15 M. Pour comparaison, Colinet *et al.*<sup>10</sup>, pour un échantillon d'alginate différent de celui de notre étude ( $M_n = 194\ 000$  g.mol<sup>-1</sup>,  $M/G = 0,5$ ), ont trouvé une valeur de  $C_{cr}$  égale à 6,3 g.L<sup>-1</sup> dans du NaCl 0,1 M.

La concentration critique de recouvrement de l'alginate ctrl est égale à 4 dans du PBS 0,15 M. Cette légère augmentation comparée à la  $C_{cr}$  de l'Alginate reste cohérente au regard de la légère dégradation de l'alginate durant les étapes de purification.

En comparaison avec l'alginate ctrl, on remarque que dans le cas des dérivés Alg- $G_x$ , les concentrations critiques augmentent avec le DS(Ga). Cela illustre bien des tailles des pelotes des dérivés greffés légèrement plus compactes que celle du précurseur alginate ctrl. Ainsi, dans le cas des produits Alg- $G_x$ , il y a prédominance d'interactions intramoléculaires hydrophobes en solution et ce, même en régime semi-dilué comme à l'exemple des dérivés CMP- $G_x$ .

Pour comparaison, Siquin *et al.*<sup>12</sup> ont greffé des chaînes alkyle ( $C_{12}$ ) sur un dérivé d'alginate partiellement estérifié. Le degré de substitution obtenu était de 9 %. Des mesures de viscosité en milieu dilué et semi dilué ont été établies à partir du dérivé greffé en  $C_{12}$  et du précurseur. Les auteurs mettent en avant en régime dilué une viscosité intrinsèque  $[\eta]$  du dérivé greffé inférieure à celle de l'alginate. Ils expliquent cette évolution en raison d'une conformation du dérivé greffé moins expansée que celle de l'alginate. Cependant, en régime semi-dilué, le dérivé alginate greffé en  $C_{12}$  possède une viscosité supérieure à celle du précurseur alginate.

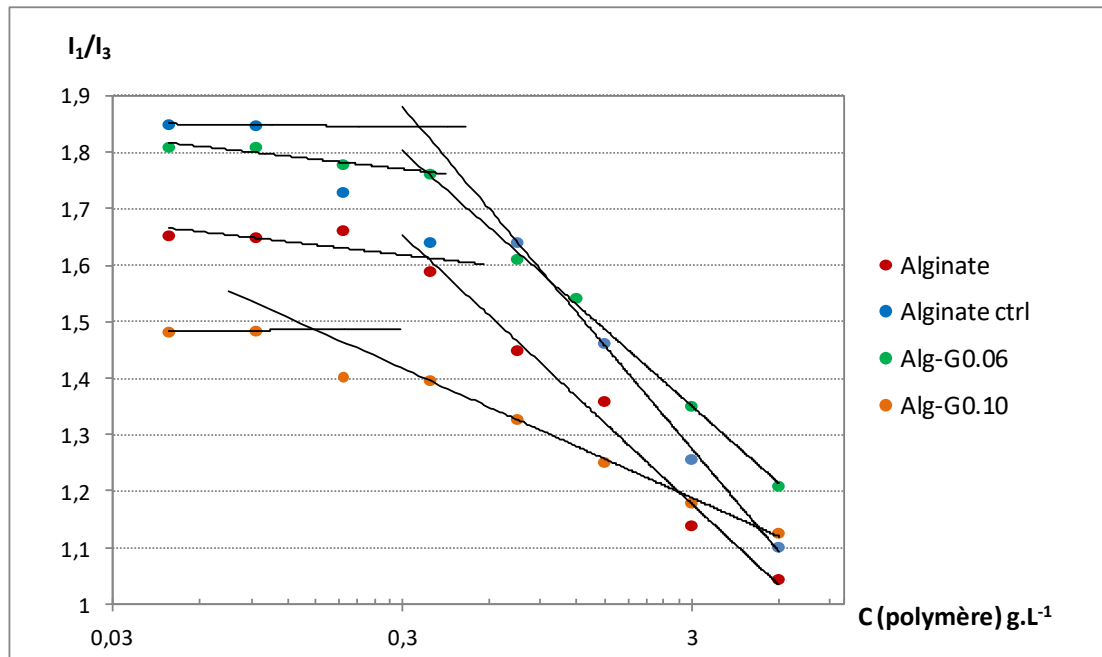
Ce qui est traduit par la prédominance d'interactions intermoléculaires entre greffons alkyles en régime semi-dilué. Simon *et al.*<sup>13</sup> ont montré (en milieu NaCl 0,1 M) sur des systèmes à base de CMP modifiés par des groupements alkyle (C<sub>8</sub>) notamment pour des taux de greffage supérieurs à 30%, que l'augmentation de la concentration se traduisait par une transition des interactions intra vers inter conduisant bien à terme à une amélioration de la rhéologie.

On voit bien ici la différence de comportement entre greffons alkyle menant à des systèmes associatifs plus performants en terme de rhéologie et nos systèmes CMP (ou Alginate) greffés avec l'aminogaiacol (greffon aromatique). Ces derniers conduisent plutôt à des systèmes associatifs avec une prédominance des structures compactes (interactions intramoléculaires) et ce, même dans le domaine semi-dilué, soit un comportement de type polysavon.

### 3.3.3 Fluorescence

Des mesures par fluorescence (en présence du pyrène à  $4.10^{-7}$  M) ont été menées sur des solutions d'Alginate, d'Alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> afin d'étudier le caractère associatif mis en avant précédemment. Les solutions des échantillons sont préparées dans les domaines de concentrations [0,05 – 6] g.L<sup>-1</sup>. Le solvant utilisé est NaCl 0,15 M.

L'évolution du rapport  $I_1/I_3$  des pics du pyrène en fonction de la concentration en polymère est présentée sur la Figure D-27.



**Figure D-27 :** Evolution du rapport  $I_1/I_3$  des bandes d'intensités du pyrène en fonction de la concentration en polymère (en g.L<sup>-1</sup>), dans le solvant NaCl 0,15 M, à 25°C pour l'Alginate, l'Alginate ctrl et les dérivés Alg-G<sub>x</sub>: Alginate (rouge); Alginate ctrl (bleu); Alg-G<sub>0.06</sub> (vert); Alg-G<sub>0.10</sub> (orange).

**Remarque :** Nous avons connu des problèmes techniques pour la réalisation des mesures par fluorescence. L'appareil disponible au sein du laboratoire étant tombé en panne, nous avons réalisé les analyses au moyen de deux spectrofluorimètres différents mais également à des périodes assez éloignées (quelques mois). Cela peut expliquer les décalages que nous observons sur les courbes obtenues au niveau du rapport  $I_1/I_3$  (intensités), notamment dans le cas de l'alginate ctrl et du dérivé Alg-G<sub>0.06</sub> qui possèdent des intensités en pyrène plus importantes en comparaison avec l'alginate. Cependant cela ne modifie pas les valeurs des concentrations d'agrégats critiques obtenues regroupées dans le tableau D-13.

**Tableau D-13 : Valeurs des concentrations d'agrégations critiques (CAC) de l'Alginate, l'Alginate ctrl et les dérivés Alg-G<sub>x</sub>**

	Alginate	Alginate ctrl	Alg-G <sub>0.06</sub>	Alg-G <sub>0.10</sub>
CAC (g.L <sup>-1</sup> )	0,37	0,35	0,36	0,15

En s'intéressant en premier lieu à la courbe de l'alginate précurseur, on observe une baisse du rapport  $I_1/I_3$  du pyrène lorsque la concentration en alginate augmente. Cela démontre que ce polysaccharide, au contraire du CMP, forme des agrégats en solution aqueuse saline. La CAC déterminée est égale à 0,37 g.L<sup>-1</sup>. Ces propriétés associatives de l'alginate ont déjà été mises en avant dans la littérature<sup>11,14</sup>. En effet, Pelletier *et al.*<sup>11</sup> ont démontré la présence d'agrégats formés par l'alginate en milieu NaCl 0,15 M en utilisant le 1,1-dicyano-(4H-N,N-diméthyle-aminophenyle)-1,3-butadiène (DMAC) comme sonde fluorescente hydrophobe. Ils expliquent ce comportement en raison d'un environnement enrichi en fonctions hydroxyle (présentes sur le polysaccharide) lorsque la concentration en alginate augmente. Ainsi à partir d'une certaine concentration, la sonde fluorescente se retrouve dans un milieu semblable à celui d'un alcool. On rappelle que le pyrène présente une valeur du rapport  $I_1/I_3$  dans de l'éthanol égale à 1,1<sup>12</sup>. Les auteurs ont estimé la CAC en alginate comprise entre [0,2 - 0,4] g.L<sup>-1</sup>, ce qui est cohérent avec la valeur trouvée dans notre cas.

Une baisse du rapport  $I_1/I_3$  du pyrène est également observée dans le cas de l'alginate ctrl. La CAC a été déterminée à 0,35 g.L<sup>-1</sup> et est sensiblement égale à celle de l'alginate. L'Alg-G<sub>0.06</sub> présente une CAC quasi-similaire à l'alginate ctrl et égale à 0,36 g.L<sup>-1</sup>. Le dérivé Alg-G<sub>0.10</sub> se démarque avec une CAC égale à 0,15 g.L<sup>-1</sup>. Cette faible valeur illustre probablement la présence d'associations entre greffons hydrophobes.

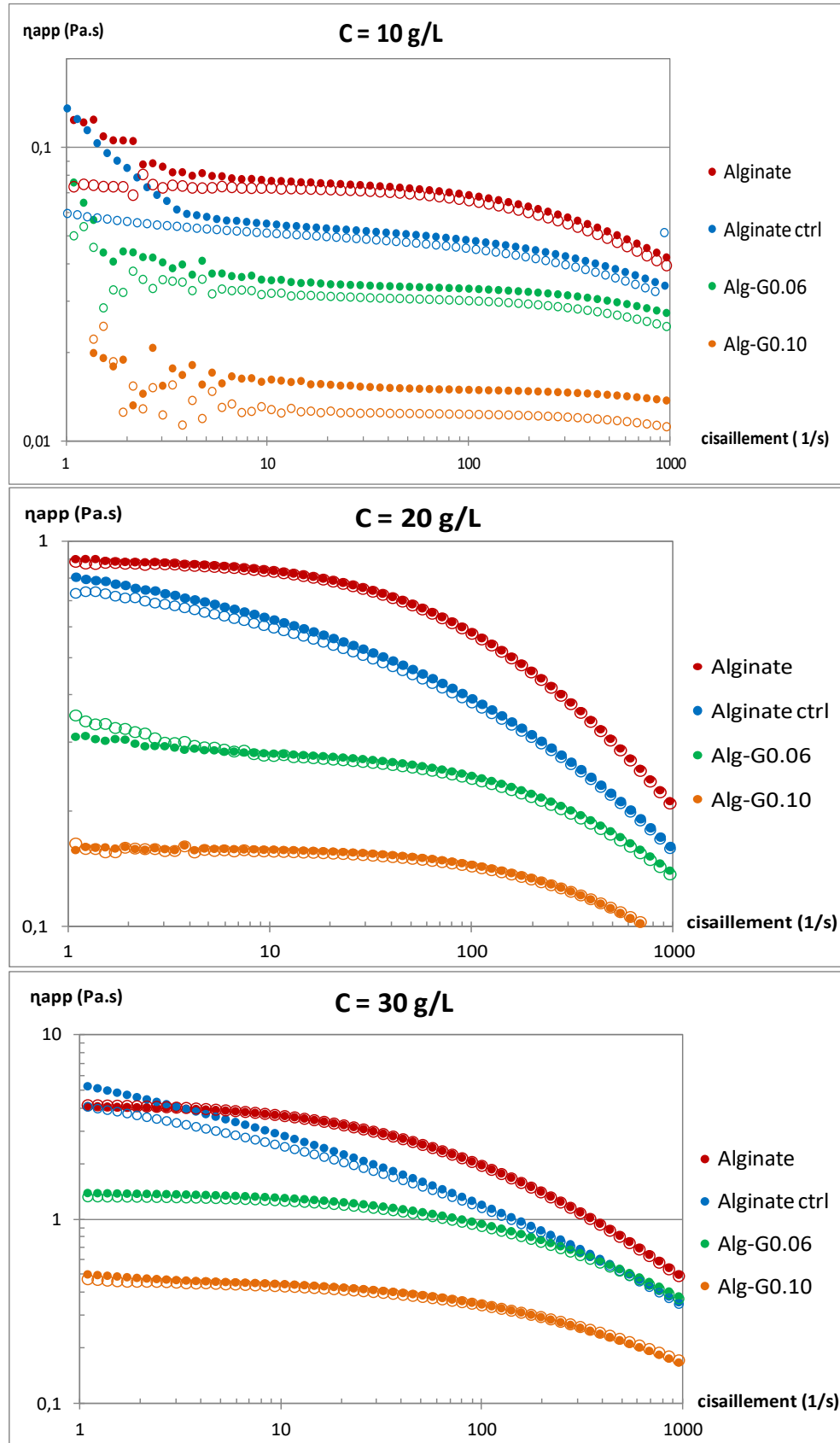
Ainsi la comparaison du pouvoir associatif apporté par les greffons aminogaiacol dans les systèmes Alg-G<sub>x</sub> et CMP-G<sub>x</sub> reste difficile. Bien qu'on remarque que les CAC des dérivés

Alg-G<sub>0,06</sub> et Alg-G<sub>0,10</sub> sont plus faibles que celles des CMP-G<sub>0,05</sub> et CMP-G<sub>0,16</sub>, ces évolutions restent peu significatives. En effet, le caractère agrégatif propre à l'alginate ne nous permet pas d'évaluer l'apport réel du pouvoir associatif des Alg-G<sub>x</sub> essentiellement causé par les greffons aminogaiacol.

### **3.3.4 Mesures rhéologiques : Etude en écoulement**

Les propriétés des dérivés Alg-G<sub>x</sub> en milieu semi-dilué ont été étudiées par rhéologie en mode écoulement (cisaillement compris entre [1-1000] s<sup>-1</sup>) sur des solutions d'Alginate, d'Alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub>, à 10, 20 et 30 g.L<sup>-1</sup> dans du PBS 0,15 M. Les courbes obtenues sont présentées Figure D-28.





**Figure D-28 :** Viscosité apparente des solutions d'Alginate, d'Alginate ctrl et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> en fonction du taux de cisaillement.  $C = 10, 20$  et  $30 \text{ g.L}^{-1}$  dans le solvant PBS  $0,15 \text{ M}$ ; Alginate (rouge), Alginate ctrl (bleu), Alg-G<sub>0,06</sub> (vert), Alg-G<sub>0,10</sub> (orange). Rond plein = aller (augmentation du cisaillement); rond vide = retour (diminution du cisaillement). Géométrie utilisée : cône plan.

D'une manière générale, à  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , l'alginate, l'alginate ctrl ainsi que les dérivés Alg-G<sub>x</sub> présentent un comportement de type newtonien avec une amorce de rhéofluidité aux forts gradients de cisaillement. A 20 et  $30 \text{ g.L}^{-1}$ , l'alginate, l'alginate ctrl et les dérivés Alg-G<sub>x</sub> présentent un comportement plus clairement rhéofluidifiant sur la gamme de gradient de cisaillement étudiée. Ceci constitue une différence notable avec la rhéologie du CMP et les dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Encore une fois, la flexibilité moins marquée de l'alginate apparaît à des concentrations intéressantes beaucoup plus faibles que pour les CMP et avec un comportement rhéofluidifiant.

Les viscosités des dérivés Alg-G<sub>x</sub> restent cependant toujours inférieures à celles du précurseur alginate ctrl et diminuent lorsque le DS(Ga) augmente. Une telle évolution confirme la prédominance d'interactions intramoléculaires entre greffons hydrophobes malgré le changement de régime de concentrations (semi-dilué). Le comportement observé pour les dérivés Alg-G<sub>x</sub> est donc toujours caractéristique de systèmes associatifs qui tendent vers des « polysavons » même si les dérivés Alg-G<sub>x</sub> présentent des viscosités plus importantes que les produits CMP-G<sub>x</sub> et ce, bien que nous travaillons à des concentrations plus faibles dans le cas des produits Alg-G<sub>x</sub> (soit 10, 20,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  au lieu de 50, 100 et  $150 \text{ g.L}^{-1}$  dans le cas des CMP-G<sub>x</sub>).

Il faut par ailleurs noter que tous les produits Alg-G<sub>x</sub> possèdent un caractère non-thixotrope, c'est-à-dire indépendant du temps. En effet, les rhéogrammes obtenus à des taux de cisaillement croissants et décroissants se superposent parfaitement.

### 3.4 Conclusion sur la partie physico-chimique

Les dérivés caractérisés tout au long de cette partie présentent de faibles taux de greffage en aminogaïacol DS(Ga) et des squelettes carbonés : flexible (CMP-G<sub>0.05</sub>) et semi-flexible (<sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>) et (Alg-G<sub>0.06</sub> et Alg-G<sub>0.10</sub>)

Stratégie 1 : Dans le cas des dérivés CMP-G<sub>x</sub>, il a été démontré que même à très faible taux en aminogaïacol (5%), il était encore possible d'avoir des interactions intra et intermoléculaires entre greffons hydrophobes. En régime dilué, ces associations influencent peu la taille ( $R_h$ ,  $[\eta]$ ,  $C_{cr}$ ) du CMP-G<sub>0.05</sub> en comparaison avec le CMP. Le caractère associatif est logiquement clairement diminué pour les taux d'incorporation plus faible en aminogaïacol. Nous arrivons à atteindre néanmoins une CAC pour ce dérivé, ce qui témoigne de la sensibilité de la sonde

pyrène à détecter et s'insérer dans des zones hydrophobes qui pourraient impliquer un très faible nombre greffons. Les études en régime semi-dilué ( $C > C_{cr}$ ) mettent toujours en avant une conservation prédominante des interactions de type intramoléculaire avec des viscosités légèrement plus faibles que celles du précurseur. Les propriétés rhéologiques du CMP-G<sub>0.05</sub> ne sont donc pas améliorées comparé au CMP. Cependant et de façon attendue, le caractère associatif du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> est beaucoup moins marqué que celui de ses homologues plus modifiés. Ce caractère associatif globalement affaibli du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> pourrait rendre plus disponibles les greffons aminogaiacol et améliorées les propriétés recherchées, notamment antibactériennes.

Stratégie 2 : Les produits greffés CMP-G<sub>0.05</sub> et <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> possèdent des masses molaires et des viscosités différentes en solution cependant ces deux composés adoptent des conformations similaires en solution, de type pelote statistique. Le <sup>d</sup>CMP conserve un caractère flexible. D'une manière générale, les résultats obtenus par SEC/MALLS/DRI/Visco à 15 g.L<sup>-1</sup> ne nous permettent pas de conclure sur l'existence d'un pouvoir associatif du <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>. Les résultats obtenus en fluorescence à 1 g.L<sup>-1</sup> illustrent cependant une capacité du dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> similaire à celle du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> à former des micro-domaines hydrophobes en solution saline, avec précisément une CAC sensiblement identique (~1,2). Au final, le dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> possède quand même un caractère faiblement associatif.

Stratégie 3 : L'Alginate et le CMP présentent des squelettes différents : semi-flexible dans le cas de l'alginate et flexible dans le cas du CMP. Cependant, les études physico-chimiques en régime dilué montrent que les dérivés greffés Alg-G<sub>x</sub> présentent toujours un comportement associatif (à faible taux : 6 et 10 %). Au regard du faible taux de greffage, la présence d'associations hydrophobes notamment dans le cas de l'Alg-G<sub>0.06</sub> influence peu la taille ( $R_h$ ,  $[\eta]$ ) et la  $C_{cr}$  en comparaison avec le précurseur alginate ctrl. L'effet associatif est sensiblement plus marqué dans le cas du dérivé Alg-G<sub>0.10</sub>. D'une manière plus générale, les comportements des dérivés Alg-G<sub>0.06</sub> et Alg-G<sub>0.10</sub> semblent comparables à ceux des dérivés CMP-G<sub>x</sub> (CMP-G<sub>0.05</sub> et CMP-G<sub>0.16</sub>). Dans ce cas, notre stratégie d'utiliser un polysaccharide moins flexible que le CMP pour limiter le pouvoir associatif notamment intramoléculaire n'est pas validée. Il faut noter que les dérivés Alg-G<sub>x</sub> présentent en régime semi-dilué des viscosités légèrement inférieures à celle de leur précurseur alginate ctrl. Cependant, la plus grande rigidité de l'alginate induit des propriétés épaississantes plus importantes que celles des dérivés de CMP pour des concentrations en polymère bien plus faibles avec en plus

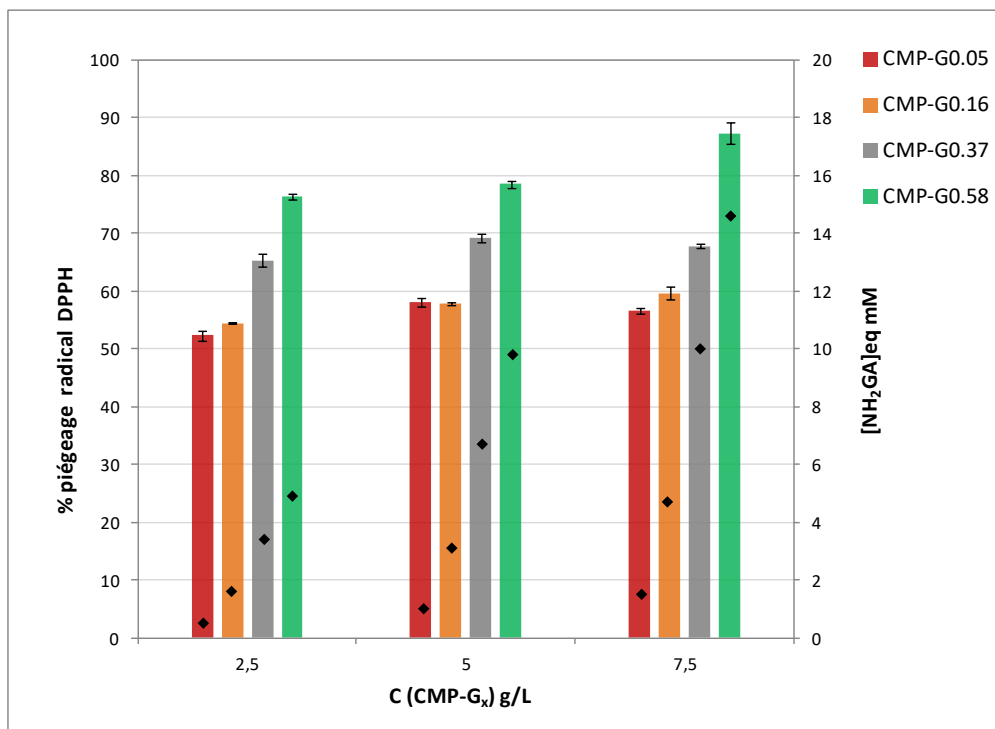
l'apparition d'un caractère rhéofluidifiant. Nous avons donc pu obtenir des propriétés rhéologiques améliorées.

Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus suite à l'évaluation des propriétés antioxydantes des nouveaux dérivés synthétisés : CMP-G<sub>0.05</sub>, <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>, Alg-G<sub>0.06</sub> et Alg-G<sub>0.10</sub>.

## 4 Propriétés antioxydantes

### 4.1 Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G)

L'activité antioxydante du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> a été évaluée vis-à-vis du radical DPPH• à des concentrations similaires à celles du CMP et des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub> ; soit 2,5; 5 et 7,5 g.L<sup>-1</sup>. Les pourcentages de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration en dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> sont présentés sur la Figure D-29 et comparés aux résultats des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>.

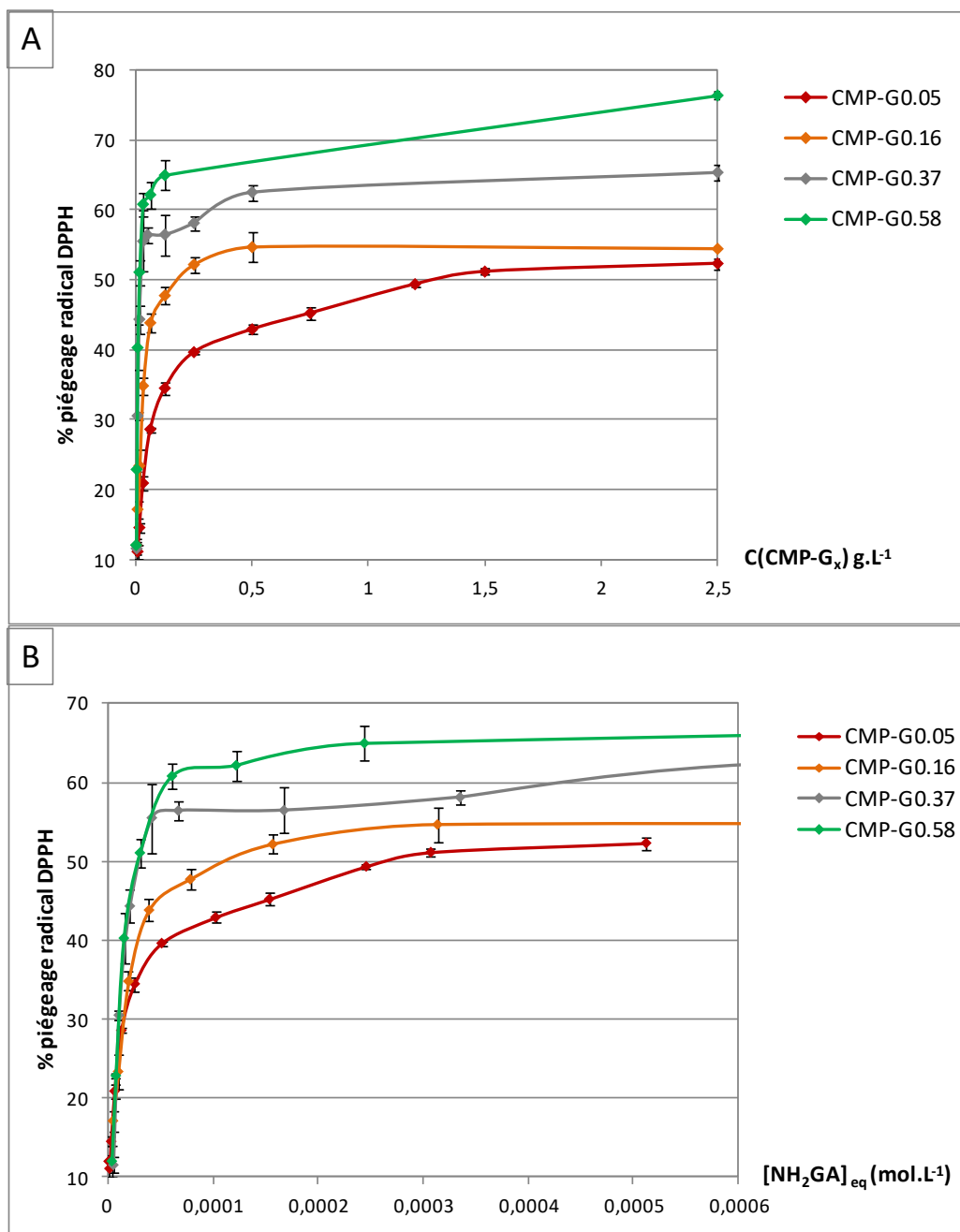


**Figure D-29** : Pourcentages de piégeage du radical DPPH• en présence du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> (rouge) et des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>. (mesures réalisées en triplicat). Concentrations équivalentes en NH<sub>2</sub>GA (♦) sur l'axe de droite. Analyse au temps t = 5min

Rappelons que le CMP précurseur n'avait démontré aucune activité à 2,5 ; 7,5 et 10 g.L<sup>-1</sup>. Le dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> possède une activité antioxydante à ces mêmes concentrations.

Les pourcentages de piégeage du radical DPPH• en présence du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> restent quasiment constants quelle que soit la concentration en polymère et sont compris entre 50 et 60 %. Le pourcentage de piégeage maximal atteint est de (56,7±0,5) % à 7,5 g.L<sup>-1</sup>. On peut noter que les résultats obtenus pour le CMP-G<sub>0.05</sub> à 2,5 ; 7,5 et 10 g.L<sup>-1</sup> sont très proches de ceux obtenus pour le CMP-G<sub>0.16</sub>.

Par la suite, afin de déterminer la concentration IC<sub>50</sub> du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub>, des mesures d'absorbances par UV ont été effectuées sur des solutions de CMP-G<sub>0.05</sub> en présence du radical DPPH• sur une gamme de concentrations [0,004 – 2,5] mg.mL<sup>-1</sup> dans un milieu (PBS 0,15 M / Ethanol 50/50) (Figure D-30A). Les courbes de tous les dérivés CMP-G<sub>x</sub> ont également été additionnées pour comparaison.



**Figure D-30 :** A) Pourcentages moyens de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration en produits CMP-G<sub>x</sub>. B) Pourcentages moyens de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration équivalente en NH<sub>2</sub>GA, [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub>. Analyse au temps t = 5 min (mesures réalisées en triplicat).

Sur la Figure D-30 A), on constate que les pourcentages de piégeage du radical DPPH• augmentent rapidement avec la concentration en dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> avant d'atteindre un palier. On obtient donc une évolution similaire à celle des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>. La IC<sub>50</sub> déterminée dans le cas du dérivé CMP-G<sub>0,05</sub> est égale à 1300 µg.mL<sup>-1</sup>. Cette valeur est supérieure aux concentrations IC<sub>50</sub> au préalable obtenues (chapitre C) pour le CMP-G<sub>0,16</sub>, CMP-G<sub>0,37</sub> et le CMP-G<sub>0,58</sub>, respectivement égales à 179 µg.mL<sup>-1</sup>, 24 µg.mL<sup>-1</sup> et 13 µg.mL<sup>-1</sup>.

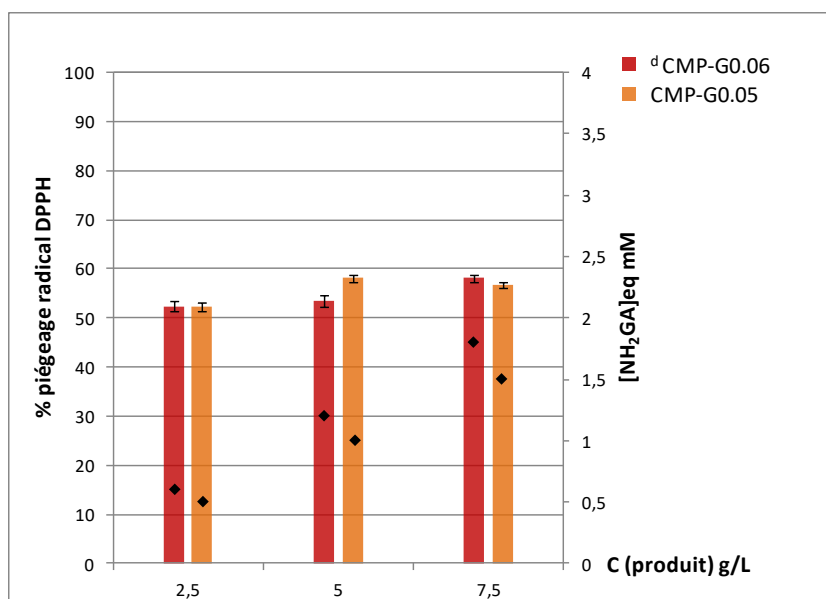
Cela démontre une activité antioxydante moins importante pour le dérivé CMP-G<sub>0.05</sub>. Cette évolution est cohérente et pouvait être attendue en raison du faible taux de greffage du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub>. On peut tout de même noter que les dérivés CMP-G<sub>0.05</sub> et CMP-G<sub>0.16</sub> atteignent des activités antioxydantes maximales quasi-similaires aux concentrations d'étude les plus élevées (> IC<sub>50</sub>).

Nous avons également représenté sur la Figure D-30 B), les pourcentages de piégeage du radical DPPH• en fonction cette fois-ci de la concentration équivalente en aminogaiacol [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> présente dans les différents produits CMP-G<sub>x</sub> (aux différentes concentrations C(CMP-G<sub>x</sub>) testées). A concentration [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub> fixe, l'activité antioxydante augmente avec le DS(Ga). On confirme l'hypothèse formulée dans le chapitre C: l'activité antioxydante serait alors effectivement dépendante du caractère associatif. Plus ce dernier est marqué, meilleure semble être l'activité. En d'autres termes, l'activité antioxydante serait plus importante au sein d'un cluster (zone d'agrégation) que pour des greffons isolés.

#### 4.2 Stratégie 2 : diminution de la masse molaire (<sup>d</sup>CMP et <sup>d</sup>CMP-G)

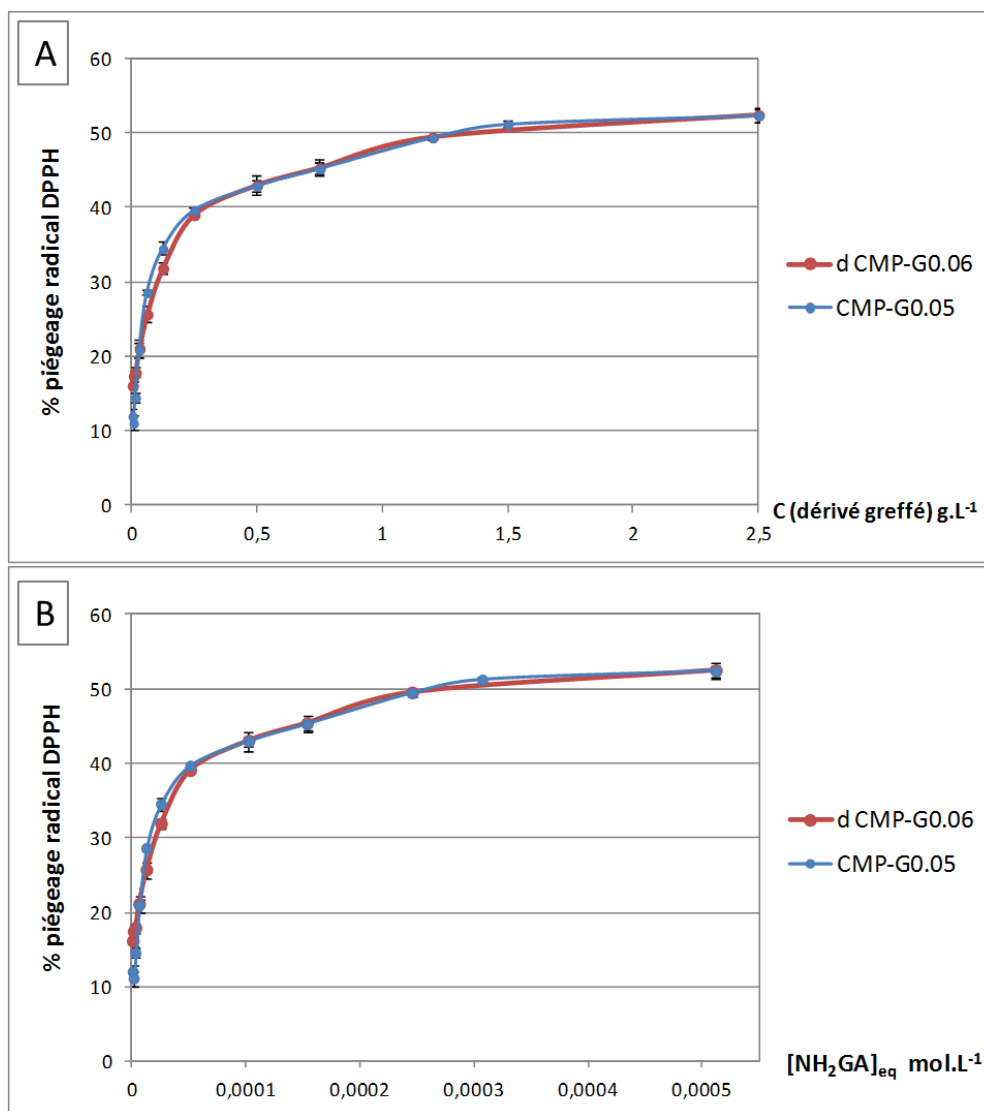
Les activités antioxydantes du CMP dégradé (<sup>d</sup>CMP) et du dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> ont été évaluées contre le radical DPPH• à 2,5 ; 7,5 et 10 g.L<sup>-1</sup>.

A l'instar du CMP précurseur non dégradé, le CMP dégradé n'a démontré aucune propriété antioxydante. Les pourcentages de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration en dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> sont présentées sur la figure D-31. Les résultats du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> de haute masse molaire ont été ajoutés pour comparaison.



**Figure D-31** : Pourcentages de piégeage du radical DPPH• en présence du dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> (rouge) et du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> (orange) ; (mesures réalisées en triplicat). Concentrations équivalentes en NH<sub>2</sub>GA (◆) sur l'axe de droite. Analyse au temps t = 5min

Le dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  possède des propriétés antioxydantes comprises entre 50 et 60 % et quasiment constantes quelle que soit la concentration d'étude. Ces propriétés sont similaires à celles du dérivé  $\text{CMP-G}_{0.05}$ . Par la suite, des concentrations plus faibles en dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  ont été évaluées, soient comprises entre  $[0,004 - 2,5]$   $\text{mg.mL}^{-1}$  dans un milieu (PBS 0,15 M / Ethanol 50/50). La courbe représentant les pourcentages de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration en produit  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  est présentée ci-dessous (Figure D-32 A). La courbe du  $\text{CMP-G}_{0.05}$  est ajoutée pour comparaison.



**Figure D-32.** A) Pourcentages moyens de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration en dérivés greffés  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  et  $\text{CMP-G}_{0.05}$ . B) Pourcentages moyens de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration équivalente en  $\text{NH}_2\text{GA}$ ,  $[\text{NH}_2\text{GA}]_{\text{eq}}$ . Analyse au temps  $t = 5$  min (mesures réalisées en triplicat)

Sur la Figure D-32 A), on remarque que la courbe obtenue dans le cas du dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  est sensiblement identique à celle du dérivé  $\text{CMP-G}_{0.05}$  (haute masse molaire). Ces évolutions similaires sont également obtenues en représentant les courbes de pourcentages de piégeage



du radical DPPH• en fonction de la concentration équivalente en aminogaiacol  $[\text{NH}_2\text{GA}]_{\text{eq}}$  présent dans les différents produits  $^{\text{d}}\text{CMP-G}_{0.06}$  et  $\text{CMP-G}_{0.05}$  (Figure D-32 B).

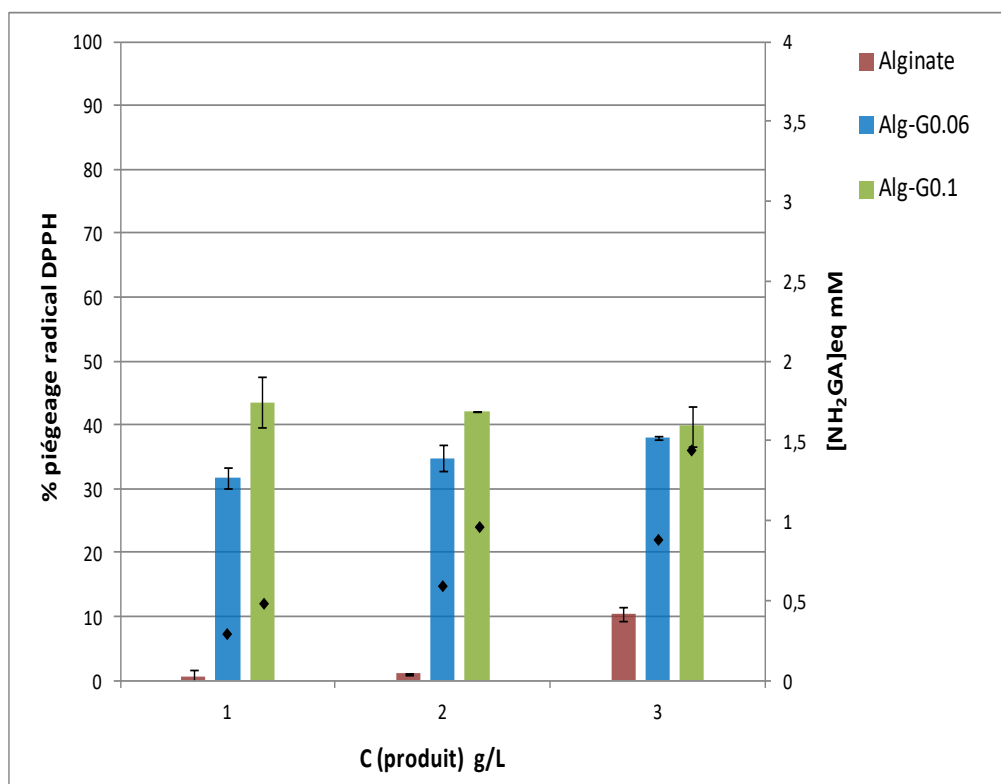
La  $\text{IC}_{50}$  du dérivé  $^{\text{d}}\text{CMP-G}_{0.06}$  est égale à  $1400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  et similaire à celle du dérivé  $\text{CMP-G}_{0.05}$   $1300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ces résultats sont cohérents étant donné que ces deux dérivés présentent un taux de greffage en aminogaiacol sensiblement égal (5 et 6%) et un faible caractère associatif. Ce qui confirme l'hypothèse de départ sur l'activité antioxydante des dérivés greffés.

### 4.3 Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G)

Les activités antioxydantes de l'alginate et de ses dérivés  $\text{Alg-G}_x$  ont été évaluées contre le radical DPPH• à 1 ; 2 et  $3 \text{ g.L}^{-1}$ . Nous avons travaillé à des concentrations en échantillon plus faibles que dans le cas du CMP (ou du  $^{\text{d}}\text{CMP}$ ) en raison de la viscosité prononcée des solutions d'alginate et de ses dérivés. De plus à des concentrations supérieures à  $3 \text{ g.L}^{-1}$ , l'éthanol conduisait à la précipitation du polysaccharide.

Remarque : L'effet du temps d'analyse sur les activités antioxydantes des dérivés  $\text{Alg-G}_x$  a été étudié à 5 et 30 min. A 30 min, des pourcentages de piégeage du radical DPPH• légèrement plus importants ont été déterminés. Nous avons décidé de présenter les résultats obtenus après 30 min.

Les pourcentages de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration en alginate et dérivés  $\text{Alg-G}_x$  sont présentées sur la Figure D-33.



**Figure D-33 :** Pourcentages de piégeage du radical DPPH• en présence de l’alginate (rouge) et des dérivés Alg-G<sub>0.06</sub> (bleu) et Alg-G<sub>0.10</sub> (vert) (mesures réalisées en triplicat). Concentrations équivalentes en NH<sub>2</sub>GA (♦) sur l’axe de droite. Analyse au temps t = 30min.

L’alginate précurseur possède des propriétés antioxydantes qui restent globalement faibles ( $\leq 10\%$ ) et qui augmentent toutefois en fonction de la concentration en alginate (sur la gamme étudiée). Sari-Chmayssem *et al.*<sup>15</sup> ont démontré pour des concentrations similaires à notre étude, des activités antioxydantes de l’alginate plus élevées. Ils ont utilisé un alginate de sodium avec un rapport M/G = 0,785 inférieur à notre cas (1,2). Les auteurs indiquent qu’une diminution de l’efficacité de piégeage des radicaux par l’alginate peut être attribuée à la baisse de la teneur en blocs G.

Le pourcentage maximum déterminé à 3 g.L<sup>-1</sup> est égal à  $(10,5 \pm 1,0)\%$ . On remarque que le greffage de l’aminogaiacol sur l’alginate améliore les propriétés antioxydantes du précurseur. En effet, les dérivés Alg-G<sub>x</sub> sont également actifs vis-à-vis du radical DPPH• à 1, 2 et 3 g.L<sup>-1</sup> avec des valeurs de pourcentages de piégeage plus importantes comparé au précurseur.

On constate qu’à concentration fixe en Alg-G<sub>x</sub>, les pourcentages déterminés augmentent légèrement avec le degré de substitution en aminogaiacol DS(Ga). Jusqu’à 2 g.L<sup>-1</sup>, le pouvoir antioxydant est amélioré par la présence plus importante de greffons (i.e. évolue avec le DS(Ga)). A partir de 3 g.L<sup>-1</sup>, le pouvoir antioxydant est quasi similaire entre les deux alginates modifiés et ne semble plus dépendre du DS(Ga). De plus, on remarque également

que pour un DS(Ga) fixe, le pourcentage de piégeage du radical DPPH• varie très peu (plateau) quelle que soit la concentration en produit testé.

Par ailleurs, il faut noter que quel que soit le dérivé étudié, l'activité maximale atteinte déterminée est inférieure à 50%. Et comme nous l'avons vu, l'augmentation de la concentration ne permet pas d'augmenter le piégeage. Il n'a donc pas été possible de remonter aux concentrations IC<sub>50</sub> dans le cas des dérivés Alg-G<sub>x</sub>.

On rappelle que les dérivés CMP-G<sub>0.05</sub> et CMP-G<sub>0.16</sub>, dans les mêmes gammes de concentrations, présentaient des activités supérieures à 50% (dès 2,5 g.L<sup>-1</sup>) et des IC<sub>50</sub> respectivement égales à 1300 et 179 µg.mL<sup>-1</sup>. Les produits Alg-G<sub>x</sub> semblent donc moins actifs que les CMP-G<sub>x</sub>. Nous rappelons que les résultats obtenus en physico-chimie nous avaient permis de démontrer que les dérivés Alg-G<sub>0.06</sub> et Alg-G<sub>0.10</sub> présentaient un caractère associatif comparable à ceux des dérivés CMP-G<sub>x</sub> (CMP-G<sub>0.05</sub> et CMP-G<sub>0.06</sub>). La principale différence entre ces systèmes est observée au niveau des viscosités plus importantes dans le cas de l'alginate et de ses dérivés. Ainsi, ne pourrait-on pas considérer également une incidence de la viscosité du milieu largement plus importante dans le cas des dérivés d'alginate avec des effets sur les phénomènes de diffusion des radicaux DPPH• et/ou de la mobilité des chaînes de polymère ? Par ailleurs, il serait peut être possible d'améliorer les activités observées en réalisant des tests similaires à des temps encore plus importants (>30 min). Cela pourrait peut être permettre une meilleure dynamique du système et améliorer les activités qui sont observées.

#### 4.4 Conclusion sur les propriétés antioxydantes

Les résultats obtenus suite aux tests antioxydants ont permis de confirmer (aux faibles taux de greffage DS(Ga)) l'hypothèse au préalable formulée dans le chapitre C : les activités antioxydantes sont fonction du caractère associatif des dérivés greffés et en particulier de la présence de micro-domaines ou clusters d'aminogaiacol.

Stratégie 1 : Le dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> présente un caractère associatif affaibli en comparaison avec les autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Les activités antioxydantes du CMP-G<sub>0.05</sub> se sont avérées être moins efficaces en comparaison avec ses homologues greffés. Nous avons précisément déterminé une IC<sub>50</sub> dans le cas du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> égale à 1300 µg.mL<sup>-1</sup>. Cette valeur est supérieure aux concentrations IC<sub>50</sub> des produits CMP-G<sub>0.16</sub>, CMP-G<sub>0.37</sub> et le CMP-G<sub>0.58</sub>, respectivement égales à 179 µg.mL<sup>-1</sup>, 24 µg.mL<sup>-1</sup> et 13 µg.mL<sup>-1</sup>.

**Stratégie 2 :** Les dérivés CMP-G<sub>0.05</sub> et <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> possèdent des degrés DS(Ga) similaires et tous les deux des comportements associatifs faibles et comparables. Les activités antioxydantes observées sont presque identiques avec respectivement des IC<sub>50</sub> égales à 1300 µg.mL<sup>-1</sup> et à 1400 µg.mL<sup>-1</sup> pour le dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> et le <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>.

**Stratégie 3 :** Dans le cas des dérivés Alg-G<sub>0.06</sub> et CMP-G<sub>0.05</sub> (DS(Ga) similaires), le comportement associatif est faible et presque comparable. Il a été cependant démontré que les activités antioxydantes varient. L'IC<sub>50</sub> du CMP-G<sub>0.05</sub> est égale à 1300 µg.mL<sup>-1</sup> et nous n'avons pas accès à l'IC<sub>50</sub> du dérivé Alg-G<sub>0.06</sub>. Les viscosités plus prononcées des solutions d'alginate et Alg-G<sub>x</sub> comparées aux solutions du CMP et des CMP-G<sub>x</sub> semblent être un facteur limitant dans le cas des activités antioxydantes.

Nous allons maintenant aborder la partie concernant les propriétés antibactériennes des nouveaux dérivés synthétisés.

## 5 Propriétés antibactériennes

Les activités antibactériennes du dérivé greffé CMP-G<sub>0.05</sub>, de l'alginate et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> ont été évaluées face à la bactérie *S.aureus*, à un ensemencement fixé à 10<sup>6</sup> UFC/mL et au moyen d'une méthode de comptage au préalable utilisée dans le chapitre C. Nous n'avons pas étudié le système <sup>d</sup>CMP qui ne présentent à l'évidence pas de propriétés rhéologiques intéressantes. Par la suite, nous aborderons donc uniquement les résultats relatifs aux tests antibactériens concernant les stratégies 1 et 3.

### 5.1 Stratégie 1 : diminution du taux de greffage (CMP et CMP-G)

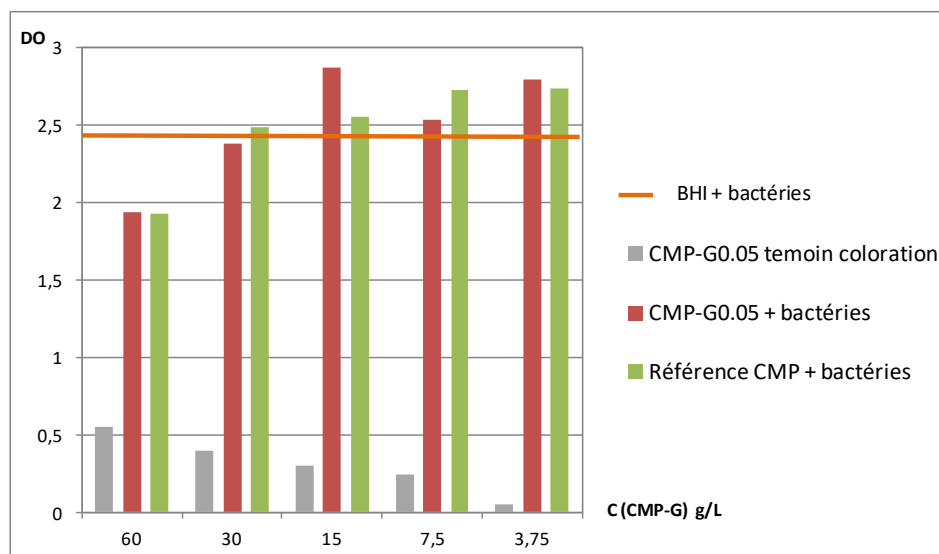
#### 5.1.1 CMP vs *S.aureus*

Pour rappel, les résultats obtenus suite à l'évaluation de l'activité antibactérienne du CMP face à la bactérie *S.aureus* sont présentés dans le chapitre C. Le CMP n'a démontré aucune propriété antibactérienne aux concentrations d'étude testée. A l'exemple des tests effectués dans le cas des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>, le CMP sera utilisé par la suite comme gamme de référence pour les essais avec le CMP-G<sub>0.05</sub>.

#### 5.1.2 CMP-G<sub>0.05</sub> vs *S.aureus*

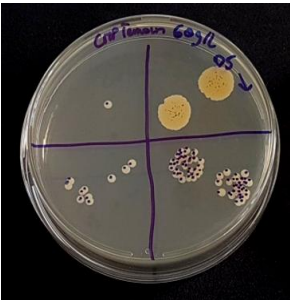

Les gammes de dilutions du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> ont été préparées à des concentrations comprises entre [60 – 3,75] g.L<sup>-1</sup> avec une gamme témoin coloration et une gamme de CMP

en parallèle. L'ensemencement est fixé à  $10^6$  CFU/mL. Les résultats obtenus suite aux lectures des DO sont présentés sur la Figure D-34.



**Figure D-34 :** Lectures des densités optiques (DO) obtenues pour chacune des gammes de dilutions du CMP-G<sub>0.05</sub> après 24 h d'incubation et à 37°C. Gamme témoin coloration CMP-G<sub>0.05</sub> (gris), gamme CMP-G<sub>0.05</sub> ensemencée (en rouge), gamme témoin CMP (en vert), pot BHI ensemencé (en orange).

La valeur de DO lue dans le cas du pot BHI ensemencé (~2,4) témoigne d'une bonne croissance des bactéries. La gamme de référence CMP démontre des valeurs de DO élevées et voisines de celles du pot témoin BHI ensemencé. La gamme du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> démontre également des valeurs de DO élevées. Les résultats concernant les DO sont qualitatifs, ils ne permettent pas réellement de conclure quant à une activité antibactérienne de CMP-G<sub>0.05</sub>. Nous avons donc procédé au dénombrement pour les concentrations 60, 30 et 15 g.L<sup>-1</sup> comme à l'exemple des dérivés CMP-G<sub>0.16</sub> et CMP-G<sub>0.37</sub>. Les images des boîtes de gélose correspondant à la concentration la plus élevée (60 g.L<sup>-1</sup>) en CMP-G<sub>0.05</sub> sont présentées sur la Figure D-35. Seules les boîtes (donc les dilutions) où les comptages sont significatifs sont représentées.

	Référence CMP $C(\text{CMP}) = 60 \text{ g.L}^{-1}$	Produit CMP-G <sub>0.05</sub> $C(\text{CMP-G}_{0.05}) = 60 \text{ g.L}^{-1}$
Photos des boîtes de pétri après 24h à 37°C		

**Figure D-35** : Images des boîtes de géloseensemencées obtenues dans le cas du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> à  $60 \text{ g.L}^{-1}$  ; après incubation (24 h, 37°C) aux dilutions 5 à 8.

On constate par exemple dans le cas de la référence CMP, qu'à la dilution 5 (quarts en haut à droite sur les images), le nombre de colonies de bactéries est très important, non discernable et incomptable. Tandis qu'en présence du CMP-G<sub>0.05</sub>, il y a très peu de bactéries et les colonies peuvent être dénombrées.

Les activités antibactériennes obtenues pour le dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> à 60, 30 et 15  $\text{g.L}^{-1}$  sont regroupées dans le tableau D-14. Les calculs ont été effectués avec une valeur moyenne pour la référence CMP de  $3,7 \times 10^9 \text{ CFU/mL}$  (même valeur utilisée dans le cas des autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>).

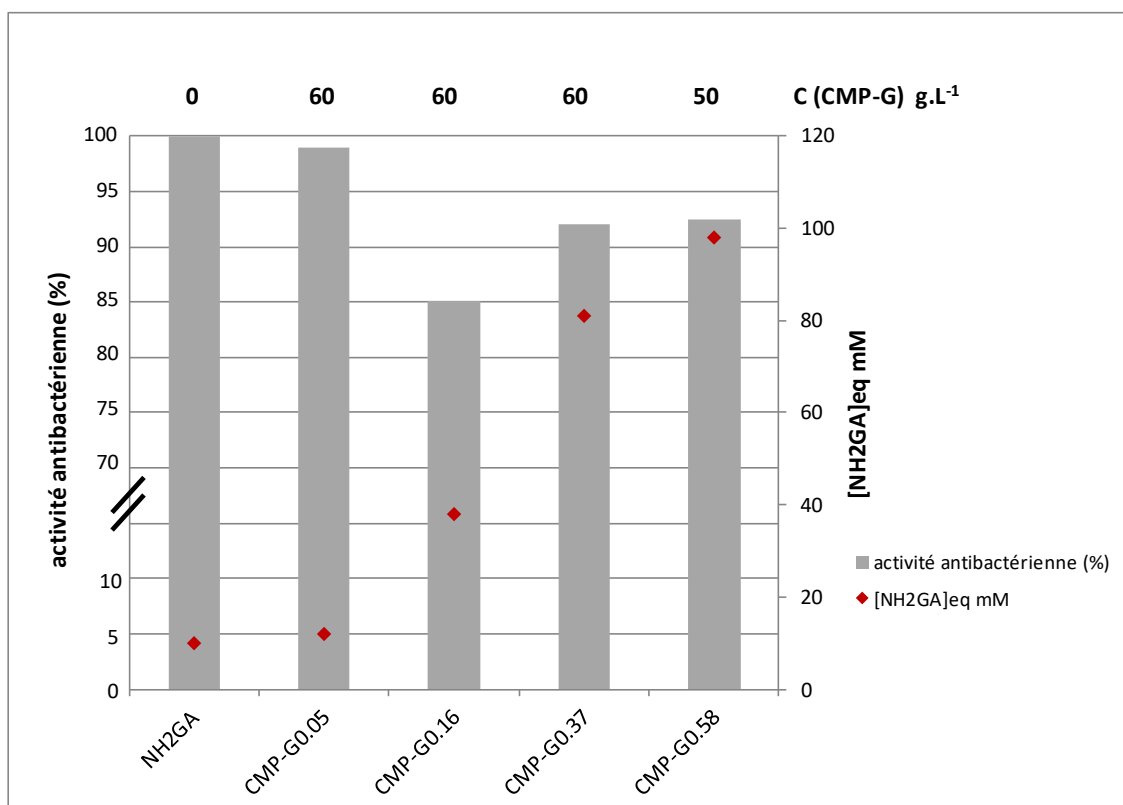
**Tableau D-14** : Activité antibactérienne (%) du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> (essais préliminaires)

	[CMP-G <sub>0.05</sub> ] $\text{g.L}^{-1}$	[NH <sub>2</sub> GA] <sub>eq</sub> mM	CFU/mL (CMP-G <sub>0.05</sub> )	Activité antibactérienne (%)
CMP-G <sub>0.05</sub>	60	12,3	$3,0 \times 10^7$	99,2
			$4,7 \times 10^7$	98,7
	30	6,1	$2,0 \times 10^9$	45,9
			$2,4 \times 10^9$	35,1
	15	3,1	$2,6 \times 10^9$	29,7
			-	-

Le CMP-G<sub>0.05</sub> possède des propriétés antibactériennes avec une activité maximale égale à environ 99,0 %. Ces activités augmentent globalement avec la concentration en greffons aminogaiacol [NH<sub>2</sub>GA]<sub>eq</sub>. Pour rappel, les dérivés greffés CMP-G<sub>0.16</sub>, CMP-G<sub>0.37</sub> présentaient

des activités respectivement égales à 85,1 % et 92,1 % précisément à  $60 \text{ g.L}^{-1}$  (Figure D-36). Le dérivé CMP-G<sub>0.58</sub> avait démontré une activité égale à 92,5 % précisément à  $50 \text{ g.L}^{-1}$  (Figure D-36). La meilleure activité antibactérienne est donc observée pour le dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> (à  $60 \text{ g.L}^{-1}$ ), avec une quantité équivalente en greffons aminogaiacol  $[\text{NH}_2\text{GA}]_{\text{eq}}$  égale à 12 mM. Cette dernière est plus faible que les concentrations  $[\text{NH}_2\text{GA}]_{\text{eq}}$  présentes dans les autres dérivés greffés. Notamment, 98 mM ; 81 mM et 38 mM respectivement pour les produits CMP-G<sub>0.58</sub>, CMP-G<sub>0.37</sub> et CMP-G<sub>0.16</sub>. Un taux de greffage faible en aminogaiacol suffirait donc pour atteindre des activités optimales.

Nous avons donc réussi à améliorer les propriétés antibactériennes des CMP-G<sub>x</sub> en diminuant le taux de greffage en aminogaiacol. Ce résultat est expliqué en raison du faible caractère associatif du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> mis en avant par les études effectuées en physico-chimie. Ce résultat apparaît important, il semble bien indiquer que les greffons aminogaiacol sont d'autant plus actifs qu'ils sont disponibles (i.e. non impliqués dans des clusters) pour agir sur la membrane des bactéries.



**Figure D-36 :** Activités antibactériennes (%) de l'aminogaiacol (NH<sub>2</sub>GA) ainsi que de tous les dérivés greffés CMP-G<sub>x</sub> aux plus hautes concentrations d'études testées :  $60 \text{ g.L}^{-1}$  (CMP-G<sub>0.05</sub> ; CMP-G<sub>0.16</sub> et CMP-G<sub>0.37</sub>) et à  $50 \text{ g.L}^{-1}$  (CMP-G<sub>0.58</sub>). Concentrations équivalentes en NH<sub>2</sub>GA notées  $[\text{NH}_2\text{GA}]_{\text{eq}}$  (♦)

Par ailleurs, l'aminogaiacol greffé reste toujours moins actif que la molécule libre. En effet, à  $60 \text{ g.L}^{-1}$  en CMP-G<sub>0.05</sub> ( $[\text{NH}_2\text{GA}]_{\text{eq}} = 12 \text{ mM}$ ), soit quasiment similaire à la CMB de l'aminogaiacol (10 mM), le CMP-G<sub>0.05</sub> possède une activité égale à 99,0 %, (inférieure à 99,99 %).

## 5.2 Stratégie 3 : rigidification de la chaîne (Alginate et Alg-G)

Les gammes de dilutions de l'alginate et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> ont été préparées à des concentrations comprises entre  $[20 - 1,25] \text{ g.L}^{-1}$ . Ces dernières sont inférieures aux concentrations testées dans le cas du CMP en raison de la forte viscosité de l'alginate. Les gammes de références utilisées sont : le solvant PBS/BHI dans le cas de l'alginate et les solutions d'alginate dans le cas des dérivés Alg-G<sub>x</sub>. L'ensemencement est fixé à  $10^6 \text{ CFU/mL}$ .

Remarque : Il faut préciser que la préparation des gammes de dilutions n'a pas toujours été évidente. Notamment, en raison de la viscosité des solutions d'Alginate (et dérivés) qui était parfois gênante pour les prélèvements des volumes. Nous avons utilisé dans certains cas (Alginate et Alg-G<sub>0.06</sub>) une pipette (et des cônes) appropriés pour le prélèvement des solutions visqueuses.

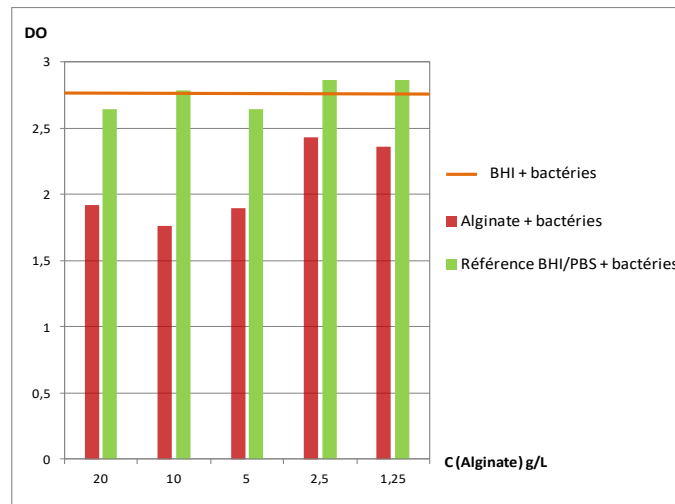
### 5.2.1 Alginate vs *S.aureus*

La valeur de DO lue dans le cas du pot BHI ensemencé (~2,5) témoigne d'une bonne croissance des bactéries (Figure D-37). La gamme de référence PBS/BHI démontre des valeurs de DO élevées et voisines de celles du pot témoin BHI ensemencé.

En présence de l'Alginate, les valeurs de DO sont voisines de 2. Au vu des hautes valeurs des DO, proches de celle du pot témoin BHI ensemencé, on conclut que l'alginate ne possède pas d'activité antibactérienne aux concentrations d'étude testées.

Comme à l'exemple des CMP-G<sub>x</sub>, l'alginate précurseur sera utilisé par la suite comme gamme de référence dans le cas des tests des dérivés Alg-G<sub>x</sub>.





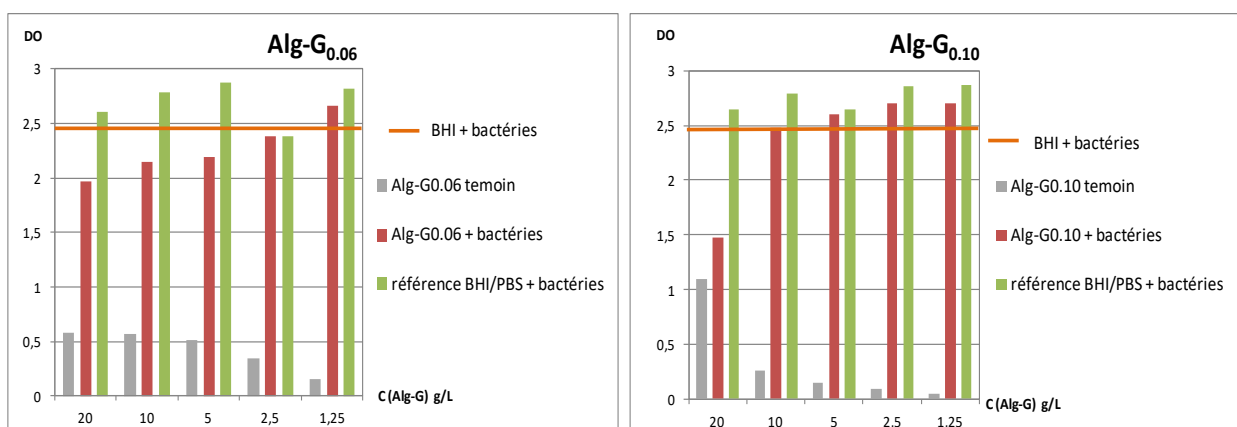
**Figure D-37 :** Lectures des densités optiques (DO) obtenues pour chacune des gammes de dilutions de l’Alg après 24 h d’incubation et à 37°C. Gamme Algensemencée (en rouge), gamme référence BHI/PBSensemencée (en vert), pot BHIensemencé (en orange).

### 5.2.2 Alg-G<sub>x</sub> vs *S.aureus*

La valeur de DO lue dans le cas du pot BHIensemencé (~ 2,5) témoigne d’une bonne croissance des bactéries (Figure D-38).

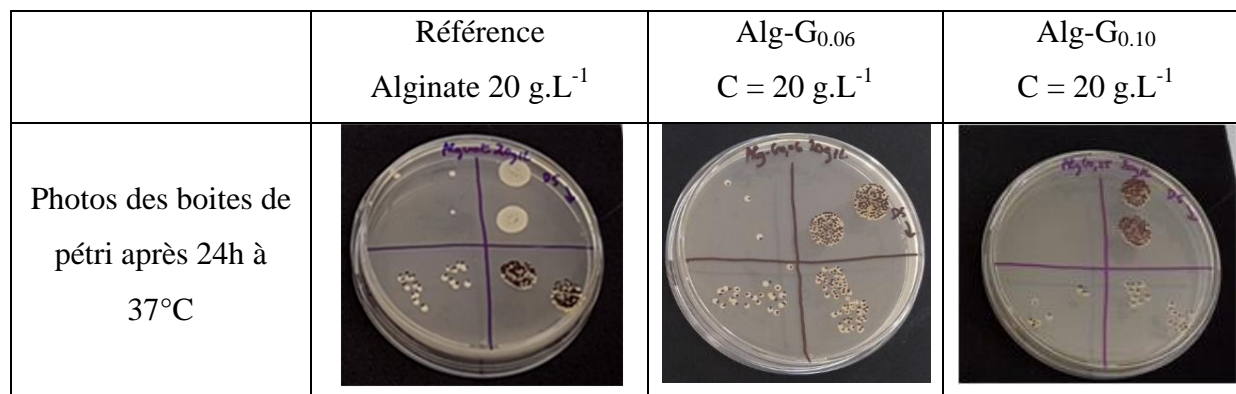
Concernant la gamme témoin de coloration, on constate que les DO diminuent avec la concentration en Alg-G<sub>x</sub>. Cette évolution est logique.

Les lectures des DO des gammes Alg-G<sub>x</sub> en présence des bactéries *S. aureus* sont effectuées après avoir retranché la DO du blanc (coloration) de la concentration en Alg-G<sub>x</sub> correspondante. Concernant le dérivé Alg-G<sub>0,06</sub>, on remarque que les valeurs de DO sont élevées (~ 2), ce qui témoigne déjà d’une faible activité antibactérienne. Pour le dérivé Alg-G<sub>0,10</sub>, les valeurs de DO diminuent (~ 1,5) seulement pour la concentration la plus élevée (20 g.L<sup>-1</sup>).



**Figure D-38 :** Lectures des densités optiques (DO) obtenues pour chacune des gammes de dilutions des dérivés Alg-G<sub>0,06</sub> et Alg-G<sub>0,10</sub> après 24 h d’incubation et à 37°C. Gamme Alg-G<sub>x</sub>ensemencée (en rouge), gamme Alg-G<sub>x</sub> témoin coloration (gris), gamme référence BHI/PBSensemencée (en vert), pot BHIensemencé (en orange).

La méthode de dénombrement a été réalisée aux concentrations 20, 10 et 5 g.L<sup>-1</sup>. Les images des boîtes de gélose à la concentration la plus élevée (20 g.L<sup>-1</sup>) sont présentées Figure D-39. Les activités calculées aux différentes concentrations sont regroupées dans le tableau D-16. La valeur moyenne CFU/mL de la référence alginate utilisée est égale à 4,0 x 10<sup>9</sup>.



**Figure D-39** : Images des boîtes de géloseensemencées obtenues après incubation (24 h, 37°C) aux dilutions 5 à 8 pour les dérivés Alg-G<sub>x</sub> et la référence solvant BHI/PBS.

On remarque par exemple, qu'à la dilution 5, le nombre de colonies de bactéries est non discernable et incomptable dans le cas de la référence alginate. Dans le cas des dérivés Alg-G<sub>x</sub>, dès la dilution 5, il est possible de dénombrer le nombre de colonies. Cela traduit une activité antibactérienne des dérivés Alg-G<sub>x</sub>. Ces activités ont été calculées et sont fournies dans le tableau D-16.

**Tableau D-16** : Activité antibactérienne (%) des produits Alg-G<sub>x</sub> (essais préliminaires)

	[Alg-G <sub>x</sub> ] g.L <sup>-1</sup>	[NH <sub>2</sub> GA] <sub>eq</sub> mM	Test 1		Test 2	
			CFU/mL (Alg-G)	Activité antibact. (%)	CFU/mL (Alg-G)	Activité antibact. (%)
Alg-G <sub>0.06</sub>	20	5,9	5,3 x 10 <sup>8</sup>	87	3,6 x 10 <sup>9</sup>	10
	10	3,0	2,7 x 10 <sup>9</sup>	32	2,3 x 10 <sup>9</sup>	42
	5	1,5	4,1 x 10 <sup>9</sup>	-	3,9 x 10 <sup>9</sup>	3
Alg-G <sub>0.10</sub>	20	9,6	6,8 x 10 <sup>8</sup>	83	-	-
	10	4,8	2,6 x 10 <sup>9</sup>	35		
	5	2,4	2,7 x 10 <sup>9</sup>	32		

Les dérivés Alg-G<sub>x</sub> semblent posséder de faibles activités antibactériennes aux concentrations d'étude. Dans le cas du produit Alg-G<sub>0.06</sub>, deux essais ont pu être effectués. On remarque que

les tests ne sont pas reproductibles. Cela pourrait être dû à la viscosité importante des solutions d'Alg-G<sub>x</sub> comparées à celles des CMP-G<sub>x</sub>. Dans le cas du produit Alg-G<sub>0.10</sub>, un seul essai a pu être effectué (manque de produit). En s'intéressant aux activités déterminées dans le cas du test 1, on remarque que les dérivés Alg-G<sub>0.06</sub> et Alg-G<sub>0.10</sub> possèdent des activités antibactériennes peu différentes selon le DS(Ga). Il faut par ailleurs noter que les tests ont été effectués à des concentrations en dérivés Alg-G<sub>x</sub> qui correspondent à des concentrations en aminogaiacol équivalentes ( $[\text{NH}_2\text{GA}]_{\text{eq}}$ ) inférieures à la CMB de l'aminogaiacol (10 mM). Des essais supplémentaires pour confirmer ces résultats préliminaires sont nécessaires.

### 5.3 Conclusion sur les propriétés antibactériennes

Les résultats obtenus suite aux tests antibactériens ont permis de prouver dans le cas de la stratégie 1 (diminution du taux de greffage) que la présence d'un caractère associatif marqué (présence de clusters) était défavorable à l'activité antibactérienne des dérivés CMP-G<sub>x</sub>. En effet, aux plus hautes concentrations en dérivé CMP-G<sub>x</sub> testées, le CMP-G<sub>0.05</sub> a démontré l'activité la plus importante (99,0%) avec une concentration  $[\text{NH}_2\text{GA}]_{\text{eq}}$  (12 mM) la plus faible en comparaison avec ses homologues les plus greffés. Cela est expliqué en raison du faible caractère associatif mis en avant par les analyses en physico-chimie qui rend les greffons aminogaiacol disponibles pour agir sur la membrane des bactéries.

Dans le cas des tests réalisés avec l'alginate (stratégie 3), les premiers essais ont montré une légère activité antibactérienne des dérivés Alg-G<sub>x</sub>. Il faudrait cependant effectuer des essais supplémentaires pour confirmer ces résultats préliminaires. Les viscosités des solutions d'alginate (et dérivés) sont plus importantes que celles du CMP (et dérivés) et semblent également être un facteur limitant pour les tests antibactériens.

Par la suite nous présentons les résultats concernant la cytotoxicité de tous les dérivés synthétisés dans ce chapitre.

## 6 Cytocompatibilité

La cytotoxicité de tous les produits (CMP-G<sub>0.05</sub>, <sup>d</sup>CMP et dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>, Alginate et des dérivés Alg-G<sub>x</sub>) a été évaluée sur des cellules fibroblastes L929 de souris au moyen de deux tests : le Live/Dead et l'Alamar Blue®.

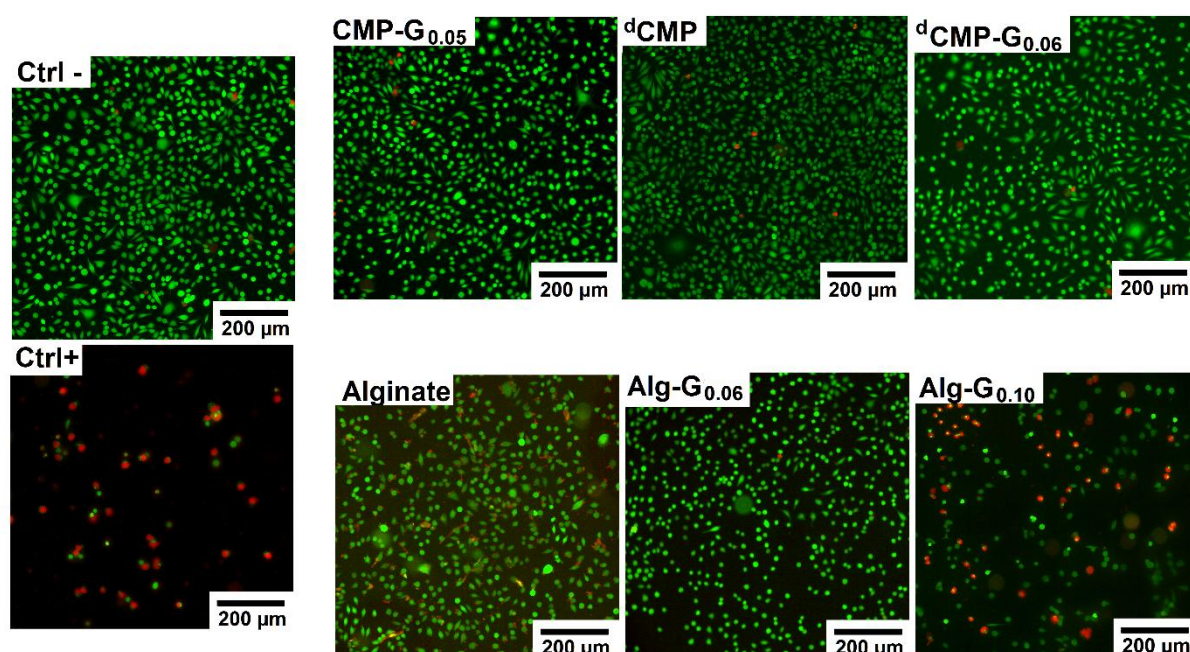
Remarques :

Dans le cas du dérivé  $\text{CMP-G}_{0.05}$ , du  $^d\text{CMP}$  et du  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  nous avons maintenu les conditions utilisées pour les tests avec le CMP et des dérivés greffés  $\text{CMP-G}_x$  (présentés dans le chapitre C). Les tests sont réalisés à  $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ , soit la plus haute concentration testée dans le cadre des tests antioxydants.

Dans le cas de l'Alginate et des dérivés  $\text{Alg-G}_x$ , les tests sont réalisés à  $3 \text{ g.L}^{-1}$ , soit la plus haute concentration testée dans le cadre des tests antioxydants. Il faut tout de même noter que la stérilisation des solutions n'a pas toujours été aisée en raison des viscosités des solutions. Dans le cas de l'alginate, aucune filtration n'a été possible (sur  $0,22$  ou  $0,45 \mu\text{m}$ ). Pour le dérivé  $\text{Alg-G}_{0.06}$ , nous avons pu filtrer uniquement sur des filtres de  $0,45 \mu\text{m}$  de diamètre. Le dérivé  $\text{Alg-G}_{0.10}$  a été difficilement filtré ( $0,22 \mu\text{m}$ ). Dans ces trois cas, les tests ont été effectués en travaillant dans des conditions stériles.

### 6.1 Test Live/Dead : mise en évidence de la viabilité des cellules

Les résultats obtenus suite aux tests Live/Dead sont présentés ci-dessous sur la Figure D-40.



**Figure D-40 :** Evaluation de la cytotoxicité des solutions  $\text{CMP-G}_{0.05}$ ,  $^d\text{CMP}$  et du dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$  à  $7,5 \text{ g.L}^{-1}$  ainsi que de l'alginate et des dérivés  $\text{Alg-G}_x$  ( $\text{Alg-G}_{0.06}$  et  $\text{Alg-G}_{0.10}$ ) à  $3 \text{ g.L}^{-1}$ . Contrôles (Ctrl): positif (DMSO 10%), négatif (milieu de culture complet). Images obtenues par le test Live/Dead après 24 h de contact avec les cellules L929. Cellules vivantes (vert) / Cellules mortes (rouge).

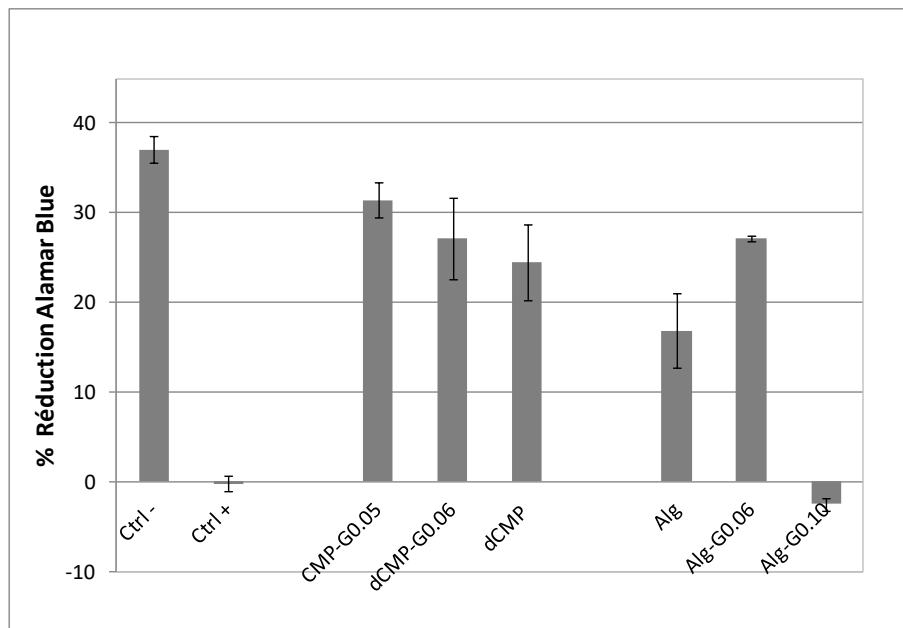
Dans un premier temps, on remarque qu'en présence du  $\text{CMP-G}_{0.05}$ , du  $^d\text{CMP}$  et du dérivé  $^d\text{CMP-G}_{0.06}$ , les cellules apparaissent en vert comme pour le contrôle négatif (milieu de culture

complet). Cela démontre qu'elles possèdent une bonne viabilité. Ces premières observations peuvent être également apportées dans le cas de l'alginate et du dérivé Alg-G<sub>0,06</sub>. Cependant, on constate qu'en présence du dérivé Alg-G<sub>0,10</sub>, la viabilité des cellules semble être affectée et est comparable aux cellules cultivées en présence de DMSO 10% (contrôle positif). Le dérivé Alg-G<sub>0,10</sub> démontre donc un effet cytotoxique sur les cellules fibroblaste à 3 g.L<sup>-1</sup>.

Pour rappel, comme démontré précédemment (chapitre C), l'aminogaiacol seul présente un effet cytotoxique à 1 mM. Il faut préciser qu'à la concentration d'étude en CMP-G<sub>0,05</sub> et <sup>d</sup>CMP-G<sub>0,06</sub> (7,5 g.L<sup>-1</sup>), les concentrations équivalentes en aminogaiacol sont respectivement égales à 1,5 mM et 1,8 mM. Ces dernières sont donc supérieures à la concentration d'étude de NH<sub>2</sub>GA non greffé (soit 1 mM) et pour autant aucune cytotoxicité n'est mise en évidence. On peut donc conclure que l'immobilisation par greffage chimique de l'aminogaiacol sur le polysaccharide CMP ou <sup>d</sup>CMP limite la cytotoxicité du composé naturel.

## 6.2 Test Alamar Blue® : mise en évidence de l'activité métabolique des cellules

Les résultats obtenus suite aux tests à l'Alamar Blue® sont présentés ci-dessous sur la Figure D-41.



**Figure D-41 :** Evaluation de la cytotoxicité des solutions CMP-G<sub>0,05</sub>, <sup>d</sup>CMP et du dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0,06</sub> à 7,5 g.L<sup>-1</sup> ainsi que de l'alginate et des dérivés Alg-G<sub>x</sub> (Alg-G<sub>0,06</sub> et Alg-G<sub>0,10</sub>) à 3 g.L<sup>-1</sup>. Contrôles (Ctrl) : positif (DMSO 10%), négatif (milieu de culture complet). Activité métabolique des cellules fibroblastes après 48 h de contact obtenue par le test Alamar Blue® (AB). Les données sont exprimées en moyennes ± SEM ( $n=3$ ).

Les premières conclusions apportées par le Live/Dead sont également confirmées avec le test à l'Alamar Blue®. En effet, le métabolisme des cellules est affecté par la présence du dérivé

Alg-G<sub>0.10</sub> (similaire au contrôle positif). Au contraire, les cellules possèdent un bon métabolisme lorsqu'elles sont en contact avec les produits CMP-G<sub>0.05</sub>, <sup>d</sup>CMP et dérivé <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> ainsi que l'alginate et le dérivé Alg-G<sub>0.06</sub>. Il faut tout de même noter que les valeurs de pourcentage de réduction en présence des produits CMP-G<sub>0.05</sub>, <sup>d</sup>CMP, <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub> ainsi que l'Alginate et le dérivé Alg-G<sub>0.06</sub> sont sensiblement moins importantes que celle obtenue pour le contrôle négatif (milieu de culture).

## 7 Conclusions générales

Pour rappel, les dérivés CMP-G<sub>x</sub> synthétisés et décrits tout au long du chapitre C présentaient des propriétés associatives en solution saline, en régime dilué et semi-dilué. Ce caractère était de type polysavon et expliqué en raison de la prédominance d'interactions entre greffons hydrophobes de type intramoléculaires. Le comportement agrégatif des CMP-G<sub>x</sub> est un paramètre d'importance puisqu'il est susceptible de (i) limiter les propriétés rhéologiques, mais aussi (ii) de limiter la disponibilité des greffons actifs et donc leur efficacité vis-à-vis précisément des propriétés antibactériennes visées. Cependant, la présence des groupements aminogaiacol impliqués dans des clusters sembleraient être favorable dans le cas des activités antioxydantes.

Dans le souci d'améliorer les activités antibactériennes de la molécule une fois greffée et/ou d'obtenir les propriétés rhéologiques recherchées, nous avons envisagé l'étude de nouvelles voies décrites tout au long du chapitre D:

Stratégie 1 : Diminuer le DS(Ga) pour limiter le caractère associatif ;

Stratégie 2 : Diminuer les masses molaires du CMP pour augmenter la rigidité des chaînes de polymères ;

Stratégie 3 : Utiliser un autre polysaccharide (l'alginate) présentant un caractère rigide plus important que le CMP mais également une viscosité plus importante.

Les réactions de greffage de l'aminogaiacol menées à partir du CMP (stratégie 1) du <sup>d</sup>CMP (stratégie 2) et de l'alginate (stratégie 3) ont été réalisées dans les mêmes conditions de réactions utilisées dans le chapitre C : en milieu aqueux acidifié et à température ambiante. Le greffage de l'aminogaiacol sur le CMP a été effectué avec un  $DS_{théo}(Ga) = 0,15$ . Dans le cas du <sup>d</sup>CMP et de l'alginate, nous avons fixé des  $DS_{théo}(Ga)$  variables, compris entre [0,15 - 1]. En comparaison avec les dérivés greffés sur le CMP, l'utilisation d'un polysaccharide semi-flexible (alginate) ou de masse molaire plus faible (<sup>d</sup>CMP) conduit à l'obtention de dérivés

greffés dont la solubilité dans l'eau est rapidement limitée ( $DS_{théo}(Ga) > 0,25$ ). Tous les dérivés qui étaient solubles dans l'eau ont été caractérisés par les techniques de spectroscopie (UV, IR, RMN). La détection et la quantification des greffons aminogaïacol ont permis de conclure sur le succès, l'efficacité et la reproductibilité des nouvelles réactions menées. La quantification des dérivés solubles (cas des trois stratégies) a conduit à l'obtention de produits avec des  $DS(Ga)$  faibles : **CMP-G<sub>0.05</sub>** (stratégie 1), **<sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>** (stratégie 2) et dérivés **Alg-G<sub>0.06</sub>** et **Alg-G<sub>0.10</sub>** (stratégie 3).

D'un point de vue physico-chimique, dans le cas de la stratégie 1, les analyses physico-chimiques en milieu dilué ( $C < C_{cr}$ ) et semi-dilué ( $C > C_{cr}$ ) menées sur le dérivé **CMP-G<sub>0.05</sub>** permettent de conclure sur un produit présentant un faible caractère associatif en comparaison avec ses homologues (plus greffés). En effet, peu de différences au regard de la taille ( $R_h$ ,  $[\eta]$ ) et de la  $C_{cr}$  ont été observées en comparant le **CMP-G<sub>0.05</sub>** et son précurseur **CMP**. Les propriétés rhéologiques du **CMP** faiblement greffés ne sont toujours pas améliorées par rapport au précurseur même si la diminution de viscosité newtonienne observée est plus faible que pour ses homologues plus greffés. Dans le cas de la stratégie 2, la dégradation du **CMP** conduit à l'obtention d'un dérivé **<sup>d</sup>CMP** présentant de faibles masses molaires sans pour autant affecter la présence d'un caractère flexible chez ce dernier. Le greffage à faible taux sur le **<sup>d</sup>CMP** conduit au produit **<sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>** présentant un faible pouvoir associatif et comparable au dérivé **CMP-G<sub>0.05</sub>**. Concernant la stratégie 3, l'utilisation d'un polysaccharide semi-flexible (alginate) pour le greffage de l'aminogaïacol n'a pas permis de limiter le caractère associatif des nouveaux dérivés **Alg-G<sub>0.06</sub>** et **Alg-G<sub>0.10</sub>** élaborés. En effet, les résultats obtenus en milieu dilué et semi dilué par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco, par fluorescence ou encore par rhéologie mettent en avant la présence d'interactions intra et intermoléculaires entre greffons aminogaïacol. Ce comportement associatif s'est avéré plus marqué avec le  $DS(Ga)$  qui augmente (**Alg-G<sub>0.10</sub>**). Les nouveaux dérivés présentent des comportements proches et comparables aux dérivés greffés **CMP-G<sub>0.05</sub>** et **CMP-G<sub>0.16</sub>**. Cependant, il est à noter que les dérivés **Alg-G<sub>x</sub>** possèdent des comportements de type rhéofluidifiant et des viscosités plus importantes que les dérivés **CMP-G<sub>x</sub>**. L'objectif rhéologique attendu est dans ce cas en partie atteint.

Concernant les propriétés antioxydantes, les résultats obtenus ont permis de confirmer l'hypothèse au préalable formulée : l'activité antioxydante est bien fonction du  $DS(Ga)$  et plus précisément du caractère agrégatif des dérivés greffés. Plus le caractère associatif est marqué, plus l'activité est importante. Une concentration locale élevée de greffons (au sein d'un cluster) semble plus efficace que lorsque les greffons sont isolés. Ainsi dans le cas des dérivés

synthétisés dans le chapitre D (CMP-G<sub>0.05</sub>, <sup>d</sup>CMP-G<sub>0.06</sub>, Alg-G<sub>0.06</sub> et Alg-G<sub>0.10</sub>), ils présentent tous de faibles taux DS(Ga) [5 - 10]% et un faible pouvoir associatif : il a été vérifié que les activités antioxydantes de ces nouveaux dérivés greffés n'ont pas été améliorées. Il faut tout de même préciser les dérivés Alg-G<sub>x</sub> se sont avérés être moins actifs que les dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Dans ce cas, la viscosité des solutions d'alginate (et dérivés) semble être un facteur limitant pour les activités antioxydantes de ces produits. Ces activités pourraient aussi être améliorées en réalisant des tests antioxydants sur des temps plus longs (> 30 min). Notons également une faible activité antioxydante de l'alginate précurseur non observée pour le CMP précurseur.

Concernant les propriétés antibactériennes, le dérivé CMP-G<sub>0.05</sub> (stratégie 1) s'est avéré être plus efficace que les autres dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Nous avons donc réussi à améliorer l'activité antibactérienne des produits CMP-G<sub>x</sub> en diminuant le caractère associatif des dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'hypothèse au préalable formulée : l'activité antibactérienne est bien fonction du caractère agrégatif des dérivés greffés. Plus précisément, plus le caractère associatif est marqué, moins l'activité antibactérienne est importante en raison d'une moins bonne disponibilité des greffons engagés dans les associations. Dans le cas de la stratégie 3, les résultats obtenus concernant l'alginate semble montrer une activité antibactérienne. Cette dernière semblerait être améliorée de par la présence de greffons aminogaiacol. Cependant les tests préliminaires réalisés sont peu reproductibles et la viscosité semble être un facteur limitant. Il serait intéressant de réaliser de nouveaux essais pour confirmer ces résultats.

Par ailleurs, que ce soit dans le cas des propriétés antibactériennes ou antioxydantes, la molécule non greffée reste plus active que la molécule greffée. Il faut également noter que le greffage de l'aminogaiacol limite la cytotoxicité de ce dernier (sous forme libre). En effet, tous les dérivés synthétisés (Alg-G<sub>x</sub> et <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub>) se sont avérés biocompatibles comme à l'exemple des dérivés CMP-G<sub>x</sub>, excepté le dérivé Alg-G<sub>0.10</sub>.

En somme, les deux alternatives qui semblent intéressantes sont les stratégies 1 et 3. La voie 1 a permis d'obtenir un produit faiblement associatif et d'améliorer les propriétés antibactériennes des dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Cependant, le caractère rhéologique n'est pas atteint. La voie 3 conduit à l'obtention de dérivés greffés avec un comportement associatif comparable à ceux des dérivés greffés CMP-G<sub>x</sub>, cependant les viscosités des dérivés Alg-G<sub>x</sub> sont plus importantes que celles des solutions de CMP-G<sub>x</sub>. L'objectif rhéologique attendu est dans ce cas en partie atteint.



- (1) Bréham, J. Elaboration de Nouveaux Revêtements À Base de Polysaccharides À Amphiphilie Contrôlée : Application Aux Biocapteurs À Protéine. **2015**.
- (2) Ali, G.; Rihouey, C.; Le Cerf, D.; Picton, L. Effect of Carboxymethyl Groups on Degradation of Modified Pullulan by Pullulanase from *Klebsiella Pneumoniae*. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93* (1), 109–115.
- (3) Baños, F. G. D.; Díez Peña, A. I.; Hernández Cifre, J. G.; López Martínez, M. C.; Ortega, A.; García de la Torre, J. Influence of Ionic Strength on the Flexibility of Alginate Studied by Size Exclusion Chromatography. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102*, 223–230.
- (4) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (1), 106–126.
- (5) Pawar, S. N.; Edgar, K. J. Alginate Derivatization: A Review of Chemistry, Properties and Applications. *Biomaterials* **2012**, *33* (11), 3279–3305.
- (6) Vold, I. M. N.; Kristiansen, K. A.; Christensen, B. E. A Study of the Chain Stiffness and Extension of Alginates, in Vitro Epimerized Alginates, and Periodate-Oxidized Alginates Using Size-Exclusion Chromatography Combined with Light Scattering and Viscosity Detectors. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (7), 2136–2146.
- (7) Hecht, H.; Srebnik, S. Structural Characterization of Sodium Alginate and Calcium Alginate. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (6), 2160–2167.
- (8) Guarino, V.; Caputo, T.; Altobelli, R.; Ambrosio, L. Degradation Properties and Metabolic Activity of Alginate and Chitosan Polyelectrolytes for Drug Delivery and Tissue Engineering Applications. *AIMS Mater. Sci.* **2015**, *2* (4), 497–502.
- (9) Claisse, N. Préparation et Modification D'oligosaccharides de Cellulose Par Chimie Douce Bio-Inspirée; 2013.
- (10) Colinet, I.; Dulong, V.; Hamaide, T.; Le Cerf, D.; Picton, L. New Amphiphilic Modified Polysaccharides with Original Solution Behaviour in Salt Media. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *75* (3), 454–462.
- (11) Pelletier, S.; Hubert, P.; Lapique, F.; Payan, E.; Dellacherie, E. Amphiphilic Derivatives of Sodium Alginate and Hyaluronate: Synthesis and Physico-Chemical Properties of Aqueous Dilute Solutions. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *43* (4), 343–349.
- (12) Sinquin, A.; Hubert, P.; Dellacherie, E. Amphiphilic Derivatives of Alginate: Evidence for Intra- and Intermolecular Hydrophobic Associations in Aqueous Solution. *Langmuir* **1993**, *9* (12), 3334–3337.
- (13) Simon, S.; Dugast, J. .; Le Cerf, D.; Picton, L.; Muller, G. Amphiphilic Polysaccharides. Evidence for a Competition between Intra and Intermolecular Associations in Dilute System. *Polymer (Guildf)*. **2003**, *44* (26), 7917–7924.
- (14) Yang, L.; Zhang, B.; Wen, L.; Liang, Q.; Zhang, L. M. Amphiphilic Cholesteryl Grafted Sodium Alginate Derivative: Synthesis and Self-Assembly in Aqueous Solution. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68* (2), 218–225.
- (15) Sari-Chmayssem, N.; Taha, S.; Mawlawi, H.; Guégan, J. P.; Jeftić, J.; Benvegna, T. Extracted and Depolymerized Alginates from Brown Algae *Sargassum Vulgare* of Lebanese Origin: Chemical, Rheological, and Antioxidant Properties. *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28* (3), 1915–1929.
- (16) Hu, X.; Jiang, X.; Gong, J.; Hwang, H.; Liu, Y.; Guan, H. Antibacterial Activity of Lyase-Depolymerized Products of Alginate. *J. Appl. Phycol.* **2005**, *17* (1), 57–60.

## **Conclusion générale et perspectives**



Dans un contexte de recherche d'alternatives aux conservateurs de synthèse, comme les parabènes et les BHA/BHT utilisés dans les formulations aqueuses notamment cosmétique et/ou agroalimentaire, les études s'orientent de plus en plus vers les dérivés d'origine naturelle aux propriétés antibactériennes et/ou antioxydantes avérées. Nous avons vu dans l'état de l'art (Chapitre A) qu'il existe plusieurs sources naturelles (animales, végétales, microorganismes ou encore minérales) qui renferment de nombreux composés actifs (antibactériens, antioxydants, antifongiques ou autres) à structures chimiques diverses. En s'intéressant aux dérivés des plantes et plus particulièrement aux composés de type phénolique, on s'aperçoit que ces derniers sont souvent instables chimiquement et présentent une faible solubilité dans l'eau, ce qui est un facteur limitant dans de nombreuses applications. Afin d'améliorer les propriétés d'usages de ces dérivés et d'élargir leurs champs d'applications, précisément dans le cas de formulations aqueuses cosmétique et/ou alimentaire, ces molécules phénoliques peuvent être incorporées au sein de matrice de polysaccharides hydrosolubles au moyen de différentes méthodes : polymérisation, encapsulation au sein de films polymères, incorporation au sein de capsules ou par greffage chimique. C'est cette dernière voie que nous avons choisi pour réaliser nos travaux de recherche en utilisant comme composés phénoliques : l'aminogaïacol (ou l'eugénol) et comme polysaccharides, le carboxyméthylpullulane ou l'alginate. Les greffages chimiques ont été effectués selon deux voies : le greffage direct (discuté tout au long du manuscrit) et le greffage indirect (essais préliminaires discutés en annexe).

Ce projet de thèse avait ainsi pour objectif d'élaborer des conservateurs naturels présentant des propriétés variées à base de polysaccharides et de molécules végétales actives. Nous avons notamment visé un double enjeu : d'une part, concevoir des systèmes hydrosolubles présentant des propriétés antibactériennes et/ou antioxydantes apportées par les dérivés issus de plantes et d'autre part, contrôler la rhéologie des formulations aqueuses en apportant des propriétés viscosifiantes (ou gélifiantes) par la matrice polysaccharide.

En premier lieu, nous nous sommes intéressés au greffage chimique de l'aminogaïacol (NH<sub>2</sub>GA) sur le carboxyméthylpullulane (CMP) (chapitre C). Les synthèses ont été réalisées en fixant des proportions en aminogaïacol variables ce qui a conduit à l'obtention de dérivés (CMP-G<sub>x</sub>) présentant des taux de greffage expérimentaux en aminogaïacol compris entre 16 et 58%. La réaction est reproductible et l'efficacité atteinte est de l'ordre de 60 à 70%. Des études physico-chimiques ont été menées sur les dérivés CMP-G<sub>x</sub> en milieu aqueux

(phosphate salin) dans les régimes dilué ( $C < C_{cr}$ ) et semi-dilué ( $C > C_{cr}$ ) et ont permis de mettre en avant un caractère associatif de ces derniers qui s'est avéré logiquement d'autant plus marqué que le taux de greffage est important. Ces comportements sont la conséquence directe de l'établissement d'interactions de type hydrophobe entre greffons (formation de clusters) et principalement de type intramoléculaire. Cela s'est traduit notamment par une forte diminution des volumes hydrodynamiques (conformation très compacte en solution) des dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Même en régime plus concentré, les associations intramoléculaires demeurent, conduisant à un affaiblissement des propriétés rhéologiques en comparaison avec leur précurseur (CMP). Ainsi, ce comportement est le comportement classique d'un polysavon et limite fortement notre objectif rhéologique. En revanche, tous les dérivés greffés ont démontré des activités antioxydantes et antibactériennes intéressantes. Ces dernières ont été corrélées au pouvoir associatif des dérivés. La formation de micro-domaines hydrophobes s'est avérée être favorable à l'activité antioxydante et au contraire défavorable à l'activité antibactérienne et ce probablement en raison de la moindre disponibilité des greffons engagés dans les clusters. Afin d'améliorer notamment les propriétés biologiques et rhéologiques des dérivés, nous avons envisagé des stratégies visant notamment à réduire le comportement de type « polysavon » et donc l'établissement d'associations intramoléculaires : diminution du DS(Ga) des dérivés CMP-G<sub>x</sub> (stratégie 1), réduction des longueurs des chaînes du CMP (stratégie 2) et utilisation d'un polysaccharide plus rigide que le CMP (stratégie 3).

Dans un second temps, nous nous sommes donc intéressés aux alternatives suggérées pour améliorer les propriétés antibactériennes et/ou rhéologiques des dérivés greffés (chapitre D). La stratégie 1 nous a permis de synthétiser un dérivé CMP-G<sub>x</sub> faiblement greffé (5%) qui a présenté effectivement un caractère associatif affaibli en comparaison avec ses homologues plus greffés. Cependant les propriétés rhéologiques n'ont pas été améliorées comparé au précurseur même si le comportement polysavon a été fortement réduit. Ce dérivé faiblement greffé a démontré d'une part des propriétés antioxydantes plus faibles comparées aux autres produits greffés confirmant ainsi que les clusters hydrophobes semblent être favorables dans le cas de l'activité chimique. D'autre part, ce dérivé a présenté la meilleure activité antibactérienne de la série des CMP-G<sub>x</sub> confirmant également que les greffons associés apparaissent moins actifs dans le cas de l'activité biologique. Ce dernier aspect s'est avéré être prometteur et semble bien valider cette première stratégie. Concernant la stratégie 2 et les dérivés synthétisés à partir d'un CMP dégradé (<sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub>), nous avons observé que la solubilité aqueuse était largement conditionnée au DS(Ga). Ainsi et contrairement au dérivés

issus du CMP non dégradé, les dérivés <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub> sont hydrosolubles seulement à faible DS indiquant des auto-associations différentes en fonction de la masse molaire du polymère. Le seul dérivé étudié et hydrosoluble possédait un faible taux de greffage (6 %). A l'instar de son homologue greffé (haute masse molaire 5 %), il a révélé un faible caractère associatif et un pouvoir antioxydant comparable. Les propriétés rhéologiques forcement affaiblies par la dégradation ainsi que les propriétés antibactériennes n'ont donc pas été évaluées. Concernant la stratégie 3, nous avons envisagé l'utilisation d'un polysaccharide semi-flexible, l'alginate, pour le greffage de l'aminogaiacol (Alg-G<sub>x</sub>) pensant réduire la formation d'associations intramoléculaires. Nous avons effectivement montré clairement la rigidité plus importante de l'alginate comparée au CMP, mais cette caractéristique n'a pas permis de limiter le caractère associatif des nouveaux dérivés synthétisés pourtant faiblement greffés (6 et 10 %). En effet, ces derniers présentent un comportement associatif comparable aux produits CMP-G<sub>x</sub> à taux de greffage équivalent. Cependant ces dérivés plus rigides montrent des comportements de type rhéofluidifiant et des viscosités apparentes, certes toujours légèrement inférieures à celle de leur précurseur, mais largement plus importantes que celles des dérivés CMP-G<sub>x</sub>. Dans ce cas, l'objectif rhéologique attendu est en partie atteint. C'est d'ailleurs probablement en raison de ces viscosités plus importantes que les activités chimiques et biologiques ont été beaucoup plus délicates à appréhender.

Au final, nous avons pu valider aux travers des résultats obtenus, les hypothèses formulées sur la corrélation entre activités et caractère associatif. Concernant les propriétés antioxydantes, les résultats ont en effet permis de confirmer l'hypothèse au préalable formulée que l'activité antioxydante est bien fonction du DS(Ga) et plus précisément du caractère agrégatif des dérivés greffés. Plus le caractère associatif est marqué, plus l'activité est importante. Une concentration locale élevée de greffons (au sein d'un cluster) semble plus efficace sur le radical DPPH<sup>•</sup> que lorsque les greffons sont isolés. Concernant les propriétés antibactériennes, plus le caractère associatif est marqué, moins l'activité antibactérienne est importante en raison d'une moins bonne disponibilité des greffons engagés dans les associations pour perturber les parois bactériennes.

Au regard des conclusions apportées aux chapitres C et D, nous proposons comme alternatives à court terme d'évaluer les propriétés antibactériennes des dérivés greffés (CMP-G<sub>x</sub> et Alg-G<sub>x</sub>) sur d'autres souches, notamment de type gram - telle que *Escherichia Coli*. Pour s'affranchir des problèmes de viscosité, nous pourrions également changer de méthode de tests antibactériens et nous orienter vers des tests en milieu solide. Pour ce faire, nous

pourrons élaborer des films de polymères et tester leurs activités face à des souches gram + et gram -. Concernant le contrôle et l'amélioration des propriétés rhéologiques qui se sont avérés difficiles à atteindre, nous proposons comme alternative, d'introduire au sein des solutions de dérivés synthétisés (y compris les <sup>d</sup>CMP-G<sub>x</sub>), le précurseur ou un autre polysaccharide (non greffé) et compatible qui posséderait de bonnes propriétés épaississantes. Enfin comme perspective à long terme et au vu de la coloration brune de la molécule aminogaiacol qui peut s'avérer gênante pour les applications envisagées, il serait intéressant d'utiliser une autre molécule pour le greffage chimique et de réaliser des synthèses similaires. Cela nous permettrait d'étendre notre approche sur d'autres molécules naturelles (ex : vanilline, squalamine, nisine).

# **ANNEXE 1**





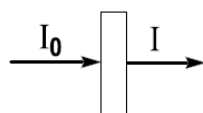
### **Annexe B-1 : Les techniques de caractérisations physico-chimique**

Les principes des différentes techniques de caractérisation utilisées sont détaillés ci-dessous :

➤ Spectroscopie Ultra-Violet –Visible (UV-Visible)

La technique UV-Visible est basée sur la propriété de certains composés à absorber une radiation lumineuse de longueur d'onde  $\lambda$ . L'absorption d'un rayonnement (d'un quantum d'énergie) provoque chez la molécule d'étude des transitions électroniques de son état fondamental vers un état excité. Ce sont précisément des groupes d'atomes appelés chromophores qui absorbent la radiation émise. Ils possèdent en général des liaisons  $\pi$  (ex : benzène ou éthylène).

Le domaine d'étude UV-Visible s'étend environ de 800 à 10 nm dans le spectre électromagnétique. Le spectrophotomètre UV-Visible permet de mesurer l'absorbance d'une solution homogène placée dans une cuve à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée ou sur une région spectrale donnée.



$$A = \log (I_0 / I)$$

$I_0$  : Intensité incidente de la lumière sur l'échantillon placé dans une cuve

$I$  : Intensité sortante de l'échantillon

$A$  : Absorbance

Le spectrophotomètre est constitué d'une source lumineuse, d'un monochromateur qui va permettre de sélectionner une gamme de longueurs d'ondes, de compartiments pour placer les cuves et d'un détecteur connecté à un dispositif de traitement de données. On obtient ainsi un spectre suite à une analyse sur une région. Le spectre UV-Visible (Absorbance =  $f(\lambda)$ ) permet une étude structurale qualitative grâce à la détection des pics d'absorption de la molécule d'étude. Cette technique peut également être utilisée pour des analyses quantitatives pour déterminer une concentration par application de la loi de Beer-Lambert.

➤ Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

La spectroscopie IR est une technique d'analyse structurale qualitative de la plupart des composés. Elle permet d'identifier la présence de groupements fonctionnels et de liaisons entre atomes. Le domaine de l'infrarouge correspond à des longueurs d'onde comprises entre 0,8  $\mu\text{m}$  et 1 000  $\mu\text{m}$ .

Les molécules organiques analysées sont capables d'absorber une partie de l'énergie d'un rayonnement IR. Elles se mettent alors en résonance et subissent des mouvements de vibrations (élongation ou déformation angulaire) à des fréquences caractéristiques. L'autre partie de l'énergie transmise par l'échantillon est recueillie et analysée sous forme de spectre. Un spectre IR représente l'évolution de la transmittance (%) en fonction du nombre d'onde  $\sigma$  (inverse de la longueur d'onde en  $\text{cm}^{-1}$ ).

➤ Spectroscopie de Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La Spectroscopie RMN est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Un noyau est observable en RMN s'il possède un spin nucléaire noté I non nul : soit un nombre impair de protons ou de neutrons ou encore les deux. Les atomes les plus étudiés en RMN sont :  $^1\text{H}$  ;  $^{13}\text{C}$  ;  $^{31}\text{P}$  ;  $^{14}\text{N}$  ... Par la suite, les études porteront sur la RMN du proton donc du noyau de l'hydrogène  $^1\text{H}$ .

Lorsqu'un noyau est placé dans un champ magnétique intense noté  $B_0$ , il est soumis à un champ radio fréquence  $B_1$  qui provoque une perturbation de son état d'équilibre. L'application de ce champ radio fréquence est de courte durée, quelques microsecondes. La réponse des noyaux excités lors de leur relaxation est captée par une bobine réceptrice. Ces données sont envoyées à un ordinateur où elles sont analysées et transformées en signal. Par transformée de Fourier, on passe d'un signal à un spectre RMN.

➤ Fluorescence

Lorsqu'une molécule fluorescente (fluorophore) absorbe des photons de longueur d'onde  $\lambda_1$ , elle est conduite de son état fondamental (au repos) vers un état excité, cela est traduit par des transitions électroniques. La durée de vie moyenne de l'état excité est de l'ordre de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  s et suivi de l'émission de la lumière à une longueur d'onde  $\lambda_2$  ( $>\lambda_1$ ) pour rejoindre l'état initial. Cette émission de lumière est qualifiée de fluorescence. Ce principe est représenté sur le schéma 1. Les molécules fluorescentes possèdent en général des groupes cycliques (liaisons  $\pi$ ).

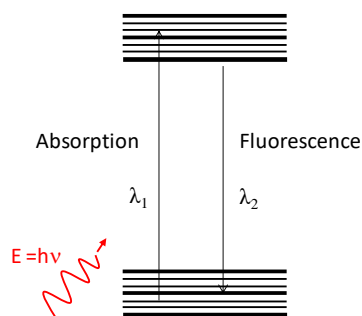


Schéma 1 : Principe de la fluorescence

### **Annexe B-2 : Diffusion statique de la lumière (théorie)**

Lorsqu'un faisceau incident monochromatique de longueur d'onde  $\lambda_0$  traverse une solution, chaque particule (ici macromolécule) présente dans la solution va diffuser la lumière dans toutes les directions de l'espace, à la même longueur d'onde que le faisceau incident.

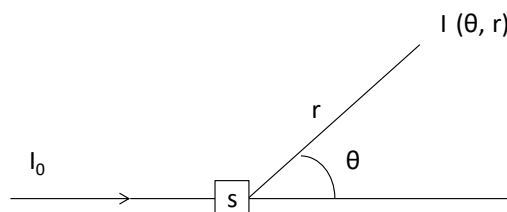


Schéma 2 : Principe de la diffusion de la lumière

L'intensité ainsi diffusée par la solution, notée  $I(\theta, r)$  est fonction de la longueur d'onde  $\lambda_0$  et de l'angle  $\theta$ . Elle est exprimée de la manière suivante :

$$I(\theta, r) = \frac{8\pi^2 N \alpha^2}{\lambda_0^4 r^2} I_0 (1 + \cos^2 \theta) \quad \text{Eq.1}$$

avec :

- $\theta$  : angle auquel on mesure l'intensité diffusée ;
- $r$  : distance entre les particules diffusantes et le point de mesure ;
- $\lambda_0$  : la longueur d'onde du faisceau incident ;
- $N$  : nombre de particules indépendantes par unité de volume
- $\alpha$  : polarisabilité des particules en solution ;

On peut définir un nouveau paramètre, le rapport de Rayleigh noté  $\Delta R(\theta)$  qui est sensiblement égal à l'intensité diffusée  $I(\theta, r)$  mais indépendant de  $I_0$  et de  $r$ .

$$\Delta R(\theta) = \frac{\Delta I(\theta, r) r^2}{I_0} = \frac{8\pi^2 N \alpha^2}{\lambda_0^4} (1 + \cos^2 \theta) \quad \text{Eq.2}$$

En considérant que :

$$N \alpha^2 = \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 n_0^2 \frac{c M_w}{4\pi^2 N_A}$$

avec :

$dn/dc$  : incrément d'indice de réfraction ;

$n_0$  : l'indice de réfraction du solvant ;

$N_A$  : nombre d'Avogadro

$$\text{On obtient : } \Delta R(\theta) = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^2 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 C M_w (1 + \cos^2 \theta) \quad \text{Eq.3}$$

Par ailleurs, l'intensité diffusée dépend également de la taille et de la structure des particules qui diffusent. Les particules possédant des tailles très petites, plus précisément des dimensions négligeables devant la longueur d'onde du faisceau incident ( $R_g < \lambda_0/20$ ) vont diffuser de manière isotrope, c'est-à-dire qu'elles vont diffuser la lumière de façon identique dans toutes les directions de l'espace.

Si on considère que la lumière de l'appareil de mesure est polarisée verticalement et qu'il existe des interférences entre les rayonnements émis par les particules, on exprime alors l'équation de la lumière de la manière suivante :

$$\Delta R(\theta) = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^2 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{C}{\frac{1}{M_w} + 2A_2 C + 3A_3 C} \quad \text{Eq.4}$$

avec :

$A_2$  : second coefficient du viriel

$A_3$  : troisième coefficient du viriel

De manière plus simplifiée on peut écrire l'équation de la lumière en intégrant les paramètres fixes dans une constante :

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M_w} + 2A_2 C + \dots \quad \text{Eq.5}$$

avec  $K$ , la constante optique :

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^2 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2$$

Eq.6

Cependant, les macromolécules en solution sont en général de dimensions plus importantes que la longueur d'onde du faisceau incident ( $R_g > \lambda_0/20$ ) et vont diffuser de manière anisotrope (non uniforme). Il faut alors tenir compte d'un facteur correctif, appelé facteur de

forme  $P(\theta)$ . Il est fonction de l'angle  $\theta$  et de la dimension de la macromolécule. Il est défini de la manière suivante :

$$P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} R_g^2 \sin^2(\theta/2) \quad \text{Eq.7}$$

Dans ce cas là, on exprime l'équation de la lumière de la manière suivante :

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) \frac{1}{P(\theta)} \quad \text{Eq.8}$$

Pour des valeurs faibles de  $\theta$ ,  $1/P(\theta)$  peut s'écrire :

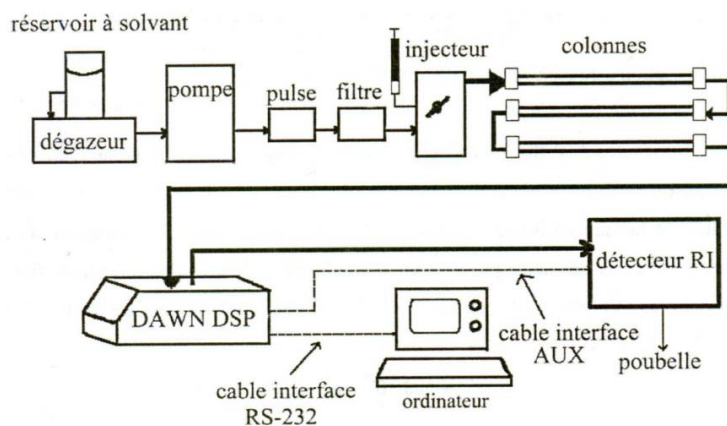
$$P(\theta) = 1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} R_g^2 \sin^2(\theta/2) \quad \text{Eq.9}$$

L'expression générale de la diffusion de la lumière s'écrit alors de la manière suivante :

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda_0^2} R_g^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + \dots \right) + 2A_2C + \dots \quad \text{Eq.10}$$

Il va donc être possible d'accéder à la masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ), le rayon de giration  $R_g$  ou encore au paramètre thermodynamique de solvation ( $A_2$ ) par le tracé du diagramme de Zimm  $\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = f(\sin^2(\theta/2) + k)$ ; avec  $k$ , une constante arbitraire.

### **Annexe B-3 : Appareillage couplage SEC/MALLS/DRI**



**Figure 1** : Représentation schématique du couplage SEC/MALLS/DRI

### **Annexe B-4 : Les différents types de fluides**

#### a. Fluide Newtonien

Un liquide newtonien possède une viscosité apparente indépendante du gradient de cisaillement.

## b. Fluide non Newtonien

### - Les fluides rhéofluidifiants (*pseudo-plastique*)

Ces types de fluides sont caractérisés par une viscosité apparente qui décroît lorsque le gradient de cisaillement augmente.

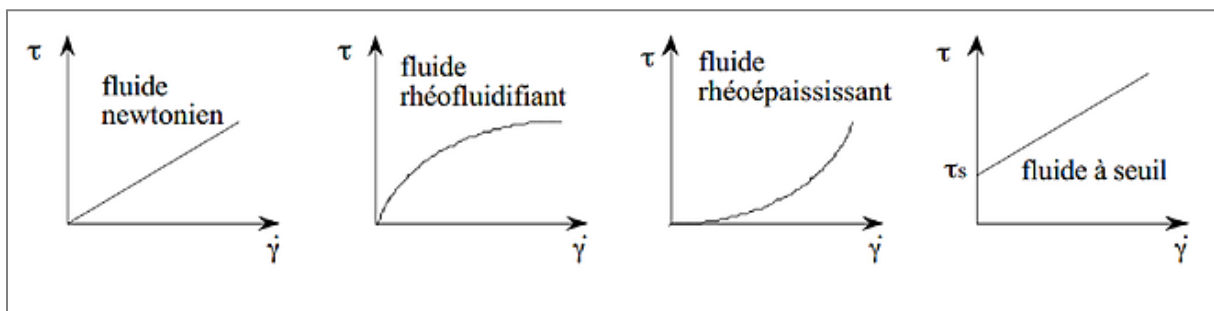
### - Les fluides rhéoépaississants (*dilatant*)

Ils sont caractérisés par une viscosité apparente qui croît avec le gradient de cisaillement.

## c. Fluide non Newtonien à contrainte de seuil

Pour ce type de fluides, il faut exercer une certaine contrainte de cisaillement minimale avant que l'écoulement ne commence. Avant toute déformation (au repos), ces fluides se comportent comme des solides.

On distingue les fluides de Bingham, qui présentent un comportement de type newtonien lorsque la contrainte minimale est atteinte. Les fluides de Casson présentent plutôt un comportement non newtonien à partir de la contrainte minimale.



**Figure 2 :** Les différents types de comportements de fluides : évolution de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement.

Les comportements de ces différents fluides suivent en général des lois (modèles) bien définies<sup>1</sup>.

Dans nos travaux, la plupart des fluides étudiés sont de type newtonien ou rhéofluidifiant.

Dans ces cas-là, ils suivent la loi de puissance ou d'Ostwald-de Waele :

$$\eta = K \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad \text{Eq.11}$$

avec :

$\eta$  : viscosité

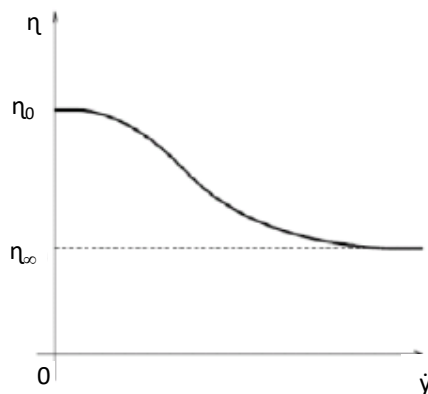
$K$  : constante

$\dot{\gamma}$  : gradient de cisaillement

$n$  : indice d'écoulement sans dimension avec  $0 < n < 1$

$n = 1$  : fluide newtonien,  $n < 1$  : fluide rhéofluidifiant,  $n > 1$  : fluide rhéoépaississant

Cependant, pour les fluides rhéofluidifiants ce modèle présente des limites dans certaines gammes de cisaillement. En effet, aux faibles et forts taux de cisaillement, les polymères en solution présentent des plateaux newtoniens. Ces derniers sont caractérisés par une viscosité à cisaillement nul  $\eta_0$  (faible cisaillement) et une viscosité infinie  $\eta_\infty$  comme illustré ci-dessous (figure 3) :



**Figure 3 :** Courbe d'écoulement d'une solution de polymère à comportement rhéofluidifiant, viscosité apparente en fonction du cisaillement

De nouveaux modèles entrent alors en jeu : le modèle de Carreau et le modèle de Cross.

- Modèle de Carreau<sup>1</sup>

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = \frac{1}{(1 + (\lambda \dot{\gamma})^2)^{\frac{n-1}{2}}} \quad \text{Eq.12}$$

avec les quatre paramètres :  $\eta_0$ ,  $\eta_\infty$ ,  $\lambda$  (la constante de temps) et  $n$

- Modèle de Cross<sup>1</sup>

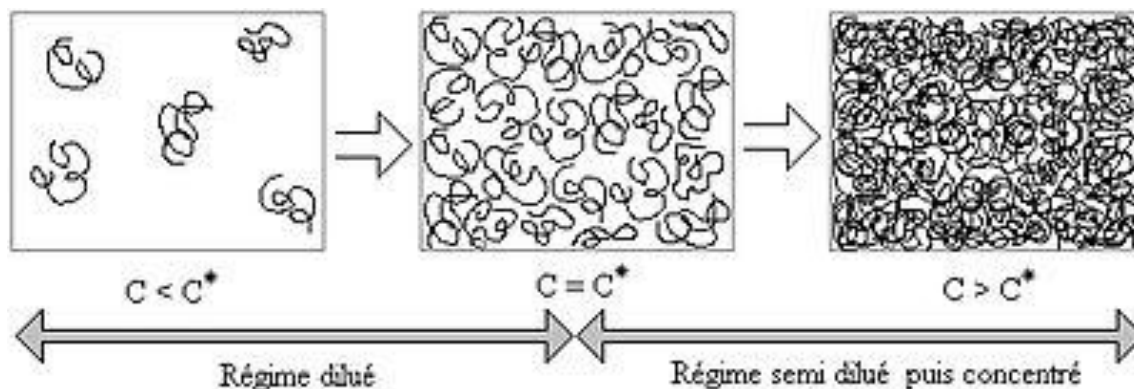
$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = \frac{1}{(1 + (\lambda \dot{\gamma})^m)} \quad \text{Eq.13}$$

avec les quatre paramètres :  $\eta_0$ ,  $\eta_\infty$ ,  $\lambda$  et  $m$



### **Annexe B-5 : Les régimes de concentrations observés pour un polymère en solution**

Les trois régimes de concentrations observés pour un polymère en solution sont : le régime dilué, le régime semi-dilué et le régime concentré (Figure 4).



**Figure 4 :** Représentations schématiques des trois régimes de concentrations observables dans le cas d'un polymère en solution.

Source : ([http://www.wikiwand.com/fr/Polym%C3%A8re\\_en\\_solution](http://www.wikiwand.com/fr/Polym%C3%A8re_en_solution))

Dans le domaine dilué, les chaînes de macromolécules sont considérées comme isolées et libres. Elles vont se mouvoir en prenant des directions aléatoires en solution. Elles adoptent en général la conformation de « pelote statistique » dans l'hypothèse de chaînes de polymères flexibles. Dans ce régime, les interactions polymère-solvant sont prépondérantes.

L'augmentation de la concentration (donc du nombre de macromolécules) favorise le rapprochement des chaînes isolées en solution. Cela est expliqué par une augmentation du volume occupé par les chaînes (volume hydrodynamique). A une concentration notée  $C^*$  (concentration de recouvrement), les chaînes sous formes de pelotes vont commencer à entrer en contact, elles vont se toucher. Le régime semi-dilué est alors atteint.

Au-delà de cette concentration ( $C > C^*$ ), les macromolécules vont devenir de moins en moins libres pour se mouvoir en raison d'espace (de volume) insuffisant. Les interactions polymère-polymère vont devenir de plus en plus importantes. Les mouvements sont ralentis. Les chaînes ne peuvent plus facilement se replier sur elles-mêmes ou prendre des orientations multiples. Le phénomène d'interdépendance d'orientations de chaînes va alors s'accroître avec l'augmentation de la concentration. Par conséquent, il y aura formation d'un réseau à la concentration  $C^{**}$  (concentration d'enchevêtrement). Dans le régime concentré ( $C > C^{**}$ ), les chaînes en solution sont alors enchevêtrées et ne peuvent plus être dissociées les unes des autres.

**Annexe B-6 : Informations complémentaires sur la méthode de dilution et de comptages****Méthode de dilution***a. Préparation des gammes de dilutions*

A partir d'une solution mère du composé à tester, les dilutions sont réalisées (facteur 2) dans le milieu de culture BHI (deux fois concentré) avec un volume final de 2 mL.

Le tableau 1, présente les différentes conditions utilisées pour les différents produits testés.

**Tableau 1. Les concentrations et conditions de solubilisation de tous les composés testés Aminogaïacol (NH<sub>2</sub>GA), CMP et les dérivés greffés CMP-G<sub>x</sub>, Alginate et les dérivés greffés Alg-G<sub>x</sub>.**

<b>Produit</b>	<b>Solvant</b>	<b>[solution mère] (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>[produit] (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Gamme Référence</b>
NH <sub>2</sub> GA	Ethanol	69,5	[2,8 – 0,35]	Milieu Ethanol/BHI
CMP	PBS	50 ou 80	[50 – 3,125] / [60 – 3,75]	Milieu PBS/BHI
CMP-G <sub>x</sub>	PBS	50 ou 80	[50 – 3,125] / [60 – 3,75]	CMP dans le milieu PBS/BHI
Alginate		40	[20 – 1,25]	Milieu PBS/BHI
Alg-G <sub>x</sub>		40	[20 – 1,25]	Milieu PBS/BHI

*b. Culture*

Avant d'ensemencer toutes les solutions préparées, nous avons au préalable réalisé un traitement sur les bactéries.

Le lendemain de la préculture, il était possible de constater la prolifération des bactéries par un trouble caractéristique du milieu de culture. Un comptage est néanmoins nécessaire afin de distribuer les bactéries de façon fiable et reproductible d'une manipulation à l'autre. Pour cela, la suspension est centrifugée pendant 15 min à 5000 rpm (rotation par minute). Les surnageants sont jetés puis les culots sont repris et remis en suspension dans 7,5 mL de PBS. La nouvelle suspension est utilisée d'une part pour la lecture de la DO afin d'estimer la population bactérienne totale à disposition. D'autre part, pour réaliser l'ensemencement des gammes de dilution d'intérêt.

- Nombre de bactéries à prélever

Pour réaliser l'ensemencement, le nombre de bactéries ou plus précisément le nombre d'unités formant colonie (UFC) a été fixé à  $10^6$  UFC pour 1 mL de milieu vierge. Il était alors nécessaire de calculer le nombre total de bactéries à prélever pour la manipulation en cours en tenant compte du volume final de milieu par pot (2 mL) et du nombre total de pots à ensemenecer.

- Dénombrement de la suspension bactérienne

Un prélèvement d'1 mL de la suspension bactérienne d'une part et d'1 mL de tampon PBS d'autre part, sont versés chacun dans une cuve en Polyméthacrylate de méthyle (PMMA). La première mesure de DO faite au spectrophotomètre à 595 nm est celle du PBS. Elle sera amenée à la valeur zéro, signifiant l'absence de toute particule. La DO de la suspension bactérienne sera ensuite mesurée. La valeur de DO obtenue est alors intégrée dans une équation linéaire qui établit le rapport entre la DO et le nombre de bactéries contenues dans 1 ml. Cette équation est propre à chaque type de bactérie.

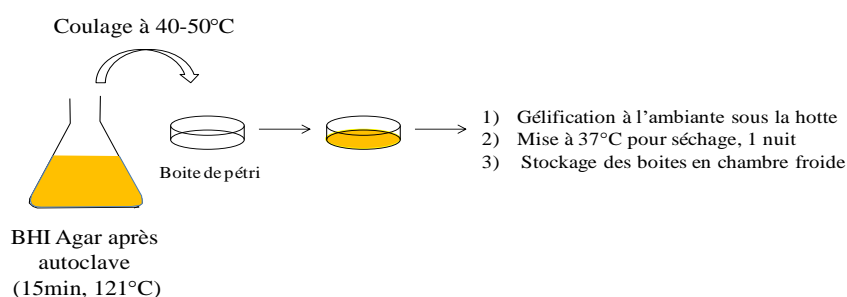
Dans le cas de la souche *S.aureus* employée, l'équation utilisée avait été au préalable déterminée et est égale à  $y = 1,06.10^{-7} x - 0,015$ .

- Ensemencement

Connaissant la teneur en bactéries de la suspension (x) et le nombre total de bactéries à prélever (ensemencement fixé à  $10^6$  UFC/mL), le volume total nécessaire pour les ensemencements des pots préparés est calculé. Le volume à ensemenecer (par pot) est obtenu en divisant ce volume total par le nombre de pots à ensemenecer. Une fois ensemencés, les pots sont placés dans un incubateur à 37°C sous agitation pendant 24 h.

#### Méthode de Comptages :

La méthode de préparation du milieu solide : gélose BHI Agar est présentée sur le schéma 3.



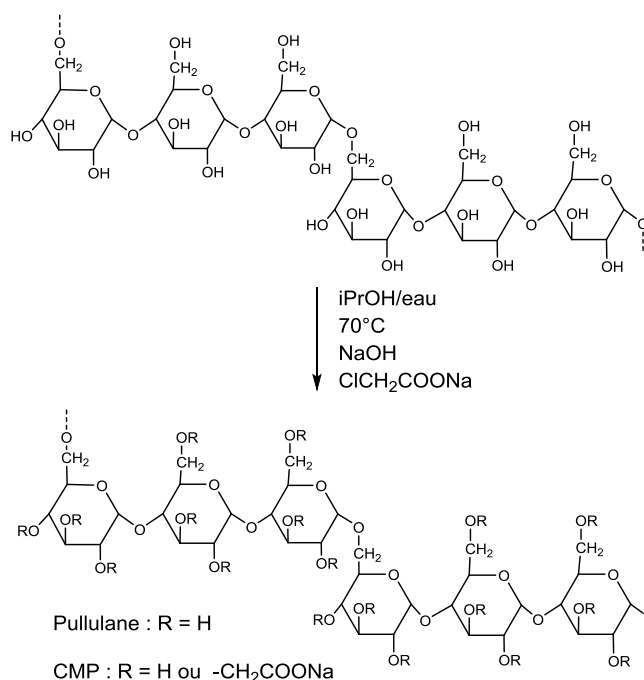
**Schéma 3 : Préparation du milieu gélosé BHI Agar**

**Annexe C-1 : Synthèse et caractérisation du carboxyméthylpullulane**

## a. Protocole de synthèse du carboxyméthylpullulane

(DS en fonction carboxylates  $-\text{COONa}$  visé est égal à 1)

La réaction de carboxyméthylation permet d'incorporer des fonctions carboxylate sur le pullulane via la formation d'un lien éther entre les fonctions hydroxyle du réactif pullulane et les fonctions  $-\text{CH}_2\text{COONa}$  du réactif chloroacétate de sodium ( $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ ). La réaction se fait en milieu biphasique eau/isopropanol pour limiter l'hydrolyse basique du chloroacétate en acide glycolique. Afin de limiter la dégradation des chaînes polymères par hydrolyse basique, les ajouts de soude et de chloroacétate sont effectués en quatre fois.



Pour ce faire, 30g de pullulane ont été au préalable dissous dans 120 ml d'eau à l'aide d'un réacteur de 500 ml et sous agitation mécanique pendant une nuit. Le lendemain,  $\frac{1}{2}$  pastille de borohydrure de sodium ( $\text{NaB}_2\text{H}_4$ ) est ajoutée à la solution de pullulane afin de réduire son extrémité réductrice (aldéhyde) en alcool, puis le tout est laissé pendant 30 min, à  $70^\circ\text{C}$ . Le montage est surmonté d'un réfrigérant. Par la suite, 120 ml d'isopropanol (iPrOH) sont ajoutés très lentement à la solution de pullulane suivi de l'introduction d'une solution de soude (4,625 g dans 5 ml d'eau milli-Q). Après 15 min d'agitation, 13,5 g de chloroacétate ( $\text{ClAcNa}$ ) de sodium sont additionnés au précédent mélange. Ainsi de suite, les ajouts successifs de soude, d'isopropanol et de chloroacétate de sodium sont effectués à intervalles réguliers de 15 min et sont résumés dans le tableau 2. A la fin de tous les ajouts, le milieu réactionnel est maintenu à  $70^\circ\text{C}$  sous agitation mécanique pendant 4 heures.

**Tableau 2 : Liste des ajouts successifs effectués afin de réaliser la réaction de carboxyméthylation à partir d'une solution de pullulane.**

temps	NaOH	ClAcNa	isopropanol
Ajout 1 (t = 0 min)	4,625g/5mL eau		120 ml (ajout lent)
+ 15 min		13,5g	
+ 15 min	4,625g/5mL eau		40 ml (ajout lent)
+ 15 min	-	13,5g	
+ 15 min	4,625g/5mL eau	-	40 ml (ajout lent)
+ 15 min	-	13,5g	
+ 15 min	6,45/7mL eau	-	40 ml (ajout lent)
+ 15 min	-	18,8g	15 ml (ajout lent)

Au total, les quantités utilisées en réactifs sont :

temps	Masse (g)	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	n (mol)
Pullulane	30	162	0,185
ClCH <sub>2</sub> COONa	59,3	116,5	0,509

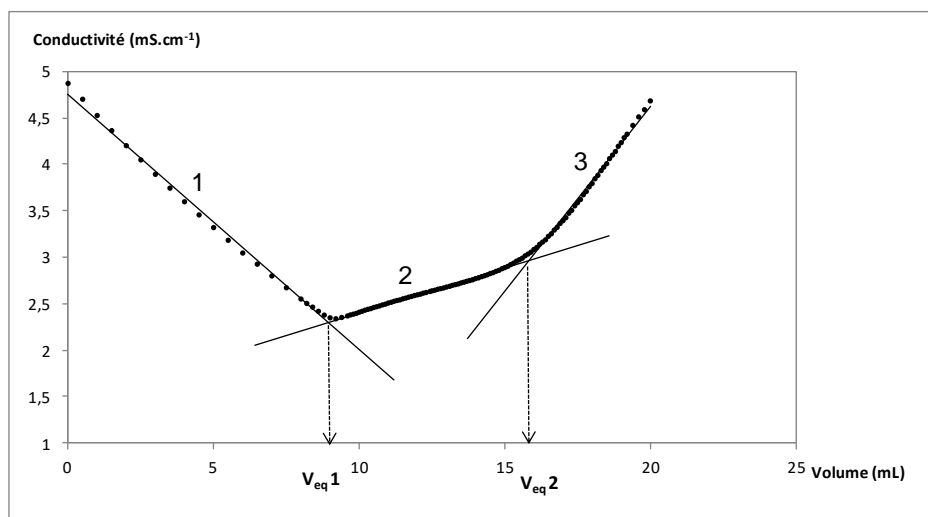
Au bout des 4 heures, la réaction est arrêtée. Le mélange dans le ballon présente deux phases. La phase organique est éliminée à l'aide d'un évaporateur rotatif. La phase aqueuse contenant le produit d'intérêt est récupérée. Elle est ensuite neutralisée par une solution d'acide chlorhydrique HCl 4 N puis dialysée (seuil de coupure des membranes 12 – 14 kDa, SpectrumLabs, UK) contre de l'eau milli-Q pendant environ 10 jours. La dialyse est arrêtée pour une conductivité des eaux de dialyse suffisamment faible (4 – 6  $\mu$ S). Les solutions ainsi purifiées sont congelées puis lyophilisées. Une fois le CMP récupéré sous la forme de sel de sodium, la quantification du greffage est réalisée à l'aide d'un dosage conductimétrique.

b. Détermination du degré de substitution en fonctions carboxylate ( $-\text{COONa}$ ) du CMP par dosage conductimétrique

### Protocole du dosage

225 mg de CMP sous la forme de sel de sodium sont dissous dans 50 ml d'eau milli-Q. Après dissolution complète, 7 ml de cette solution sont exactement prélevés et placés à l'étuve à 95°C pour évaporation complète de l'eau. L'extrait sec recueilli le lendemain permettra de déterminer la concentration exacte de la solution de CMP dosée par conductimétrie.

Les 43 ml restants sont incorporés dans un bécher à double paroi thermostatée à 25°C et placés sous azote pour effectuer le dosage. Par la suite, 1 ml de soude à 1 M est additionné à la solution de CMP. Cette dernière est ensuite dosée par de l'acide chlorhydrique HCl 0,1 M (contenu dans une burette graduée de 2 ml). Un exemple de courbe représentant la conductivité de la solution du CMP mesurée en fonction du volume de HCl ajouté (conductivité =  $f(V_{\text{HCl}})$ ) est fourni figure 5.



**Figure 5 :** Exemple de courbe obtenue expérimentalement par dosage conductimétrique des fonctions carboxylates du CMP à l'aide d'une solution de HCl 0,1M, en présence de soude à 1M, à 25°C

La courbe obtenue peut être délimitée en trois droites. A  $V_{\text{HCl}} = 0$ , la conductivité de la solution est majoritairement apportée par les ions  $\text{OH}^-$  (en excès). La première droite illustre le dosage de l'excès des ions  $\text{OH}^-$  (NaOH) par les ions  $\text{H}^+$  (HCl). La conductivité diminue. La fin de ce premier dosage (consommation totale des ions  $\text{OH}^-$  en excès) est marquée par un volume équivalent en HCl (noté  $V_{\text{eq}1}$ ).

Ensuite, l'ajout progressif d'HCl conduit au dosage des fonctions carboxylates ( $\text{COO}^-$ ) du CMP. La conductivité augmente légèrement. Une fois toutes les fonctions  $\text{COO}^-$  titrées, le volume équivalent en HCl (noté  $V_{\text{eq}2}$ ) est atteint. Après cette seconde équivalence, l'ajout d'HCl à la solution de CMP apporte des ions  $\text{H}^+$  en excès. La conductivité augmente donc à nouveau.

Remarque : Les  $V_{eq}$  correspondent à l'abscisse des points d'intersection entre les droites 1 et 2 ( $V_{eq1}$ ) et les droites 2 et 3 ( $V_{eq2}$ )

### Calcul du DS(COONa)

Le nombre de mole de fonctions  $COO^-$  dosées ( $n_{COO^-}$ ) est déterminé en s'intéressant à la région correspondant au dosage des fonctions carboxylate. Il est exprimé de la manière suivante :

$$n_{COO^-} = C_{HCl} \times \Delta V$$

avec  $\Delta V = V_{eq2} - V_{eq1}$

Or par définition,

$$DS (COONa) = \frac{n_{COO^-}}{n_{CMP}} = \frac{n_{COO^-} \times M_{CMP}}{m_{CMP}} \quad \text{Eq.14}$$

avec :

DS (COONa) : le degré de substitution en fonction carboxylate

$n_{COO^-}$  : nombre de moles de fonctions  $COO^-$  présent dans la solution dosée ( $V= 43$  ml);

$n_{CMP}$  : nombre de moles de CMP dans la solution dosée;

$m_{CMP}$  : masse en CMP dans la solution dosée;

$M_{CMP}$  :  $M_{AGU} + M_1 \times DS(COONa)$ ;

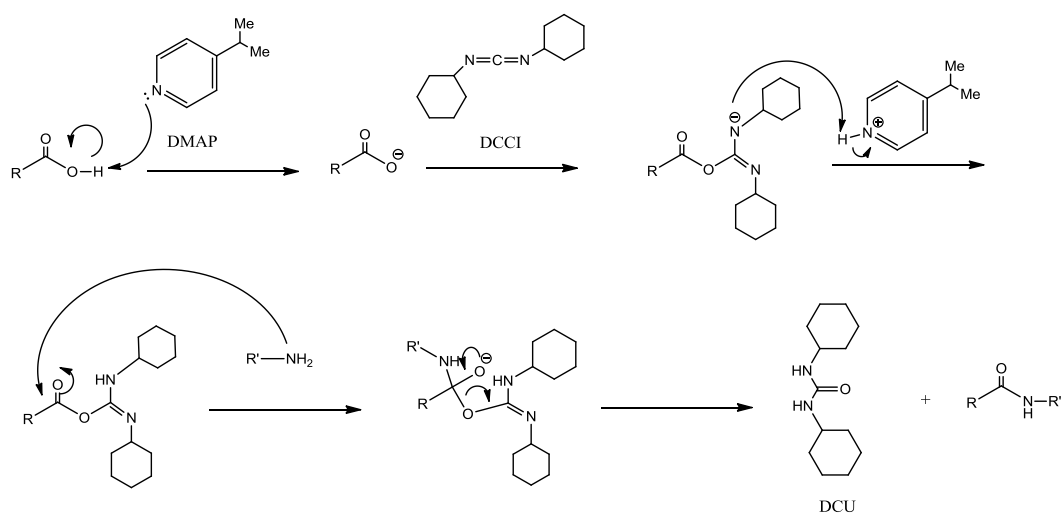
$M_{AGU}$  : Masse molaire de l'unité anhydroglucose du pullulane ( $162 \text{ g.mol}^{-1}$ )

$M_1$  : Masse obtenue par le calcul de la différence entre la masse molaire du chloroacétate ( $ClCH_2COONa$ ) et la masse molaire des atomes H ( $-OH$  du pullulane) et de l'atome Cl qui ont été éliminés au cours de la réaction de carboxyméthylation pour donner le groupement  $-OCH_2COONa$  (soit  $80 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

Après réarrangement, on obtient :

$$DS (COONa) = \frac{n_{COO^-} \times M_{AGU}}{m_{CMP} - (M_1 \times n_{COO^-})}$$

**Annexe C-2 : Mécanisme réactionnel d'activation des fonctions carboxyliques du CMP en présence d'agents activateurs DCCI/DMAP**



**Schéma 4 : Mécanisme réactionnel en présence de DMAP et DCCI**



**Annexe C-3: Activité antibactérienne (%) des produits CMP-G<sub>x</sub>**

Le détail des activités déterminées à l'aide de trois mesures dans le cas de chacune des concentrations testées et de chacun des dérivés est présenté dans le tableau C-5.1

**Tableau 3 : Activité antibactérienne (%) des produits CMP-G<sub>x</sub>**

	[CMP-G <sub>x</sub> ] g.L <sup>-1</sup>	[NH <sub>2</sub> GA] <sub>eq</sub> mM	CFU/mL (CMP-G <sub>x</sub> )	Activité antibactérienne (%) <sup>a</sup>
CMP-G <sub>0,58</sub>	50	98	2,3 x 10 <sup>8</sup>	93,8
			1,6 x 10 <sup>8</sup>	95,7
			4,5 x 10 <sup>8</sup>	87,8
	25	49	2,7 x 10 <sup>8</sup>	92,7
			3,2 x 10 <sup>8</sup>	91,4
			3,6 x 10 <sup>8</sup>	90,3
	12,5	24	5,0 x 10 <sup>8</sup>	86,4
			3,4 x 10 <sup>8</sup>	90,8
			6,1 x 10 <sup>8</sup>	83,5
CMP-G <sub>0,37</sub>	60	81	2,7 x 10 <sup>8</sup>	92,7
			4,7 x 10 <sup>8</sup>	87,3
			1,4 x 10 <sup>8</sup>	96,2
	30	40	7,5 x 10 <sup>8</sup>	79,7
			6,6 x 10 <sup>8</sup>	82,2
			6,8 x 10 <sup>8</sup>	81,6
	15	20	9,9 x 10 <sup>8</sup>	73,2
			7,5 x 10 <sup>8</sup>	79,7
			1,3 x 10 <sup>9</sup>	64,8
CMP-G <sub>0,16</sub>	60	38	7,6 x 10 <sup>8</sup>	79,4
			7,2 x 10 <sup>8</sup>	80,5
			1,8 x 10 <sup>8</sup>	95,1
	30	16	6,9 x 10 <sup>8</sup>	81,3
			1,1 x 10 <sup>9</sup>	70,3
			4,5 x 10 <sup>8</sup>	87,8
	15	9,4	2,5 x 10 <sup>9</sup>	32,4
			2,4 x 10 <sup>9</sup>	35,1
			1,7 x 10 <sup>9</sup>	54,1

**Annexe D-1 : Protocole de synthèse du CMP dégradé (<sup>d</sup>CMP)**

La veille, une solution de CMP à haute masse molaire à  $20 \text{ g.L}^{-1}$  ( $4,5 \text{ g} / 225 \text{ ml}$  d'eau) a été préparée dans un ballon de 250 mL. Le lendemain, le pH est ajusté à 2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique HCl 1 M. Le ballon contenant la solution acide de CMP et surmonté d'un réfrigérant est ensuite chauffé à  $80^\circ\text{C}$  pendant 72 h. Une fois la réaction terminée, après refroidissement, le pH de la solution est neutralisé. Cette dernière est ensuite dialysée contre de l'eau milli-Q pendant environ 1 semaine (seuil des membranes de dialyse utilisées 3,5 kDa), puis lyophilisée pour récupérer le <sup>d</sup>CMP.

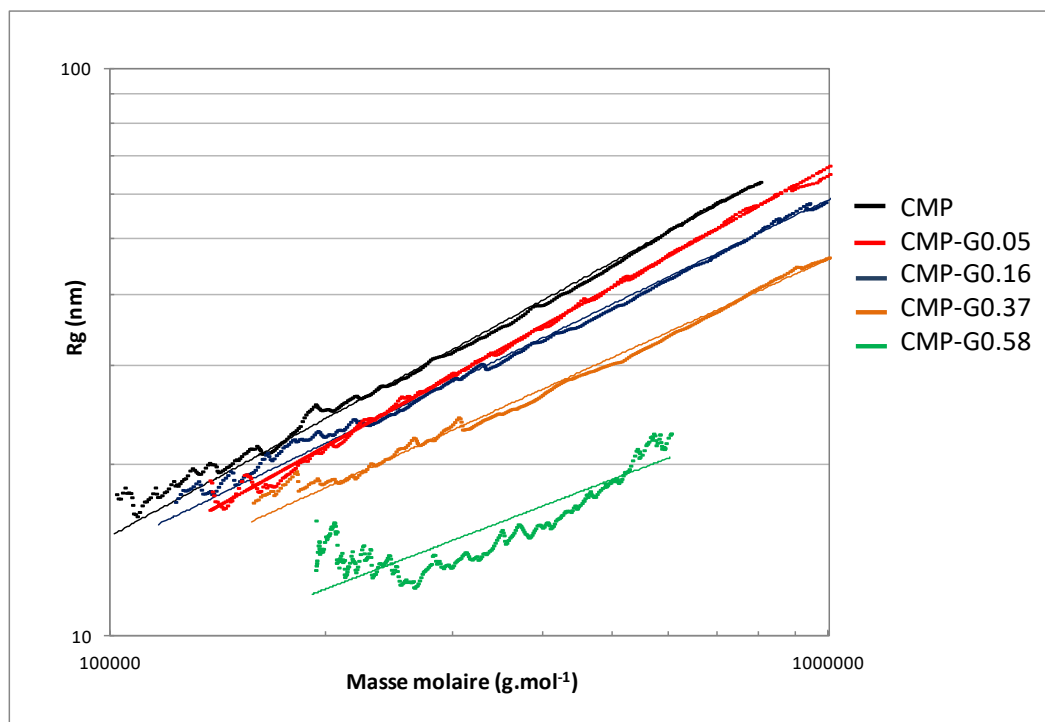
**Annexe D-2 : Exemple de protocole de synthèse du dérivé Alg-G<sub>x</sub> avec un DS(Ga) théorique égal à 0,15**

Il faut noter qu'en raison de la viscosité marquée de l'alginate, nous avons travaillé à des concentrations plus faibles comparées au CMP et au <sup>d</sup>CMP.

La veille, l'aminogaiacol (1,05 mmol) a été dissous dans 80 mL d'acide chlorhydrique HCl  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  toute une nuit. La solution est colorée en marron. En parallèle, une solution d'alginate (1 g ; 4,2 mmol) dans 250 mL d'eau milli-Q a également été préparée. Le lendemain, la solution d'aminogaiacol est ajoutée lentement à celle de l'alginate. Le pH du mélange a alors été ensuite ajusté à 4,5 à l'aide de HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . L'EDCI (0,24 g ; 1,3 mmol) dans 2 ml d'eau milli-Q est par la suite additionné à la solution précédente. Le tout est laissé sous agitation, à température ambiante et pendant 24 h.

### Annexe D-3 : Représentation $R_g = f(M)$ en échelle bi-logarithmique obtenue dans le cas du dérivé CMP-G<sub>0.05</sub>

Les courbes  $R_g = f(M)$  du CMP et des autres dérivés sont également représentées.



**Figure 6 :** Représentation bilogarithmique  $R_g = f(M)$  pour le CMP (noir) et les dérivés CMP-G<sub>0.05</sub> (rouge), CMP-G<sub>0.16</sub> (bleu), CMP-G<sub>0.37</sub> (orange) et CMP-G<sub>0.58</sub> (vert) dans le solvant PBS 0,15 M, à 25°C et à  $C = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### Référence bibliographique

- (1) Khalili Garakani, A. H.; Mostoufi, N.; Sadeghi, F.; Hosseinzadeh, M.; Fatourehchi, H.; Sarrafzadeh, M. H.; Mehrnia, M. R. Comparison between Different Models for Rheological Characterization of Activated Sludge. *Iranian J. Environ. Health Sci. Eng.* **2011**, 8 (3), 255–264.

**ANNEXE 2**

**Greffage chimique indirect de l'eugénol  
sur le carboxyméthylpullulane**



## Introduction

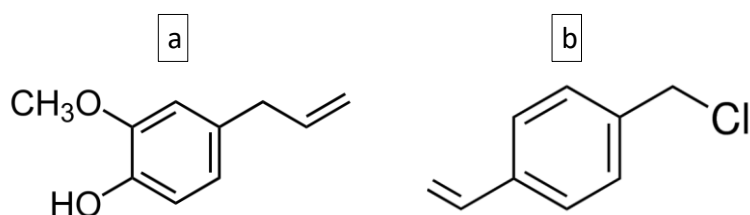
Nous rappelons que nous avons choisi la voie de greffage chimique afin d'incorporer les molécules végétales au sein de structure polymère. Nous avons envisagé deux axes principaux pour lier de manière covalente les composés actifs choisis (aminogaiacol ou eugénol) sur les squelettes des polysaccharides sélectionnés (CMP ou Alginate) :

(1) Le greffage chimique direct : il a été utilisé pour la réalisation de toutes les synthèses menées avec l'aminogaiacol et qui ont déjà été présentées tout au long du manuscrit, précisément dans les chapitres de résultats C et D. Il représente l'axe principal de notre étude.

(2) Le greffage indirect est présenté dans cette partie (annexe 2). Il avait été choisi en vue d'élaborer des systèmes greffés par l'intermédiaire d'un bras espaceur afin d'éloigner la molécule végétale active de la chaîne de polysaccharide en comparaison avec des systèmes greffés obtenus par voie directe, ce qui pourrait lui conférer une mobilité plus importante. Le greffage indirect s'établit en deux étapes : une étape préliminaire est nécessaire pour fixer de manière covalente une molécule intermédiaire sur le squelette carboné de la matrice (polysaccharide). Cette dernière servira de bras espaceur et ouvrira la possibilité à un second greffage chimique : celui de la molécule végétale active.

Nous avons utilisé cette fois-ci l'eugénol comme molécule végétale et le CMP comme polysaccharide. Dans l'étape préliminaire, nous avons incorporé un groupe vinylbenzène (VB) sur le CMP conduisant au produit intermédiaire CMP-VB, ensuite nous avons élaboré le dérivé final noté CMP-VB-E par greffage de l'eugénol (schéma 1) sur les groupes VB sous rayonnement UV. Nous nous intéresserons uniquement dans ce chapitre aux synthèses et aux caractérisations chimiques des produits greffés. Les propriétés antibactériennes et/ou antioxydantes n'ont pas été évaluées et ne seront donc pas abordées.

La structure chimique de l'eugénol et du chlorure de 4-vinylbenzyle (VB) est présentée sur le schéma 1.



**Schéma 1** : Structures chimiques (a) de l'eugénol et (b) du chlorure de 4-vinylbenzyle (VB)

# 1 Synthèse et Caractérisations de l'intermédiaire CMP-VB

## 1.1 Réactifs et solvants

Le carboxyméthylpullulane (CMP) synthétisé au laboratoire et au préalable présenté dans les chapitres précédents a été utilisé comme polysaccharide.

La molécule intermédiaire sélectionnée est le chlorure de 4-vinylbenzyle (VB) de chez (Sigma-Aldrich, France). C'est un composé hydrophobe qui se présente sous forme de liquide coloré en jaune pâle. Il a été choisi en raison de la présence d'une part d'un groupement halogéné (R-Cl : bon groupement partant) permettant d'établir un premier greffage sur les fonctions carboxylate ( $-\text{COO}^-$ ) du CMP via la formation d'un lien ester  $-\text{COO}-\text{R}$ . D'autre part, le VB possède également une double liaison vinylique qui est réactive sous UV et sera utile pour le second greffage en présence de la molécule végétale.

La molécule de VB étant insoluble dans l'eau et le CMP sous forme de sel de sodium (CMP-COONa) étant hydrosoluble, il était nécessaire de trouver un solvant approprié pour les deux réactifs. La réaction a été menée en milieu organique avec le solvant diméthylsulfoxyde (DMSO). Le CMP a été utilisée sous la forme de sel de tétrabutylammonium CMP-COON(Bu)<sub>4</sub>.

## 1.2 Synthèses et conditions de réactions

La réaction de greffage du chlorure de 4-vinylbenzyle (VB) sur le CMP est effectuée dans le DMSO à 40°C et pendant 2 jours. Le greffage du VB sur le CMP se fait par établissement de liaisons covalentes ester ( $-\text{CO}-\text{OR}-$ ). Cette dernière est formée suite à la réaction de substitution électrophile entre la fonction chlorure d'alkyle ( $-\text{R}-\text{Cl}$ ) du VB et la fonction carboxylate ( $-\text{COO}^-$ ) du CMP. La synthèse du CMP-VB est présentée schéma 2.

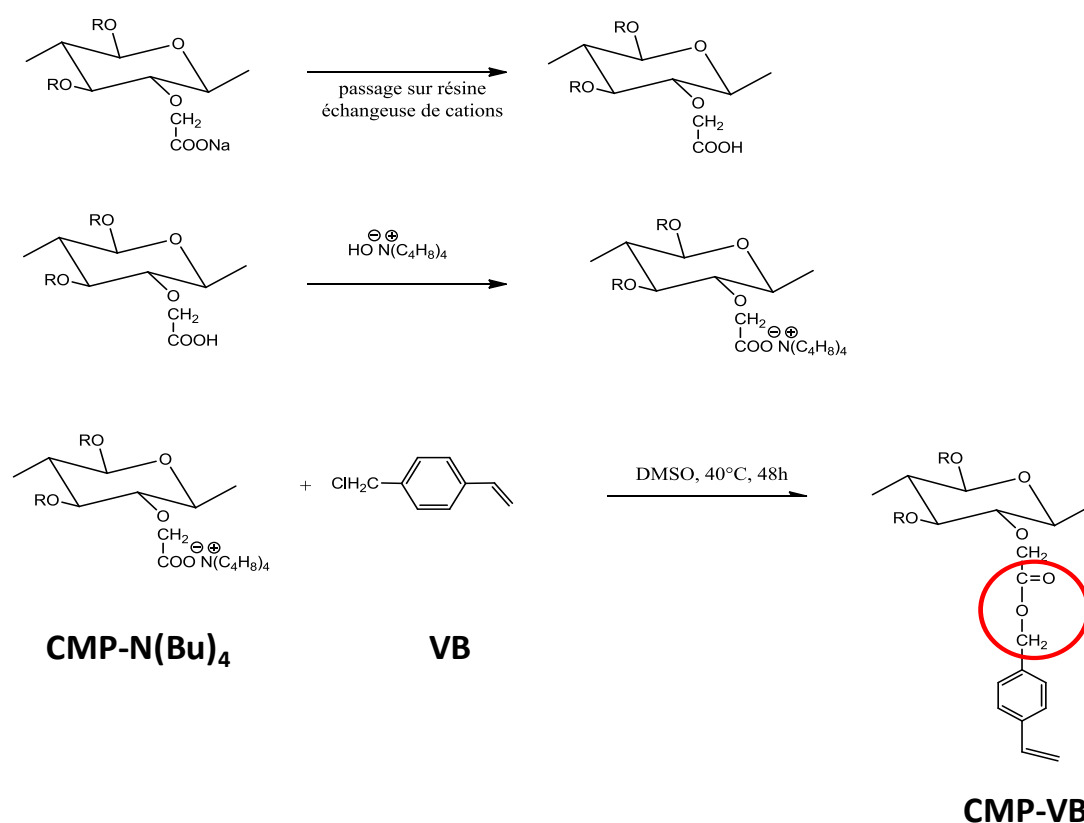
### **Protocole de synthèse du CMP greffé avec le chlorure de 4-vinylbenzyle (VB) :**

Etape 1 : Au préalable le CMP sous forme de sel de sodium (CMP-COONa) avait été transformé en CMP sous forme de sel de tétrabutylammonium CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> (rappel annexe C-3).

Etape 2 : La veille, le CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> est placé sous vide à 40°C pendant une nuit. Le degré de substitution théorique en VB visé a été fixé à 0,2 (rapport molaire :  $n(\text{VB})/n(\text{CMP})$ ). Pour réaliser la synthèse, 2,00549 g (4,49 mmol) de CMP-COON(Bu)<sub>4</sub> dans 50 ml de DMSO sont introduits dans un ballon de réaction de 250 mL puis chauffés à 40°C à l'aide d'un bain

d'huile. Après dissolution complète du  $\text{CMP-COON}(\text{Bu})_4$ , 0,13687 g (0,87 mmol) de chlorure de 4-vinylbenzyle (VB) dans 15 mL de DMSO sont ajoutés goutte à goutte à la solution de départ à l'aide d'une ampoule à brome. Le tout est laissé sous agitation à 40°C pendant 2 jours.

En fin de réaction, le mélange issu de la synthèse est ajouté lentement dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) afin de transformer tous les sels de tétrabutylammonium -  $\text{COON}(\text{Bu})_4$  restants en groupements  $-\text{COONa}$ . A ce stade, nous avons observé la formation d'un précipité blanc et collant à l'intérieur du mélange qui s'est déposé par la suite au fond du bécher. Le produit de synthèse présent dans la solution restante encore homogène est ensuite précipité dans de l'acétone puis filtré sous vide. Pour finir, une dialyse est effectuée contre de l'eau milli-Q avant la lyophilisation du produit noté CMP-VB.



**Schéma 2 :** Réaction de greffage du VB sur le CMP dans du DMSO, à 40°C et pendant 48 h.

Plusieurs synthèses (3 essais) ont été réalisées afin d'évaluer la reproductibilité de la réaction. Les conditions de réactions sont résumées dans le tableau 1. Le DS(VB) théorique visé est égal à 0,20. Il est défini comme le nombre de mole de chlorure de 4-vinylbenzyle (VB) par nombre de mole d'unité anhydroglucose du CMP. Le rendement massique moyen obtenu est



égal à 53%. Le CMP-VB obtenu était de coloration blanche et sous forme de coton. Il est soluble dans l'eau.

**Tableau 1 : Conditions de réaction de greffage du VB sur le CMP**

DS(VB) <sup>a</sup> théorique	Rendements massiques <sup>b</sup> (%)	Solubilité dans l'eau
0,2	48	oui
	53	
	57	
	53 ± 5,0 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>: Ratio molaire VB/CMP.

<sup>b</sup>: Moyenne déterminée à l'aide de 5 synthèses différentes

## 1.3 Caractérisations

### 1.3.1 Méthodes de caractérisation

Les techniques de spectroscopie UV, RMN<sup>1</sup>H ainsi que le couplage SEC/MALLS/DRI/Visco ont été également employées pour la caractérisation des produits (rappel Matériels et méthodes).

La quantification des greffons hydrophobes a été réalisée par spectroscopie UV et/ou RMN<sup>1</sup>H (lorsque c'était possible).

- Explication des calculs des degrés de substitution en greffons hydrophobes

Dans le cas du produit CMP-VB obtenu suite au greffage du VB sur le CMP (greffage intermédiaire), nous avons calculé le degré de substitution expérimental en greffons VB noté DS<sub>exp</sub>(VB) par UV et par RMN<sup>1</sup>H.

Dans le cas du produit CMP-VB-E, nous avons également déterminé un degré de substitution expérimental en greffons eugénol noté DS<sub>exp</sub>(E) uniquement par UV.

Détermination du DS<sub>exp</sub>(VB) par UV :

Par définition,

$$DS_{exp}(VB) = \frac{C(VB) \text{ en mol/l}}{C(CMP-VB) \text{ en mol/l}} \quad \text{Eq. E1}$$

$$DS_{exp}(VB) = \frac{C(VB) \text{ en mol/l}}{C(CMP-VB) \text{ en g/l}} * M_{motif}(CMP - VB) \text{ en g/mol} \quad \text{Eq. E2}$$

$C(\text{VB})$  : concentration molaire en greffons VB présente dans le produit CMP-VB analysé

$C(\text{CMP-VB})$  en  $\text{g.L}^{-1}$  : concentration massique en produit CMP-VB préparée pour effectuer les analyses UV

$M_{\text{motif}}(\text{CMP-VB})$  : masse molaire du motif de répétition CMP-VB

$$M_{\text{motif}}(\text{CMP-VB}) = M_{\text{motif}}(\text{pullulane}) + (M(\text{CH}_2\text{COONa}) - M(\text{H})) * \text{DS}_1 + (M(\text{VB}) - (M(\text{Cl}) - M(\text{Na})) * \text{DS}(\text{VB}))$$

avec :

$$M_{\text{motif}}(\text{pullulane}) = 162 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{VB}) = 152,62 \text{ g/mol}$$

$\text{DS}_1 = \text{DS}(\text{COONa}) = 0,96$  ;  $\text{DS}(\text{COONa})$  : le degré de substitution en fonction carboxylate.

$$M_{\text{motif}}(\text{CMP-VB}) = 162 + 80 * 0,96 + 94 * \text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$$

Après réarrangement de l'Eq.E2, on obtient:

$$\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB}) = \frac{C(\text{VB})_{\text{en}} \frac{\text{mol}}{\text{l}} * (162 + 80 * 0,96)}{C(\text{CMP-VB})_{\text{en}} \frac{\text{g}}{\text{l}} - C(\text{VB})_{\text{en}} \frac{\text{mol}}{\text{l}} * 94} \quad \text{Eq. E3}$$

Remarque :

Afin de déterminer la concentration molaire en greffons VB notée  $C(\text{VB})$ , nous avons réalisé au préalable une courbe d'étalonnage par UV. Pour ce faire, nous avons utilisé le styrène sulfonate de sodium comme molécule étalon. Cette dernière a été choisie pour l'étalonnage car elle possède une structure chimique de base similaire à celle du chlorure de 4-vinylbenzyle (VB). De plus, elle est soluble dans l'eau contrairement au VB. La droite d'étalonnage a été déterminée à 255 nm avec l'équation correspondante :  $18636 \times$  avec  $R^2 = 0,999$ . Nous sommes toutefois conscients que le coefficient d'extinction molaire peut varier entre les deux molécules, ce qui peut induire une erreur sur le calcul du DS par cette méthode.

#### Détermination du $\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$ par RMN<sup>1</sup>H :

Les degrés de substitutions par RMN<sup>1</sup>H ont été déterminés sans étalon interne. Nous avons directement utilisés comme pics de référence, ceux des protons anomériques du CMP (qui étaient bien définis).

D'une manière générale, les degrés en greffons hydrophobes notés  $\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$  sont calculés à l'aide de l'équation E4 après intégration des protons du VB et de ceux des protons anomériques du CMP.

$$\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB}) = \frac{I(\text{VB}) * n(\text{H1})}{I(\text{CMP}) * n(\text{H2})} \quad \text{Eq. E4}$$

avec :

$I(\text{VB})$  = aire du pic correspondant aux protons de la molécule VB qui ont été intégrés ;

$I(\text{CMP})$  = aire du pic correspondant aux protons anomériques du CMP ;

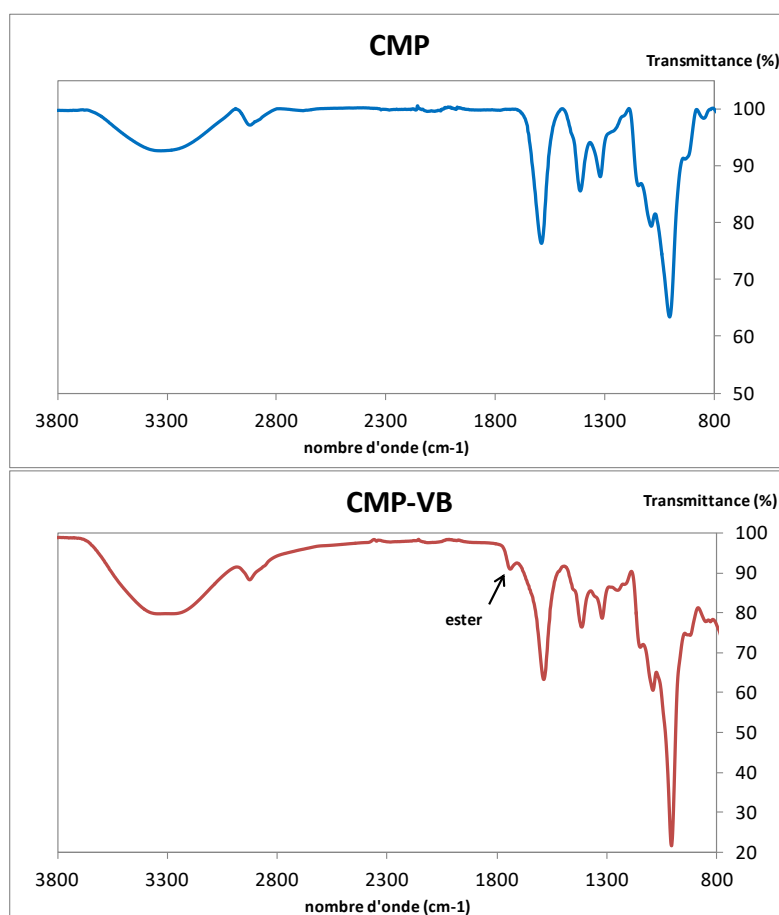
$n(\text{H1})$  = nombre de protons anomériques du CMP correspondant au pic intégré ;

$n(\text{H2})$  = nombre de protons de la molécule VB correspondant au pic intégré.

Nous allons maintenant nous intéresser aux résultats obtenus suite aux caractérisations des produits CMP-VB.

### 1.3.2 Spectroscopie IR

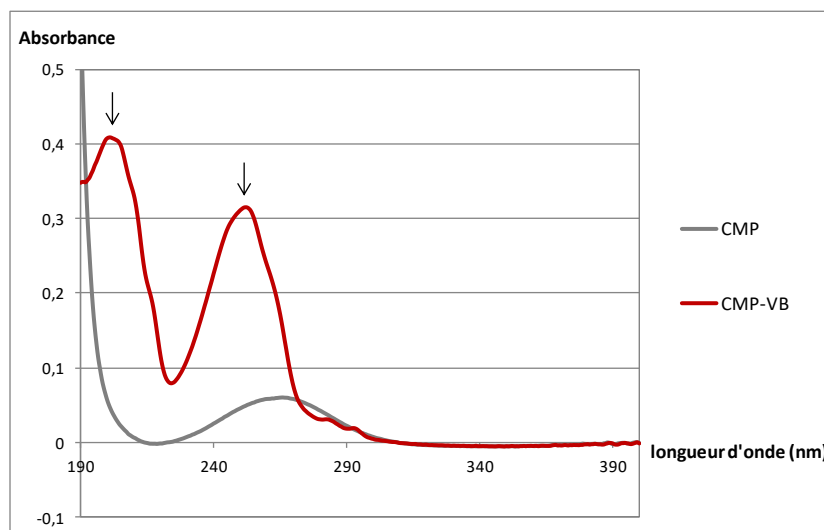
La spectroscopie IR a permis de confirmer les greffages réalisés. Les spectres IR du CMP et du dérivé CMP-VB sont présentés ci-dessous (Figure 1). Sur le spectre du dérivé CMP-VB, il y a apparition d'un nouveau pic (sous forme d'épaulement) qui est caractéristique de la fonction ester créée (à  $1737\text{ cm}^{-1}$ )<sup>1,2</sup>.



**Figure 1** : Spectre IR du CMP (bleu) et du CMP-VB (rouge)

### 1.3.3 Spectroscopie UV

La molécule VB possède des groupements chromophores détectables en UV, notamment un noyau aromatique et une fonction vinylique. Des solutions du précurseur CMP et du dérivé CMP-VB ont été préparées dans l'eau respectivement à  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  et  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ . Elles ont été par la suite analysées dans le domaine UV. Les spectres obtenus sont présentés sur la Figure 2.



**Figure 2 :** Spectres UV du CMP (gris) à  $C = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$  et CMP-VB (rouge) à  $C = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$  dans l'eau.

Commentaires :

Le spectre du CMP possède une bande d'absorption entre [230 - 300] nm. Le spectre du CMP-VB présente deux pics bien définis avec des maximums à 201 et 255 nm (marqués par des flèches). Ils sont respectivement attribués de manière qualitative au cycle benzène et à la fonction vinylique du VB.

Nous avons déterminé les degrés DS(VB) expérimentaux par UV grâce à un étalonnage avec le styrène sulfonate de sodium dans l'eau. Le pic de référence utilisé pour le calcul est celui de la fonction vinylique du VB (255 nm). Les degrés de substitutions  $DS_{\text{exp}}(\text{VB})$  déterminés sont présentés dans le tableau 2 (plus bas, partie RMN<sup>1</sup>H). Le degré  $DS_{\text{exp}}(\text{VB})$  moyen déterminé par UV est égal à  $0,08 \pm 0,01$  (soit 8 molécules de VB greffées sur 100 unités anhydroglucose du CMP). Il faut néanmoins avoir en mémoire que l'étalonnage n'a pas pu être fait avec le VB car il est insoluble dans l'eau. Il a été effectué avec le styrène sulfonate de sodium qui lui est soluble dans l'eau mais qui ne présente pas forcément le même coefficient d'extinction molaire. Les  $DS_{\text{exp}}(\text{VB})$  restent donc approximatifs.

### 1.3.4 Spectroscopie RMN<sup>1</sup>H

La spectroscopie RMN a été réalisée afin de détecter la présence en greffons VB dans le produit CMP-VB mais également pour la quantification du greffage. Le spectre RMN obtenu est présenté sur la Figure 3.

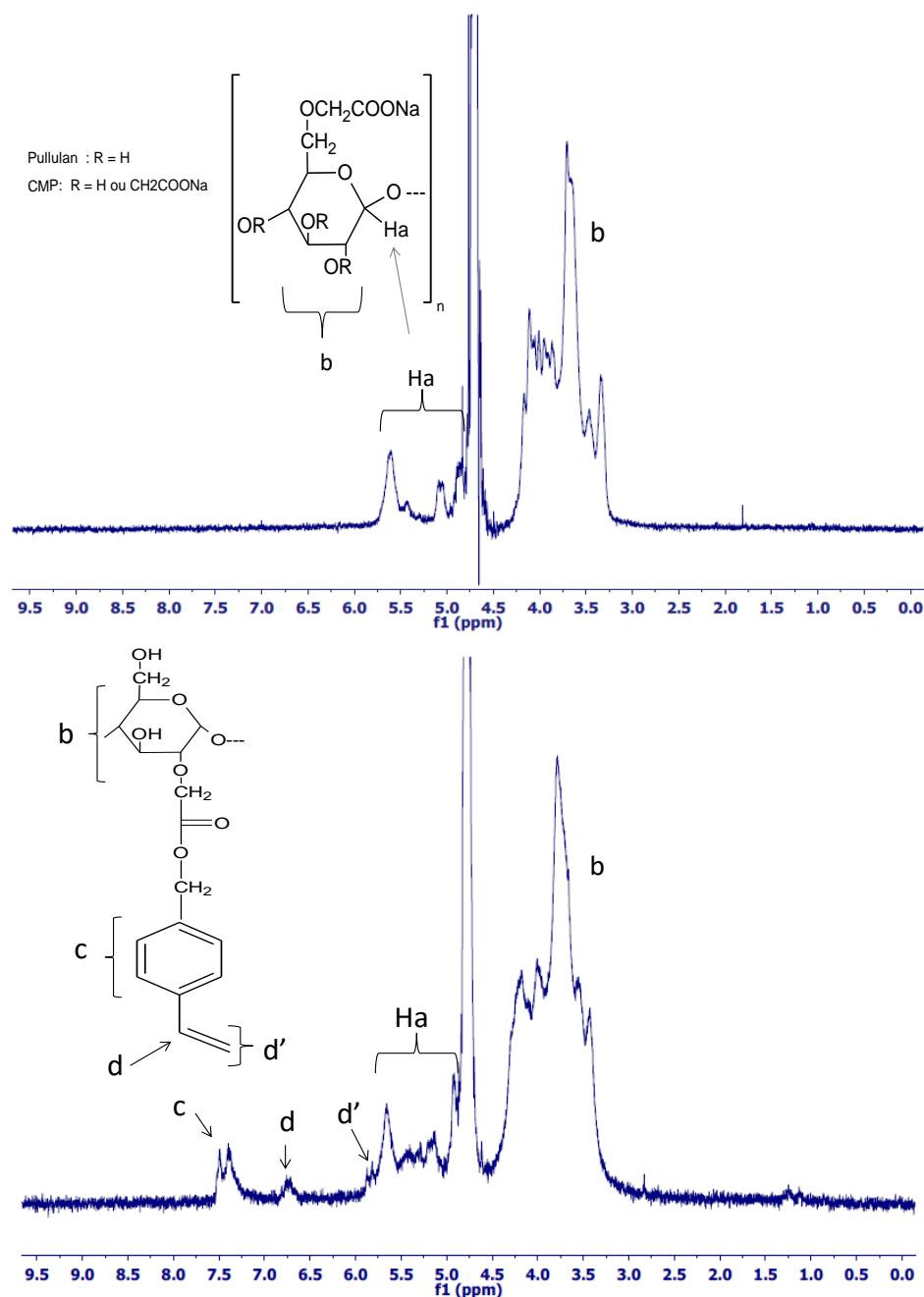


Figure 3 : Spectres RMN <sup>1</sup>H du CMP (A) et du dérivé CMP-VB (B) dans du D<sub>2</sub>O à 10 g.L<sup>-1</sup>.

En comparaison avec le spectre du CMP, le spectre du CMP-VB présente de nouveaux pics, annotés c, d et d'. Ces derniers sont notamment retrouvés respectivement entre [7,25 – 7,5] ppm ; à 6,75 ppm et à 5,75 ppm. Les pics d ( $\underline{CH}$ ) et d' ( $\underline{CH}_2$ ) peuvent être attribués aux protons de la double liaison vinylique de la molécule de VB. Il faut noter qu'un des deux protons du  $\text{CH}_2$  devrait sortir vers 5,2 ppm, donc en même temps que les protons anomériques du CMP)). Les protons aromatiques (4 H) de la molécule VB sont attribués au pic c.

Nous avons choisi d'utiliser le pic c pour la quantification car parmi tous les autres pics attribués au VB (c, d et d'), il était le mieux défini et le plus intense. La spectroscopie RMN a permis de quantifier le greffage avec également une approximation compte-tenu de la présence d'un proton de la fonction vinylique dans l'intégration du pic des protons anomériques.

Nous avons déterminé les  $\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$ . Ils sont regroupés dans le tableau 2. Le degré  $\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$  moyen déterminé par RMN est de  $0,20 \pm 0,01$ . L'efficacité de la réaction est totale. Cette valeur moyenne de  $\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$  semble être surestimée en tenant compte du fait que nous n'avons pas utilisé d'agents activateurs des fonctions carboxylate du CMP. Pour comparaison, Bataille *et al.*<sup>3</sup> avaient synthétisé des systèmes CMP greffés avec des chaînes alkyle  $\text{C}_{16}$ , avec un efficacité de 65 %. Les auteurs avaient utilisé un solvant et une température similaire (DMSO et  $40^\circ\text{C}$ ) mais à la différence ils avaient ajouté un agent de type carbodiimide, activateur des fonctions carboxylates du CMP soit le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCI). Il faut tout de même noter que dans notre cas, le  $\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$  moyen obtenu ne limite pas la solubilité des produits CMP-VB dans l'eau. Ce qui est important pour la suite des synthèses mais également pour les applications désirées.

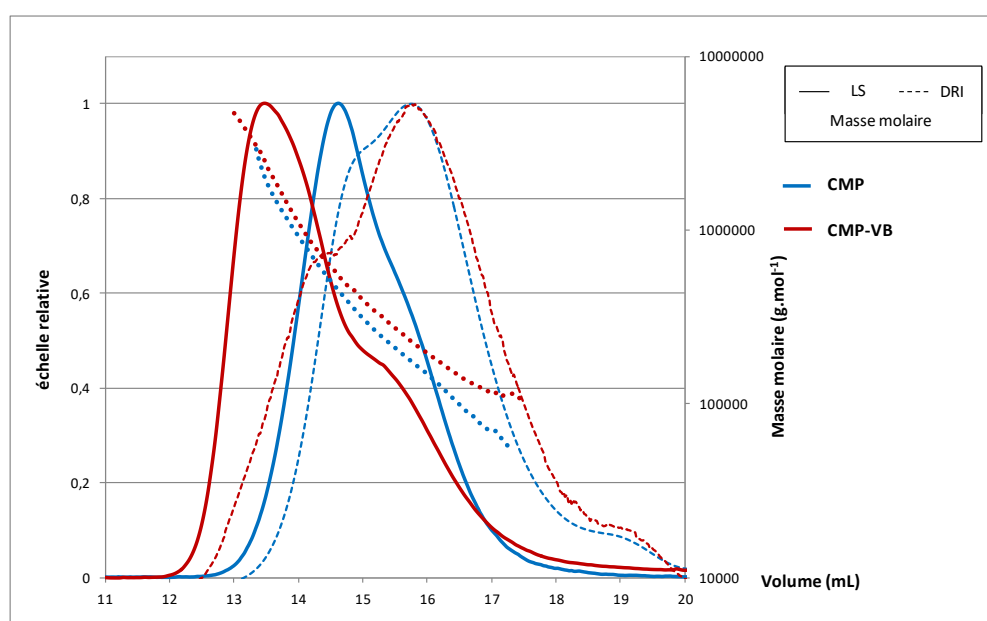
Par ailleurs, on remarque que les  $\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$  déterminés par UV et par  $\text{RMN}^1\text{H}$  sont très éloignés. Cependant il faut noter que chacune de ces méthodes apporte certaines erreurs telles que la nature de l'étalon utilisée (en UV) et la présence d'un proton de la fonction vinylique dans l'intégration du pic des protons anomériques (en RMN).

**Tableau 2 :  $\text{DS}(\text{VB})$  expérimentaux moyens des dérivés CMP-VB calculés par UV et  $\text{RMN}^1\text{H}$**

	$\text{DS}_{\text{théo}}(\text{VB})$	$\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$ UV	$\text{DS}_{\text{exp}}(\text{VB})$ $\text{RMN}^1\text{H}$
CMP-VB	0,2	0,080	0,197
		0,070	0,191
		0,076	0,215

### 1.3.5 SEC/MALLS/DRI/Visco

La Figure 4 présente les profils d'élution du CMP et du CMP-VB à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  en milieu salin  $\text{LiNO}_3$   $0,1 \text{ M}$ . Le tableau 3 regroupe toutes les informations recueillies concernant les grandeurs macromoléculaires des échantillons analysés. Il faut noter que la filtration du CMP-VB a été difficile et que la fraction analysée est faible (50%).



**Figure 4 :** Profils d'élutions du CMP et du dérivé CMP-VB dans du  $\text{LiNO}_3$  à  $0,1 \text{ M}$ ; CMP DS  $0,96$  (bleu), CMP-VB (rouge). Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes obtenues par le détecteur réfractomètre (DRI) : trait discontinu. Distribution des masses molaires (rond plein).

**Tableau 3 :** Grandeurs macromoléculaires caractéristiques des produits CMP et CMP-VB déterminés par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco à une concentration en échantillon  $C = 1.0 \text{ g L}^{-1}$  et dans un milieu  $\text{LiNO}_3$   $0.1 \text{ M}$ .

	$M_n$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$M_w$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$M_o^a$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$DP_n$ apparent ( $M_n/M_o$ )	$R_{h(n)}$ (nm)	$[\eta]_n$ ( $\text{mL g}^{-1}$ )	Masse récupérée (%)
CMP	149 000 ( $\pm 2,9 \%$ )	268 000 ( $\pm 0,8 \%$ )	239	623	13,0 ( $\pm 0,8 \%$ )	190 ( $\pm 0,4 \%$ )	88
CMP-VB	246 000 ( $\pm 1,7 \%$ )	547 000 ( $\pm 0,7 \%$ )	246	1000	16,4 ( $\pm 1,3 \%$ )	204 ( $\pm 2,3 \%$ )	51

En s'intéressant à la Figure 4, on remarque que le CMP-VB est élué (profils DRI et LS) à des volumes plus faibles que le CMP. Le CMP-VB présente donc des objets plus volumineux que le CMP. L'évolution de la distribution des masses molaires montrent qu'à volume d'éluion constant (i.e. même volume hydrodynamique), le dérivé CMP-VB possède des masses plus importantes que le précurseur, traduisant des objets plus denses. Ces premières observations sont confirmées par les données résumées dans le tableau 3. En effet, les masses molaires  $M_n$  et  $M_w$  du CMP-VB sont élevées en comparaison avec celles du CMP. L'augmentation de ces masses molaires n'est pas uniquement la conséquence de l'augmentation de la masse  $M_0$  du motif de répétition car on remarque que le  $DP_n$  'apparent' devient également important. Ces résultats indiquent clairement la présence de structures agrégées dues à un caractère associatif du CMP-VB (interactions intra et intermoléculaires entre greffons VB). Confirmant les résultats des masses molaires et l'observation des profils, les tailles de CMP-VB ( $R_h$  et viscosités  $[\eta]$ ) sont légèrement supérieures à celles du CMP.

#### Conclusion sur la synthèse et la caractérisation du CMP-VB :

La synthèse du CMP-VB avec un  $DS_{théo}(VB)$  fixé à 0,20 a conduit à l'obtention d'un dérivé noté CMP-VB amphiphile soluble dans l'eau. Les résultats obtenus suite aux caractérisations du produit CMP-VB par spectroscopie RMN<sup>1</sup>H, UV et IR permettent de détecter la présence des greffons VB et de quantifier les greffages. Cependant, il existe une différence notable entre les degrés  $DS_{exp}(VB)$  moyens déterminés par RMN<sup>1</sup>H et UV. Ils sont respectivement égaux à  $0,20 \pm 0,01$  et  $0,08 \pm 0,01$ . On utilisera par la suite un  $DS_{exp}(VB) = 0,08$  qui semble plus proche de la réalité. La réaction menée est donc reproductible et l'efficacité est autour de 40 % (UV). Tous les résultats obtenus conduisent à la conclusion d'un succès du greffage désiré. De plus, le couplage SEC/MALLS/DRI/Visco nous a permis de mettre en avant un caractère associatif du CMP-VB en milieu salin LiNO<sub>3</sub> 0,1 M.

Nous allons par la suite nous intéresser à la seconde étape de greffage envisagée : celui de l'eugénol sur l'intermédiaire CMP-VB.

## **2 Greffage de l'eugénol sur le CMP-VB**

La molécule active végétale utilisée est l'eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol), fournie par Alfa Aesar (France). C'est un composé d'origine naturel retrouvé dans divers arômes, notamment. Il peut être extrait du clou de girofle. Comme déjà évoqué dans la partie bibliographique, il possède une structure chimique de type phénolique (schéma 1) et diverses propriétés intéressantes : antibactériennes, antioxydantes et antifongiques, antiseptiques, analgésiques et



autres. Il se présente sous forme d'huile colorée en jaune. Il est hydrophobe (peu soluble dans l'eau) mais soluble dans des solvants tels que le méthanol ou l'éthanol<sup>4</sup>. Il a été choisi en raison de sa structure phénolique qui lui confère des propriétés antibactériennes et antioxydantes mais également en raison de la présence d'une double liaison sur son squelette carboné qui ouvre une possibilité de réaction sous UV.

La molécule 2-hydroxy-2-methylpropiophénone connue sous le nom de Darocur 1173 (Sigma-Adrich, France) a également été employée et servira de photoamorceur pour les réactions de greffage sous UV.

## 2.1 Conditions de réactions

Nous souhaitons réaliser la réaction de greffage de l'eugénol sur le CMP-VB et ce précisément sous rayonnement UV. L'eugénol se présente sous la forme d'huile et le CMP-VB sous la forme de coton. Il serait difficile de travailler en masse (sans solvant). Nous avons donc décidé d'effectuer la synthèse en milieu solvant. En tenant compte du fait que l'eugénol est peu soluble dans l'eau<sup>5</sup> mais soluble dans l'éthanol et que le CMP-VB est hydrophile, la question était de trouver un milieu adéquat pour la réaction. Nous avons choisi de travailler dans un mélange eau/éthanol. Afin de définir les meilleures conditions en solvant et éviter la précipitation des réactifs au cours de la synthèse, nous avons au préalable réalisé des tests de solubilité de l'eugénol (ainsi que du CMP-VB) dans des proportions variées en mélange eau/éthanol par un suivi spectrophotométrique de l'apparition d'un point de trouble.

Les tests de solubilité ont été réalisés en partant 0,2 g (0,8 mmol) de CMP-VB et 0,5 g (3 mmol) d'eugénol. Cette quantité molaire en eugénol ( $n(\text{eugénol})$ ) correspond à une réaction de greffage pour laquelle l'eugénol serait introduit en excès (soit  $n(\text{eugénol}) = 3,75 \times n(\text{CMP-VB})$  ou encore  $n(\text{eugénol}) = 48 \times n(\text{VB})$ ).

Les conditions optimales ont permis de fixer un ratio eau/éthanol (50/50 v/v) pour la réaction sous UV pour des systèmes

## 2.2 Synthèses : essais préliminaires

Conditions de réactions : Le greffage de l'eugénol sur le CMP-VB est réalisé dans un mélange eau/éthanol (50/50) sous UV et en présence du Darocur 1173. C'est un photoamorceur radicalaire classique de type Norrish I qui se présente sous la forme d'un liquide jaune. La réaction est effectuée à 365 nm, la puissance de la lampe est de 240 mW/cm<sup>2</sup> et le temps de

réaction sous UV a été fixé à 10, 15 ou 20 min. Nous avons réalisé des essais préliminaires, notamment un essai par temps. Les conditions de réactions utilisées sont regroupées dans le tableau 4. Ne connaissant pas la faisabilité de la réaction, nous avons décidé de travailler en excès molaires d'eugénol par rapport CMP-VB et donc par rapport à la molécule VB. Ces conditions avaient été utilisées pour les tests de solubilité.

Il faut par ailleurs noter que les rendements massiques obtenus en fin de purification sont faibles, compris entre [10-30]%.

**Tableau 4 : Conditions de synthèse de greffage de l'eugénol sur le CMP-VB (Longueur d'onde 365 nm, puissance de la lampe 240 mW/cm<sup>2</sup>)**

Eugénol	CMP-VB	Darocur ® 1173	temps de réaction	Rendements massiques (%)	Solubilité dans l'eau
$\frac{n(\text{eugénol})}{n(\text{VB})} = 48$ excès d'eugénol	n (CMP-VB)	3 % massique	10 min	10	oui
			15 min	30	
			20 min	15	

Hypothèses et mécanismes pour la réaction de greffage (schéma 3):

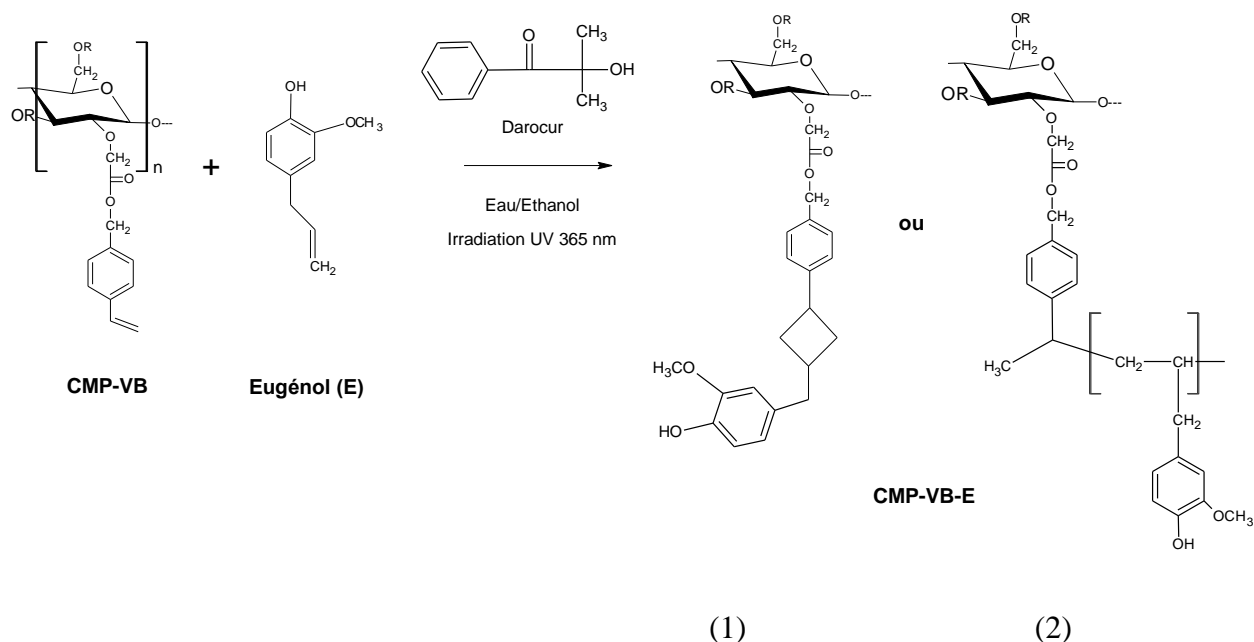
L'absorption de la lumière UV par le photoamorceur va générer la formation de radicaux primaires. Ces espèces réactives vont par la suite amorcer la réaction en réagissant avec la double liaison vinylique du VB présente sur le CMP-VB pour former le radical CMP-VB•. Puis c'est l'étape de propagation qui peut s'établir de différentes manières : (1) une réaction entre le radical CMP-VB• et l'eugénol. Précisément, entre le radical CMP-VB• et la double liaison allylique de l'eugénol. On forme ainsi un produit avec une molécule d'eugénol (mono-eugénol) greffée par unité CMP-VB. La propagation peut également entraîner (2) la polymérisation de l'eugénol sur le CMP-VB•. On forme ainsi un produit avec un poly(eugénol) greffé par unité CMP-VB. Une troisième possibilité (non décrite sur le schéma 3) est (3) la réaction entre deux radicaux CMP-VB• conduisant à la réticulation du polymère. La réaction de greffage sous UV entre l'eugénol et le CMP-VB peut donc conduire à différents produits. Nous désirons obtenir principalement les produits issus des réactions (1) et (2).

**Protocole de la synthèse du CMPVB greffé avec l'eugénol noté CMP-VB-E :**

0,20027 g (0,8 mmol) de CMP-VB sont dissous dans 15 mL d'eau. La réaction est réalisée dans un bécher. A la solution de CMP-VB sont ajoutés goutte à goutte 0,5 g (3 mmol)

d'eugénol dans 15 mL d'éthanol. Le mélange à ce stade semble hétérogène avec l'apparition d'un précipité (petits morceaux de solides blancs) au sein de la solution. Ensuite, 0,02 g (0,12 mmol) de photoamorceur Darocur 1173 sont additionnés directement au mélange précédent (le photoamorceur est sous forme liquide). Le bécher est ensuite placé sous irradiation UV à 365 nm pendant 10, 15 ou 20 min et à température ambiante. En fin de réaction, les solutions obtenues (aux différents temps) sont homogènes et colorées en jaune.

La première étape de purification de chacune des solutions (issues des réactions sous UV) est une dialyse (12-14 kDa) contre de l'éthanol. Cette dernière permet d'éliminer les éventuelles molécules d'eugénol n'ayant pas réagi ainsi que le photoamorceur. Un suivi par spectroscopie UV de la disparition de cette molécule est effectué sur les solutions de lavage d'éthanol. La dialyse contre l'éthanol est arrêtée pour une absorbance faible des solutions de lavage (similaire à celle de l'éthanol). A ce stade, nous observons un précipité dans les membranes de dialyse. Par la suite, les dialyses sont poursuivies contre de l'eau jusqu'à atteindre des conductivités d'eau de dialyse faibles. Le précipité au préalable observé se solubilise progressivement dans l'eau et les solutions se colorent légèrement en jaune. A la fin des dialyses, toutes les solutions sont congelées puis lyophilisées. Les produits greffés sont ensuite récupérés sous forme de coton et sont légèrement colorés en jaune-pâle. Les produits étaient solubles dans l'eau.



**Schéma 3.** Réaction de greffage de l'eugénol sur le CMP-VB en présence d'agent photoamorceur DAROCUR 1173.

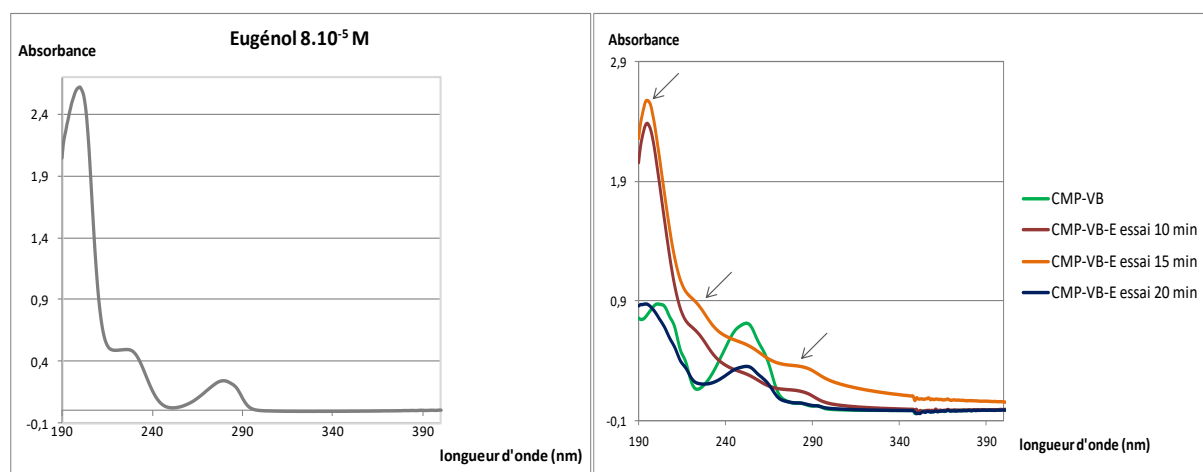
Les structures exactes des produits qui ont été élaborés ne sont pas encore connues. Nous essaierons suite aux caractérisations des produits obtenus d'accéder à la structure des dérivés synthétisés.

## 2.3 Caractérisations

Les techniques de spectroscopie UV, RMN<sup>1</sup>H ainsi que le couplage SEC/MALLS/DRI/Visco ont été employées pour la caractérisation des produits.

### 2.3.1 Spectroscopie UV

Des solutions du précurseur CMP-VB et des dérivés CMP-VB-E (obtenus après synthèse d'une durée de 10, 15 et 20 min) ont été préparées dans l'eau à 0,13 g.L<sup>-1</sup>. Elles ont été par la suite analysées dans le domaine UV [190 - 400] nm. Les spectres obtenus sont présentés Figure 5.



**Figure 5** : Spectres UV du CMP-VB (vert) et des dérivés CMP-VB-E essai 10 min (rouge), essai 15 min (orange) et essai 20 min (bleu) à  $C = 0,13 \text{ g.L}^{-1}$  dans l'eau. Un exemple de spectre de l'eugénol (gris) préparé à  $8.10^{-5} \text{ M}$  dans un mélange (eau/ éthanol 8%) est ajouté pour comparaison.

Les produits CMP-VB-E (10, 15 et 20 min) présentent des allures de courbes différentes. A 10 et 15 min, l'allure des courbes des produits CMP-VB-E est intermédiaire entre celle du CMP-VB de départ (spectre en vert) et celle de l'eugénol (spectre en gris). Précisément, on retrouve sur les spectres des CMP-VB-E à 10 et 15 min : la bande à 200 nm présente dans le cas de l'eugénol ainsi que l'épaulement à 233 nm. La bande à 285 nm de l'eugénol est également retrouvée mais sous forme d'épaulement. De plus, les courbes des produits CMP-VB-E à 10 et 15 min présentent un pic sous forme d'épaulement (à 255 nm) attribuable au pic de la double liaison vinylique du VB greffé.

Concernant le dérivé obtenu à 20 min, l'allure de la courbe est semblable à celle du CMP-VB. On remarque cependant qu'à concentration fixe pour les deux produits, dans le cas du produit greffé, il y a baisse de l'absorbance du pic correspondant à celui des fonctions vinyliques du VB. Cela prouve qu'il y a eu réaction des doubles liaisons vinyliques.

Nous avons tenté de quantifier par UV les greffages réalisés pour les différents produits greffés obtenus après 10, 15 et 20 min sous UV. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés en premier lieu au pic correspondant à celui des doubles liaisons vinyliques du VB. Les DS expérimentaux en greffons VB obtenus après greffage sous UV sont notés  $DS_{exp}(VB)_{AG}$  et présentés dans le tableau 5. En tenant compte du nouveau  $DS_{exp}(VB)_{AG}$  et du  $DS_{exp}(VB)$  déterminé avant greffage (soit 0,08), nous avons calculé en second lieu le degré de substitution en greffons mono-eugénol (ou poly(eugénol)) notés  $DS_{exp}(E)$ . Ces derniers sont également présentés dans le tableau 5. L'efficacité de la réaction est comprise [33 - 65] %. La réaction semble mieux fonctionner à 10 et 20 min.

Il faut néanmoins noter que dans le cas des produits obtenus après 10 et 15 min, les pics correspondants à la double liaison du VB ne sont pas bien définis, cela conduit plutôt à une quantification peu précise (approximation).

**Tableau 5 :  $DS_{exp}(VB)$  et  $DS_{exp}(E)$  déterminés par UV**

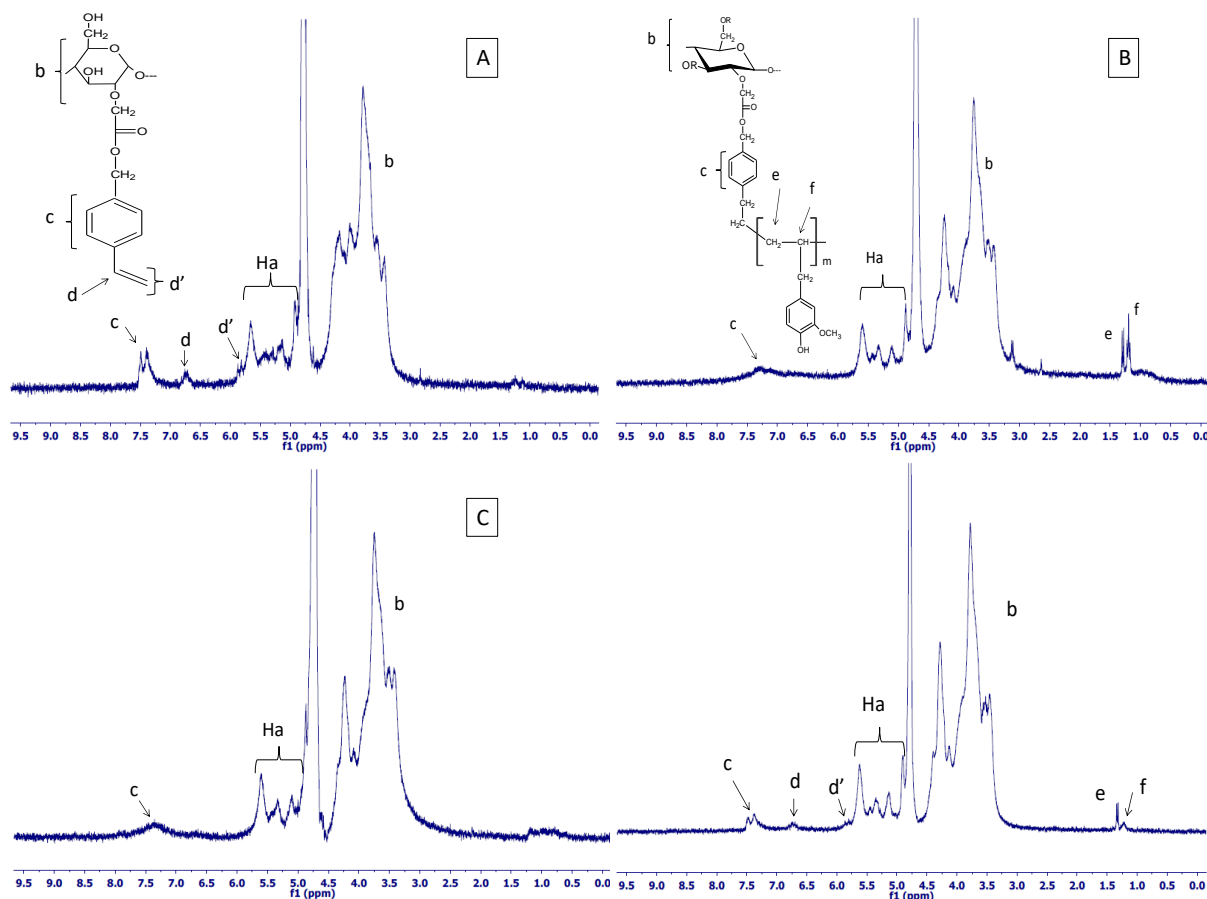
	$DS_{exp}(VB)_{AG}$ <sup>a</sup>	$DS_{exp}(E)$ <sup>b</sup>
CMP-VB-E 10 min	0,028	0,052
CMP-VB-E 15 min	0,054	0,026
CMP-VB-E 20 min	0,035	0,045

<sup>a</sup>: déterminé à l'aide de l'absorbance maximale du pic correspondant aux doubles liaisons vinyliques présent sur les spectres des produits CMP-VB-E

<sup>b</sup>:  $DS_{exp}(E)=0,08-DS_{exp}(VB)_{AG}$

### 2.3.2 Spectroscopie RMN<sup>1</sup>H

Les spectres RMN obtenus dans le cas de tous les produits CMP-VB-E (10, 15 et 20 min) sont présentés ci-dessous Figure 6.



**Figure 6** : Spectres RMN  $^1\text{H}$  du CMP-VB (A) et des dérivés CMP-VB-E à 10 min (B) ; à 15 min (C) et 20 min (D) dans du  $\text{D}_2\text{O}$  à  $10 \text{ g.L}^{-1}$ .

D'une part, on remarque des changements sur les spectres des produits en comparaison avec le spectre du précurseur CMP-VB. Précisément, entre  $[7 - 7,5]$  ppm, le pic correspondant aux protons aromatiques du VB (4 H) est toujours présent sur les courbes des produits CMP-VB-E mais avec parfois une intensité faible (comparable au bruit de fond) et une allure moins bien définie (spectres des essais à 10 et 15 min). En revanche, le pic d correspondant aux protons de la double liaison vinylique du VB (1 H) a disparu dans le cas des produits CMP-VB-E à 10 et 15 min. Dans le cas du produit CMP-VB-E à 20 min, il est toujours présent mais avec une intensité plus faible comparée au spectre du CMP-VB. Le pic d' correspondant à un des protons de la double liaison vinylique du VB est uniquement visible sur le spectre du CMP-VB-E (20 min). Cependant, l'intensité reste très faible.

D'autre part, toujours en comparaison avec le spectre du précurseur CMP-VB, il y a détection de nouveaux pics (annotés e et f) sur les spectres de tous les produits CMP-VB-E entre  $[0,7 - 1,5]$  ppm. Plus précisément, dans le cas des essais à 10 et 20 min, ces nouveaux pics sont bien définis et respectivement attribués à un doublet et un triplet. Ils témoignent de la présence de groupements alkyles ( $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ ) présents sur le squelette du CMP-VB, qui pourraient

appartenir à une structure de type poly(eugénol) comme représenté sur la Figure 8. Dans le cas de l'essai à 15 min, le nouveau pic détecté est mal défini et possède une très faible intensité (bruit de fond).

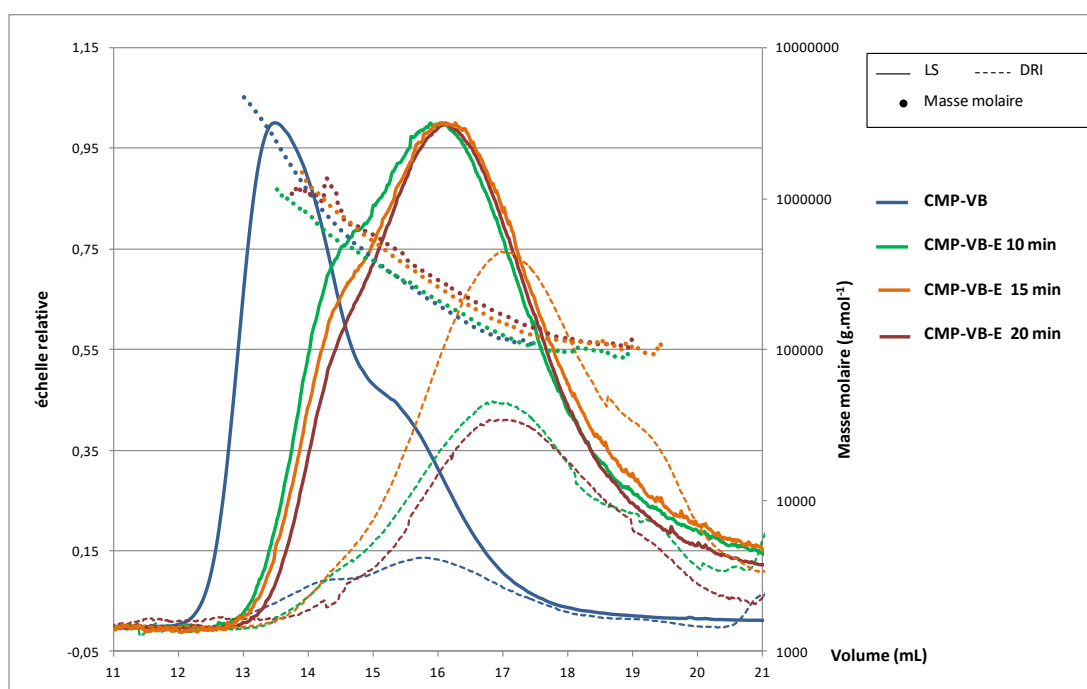
Au vu des faibles intensités des pics (notamment du pic c) et de l'erreur apportée par la présence du proton de la double liaison (sous le pic des protons anomériques) qui a conduit au préalable à des degrés de substitutions en VB surestimés, nous avons décidé de ne pas essayer de quantifier le greffage par RMN<sup>1</sup>H.

#### Conclusion sur la synthèse et caractérisation des produits CMP-VB-E (10, 15 et 20 min) suite aux essais préliminaires de greffage :

Des essais préliminaires de greffage de l'eugénol sur le CMP-VB ont été réalisés en excès d'eugénol et à différents temps 10, 15 et 20 min d'exposition à 365 nm. Des dérivés CMP-VB-E solubles dans l'eau ont été obtenus. Les techniques de caractérisation RMN<sup>1</sup>H et UV ont permis de détecter des changements sur les spectres des produits CMP-VB-E en comparaison avec le précurseur CMP-VB. Une réaction des doubles liaisons vinyliques du VB semble avoir eu lieu sous UV. Notamment à 10 et 20 min, la RMN<sup>1</sup>H a permis de détecter l'apparition de nouveaux pics attribuables à la présence de greffons poly(eugénol). La quantification de ces derniers n'a pas toujours été évidente. Les calculs effectués par UV montrent une efficacité de la réaction comprise [33 - 65] %.

#### **2.3.3 SEC/MALLS/DRI**

La Figure 7 présente les profils d'élution du CMP-VB et des dérivés CMP-VB-E (10, 15 et 20 min) à 1 g.L<sup>-1</sup> en milieu salin LiNO<sub>3</sub> 0,1 M. Le tableau 6 regroupe toutes les informations recueillies concernant les grandeurs macromoléculaires des échantillons analysés. Il faut noter que la filtration des produits CMP-VB-E a été difficile et que les fractions analysées sont faibles (de l'ordre de 30 – 40 %). Les résultats ne sont alors pas représentatifs de la totalité de l'échantillon. Ces pertes peuvent être la conséquence de macrostructures (retenues lors de la filtration sur 0,45µm) issues d'agrégats de tailles importantes des CMP portant des greffons polyeugénol (fort caractère agrégatif attendu) ou bien de structures réticulées suivant l'hypothèse (3) proposées lors de la discussion sur les mécanismes.



**Figure 7 :** Profils d'éluions du CMP-VB et des dérivés CMP-VB-E dans du  $\text{LiNO}_3$  à 0,1 M; CMP-VB (bleu), CMP-VB-E 10 min (vert), 15 min (orange) et 20 min (rouge). Signaux de diffusion de lumière (LS) : trait plein. Courbes obtenues par le détecteur réfractomètre (DRI) : trait discontinu. Distribution des masses molaires (rond plein).

**Tableau 6 :** Grandeurs macromoléculaires caractéristiques du CMP-VB et des dérivés CMP-VB-E (10, 15 et 20 min) déterminées par couplage SEC/MALLS/DRI/Visco à une concentration en échantillon  $C = 1,0 \text{ g L}^{-1}$  et dans un milieu  $\text{LiNO}_3$  0,1 M.

	$M_n$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$M_w$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$M_o^a$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$DP_n$ apparent ( $M_n/M_o$ )	$R_{h(n)}$ (nm)	$[\eta]_n$ ( $\text{mL g}^{-1}$ )	Masse récupérée (%)
<b>CMP-VB</b>	246 000 ( $\pm 1,7 \%$ )	547 000 ( $\pm 0,7 \%$ )	246	1000	16,4 ( $\pm 1,3 \%$ )	204 ( $\pm 2,3 \%$ )	51
<b>CMP-VB-E 10 min</b>	142 000 ( $\pm 2,3 \%$ )	192 000 ( $\pm 1,9 \%$ )	253	561	11,5 ( $\pm 3,7 \%$ )	94 ( $\pm 9,7 \%$ )	23
<b>CMP-VB-E 15 min</b>	153 000 ( $\pm 4,2 \%$ )	207 000 ( $\pm 3,3 \%$ )	255	600	11,9 ( $\pm 3,5 \%$ )	96 ( $\pm 8,1 \%$ )	39
<b>CMP-VB-E 20 min</b>	172 000 ( $\pm 1,6 \%$ )	231 000 ( $\pm 1,3 \%$ )	254	677	13,1 ( $\pm 2,6 \%$ )	113 ( $\pm 8,1 \%$ )	33

En s'intéressant à la Figure 7, on observe des allures de courbes (DRI et LS) des produits CMP-VB-E (10, 15 et 20 min) similaires entre elles et différentes de celle du CMP-VB. On



remarque que les produits CMP-VB-E sont élués à des volumes plus importants que le CMP-VB et présentent donc des tailles (volumes hydrodynamiques) plus faibles que le CMP-VB. En s'intéressant aux grandeurs macromoléculaires obtenues pour les dérivés CMP-VB-E (10, 15 et 20 min) (tableau 6), on remarque que quel que soit le temps de réaction, les masses molaires  $M_n$  et  $M_w$  ainsi que les rayons  $R_h$  et les viscosités intrinsèques  $[\eta]$  sont inférieurs à celles du CMP-VB. Il semble qu'il y ait eu dégradation du polysaccharide sous UV.

Rappelons toutefois que ces résultats ne sont caractéristiques que d'une fraction de l'échantillon (30 à 40%) au regard des fortes pertes à la filtration détectées.

### 3 Conclusion générale

Des réactions de greffage de l'eugénol sur le CMP ont été effectuées en deux étapes : (1) le greffage chimique intermédiaire de la molécule de VB sur le CMP suivi (2) du greffage chimique covalent de l'eugénol sur le produit intermédiaire CMP-VB.

La première étape a été réalisée avec succès. Le produit CMP-VB obtenu est soluble dans l'eau. Les techniques de caractérisation du dérivé CMP-VB synthétisé ont permis de détecter la présence des greffons VB et de quantifier ces molécules par RMN<sup>1</sup>H et par UV. Les  $DS_{exp}(VB)$  déterminés en UV semblent plus se rapprocher de la réalité. L'efficacité de la réaction est de l'ordre 40 % (UV) et la réaction est reproductible. Le CMP-VB a démontré un comportement associatif en milieu salin LiNO<sub>3</sub> 0,1 M.

La seconde étape de greffage a été effectuée sous rayonnement UV à 365 nm dans un mélange eau/éthanol (50/50) en présence d'un agent photoamorceur le Darocur 1173. Des essais préliminaires ont été effectués à 10, 15 et 20 min. Les dérivés CMP-VB-E obtenus, avec un faible rendement massique, étaient solubles dans l'eau. Les techniques de caractérisation utilisées ont permis de détecter des nouveaux pics notamment sur les spectres RMN<sup>1</sup>H des dérivés. Il semblerait avoir eu greffage de poly(eugénol) sur le CMP-VB. En UV, une baisse d'absorbance du pic des doubles liaisons vinyliques du VB a été observée sur les spectres des produits greffés. Cependant les quantifications des éventuels greffons présents et la détermination de la nature de ces derniers restent difficiles. Trois possibilités de réaction ont été envisagées : mono-greffage d'eugénol, polymérisation de l'eugénol sur le CMP-VB et enfin réticulation des groupements VB entre eux.

La réaction de greffage sous UV n'est donc pas encore maîtrisée. Un gros travail d'optimisation doit être réalisé. Il serait nécessaire de réaliser de nouveaux essais en variant

certaines conditions de réactions telles que : le temps de réaction, la nature et la quantité des réactifs (photoamorceur, CMP-VB et eugénol), la nature du solvant ou encore la nature de la molécule végétale active. Dans ce dernier cas, nous pensons par exemple utiliser le composé acrylamide gaïacol qui est un dérivé du gaïacol et qui possède des fonctions acrylamide, beaucoup plus réactives qu'une fonction allylique (de l'eugénol) sous UV. Ce composé a été élaboré dans l'équipe de Philippe Roger à l'ICMMO (Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay) mais les essais préliminaires effectués ont conduit à des produits insolubles que nous n'avons donc pas pu caractériser. Il faudrait alors faire des essais avec des taux de greffage théoriques plus faibles.

- (1) Yang, L.; Zhang, B.; Wen, L.; Liang, Q.; Zhang, L. M. Amphiphilic Cholesteryl Grafted Sodium Alginate Derivative: Synthesis and Self-Assembly in Aqueous Solution. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68* (2), 218–225.
- (2) Yang, J. S.; Zhou, Q. Q.; He, W. Amphiphaticity and Self-Assembly Behavior of Amphiphilic Alginate Esters. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92* (1), 223–227.
- (3) Bataille, I.; Huguet, J.; Muller, G.; Mocanu, G.; Carpov, A. Associative Behaviour of Hydrophobically Modified Carboxymethylpullulan Derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *20* (3), 179–191.
- (4) Myint, S.; Daud, W. R. W.; Mohamad, A. B.; Kadhum, A. A. H. Separation and Identification of Eugenol in Ethanol Extract of Cloves by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72* (10), 1231–1233.
- (5) Samperio, C.; Boyer, R.; Eigel, W. N.; Holland, K. W.; McKinney, J. S.; O'Keefe, S. F.; Smith, R.; Marcy, J. E. Enhancement of Plant Essential Oils' Aqueous Solubility and Stability Using Alpha and Beta Cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (24), 12950–12956.



## **ANNEXE 3**



Ces travaux de recherches ont fait l'objet des communications scientifiques suivantes :

1. **Journées Nord-Ouest Européennes des jeunes chercheurs et de l'Ecole Doctorale normande de Chimie**, 11 et 12 Mai 2015 à Rouen. Communication par affiche (M-C. Kouassi) : « Synthesis of antibacterial polysaccharides based on natural molecules ».
2. **Stage pédagogique : Polymères dans les formulations**, 15 au 17 Juin 2015 à Rouen. Communication par affiche (M-C. Kouassi) : « Synthèse de polysaccharides antibactériens à base de molécules naturelles ».
3. **37<sup>èmes</sup> Journées du Groupe Français d'Etudes et d'Applications des Polymères – section Ouest**, 19 & 20 mai 2016 à Alençon, Communication orale (M-C. Kouassi) : « Agents conservateurs naturels à base de polysaccharides et de molécules issues de plantes pour des formulations aqueuses en cosmétique et/ou agroalimentaire »
4. **16th International Conference “Polymers and Organic Chemistry”** 13-16 juin 2016 à Hersonissos, Crète, Communication orale (V. Dulong) : « Synthesis of antibacterial polymer by grafting of aminogaiacol on carboxymethylpullulan ».
5. **Journées d'Etude des Polymères (JEPO 2016)**, 19 au 23 septembre 2016 à Piriac-sur-Mer. Communication orale (M-C. Kouassi) : « Antibacterial and/or antioxidant polysaccharides grafted with aminoguaiacol ».
6. **Colloque du groupe de recherche (GDR) Cosm'actifs**, 26 et 27 septembre 2016 au Moulin d'Andé. Communication orale (M-C. Kouassi) : « Agents conservateurs naturels à base de polysaccharides et de molécules végétales : application en cosmétique et/ou agroalimentaire ».
7. **3<sup>ème</sup> séminaire du GDR Symbiose**, 29 Mai - 1er Juin 2017, La Grande Motte, Communication orale (V. Dulong) : « Carboxymethylpullulan grafted with natural molecules possesses antioxidant properties and biological activity »
8. **Congrès international “the European Colloid and Interface Society” (ECIS)**, 3 au 8 septembre 2017 à Madrid. Communication par affiche (M-C. Kouassi) : « Associative natural systems with antibacterial and antioxidant properties based on polysaccharides and aminoguaiacol ».

## **Résumé**

Les travaux décrits dans ce manuscrit concernent l'élaboration de conservateurs naturels et hydrosolubles à base de polysaccharides greffés par des molécules actives d'origine végétale de type phénoliques (peu solubles dans l'eau). L'objectif est de développer de nouveaux systèmes présentant des propriétés antioxydantes et/ou antibactériennes, voire rhéologiques et principalement destinés aux domaines des formulations aqueuses cosmétiques et/ou alimentaires. Pour ce faire, le composé aminogaïacol (dérivé du gaïacol) a été greffé chimiquement sur un polysaccharide (carboxyméthylpullulane) selon des proportions variées (comprises entre 5 et 58 %). Les études physico-chimiques en milieux salins dilué et semi-dilué mettent en avant un caractère associatif (de type polysavon) des dérivés les plus greffés, avec des interactions intramoléculaires hydrophobes prédominantes qui limitent les propriétés rhéologiques. Tous les produits synthétisés ont par contre démontré des propriétés antioxydantes et antibactériennes. Le caractère associatif (i.e. la présence de microdomaines hydrophobes) s'est avéré être favorable à l'activité antioxydante, avec les meilleures activités observées pour le dérivé le plus fortement greffé en aminogaïacol (58%). Au contraire, le comportement associatif a limité l'activité biologique, dans ce cas, c'est le dérivé le moins greffé (5%) qui a démontré la meilleure activité antibactérienne, en raison d'une meilleure disponibilité des greffons. Afin d'améliorer les propriétés biologiques et/ou rhéologiques, cette approche de greffage de l'aminogaïacol a été étendue sur un autre polysaccharide anionique (l'alginate), plus rigide que le carboxyméthylpullulane avec des résultats prometteurs notamment en rhéologie.

## **Abstract**

The works described in this manuscript concern the development of natural and water soluble preservatives based on polysaccharides grafted with molecules of plant origin (from phenolic structure). The aim consists in developing new systems with antioxidant and/or antibacterial properties together with rheological ones for cosmetic and/or food application fields. For this purpose, aminoguaiacol (derived from guaiacol) was chemically grafted onto a polysaccharide (carboxymethylpullulan) in various proportions (between 5 and 58 %). The physicochemical studies in dilute and semi-dilute saline media put forward an associative character (of polysoap type) of the most grafted derivatives, with predominant hydrophobic intramolecular interactions which are limiting for rheology. All synthesized products have demonstrated antioxidant and antibacterial properties. The associative character (i.e., the presence of hydrophobic microdomains) was found to be favorable to the antioxidant activity, with the best activity for the most grafted aminoguaiacol derivative (58%). On the contrary, the associative behavior limited the antibacterial activity, in this case, the least grafted derivative (5%) demonstrated the best antibacterial activity, due to best availability of the grafted moieties. In order to improve the biological and/or rheological properties, this grafting approach of aminoguaiacol has been extended to another anionic polysaccharide (alginate), more rigid than carboxymethylpullulan with promising results notably as concerns rheology.