



HAL
open science

Synthèse et caractérisation de dérivés amphiphiles du xanthane : application à la stabilisation d'émulsions

Céline Fantou

► **To cite this version:**

Céline Fantou. Synthèse et caractérisation de dérivés amphiphiles du xanthane : application à la stabilisation d'émulsions. Polymères. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMLH38 . tel-02157077

HAL Id: tel-02157077

<https://theses.hal.science/tel-02157077>

Submitted on 15 Jun 2019

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

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein de l'Université Le Havre Normandie

Synthèse et caractérisation de dérivés amphiphiles du xanthane : application à la stabilisation d'émulsions.

Présentée et soutenue par
Céline FANTOU

Thèse soutenue publiquement le 14 Décembre 2018
devant le jury composé de

M. Jean-Luc SIX	Professeur des Universités, Université de Lorraine	Rapporteur
Mme. Véronique SCHMITT	Directeur de Recherche CNRS, Centre de Recherche Paul Pascal	Rapporteur
M. Sébastien COMESSE	Maître de conférences HDR, Université Le Havre Normandie	Examineur
M. Etienne FLEURY	Professeur des Universités, Université de Lyon	Examineur
M. Michel GRISEL	Professeur des Universités, Université Le Havre Normandie	Directeur de thèse
M. Frédéric RENO	Maitre de conférences, Le Mans Université	Examineur
M. Luc PICTON	Professeur des Universités, Université de Rouen	Invité

Thèse dirigée par Michel GRISEL et encadrée par Sébastien COMESSE et Frédéric RENO,
Laboratoire URCOM



Remerciements

Ce manuscrit de thèse atteste de la fin de mes années de doctorat à l'Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire (URCOM) de l'Université du Havre. Trois années qui sont passées bien vite et qui représentent une expérience très enrichissante tant sur le plan professionnel que personnel.

Tout d'abord, je souhaite remercier Mme Véronique Schmitt et Mr Jean-Luc Six qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteur, ainsi que Mr Etienne Fleury et Mr Luc Picton pour avoir accepté d'être membre de mon jury. Je les remercie pour leurs remarques sur mon manuscrit de thèse mais également pour les échanges pertinents lors de ma soutenance qui ont permis de confirmer les nombreuses pistes de perspective liées à ce travail de thèse et de mettre en évidence les plus intéressantes.

Je remercie mon directeur de thèse, Michel Grisel, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger cette thèse ainsi que durant ces trois années. Je le remercie pour ses conseils, pour ses encouragements ainsi que pour m'avoir permise de participer à des congrès internationaux.

Mes remerciements vont plus particulièrement à mes deux encadrants de thèse. Frédéric Renou, qui malgré son départ anticipé a su se rendre toujours disponible quand cela était nécessaire. Je le remercie pour tous ses conseils, ses critiques constructives (toujours avec diplomatie bien sûr) qui m'ont permis de toujours m'améliorer et de donner le meilleur de moi-même.

Je remercie également Sébastien Comesse pour sa présence quotidienne, son aide et son grand intérêt pour ce projet pourtant bien loin de son domaine d'expertise.

Je ne les remercierai jamais assez pour leur soutien et tout ce beau travail réalisé. Ce fût un grand plaisir de travailler avec vous !

Mes remerciements vont également à l'ensemble du laboratoire URCOM, Odile pour sa bonne humeur et surtout pour l'isononanoate d'isononyle, Vincent L. pour m'avoir si souvent aidée avec les appareils et toujours avec le sourire, Nicolas pour ses remarques pertinentes mais aussi Faustine, Déborah, Marie, Delphine, Sandrine, Valérie et tous les permanents : Céline P., Géraldine, Catherine M., Catherine T., Vincent D. Adam, Mohamed, Martin et Nathalie.

Je remercie ma stagiaire, Jiseon Yoo, pour le travail important qu'elle a fourni pendant ses trois mois à l'URCOM. Sa présence au laboratoire pendant le début de ma rédaction a été d'une grande aide et m'a permise de continuer mes travaux et d'ouvrir encore de nouvelles voies à explorer.

Cette thèse n'aurait jamais été la même sans cette super équipe « Doctorants URCOM », bien que certains aient déjà obtenu le très convoité titre de docteur. A ceux qui sont déjà partis : Thomas, Laura R., Pauline et Nico, Julien et bien sûr Audrey, Philippe, Emilie, Lucie et Omar ; à ceux qui finalement ont décidé de rester un peu plus longtemps ou de revenir : Ecaterina, Daria et Livia ; aux nouveaux docteurs : Florine (ce fût un plaisir de partager ma thèse avec toi) et Momo (courage c'est bientôt la fin) ; à ceux dont c'est la dernière ligne droite : ma super copine Fanny et bien sûr Alex ; et à ceux pour qui il reste encore quelques années : Clément, Sami, Charbel, Elodie, Ismail. Vous avez fait de cette thèse trois années inoubliables !!

Je remercie du fond du cœur ma famille pour leur soutien sans faille pendant mes longues années d'études qui (enfin) se terminent avec ce manuscrit.

Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Liste des symboles.....	3
Table des figures.....	5
Table des tableaux.....	9
Introduction Générale.....	11
Chapitre 1 : Bibliographie	15
Introduction.....	17
Partie 1 : Xanthane : structure et propriétés	19
1.1. Généralités sur le xanthane.....	19
1.2. Structure du xanthane.....	20
1.3. Conformation en solution.....	21
1.3.1 Transition conformationnelle ordre – désordre.....	21
1.3.2. Structure secondaire du xanthane.....	23
1.4. Propriétés en solution.....	30
1.3.1 Régime de concentration.....	30
1.3.2. Propriétés viscosimétriques.....	33
1.3.3. Propriétés viscoélastiques.....	36
Partie 2 : Polymères amphiphiles	41
2.1. Définition, structure et application.....	41
2.2. Propriétés en solution.....	43
1.3.1 Régime de concentration.....	43
1.3.2. Propriétés viscosimétriques.....	45
1.3.3. Propriétés viscoélastiques.....	48
3.3. Modification chimique du xanthane.....	51
Partie 3 : Emulsions	53
3.1. Définition.....	53
3.1.1 Classification des émulsions.....	53
3.1.2. Préparation d'un système dispersé.....	54
3.2. Stabilité des émulsions.....	55

3.3 Caractérisation des émulsions.....	58
3.3.1 Analyse de la macrostructure.....	58
3.3.2. Analyse de la microstructure.....	61
3.4. Stratégies de stabilisation des émulsions.....	65
3.4.1. Tensioactif	65
3.4.2. Polysaccharide.....	68
3.4.3. Polysaccharide modifié hydrophobiquement	70
Conclusion du chapitre.....	73
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	75
Partie 1 : Modification chimique du xanthane.....	77
1.1. Réactifs utilisés	77
1.2. Modification chimique sous forme désordonnée	77
1.3. Modification chimique sous forme ordonnée.....	79
1.4. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN ¹ H)	79
1.4.1. Principe.....	79
1.4.2. Appareillage et préparation des échantillons	81
1.4.3. Détermination de la densité de greffage des xanthanes modifiés	82
Partie 2 : Propriétés des xanthanes modifiés en solution	85
2.1. Dichroïsme Circulaire	85
2.1.1. Principe.....	85
2.1.2. Appareil utilisé et préparation des échantillons	87
2.2. Rhéologie.....	88
2.2.1. Définition.....	88
2.2.2. Mesures en écoulement.....	88
2.2.3. Mesures dynamiques	89
2.2.4. Appareillage et préparation des échantillons	90
Partie 3 : Application à la stabilisation des émulsions	91
3.1. Préparation des émulsions.....	91
3.1.1 Matières premières	91
3.1.2 Protocole de formulation	91
3.1.3. Méthodologie d'étude de la stabilité des émulsions	93

3.2. Granulométrie laser	93
3.3.1. Principe.....	94
3.3.2 Appareillage et préparation des échantillons	95
3.5. Caractérisation rhéologique	96
3.5.1. En écoulement.....	96
3.5.2. Balayage en fréquence	96
Chapitre 3 : Résultats et Discussion	99
Introduction.....	101
Partie 1 : Synthèse et caractérisation des xanthanes modifiés en solution	105
Publication 1:.....	107
Partie 2 : Application des xanthanes amphiphiles à la stabilisation des émulsions	129
Publication 2.....	130
Publication 3:.....	149
Partie 3 : Etude complémentaire et perspectives	169
3.1. Comparaison du pouvoir stabilisant des émulsions contenant du xanthane modifié et des émulsions conventionnelles	170
3.2. Impact de l'ajout d'un tensioactif sur la stabilité des émulsions contenant du xanthane modifié	179
3.3. Etude d'émulsions contenant du xanthane modifié et du xanthane natif	183
Conclusion Générale	193
Références Bibliographiques.....	199

Liste des abréviations

APG : Alkyl polyglucoside

ATG : Analyse thermogravimétrique

CAC : Concentration d'agrégation critique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Ds : Degré de substitution

E/H : Emulsion eau dans huile

H/E : Emulsion huile dans eau

EDAC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide

Et₃N : Triéthylamine

HBTU : Hexafluorophosphate de *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium

HLB : Balance hydrophile/lipophile

HOBT : Hydroxybenzotriazole

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

RMN ¹H : Résonance magnétique nucléaire du proton

TSP : 2.2.3.3-d(4)-3-(triméthylsilyl)propanoate de sodium

Xn : Xanthane non modifié

XMH : Xanthane modifié hydrophobiquement

XMHD : Xanthane modifié hydrophobiquement sous forme désordonnée

XMHO : Xanthane modifié hydrophobiquement sous forme ordonnée

Liste des symboles

a_T : Facteur de décalage horizontal

b_T : Facteur de décalage vertical

C^* : Concentration critique de recouvrement (g/L)

C^{**} : Concentration d'enchevêtrement (g/L)

Υ : Déformation (%)

Φ : Fraction volumique (%)

ω : Fréquence angulaire (rad/s)

G' : Module de conservation ou élastique (Pa)

G'' : Module de perte ou visqueux (Pa)

Θ : Ellipticité (mdeg)

η : Viscosité (Pa.s)

$[\eta]$: Viscosité intrinsèque (mL/g)

η_0 : Viscosité newtonienne (Pa.s)

τ : Temps de relaxation (s)

T_m : Température de transition conformationnelle (°C)

$\dot{\Upsilon}$: Vitesse de cisaillement (s^{-1})

Table des figures

Figure 1 : Structure chimique du xanthane.....	20
Figure 2 : Structure chimique du xanthane selon Kool et al. ¹⁹	21
Figure 3 : Mise en évidence des deux conformations du xanthane et de la T _m par polarimétrie et RMN (issue de Foss et al. ³⁰)	22
Figure 4 : Structures ordonnées du xanthane proposées à partir de la modélisation informatique des données de diffraction des rayons X : (a) une simple hélice ⁴⁵ (b) une double hélice antiparallèle ⁴⁶ . .	24
Figure 5 : Modèle de la double partiellement fondue proposé par Liu et al. ⁵⁰	26
Figure 6 : Représentation schématique du processus de dénaturation en fonction de la concentration (issue de Matsuda et al. ³¹).....	27
Figure 7 : Mise en évidence par AFM de la structure secondaire du xanthane (a) image AFM (b) évolution de la topographie mesurée le long de la ligne blanche en haut à droite de l'image (a) (issue de Moffat et al. ³⁵)	28
Figure 8 : Schéma du mécanisme proposé par Morris ⁵⁶ pour la transition ordre – désordre du xanthane.....	29
Figure 9 : Régimes de concentration des polymères en solution (adaptée de Bertola ⁵⁸)	30
Figure 10 : Détermination des régimes de concentration (issue de Wyatt et al. ⁶¹) pour le xanthane (A) sous forme ordonnée (B) sous forme désordonnée	31
Figure 11 : Courbes d'écoulement de solutions de xanthane à différentes concentration dans 0,1 M NaCl (issue de Cuvelier et al. ⁵⁹)	34
Figure 12 : (a) Evolution des modules élastiques G' (symboles pleins) et visqueux (symboles ouverts) en fonction de la fréquence pour une solution de xanthane à 10 g/L à différentes températures. (b) Courbe maitresse fréquence – température correspondante (T _{ref} = 20°C) (issue de Choppe et al. ²⁴).	36
Figure 13 : Evolution des modules G' et G'' pour des solutions de xanthanes à différentes concentrations (issue de Cuvelier et al. ⁵⁹).....	38
Figure 14 : Courbe maitresse fréquence – concentration du xanthane (a) pour C < C** et C _{ref} = 0,8 g/L (b) pour C > C** et C _{ref} = 4 g/L (issue de Cuvelier et al. ⁵⁹)	38
Figure 15 : Courbe maître fréquence-température-concentration avec C _{ref} = 10 g/L et T _{ref} = 20°C (issue de Renou et al. ⁷²).....	39
Figure 16 : Exemple d'association des polymères amphiphiles en solution.....	41
Figure 17 : Représentation schématique des différents types de polymères associatifs (adaptée de Winnik ⁸¹).....	42

Figure 18 : Evolution de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration pour des poly(acide acrylique) greffés avec différentes longueurs de chaînes alkyles (issue de Guo et al. ¹⁰³)	44
Figure 19 : Influence de la concentration sur les propriétés en écoulement d'un polymère amphiphile (issue de Sinquin et al. ¹⁰⁴).....	45
Figure 20 : Evolution de G' (symboles pleins) et de G'' (symboles ouverts) en fonction de la fréquence pour des alginates amphiphiles avec différents degré de substitution (issue de Vallée et al. ¹¹⁴)	48
Figure 21 : Représentation schématique du tube de reptation (issue de Covin ¹²¹)	49
Figure 22 : Comportement viscoélastique des polymères associatifs (trait plein) et non associatifs (trait pointillé) (issue de Leibler et al. ¹¹⁹)	50
Figure 23 : Représentation des différents types d'émulsions : de gauche à droite : huile dans eau (H/E), eau dans huile (E/H), eau dans huile dans eau (E/H/E) et huile dans eau dans huile (H/E/H) ...	53
Figure 24 : Mécanismes de déstabilisation des émulsions H/E (issue de Bouyer et al. ¹⁴³)	56
Figure 25 : Evolution des courbes d'écoulement en fonction de la taille des gouttelettes de l'émulsion (issue de Pal ¹⁵⁷).....	60
Figure 26 : Evolution de G' et G'' en fonction de la fréquence pour les émulsions (issue de Barnes ¹⁵⁶)	61
Figure 27 : Evolution de la microstructure de trois émulsions en fonction de la température observée par microscopie optique (issue de Güzey et al. ¹⁶²)	62
Figure 28 : Evolution du diamètre moyen d_{32} en fonction de la température (issue de Güzey et al. ¹⁶²)	63
Figure 29 : Exemple de distributions granulométriques en nombre et en volume d'une émulsion	64
Figure 30 : Schéma de l'organisation de l'émulsifiant à l'interface eau/huile.....	66
Figure 31 : Echelle des HLB pour les émulsions	67
Figure 32 : Influence de la concentration en xanthane sur l'indice de crémage (issue de Krstonosic et al. ¹⁸³)	68
Figure 33 : Mécanisme de floculation par déplétion (issue de Fan et al. ¹⁸⁹)	69
Figure 34 : Représentation des deux orientations de spin 12 dans un champ B_0 (issue de Akoka ²¹³).80	
Figure 35 : Représentation de M (A) en présence de B_0 (B) en présence de B_1 (C) lorsque B_1 n'est plus appliqué (issue de Akoka ²¹³)	81
Figure 36 : Différents états de polarisation	85
Figure 37 : Représentation graphique de (A) l'absorption inégale de la lumière polarisée circulairement droite E_d et gauche E_g ainsi que l'onde résultante E_{sortant} (B) la polarisation elliptique de la résultante.....	86
Figure 38 : Schéma du principe d'un appareil de dichroïsme circulaire (issue de Šmidlehner et al. ²¹⁸)86	

Figure 39 : Evolution de l'ellipticité Ψ en fonction de la longueur λ pour une solution de xanthane à 1 g/L dans l'eau (pH = 4.3 et force ionique de 1mS/cm) et dans du DMSO (issue de la thèse de A. Roy ¹⁴³).....	87
Figure 40 : Représentation de l'écoulement laminaire d'un matériau.....	88
Figure 41 : Schéma du principe de la granulométrie laser (issue de Keck et al. ²²⁰).....	94
Figure 42 : (A) Protocole de prélèvement des échantillons (B) Représentation graphique des distributions en volume du haut (trait plein) et du bas (trait pointillé) d'une émulsion.	95
Figure 43 : Spectre RMN ¹ H du xanthane modifié (A) dans l'eau avec une densité de greffage en octylamine de 30 % puis (B) dans le DMSO avec une densité de greffage en benzylamine de 14 %. 127	127
Figure 44 : Représentation schématique des trois études de cette partie.....	169
Figure 45 : Photographie des émulsions contenant du X ⁸ C _{8ord} , du X ⁷ C _{8des} et un système composé de Xn et d'APG à différentes concentration à J+1.....	173
Figure 46 : Photographie des émulsions contenant du X ³² C _{8ord} , du X ³⁵ C _{8des} et un système composé de Xn et d'APG à différentes concentration à J+1.....	173
Figure 47 : Photographies des émulsions contenant différentes concentrations en Xn et en APG, ainsi que des émulsions contenant différentes concentrations en X ⁸ C _{8ord} à J +1.....	175
Figure 48 : (A) Comparaison de la distribution de la taille des gouttelettes du haut de l'émulsion contenant soit du xanthane non modifié et de l'APG soit X ⁸ C _{8ord} pour différentes concentrations à J +1. (B) Evolution de la taille des gouttes pour les émulsions contenant Xn + APG ou X ⁸ C _{8ord}	176
Figure 49 : Evolution dans le temps de la distribution de la taille des gouttelettes du haut de l'émulsion contenant soit du xanthane non modifié et de l'APG soit X ⁸ C _{8ord} à différentes concentrations.....	178
Figure 50 : Photographie à différents temps des émulsions contenant 0,1 % m/m en polymères (X ⁶ C _{8ord} ou Xn) et différentes concentrations en APG.	180
Figure 51 : Evolution dans le temps de la distribution de la taille des gouttelettes du haut de l'émulsion contenant 0,1 % m/m de X ⁶ C _{8ord} ou Xn et différentes concentrations en APG.	181
Figure 52 : Comparaison de la distribution de la taille des gouttelettes du haut de l'émulsion contenant 0,1 % m/m en polymère (X ⁶ C _{8ord} ou Xn) et différentes concentrations en APG à J +1.	181
Figure 53 : Photographie à différents temps des émulsions contenant soit 0,1 % m/m de X ⁶ C _{8ord} soit 0,05 % m/m de X ⁶ C _{8ord} et 0,05 % m/m de Xn.....	184
Figure 54 : Photographie à différents temps des émulsions contenant soit 0,1 % m/m de X ³² C _{8ord} soit 0,05 % m/m de X ³² C _{8ord} et 0,05 % m/m de Xn.	185

Figure 55 : Distribution de la taille des gouttelettes du haut (trait plein) et du bas (trait pointillé) des émulsions contenant soit 0,1 % m/m de polymère modifié (X^6C_{8ord} ou $X^{32}C_{8ord}$) soit un mélange de 0,05 % m/m polymère modifié (X^6C_{8ord} ou $X^{32}C_{8ord}$) et 0,05 % m/m de Xn..... 186

Figure 56 : Courbe d'écoulement (A) des solutions contenant soit 0,125 % m/m de polymère modifié ou non (Xn, X^6C_{8ord} ou $X^{32}C_{8ord}$) soit un système composé de 0,063 % m/m polymère modifié (X^6C_{8ord} ou $X^{32}C_{8ord}$) et 0,063 % m/m de Xn et (B) des émulsions correspondantes. 187

Figure 57 : Comparaison des courbes d'écoulement des solutions, des émulsions correspondantes et de la phase inférieure de l'émulsion après centrifugation, dans le cas de X^6C_{ord} et $X^{32}C_{8ord}$ 188

Figure 58 : Schéma bilan des trois études de cette partie 190

Table des tableaux

Tableau 1 : Exemples de valeurs des concentrations critiques C^* et C^{**} du xanthane en solution. ...	32
Tableau 2 : Comparaison des valeurs de concentration critique pour le xanthane sous forme ordonnée et sous forme désordonnée	33
Tableau 3 : Incréments associés aux différents groupes chimiques d'une molécule.....	67
Tableau 4 : Structure chimique des différents composants de l'émulsion.....	91
Tableau 5 : Composition des formulations	92
Tableau 1 : Répartition de la densité de greffage à chaque étape entre les acides pyruvique et les acides glucuronique.	128
Tableau 7 : Quantité d'APG à introduire en fonction du taux de greffage et de la concentration en XMH.....	172
Tableau 8 : Quantité de matière de chaîne alkyle (en mol) pour l'APG et pour X^8C_{8ord}	174

Introduction Générale

Les polymères amphiphiles se caractérisent par des propriétés physicochimiques très différentes comparées aux polymères purement hydrophiles, dues au greffage de chaînons hydrophobes sur leur squelette hydrophile. En effet, en solution aqueuse, les groupements hydrophobes s'associent *via* des interactions inter et/ou intramoléculaires au sein de microdomaines. De ce fait, les polymères amphiphiles appartiennent à la classe des polymères associatifs. Cette organisation particulière de leurs chaînes en solution aqueuse se traduit par des propriétés viscosifiantes et épaississantes inédites dès lors qu'ils sont introduits en quantité suffisante.

Du fait de leur caractère amphiphile, ces polymères modifiés présentent un fort potentiel en tant qu'agent stabilisant dans le domaine de la formulation. Cette spécificité apparaît d'autant plus prometteuse que l'utilisation de tensioactifs de faible poids moléculaire, classiquement utilisés pour disperser et stabiliser les gouttelettes d'huile, s'avère de plus en plus controversée due à des considérations toxicologiques et environnementales.

La majorité des modifications visant à apporter un caractère amphiphile décrites dans la littérature concernent des polymères linéaires qui adoptent une conformation de type pelote flexible en solution. Peu d'études s'intéressent à conférer ce type de propriétés à des polymères plus complexes en termes de structure et/ou de conformation, comme le xanthane. Le xanthane est un hétéropolysaccharide anionique hydrophile obtenu par fermentation de sucre en présence d'une bactérie. Il est connu pour ses propriétés épaississantes importantes ainsi que pour son caractère fortement rhéofluidifiant. De plus, le xanthane a la particularité d'adopter deux conformations distinctes en solution : l'une sous forme ordonnée hélicoïdale semi-rigide à basse température et force ionique élevée, et l'autre sous forme désordonnée de type pelote flexible à haute température et/ou très faible force ionique. La transition conformationnelle ordre-désordre est réversible et s'accompagne d'une modification des propriétés rhéologiques du polymère en solution.

L'objectif principal de cette thèse consiste à déterminer l'impact de la conformation adoptée par le xanthane pendant le processus de greffage des groupements alkyles, sur ses propriétés associatives en solution aqueuse ainsi que sur ses propriétés stabilisantes en émulsion.

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse se sont articulés selon trois grands axes. Le premier axe consiste à développer un protocole opératoire permettant de greffer des chaînes hydrophobes sur les fonctions acide carboxylique du xanthane sous forme **désordonnée**. Le deuxième se focalise sur la caractérisation des propriétés en solution de ces nouveaux polymères, notamment rhéologiques. Le but est de pouvoir les comparer à celles des polymères modifiés sous

forme **ordonnée** et de conclure sur l'influence de la rigidité de la chaîne sur les propriétés associatives. Puis, dans un troisième axe, les xanthanes amphiphiles modifiés sous forme ordonnée et sous forme désordonnée ont été utilisés pour la préparation d'émulsions Huile dans Eau (H/E) afin de tester leur capacité à la stabilisation de celles-ci.

Ce manuscrit est composé de trois chapitres :

1- Etude bibliographique

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique et se compose de 3 parties. Tout d'abord, la première partie présente le xanthane, le polysaccharide choisi pour cette étude, ses différentes conformations ainsi que ses propriétés en solution aqueuse. Puis, une deuxième partie s'intéresse aux polymères amphiphiles, en se focalisant sur leur comportement rhéologique en solution aqueuse. Différents exemples de modification chimique du xanthane ayant pour but de lui conférer des propriétés amphiphiles sont décrits dans cette partie. Enfin, la dernière partie présente des concepts généraux concernant les émulsions. Notre intérêt sera focalisé sur les mécanismes de déstabilisation des émulsions, sur les différentes techniques permettant de les mettre en évidence ainsi que sur la description des différentes stratégies disponibles afin d'obtenir des émulsions stables dans le temps.

2- Matériel et méthodes

Le deuxième chapitre est dédié aux protocoles de modification chimique du xanthane sous forme désordonnée et sous forme ordonnée ainsi qu'au protocole de formulation. Les différentes techniques de caractérisation développées au cours de cette thèse seront présentées que ce soit pour le xanthane modifié hydrophobiquement en solution (RMN, dichroïsme circulaire et rhéologie) ou en émulsions (granulométrie, microscopie et rhéologie).

3- Résultats et discussion

Le troisième chapitre décrit les principaux résultats obtenus et s'appuie notamment sur trois articles publiés ou en cours d'évaluation.

La première partie compare le comportement des xanthane modifiés hydrophobiquement sous forme ordonnée et désordonnée en solution. Plus particulièrement, on cherche à mettre en évidence la relation entre organisation des chaînes amphiphiles en solutions et propriétés observées. Cette partie s'appuie sur la publication intitulée « Chemical modification of xanthan in the ordered and disordered states: an open route for tuning the physico-chemical properties » publiée dans le journal Carbohydrate Polymers¹.

La deuxième partie s'intéresse à l'application des xanthanes amphiphiles à la stabilisation des émulsions. Dans un premier temps, nous avons étudié leur pouvoir émulsifiant et stabilisant, ainsi que les phénomènes régissant la stabilisation/déstabilisation des émulsions contenant du xanthane modifié sous forme ordonnée. Les résultats obtenus dans cette partie sont présentés dans la publication intitulée « Hydrophobically modified xanthan: thickening and surface active agent for highly stable oil in water emulsions » acceptée dans *Carbohydrate Polymers*².

Puis, dans un deuxième temps et dans la continuité des travaux présentés dans cette thèse, nous avons déterminé l'impact de la rigidité du squelette ainsi que de la longueur de la chaîne alkyle greffée sur les propriétés stabilisantes en émulsion. Cette partie, intitulée « Oil in water emulsion stabilized by hydrophobically modified xanthan: impact of the grafted chain length and the backbone stiffness », a été soumise pour publication.

Une étude complémentaire regroupe des résultats préliminaires qui ont permis d'approfondir la compréhension des phénomènes régissant la formation, la stabilisation et la déstabilisation des émulsions contenant du xanthane modifié.

Pour finir, les conclusions principales de ces travaux de thèse seront présentées ainsi que quelques perspectives.

Chapitre 1 : Bibliographie

- 1. Xanthane : structure et propriétés**
- 2. Polymères amphiphiles**
- 3. Emulsions**

Introduction

L'objectif de ce premier chapitre est de rappeler quelques concepts généraux nécessaires à la compréhension de cette étude et de positionner le sujet de thèse par rapport à la bibliographie actuelle.

Les polysaccharides sont des polymères constitués de sucre d'origine végétale ou biosynthétique. Leurs propriétés épaississantes et gélifiantes attirent l'intérêt scientifique et industriel dans de nombreux domaines. Parmi ces polysaccharides, notre intérêt s'est porté sur le xanthane. En effet, le xanthane a la particularité d'adopter en solution aqueuse et selon les conditions opératoires deux conformations distinctes. L'une sous forme ordonnée hélicoïdale rigide et l'autre sous forme désordonnée de type pelote flexible, se caractérisant notamment par des propriétés rhéologiques différentes. La description de la structure du **xanthane** ainsi que de ses propriétés en solution fait l'objet de cette première partie.

Depuis les années 1980, de nombreux auteurs se sont intéressés à la modification chimique des polysaccharides dans le but de leur conférer un caractère amphiphile. Par la présence de parties hydrophiles et hydrophobes, ces polymères ont tendance à s'auto-associer en solution, induisant de ce fait des propriétés inédites. Cependant, ces études concernent principalement des polysaccharides avec une structure linéaire et qui adoptent une conformation de type pelote flexible en solution. Peu d'études s'intéressent à des polysaccharides plus complexes, que ce soit au niveau de leur structure ou de leur conformation en solution. Ainsi, les propriétés du xanthane en font un bon candidat pour l'étude de l'impact de la rigidité de la chaîne sur les propriétés associatives en solution aqueuse. Les caractéristiques des **polysaccharides amphiphiles**, ainsi que la modification chimique du xanthane permettant d'obtenir des xanthanes modifiés hydrophobiquement sont décrites dans la deuxième partie de ce chapitre.

De par leur caractère amphiphile, ces nouveaux polysaccharides offrent des applications potentielles intéressantes à la stabilisation des émulsions. L'un des plus gros challenge lié aux émulsions concerne leur stabilisation. En effet, les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables et nécessitent l'ajout de molécules, souvent amphiphiles, pour stabiliser l'interface eau/huile mais également d'agent épaississants dont le rôle est de contrôler la viscosité de la phase continue. La troisième et dernière partie de ce chapitre décrit les notions de bases concernant les **émulsions** ainsi que les différentes techniques employées pour les stabiliser, notamment l'utilisation des polysaccharides amphiphiles.

Partie 1 : Xanthane : structure et propriétés

1.1. Généralités sur le xanthane

Vers la fin des années 1950, Allene R. Jeanes³ du département américain de l'Agriculture découvre qu'en présence de sucre, une bactérie isolée des feuilles de chou, *Xanthomonas campestris*, est capable de produire un polysaccharide extracellulaire, la gomme de xanthane.

L'intérêt industriel de ce nouveau polysaccharide se dessine rapidement et repose notamment sur ses propriétés rhéologiques exceptionnelles. Le xanthane possède un important pouvoir épaississant même pour de faibles concentrations en polymère, ainsi qu'un caractère fortement rhéofluidifiant. Il est soluble en solution aqueuse à chaud et à froid. Ces solutions sont stables pour une large gamme de concentration (jusqu'à 150 g/L en NaCl), de température (jusqu'à 90°C) ainsi que de pH (entre 2 et 11)⁴. Une autre propriété intéressante du xanthane concerne sa capacité à interagir avec d'autres polysaccharides comme les galactomannanes (caroube, guar ...). En effet, leur addition à des solutions de xanthane entraîne une augmentation synergique de la viscosité. C'est-à-dire que les mélanges possèdent une viscosité bien supérieure à celles des solutions de polysaccharides seuls^{5,6}.

Dès 1964, le procédé de production permettant d'obtenir la gomme de xanthane est développé par l'entreprise Kelco. Le xanthane est alors le 2^{ème} polysaccharide microbien à être exploité industriellement après le dextrane. Brièvement, le xanthane est obtenu par la fermentation aérobie de la bactérie *Xanthomonas campestris* dans un milieu de culture contenant une source de carbone (comme le glucose ou l'amidon), d'azote et différents sels (magnésium, calcium ...). La réaction se déroule à une température comprise entre 28 et 32°C pour un pH situé entre 6.5 et 7.5, jusqu'à consommation totale de la source de carbone. Le moût obtenu est alors stérilisé thermiquement afin de tuer les bactéries restantes, puis purifié par précipitation dans l'isopropanol. Le xanthane est alors récupéré par filtration ou centrifugation, séché, broyé et finalement conditionné sous forme de poudre⁷. De nombreux paramètres peuvent affecter le procédé de production (nature des sources, température, pH ..)⁸ et auront un impact sur le produit final (masse molaire, structure chimique ...). De plus, le xanthane possède un coût de vente, lié au principalement à la production, relativement élevé par rapport aux autres gommes. Pour ces différentes raisons, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'optimisation du procédé de fermentation⁹⁻¹².

Dans l'objectif d'une application dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique, les propriétés toxicologiques et d'innocuités du xanthane ont fait l'objet de recherches approfondies. Ces dernières attestent de son caractère non toxique et n'altérant pas la croissance. Il est également non sensibilisant et ne provoque pas d'irritation de la peau ou des yeux¹³. Ainsi, en 1969, la gomme de xanthane est approuvée pour son usage alimentaire aux Etats-Unis par la FDA (Food and Drug

Administration). Puis, en 1980, la CEE (European Economic Community) inscrit le xanthane sous le numéro E 415 en tant qu'additif alimentaire.

De nos jours, avec une production annuelle estimée à 30 000 tonnes par an¹⁴, c'est le polysaccharide le plus vendu.

Les propriétés du xanthane suggèrent des applications intéressantes en tant qu'agent de contrôle de la viscosité dans les systèmes aqueux ou en tant que stabilisant pour les émulsions et les suspensions. De plus, issu de ressources renouvelables, il présente l'avantage d'être biodégradable et biocompatible. Ainsi, ses domaines d'application couvrent un large spectre. L'une de ses applications majeures est l'industrie alimentaire. Utilisé en faible quantité, le xanthane permet de contrôler la texture, la viscosité, l'aspect et les propriétés rhéologiques du produit final. Il est utilisé pour les assaisonnements de salade, les sauces, les boissons ou encore les plats surgelés^{4,15}. Le xanthane trouve également des applications en cosmétique (crème, dentifrice...), en agroalimentaire (amélioration de la capacité de pulvérisation des produits phytosanitaires et de leur adhérence⁸), pour les produits détergents (tolérance élevée vis-à-vis des acides et des produits alcalins) ou encore à la récupération assistée du pétrole¹⁶.

1.2. Structure du xanthane

Le xanthane est un hétéropolysaccharide anionique hydrophile. Comme la plupart des polysaccharides naturels, le xanthane possède une masse molaire élevée ($\approx 10^6$ g/mol).

La structure chimique du xanthane est illustrée en Figure 1. Ce polymère est constitué d'un squelette cellulosique linéaire de β -1,4-D-glucose dont une unité sur deux est substituée en C3 par une chaîne triosidique comportant un α -D-mannose, un acide β -D-glucuronique et un β -D-mannose terminal¹⁷.

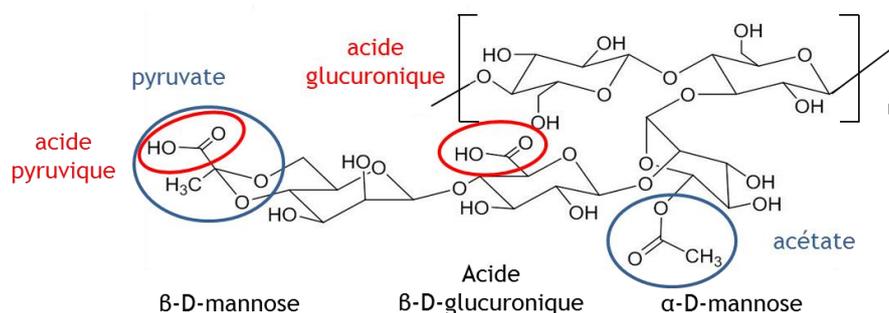


Figure 1 : Structure chimique du xanthane

Le xanthane possède également des groupements acétate et pyruvate sur le carbone 6 du mannose interne et sur les carbones 4 et 6 du mannose terminal, respectivement, et dont les proportions varient en fonction de la nature de la souche bactérienne¹⁸, des conditions de fermentation^{9,17,19} ou

encore des traitements de post-fermentation⁸. De plus, la proportion de ces deux groupements a un impact sur les propriétés du polymère en solution (voir le paragraphe 1.3.1.).

Plus récemment, des travaux menés par Kool et al.^{20,21} ont abouti à l'identification de motifs de substitutions supplémentaires. Pour ces auteurs, la seule présence de l'acétate sur le α -D-mannose ne permet pas une stabilisation suffisante de la structure hélicoïdale. Ainsi, le mannose terminal peut également être substitué par un groupement acétate (voir la Figure 2). Ces résultats ont été confirmés par Abbaszadeh et al.²².

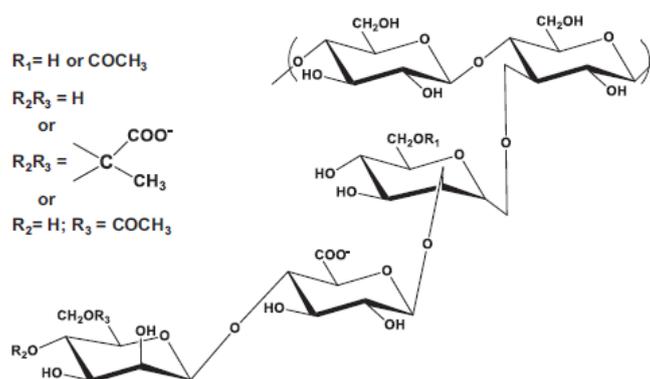


Figure 2 : Structure chimique du xanthane selon Kool et al.²¹

Le xanthane doit son caractère anionique à la présence de deux acides carboxyliques le long de la chaîne latérale, à savoir un acide glucuronique et un acide pyruvique, situé sur le mannose terminal. Leur proportion par unité de répétition, notamment pour l'acide pyruvique, est dépendante du degré de substitution en pyruvate. Le xanthane possède donc des capacités d'échange de protons en solution^{23,24}.

Dans les produits commerciaux, ces fonctions sont souvent sous forme carboxylate, et saponifiées par des ions Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} . La forme neutralisée peut être ensuite convertie en forme acide par échange d'ions ou bien par dialyse contre une solution acide.

1.3. Conformation en solution

1.3.1 Transition conformationnelle ordre – désordre

Le xanthane adopte en solution aqueuse et selon les conditions opératoires, deux conformations distinctes²⁵ : l'une sous forme ordonnée hélicoïdale très rigide et l'autre sous forme désordonnée de type pelote flexible, se caractérisant par des propriétés rhéologiques différentes²⁶. Cette transition conformationnelle ordre - désordre réversible est définie par une température de transition T_m .

Plus particulièrement, le xanthane issu directement du moût de fermentation sans aucun traitement thermique est dit sous sa forme native. L'augmentation de la température du milieu au-dessus de T_m

et/ou un milieu contenant une très faible concentration en sel ($[\text{NaCl}] < 10^{-4} \text{ M}$) entraîne le passage de cette forme native à une conformation désordonnée ou dite dénaturée. Le passage de l'état natif à dénaturé est irréversible. Le xanthane est donc peu étudié sous sa forme native^{27,28}. Si le milieu est refroidi en dessous de T_m ou si la concentration en sel est suffisante ($[\text{NaCl}] > 10^{-4} \text{ M}$), le xanthane adopte de nouveau une conformation ordonnée mais différente de la forme native, cette forme est dite renaturée. Cette fois-ci, le passage de l'état dénaturé à renaturé est réversible²⁹.

Outre la dénaturation thermique, la conformation désordonnée du xanthane est également observée dans le cadoxen³⁰, un solvant fortement alcalin constitué d'hydroxyle de sodium, de cadmium et d'éthylenediamine, et capable de dissoudre la cellulose.

Il existe de nombreuses techniques permettant de mettre en évidence les différentes conformations adoptées par le xanthane en solution telles que la polarimétrie^{31,32}, le dichroïsme circulaire^{31,33}, la conductimétrie³⁴, la microscopie à force atomique³⁵⁻³⁷, la rhéologie^{28,38,39} ou encore la RMN^{31,32}. Un exemple est présenté en Figure 3.

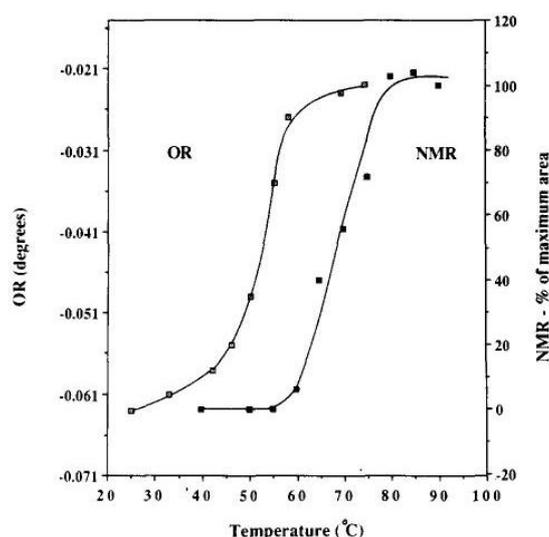


Figure 3 : Mise en évidence des deux conformations du xanthane et de la T_m par polarimétrie et RMN (issue de Foss et al.³²)

La température de transition conformationnelle, T_m , dépend de différents paramètres comme le pH, la concentration en sel mais également de la structure primaire, notamment le degré de substitution en acétate et en pyruvate. La T_m est, néanmoins, indépendante de la concentration en polymère^{25,31}.

- L'augmentation de la force ionique entraîne un renforcement de la structure hélicoïdale du xanthane, permettant ainsi une meilleure stabilité thermique^{32,40}. En effet, la présence des cations permet d'écranter les charges négatives présentes sur les chaînes latérales du xanthane, entraînant une réduction des répulsions électrostatiques entre ces groupements. Il y a alors réduction du

volume hydrodynamique et l'obtention d'une chaîne plus rigide donc plus stable thermiquement. Cet effet est encore plus marqué avec des cations divalents.

- De façon similaire, la diminution du pH induit un décalage de la T_m vers de plus hautes températures^{41,42}.

- Des études ont été réalisées en retirant partiellement ou totalement les groupements pyruvate et acétate afin de conclure quant à leur impact sur la stabilisation de la forme ordonnée et donc sur la T_m ^{40,42,43}. La présence des charges négatives des groupements pyruvate induit des répulsions électrostatiques et des contraintes stériques qui déstabilisent l'hélice. Ainsi, plus le xanthane sera riche en pyruvate, plus sa T_m sera basse.

En revanche, les fonctions acétate permettent de stabiliser la structure hélicoïdale, principalement par des interactions apolaires ou par des liaisons hydrogène entre ces groupements et le squelette cellulosique^{38,44}, entraînant une augmentation de la T_m lorsque leur proportion est plus importante.

Selon les conditions expérimentales et la nature de l'échantillon étudié, la T_m varie entre 40 et plus de 100 °C^{32,45,46}.

1.3.2. Structure secondaire du xanthane

Si la structure primaire du xanthane est bien définie, sa structure secondaire fait encore l'objet d'un débat controversé, notamment pour la forme native et la forme renaturée. Depuis des années, de nombreuses études ont été menées dans le but de statuer sur la nature exacte de cette structure. Néanmoins, les différents auteurs s'accordent sur la conformation désordonnée du xanthane sous forme de pelote flexible.

○ A l'état solide

La diffraction des rayons X est la seule technique permettant de caractériser la structure ordonnée des polysaccharides sous forme de fibres à l'échelle atomique.

Cette approche a été employée par Moorhouse et al.⁴⁷. Les résultats obtenus ont montré une hélice droite à 5 unités de répétition par tour (notée 5_1) et d'une hauteur de 4,7 nm comme présentée en Figure 4 a.

Ils en concluent que sous forme ordonnée le xanthane est constitué d'une hélice simple stabilisée par l'alignement des chaînes latérales le long du squelette cellulosique.

Cependant, ces résultats sont en opposition avec ceux reportés pour le xanthane sous sa forme solide par Okuyama et al.⁴⁸. En effet, pour ces auteurs, il s'agit d'une double hélice 5_1 composée de deux brins antiparallèles d'une hauteur de 4,7 nm et stabilisée *via* des liaisons hydrogènes intermoléculaires, comme illustrée par la Figure 4 b.

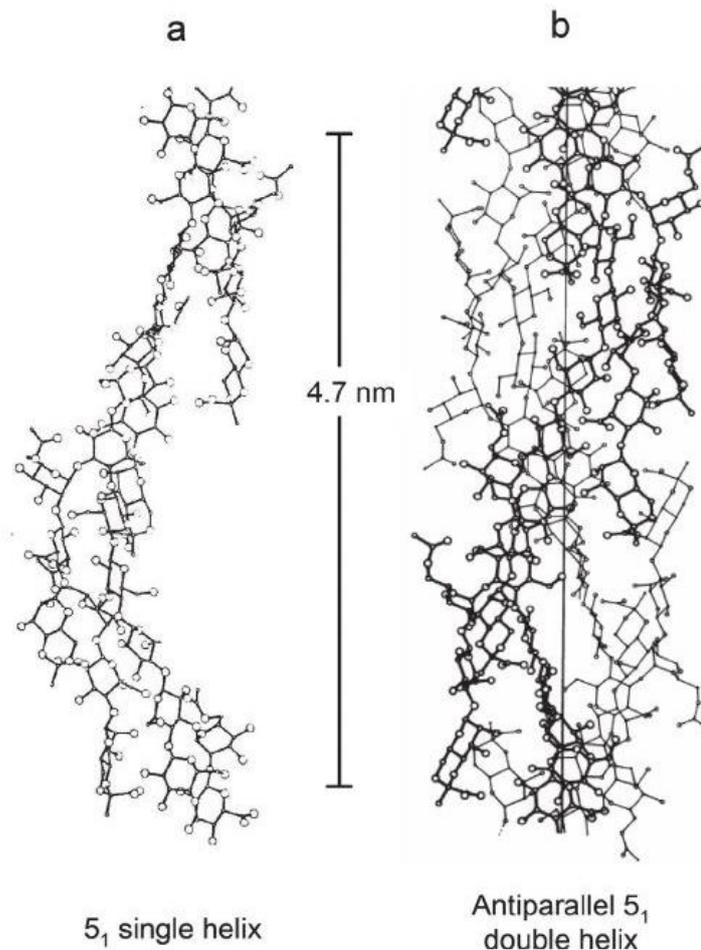


Figure 4 : Structures ordonnées du xanthane proposées à partir de la modélisation informatique des données de diffraction des rayons X : (a) une simple hélice⁴⁷ (b) une double hélice antiparallèle⁴⁸.

Les données expérimentales obtenues sont en accord avec les deux modèles proposés : simple ou double hélice. Ainsi, la diffraction des rayons X ne donne pas de preuve concluante sur la conformation ordonnée du xanthane à l'état solide.

- En solution aqueuse

En solution, deux conformations ordonnées du xanthane ont également été observées : une simple et une double hélice, sans pour autant pouvoir valider l'un des modèles avec certitude. Il est important de rappeler que l'étude de la conformation du xanthane dépend des facteurs expérimentaux mais également de l'historique de l'échantillon considéré (conditions de fermentation, traitements post fermentation ...), l'étude de chaînes isolées ou bien d'agrégats, pouvant ainsi expliquer les différences observées dans les données de la littérature.

Tout d'abord, certains auteurs sont en faveur d'un modèle d'une structure secondaire du xanthane constituée d'une **simple hélice**. Cette théorie est basée sur des études attestant que les changements de conformation sont dus à des réarrangements intramoléculaires.

Tout d'abord, en 1977, Morris et al.³¹ observent par différentes techniques (polarimétrie et dichroïsme circulaire) que la transition conformationnelle est indépendante de la concentration en polymère et en concluent que le xanthane sous sa forme ordonnée est constitué d'un seul brin.

Puis, Norton et al.⁴⁹ ont montré que la transition conformationnelle ordre - désordre induite par l'augmentation de la concentration en sel, suit une cinétique d'ordre 1, suggérant également une hélice simple constituée d'un seul brin et un processus de dénaturation intramoléculaire. Ces résultats ont été confirmés par Jones et al.³⁴ lors d'une étude de la conductivité de solutions aqueuses de xanthane.

Cependant, ces auteurs ont étudié des polymères après traitement thermique. Or, le passage de l'état natif à renaturé par augmentation de la température étant irréversible, leurs observations concernent probablement la forme renaturée du xanthane.

Afin de déterminer la conformation native puis renaturée du xanthane, Milas et al.^{28,50} se sont intéressés à un moût de fermentation n'ayant subi aucun traitement thermique et n'ayant pas été exposé à de faibles forces ioniques. Ils démontrent que les deux conformations ordonnées (native et renaturée) sont des hélices mais qu'elles ne sont pas identiques. En effet, en solution, la forme renaturée est plus visqueuse, plus rigide et possède une masse molaire doublée par rapport à la forme native⁵⁰. De plus, ils observent qu'il n'y a pas de différence dans le nombre de brins par molécule dans les deux états.

Ils en concluent qu'à l'état natif, le xanthane est une hélice à seul brin. La transition de l'état natif à dénaturée est principalement liée à un processus intramoléculaire. Finalement, lors de la renaturation, les chaînes du xanthane se replient sur elles-mêmes pour former une double hélice toujours composée d'un seul brin.

A l'inverse, d'autres auteurs supportent la théorie d'une structure secondaire du xanthane composée d'une **double hélice** constituée de deux brins.

Différentes techniques ont été utilisées pour caractériser les conformations ordonnées du xanthane. Liu et al.⁵¹ ont étudié la transition ordre – désordre par polarimétrie et diffusion de la lumière lors de l'augmentation de la température pour des échantillons de xanthane soniqués. A 20°C et 0,01 M de NaCl, le xanthane est ordonné et plus particulièrement sous la forme d'une double hélice. L'augmentation de la température entraîne généralement une diminution de la viscosité sans pour autant observer de modification de la masse molaire. En revanche, dans le cadoxen, solvant dans lequel le xanthane est sous sa forme désordonnée, la masse molaire³⁰ est divisée par deux.

Ainsi, ils proposent le modèle présenté en Figure 5, selon lequel la double hélice constituée de deux brins se défait progressivement par ses extrémités, à cause des répulsions entre les groupements chargés, lors de la dénaturation qui n'est alors que partielle.

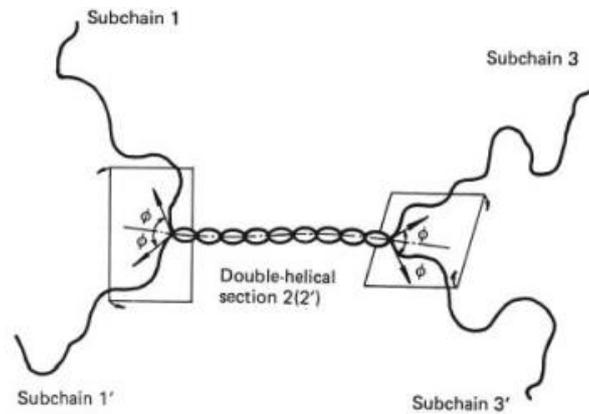


Figure 5 : Modèle de la double partiellement fondue proposé par Liu et al.⁵²

Par ailleurs, des études menées par Muller et al.⁵³ et Capron et al.⁵⁴ sur des xanthanes avant et après traitement thermique ont permis de caractériser la forme native et la forme renaturée. Cette fois-ci par diffusion de la lumière, ces auteurs ont confirmé cette structure native en double hélice compacte. La dénaturation est alors un mécanisme en deux étapes. Tout d'abord, ils observent une étape rapide avec une augmentation de la viscosité sans modification de la masse molaire qu'ils attribuent à l'extension de la double hélice. Puis, il y a dissociation complète de la double hélice en deux chaînes simples par un processus intramoléculaire accompagnée de la division par deux de la masse molaire. Cette seconde étape est un processus long, ainsi le temps du traitement thermique et la technique utilisée ont leur importance^{53,55,56}. Si les conditions ne sont pas suffisantes pour assurer une dissociation totale de la double hélice, un état intermédiaire est observé avec des zones partiellement ordonnées et désordonnées.

En utilisant la même technique, Lecourtier et al.²⁹ ont étudié la dénaturation du xanthane par dilution à de très faibles forces ioniques ($[\text{NaCl}] < 10^{-5} \text{ M}$), ou encore Stokke et al.⁵⁷ par microscopie électronique, ont reporté des résultats similaires.

Afin de se rapprocher des conditions réelles de fermentation, Capron et al.³⁹ se sont intéressés à l'impact de la concentration sur la dénaturation de la double hélice. Pour des concentrations inférieures à 10 g/L, ils observent une dissociation totale. En revanche, pour des concentrations supérieures, celle-ci n'est que partielle du fait des contraintes stériques générées par les chaînes de xanthanes.

Matsuda et al.³³ ont étudié des échantillons de xanthane préparés dans différentes conditions de dénaturation et de renaturation notamment par dichroïsme circulaire et diffusion de la lumière et ont confirmé le rôle important de la concentration en polymère lors du processus de dénaturation. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 6. En milieu dilué ($C < 10 \text{ g/L}$) et pour des conditions expérimentales spécifiques (traitement thermique suffisant, très faible concentration en sel ou encore dans le cadoxen), la double hélice du xanthane natif se dissocie totalement en deux brins selon un processus en deux étapes^{39,53,53} entraînant une diminution de la masse molaire ainsi que de la viscosité. Lors de la renaturation, les chaînes se replient sur elles même pour former une double hélice constituée d'un seul brin.

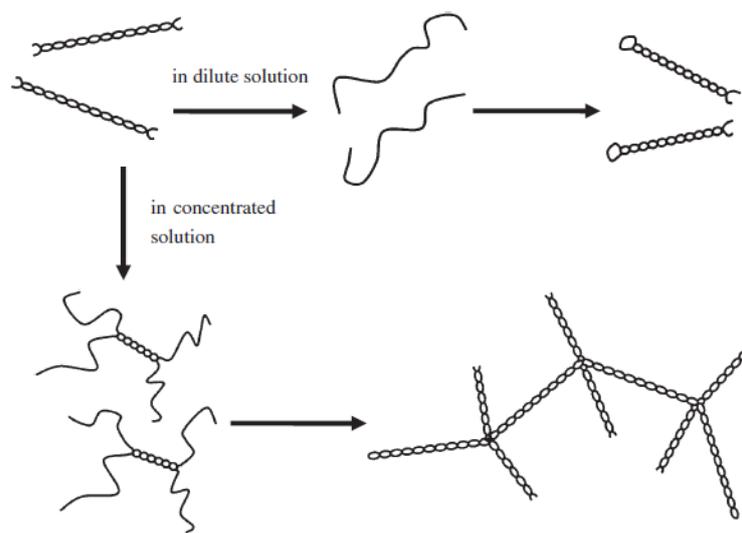


Figure 6 : Représentation schématique du processus de dénaturation en fonction de la concentration (issue de Matsuda et al.³³)

En milieu concentré, la double hélice fond par ses extrémités lors de la dénaturation⁵² mais la dissociation n'est que partielle. Des zones partiellement ordonnées et désordonnées sont alors observées. Lors de la renaturation, les chaînes ont alors tendance à s'agréger mais sont toujours constituées de doubles hélices à deux brins, moins ordonnées que dans la forme native. Ce dernier mécanisme permet d'expliquer pourquoi certains auteurs n'ont pas observé de modification de la masse molaire de leurs échantillons lors de sa dénaturation.

Des auteurs se sont également intéressés à la détermination de la conformation ordonnée par des mesures de microscopie à force atomique^{36,37,56}. Cette technique présente l'avantage d'une meilleure sensibilité comparée aux techniques précédentes.

Notamment, Moffat et al.³⁷ ont étudié la conformation d'une solution de xanthane adsorbée sur un substrat chargé, ici le mica.

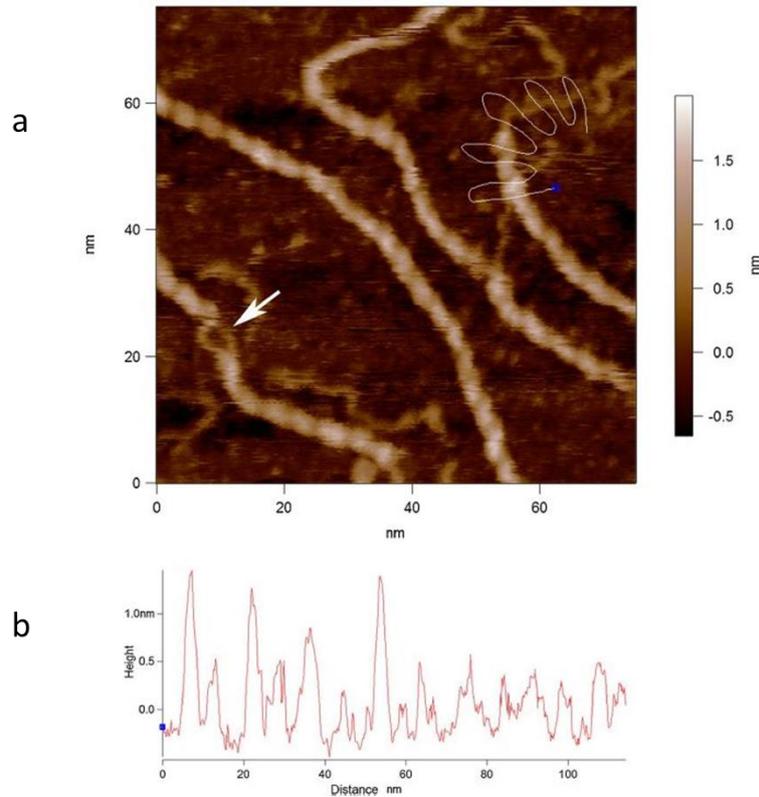


Figure 7 : Mise en évidence par AFM de la structure secondaire du xanthane (a) image AFM (b) évolution de la topographie mesurée le long de la ligne blanche en haut à droite de l'image (a) (issue de Moffat et al.³⁷)

L'AFM permet de visualiser les chaînes en solution et la Figure 7 confirme la présence de longues structures étendues. De plus, l'analyse de la topographie a permis de déterminer une hauteur de chaîne de 4,7 nm, correspondant aux données reportées en diffraction des rayons X pour le xanthane^{47,48}. Sur la Figure 7 a, la flèche blanche indique une courte partie de la chaîne pour laquelle les deux brins des chaînes sont visibles. Il est également possible d'observer en haut à droite de l'image la séparation de la chaîne principale en deux chaînes moins rigides. Ces résultats sont confirmés par la différence de hauteur de chaîne entre les zones ordonnées et désordonnées (voir la Figure 7 b). D'autres images obtenues dans cette étude montrent des structures en « épingle à cheveux » en extrémités de chaînes.

Moffat et al.³⁷ confirment ainsi la théorie selon laquelle la structure secondaire du xanthane est une double hélice formée par des associations intramoléculaires qui se dissocie partiellement en deux brins simples lors de la dénaturation.

Les études précédentes indiquent que la dénaturation et la renaturation du xanthane en solution aqueuse sont des phénomènes complexes dépendant de diverses conditions expérimentales comme la concentration, la force ionique, la température et le temps d'exposition à celle-ci ou encore la structure primaire du polysaccharide.

Certaines études montrent que la transition ordre – désordre est un processus intramoléculaire, régi par une cinétique du premier ordre, et affirment que la structure ordonnée du xanthane est une seule hélice stabilisée par l'alignement des chaînes latérales le long du squelette du polymère.

D'autres études sont en faveur d'une structure ordonnée sous la forme d'une double hélice dont la formation, par un processus intramoléculaire, entraîne un doublement de la masse molaire.

Plus récemment, Morris⁵⁸ a proposé un nouveau modèle basé sur le fait que les deux interprétations précédentes sont correctes. En effet, la controverse autour de la structure ordonnée du xanthane repose sur l'hypothèse implicite que les polymères n'adoptent qu'un seul type de conformation ordonnée, et cela n'est pas forcément correct. Selon Morris⁵⁸, la transition conformationnelle du xanthane est un processus en deux étapes comme illustré par la Figure 8.

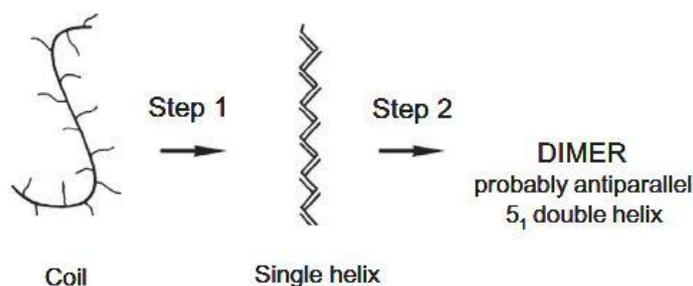


Figure 8 : Schéma du mécanisme proposé par Morris⁵⁸ pour la transition ordre – désordre du xanthane

La première étape correspond au passage de la forme désordonnée de type pelote flexible à une hélice simple par un processus intermoléculaire. Puis, au cours de la deuxième étape, il y a dimérisation de deux hélices simples entraînant l'obtention d'une double hélice 5₁ composée de deux brins antiparallèles (voir la Figure 4 b) justifiant le doublement de la masse moléculaire.

En fonction des conditions expérimentales, la transition conformationnelle peut s'arrêter à l'étape 1, expliquant pourquoi certaines études ont attesté d'une seule hélice sans modification du poids moléculaire.

1.4. Propriétés en solution

1.3.1 Régime de concentration

- Cas général des polymères

En solution, le comportement des polymères dépend de nombreux paramètres, notamment de leur concentration et de leur masse molaire. On distingue principalement trois régimes de concentration différents⁵⁹, représentés en Figure 9.

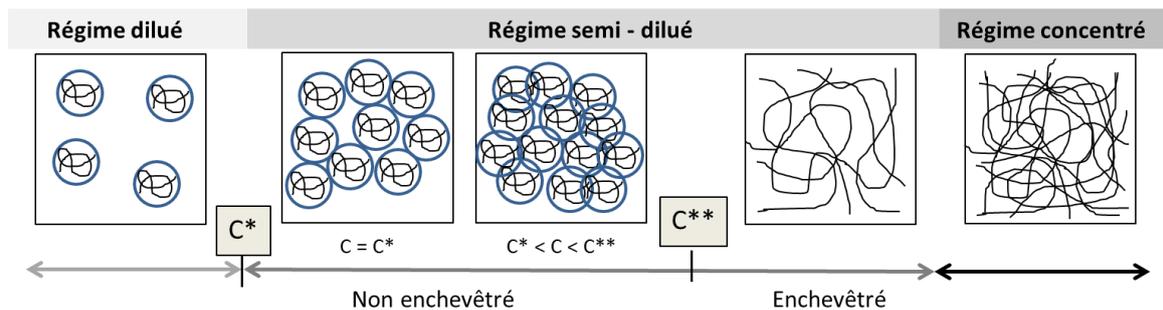


Figure 9 : Régimes de concentration des polymères en solution (adaptée de Bertola⁶⁰)

En régime dilué, les chaînes macromoléculaires sont considérées comme isolées où les interactions entre les chaînes sont minimisées. Avec l'augmentation de la concentration, la distance entre les chaînes diminue. La concentration de recouvrement C^* correspond à une concentration pour laquelle les volumes hydrodynamiques des chaînes sont en contact et les chaînes commencent à interagir entre elles. Elle marque le passage du régime dilué au régime semi – dilué et se traduit par une augmentation de la viscosité plus importante.

Dans le régime semi – dilué, les interactions entre les chaînes sont prépondérantes. Ce régime est partagé en deux selon que les chaînes sont enchevêtrées ou non. La transition entre ces deux sous régimes est définie par la concentration C^{**} , appelée concentration d'enchevêtrement.

Si la concentration en polymère continue d'augmenter, les chaînes sont d'autant plus enchevêtrées et le régime concentré est alors atteint.

Chaque régime de concentration se traduit par des propriétés viscosimétriques et viscoélastiques qui lui sont propres.

- Cas du xanthane

La détermination des régimes de concentration du xanthane représente un aspect important de l'étude de ce polysaccharide du fait que l'organisation des chaînes en solution et donc le comportement rhéologique varient selon le régime de concentration.

Les techniques les plus courantes pour déterminer les valeurs des deux concentrations critiques C^* et C^{**} sont principalement la rhéologie⁶¹⁻⁶³ mais aussi la diffusion de la lumière⁶⁴⁻⁶⁶.

Par exemple, la Figure 10 présente les résultats obtenus par Wyatt et al.⁶³ pour des solutions de xanthane sous forme ordonnée et sous forme désordonnée à différentes concentrations.

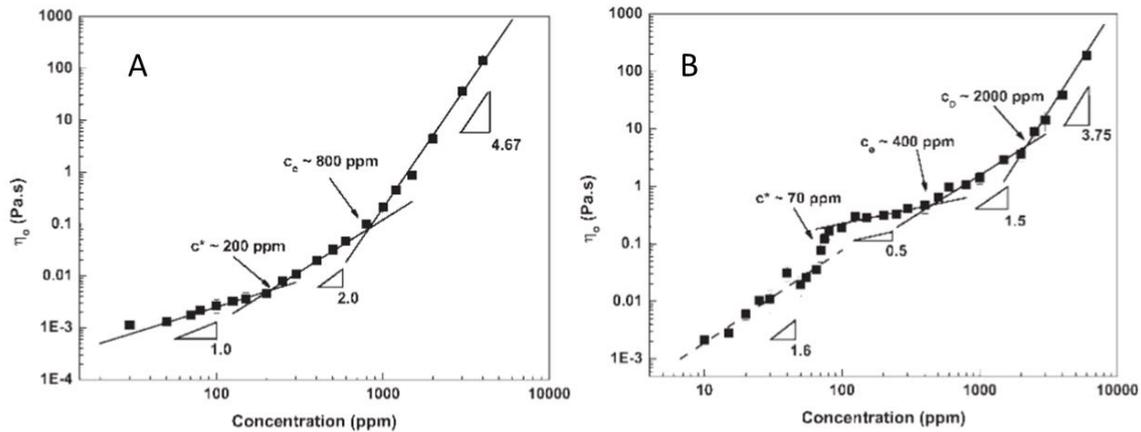


Figure 10 : Détermination des régimes de concentration (issue de Wyatt et al.⁶³) pour le xanthane (A) sous forme ordonnée (B) sous forme désordonnée

En rhéologie, les régimes de concentration sont déterminés à partir des courbes d'écoulement et plus particulièrement en traçant l'évolution de la viscosité newtonienne à gradient de vitesse nul ou très faible en fonction de la concentration.

Si pour de faibles concentrations (< 2 g/L), il est possible d'obtenir la viscosité newtonienne η_0 au niveau du plateau newtonien, en revanche, pour des concentrations plus élevées, il est nécessaire d'appliquer un modèle de loi de puissance comme par exemple le modèle de Carreau ou de Cross afin d'obtenir une approximation de cette viscosité.

Comme illustré par la Figure 10, chaque rupture de pente correspond à une concentration critique et donc à un changement de régime de concentration, caractérisé par une valeur de pente. Dans le cas des polysaccharides neutres flexibles, cette pente est généralement de 1 dans le régime dilué, entre 2 et 3 en régime semi - dilué et entre 3 et 5 pour le régime semi - dilué enchevêtré⁶⁷. Les résultats obtenus pour le xanthane, bien que sous sa forme ordonnée donc rigide, sont en accords avec ces valeurs de la littérature.

De nombreux auteurs se sont intéressés à la détermination des concentrations critiques du xanthane. Il est important de souligner que la plupart de ces études sont réalisées en présence de sel, soit pour des xanthanes sous forme ordonnée. Des exemples sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Exemples de valeurs des concentrations critiques C^* et C^{**} du xanthane en solution.

Technique	Auteurs	Condition	C^* (g/L)	C^{**} (g/L)
Rhéologie	Cuvelier et al. ⁶¹	0,1 M NaCl	0,3	1,1
	Milas et al. ⁶²	0,1 M NaCl	0,1	0,6
	Wyatt et al. ⁶³	0,05 M NaCl	0,2	0,8
Diffusion de la lumière	Southwick et al. ⁶⁴	0,03 NaN3	0,15	0,7
	Tinland et al. ⁶⁵	0,1 M NaCl	0,4	-
	Rodd et al. ⁶⁶	0,1 M NaCl	0,2	0,7

On remarque que les valeurs obtenues dans la littérature peuvent varier d'une étude à l'autre. Ces résultats peuvent s'expliquer par les différentes techniques utilisées, les conditions de l'analyse mais également la nature de l'échantillon (teneur en pyruvate, polydispersité, masse molaire), comme précédemment établi.

Cependant, ces valeurs restent du même ordre de grandeur et il est possible d'approximer que $C^* \approx 0,2$ g/L et $C^{**} \approx 1$ g/L.

Wyatt et al.⁶³ sont les seuls, à notre connaissance, à avoir étudié les régimes de concentration du xanthane en absence de sel, soit sous sa forme désordonnée.

Comme illustré par la Figure 10 B, on observe différents régime de concentration : le régime dilué, caractérisé par une pente de 1,6, le régime semi dilué avec une pente de 0,5 et le régime semi – dilué enchevêtré avec une pente de 1,5. Dans ce cas, on remarque également un quatrième régime de concentration caractérisé par une pente de 2.

Ce dernier peut s'expliquer par le caractère polyelectrolyte du xanthane. Selon la théorie de Dobrynin et al.⁶⁸, les polyelectrolyte peuvent être décrits comme une succession de blobs électrostatiques. En l'absence de sel, les charges négatives ne sont pas écrantées ce qui entraine un étirement de la chaîne sous l'effet des répulsions électrostatiques. Ainsi, le volume hydrodynamique est plus important pour de faibles concentrations et favorise les interactions entre les chaînes.

Ils définissent cette dernière concentration critique, C_d , comme la concentration à partir de laquelle les blobs commencent à s'enchevêtrer entraînant le passage d'un comportement de polymère chargé à celui d'un polymère neutre dans un bon solvant.

Pour des concentrations supérieures à C_d , les blobs électrostatiques ne se font plus ressentir en solution et le comportement rhéologique de la solution est principalement dû à la nature du polymère.

Tableau 2 : Comparaison des valeurs de concentration critique pour le xanthane sous forme ordonnée et sous forme désordonnée

	C* (g/L)	C** (g/L)	C _d (g/L)
Forme ordonnée	0,2	0,9	-
Forme désordonnée	0,07	0,4	2

L'étude de solution de xanthane en présence de sel, soit sous sa forme ordonnée, a permis d'identifier trois régimes de concentration et deux concentrations critiques (C* et C**). En absence de sel, soit pour le xanthane sous sa forme désordonnée, quatre régimes de concentration et donc trois concentrations critiques (C*, C** et C_d) ont été observés. De plus, les concentrations critiques C* et C** sont plus faibles pour le xanthane sous forme désordonnée que sous forme ordonnée (voir le Tableau 2). Ainsi, le comportement du xanthane en solution dépend du régime de concentration mais également de la conformation de la chaîne et donc de la concentration en sel du milieu.

1.3.2. Propriétés viscosimétriques

○ Viscosité

Par la nature anionique des chaînes latérales, le xanthane possède une bonne solubilité en solution aqueuse et entraîne des viscosités élevées dès de faibles concentrations en polymère¹³.

Dans le régime dilué, on définit la viscosité intrinsèque $[\eta]$, qui est une mesure indirecte du volume hydrodynamique de la chaîne polymère et dépend de la masse molaire, du solvant et plus particulièrement de la concentration en sel et de la température.

Conformément aux polyelectrolytes en solution, la viscosité intrinsèque du xanthane diminue lorsque la concentration en sel augmente^{29,62}. Ce résultat s'explique par l'écrantage des charges négatives en présence de sel entraînant un repliement des chaînes latérales et donc une réduction du volume hydrodynamique. A partir d'une certaine force ionique et du fait de la forte rigidité de l'hélice, la viscosité devient indépendante de la force ionique, comme reporté par Capron et al.⁵⁴.

Comme dans la partie précédente, la nature de l'échantillon impacte très fortement sa viscosité intrinsèque. Ainsi, Liu et al.⁵² ou encore Arendt et al.⁶⁹ ont constaté une augmentation de cette viscosité avec l'augmentation de la masse molaire, ce phénomène ayant également été mis en évidence par Callet et al.⁷⁰ dans le cas de xanthane à haute teneur en pyruvate.

Pour rappel, le xanthane peut présenter trois conformations différentes en solution (native, dénaturée et renaturée) caractérisées par une organisation différente de la chaîne. Cependant, les conditions de dénaturation (température et temps de chauffage) peuvent influencer la conformation

de la forme renaturée et donc sa viscosité intrinsèque. Muller et al.⁵³ ont dénaturé le xanthane sous différentes conditions. Dans un premier cas, ils observent une viscosité intrinsèque supérieure à la forme native et en déduisent que la dénaturation n'est alors que partielle. La forme renaturée est une double hélice moins ordonnée que la forme native et donc son volume hydrodynamique est plus important, comme observé par Lecourtier et al.²⁹. Dans un autre cas et pour des conditions plus drastiques, la viscosité intrinsèque de la forme renaturée diminue. Ces auteurs expliquent ce résultat par une dissociation totale de la double hélice et une renaturation sous la forme d'une hélice à un seul brin possédant un volume hydrodynamique plus faible.

Il est donc possible de contrôler la viscosité intrinsèque du xanthane sous forme renaturée en ajustant les conditions de dénaturation.

Ces différents paramètres permettent entre autres d'expliquer les différences de viscosités intrinsèques observées dans la littérature.

Sous forme désordonnée, le xanthane présente une conformation de type pelote statistique constituée d'une seule chaîne de polymère. Cependant, en raison de l'absence totale d'écrantage des charges du polymère, le volume hydrodynamique est plus important. La viscosité intrinsèque de la forme désordonnée est donc plus élevée que pour les conformations ordonnées^{29,71}.

- Courbe d'écoulement

En solution et dès de faibles concentrations, le xanthane est également connu pour son caractère fortement rhéofluidifiant. Un exemple de ce comportement est présenté en Figure 11.

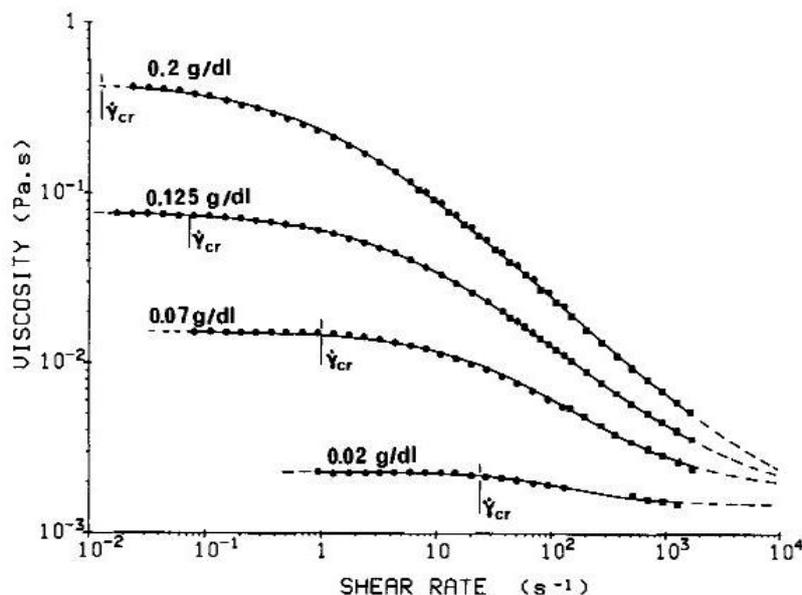


Figure 11 : Courbes d'écoulement de solutions de xanthane à différentes concentration dans 0,1 M NaCl (issue de Cuvelier et al.⁶¹)

On observe sur la Figure 11 que le xanthane présente un caractère rhéofluidifiant pour toutes les concentrations étudiées. Celui-ci est d'autant plus marqué que la concentration en polymère est élevée. Toutes les courbes montrent un plateau newtonien pour de faibles cisaillements et que la viscosité newtonienne η_0 est atteignable expérimentalement jusqu'à 2 g/L.

Lorsque la concentration diminue, le début de la zone rhéofluidification, caractérisée par la vitesse de cisaillement critique $\dot{\gamma}_{CR}$, est décalée vers de plus hautes vitesses de cisaillement.

Ce régime obéit à une loi de puissance de type $\eta = k \dot{\gamma}^n$, avec l'indice d'écoulement $n \leq 1$ pour les fluides rhéofluidifiant. Par extension de cette loi de puissance, il est possible d'approximer la valeur de la viscosité au niveau du plateau newtonien en appliquant par exemple la loi de Carreau – Yasuda.

Dans la littérature, certains auteurs se sont intéressés à la nature des mécanismes responsables de ces propriétés en écoulement. Notamment, ils ont étudié le principe de superposition de Cox – Merz qui est basé sur une corrélation empirique entre la viscosité de cisaillement (η) en fonction du taux de cisaillement et la viscosité complexe η^* en fonction de la fréquence ω et selon lequel ces deux courbes se superposent si le polymère en solution est soumis seulement à des enchevêtrements.

En l'absence de sel, Wyatt et al.⁶³ observent que la loi de Cox – Merz s'applique dans le cas du xanthane mais pas pour de faibles concentrations ($C < C^*$). Ainsi, dans le régime semi-dilué enchevêtré, les chaînes du xanthane ne sont pas soumises à d'autres interactions que des enchevêtrements.

En opposition, d'autres auteurs comme Ross – Murphy et al.⁷² remarquent que la loi de Cox – Merz n'est pas applicable et ils en concluent l'existence d'interactions non covalentes en solution.

Choppe et al.²⁶ constatent que la loi de Cox – Merz s'applique uniquement pour de faibles vitesses de cisaillement. Pour des valeurs plus importantes, la viscosité de cisaillement est plus faible que la viscosité complexe. Ces auteurs expliquent ce comportement par la formation d'un réseau transitoire gouverné par des interactions particulières. Milas et al.⁶² observent des résultats similaires mais en déduisent que le comportement du xanthane est dû à de simples enchevêtrements.

La force ionique du milieu ainsi que la température ou encore la conformation des chaînes en solution ont un impact sur le comportement en écoulement du xanthane.

Selon le régime de concentration du polymère, l'effet de la force ionique n'est pas le même⁶³. En effet, en régime dilué ou semi – dilué non enchevêtré, la viscosité diminue avec l'augmentation de la concentration en sel. Comme vu précédemment, ce phénomène peut s'expliquer par l'écrantage des charges négatives qui entraîne une réduction du volume hydrodynamique. A partir d'une certaine concentration en sel, l'écrantage des charges est total et le comportement en écoulement n'évolue plus. Néanmoins, dans le régime semi – dilué enchevêtré, Whitcom et al.⁷³ observent l'effet inverse avec une augmentation de la viscosité avec la force ionique. Ils en concluent que du fait de

l'écrantage des charges, des interactions non covalentes sont favorisées et le réseau intermoléculaire renforcé.

1.3.3. Propriétés viscoélastiques

De façon similaire aux parties précédentes, les propriétés viscoélastiques du xanthane dépendent de nombreux paramètres, notamment la température, la force ionique et la concentration en polymère.

○ Impact de la température

Choppe et al.²⁶ ont étudié le comportement rhéologique d'une solution de xanthane en appliquant une sollicitation sinusoïdale. La Figure 12 a représente l'évolution des modules élastiques G' et visqueux G'' en fonction de la fréquence f pour une solution de xanthane à 10 g/L et pour des températures allant de 5 à 90 °C.

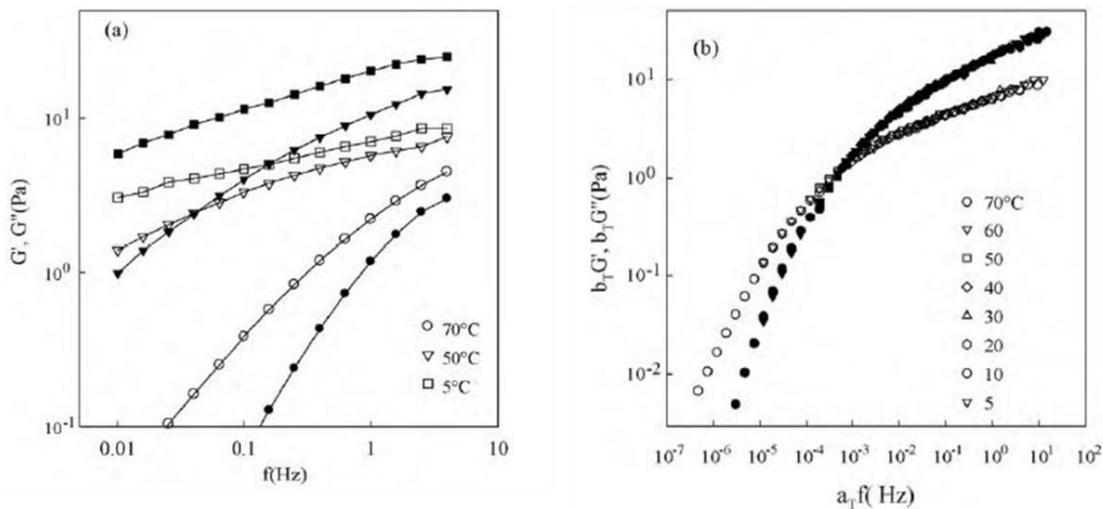


Figure 12 : (a) Evolution des modules élastiques G' (symboles pleins) et visqueux (symboles ouverts) en fonction de la fréquence pour une solution de xanthane à 10 g/L à différentes températures. (b) Courbe maitresse fréquence – température correspondante ($T_{ref} = 20^\circ\text{C}$) (issue de Choppe et al.²⁶)

A basse température, la solution de xanthane présente un comportement de type solide avec G' supérieur à G'' sur toute la gamme de fréquence étudiée. Les valeurs des deux modules diminuent avec l'augmentation de la température. Pour une température de 50 °C, la relaxation a lieu dans le domaine de fréquence étudiée, on nomme f_r , fréquence pour laquelle les deux modules G' et G'' se croisent. En dessous de f_r , le xanthane se comporte comme un liquide viscoélastique avec $G' < G''$. La fréquence de relaxation augmente avec la température. A partir de 70 °C, G' est inférieur à G'' sur toute la gamme de fréquence étudiée, ce qui est caractéristique d'un comporte de type liquide de Maxwell.

A partir des données de la Figure 12 a, il est possible d'appliquer le principe d'équivalence temps – température pour construire une courbe maitresse fréquence – température, présentée en Figure 12 b. Cette technique permet de déterminer si les mécanismes de relaxation d'une solution de polymère sont identiques en fonction de la température. Le principe est le suivant : tout d'abord, il faut fixer une température de référence, notée T_{ref} . Puis, un facteur de décalage horizontal a_T et un facteur de décalage vertical b_T sont appliqués aux valeurs de fréquences et de modules obtenues pour les autres températures afin d'obtenir une superposition de toutes les courbes. Grâce à la construction de la courbe maitresse, il est possible d'avoir accès à une plus large gamme de fréquence que celle obtenue expérimentalement.

Comme illustré par la Figure 12 b, à haute fréquence et basse température, le xanthane possède un comportement de type gel faible avec G' supérieur à G'' et une faible dépendance en fréquence des modules. A basse fréquence et haute température, G' est inférieur à G'' ce qui est caractéristique d'un liquide viscoélastique.

D'autres auteurs comme Pelletier et al.³⁸ ou Rochefort et al.⁴⁵ ont étudié les propriétés viscoélastiques du xanthane en présence de sel et ont obtenu des courbes maitresses similaires à celle obtenue par Choppe et al.²⁶.

En l'absence de sel, Rochefort et al.⁴⁵ ont constaté que les courbes ne se superposent plus à partir de 60°C. Ils expliquent ces observations par la transition ordre – désordre qui entraîne une modification de la structure en solution et donc des mécanismes de relaxation. Néanmoins, ces auteurs ont fait varier b_T selon la température absolue, en accord avec le modèle de l'élasticité caoutchoutique, une hypothèse peu probable dans le cas du xanthane.

A l'inverse, Pelletier et al.³⁸, Choppe et al.²⁶ ou encore Renou et al.⁷⁴ sont capables de construire la courbe maitresse sur toute la gamme de température étudiée que le xanthane soit ordonné ou désordonné. Pour ces auteurs, les deux conformations sont donc régies par les mêmes mécanismes de relaxation.

- Impact de la concentration en polymère

La concentration de la solution de xanthane, et notamment les régimes de concentration, impacte fortement les propriétés viscoélastiques, comme illustré par la Figure 13.

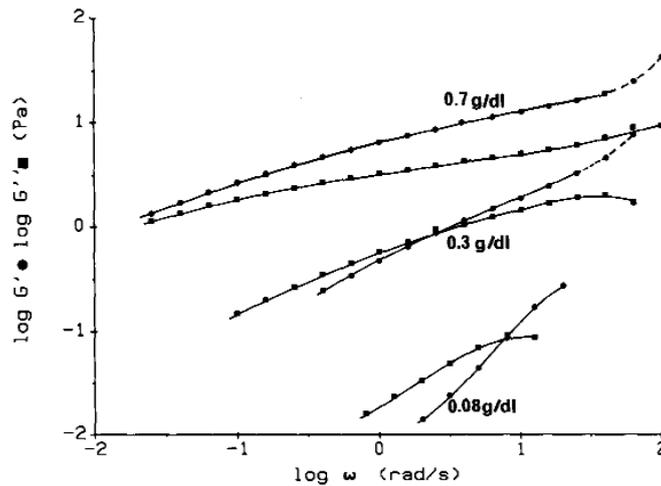


Figure 13 : Evolution des modules G' et G'' pour des solutions de xanthanes à différentes concentrations (issue de Cuvelier et al.⁶¹)

Pour des concentrations inférieures à C^* , le xanthane se comporte comme un liquide viscoélastique ($G' < G''$) sur toute la gamme de fréquence étudiée. Lorsque la concentration augmente, la fréquence de relaxation se décale progressivement vers de plus basses fréquences.

Pour ces études, il est possible de construire des courbes maitresses fréquence – concentration comme présenté en Figure 14. Notamment, Cuvelier et al.⁶¹ observent une dépendance en concentration de la fréquence de relaxation différente selon les régimes de concentration.

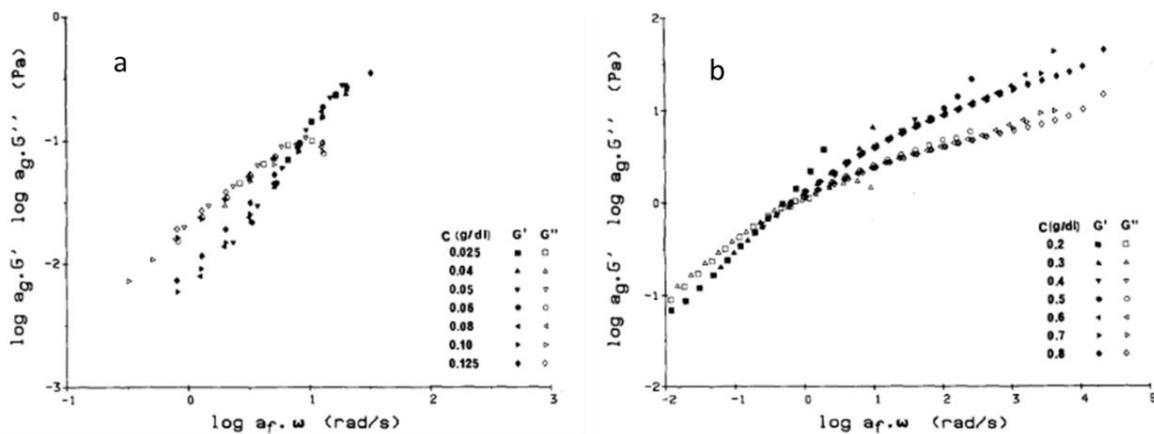


Figure 14 : Courbe maitresse fréquence – concentration du xanthane (a) pour $C < C^{**}$ et $C_{ref} = 0,8$ g/L (b) pour $C > C^{**}$ et $C_{ref} = 4$ g/L (issue de Cuvelier et al.⁶¹)

Sur la Figure 14 a, on observe pour $C < C^*$ soit pour le régime dilué et semi – dilué enchevêtré que G' est inférieur à G'' sur presque toute la gamme de fréquence étudiée. Des résultats similaires ont été obtenus par Wyatt et al.⁶³.

Pour $C > C^{**}$ et comme illustré par la Figure 14 b, le comportement de la solution de xanthane passe de gel faible aux hautes fréquences à liquide viscoélastique aux basses fréquences.

- Courbe maîtresse fréquence – température - concentration

A partir des deux parties précédentes, il est possible de construire une courbe maîtresse fréquence – température – concentration²⁶, comme illustré par la Figure 15.

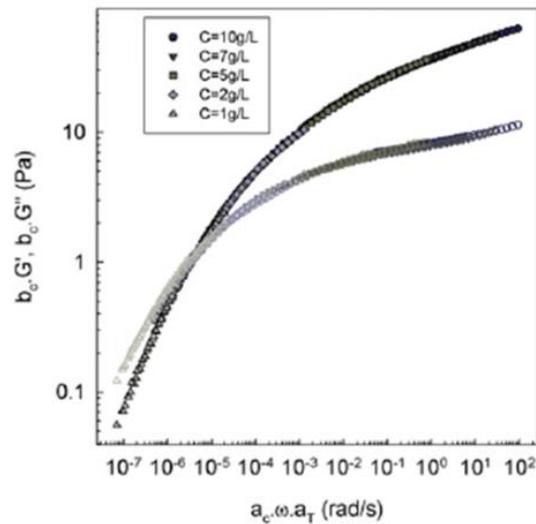


Figure 15 : Courbe maîtresse fréquence-température-concentration avec $C_{ref} = 10 \text{ g/L}$ et $T_{ref} = 20^\circ\text{C}$
(issue de Renou et al.⁷⁴)

Dans le cas du xanthane, une très bonne superposition est obtenue et on retrouve le comportement de type gel faible à haute fréquences et de liquide visqueux à basse fréquences.

Ainsi, il est possible de conclure que les mécanismes de relaxation sont indépendants de la température et de la concentration de la solution de xanthane.

Conclusion de la partie

Le xanthane est un hétéropolysaccharide hydrophile dont la particularité est de pouvoir adopter deux conformations différentes en solution aqueuse. Ainsi, les chaînes passent d'une forme hélicoïdale rigide à basse température et haute force ionique, à une conformation de type pelote statistique à haute température et/ou faible force ionique.

La transition ordre – désordre est réversible et dépend de nombreux paramètres tels que la nature l'échantillon utilisé (condition de fermentation et traitement de post fermentation, structure chimique notamment la masse molaire ou le taux d'acétate et de pyruvate) ou encore des conditions opératoires (température, force ionique, pH et concentration).

A ce jour et du fait des nombreuses données contradictoires de la littérature, il n'est pas possible de d'affirmer si les formes ordonnées du xanthane (native et renaturée) consistent en une simple ou une double hélice. Selon Morris⁵⁸, ces deux possibilités sont envisageables. Ainsi, la structure secondaire du xanthane dépend des conditions expérimentales lors de la renaturation.

Tout comme pour la conformation, les propriétés rhéologiques du xanthane dépendent de la concentration, de la température ainsi que de force ionique.

Le xanthane est caractérisé par une viscosité intrinsèque élevée et un comportement fortement rhéofluidifiant, ce qui explique ses nombreuses applications industrielles en tant qu'agent épaississant ou encore de texture.

Les propriétés viscoélastiques du xanthane évoluent en fonction de la température. En effet, le xanthane passe d'un comportement de gel faible à liquide viscoélastique avec l'augmentation de la température. La construction de courbe maitresse, reposant sur le principe de superposition temps-température, est alors possible. Une telle construction indique que les processus de relaxation au sein des chaînes sont identiques d'une température à l'autre mais également pour les deux conformations.

Du fait de ces nombreux paramètres influençant sa structure chimique et donc sa conformation et ses propriétés en solution, les études sur le xanthane présentent un inconvénient majeur lié au manque de reproductibilité d'un échantillon à l'autre.

Partie 2 : Polymères amphiphiles

2.1. Définition, structure et application

Les polymères amphiphiles se définissent comme l'association, au sein d'une même macromolécule, d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe, possédant la capacité de s'auto-organiser spontanément en milieux aqueux par des interactions inter et/ou intramoléculaires entre les groupements hydrophobes. En effet, en solution aqueuse, les groupements hydrophobes se rassemblent pour diminuer leur surface de contact avec le solvant *via* des interactions physiques telles que des liaisons hydrogènes, hydrophobes ou encore ioniques. De ce fait, les polymères amphiphiles appartiennent à la classe des polymères associatifs. La Figure 16 présente un exemple d'association des polymères amphiphiles en solution et notamment dans ce cas, la formation de microdomaines hydrophobes.

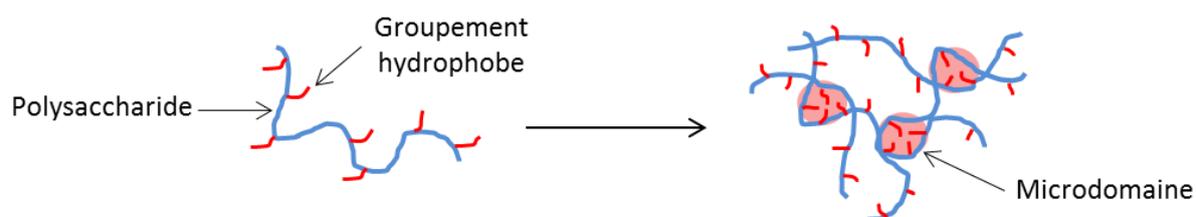


Figure 16 : Exemple d'association des polymères amphiphiles en solution

Ces polymères possèdent en solution une organisation de leurs chaînes bien différentes des polymères non associatifs et cela se traduit par des propriétés viscosifiantes et épaississantes supérieures au-delà d'une certaine concentration seuil⁷⁵. Ces propriétés seront détaillées dans le paragraphe 2.2. de cette partie.

Les polymères amphiphiles sont le plus souvent des copolymères, obtenus à partir de la combinaison de blocs de polymères hydrophiles et hydrophobes soit par polymérisation^{76,77} (en chaîne ou par étapes) soit par modification chimique d'un squelette initial^{78,79}. La synthèse de copolymères amphiphiles, possédant des architectures variables en fonction notamment de la nature des polymères et de leur masse molaire, permet de moduler les propriétés physico-chimiques finales en solution.

L'architecture macromoléculaire de cette classe de polymères est très diversifiée. Néanmoins, il est possible de les classer en deux catégories, comme illustré par la Figure 17.

- Les copolymères à blocs⁸⁰ qui sont des polymères constitués de blocs hydrophiles et de blocs hydrophobes. Plus particulièrement, on distingue les polymères téléchéliques qui sont composés

d'une chaîne principale hydrophile qui est fonctionnalisée à chacune de ses extrémités par des groupements hydrophobes, ou inversement avec une chaîne hydrophobe possédant deux groupements hydrophiles aux extrémités. Il s'agit principalement de dérivés du polyoxyéthylène⁸¹.

○ Les polymères associatifs de type « peigne » qui comportent un squelette hydrophile porteur de groupements hydrophobes latéraux répartis plus ou moins statistiquement le long du squelette⁸². On parle également de copolymères greffés. La répartition des groupements hydrophobes peut être statistique, en blocs ou encore séparés de la chaîne principale par des espaceurs (voir la Figure 17).

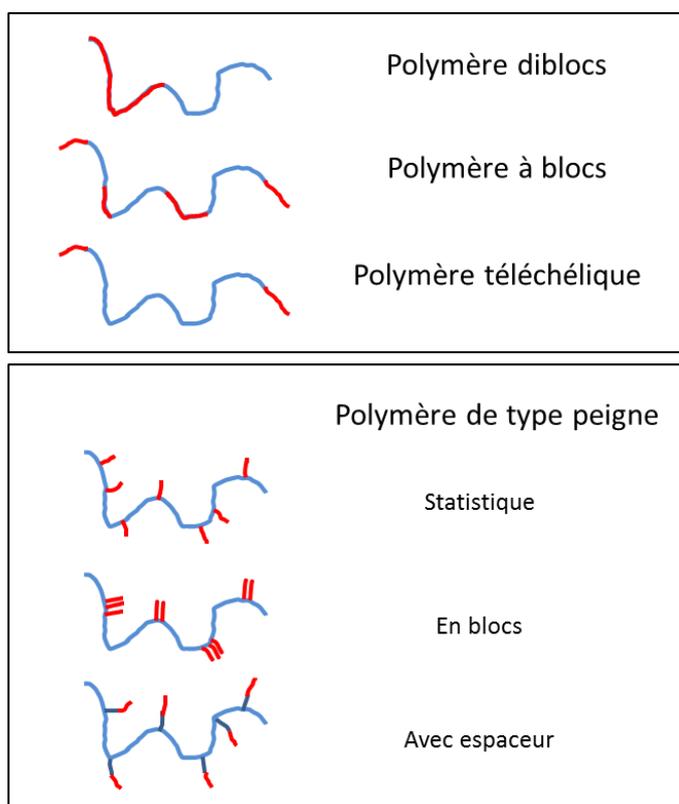


Figure 17 : Représentation schématique des différents types de polymères associatifs (adaptée de Winnik⁸³)

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons aux polymères amphiphiles de type « peigne ». Dans ce qui suit, nous utiliserons la notion de densité (ou taux) de greffage ou encore degré de substitution (D_s) indiquant le nombre de greffons hydrophobes fixés sur la chaîne, par unité de répétition, ainsi que de précurseur pour désigner le polymère initial sans les groupements hydrophobes.

Pour ces derniers, les groupements hydrophobes sont le plus souvent des chaînes carbonées (hydrogénées⁸⁴ ou fluorées⁸⁵) sous la forme ramifiée, linéaire, cyclique ou aromatique.

Le squelette hydrophile est constitué d'un polymère hydrosoluble, pouvant être d'origine naturelle ou synthétique. De plus, certains ont un caractère neutre⁸⁶, anionique⁸⁷ ou encore cationique⁸⁸. La présence de groupements fonctionnels tels que des groupements acide carboxylique ou hydroxyle fait de ces polymères de bons candidats pour obtenir des polymères amphiphiles.

Du fait de leur grande diversité de structure et d'architecture, les polymères amphiphiles suscitent l'intérêt pour de nombreuses applications à visée industrielle. Cet intérêt s'avère d'autant plus marqué pour les polysaccharides qui offrent l'avantage d'être biocompatibles, biodégradables et issus de ressources renouvelables.

Dans les années 1980, Landoll⁸⁹ fut le premier auteur à étudier les propriétés d'une série de dérivés de polysaccharides neutres obtenus par greffage des chaînes époxyde alkylées sur un squelette cellulosique. A la suite de ce travail pionnier, la cellulose^{90,91} mais également d'autres polysaccharides ont été modifiés chimiquement afin de leur conférer des propriétés amphiphiles tels que l'alginate^{78,92,93}, le chitosan^{79,94}, le pullulane^{84,88} ou encore le dextrane^{86,95}.

Les principales applications des polysaccharides amphiphiles concernent le domaine pharmaceutique et biomédical. En effet, ils sont largement utilisés pour l'encapsulation et la libération contrôlée de substances actives^{93,96,97}. Ces polysaccharides trouvent également des applications en formulation, notamment pour leurs propriétés épaississantes, émulsifiantes et de stabilisation des interfaces eau/huile^{86,98,99}. Enfin, ils peuvent être utilisés pour le traitement des eaux polluées par concentration des substances organiques hydrophobes¹⁰⁰ ou encore pour la récupération assistée du pétrole¹⁰¹.

2.2. Propriétés en solution

1.3.1 Régime de concentration

Tout comme décrit précédemment dans le cas du xanthane, le comportement en solution des polymères amphiphiles est régi par leur concentration ainsi que leur masse molaire. En effet, les polymères amphiphiles de masse molaire élevée présentent trois régimes de concentration : un régime dilué, un régime semi-dilué non enchevêtré et enchevêtré puis un régime concentré. Néanmoins, la présence des groupements hydrophobes, qui induisent des interactions intra et/ou intermoléculaires, impacte fortement l'organisation des chaînes en solution.

En régime dilué, des études^{95,102} ont montré que la viscosité intrinsèque d'un polymère modifié hydrophobiquement peut être inférieure à celle du précurseur en raison de la présence d'agrégats constitués majoritairement d'une seule chaîne repliée sur elle-même. Ainsi, cela met en évidence

que les associations entre les groupements hydrophobes se font au sein d'une même chaîne, soit par des interactions intramoléculaires.

L'augmentation de la concentration en polymère induit une diminution de la distance entre les chaînes. Cette diminution est alors en faveur des interactions intermoléculaires qui deviennent prépondérantes par rapport aux interactions intramoléculaires. Le passage du régime dilué au régime semi-dilué non enchevêtré est alors défini par la concentration critique d'agrégation critique, notée CAC, correspondant à la concentration pour laquelle on constate la formation d'agrégats formés de plusieurs chaînes reliées entre elles par des microdomaines hydrophobes. La valeur de la CAC est généralement inférieure à celle de C^* pour des polymères similaires non amphiphiles.

A partir de la CAC, la viscosité de la solution de polymère amphiphile est généralement supérieure à celle du précurseur^{103,104}. Ce phénomène peut s'expliquer du fait des interactions intermoléculaires qui agissent comme des nœuds de réticulation temporaires et ralentissent le mouvement des chaînes.

Guo et al.¹⁰⁵ ont étudié l'évolution de la viscosité newtonienne η_0 de solutions de poly(acide acrylique) en fonction de la concentration et plus particulièrement en fonction de l'hydrophobie de la chaîne modifiée. Les résultats sont présentés en Figure 18. Ces auteurs montrent que la CAC diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne greffée. En effet, plus la chaîne greffée sur le polymère est longue, plus le volume hydrodynamique sera important. Par conséquent, les interactions intermoléculaires apparaissent à de plus faibles concentrations.

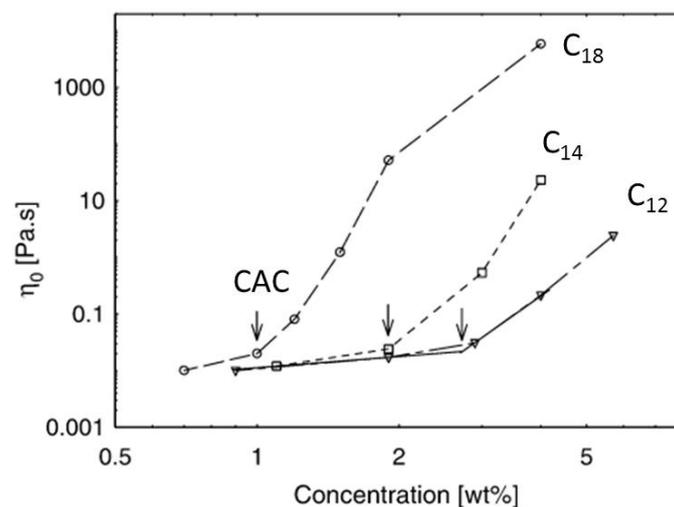


Figure 18 : Evolution de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration pour des poly(acide acrylique) greffés avec différentes longueurs de chaînes alkyles (issue de Guo et al.¹⁰⁵)

Si la concentration continue d'augmenter, les polymères amphiphiles présentent également un régime semi-dilué enchevêtré puis un régime concentré, pour lesquels les associations sont

principalement intermoléculaires. La viscosité augmente fortement avec la concentration mais avec une dépendance en concentration plus faible que le régime précédent.

1.3.2. Propriétés viscosimétriques

o Courbe d'écoulement

En fonction du régime de concentration, la contribution des interactions entre les chaînes, qu'elles soient inter et/ou intramoléculaires, est différente. Ainsi, les polymères amphiphiles peuvent présenter deux comportements distincts.

Pour une concentration inférieure à la concentration d'agrégation critique CAC, soit en régime dilué, le comportement du polymère associatif est de type newtonien, c'est-à-dire que la viscosité est indépendante du cisaillement.

En revanche, lorsque la concentration est supérieure à la CAC, les interactions entre les greffons hydrophobes ne sont plus négligeables et la viscosité n'est plus indépendante de la vitesse de cisaillement.

Sinquin et al.¹⁰⁶ ont mis en évidence ce phénomène en étudiant l'effet de l'augmentation de la concentration sur les propriétés en écoulement de solutions de dérivés d'alginate greffés par des chaînes dodécyles (C₁₂), comme illustré par la Figure 19.

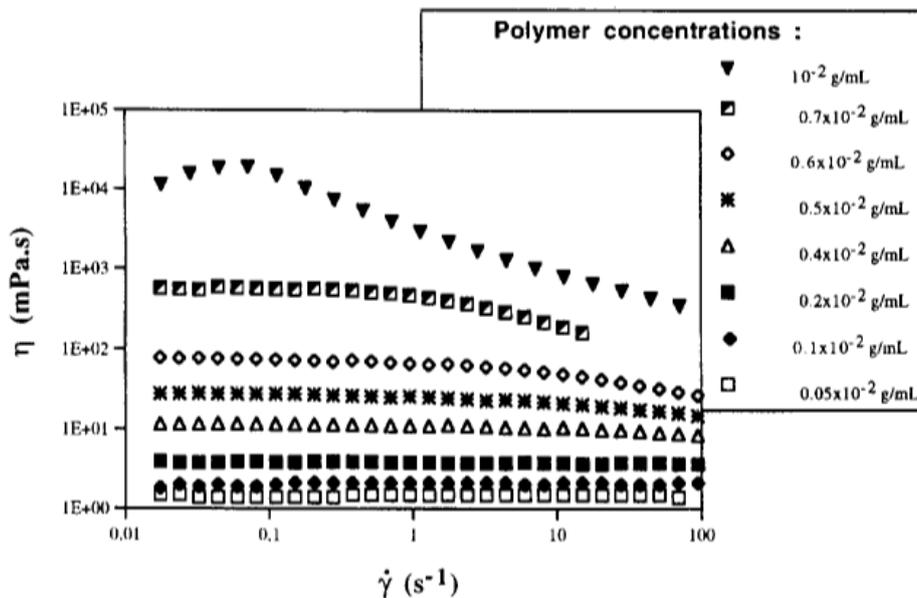


Figure 19 : Influence de la concentration sur les propriétés en écoulement d'un polymère amphiphile (issue de Sinquin et al.¹⁰⁶)

Pour des concentrations comprises entre 0,05*10⁻² et 0,4*10⁻² g/mL, les solutions d'alginate modifié présentent un comportement newtonien sur toute la gamme de vitesse de cisaillement étudiée.

Lorsque la concentration atteint $0,5 \cdot 10^{-2}$ g/mL, on observe toujours le plateau newtonien aux faibles cisaillements mais celui-ci est suivi d'une zone légèrement rhéofluidifiante à plus haut cisaillement. Ce phénomène peut s'expliquer par la rupture des associations hydrophobes sous l'effet du cisaillement, induisant l'alignement des chaînes dans le sens de l'écoulement. Le caractère rhéofluidifiant s'accroît avec l'augmentation de la concentration.

Pour 0,01 g/mL, une zone de rhéoépaississement est observée entre le plateau newtonien et la zone de rhéofluidification, c'est-à-dire que la viscosité augmente avec le cisaillement. Cette augmentation est généralement expliquée par une réorganisation des groupements hydrophobes au sein des agrégats en faveur des interactions intermoléculaires¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

- Paramètres influençant les propriétés viscosimétriques

Outre la concentration, le comportement en solution des polymères amphiphiles peut dépendre de divers paramètres comme la nature et le degré de substitution en groupements hydrophobes, la force ionique et la température. L'impact de ces différents paramètres va être discuté dans ce paragraphe.

Plusieurs auteurs comme Desbrières¹⁰⁹, Colinet et al.¹⁰³ ou encore Durand et al.⁹⁵ se sont intéressés à l'étude des propriétés viscosimétriques des polysaccharides amphiphiles.

Dans la littérature, il est admis que la concentration d'agrégation critique CAC diminue lorsque la longueur de la chaîne greffée ou la densité de greffage augmente, comme observé sur la Figure 18. En effet, une hydrophobie importante sera en faveur des interactions intermoléculaires.

Les polymères amphiphiles présentent un comportement rhéologique particulier à partir d'une densité de greffage minimale, celle-ci étant dépendante de la longueur de la chaîne hydrophobe. Dans le cas du chitosane, Desbrières et al.⁷⁹ ont montré qu'une chaîne alkyle linéaire possédant au minimum 6 carbones est nécessaire pour observer des propriétés associatives. En revanche, il existe également une densité de greffage maximale au-dessus de laquelle le polymère amphiphile est insoluble dans l'eau.

La concentration en sel impacte également fortement les propriétés viscosimétriques des polymères amphiphiles en solution. On distingue alors le cas des polymères amphiphiles non chargés des polyelectrolytes associatifs.

Pour les polymères amphiphiles non chargés, l'augmentation de la force ionique favorise les interactions hydrophobes par un effet de « salting out »^{110,111}, c'est-à-dire que cette augmentation diminue la solubilité du polymère dans l'eau, entraînant ainsi un renforcement des propriétés associatives. Néanmoins, en fonction du régime de concentration, cette augmentation ne favorise pas le même type d'interaction. En effet, pour $C < CAC$, on observe un renforcement des interactions

intramoléculaires. Par conséquent, les chaînes se replient sur elles-mêmes ce qui se traduit par une réduction du volume hydrodynamique et donc de la viscosité intrinsèque¹¹¹. Pour $C > CAC$, ce sont les interactions intermoléculaires qui sont favorisées. Cette fois-ci, une augmentation de la viscosité de la solution est alors observée¹¹⁰.

Une concentration trop élevée en sel peut également rendre le polymère insoluble et donc entraîner une séparation de phase.

Dans le cas des polyelectrolytes associatifs, une augmentation ou une diminution de la viscosité est constatée en fonction de la concentration en sel dans le milieu^{104,112}. Pour de faibles concentrations, la présence de sel induit un écrantage des sites chargés, ce qui conduit à une contraction des chaînes polymères et donc une diminution de la viscosité. À l'inverse, pour de fortes forces ioniques, les interactions hydrophobes sont renforcées ce qui entraîne la formation d'enchevêtrement intermoléculaire et donc une augmentation de la viscosité.

Un autre paramètre ayant un impact important sur les propriétés viscosimétriques est la température. Dans la littérature, l'effet de la température sur ces dernières est encore sujet à débat. En effet, les polymères amphiphiles présentent soit une hausse^{95,110}, soit une diminution^{104,113-115} de leur viscosité avec l'augmentation de la température.

Pour certains auteurs^{95,110}, l'augmentation de la température est favorable aux interactions hydrophobes. McCormick et al.¹¹⁰ ont étudié le comportement de solutions de polyacrylamide greffé par des chaînes alkyles lors que la température passe de 25 à 55°C et concluent à un renforcement des associations intermoléculaires dû à la nature entropique des interactions hydrophobes. Pour Durand⁹⁵, l'augmentation de la température affaiblit les liaisons hydrogènes responsables de la solubilisation du polymère, renforçant ainsi les interactions hydrophobes. L'évolution de la viscosité est alors fonction du régime de concentration et donc du caractère intra et/ou intermoléculaire des interactions. Si les interactions sont majoritairement intramoléculaires, l'augmentation de la température entraîne une viscosité intrinsèque plus faible, et inversement pour les interactions intermoléculaires.

À l'inverse, d'autres auteurs^{104,114} considèrent que l'augmentation de la température n'est pas en faveur des interactions hydrophobes. Biggs et al.¹¹⁴ ont étudié des solutions de polyacrylamides amphiphiles et ont constaté une diminution de la viscosité avec l'augmentation de la température. Ces auteurs attribuent cette diminution à la rupture des liaisons hydrophobes sous l'effet de la chaleur et ont confirmé cette hypothèse par des analyses de fluorescence.

Kujawa et al.¹⁰⁴ ont obtenu des résultats similaires pour leurs dérivés d'acrylamides mais ces auteurs l'associent à une diminution de la durée de vie des nœuds de réticulation. L'augmentation de la

température augmente la vitesse de sortie des groupements hors de leurs microdomaines (temps de relaxation).

1.3.3. Propriétés viscoélastiques

Les polymères amphiphiles présentent également des propriétés viscoélastiques différentes de leurs homologues non greffés.

Par exemple, Vallée et al.¹¹⁶ ont étudié l'évolution des modules élastiques G' et visqueux G'' en fonction de la fréquence pour des dérivés d'alginate porteurs de chaînes dodécyles avec différents degrés de substitution allant de 3 à 20 % (voir la Figure 20).

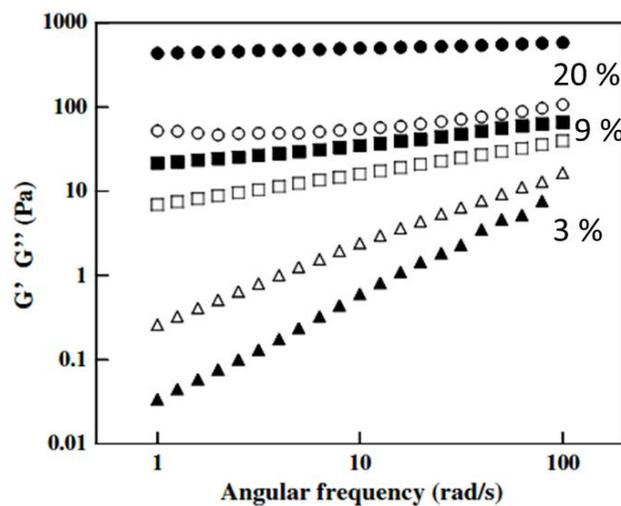


Figure 20 : Evolution de G' (symboles pleins) et de G'' (symboles ouverts) en fonction de la fréquence pour des alginate amphiphiles avec différents degré de substitution (issue de Vallée et al.¹¹⁶)

Pour un faible degré de substitution (3 %), l'alginate modifié hydrophobiquement présente un comportement de type liquide viscoélastique avec G' inférieur à G'' sur toute la gamme de fréquence étudiée.

L'augmentation de la densité de greffage entraîne une augmentation de plus en plus marquée de la valeur des modules. Plus particulièrement, dès que l'on atteint un degré de substitution de 9 %, on observe que G' est supérieur à G'' et que les deux modules ont une faible dépendance en fréquence. Les alginate les plus greffés ont donc un comportement rhéologique typique d'un gel et aucune relaxation de la chaîne n'est observée dans la gamme de fréquences étudiée. Hourdet et al.¹¹⁵ ont observé un comportement similaire avec l'augmentation de la température pour des polyacrylates modifiés hydrophobiquement par des chaînes alkyles.

Ces propriétés viscoélastiques particulières peuvent s'expliquer du fait de la formation d'un réseau transitoire régit par des interactions intermoléculaires et dont les microdomaines hydrophobes

résultant agissent comme des nœuds de réticulation temporaire. En effet, si la durée de vie des nœuds de réticulation est supérieure au temps de l'analyse, un comportement de gel sera observé. La transition du comportement de liquide à solide peut alors être décrite par un mécanisme de percolation^{117,118}.

Deux modèles existent pour décrire des propriétés rhéologiques des polymères associatifs pour des concentrations supérieures à la concentration d'agrégation critique selon la présence ou non d'enchevêtrements.

Dans le cas des polymères amphiphiles flexibles en régime non enchevêtré, c'est le modèle de Rouse collant^{119,120} (ou « sticky Rouse model ») qui s'applique. Celui-ci repose sur le principe que les groupements hydrophobes sont équivalents à des « points collants » ou « stickers » équidistants les uns des autres le long de la chaîne polymère et s'associant uniquement par paire. Dans le cadre de ce manuscrit, ce modèle ne sera pas détaillé.

Le modèle de Rouse collant n'est pas applicable dans le régime enchevêtré du fait que dans ce régime la dynamique du système est régie par la présence des microdomaines hydrophobes ainsi que par des enchevêtrements topologiques. Ainsi, un modèle combinant la théorie de la reptation, utilisée dans le cas des polymères enchevêtrés non associatifs, et celle de Rouse collant a été développé par Leibler et al.¹²¹ : le modèle de la reptation collante.

Le modèle de la reptation, développé par De Gennes¹²², propose que les chaînes de polymères sont confinées dans un tube dont le diamètre est délimité par les enchevêtrements de la chaîne avec les chaînes voisines, comme illustré par la Figure 21. Afin de se déplacer, les mouvements latéraux étant limités par les parois du tube, la chaîne réalise un mouvement de reptation à l'intérieur du tube.

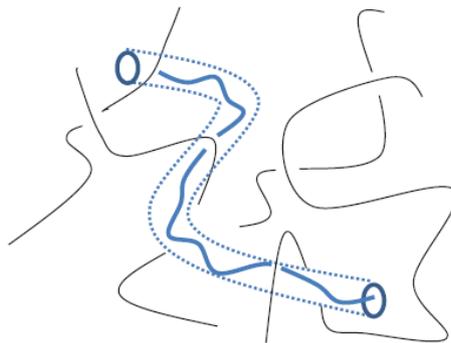


Figure 21 : Représentation schématique du tube de reptation (issue de Covin¹²³)

Pour les polymères associatifs en régime enchevêtré, la chaîne obéit à une dynamique de type Rouse collante mais dans un tube limité par des enchevêtrements. La présence des stickers ralentit la reptation de la chaîne hors du tube.

Le processus de relaxation est alors défini par trois temps caractéristiques : τ_e le temps de relaxation des segments de chaîne entre enchevêtrements (dynamique de Rouse), τ la durée des interactions entre les stickers et τ_d le temps de reptation, correspondant au temps nécessaire à la chaîne pour sortir du tube. T_d^0 correspond au temps de reptation pour des polymères non associatifs.

En fonction du temps t , quatre régimes différents sont alors observés¹²¹ et présentés en Figure 22.

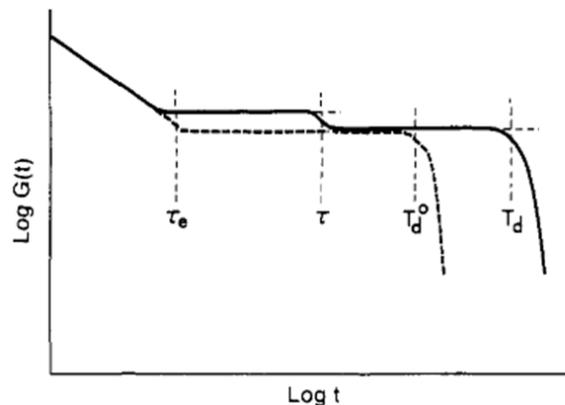


Figure 22 : Comportement viscoélastique des polymères associatifs (trait plein) et non associatifs (trait pointillé) (issue de Leibler et al.¹²¹)

Pour $t < \tau_e$, il y a relaxation des segments de chaîne entre enchevêtrements uniquement, sans influence des stickers. La dynamique de relaxation est donc similaire au précurseur.

Pour $\tau_e < t < \tau$, le temps n'est pas suffisamment long pour permettre aux stickers de se libérer des microdomaines hydrophobes. La relaxation des chaînes polymères est alors caractérisée par un plateau caoutchoutique, comparable au précurseur. Néanmoins, du fait de la contribution des microdomaines et des enchevêtrements, les valeurs des modules sont plus élevées.

Pour $\tau < t < \tau_d$, un second plateau caoutchoutique est observé et les modules sont identiques pour des polymères associatifs ou non. Cependant, ce plateau est plus court dans le cas de ces derniers. Ce comportement est dû à la relaxation des stickers dans les microdomaines. A ce stade, seuls les enchevêtrements continuent de ralentir la dynamique de la chaîne.

Et enfin, pour $t > \tau_d$, les chaînes du polymère sont libérées du tube et glissent les unes par rapport aux autres, cela se traduit par un comportement de liquide visqueux.

Ainsi, en raison de ces propriétés particulières et inédites en solution, les polymères amphiphiles associatifs se distinguent de leurs homologues non greffés. De plus, leur caractère amphiphile permet également d'obtenir des propriétés intéressantes aux interfaces. Ce point sera détaillé dans la Partie 3.

3.3. Modification chimique du xanthane

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons plus particulièrement au cas du xanthane. Ainsi, cette sous partie présente quelques exemples de modifications chimiques du xanthane.

Comme vu dans la Partie 1, le xanthane possède en solution aqueuse des propriétés rhéologiques inédites, notamment un important pouvoir épaississant et un caractère fortement rhéofluidifiant. Plusieurs auteurs se sont intéressés à la modification chimique du xanthane dans l'objectif de pouvoir améliorer ses propriétés en solution ou de lui en conférer de nouvelles, permettant ainsi d'élargir la gamme de ses applications.

Afin de modifier chimiquement le xanthane, différentes voies sont envisageables et peuvent consister à faire varier les taux en acétate et pyruvate^{43,124}, supprimer une partie de la chaîne latérale ou greffer d'autres composés sur les fonctions hydroxyle¹²⁵⁻¹²⁷ ou acide carboxylique^{128,129} afin de moduler ses propriétés, principalement rhéologiques. Par exemple, Su et al.¹³⁰ ont fait réagir le xanthane avec du formaldéhyde afin de réduire les interactions intermoléculaires et ainsi améliorer le temps de dissolution en solution aqueuse.

Ici, nous nous intéressons à la modification du xanthane par greffage de nouvelles fonctions qui, de par leur nature particulière, permettent d'apporter directement de nouvelles propriétés.

La majorité des publications sur la modification chimique du xanthane ciblent comme site de greffage les fonctions hydroxyle du polymère, notamment pour réticuler le polymère et créer des hydrogels^{131,132}.

Peu de travaux concernent la modification chimique du xanthane au niveau de ses fonctions acide carboxylique. Étant moins nombreuses que les fonctions hydroxyle, ces fonctions permettent un meilleur contrôle de la régiosélectivité de la réaction. De plus, selon la fonction résultante de la modification, le nombre de liaisons hydrogènes potentielles n'est pas affecté permettant ainsi de maintenir la capacité du xanthane à s'ordonner.

Dans la littérature, quelques auteurs se sont intéressés à ces sites de greffage¹³³. Tout d'abord, Bejenariu et al.¹³⁵ ont modifié le xanthane par couplage peptidique dans des conditions de synthèse telles que le polymère soit sous sa forme ordonnée pour obtenir un hydrogel qui pourrait avoir des applications thérapeutiques.

Puis, Arimura et al.¹³⁴ ont décrit une synthèse chimio-enzymatique du xanthane permettant de greffer de l'amylose. Le polymère ainsi obtenu présente la capacité de former un gel physique dans un liquide ionique et dans l'eau avec une amélioration du caractère élastique.

Mendes et al.¹²⁹ se sont aussi assurés du maintien de la conformation hélicoïdale du xanthane, par dichroïsme circulaire, avant et après modification. Ils ont obtenu un polymère amphiphile par

couplage peptidique en présence de carbodiimide, capable de s'auto-assembler en conditions aqueuses douces.

Plus récemment, Roy et al.¹³⁶ ont développé un protocole permettant de greffer l'octylamine sur les fonctions acide carboxylique du xanthane sous forme ordonnée *via* une réaction de couplage peptique. L'agent de couplage utilisé est un carbodiimide, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) couplé d'un co-agent de couplage, le *N*-Hydroxysuccinimide (NHS). La conformation hélicoïdale de ces dérivés, stabilisée par liaisons hydrogène, s'avère renforcée par la modification chimique et de plus, la dynamique de relaxation est fortement ralentie par la présence des chaînons hydrophobes. Contrairement aux polysaccharides amphiphiles flexibles, la rigidité de la chaîne empêche son repliement sur elle-même pour former des microdomaines hydrophobes. Par cette méthode de modification, les xanthanes amphiphiles obtenus ne présentent pas de caractère associatif.

Par une réaction de couplage peptique utilisant les mêmes agents de couplage, Laffleur et al.¹³⁷ ont greffé la L-cystéine *via* la formation d'une liaison amide. Les dérivés obtenus sont non toxiques et attestent de propriétés intéressantes pour des applications pharmaceutiques.

Quelques auteurs se sont donc intéressés à la modification chimique du xanthane sous sa forme ordonnée en ciblant les fonctions acide carboxylique comme site de greffage. En revanche, à notre connaissance, la modification du xanthane sous forme désordonnée ainsi que l'impact de la conformation sur l'accessibilité des deux fonctions acide carboxylique du xanthane n'ont pas été étudiés. De plus, les caractérisations des dérivés obtenus au niveau de leur conformation et de leurs propriétés en solution n'ont, à ce jour, pas été décrites dans la littérature.

Conclusion de la partie

Depuis les années 1980 et les travaux de Landoll⁸⁹, les polysaccharides amphiphiles ont été largement étudiés du fait de leur abondance, de leur caractère biocompatible et souvent biodégradable mais également pour leurs propriétés en solution. En effet, grâce à la modification chimique, ces dérivés sont composés d'un squelette hydrophile sur lequel sont greffés des groupements hydrophobes. Ce caractère amphiphile leur apporte des propriétés physico-chimiques particulières qui sont dues d'un côté à leur capacité d'auto-organisation en solution aqueuse et de l'autre côté à leurs propriétés d'adsorption aux interfaces eau/huile. Cet aspect sera discuté dans la partie suivante.

Partie 3 : Emulsions

3.1. Définition

Une émulsion est définie comme une dispersion d'un liquide en fines gouttelettes (phase dispersée) dans un autre liquide (phase continue), les deux liquides étant non miscibles. Les émulsions appartiennent aux systèmes dispersés. Généralement, l'une des phases possède un caractère hydrophobe ou lipophile, c'est la phase huileuse ou grasse. L'autre est hydrophile, on parle alors de phase aqueuse. Il peut également s'agir de deux phases grasses ou inversement, de deux phases aqueuses.

Selon les propriétés finales recherchées, chaque phase de l'émulsion peut être complétée par d'autres composés (conservateurs, colorants, substance active ...).

3.1.1 Classification des émulsions

Les émulsions peuvent être classées en deux groupes : les émulsions simples et les émulsions multiples. Ces différentes émulsions sont représentées en Figure 23.

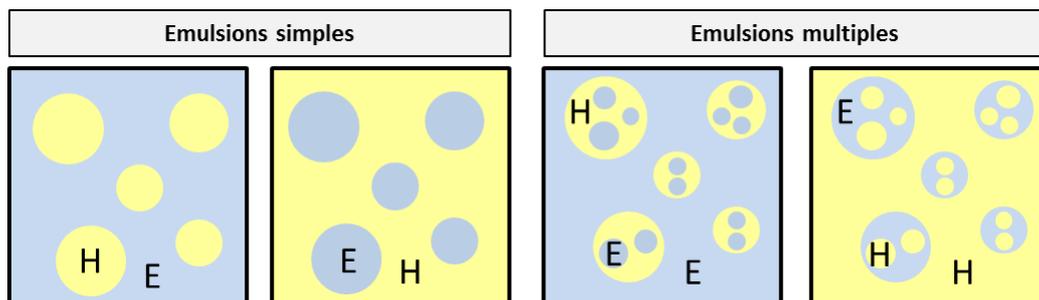


Figure 23 : Représentation des différents types d'émulsions : de gauche à droite : huile dans eau (H/E), eau dans huile (E/H), eau dans huile dans eau (E/H/E) et huile dans eau dans huile (H/E/H)

Parmi les émulsions simples, il est possible de distinguer deux types :

- Les émulsions huile dans eau, notée H/E pour lesquelles la phase grasse est dispersée dans la phase aqueuse.
- Les émulsions eau dans huile, notée E/H pour lesquelles la phase aqueuse est dispersée dans la phase grasse continue. Elles sont également appelées émulsions inverses.

L'aspect de ces émulsions est souvent similaire. Elles diffèrent cependant par leurs propriétés sensorielles (brillance, toucher gras ...).

Les émulsions multiples sont des systèmes plus complexes de type H/E/H ou E/H/E. Pour cette dernière, l'émulsion est composée de gouttelettes de phase aqueuse, contenues dans des gouttelettes de phase grasse, elles-mêmes dispersées dans une phase aqueuse continue¹³⁸. Chaque

phase peut contenir des composants différents. Ce type d'émulsion permet par exemple de combiner deux principes actifs incompatibles. Elles sont principalement utilisées pour des applications cosmétiques ou pharmaceutiques.

Les émulsions peuvent également être classées en sous-catégories en fonction de la taille des gouttelettes : les macroémulsions (0,1 à 100 μm , de couleur blanche) et les nanoémulsions (20 à 200 nm, transparente à trouble). Les microémulsions (10 à 100 nm, transparente) appartiennent à une autre catégorie puisque ces émulsions sont thermodynamiquement stables.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons uniquement à des macroémulsions simples de type H/E.

De nombreux produits finis utilisés dans nos vies quotidiennes sont des émulsions, notamment pour des applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires ou encore dans le domaine des produits phytosanitaires. Certaines émulsions sont naturelles comme le lait, ou peuvent résulter d'un procédé comme les émulsions E/H produites lors de l'exploitation des gisements pétroliers¹³⁹.

3.1.2. Préparation d'un système dispersé

Afin de réaliser la dispersion des deux phases non miscibles, un apport d'énergie est nécessaire.

Les émulsions sont formées par un apport d'énergie mécanique fourni généralement par un système d'agitation. Cette énergie est indispensable pour déformer et rompre les gouttelettes pour en former des plus petites¹⁴⁰. Le processus d'émulsification est gouverné par les forces interfaciales. L'énergie libre de formation de gouttelettes à partir du liquide ΔG_f s'exprime de la façon suivante.

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S_c$$

Avec γ , la tension interfaciale

ΔA , l'augmentation de de l'aire interfaciale

$T \Delta S_c$, la contribution de d'entropie liée à l'augmentation du nombre de gouttelettes

De façon générale, $\gamma \Delta A \gg T \Delta S_c$ et par conséquent, l'émulsification n'est pas un processus spontané.

Il est possible de différencier deux types de forces : les contraintes mécaniques liées au mouvement de la phase continue entraînant la dissipation d'une grande partie de l'énergie sous forme de chaleur, et les forces capillaires qui induisent une différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur des gouttelettes pour maintenir la forme de celles-ci.

Cette différence de pression ΔP s'exprime par la pression de Laplace pour les systèmes sphériques.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r}$$

Avec ΔP , la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la gouttelette (en Pa)

γ , la tension interfaciale (en N.m)

r , le rayon de la gouttelette (en m)

D'après cette équation, on remarque que plus la taille des gouttelettes est faible, plus la quantité d'énergie nécessaire pour les scinder en plusieurs gouttelettes plus petites est élevée. De plus, elle met également en évidence l'intérêt d'abaisser la tension interfaciale entre les deux liquides.

Il existe différents procédés d'émulsification. Il peut s'agir une simple agitation mécanique produite par la rotation d'un mobile (hélice, rotor stator ...), d'une émulsification par membrane¹⁴¹, sous haute pression^{142,143} ou encore par ultrasons¹⁴⁴.

3.2. Stabilité des émulsions

La stabilité d'une émulsion repose sur trois aspects : la stabilité chimique (absence de réaction chimique entre les différents composants), la stabilité microbiologique (pas de développement de microorganisme) et la stabilité physique (absence de changement de structure, telle la séparation de phase). Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons à cette dernière catégorie.

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables. La notion de stabilité se limite donc à des aspects cinétiques, le but étant de retarder au maximum l'apparition des instabilités. Pendant le processus d'émulsification, l'aire interfaciale entre la phase continue et la phase dispersée est fortement augmentée par rapport au système initial. En accord avec la thermodynamique, un système tend toujours vers son état le plus stable. Dans le cas des émulsions, cet état correspond à un système où les deux phases non miscibles sont séparées car correspondant à une aire totale d'interface minimale.

L'évolution spontanée des émulsions se manifeste selon différents mécanismes comme illustrés en Figure 24.

La **floculation** est le résultat du mouvement brownien et de forces attractives entre les gouttelettes entraînant leur agrégation sous forme de flocs sans pour autant entraîner la rupture du film interfacial. L'intégrité individuelle des gouttelettes est préservée. Outre les interactions de type Van der Waals, d'autres phénomènes peuvent induire cette attractivité. Il est alors possible de distinguer deux types de floculation¹⁴⁵.

- La floculation par **pontage** est due à l'adsorption d'une même chaîne polymère de haute masse molaire sur plusieurs gouttelettes. La jonction ainsi formée est responsable de l'agrégation.
- La floculation par **déplétion**¹⁴⁶ est due à la présence de micelles ou de polymère dans la phase continue. Lorsque deux gouttelettes se rapprochent, la taille des autres molécules est trop importante pour accéder à l'espace séparant les gouttelettes. On observe alors le phénomène de déplétion, c'est-à-dire l'appauvrissement en polymère ou particules sans propriétés de surface entre deux gouttelettes, induisant une différence de pression osmotique entre cette zone et le reste de la phase continue. Ainsi, le solvant est exclu hors de cette région, entraînant l'agrégation des gouttelettes.

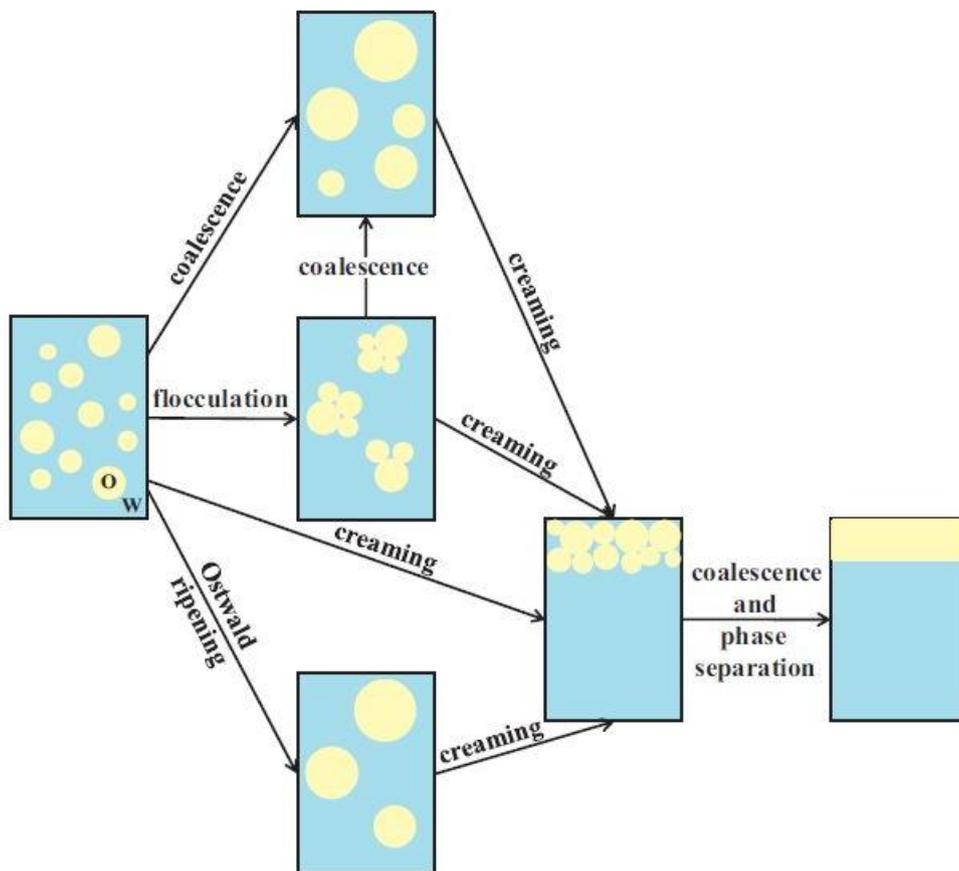


Figure 24 : Mécanismes de déstabilisation des émulsions H/E (issue de Bouyer et al. ¹⁴⁷)

Le **crémage** ou la **sédimentation** résultent d'une différence de densité entre la phase continue et la phase dispersée menant à une séparation gravitationnelle. Si la densité de la phase dispersée est inférieure à celle de la phase continue, il y a crémage. Dans le cas inverse, c'est de la sédimentation.

Il est possible de prédire la vitesse de crémage v d'une émulsion mono disperse (Equation 1) ou poly disperse (Equation 2) à partir de la loi de Stokes¹⁴⁸.

$$v = \frac{2r^2(\rho_2 - \rho_1)g}{9\eta_1} \quad (1)$$

$$v = \frac{(d^2 + \sigma^2)(\rho_2 - \rho_1)g}{18\eta_1} \quad (2)$$

Avec r , le rayon des gouttelettes (en m)

d et σ , le diamètre moyen des gouttelettes (en m) et l'écart type, respectivement

g , la constante gravitationnelle ($\approx 9.807 \text{ m/s}^2$)

η_1 , la viscosité de la phase continue (en Pa.s)

ρ_1 et ρ_2 la densité de la phase grasse et de la phase aqueuse (kg/m^3), respectivement

Sur la base de l'équation de Stokes, plusieurs leviers sont envisageables pour ralentir le processus de crémage : la viscosité de la phase continue, la différence de densité entre les deux phases ou encore la taille des gouttelettes.

La floculation et le crémage (ou sédimentation) sont des processus réversibles. En effet, une agitation même modérée suffit à redisperser le système. Néanmoins, ces processus correspondent à une première étape favorisant des processus irréversibles détaillés ci-dessous.

La **coalescence** consiste en la fusion entre plusieurs gouttelettes pour en former une plus grosse et ainsi réduire l'aire interfaciale. Ce phénomène résulte du mouvement brownien des gouttelettes qui ainsi peuvent se rapprocher, puis entrer en collision. Le film interfacial entre les deux gouttelettes s'amincit peu à peu jusqu'à sa rupture. Ce film se reforme ensuite au niveau de la nouvelle interface.

Le **mûrissement d'Ostwald** est un phénomène de diffusion moléculaire de l'huile (dans le cas des émulsions H/E) contenue dans les petites gouttelettes vers des gouttelettes plus grosses, sans contact entre elles, à travers la phase continue. Ce phénomène est possible s'il existe une solubilité, même faible, de la phase dispersée dans la phase continue. En raison d'une différence de pression de Laplace ΔP entre deux gouttelettes (supérieure pour les gouttelettes de faible rayon), la matière diffuse spontanément des plus petites gouttes vers les plus grosses, jusqu'à leur disparition¹⁴⁹.

Chacun de ces deux processus peut, par la suite, conduire à une séparation de phase macroscopique de l'émulsion.

De nombreuses méthodes sont proposées pour suivre la déstabilisation d'émulsions, parmi lesquelles des mesures de conductivités¹⁵⁰, de turbidité¹⁵¹ ou encore des techniques ultrasonores¹⁵².

D'autres méthodes, telles que la microscopie optique et la granulométrie, sont disponibles et seront décrites plus loin.

Les émulsions sont donc des systèmes complexes qui subissent une déstabilisation spontanée et progressive au cours du temps. Les phénomènes régissant le comportement de ces systèmes sont nombreux et nécessitent des approches et méthodes de caractérisation adaptées.

Cependant, il est important de noter que la déstabilisation des émulsions n'est pas toujours indésirable. En effet, pour certaines applications cosmétiques ou pharmaceutiques, celle-ci peut être voulue dans le but de libérer un principe actif¹⁵³. Cet aspect ne sera pas détaillé dans le cadre de ce manuscrit de thèse.

3.3 Caractérisation des émulsions

Le développement d'émulsions robustes repose sur la connaissance de leurs propriétés physico-chimiques d'une part, et de leur stabilité d'autre part. Les émulsions présentent une diversité de propriétés en termes de microstructure comme de macrostructure en fonction notamment du procédé d'émulsification (appareillage, temps, vitesse, température ...) et de la composition (nature et fraction volumique de la phase dispersée, nature et concentration de l'émulsifiant ...).

Ainsi, une grande variété de techniques a été développée pour caractériser ces émulsions et leurs mécanismes de déstabilisation. Les principales seront détaillées dans cette partie, afin d'établir un lien entre la microstructure de l'émulsion, les propriétés observées et leur évolution au cours du temps.

3.3.1 Analyse de la macrostructure

La macrostructure permet de caractériser les propriétés de l'émulsion à une échelle d'observation macroscopique notamment l'aspect de l'émulsion ou ses propriétés rhéologiques.

- Observations visuelles

Les différents phénomènes de déstabilisation se traduisent par des modifications de la microstructure (taille et nombre de gouttelettes) mais également par des modifications de l'aspect macroscopique des émulsions.

En effet, si certains systèmes restent parfaitement uniformes, d'autres subissent des mécanismes de déstabilisation plus ou moins rapides comme la coalescence et/ou le crémage (sédimentation) qui conduisent, à terme, à une séparation de phase macroscopique de l'émulsion.

Keowmaneechai et al.¹⁵⁴ et Sun et al.¹⁵⁵ ont caractérisé la stabilité des émulsions avec un indice de crémage IC (en %).

$$IC = 100 * \frac{H_S}{H_E}$$

Avec H_E et H_S , la hauteur totale de l'émulsion et la hauteur du sérum ou de la phase crémée, respectivement.

Sur ce principe, Novalés et al.¹⁵⁶ ont développé une technique rapide et non invasive par analyse d'image permettant de déterminer la stabilité des émulsions et plus particulièrement les cinétiques de déstabilisation selon différentes conditions de stockage.

- Caractérisations rhéologiques

Le comportement physique des émulsions peut également être caractérisé par rhéologie. Cette technique permet d'obtenir des informations sur le comportement des émulsions et leur structure mais également de suivre leur stabilité au cours du vieillissement.

On distingue l'analyse des propriétés en écoulement et les propriétés viscoélastiques.

Différents facteurs peuvent influencer la rhéologie des émulsions comme la fraction volumique et la viscosité de la phase dispersée, la granulométrie des gouttelettes, la nature et les propriétés de la phase continue (viscosité, polarité, pH) ou encore la concentration en électrolytes¹⁵⁷.

Parmi ces paramètres, la fraction volumique Φ de la phase dispersée est un facteur clé. En effet, les émulsions peuvent se comporter de deux façons différentes :

- Les émulsions diluées ($\Phi < 0,01$) se comportent généralement comme des fluides newtoniens, c'est-à-dire que la viscosité reste constante quelle que soit la contrainte appliquée. Ce comportement est dû au fait que les gouttelettes sont trop éloignées les unes des autres pour interagir entre elles. L'évolution de leur viscosité en fonction de Φ obéit alors à la loi d'Einstein ci-après :

$$\eta = \eta_0 * (1 + 2.5 \Phi)$$

- Les émulsions intermédiaires ou concentrées sont des fluides non newtoniens. Le comportement le plus fréquemment rencontré pour les émulsions est celui du fluide rhéofluidifiant, c'est-à-dire que la viscosité diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement. Dans ce cas, les interactions entre les gouttelettes ne sont plus négligeables, le comportement ne répond plus à la loi d'Einstein.

Certains auteurs comme Barnes et al.¹⁵⁸ et Pal¹⁵⁹ ont étudié l'influence de la taille des gouttelettes sur les propriétés en écoulement des émulsions.

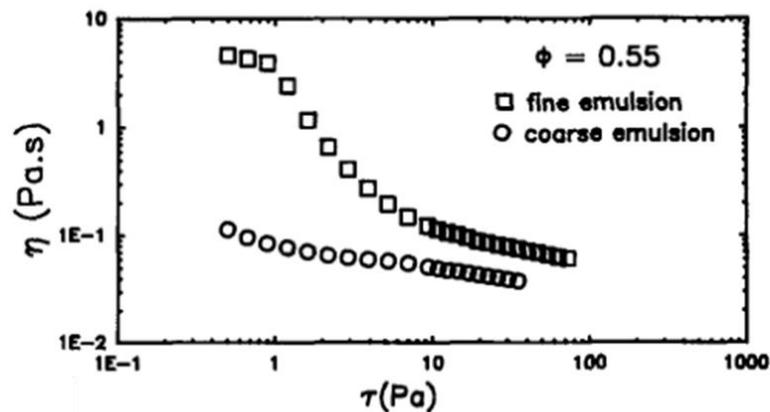


Figure 25 : Evolution des courbes d'écoulement en fonction de la taille des gouttelettes de l'émulsion (issue de Pal¹⁵⁹)

Ils constatent qu'avec la diminution de la taille des gouttelettes, la viscosité tend à augmenter considérablement. De plus, comme illustré par la Figure 25, le caractère rhéofluidifiant est renforcé dans le cas des émulsions possédant de plus petites gouttelettes. Ces phénomènes s'accroissent avec l'augmentation de la fraction volumique en phase grasse¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

Ces auteurs concluent que ce phénomène peut être dû au fait que lorsque la taille des gouttelettes diminue, l'émulsion tend à devenir mono disperse. La distance entre les gouttelettes diminue et ainsi les interactions entre elles sont favorisées ce qui entraîne une augmentation de la viscosité du système étudié.

Ainsi, Sherman¹⁶¹ a étudié les phénomènes de déstabilisation des émulsions par suivi dans le temps des propriétés en écoulement. Il observe dans un premier temps une augmentation de la viscosité, qu'il attribue à la structuration de l'émulsion, puis une diminution de celle-ci due essentiellement au phénomène de coalescence des gouttelettes. Cette diminution de la viscosité due à la coalescence des gouttelettes a également été observée par Tadros¹⁶².

Outre leurs propriétés d'écoulement, les émulsions présentent le plus souvent des propriétés viscoélastiques marquées.

Les propriétés viscoélastiques étudiées en régime dynamique permettent l'identification de la structure de l'émulsion au repos. Il est nécessaire de travailler dans le domaine linéaire de viscoélasticité, correspondant au domaine de déformation pour lequel le produit peut être déformé sans modification de sa structure microscopique, ni des interactions responsables du caractère élastique.

La Figure 26 présente le comportement type de deux émulsions possédant des fractions volumiques en phase dispersée Φ différentes.

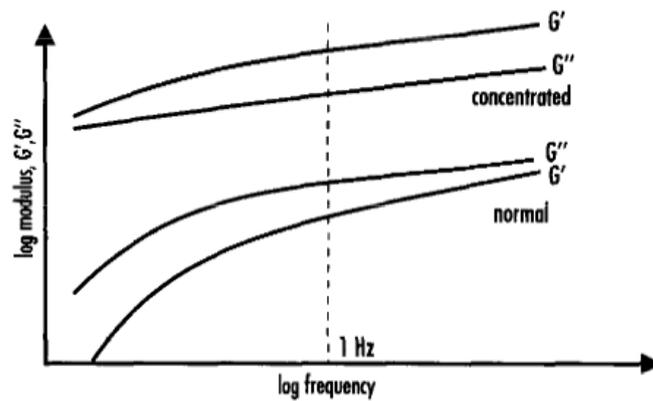


Figure 26 : Evolution de G' et G'' en fonction de la fréquence pour les émulsions (issue de Barnes¹⁵⁸)

En contrôlant la fraction volumique Φ , l'émulsion passe d'un comportement de type liquide viscoélastique avec $G' < G''$ sur toute la gamme de fréquences étudiée à un comportement de type solide avec $G' > G''$ pour les émulsions concentrées^{158,163}.

Outre la fraction volumique, la granulométrie de l'émulsion peut également affecter les propriétés viscoélastiques. Ainsi, la déstabilisation des émulsions peut être détectée en suivant l'évolution des propriétés viscoélastiques d'une émulsion en fonction du temps et de la température^{159,162}. Par exemple, l'augmentation de la taille des gouttelettes due à de la coalescence se traduit par une augmentation du module élastique G' .

Tadros¹⁶² a montré que la floculation (sans coalescence) se traduit par une augmentation du temps de relaxation ainsi que de G' et une diminution du domaine linéaire.

Néanmoins, si plusieurs phénomènes se produisent simultanément, l'analyse des données rhéologiques au cours du temps devient malheureusement très complexe.

3.3.2. Analyse de la microstructure

Les paramètres principaux étudiés pour décrire la microstructure d'une émulsion sont la taille, la distribution de taille des gouttelettes et leur organisation les unes par rapport aux autres.

○ Microscopie optique

La microscopie optique est une technique relativement simple et rapide, qui permet de déterminer la taille et la distribution de taille des gouttelettes de l'émulsion, ainsi que leur évolution au cours du temps.

Par exemple, Güzey et al.¹⁶⁴ ont montré l'impact de facteurs environnementaux sur la microstructure de différentes émulsions en s'appuyant notamment sur des photographies obtenues par microscopie optique. Ces auteurs ont ainsi observé que l'augmentation de la température ou de la concentration en sel entraîne une agrégation des gouttelettes de certaines de leurs émulsions, comme illustrée par la Figure 27.

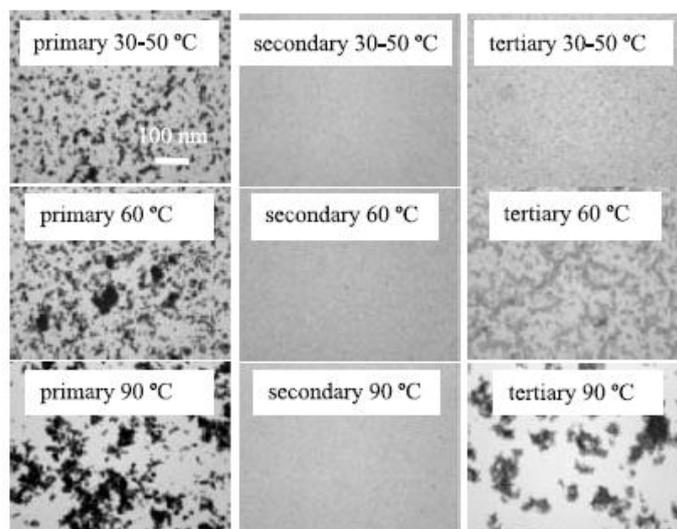


Figure 27 : Evolution de la microstructure de trois émulsions en fonction de la température observée par microscopie optique (issue de Güzey et al.¹⁶⁴)

Cette technique a également permis à Huang et al.¹⁶⁵ d'étudier la morphologie ainsi que la distribution de taille des gouttelettes d'émulsions préparées avec différents polysaccharides.

Néanmoins, la microscopie optique présente certains inconvénients, notamment parce qu'elle permet seulement une analyse relativement subjective concernant la taille et la distribution des gouttelettes. La présence de gouttelettes les plus petites est généralement sous-estimée. De plus, les grosses gouttelettes peuvent être aplaties entre la plaque et la lamelle et donc apparaître déformées, leur diamètre apparent étant alors sur-estimé.

Une alternative permettant de s'affranchir de ce biais, lié à l'écrasement des gouttelettes, est l'utilisation d'un microscope confocal à balayage laser. Sun et al.¹⁵⁵ et Ye et al.¹⁶⁶ ont utilisé cette technique après marquage fluorescent de bio polymères afin de caractériser la taille des gouttelettes et leur organisation dans l'émulsion.

Finalement, il s'avère nécessaire de corrélérer et compléter les données obtenues par microscopie optique avec une autre technique d'analyse de taille des dispersions, telle que la granulométrie laser.

o Granulométrie laser

La granulométrie laser est l'une des techniques les plus utilisées permettant d'obtenir des informations sur la taille et la distribution de taille des gouttelettes d'un système dispersé. En suivant l'évolution de ces deux paramètres au cours du temps, cette technique met en évidence certains phénomènes de déstabilisation. En revanche, la préparation de l'échantillon nécessitant le plus souvent sa dilution préalable, cette technique ne permet pas de caractériser l'organisation originale des gouttelettes au sein de l'émulsion.

La taille des gouttelettes d'une émulsion a un impact important sur sa stabilité¹⁶⁷ (séparation gravitationnelle, coalescence ...), sur ses propriétés optiques¹⁶⁸ (aspect et couleur), sur ses propriétés rhéologiques (viscosité, évolution des modules ...) et sur ses propriétés sensorielles¹⁶⁹.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, Güzey et al.¹⁶⁴ ont étudié l'évolution de la microstructure des émulsions en fonction de différents paramètres, notamment de la température. Pour certaines émulsions, ces auteurs ont constaté une augmentation du diamètre moyen d_{32} (aussi appelé diamètre de Sauter^{155,170}) des gouttelettes avec la température (voir la Figure 28). La corrélation de ces données avec la microscopie (voir la Figure 27) leur permet de conclure à un phénomène d'agrégation des gouttelettes, ainsi que de discriminer les émulsions.

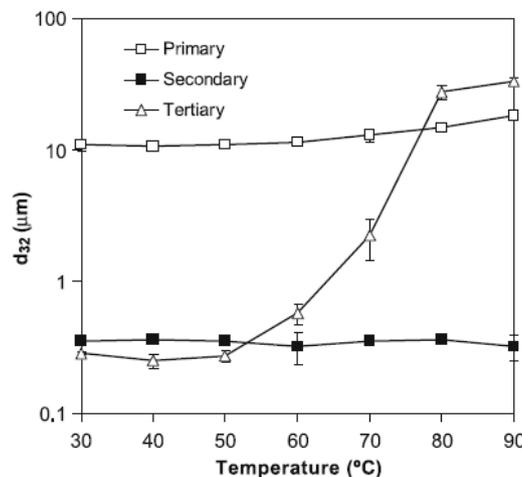


Figure 28 : Evolution du diamètre moyen d_{32} en fonction de la température (issue de Güzey et al.¹⁶⁴)

Généralement, les émulsions sont constituées d'une population de gouttelettes de différentes tailles. Une distribution étroite de tailles de gouttelettes caractérise une émulsion dite monodisperse. En opposition à une émulsion polydisperse pour laquelle la distribution de taille de gouttelettes est large. On distingue également les distributions monomodales (un seul pic) et les distributions plurimodales (plusieurs pics) comme cela est souvent observé pour les systèmes complexes. Ces informations sur la microstructure de l'émulsion permettent d'avoir des indications sur ses

propriétés ou sa stabilité. En effet, à une fraction volumique donnée, une émulsion polydisperse sera plus visqueuse qu'une émulsion monodisperse. Aussi, une émulsion monomodale sera plus stable qu'une émulsion plurimodale.

Les distributions en nombre ou en volume sont les plus couramment utilisées et illustrées par la Figure 29.

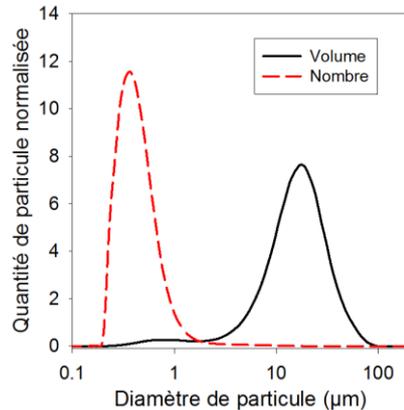


Figure 29 : Exemple de distributions granulométriques en nombre et en volume d'une émulsion

La représentation en nombre fait ressortir les gouttelettes les plus petites mais aussi les plus nombreuses de l'émulsion. Ce sont également les plus stables dans le temps. Ainsi, cette représentation est moins adaptée à un suivi de la stabilité des tailles de gouttelettes.

Au contraire, la représentation en volume met en évidence les gouttelettes les plus grosses, qui sont souvent les moins nombreuses. Cette représentation apparaît donc souvent la plus pertinente pour suivre la stabilité d'une émulsion. En effet, l'augmentation de la taille des gouttelettes d'une émulsion après une période de stockage atteste des phénomènes de floculation et ou coalescence.

Par exemple, Roesch et al.¹⁷¹ n'ont pas observé de différences majeures dans la distribution de taille de particules des émulsions avant et après chauffage et concluent que le chauffage n'a pas affecté la microstructure de leurs émulsions, celles-ci sont donc stable thermiquement.

La finesse des émulsions est une caractéristique importante puisqu'une émulsion possédant des tailles de gouttelettes les plus petites a une meilleure stabilité physique face au déphasage¹⁶⁷.

Chantrapornchai et al.¹⁶⁸ ont étudié l'impact de la taille et de la concentration des gouttelettes sur les propriétés optiques de l'émulsion. Ces auteurs constatent que l'opacité des émulsions augmente avec l'augmentation de la concentration en gouttelettes mais diminue avec la taille des gouttelettes.

Ces résultats confirment l'impact de la microstructure de l'émulsion sur ses propriétés et sa stabilité.

Au final, les analyses granulométriques permettent de déterminer rapidement la taille et la distribution de taille des gouttelettes d'un système dispersé. Cependant, les méthodes

d'échantillonnage perturbent fortement l'émulsion, ce qui s'avère souvent problématique puisque pouvant aboutir à des résultats biaisés. Ainsi, tester différentes méthodes d'échantillonnage, étudier les émulsions concentrées ou sans aucune dilution, ou encore recouper les données obtenues avec d'autres techniques (comme la microscopie) s'avère généralement nécessaire afin de caractériser l'organisation des gouttelettes au sein de l'émulsion.

Ainsi, différentes techniques permettent de caractériser les émulsions en termes de microstructure et de macrostructure, ainsi que de mettre en évidence les phénomènes de déstabilisation.

Néanmoins, les processus de déstabilisation spontanée des émulsions s'observent parfois sur des durées relativement longues (plusieurs mois). Afin de réduire le temps de suivi et d'essayer prédire la stabilité des émulsions, il est possible de mettre en place des protocoles de vieillissement en conditions accélérées telles que le stockage dans des enceintes climatiques ou la centrifugation. Ces techniques n'étant pas utilisées dans le cadre de nos travaux, celles-ci ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

3.4. Stratégies de stabilisation des émulsions

Rappelons que les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables et qu'elles tendent spontanément vers leur état le plus stable : la séparation de phase. Les cinétiques qui gouvernent les différents mécanismes de déstabilisation des émulsions sont plus ou moins rapides et sont gouvernées par de nombreux paramètres tels que le pH, la force ionique, le ratio phase aqueuse/phase grasse, la viscosité ou encore la température.

Selon Dickinson et al.¹⁷², une émulsion est considérée comme stable si aucun changement perceptible de la distribution de taille de particules, de leur état d'agrégation ou de leur agencement spatial n'est observé sur l'échelle de temps d'observation considérée, celle-ci pouvant aller de quelques jours à plusieurs mois.

Dans l'objectif de limiter les phénomènes de déstabilisation et ainsi obtenir des émulsions stables sur le long terme, différentes techniques peuvent être employées comme l'utilisation d'émulsifiants (formation et stabilisation de l'interface eau/huile) tels que les tensioactifs ou les polysaccharides amphiphiles, et/ou d'agents épaississants (contrôle de la viscosité de la phase continue) tels que les polysaccharides.

3.4.1. Tensioactif

o Définition

Les tensioactifs sont des molécules de faible poids moléculaire composées de deux parties de polarités différentes : une partie apolaire et hydrophobe, souvent composée d'une ou plusieurs

chaines hydrocarbonées présentant une affinité pour la phase grasse, et d'une partie polaire et hydrophile ayant une affinité pour la phase aqueuse (voir la Figure 30).

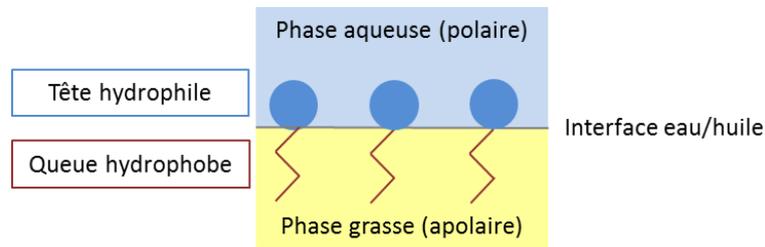


Figure 30 : Schéma de l'organisation de l'émulsifiant à l'interface eau/huile

Ils jouent un rôle indispensable lors du procédé d'émulsification mais également pour le maintien de la dispersion dans le temps. En effet, de par leur caractère amphiphile, ils ont la capacité de s'adsorber à l'interface eau/huile et ainsi de diminuer la différence de pression entre les deux liquides (pression de Laplace ΔP). De telles molécules permettent de réduire la quantité d'énergie à apporter au système pour rompre les gouttelettes et favorisant ainsi la mise en émulsion.

L'utilisation de tensioactifs, seuls ou en mélanges, permet d'obtenir des gouttelettes plus fines avec une interface eau/huile stable afin de retarder les phénomènes de déstabilisation, notamment la coalescence.

Il existe des tensioactifs neutres ou chargés (anioniques, cationiques ou zwitterioniques). Ces derniers peuvent également contribuer à la stabilisation des émulsions en jouant sur les forces électrostatiques d'après la théorie de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (ou encore DLVO). Selon cette théorie¹⁷³, la stabilité des émulsions est principalement liée à la compétition entre les interactions attractives et répulsives entre les gouttelettes. Celle-ci ne sera pas détaillée dans le cadre de ce manuscrit.

Ainsi, les tensioactifs influencent la granulométrie et la stabilité des émulsions en fonction de leur nature, leur concentration ou encore leur rapidité d'adsorption à l'interface¹⁷⁴.

- Critères de choix du tensioactif

Le choix du tensioactif est principalement régi par ses caractéristiques physico-chimiques. En effet, afin de stabiliser de façon efficace une émulsion, le tensioactif doit présenter une bonne affinité pour la phase continue. On définit la règle de Bancroft¹⁷⁵ (ou aussi la théorie de l'émulsification) qui relie la solubilité préférentielle du tensioactif vis-à-vis de l'une des phases de l'émulsion au type d'émulsion. Ainsi, l'obtention d'une émulsion H/E nécessite l'utilisation d'un tensioactif à caractère plutôt hydrophile et inversement, pour obtenir une émulsion E/H, les tensioactifs à caractère lipophile seront privilégiés.

Il existe différents concepts permettant de classer les tensioactifs selon leur affinité avec la phase continue. L'un des plus utilisés est le HLB ou balance hydrophile – lipophile, défini par Griffin¹⁷⁶ et qui permet de classer les tensioactifs selon leur nature hydrophile ou lipophile. Il s'agit d'une échelle semi-empirique allant de 0 à 20, soit des tensioactifs les plus hydrophobes au plus hydrophiles (voir la Figure 31).

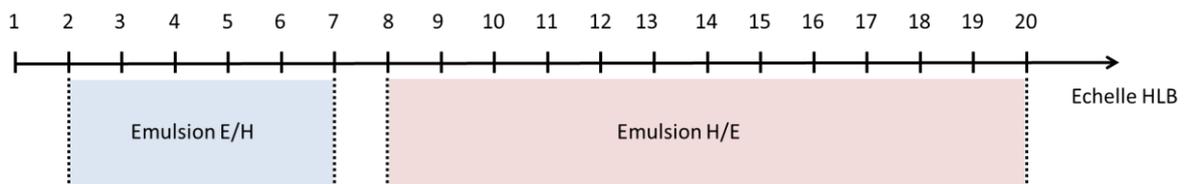


Figure 31 : Echelle des HLB pour les émulsions

Davies et al.¹⁷⁷ proposent la formule suivante permettant de calculer le HLB d'une molécule à partir de la nature chimique de ses différents groupements constitutifs et de leurs incréments associés, présentés dans le Tableau 3.

$$\text{HLB} = 7 + \sum \text{incréments des groupes hydrophiles} - \sum \text{incréments des groupes hydrophobes}$$

Tableau 3 : Incréments associés aux différents groupes chimiques d'une molécule

Groupes hydrophiles		Groupes hydrophobes	
- SO ₄ ⁻ , Na ⁺	38,7	> CH -	0,475
- CO ₂ ⁻ , K ⁺	21,1	- CH ₂ -	
- CO ₂ ⁻ , Na ⁺	19,1	- CH ₃ -	
Amine tertiaire	9,4	= CH -	
Ester (sorbitan)	6,8		
Ester	2,4		
- COOH	2,1		
- OH	1,9		
- O – (éther)	1,3		
- OH (sorbitan)	0,5		

Dans le cas, d'un mélange de tensioactif, les valeurs des HLB sont additives et le HLB d'un mélange peut être calculé à partir du HLB de chacun des composés et de leurs pourcentages massiques respectifs.

Néanmoins, le HLB reste une valeur théorique permettant de prédire et de sélectionner les compositions optimales de tensioactif pour une phase grasse donnée.

Outre leur efficacité pour émulsionner et stabiliser les interfaces, l'utilisation des tensioactifs est de plus en plus controversée pour des raisons toxicologiques (caractère irritant) et environnementales

(impact sur la faune et la flore)^{178,179}. Ainsi, d'autres stratégies alternatives sont envisageables pour assurer l'émulsification comme l'utilisation des polymères amphiphiles^{86,180} ou encore des particules solides¹⁸¹ (émulsion de Pickering).

3.4.2. Polysaccharide

Les polysaccharides sont largement employés en tant qu'agents stabilisants naturels des émulsions pour des applications dans de nombreux domaines comme l'industrie alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique.

En raison de leur caractère hydrophile et de leur haut poids moléculaire, les polysaccharides sont reconnus notamment pour leurs propriétés épaississantes ou gélifiantes en solution. En émulsion, ils permettent de contrôler les propriétés rhéologiques ainsi que la texture. Ainsi, leur mécanisme d'action pour la stabilisation des émulsions H/E repose principalement sur l'augmentation de la viscosité de la phase continue^{182,183} permettant de ralentir les mouvements des gouttelettes et donc la probabilité de chocs entre elles¹⁸⁴.

Ce phénomène a été illustré par une étude menée par Krstonosic et al.¹⁸⁵ et présentée en Figure 32.

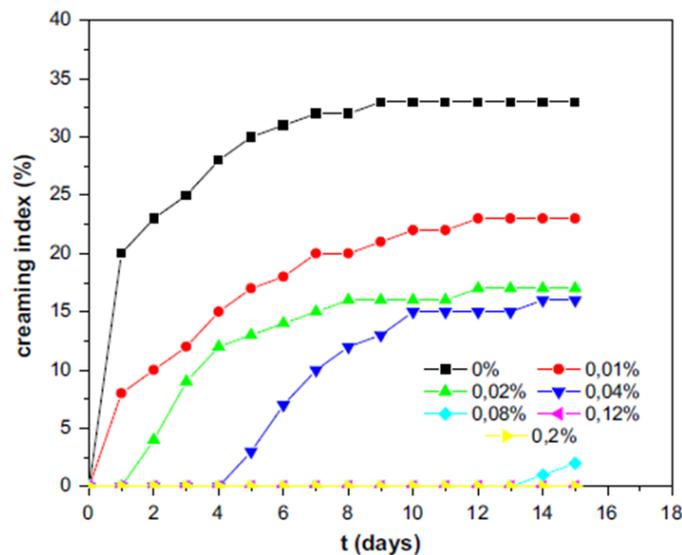


Figure 32 : Influence de la concentration en xanthane sur l'indice de crémage (issue de Krstonosic et al.¹⁸⁵)

Ces auteurs confirment que l'augmentation de la concentration en xanthane induit une diminution de la vitesse de crémage et même une inhibition totale du crémage pour les plus hautes concentrations, sur l'échelle de temps étudiée. Cette amélioration de la stabilité de l'émulsion résulte de l'augmentation de la viscosité de la phase continue.

Cependant, la plupart des polysaccharides ont peu de propriétés de surface à quelques exceptions telles que la gomme arabique^{172,186}, l'émulsifiant naturel le plus utilisé dans l'industrie alimentaire, ou

encore de certains galactomannanes^{183,187}, dont le pouvoir émulsifiant dépend de leur structure chimique. Pour ces deux derniers, l'activité de surface et les propriétés émulsifiantes sont principalement attribuées à la présence d'une fraction protéique soit en tant que contaminant soit liée de façon covalente ou physique dans un complexe protéine - polysaccharide¹⁷².

Ainsi, les polysaccharides peuvent être classés en deux groupes : les polysaccharides adsorbants et les polysaccharides non-adsorbants. Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement à cette deuxième catégorie de polysaccharide.

Du fait de leur caractère non adsorbant, ces polysaccharides ne sont pas capables de stabiliser l'interface eau/huile et il est nécessaire d'ajouter un émulsifiant. Ainsi, les émulsions H/E sont généralement composées d'un tensioactif, responsable de l'émulsification et de la stabilisation de l'interface, et d'un polysaccharide afin de contrôler la viscosité de la phase aqueuse continue.

Néanmoins, il a été montré par plusieurs auteurs comme McClements¹⁴⁶, Jenkins et al.¹⁸⁸ ou Cao et al.¹⁸⁹ que les polysaccharides peuvent induire une accélération de la déstabilisation de l'émulsion par un mécanisme de floculation par déplétion. Ce phénomène a été mis en évidence par Asakura et Oosawa¹⁹⁰ et résulte de la présence, entre des gouttelettes, de régions appauvries en polymère induisant une attraction entre celles-ci, comme illustré par la Figure 33.

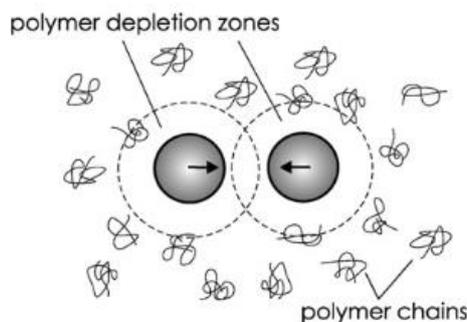


Figure 33 : Mécanisme de floculation par déplétion (issue de Fan et al.¹⁹¹)

La déplétion est principalement régie par la concentration en polysaccharide. Pour de faibles concentrations, la floculation par déplétion des gouttelettes entraîne une augmentation de leur taille favorisant ainsi le crémage, qui n'est pas toujours suffisamment compensé par une augmentation de la viscosité de la phase continue. En revanche, pour des concentrations plus élevées, le crémage est ralenti, car même si les gouttelettes sont agrégées, elles sont incapables de se déplacer en raison de la viscosité élevée induite par les polysaccharides.

Ainsi, pour contrôler les propriétés rhéologiques des émulsions, de nombreux polysaccharides peuvent être utilisés. On notera l'utilisation des alginate, et plus particulièrement de l'alginate de

sodium ou de calcium, des polysaccharides hydrosolubles extraits d'algues et connus en raison de leurs propriétés uniques telles que des propriétés épaississantes, de mise en suspension, de formation de film ou encore de gélification¹⁹². Plus particulièrement, les ions divalents (tels que Ca^{2+}) sont capables de former des liaisons ioniques avec des fonctions carboxylate appartenant à différentes chaînes, conduisant ainsi à la formation de gels physiques^{193,194}.

Il est également possible d'utiliser les carraghénanes, des polysaccharides d'origine marine, pour leurs propriétés épaississantes et gélifiantes¹⁹⁵. Ce sont des polysaccharides linéaires sulfatés dont le nombre de groupement sulfate par unité disaccharidique détermine le type de carraghénanes : 1, 2 et 3 groupements pour le type kappa, iota et lambda, respectivement. Chacun de ces types possédant des propriétés notamment gélifiante différentes¹⁹⁶. Pour la stabilisation des émulsions, ils sont souvent utilisés en combinaison avec d'autres biopolymères¹⁹⁷.

Néanmoins, le polysaccharide le plus employé en formulation reste le xanthane du fait de ses propriétés épaississantes accrues et de son fort caractère rhéofluidifiant, même à de très faibles concentrations¹⁹⁸. Dans le cas particulier de ce polysaccharide, le phénomène de déplétion a été reporté par Sun et al.¹⁵⁵ et Parker et al.¹⁹⁹.

Ainsi, dans le but de limiter l'utilisation des tensioactifs moléculaires tout en s'appuyant sur les propriétés rhéologiques des polysaccharides, la synthèse de polysaccharides amphiphiles apparaît comme une voie particulièrement intéressante pour la stabilisation des émulsions.

3.4.3. Polysaccharide modifié hydrophobiquement

Depuis les travaux précurseurs de Landoll⁸⁹, les polymères modifiés hydrophobiquement dans le but de leur conférer un caractère amphiphile, ont été largement étudiés. Cette stratégie vise à substituer les tensioactifs moléculaires, souvent problématiques vis-à-vis de l'environnement et irritants en application cutanée, par des molécules non toxiques.

Les polysaccharides naturels possèdent de nombreux groupements réactifs fonctionnalisables comme des fonctions hydroxyle, acide carboxylique ou encore amine. Ainsi, leur fonctionnalisation par modification chimique permet de modifier leurs propriétés ou d'en obtenir de nouvelles.

De ce fait, de nombreux auteurs se sont intéressés à la modification de polysaccharides pour des utilisations à la stabilisation des émulsions, dont quelques exemples majeurs sont listés ci-après.

- La cellulose est le polymère naturel le plus abondant dont les chaînes sont composées d'unités d'anhydroglucopyranoses liées en β -(1→4). La cellulose, du fait de sa forte cristallinité, est insoluble dans l'eau. Cependant, la modification chimique permet d'obtenir des dérivés hydrosolubles comme l'hydroxyéthylcellulose (HEC) ou l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC).

Wollenweber et al.²⁰⁰ ont constaté que l'HPMC permet de stabiliser des émulsions de triglycérine dans l'eau et que la stabilité de l'émulsion dépend du type de substitution.

Un autre exemple est celui de Sun et al.²⁰¹. Ces auteurs ont greffé des chaînes hydrocarbonées de 16 carbones sur HEC. Ils constatent que cette nouvelle modification apporte un comportement associatif au système permettant une augmentation significative de la viscosité de la phase continue. De plus, l'adsorption des chaînes alkyles à l'interface permet de former un film élastique évitant les phénomènes de coalescences. La combinaison de ces deux propriétés permet l'obtention d'une émulsion stable.

- L'amidon est une matière première issue de ressources renouvelables abondantes (pomme de terre, céréale ...), et est composé de deux polysaccharides : l'amylose et l'amylopectine, qui sont constitués principalement d'enchaînements d'unités glucopyranoses liées en α -(1→4). La plupart des modifications chimiques de l'amidon concernent l'amylose et permettent d'obtenir des esters d'amylose, notamment l'amylose greffée par des groupements alkyles succinates.

Wang et al.²⁰² et Ye et al.²⁰³ ont étudié l'influence du degré de substitution (Ds) sur les propriétés en émulsion. Ils montrent que la tension interfaciale eau/huile diminue avec l'augmentation du Ds, alors que dans le même temps la viscosité de la phase continue augmente. Ainsi, ces dérivés d'amylose possèdent de bonnes propriétés émulsifiantes et stabilisantes, ces dernières s'améliorant avec l'augmentation du Ds.

- La chitine, issue de la carapace des crustacés et des insectes ou encore des champignons, est le 2^{ème} polysaccharide le plus abondant sur la Terre. Le chitosane en est le principal dérivé et est obtenu par déacétylation de la chitine en milieu alcalin. Il est constitué d'un enchaînement de β -1,4 d'unités de glucosamine et de *N*-acétyl-D-glucosamine dont le taux dépend des conditions de déacétylation.

Le chitosane modifié hydrophobiquement par greffage de chaînes alkyles, est un polymère associatif⁸². Babak et al.²⁰⁴ ont étudié ses propriétés tensioactives et plus particulièrement l'impact de la longueur de la chaîne et du degré de substitution. Comme pour l'amylose, le Ds joue un rôle important sur l'abaissement de la tension superficielle. Ainsi, ces auteurs concluent que l'augmentation du Ds permet une meilleure adsorption à l'interface et que celle-ci joue un rôle plus important que la longueur de la chaîne greffée.

Enfin, d'autres polysaccharides modifiés hydrophobiquement ont été développés afin d'obtenir des propriétés amphiphiles et éventuellement émulsifiantes comme par exemple le dextrane^{86,205}, l'inuline²⁰⁶, le pullulane²⁰⁷ ou le hyaluronate²⁰⁸.

Conclusion de la partie

Cette partie sur les émulsions montre toute la complexité de l'élaboration de ces systèmes en ce qui concerne les mécanismes qui gouvernent leur formation et leur stabilisation. En effet, les émulsions sont thermodynamiquement instables et subissent des phénomènes de déstabilisation variés (crémage, coalescence, floculation ou murissement d'Ostwald). De nombreux paramètres physico – chimiques (pH, force ionique, nature et fraction volumique de la phase dispersée, nature et concentration de l'émulsifiant ...) et physiques (procédé de formulation, température, condition de stockage ...) sont à prendre en compte afin de comprendre les phénomènes régissant la stabilisation des émulsions.

Dans l'objectif d'obtenir des émulsions stables, différentes stratégies sont envisagées et reposent principalement, d'une part, sur l'utilisation de tensioactifs moléculaires, réputés efficaces pour former l'émulsion et stabiliser l'interface eau/huile et d'autre part sur l'emploi de polysaccharides pour contrôler la viscosité de la phase continue. Plus récemment, plusieurs exemples de polysaccharides amphiphiles synthétisés et étudiés pour des applications à la stabilisation des émulsions ont été décrits. Ces travaux illustrent clairement le potentiel de tels systèmes pour se substituer aux tensioactifs de faible poids moléculaire.

Néanmoins, dans la grande majorité des cas, les polysaccharides concernés par la modification chimique possèdent un squelette linéaire et adoptent une conformation de type pelote flexible en solution. A notre connaissance, il n'existe aucune étude s'intéressant à l'influence de la conformation du squelette hydrophile sur le comportement stabilisant en émulsion. Cet aspect est situé au cœur des travaux proposés dans le cadre de cette thèse.

Conclusion du chapitre

Le xanthane est un hétéropolysaccharide hydrophile naturel capable d'adopter en solution aqueuse et selon les conditions expérimentales (température, solvant, force ionique, pH) deux conformations distinctes : l'une sous forme ordonnée hélicoïdale rigide et l'autre sous forme désordonnée de type pelote flexible, chacune se caractérisant par des propriétés rhéologiques différentes.

Le xanthane possède un pouvoir épaississant très élevé même pour de faibles concentrations en polymère ainsi qu'un caractère fortement rhéofluidifiant, ce qui explique ses nombreuses applications industrielles en tant qu'agent de contrôle de la viscosité dans les systèmes aqueux ou en tant que stabilisant pour les émulsions et les suspensions.

Les polymères amphiphiles sont des macromolécules comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Par l'existence d'interactions intra et/ou intermoléculaires entre les groupements hydrophobes, ces polymères présentent des propriétés rhéologiques en solution bien supérieures aux polymères hydrophiles précurseurs.

Dans la littérature, il existe de nombreux exemples de polymères amphiphiles d'origine synthétique ou naturelle. Ces derniers, qui offrent l'avantage d'être biocompatibles, biodégradables et issus de ressources renouvelables, suscitent un intérêt particulier pour des applications à visée industrielle.

La plupart des polysaccharides amphiphiles étudiés dans la littérature adoptent des conformations de type pelote flexible en solution. Peu d'études concernent la modification de polymères adoptant deux conformations différentes en solution, comme le xanthane. Même si certains auteurs se sont intéressés à la modification chimique du xanthane afin de lui conférer des propriétés amphiphiles, aucune étude ne décrit l'influence de la conformation du xanthane lors de sa modification chimique sur ses propriétés associatives en solution.

Ce point est justement l'un des objectifs de ces travaux de thèse et repose sur la modification chimique du xanthane sous ses deux conformations (ordonnée et désordonnée) ainsi que l'étude des propriétés physicochimiques des dérivés obtenus en solution.

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables qui ont tendance à subir des mécanismes de déstabilisation spontanée au cours du temps tels que la floculation, la coalescence, le crémage ou la sédimentation et le murissement d'Ostwald. Ainsi, de nombreuses études ont été consacrées à assurer leur stabilité en ajoutant des agents épaississants, principalement des polysaccharides, et/ou des émulsifiants tels que les tensioactifs ou les polymères amphiphiles.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons principalement à cette dernière catégorie.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

- 1. Modification chimique du xanthane**
- 2. Propriétés des xanthanes modifiés en solution**
- 3. Application à la stabilisation des émulsions**

Dans un premier temps, l'objectif de cette partie est de décrire les protocoles de modification chimique du xanthane sous forme désordonnée et sous forme ordonnée. Dans un deuxième temps, les différentes techniques de caractérisation de ces xanthanes modifiés en solution puis en émulsion seront détaillées : la RMN du proton, le dichroïsme circulaire, la rhéologie et la granulométrie laser.

Partie 1 : Modification chimique du xanthane

1.1. Réactifs utilisés

Le xanthane utilisé dans cette étude a été fourni par Danisco (France). Les degrés de substitution en acétate et pyruvate ont été déterminés par RMN 1H et sont respectivement de 0,87 et 0,49. Le taux d'humidité, déterminé par analyse thermogravimétrique, est de 11,1 % et le taux en protéine, déterminé par la procédure Bradford, est de 0,1 %.

Pour la modification chimique du xanthane sous ses deux conformations, les réactifs employés sont les suivants : de l'hexafluorophosphate de O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium (HBTU, Alfa Aesar, 99%), de la triéthylamine (Et3N, Sigma Aldrich, 99%), du 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC, Alfa Aesar, 98 %), du N-hydroxysuccinimide (NHS, Acros Organics, 98 %), ainsi que la n-octylamine (Sigma Aldrich, 97 %), la n-dodécylamine (Acros, 98%) et la n-hexadécylamine (Sigma Aldrich, 98 %). Ces produits n'ont pas fait l'objet de purification préliminaire avant leur utilisation.

Les solvants utilisés pour les réactions sont l'eau ultra pure (grade 1, résistivité de 18,2 MΩ.cm à 25°C), le diméthylsulfoxyde (DMSO, Carlo Erba, 99,8 %) et pour la purification l'isopropanol (Hauguel, 98 %). Ces deux derniers ont été employés sans purification préalable.

Pour la purification du milieu réactionnel, des membranes de dialyse CelluSep T2, en cellulose régénérée, avec un diamètre de 25,5 mm et un cut-off de 6 000 à 8 000 Da ont été utilisées.

1.2. Modification chimique sous forme désordonnée

La modification chimique du xanthane sous forme désordonnée s'effectue dans le DMSO, grâce à une réaction de couplage peptidique entre les fonctions acide carboxylique du polymère et les groupements amine porteurs des chainons hydrophobes, ici principalement l'octylamine. Au préalable, des analyses de dichroïsme circulaire ont permis de confirmer que le xanthane est bien sous forme désordonnée dans le DMSO (voir Figure 39 dans la section 2.1.). La réaction se fait en une étape à température ambiante. L'agent de couplage utilisé est un uronium²⁰⁹⁻²¹¹,

l'hexafluorophosphate de *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium (HBTU) et la triéthylamine (Et₃N) est utilisée en tant que base pour déprotonner l'acide carboxylique.

Les quantités (en mole) des réactifs (HBTU et Et₃N) sont calculées par rapport au nombre de moles de fonctions acide carboxylique du xanthane, sachant que le xanthane utilisé pour la réaction possède un acide glucuronique et 0,49 acide pyruvique par unité de répétition. Ces deux réactifs sont ajoutés dans les mêmes proportions avec :

$$0 \geq \frac{n_{\text{HBTU}}}{n_{\text{COOH}}} \leq 1 \quad \text{Avec } n_{\text{HBTU}} = n_{\text{Et}_3\text{N}}, n_{\text{HBTU}} \text{ et } n_{\text{Et}_3\text{N}} \text{ le nombre de moles en HBTU et en Et}_3\text{N respectivement et } n_{\text{COOH}} \text{ nombre de moles de fonctions acide carboxylique.}$$

L'octylamine est ajoutée en excès et la stœchiométrie reste constante avec :

$$\frac{n_{\text{Octylamine}}}{n_{\text{COOH}}} = 1.1 \quad \text{Avec } n_{\text{Octylamine}} \text{ nombre de moles d'octylamine.}$$

La présence de charges négatives sur le squelette du polysaccharide peut expliquer son absence de solubilité dans le DMSO. Une étape préalable de protonation du xanthane, par dialyse contre de l'eau acide à pH = 3, est donc indispensable pour permettre la solubilisation dans ce solvant. Le polymère obtenu est solubilisé à 5 g/L sous agitation dans du DMSO (environ 500 mg dans 100 mL) à 80 °C pendant 4h. Le milieu est ramené à température ambiante pour la réaction. Le procédé consiste en l'ajout, en goutte à goutte rapide, de l'octylamine puis de Et₃N et enfin de HBTU précédemment dissous dans quelques millilitres de DMSO, dans le milieu.

Après 18h de réaction, le milieu réactionnel est purifié par différentes étapes de dialyse : contre du DMSO pendant 24h pour éliminer une partie de l'octylamine non greffée, puis une dialyse contre un mélange 70/30 eau acide (pH=3)/isopropanol pendant 24h pour protoner le xanthane et l'amine restante en ammonium, puis une dialyse contre un mélange 70/30 eau salée (0,1M NaCl)/isopropanol pendant 24h pour réaliser des échanges de contre-ions, notamment pour remplacer l'ammonium par Na⁺ et enfin une dialyse contre de l'eau distillée et de l'eau ultra pure pendant 5 jours pour éliminer Na⁺ et diminuer la salinité. Le polymère en solution est alors lyophilisé pendant 24h pour obtenir un produit sous la forme d'un solide blanc, qui sera stocké à 4°C.

Lors de l'étape de purification, la précipitation du polymère est observée pour des quantités introduites en HBTU et Et₃N supérieures à 0,5 eq, ce qui suggère que celui-ci serait trop greffé pour rester soluble dans l'eau. Ainsi, pour que le polymère obtenu reste soluble, le taux de greffage maximal est d'environ 50 %.

Selon ce même protocole de modification dans le DMSO, il a été possible de solubiliser et de greffer des chaînes dodécyles (C_{12}) et hexadécyles (C_{16}). Des problèmes de solubilisation dans l'eau des polymères obtenus ont également été observés. En effet, pour que le polymère greffé avec des chaînes C_{12} et C_{16} reste soluble, le taux de greffage maximal ne doit pas dépasser 30 %. En augmentant la longueur de la chaîne, il est cohérent que la limite de solubilité soit atteinte pour des taux de greffage plus faibles.

1.3. Modification chimique sous forme ordonnée

Un protocole de modification du xanthane sous sa forme ordonnée a été mis au point par Roy et al¹³⁶. La réaction se fait dans l'eau et l'agent de couplage utilisé est un carbodiimide^{212,213}, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDAC) couplé d'un co-agent de couplage, le *N*-hydroxysuccinimide (NHS). Ce protocole permet d'obtenir des dérivés amphiphiles du xanthane présentant des densités de greffage pouvant atteindre au maximum 40 %. Il n'est cependant pas possible de greffer des chaînes plus longues avec cette méthode puisque l'octylamine est la chaîne alkyle linéaire la plus longue encore soluble dans l'eau.

Le précurseur correspond à un xanthane non modifié ayant subi toutes les conditions de synthèse et de dialyse, mais sans ajout des agents de couplage, afin de servir de référence non greffée.

La nomenclature appliquée dans ce manuscrit pour les polymères modifiés est $X^A C_B$, où A correspond à la densité de greffage et B correspond au nombre d'atomes de carbone de la chaîne alkyle greffée. $X^A C_{Bord}$ et $X^A C_{Bdes}$ correspondent à un polymère modifié respectivement sous formes ordonnée et désordonnée.

1.4. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN 1H)

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique qui permet de déterminer, notamment, la structure moléculaire et la pureté d'un échantillon homogène. Dans le cadre de cette thèse, cette technique est utilisée pour déterminer de façon quantitative la densité de greffage des xanthanes modifiés.

1.4.1. Principe

Il est possible d'assimiler le noyau d'un atome à une particule sphérique chargée positivement en rotation autour d'un axe, entraînant un champ magnétique appelé moment magnétique nucléaire $\vec{\mu}$. Il est défini par la relation suivante :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad \text{Avec } \vec{I} \text{ le moment cinétique de spin.}$$

γ le rapport gyromagnétique, dépendant du noyau étudié²¹⁴.

Le noyau d'un atome est observable par RMN seulement s'il possède un spin nucléaire I non nul. Il existe alors différents cas :

- Pour les nucléons, $I = \frac{1}{2}$.
- Pour les noyaux, $I = 0$ ou $I \geq \frac{1}{2}$, selon la combinaison de l'ensemble des contributions des nucléons qui le constituent.

Lors d'une analyse RMN, l'échantillon est soumis à un champ magnétique externe \vec{B}_0 . C'est le spin I qui détermine le nombre d'orientations possibles de $\vec{\mu}$.

Par exemple, dans le cas d'un proton (1_1H) pour lequel $I = \frac{1}{2}$, il y a deux cas possibles pour le nombre quantique magnétique m :

- $m = I = \frac{1}{2}$, correspondant à l'état α .
- $m = I - 1 = -\frac{1}{2} = -I$, correspondant à l'état β .

Ces deux états, illustrés en Figure 34, présentent des énergies différentes.

$$E_m = -m * \gamma * \hbar * B_0 = -m * h * \mu_0 \quad \text{Avec } \mu_0 = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi}, \text{ l'équation de précession de Larmor.}$$

h la constante de Planck.

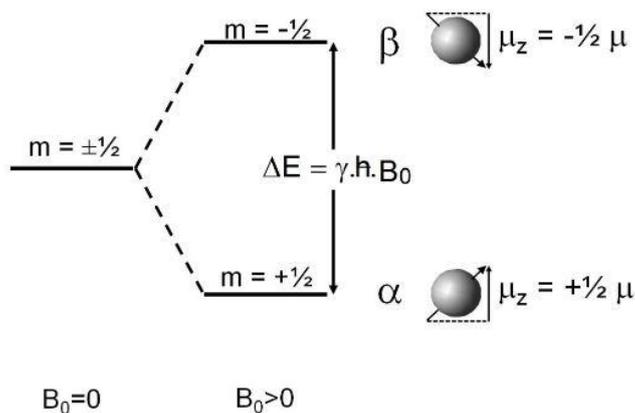


Figure 34 : Représentation des deux orientations de spin $\frac{1}{2}$ dans un champ \vec{B}_0 (issue de Akoka²¹⁵).

Un noyau est capable de passer du niveau α au niveau β en absorbant ΔE , qui correspond à l'énergie à fournir au système pour obtenir le phénomène de résonance.

L'état le plus stable est celui possédant la plus faible énergie (état α) et correspond à des noyaux orientés dans la direction du champ magnétique.

En l'absence de ce champ magnétique ($B_0 = 0$), les noyaux s'orientent de façon aléatoire. Ils présentent alors la même énergie et leur état est dit dégénéré.

L'aimantation nucléaire \vec{M} correspond à la somme vectorielle de tous les moments magnétiques nucléaires. Celle-ci est non nulle puisqu'un plus grand nombre de noyau est à l'état α (le plus stable), dirigée dans la direction du champ \vec{B}_0 (voir Figure 35 A). Or, \vec{M} n'est pas observable lorsqu'elle est orientée dans le sens de \vec{B}_0 . Il est donc nécessaire de la basculer de 90° via l'application d'un champ magnétique \vec{B}_1 perpendiculaire à \vec{B}_0 (voir Figure 35 B).

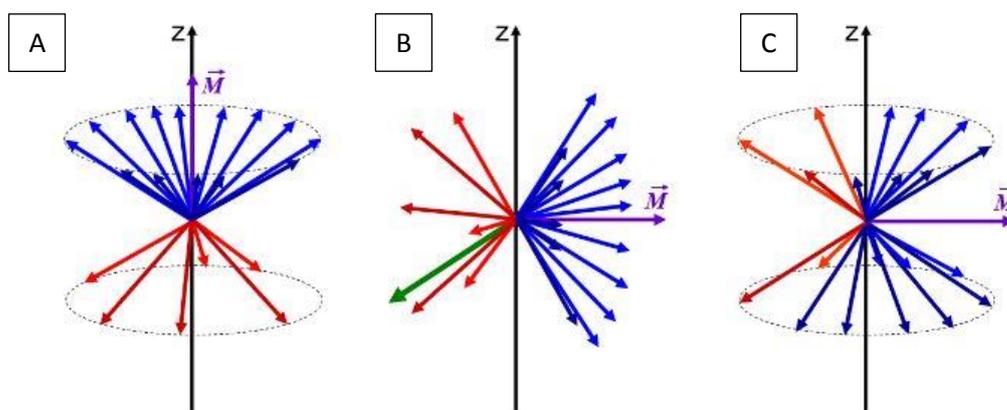


Figure 35 : Représentation de \vec{M} (A) en présence de \vec{B}_0 (B) en présence de \vec{B}_1 (C) lorsque \vec{B}_1 n'est plus appliqué (issue de Akoka²¹⁵)

Lorsque \vec{B}_1 n'est plus appliqué, le système retourne à l'équilibre en émettant de l'énergie, c'est le phénomène de relaxation. Les moments magnétiques sont de nouveau gouvernés par \vec{B}_0 mais l'aimantation nucléaire reste dans le plan transversal (voir Figure 35 C).

La technique utilisée pour analyser les échantillons en RMN est dite impulsionnelle. Elle est composée d'une phase d'excitation puis d'une phase de détection, permettant d'enregistrer le signal dans le temps lors de la relaxation des noyaux. Une transformation de Fourier est appliquée au signal afin d'obtenir le spectre RMN.

Le choix du solvant doit être judicieux afin que celui-ci n'émette pas un signal dans le même domaine de fréquence que l'échantillon étudié.

1.4.2. Appareillage et préparation des échantillons

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés à 80°C (353 K) par un appareil Brüker Avance 300 MHz (Bruker Biospin, Wissembourg, France) équipé d'une sonde 5mm ATM "broad band" multi noyaux à accord de sonde automatique et avec un contrôle de la température possible entre 123 et 423K.

Afin de pouvoir exploiter les spectres de façon quantitative, il est nécessaire que les analyses enregistrées respectent les propriétés de relaxation magnétique des noyaux étudiés. Ainsi dans le protocole développé pour les polymères étudiés⁴⁶, le délai inter-impulsion d1 est de 6 secondes soit 5 fois supérieur au temps de relaxation longitudinal T1. De plus, le nombre d'itérations est de 256, permettant d'acquérir un spectre avec un rapport signal/bruit (≥ 10) compatible avec une exploitation quantitative²¹⁶.

Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en parties par million (ppm) par rapport au 2.2.3.3-d(4)-3-(trimethylsilyl)propanoate de sodium (TSP), utilisé comme référence interne ($\delta = 0$ ppm). Le logiciel MestReNova est utilisé pour le traitement des données.

Les échantillons de xanthane ont été préparés selon le protocole suivant. Afin de diminuer la viscosité de la solution aqueuse de xanthane avant l'analyse RMN, une depolymerization par ajout de peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin à 80°C est nécessaire, en accord avec le processus développé par Wu et al²¹⁷. 7,4 μ L de NaOH (1M) et 25 μ L de H₂O₂ sont ajoutés à 1.5 mL d'une solution de xanthane à 6 g/L dans du D₂O. La solution est laissée sous agitation à 80°C pendant 1h, avant d'être refroidie pendant 30 minutes dans un bain de glace et enfin lyophilisée. La poudre obtenue est alors dissoute à température ambiante pendant une nuit dans 1 mL de D₂O contenant 5*10⁻³ M de TSP.

1.4.3. Détermination de la densité de greffage des xanthanes modifiés

La densité de greffage correspond au nombre d'amines greffées par unité de répétition. La méthode permettant de la déterminer a été mise au point par A. Roy⁴⁶.

Elle se présente de la façon suivante :

$$(1) \%_{\text{octyle}} = \frac{n_{\text{octylamine}}}{n'_{\text{UR}}}$$

Avec $n_{\text{octylamine}}$ le nombre de moles d'octylamine greffée et n'_{UR} le nombre de moles de l'unité de répétition du xanthane modifié.

A partir des intégrations du pic des protons du méthyl terminal de l'amine à 0.88 ppm et du pic du TSP à 0 ppm, il est possible de déterminer le nombre de moles de l'octylamine greffée.

$$(2) n_{\text{octylamine}} = \frac{3 \cdot I_{\text{octylamine}} \cdot n_{\text{TSP}}}{I_{\text{TSP}}}$$

Avec n_{TSP} le nombre de moles de TPS dans le tube.

$$(3) n'_{\text{UR}} = \frac{m_{\text{xanthane}}}{M'_{\text{UR}}}$$

Avec m_{xanthane} la masse de xanthane dans le tube et M'_{UR} la masse molaire de l'unité de répétition du xanthane modifié.

$$(4) \quad M'_{UR} = M_{UR} + \%_{\text{octyle}} * M_{\text{octyle}} - \%_{\text{octyle}} * M_{\text{H}_2\text{O}}$$

D'après la réaction chimique mise en jeu, une molécule d'eau est éliminée pour chaque chaîne d'octylamine greffée. De plus, $M_{UR'}$ augmente avec la densité de greffage.

Ainsi, pour déterminer la densité de greffage, il est nécessaire de connaître $M_{UR'}$. Or, $M_{UR'}$ dépend également de la densité de greffage. Afin de résoudre ce système, la méthode itérative suivante est utilisée :

- Fixer une valeur de $\%_{\text{octyle}}$.
- Injecter cette valeur dans l'équation (4) pour avoir une estimation de $M_{UR'}$.
- Résoudre l'équation (3) pour obtenir $n_{UR'}$.
- Réinjecter la valeur obtenue dans l'équation (1) pour déterminer $\%_{\text{octyle}}$.

Ce cycle d'itération est répété jusqu'à obtenir une valeur constante de $\%_{\text{octyle}}$. Pour notre système, il a été observé que la densité de greffage n'évolue plus à partir de 3 itérations.

La même méthode a été appliquée afin de déterminer la densité de greffage en dodécylamine et en hexadécylamine.

Partie 2 : Propriétés des xanthes modifiés en solution

Les xanthes modifiés obtenus vont ensuite être caractérisés en solution aqueuse afin de déterminer l'impact de la rigidité de la chaîne sur leur conformation par dichroïsme circulaire ou leurs propriétés rhéologiques.

2.1. Dichroïsme Circulaire

Le dichroïsme circulaire (DC) est une technique spectroscopique non destructive qui permet la caractérisation structurale de composés moléculaires chiraux. C'est un outil puissant notamment utilisé pour étudier la structure des protéines^{218,219}. Cette technique nous permettra de déterminer la conformation adoptée par le xanthane.

2.1.1. Principe

La lumière est une onde électromagnétique composée d'un champ électrique \vec{E} et d'un champ magnétique \vec{B} perpendiculaire l'un à l'autre et tous les deux perpendiculaires à la direction de propagation de la lumière. Pour la lumière naturelle, les ondes lumineuses ne sont pas émises en même temps et oscillent de façon aléatoire. Afin de contrôler l'orientation du champ électrique, une onde doit donc être polarisée. Les différents états de polarisation sont présentés en Figure 36. Cette polarisation est soit rectiligne (\vec{E} décrit un segment et conserve une direction fixe au cours du temps), soit circulaire (\vec{E} dessine un cercle pouvant aller vers la droite ou vers la gauche) ou encore elliptique (\vec{E} dessine une ellipse pouvant aller vers la droite ou vers la gauche).

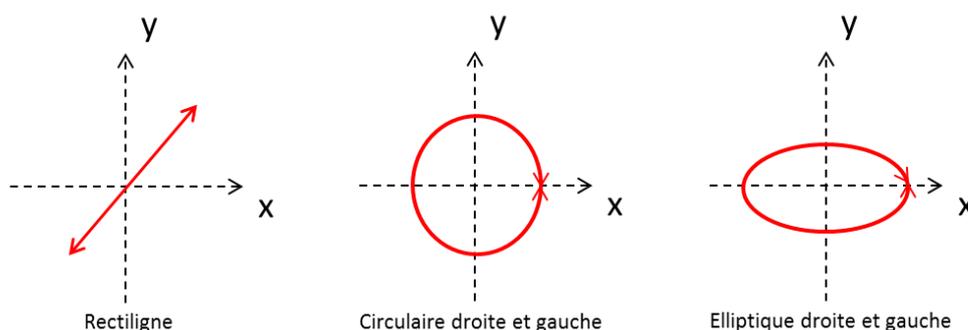


Figure 36 : Différents états de polarisation

Le dichroïsme circulaire repose sur la capacité d'un échantillon possédant une structure optiquement active (c'est-à-dire si elle est non racémique et ne possède pas de plan ni de centre de symétrie), d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement droite \vec{E}_d et la lumière polarisée

circulairement gauche \vec{E}_g . L'absorption préférentielle de l'une de ces deux polarisations entraîne une déviation de la résultante puisque les cercles décrits par les projections des vecteurs n'ont plus le même rayon. L'onde résultante donne une ellipse dont le grand axe fait un angle Θ par rapport à la direction de polarisation de la lumière incidente. (Voir Figure 37).

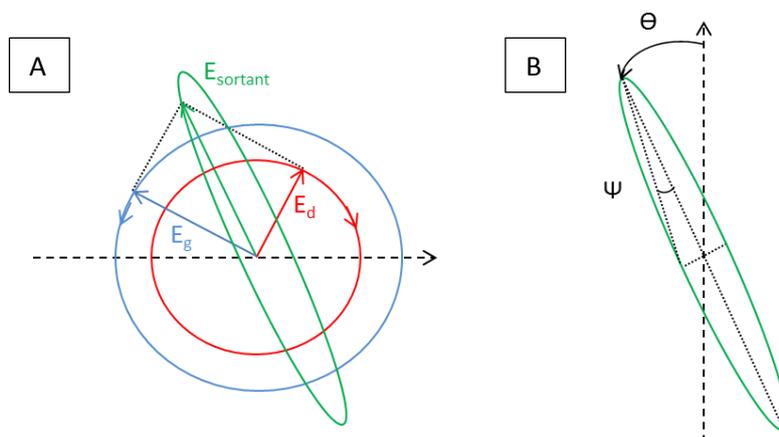


Figure 37 : Représentation graphique de (A) l'absorption inégale de la lumière polarisée circulairement droite E_d et gauche E_g ainsi que l'onde résultante E_{sortant} (B) la polarisation elliptique de la résultante.

L'ellipticité Ψ peut alors s'exprimer de la façon suivante :

$$\tan \Psi = \frac{A}{a} \quad \text{avec } A \text{ et } a \text{ les amplitudes du champ électrique selon le grand et le petit axe.}$$

Les valeurs pour $\tan \Psi$ étant faibles, on considèrera que : $\tan \Psi = \Psi$

L'ellipticité Ψ varie en fonction de la longueur d'onde et permet donc d'avoir accès au spectre de dichroïsme circulaire.

La Figure 38 donne une représentation schématique de ce type d'appareil.

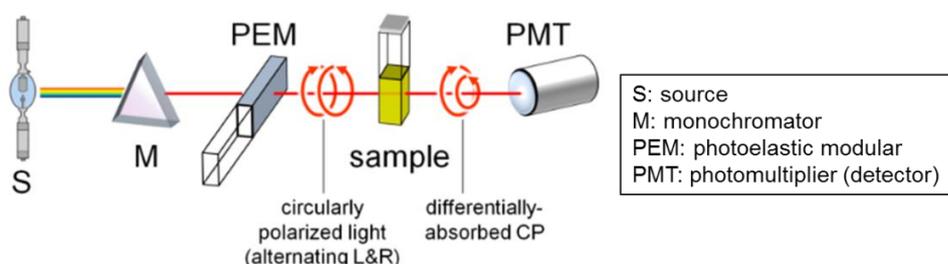


Figure 38 : Schéma du principe d'un appareil de dichroïsme circulaire (issue de Šmidlehner et al.²²⁰)

L'appareil se compose d'une source de lumière qui va être polarisée de façon rectiligne par un filtre monochromatique. Elle va ensuite passer par un modulateur qui la va décomposer en deux ondes :

une polarisée circulairement à droite et une autre polarisée circulairement à gauche, avant d'atteindre l'échantillon à analyser. Les ondes résultantes sont alors captées par le détecteur.

Cette méthode est adaptée pour caractériser le xanthane puisque celui-ci possède une activité optique du fait de sa cristallinité. La Figure 39 présente les spectres de dichroïsme circulaire du xanthane dans l'eau et dans du DMSO.

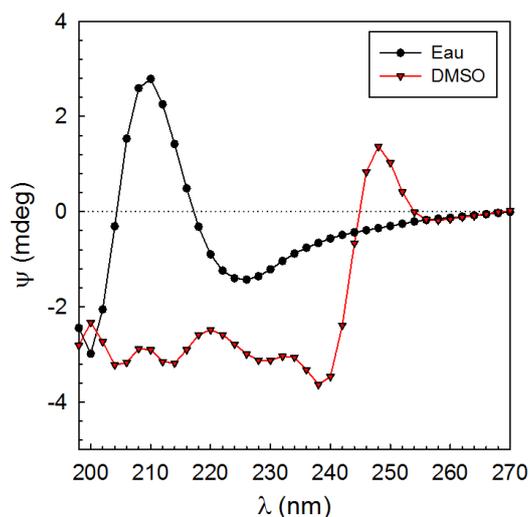


Figure 39 : Evolution de l'ellipticité Ψ en fonction de la longueur λ pour une solution de xanthane à 1 g/L dans l'eau (pH = 4.3 et force ionique de 1mS/cm) et dans du DMSO (issue de la thèse de A. Roy⁴⁶)

Sous forme ordonnée, le xanthane présente un spectre caractéristique déjà décrit par plusieurs auteurs^{25,54,58}. En effet, on observe une bande positive à 210 nm, correspondant aux fonctions acide carboxylique, et une bande négative à 225 nm, correspondant aux groupements acétates du polymère. Dans le cas du xanthane dans le DMSO, ces deux bandes ne sont pas observées ce qui confirme que les chaînes sont bien sous forme désordonnée dans le DMSO.

2.1.2. Appareil utilisé et préparation des échantillons

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés à température ambiante avec un spectropolarimètre (Jobin-Yvon, France) dans une gamme UV allant de 200 à 270 nm. La cellule de mesure utilisée est une cellule de quartz avec un chemin optique de 0,2 cm.

Des solutions aqueuses de xanthane (modifié ou non) ont été préparées à 1 g/L par dissolution du polymère dans de l'eau ultra pure sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le pH et la conductivité ionique des solutions obtenues sont alors respectivement ajustés à 4,3 (par ajout de HCl 0,1M et/ou NaOH 0,1M) et à 1 mS/cm par du NaCl (conditions dans lesquelles le xanthane natif est ordonné). 300 ppm de NaN_3 sont ajoutés pour empêcher le développement de bactéries. Afin de

pouvoir déterminer les conditions expérimentales pour lesquelles le xanthane est sous sa forme désordonnée, des échantillons ont également été préparés à 1 g/L dans du DMSO. Les solutions sont ensuite centrifugées 3 minutes à 416 g pour éliminer les bulles d'air.

2.2. Rhéologie

2.2.1. Définition

Le terme « rhéologie » a été inventé par le Professeur Bingham dans les années 1920 et concerne l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière soumis à une contrainte²²¹. Son domaine d'application couvre différents matériaux tels que les suspensions de particules, les polymères ou encore d'autres fluides complexes comme les émulsions, les mousses ou les gels.

La rhéologie permet de décrire le comportement d'un matériau étudié en donnant accès à des grandeurs physiques comme la viscosité par des mesures d'écoulement ou les modules viscoélastiques par des mesures dynamiques.

2.2.2. Mesures en écoulement

Lorsqu'un matériau est soumis à un mouvement de cisaillement entre deux surfaces, celui-ci se déforme plus ou moins selon la contrainte appliquée.

Dans le cas particulier d'un écoulement laminaire, le système peut être modélisé comme un empilement de couches les unes parallèles aux autres (voir **Figure 40**).

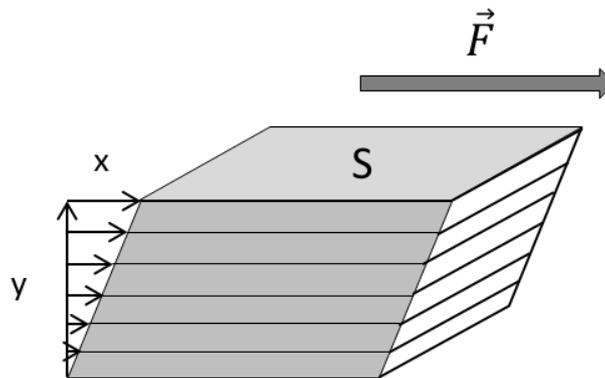


Figure 40 : Représentation de l'écoulement laminaire d'un matériau

On considère les grandeurs suivantes : S l'aire de la surface (en m^2), \vec{F} la force de cisaillement qui est parallèle à la surface de la couche (en Pa), dy la distance entre deux couches voisines et dx le déplacement d'une couche par rapport à l'autre.

La contrainte de cisaillement τ (en Pa/m²) est définie de la façon suivante :

$$\tau = \frac{F}{S}$$

La déformation du matériau Υ (en %) issue de de l'application de cette contrainte est :

$$\Upsilon = \frac{dx}{dy}$$

La vitesse de cisaillement $\dot{\Upsilon}$ (en s⁻¹) correspond à la variation de la déformation par rapport au temps :

$$\dot{\Upsilon} = \frac{d\Upsilon}{dt}$$

Ces grandeurs une fois déterminées, il est possible d'obtenir la viscosité du fluide η (en Pa.s).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\Upsilon}}$$

Ces mesures doivent être réalisées dans un régime pour lequel la viscosité est indépendante du temps, soit dans le régime stationnaire d'écoulement.

2.2.3. Mesures dynamiques

Les mesures rhéologiques peuvent également être effectuées en appliquant une sollicitation sinusoïdale.

Pour un échantillon soumis à une déformation sinusoïdale évoluant au cours du temps, on a :

$$\Upsilon(t) = \Upsilon_0 * \sin \omega t \quad \text{Avec } \omega \text{ la fréquence angulaire (en rad/s)}$$

Ainsi, la contrainte résultante $\tau(t)$ dans le domaine linéaire est également une fonction sinusoïdale du temps :

$$\tau(t) = \tau_0 * \sin(\omega t + \delta)$$

L'angle de déphasage δ donne des informations sur le caractère viscoélastique de l'échantillon.

- $\delta = 0$ pour un solide élastique idéal.
- $\Delta = \frac{\pi}{2}$ pour un liquide visqueux idéal.
- $0 \leq \delta \leq \frac{\pi}{2}$ pour un matériau viscoélastique.

Soit :

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t) \cos \delta + \tau_0 \cos(\omega t) \sin \delta$$

Avec le module de conservation (ou module élastique) : $G' = \frac{\tau_0}{\Upsilon_0} \cos \delta$

Et le module de perte (ou module visqueux) : $G'' = \frac{\tau_0}{\Upsilon_0} \sin \delta$

En étudiant l'évolution de G' et G'' , notamment en fonction de la fréquence, il est possible de déterminer le comportement rhéologique du matériau étudié.

2.2.4. Appareillage et préparation des échantillons

Le rhéomètre utilisé est un DHR2 (TA Instrument) à contrainte imposée avec un système de régulation de température à effet Peltier.

Les solutions de polymères ont été caractérisées à l'aide d'une géométrie à cylindre concentrique, aussi appelée géométrie Couette (diamètre du rotor de 27,98 mm, longueur de 42,11 mm et entrefer de 1,2 mm) ou avec une géométrie cône-plan (diamètre de 60mm, angle de $2^{\circ}00'43''$ et gap de 59 μm). Afin de limiter l'évaporation de l'eau lors des analyses en température, de l'huile de silicone de faible viscosité est ajoutée sur l'échantillon.

Le comportement viscoélastique des solutions de xanthane est étudié en sollicitations harmoniques pour une gamme de fréquence allant de 100 à 0.1 rad/s dans le domaine linéaire de déformation pour des températures allant de 5 à 80 °C. Pour chaque température et avant chaque mesure, l'échantillon est conditionné à la température requise pendant 10 minutes.

Les courbes d'écoulement sont obtenues en fonction du taux de cisaillement lors d'une rampe décroissante allant de 100 to 0.01 s⁻¹ en 300 s à 20°C.

Les mesures ont été réalisées sur des solutions aqueuses de xanthane (modifié ou non) à différentes concentrations préparées selon le protocole décrit précédemment.

Partie 3 : Application à la stabilisation des émulsions

Cette dernière partie décrit le protocole de formulation développé dans le but spécifique d'étudier le pouvoir émulsifiant et stabilisant des xanthanes amphiphiles dans des émulsions huile dans eau de composition simple, ainsi que les différentes caractérisations des émulsions obtenues.

3.1. Préparation des émulsions

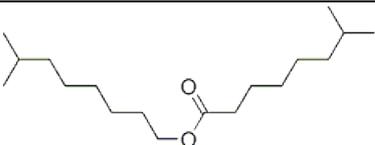
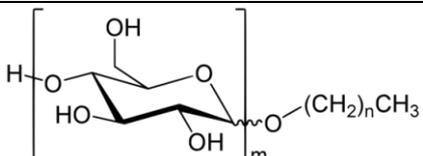
3.1.1 Matières premières

Pour la phase aqueuse des émulsions, du xanthane natif ainsi que des xanthanes modifiés sous forme ordonnée et désordonnée avec une densité de greffage allant de 0 à 35 % sont utilisés à différentes concentrations. La phase grasse est composée d'isononanoate d'isononyle, fourni par la Stéarinerie Dubois (Boulogne Billancourt, FRANCE).

Pour l'étude complémentaire, un tensioactif non ionique a été sélectionné : un Alkyl Poly Glucoside (APG) (SEPPIC, France). Le degré moyen de polymérisation m et le rapport de longueur de chaîne alkyle C_8/C_{10} n ont été déterminés par spectrométrie de masse (Agilent Q-TOF 6530, Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) et sont de 1.6 et 63/37, respectivement. Le choix de ce tensioactif sera détaillé dans la Partie 3 du Chapitre 3 : Résultats & Discussion.

Les différentes structures chimiques des composés utilisés sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Structure chimique des différents composants de l'émulsion

Nom	Structure chimique
Isononanoate d'isononyle	
Alkyl Poly Glucoside	

3.1.2 Protocole de formulation

Le protocole de formulation a été optimisé en prenant en compte différents paramètres (faible volume de mélange, température de chauffage des deux phases, vitesse et temps d'agitation ...), afin de garantir la fiabilité et la répétabilité des émulsions. Les travaux préliminaires ayant permis de

développer le protocole de formulation sont détaillés dans la Partie 2 du Chapitre 3 : Résultats & Discussion.

Pour la phase aqueuse, le xanthane (modifié ou non) a été dissous dans l'eau ultra pure sous agitation à température ambiante pendant une nuit, pour des concentrations allant de 0.125 à 0.9 % m/m. Le pH et la conductivité ionique des solutions obtenues sont alors respectivement ajustés à 4,3 (par ajout de HCl 0,1M et/ou NaOH 0,1M) et à 1 mS/cm par du NaCl. 300 ppm de NaN₃ sont ajoutés pour éviter toute contamination bactérienne. Le cas échéant, l'ajout des tensioactifs dans la formule est réalisé par dissolution préalable de ces derniers dans l'eau ultra pure. La phase grasse est composée uniquement d'isononanoate d'isononyle.

Afin de pouvoir contrôler parfaitement la température du procédé de formulation, chaque phase est préchauffée séparément à 30 °C pendant 30 minutes. La phase grasse est versée dans la phase aqueuse, puis le mélange est homogénéisé à 20 000 tr / min pendant 3 minutes à l'aide d'un Ultraturrax numérique T25 (IKA, Fribourg, Allemagne) équipé de la tête de dispersion S25N-10G. La formule est immédiatement dégazée sous vide pour éliminer l'air incorporé pendant l'émulsification.

Dans ce travail, la teneur en phase grasse de toutes les émulsions est fixée à 20 % m/m. Ce pourcentage correspond à une quantité classique en formulation. La phase aqueuse varie à travers la teneur en xanthane (natif ou modifié sous forme ordonnée ou désordonnée) ainsi que la densité de greffage de ces derniers. Dans la dernière partie, l'impact de l'ajout de tensioactif a également été étudié. La quantité disponible de chacun des grades de xanthane modifié étant limitée, les formulations sont préparées sur un total de 20 g. La composition des émulsions est détaillée dans le Tableau 5 ci-après.

Tableau 5 : Composition des formulations

	Phase	% massique
Isononyl isononanoate	Phase grasse	20
Xanthane (natif ou modifié)	Phase aqueuse	0.01 à 0.32
APG (C8-C10)		0 à 0.15
Conservateur		0.025
Eau Ultra pure		QSP

Chaque émulsion a été préparée en double pour s'assurer de la fiabilité du processus de préparation, ainsi que de la répétabilité des résultats obtenus en termes de caractérisation et suivi des émulsions dans le temps.

Des émulsions contenant le xanthane non modifié ont été préparées en suivant la même procédure, dans le but de les utiliser comme références.

3.1.3. Méthodologie d'étude de la stabilité des émulsions

Une fois préparées, les émulsions sont stockées à température ambiante, afin de suivre leur comportement dans des conditions normales de vieillissement.

Dans ce manuscrit, nous considérerons deux approches distinctes pour caractériser les émulsions :

- L'aspect macroscopique, observé visuellement, selon que l'émulsion est d'apparence homogène ou hétérogène (1 ou plusieurs phases visibles).
- Les phénomènes microscopiques de crémage, floculation et/ou coalescence, permettant de caractériser la qualité de l'interface huile-eau. A titre d'exemple, une émulsion peut présenter du crémage sans pour autant subir de modification la taille des gouttelettes. L'interface de celle-ci reste donc stable.

Dans le but de pouvoir suivre et comprendre les phénomènes mis en jeu dans la stabilisation/déstabilisation de ces émulsions, des analyses sont réalisées après formulation (J0) puis pendant un mois de stockage à température ambiante. Les émulsions sont caractérisées à J+1, J+2, J+3, J+7, J+14, J+30 par les différentes techniques qui seront détaillées dans la partie suivante :

- Observations macroscopiques (photographie).
- Caractérisations microscopiques qualitative (microscopie optique) et quantitative (granulométrie laser) : suivi de la forme et de la taille des gouttelettes ainsi que leur distribution dans le temps.
- Rhéologique : étude la viscosité de l'émulsion. Les mesures rhéologiques sont seulement réalisées à J0.

Après un mois de stockage, les émulsions toujours macroscopiquement homogènes ont continué à être analysées pendant plusieurs mois jusqu'à une éventuelle déstabilisation.

3.2. Granulométrie laser

La granulométrie laser est une technique facile d'utilisation et présentant une bonne reproductibilité qui permet de décrire la microstructure des systèmes formulées, notamment la taille des gouttelettes dans une large gamme de mesure. Elle est adaptée à l'analyse de suspensions de divers types de particules comme des poudres ou les gouttelettes d'une phase dispersée d'une émulsion.

3.3.1. Principe

Cette technique est basée sur la diffusion de la lumière par des particules dans un système dispersé. En effet, lorsqu'une particule est éclairée par un faisceau lumineux, celle-ci réémet la lumière dans plusieurs directions par un processus de diffusion/absorption fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente et des propriétés optiques des deux phases, dispersée et continue. Le principe consiste donc à exposer les particules dispersées par une onde monochromatique et à en déduire la variation angulaire de l'intensité lumineuse diffusée.

Il est alors possible de déterminer un paramètre de taille α :

$$\alpha = \frac{2\pi r}{\lambda} \quad \text{avec } r \text{ le rayon de la particule et } \lambda \text{ la longueur d'onde de l'onde incidente.}$$

Le modèle de diffusion de la lumière dépend de la taille et de la forme de la particule, et notamment du rapport taille/longueur d'onde de la lumière incidente²²². Ainsi, plusieurs modèles peuvent être proposés :

- Pour $\alpha \ll 1$, c'est le modèle de Rayleigh, il correspond à des particules plus petites que la longueur d'onde incidente.
- Pour $1 \gg \alpha$, c'est le modèle de Fraunhofer, il correspond à des particules plus grandes que la longueur d'onde.
- Pour $\alpha \approx 1$, c'est le modèle de Mie, pour lequel il y a une équivalence entre la taille des particules et la longueur d'onde.

Dans le cadre de cette étude, le modèle de Mie est applicable. Ainsi, il sera considéré que les particules analysées sont sphériques, que le système est homogène et que l'indice de réfraction des particules est connu. De plus, il est nécessaire que les échantillons analysés soient dilués à de très faibles concentrations de gouttelettes afin de ne pas saturer les détecteurs¹⁸⁶.

La Figure 41 donne une représentation schématique de ce type d'appareil.

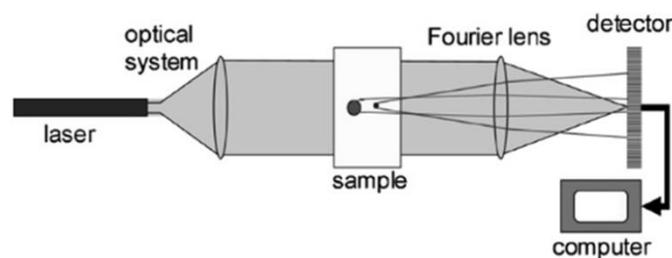


Figure 41 : Schéma du principe de la granulométrie laser (issue de Keck et al.²²²).

L'appareil se compose d'un laser émettant à une longueur d'onde spécifique, un système optique en sortie du laser permettant d'augmenter la largeur du faisceau. Lors de son passage à travers la cellule

de mesure contenant les gouttelettes de l'émulsion diluée, le faisceau lumineux est diffusé dans différentes directions selon la taille et la forme des particules, ainsi que la longueur du chemin optique. La lumière diffusée rencontre ensuite une lentille de focalisation avant d'être captée par le détecteur, lui-même relié au logiciel de traitement de données.

3.3.2 Appareillage et préparation des échantillons

La distribution et la taille des gouttelettes ont été mesurées par diffusion statique de la lumière (SLS) utilisant un diffractomètre SALD -7500 nano (Shimadzu, Kyoto, Japon). Celui-ci est équipé d'un laser semi-conducteur violet (405 nm) et d'un système optique à transformation inverse de Fourier.

La connaissance de l'indice de réfraction de la phase grasse est indispensable pour déterminer la taille des gouttelettes de l'émulsion sur la base de la théorie de la diffusion de Mie. La partie réelle de l'indice de réfraction a été fixée à 1,45 et correspond à l'huile utilisée pour préparer les émulsions (isononanoate d'isononyl). La valeur de la partie imaginaire s'appuie sur des phénomènes d'absorption et de réflexion de la matière. Dans le cas de nos émulsions et en accord avec les observations faites au microscope sur l'apparence des gouttelettes, ce paramètre a été fixé à 0,00i. Ainsi, l'indice de réfraction utilisé pour l'analyse granulométrique est de 1,45-0,00i.

Afin de mettre en évidence les phénomènes de déstabilisation, un protocole de prélèvement des échantillons a été mis en place (voir Figure 42 A). Celui-ci consiste à prélever distinctement deux zones de chaque échantillon, nommées respectivement fraction haute (à 5 mm de la surface) et fraction basse (à 5 mm du fond du récipient) de l'émulsion. La hauteur totale de l'émulsion est de 40 mm. Chaque fraction est ensuite pré-diluée dans l'eau ultra pure (environ 0.2 mL d'émulsion dans 2 mL d'eau) avant d'être introduite dans la cellule de mesure SALD BC 75 (7 cm³) jusqu'à l'obtention d'une valeur d'absorbance comprise entre 0,140 et 0,160. Une agitation mécanique est maintenue pendant toute la durée de la mesure afin d'assurer l'homogénéité et la bonne dispersion du milieu.

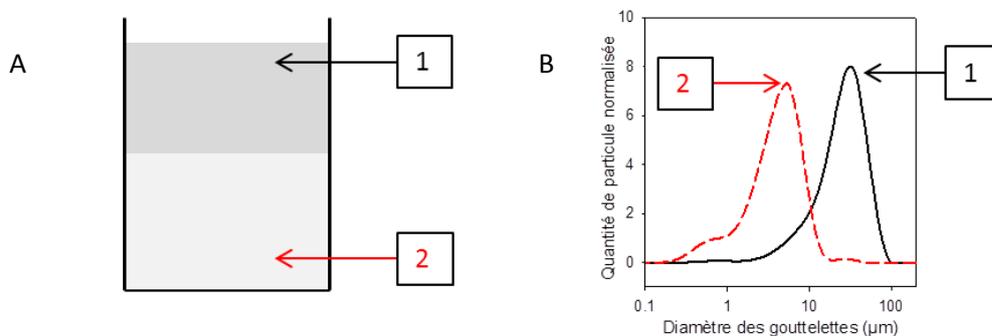


Figure 42 : (A) Protocole de prélèvement des échantillons (B) Représentation graphique des distributions en volume du haut (trait plein) et du bas (trait pointillé) d'une émulsion.

Deux répétitions sont réalisées pour chaque mesure. Les données sont exploitées à l'aide du logiciel Wing SALD II et sont représentées sous la forme d'une courbe de distributions en volume (voir Figure 42 B).

Cette représentation graphique a été sélectionnée car contrairement à la distribution en nombre, elle permet de visualiser les gouttelettes ou agrégats de gouttelettes plus volumineux, y compris s'ils sont peu nombreux. Elle semble donc particulièrement adaptée pour suivre les processus d'instabilité des émulsions.

Les mesures de granulométrie sont corrélées avec les analyses de microscopie optique réalisées au même temps et suivant le même protocole de prélèvement de l'échantillon (partie haute et partie basse) décrit précédemment.

3.5. Caractérisation rhéologique

Le rhéomètre DHR2 présenté précédemment est également utilisé pour les analyses des émulsions.

Les émulsions sont caractérisées à l'aide d'une géométrie de type plan – plan ayant un diamètre de 60 mm et un gap fixé à 200 μm . Ces analyses sont réalisées sur toutes les émulsions immédiatement après formulation (J0) afin d'étudier des systèmes homogènes.

3.5.1. En écoulement

Les propriétés d'écoulement des émulsions ont été obtenues en fonction du taux de cisaillement pendant une rampe décroissante (en mode logarithmique) de 100 à 0,01 s^{-1} pendant 300 s à 20 °C. La procédure comprend une étape de conditionnement qui consiste à appliquer un pré-cisaillement à 50 s^{-1} pendant 60 s, puis les échantillons sont laissés au repos pendant 2 min avant la mesure.

3.5.2. Balayage en fréquence

Les modules élastique G' et visqueux G'' ont été mesurés dans le domaine viscoélastique linéaire à 20°C sur une plage de fréquences allant de 100 à 0.1 rad/s. L'étape de conditionnement précédemment décrite a été appliquée avant la mesure.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

- 1. Synthèse et caractérisation des xanthanes modifiés hydrophobiquement en solution**
- 2. Application des xanthanes amphiphiles à la stabilisation des émulsions**
- 3. Etude complémentaire**

Introduction

De façon générale, cette étude vise à **modifier chimiquement** le xanthane sous ses **deux conformations** par greffage de chaînes alkyle linéaires, de caractériser les propriétés en solution des polymères amphiphiles obtenus afin de pouvoir déterminer l'influence de la **rigidité du squelette** sur les propriétés en **solution** mais également sur les propriétés stabilisantes en **émulsion**.

Dans un premier temps, l'objectif est de conférer au xanthane un caractère amphiphile par greffage de chaînons hydrophobes *via* une réaction de couplage peptidique entre une alkylamine et les fonctions acide carboxylique situées sur les chaînes latérales du polysaccharide. Étant moins nombreuses que les fonctions hydroxyles, ces fonctions (les acides glucuronique et les acides pyruvique) permettent un meilleur contrôle de la régiosélectivité de la réaction. De plus, la substitution des fonctions acide carboxylique par des amides ne modifie pas le nombre de liaisons hydrogènes. Il est néanmoins possible que cette dernière ait un impact sur la conformation du polymère en solution.

Pour rappel, le xanthane adopte en solution aqueuse et selon les conditions opératoires (température, solvant, force ionique, pH) deux conformations distinctes. L'une sous forme ordonnée hélicoïdale semi-rigide et l'autre sous forme désordonnée de type pelote flexible, se caractérisant par des propriétés rhéologiques différentes. Ces propriétés font donc du xanthane un bon candidat pour l'étude de l'influence de la rigidité des chaînes sur les propriétés associatives induites par le greffage de chaînons alkyle sur la chaîne polysaccharidique, jamais étudié auparavant.

1. Synthèse et caractérisation des xanthanes modifiés hydrophobiquement en solution

Dans le but d'appréhender l'influence de la rigidité de la chaîne principale sur ses propriétés associatives, un protocole de modification par l'octylamine du xanthane sous sa forme ordonnée a été mis au point par Audrey Roy pendant sa thèse¹³⁶ à l'URCOM. La réaction se fait en deux étapes dans l'eau en utilisant la chimie des carbodiimides comme agent de couplage. Afin de modifier le xanthane sous forme désordonnée, il a fallu mettre au point une méthode différente. Ainsi, un protocole efficace et répétable a été développé. Celui-ci se fait en une étape dans le DMSO en utilisant la chimie des uroniures. Grâce à ces deux protocoles de modification, il a donc été possible de greffer l'octylamine sur ce polysaccharide sous ses deux conformations. De plus, la modification chimique du xanthane dans le DMSO permet de pouvoir greffer des chaînes alkyles plus longues.

La détermination du taux de greffage en chaînes alkyles s'effectue par analyse RMN ¹H. Tout comme il a été démontré pour la forme ordonnée¹³⁶, il est possible de moduler la densité de greffage en ajustant la stœchiométrie des agents de couplage pour la forme désordonnée. De plus, la

caractérisation par RMN a permis d'estimer la proportion d'acides pyruvique modifiés par rapport aux acides glucuronique. Nous verrons dans la partie suivante, que l'accessibilité de ces deux sites de greffage est un facteur primordial dans cette étude.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé et comparé ces xanthanes modifiés sous forme ordonnée et sous forme désordonnée en solution aqueuse. Il est important de souligner que tous les xanthanes amphiphiles étudiés restent solubles dans l'eau, et ce, pour de densité de greffage allant jusqu'à 25 % voire jusqu'à 50 % pour les chaînons alkyles les plus courts étudiés. Tout d'abord, la conformation adoptée par les chaînes dans l'eau après modification a été déterminée par dichroïsme circulaire. Ces différentes observations ont confirmé l'intérêt de ces deux méthodes de modification qui ont un impact opposé sur l'organisation de la chaîne polymère en solution aqueuse. Puis, grâce aux analyses rhéologiques effectuées sur les différents xanthanes modifiés obtenus, il a été possible de montrer que la conformation adoptée par le polymère pendant le processus de greffage a un impact majeur sur les propriétés rhéologiques observées. Ces résultats seront présentés dans la publication¹ ci-après, publiée dans *Carbohydrate Polymers* : « Chemical modification of xanthan in the ordered and disordered states: an open route for tuning the physico-chemical properties ».

2. Application des xanthanes amphiphiles à la stabilisation des émulsions

Une étude précédente a permis de montrer, grâce à des mesures des propriétés viscoélastiques interfaciales, que les groupements hydrophobes influencent le comportement des xanthanes modifiés sous forme ordonnée à l'interface eau/huile²²³. Cela se traduit par une nette augmentation du caractère élastique de celle-ci, ce qui permet d'envisager des applications potentielles prometteuses, en particulier en formulation en tant qu'agent stabilisant. Ainsi, dans la troisième et dernière partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'application des xanthanes modifiés hydrophobiquement à la stabilisation d'émulsions.

Si le xanthane seul n'est pas capable d'émulsionner le mélange eau/huile sélectionné dans le cadre de notre travail, nous avons pu démontrer que certaines émulsions contenant des xanthanes modifiés, sans ajout supplémentaire de tensioactifs, restent stables pendant des mois. Afin de comprendre les phénomènes mis en jeu dans la stabilisation/déstabilisation de ces émulsions, leur microstructure a été caractérisée au cours du temps par microscopie optique et granulométrie laser. Les propriétés rhéologiques des solutions et des émulsions correspondantes ont également été étudiées.

Dans une première partie, du xanthane modifié sous forme ordonnée a été utilisé en émulsion en tant qu'agent stabilisant. Plus particulièrement, l'impact de la concentration en polymère ainsi que de la densité de greffage ont été investigués. Cette étude a permis de conclure sur le rôle primordial

de ces deux paramètres pour la formation et stabilisation des émulsions. Cette partie a fait l'objet de la publication² suivante, publiée dans Carbohydrate Polymers : « Hydrophobically Modified Xanthan: thickening and surface active agent for highly stable Oil in Water Emulsions ».

Puisque les xanthanes modifiés sous forme ordonnée et désordonnée présentent des propriétés rhéologiques en solution très distinctes, nous nous sommes donc ensuite intéressés à l'influence de la rigidité de la chaîne sur le pouvoir stabilisant en émulsion. Pour finir, nous avons également étudié l'impact de la longueur de la chaîne hydrophobe greffée pour les xanthanes modifiés sous forme désordonnée. L'ensemble des résultats obtenus ont permis d'émettre une hypothèse sur le comportement des xanthanes modifiés en émulsion. Ces résultats seront détaillés dans la partie intitulée « Impact of backbone stiffness and hydrophobic chain length of modified xanthan on oil in water emulsion stabilization » soumise pour publication dans Carbohydrate Polymers.

3. Etude complémentaire

Dans une étude complémentaire et dans le but d'aller encore plus loin dans la compréhension des phénomènes régissant la stabilisation de nos émulsions, nous avons étudié différents systèmes :

- Tout d'abord, nous avons formulé des émulsions composées de xanthane non modifié et d'un tensioactif. L'objectif était de comparer le pouvoir stabilisant de ce système et des émulsions contenant du xanthane modifié. Pour cette étude, un alkyl polyglucoside (APG) C₈-C₁₀ a été sélectionné et ce choix sera détaillé dans la Partie 3.
- Puis, nous avons voulu étudier le comportement des xanthanes modifiés en émulsion en présence de tensioactif. Pour cela, l'APG C₈-C₁₀ a été rajouté dans le système. Le but était de pouvoir étudier l'impact de l'ajout de ce tensioactif sur la stabilité des émulsions.
- Enfin, nous avons travaillé avec un système mixte constitué de xanthane non modifié et de xanthane modifié, l'objectif étant d'améliorer la stabilité des émulsions contenant du xanthane modifié en ajoutant du xanthane non modifié dans la phase continue.

Ces résultats, encore préliminaires, seront présentés dans la dernière partie de ce chapitre.

Partie 1 : Synthèse et caractérisation des xanthanes modifiés en solution

Cette première partie décrit le protocole de modification chimique du xanthane sous forme désordonnée ainsi que les caractérisations en solution des polymères modifiés qui ont permis de conclure sur l'impact de la rigidité de la chaîne du xanthane sur ses propriétés associatives. Ce travail a fait l'objet de la publication suivante : « Chemical modification of xanthan in the ordered and disordered states: an open route for tuning the physico-chemical properties », acceptée dans Carbohydrate Polymers.

A notre connaissance, la modification chimique du xanthane sous forme désordonnée n'a, à ce jour, pas été étudiée dans la littérature. Ainsi, dans un premier temps, nous avons cherché à développer un protocole similaire à celui mis au point par Audrey Roy, en l'adaptant de façon à ce qu'il soit efficace pour la forme désordonnée du xanthane. Par dichroïsme circulaire, nous avons pu vérifier que le xanthane est bien sous forme désordonnée dans le DMSO. Le couple d'agents de couplage EDAC/HOBt (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide/Hydroxybenzotriazole) a été sélectionné. Cependant l'analyse RMN a mis en évidence des impuretés en proportions non négligeables qui semblent correspondre à des dérivés de carbodiimides (*O*-acylsourée ou *N*-acylurée notamment). Ces impuretés sont toujours présentes après les différentes étapes de dialyse, ce qui suggère que celles-ci sont greffées sur le polymère. Nous avons essayé d'optimiser le protocole afin d'éliminer ces impuretés et de s'affranchir de leur impact sur les propriétés observées.

Pour atteindre cet objectif, plusieurs stratégies ont alors été envisagées :

- Tout d'abord, nous avons réalisé la réaction dans un mélange eau/DMSO. En supposant que ces impuretés soient des *O*-acylsourées qui n'auraient pas réagi, la présence d'eau permettrait une hydrolyse réversible vers l'acide carboxylique. Cependant, des analyses de dichroïsme circulaire ont montré que le xanthane n'est pas sous forme désordonnée quels que soit les ratios eau/DMSO étudiés allant de 99/1 à 10/90.
- Afin de limiter cette réaction secondaire, d'autres facteurs ont été étudiés comme le temps de réaction (réduit à 2 h au lieu de 24 h), ou l'ordre d'ajout des réactifs (réaction en une ou deux étapes). L'ajout des réactifs en une seule étape favoriserait la réaction entre l'*O*-acylsourée intermédiaire et l'HOBt limitant ainsi la formation irréversible de *N*-acylurée.
- La purification du milieu réactionnel est réalisée par différentes étapes de dialyse qui constituent un cycle de dialyse (Voir Fantou et al.¹). Dans l'hypothèse où ces impuretés ne seraient pas greffées sur les polymères, des étapes de purification supplémentaires telles

que la précipitation du polymère dans l'isopropanol en fin de réaction ou la réalisation de plusieurs cycles de dialyse successifs, ont été réalisées afin de pouvoir les éliminer.

Ces méthodes ont permis de diminuer le taux d'impuretés dans le produit final mais celles-ci étaient toujours en proportions non négligeables (environ 10 % d'impuretés greffées).

Une dernière option a été de changer la chimie des agents de couplage, notamment en utilisant la chimie des uroniums, tels que l'hexafluorophosphate de *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium (HBTU). En effet, cet agent de couplage, compatible avec l'utilisation du DMSO, est connu pour ses conditions d'activation douces et un fort rendement de réaction²¹¹. La réaction est réalisée en une seule étape et la triéthylamine est utilisée en tant que base pour déprotonner l'acide carboxylique. Après 18h de réaction à température ambiante, le milieu réactionnel est purifié par différentes étapes de dialyse. Cette fois-ci, aucune trace d'impureté n'a été visible à la précision de la RMN près.

Les deux protocoles de modification une fois mis au point, une gamme de xanthane modifiés sous forme ordonnée et désordonnée a été synthétisée avec des taux de greffage compris entre 7 et 50 %. Les xanthanes modifiés obtenus ont ensuite été caractérisés en solution aqueuse que ce soit au niveau de leur conformation ou leurs propriétés rhéologiques. L'objectif étant de pouvoir conclure sur l'impact de la conformation adoptée par le xanthane pendant sa modification sur l'organisation de la chaîne modifiée en solution afin de déterminer l'influence de la rigidité sur la relation structure-propriété, notamment le caractère associatif.

Publication 1: «Chemical modification of a polysaccharide with controlled chain stiffness: an open route for tuning the physico-chemical properties»

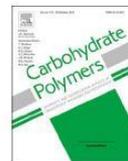
Carbohydrate Polymers 178 (2017) 115–122



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Research paper

Chemical modification of xanthan in the ordered and disordered states: An open route for tuning the physico-chemical properties



Céline Fantou^a, Audrey N. Roy^a, Emmanuelle Dé^b, Sébastien Comesse^a, Michel Grisel^a, Frédéric Renou^{a,*}

^a Normandie Univ, UNILEHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, 76600, Le Havre, France

^b Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, Polymers, Biopolymers, Surface Laboratory UMR 6270 CNRS, FR 3038 CNRS, 76000, Rouen, France

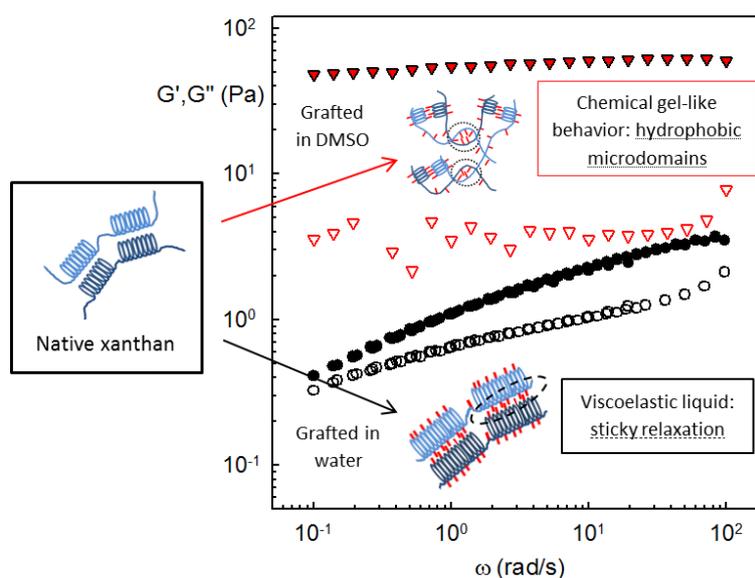
ARTICLE INFO

Keywords:
Xanthan
Chemical modification
Chains stiffness
Conformation
Rheology
Gel

ABSTRACT

The impact of the chain stiffness on physicochemical properties has been studied by chemical modification of xanthan under both ordered and disordered conformations. Corresponding rheological properties were studied and results showed that amphiphilic xanthan exhibited completely different behaviors depending on its conformation during modification. Xanthan, when modified under ordered conformation, exhibits similar behavior to non-modified one, only the chain relaxation being strongly slowed down. Therefore, the high stiffness of xanthan helices does not allow hydrophobic moieties to associate. Oppositely, xanthan modified under its disordered conformation displayed a chemical gel-like behavior without any relaxation of the chain within the studied frequency range nor with temperature, which is unexpected for this length of alkyl chains. These different viscoelastic properties can be correlated to the regioselectivity of the grafting; the latter can be controlled by the conformation of xanthan during modification, thus by the synthesis conditions.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.039>



- Abstract

The impact of the chain stiffness on physicochemical properties has been studied by chemical modification of xanthan under both ordered and disordered conformations. Corresponding rheological properties were studied and results showed that amphiphilic xanthan exhibited completely different behaviors depending on its conformation during modification. Xanthan, when modified under ordered conformation, exhibits similar behavior to non-modified one, only the chain relaxation being strongly slowed down. Therefore, the high stiffness of xanthan helices does not allow hydrophobic moieties to associate. Oppositely, xanthan modified under its disordered conformation displayed a chemical gel-like behavior without any relaxation of the chain within the studied frequency range nor with temperature, which is unexpected for this length of alkyl chains. These different viscoelastic properties can be correlated to the regioselectivity of the grafting; the latter can be controlled by the conformation of xanthan during modification, thus by the synthesis conditions.

- Introduction

Polysaccharides are massively used in a wide range of industrial areas and thus the subject of intensive researches^{1,2}. In order to increase the physicochemical scopes and potentialities of such polymers, many efforts have been devoted to their chemical modification^{3,4}. In this field, amphiphilic polysaccharides, grafted with hydrophobic moieties being able to self-associate in solution, are well-known for their viscosifying or gelling properties for instance. They are extensively used for applications with industrial interest in several fields like cosmetic as emulsifier or thickener⁵⁻⁷, pharmaceutical or medicinal issues for drug delivery^{8,9} or even oil recovery¹⁰. Thanks to the flexibility of the chains, the hydrophobic moieties are able to self-associate in solution, thus resulting in specific properties.

In literature, most of the modifications leading to such systems concern polysaccharides with a simple structure^{11,12} consisting of a linear backbone that form random coils in solution and only few studies describe the chemical modification of heteropolysaccharides owning both a more complex structure and a secondary organization, *i.e.*, semi-rigid conformation^{13,14}.

Surprisingly, to the best of our knowledge no one ever reported the chemical modification of a complex polysaccharide that can adopt different conformations in order to confer diverse properties depending on the conformation starting from the same substrates. Such approach could open up a new paradigm in the area of polysaccharide chemistry and should be of interest for both a fundamental and an industrial point of view. For that purpose, we turned our attention to xanthan. Indeed, xanthan is a natural bacterial heteropolysaccharide produced by fermentation from

Xanthomonas campestris. Its structure consists of a cellulosic backbone of β -D-glucose substituted on every two units with a charged trisaccharidic side chain containing a D-glucuronic acid between two D-mannoses. Xanthan also possesses acetate and pyruvate groups on inner and terminal mannoses of the side chain respectively. Their proportions vary according to the fermentation process and the post-fermentation treatment and have an impact on the polymer properties^{16–18}. In aqueous media, xanthan can adopt two distinct conformations¹⁹: an rigid ordered double-stranded helical structure at low temperature and high ionic strength, and a disordered flexible coil at high temperature and low total ionic strength^{19,20}. The helix-coil transition is reversible with temperature and is accompanied by a fall of the storage modulus. Both conformations exhibit distinct rheological properties^{21–23} due to the difference in rigidity between them. Thus xanthan is the perfect candidate for studying the impact of chains rigidity on associative properties. The order-disorder transition, which is traditionally monitored by optical rotation, DSC, NMR, or circular dichroism, does not necessarily correspond directly to full dissociation. In fact, common techniques only give information about the ordering of side chains, and are not strictly connected to strandedness but both are intimately related^{24,25}.

Chemical modifications of xanthan under its ordered conformation have been well described in literature and most of them are carried out on the hydroxyl functions of xanthan^{26,27}. Only few authors were targeting the carboxylic functions of the polymer^{28,29}, even though that undoubtedly offers a better control of the *regioselectivity*. In order to provide amphiphilic properties, octyl residues were grafted onto the carboxylic functions of the polysaccharide *via* an amidation reaction. Among the different chemical grafting of xanthan polymer described in the literature, only Roy et al³⁰ succeeded in developing a method to modify xanthan under its ordered conformation via a carbodiimide-mediated amidation reaction method in water; the corresponding amphiphilic xanthans own original but non associative rheological properties. However, modification on disordered xanthan is still lacking.

The aim of the present work is to determine the influence of the chain stiffness on both the conformation and physicochemical properties of modified xanthan. In a first step, a protocol for chemical grafting of xanthan under disordered conformation was developed. To our knowledge, chemical modification of xanthan under disordered conformation has never been done so far. Then, the conformation of the resulting modified xanthans was investigated using circular dichroism. Finally, rheological analyses were performed and compared to modified xanthan under ordered conformation, confirming our hypothesis. Moreover, the whole results indicated original associative properties with high gelling properties at quite low concentrations, offering promising interest in formulation as stabilizer and/or texturing agent.

- Materials and Methods

- Materials

The xanthan was provided by Danisco (France). The substitution degrees of acetate and pyruvate obtained by ^1H NMR were respectively 0.87 and 0.49. The moisture content, measured by thermo gravimetric analysis, was 10.1 % and the protein content, determined by the Bradford procedure was 0.1 %. 2,2,3,3-d(4)-3-(trimethylsilyl)propionic acid sodium salt (TSP) and *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) were purchased from Alfa Aesar, triethylamine and sodium azide from Sigma Aldrich, octylamine, DMSO and sodium chloride from Carlo Erba. All reagents were used without further purification and ultra-pure water was used as solvent for all the characterizations.

- Synthesis

The modification process of xanthan under disordered conformation is described in detail in the Results and Discussion section. Modified xanthan under ordered conformation has been obtained following the procedure developed by Roy et al³⁰.

- Characterization methods

- *^1H NMR Analysis*

Prior to NMR analysis, chemical depolymerization using hydrogen peroxide in alkaline solution was necessary to decrease the viscosity of xanthan aqueous solutions and was conducted according to Wu et al³¹. Briefly, 7.4 μL of NaOH (1 M) and 25 μL of H_2O_2 were added to 1.5 mL of a solution of xanthan at 6 g/L in D_2O . The solution was heated at 80°C for 1h under stirring and then cooled down in an ice bath for 30 minutes before freeze-drying. Then, polymer solutions were prepared in D_2O at 5 g/L in the presence of $5 \cdot 10^{-3}$ M of TSP as chemical shift (in ppm) and internal quantification reference. 300 MHz ^1H NMR spectra were recorded at 80 °C, using a Bruker Avance 300 spectrometer. The determination of the grafting density of our samples was done using a procedure described by Roy et al³⁰.

- *Circular Dichroism*

Circular dichroism (CD) spectra were recorded with a CD spectropolarimeter (Jobin-Yvon, France) in the UV range of 200-270 nm with a quartz cell with an optical path of 0.2 cm at room temperature. Xanthan solutions at 1 g/L in water were prepared and stirred at room temperature overnight. The pH was adjusted to 4.3 with 0.1 M HCl and the ionic strength to 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ with NaCl. 300 ppm of NaN_3 were added to the samples to prevent bacterial growth. Solutions were centrifuged for 3 minutes to get rid of air bubbles. Spectra were averaged over 5 scans with a bandwidth of 2 nm then

smoothed and corrected with the subtraction of the CD spectrum of solvent measured within the same conditions.

- *Rheology*

Oscillatory shear studies were carried out with a stress controlled rheometer HR2 (TA Instruments) using concentric cylinder geometry (bob diameter, 27.98 mm; length, 42.11 mm; gap, 1.2 mm) equipped with a Peltier temperature control device. Water evaporation was avoided by covering the geometry with low viscosity silicon oil. The storage (G') and loss (G'') moduli were measured within the linear viscoelasticity domain at different temperature, from 5 to 80 °C. Polymer solutions ranging from 0.05 g/L to 2 g/L were prepared as mentioned above. The pH was adjusted to 4.3 with 0.1 M HCl and the ionic strength to 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ with NaCl. 300 ppm of NaN_3 were added to the samples to prevent bacterial growth.

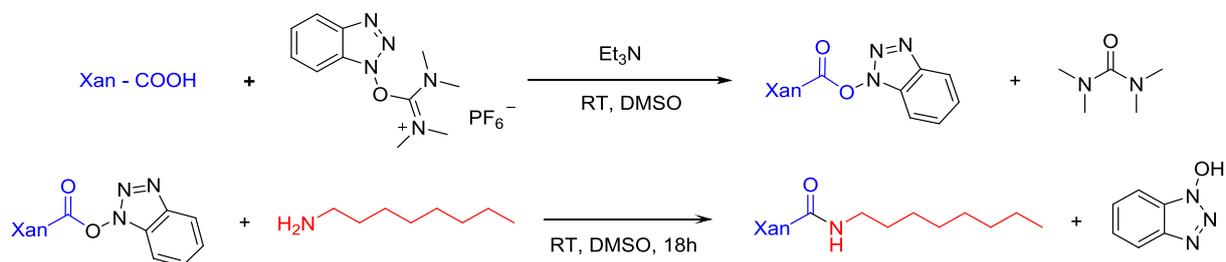
- Results and Discussion

- Chemical modification of xanthan

Modification of xanthan under its disordered conformation in water would require low ionic strength conditions (salt concentration below 10^{-3} M), or working at temperature above the xanthan conformational transition temperature (T_m). However, the addition of the reagents makes the ionic strength high enough to stabilize the ordered conformation of xanthan, and increasing the temperature could strongly affect the coupling efficiency. We proved by circular dichroism that acidic form of xanthan adopts a disordered conformation in DMSO (see Figure 3A). Similar approach as for xanthan modification under its ordered conformation, using carbodiimide chemistry, has been conducted. Nevertheless, in spite of intensive purification, the modified xanthan in DMSO still contain impurities in quite important amount, impurities that we believe to be covalently bounded to the xanthan backbone. Therefore, a novel methodology was investigated to better control the final polymer characteristics. Among the methods described in the literature, uronium salts, such as *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), are versatile reagents for an acid-amine coupling³²⁻³⁴, compatible with DMSO and characterized by their mildness and the high yields obtained³⁵. On the basis of this information, we decided to modify xanthan under its disordered conformation using uronium chemistry.

Due to the presence of negative charges on its backbone, xanthan is not soluble in DMSO. A preceding acidification step is thus necessary to make xanthan soluble. To this aim, a solution of xanthan at 5 g/L was dialyzed for 24h against ultrapure water buffered at pH = 3 with HCl. Once the product freeze-dried, a solution of xanthan at 1 g/L in DMSO was prepared and stirred at 80°C during 4h for complete dissolution; then cooled down to room temperature. Then HBTU, triethylamine and

octylamine were introduced. The reaction is a one-pot process with two chemical steps as described in Scheme 1.



Scheme 1: Grafting reaction of octylamine onto disordered xanthan.

Triethylamine is used as a base to deprotonate the carboxylic acid functions. The quantity of each reagent is calculated with respect to the number of carboxylic acid on the polymer knowing that the xanthan used in this study possesses one glucuronic acid and 0.49 pyruvate groups per repeating unit. For octylamine, the stoichiometry remains constant with $n_{\text{Octylamine}} / n_{\text{COOH}} = 1.1$. All reagents were added at the same time under stirring for 18h at room temperature.

Modified polymers were purified by successive dialysis steps: (1) against DMSO for 24h to remove most of ungrafted octylamine, then (2) against a mixture of water buffered at pH=3 / isopropanol with a ratio 70/30 (v/v) for 24h to protonate xanthan and protonate the remaining amine into ammonium, (3) then against a mixture of water containing 0.1 M NaCl / isopropanol with a ratio 70/30 v/v for 24h for counterion exchanges especially ammonium into Na^+ and finally (4) against distilled and ultrapure water for 7 days to remove Na^+ and to decrease the salinity. Samples were then freeze-dried. It is important to note that all modified polymers remained fully water soluble thus allowing pouring back in water for characterizations.

Precursor refers to a xanthan that went through all the synthesis and purification steps except the addition of the coupling agents. Therefore, precursor is the reference corresponding to an unmodified xanthan that endured the same treatment as the modified one. The nomenclature applied for the modified polysaccharides is $X^A C_8$, where A is the grafting density (as defined by Roy et al³⁰) and C_8 the number of carbon atoms in the alkyl chain. In addition, $X^A C_{8\text{ord}}$ and $X^A C_{8\text{dis}}$ correspond to a polymer modified under its ordered and its disordered conformation, respectively.

Figure 1 represents ^1H NMR spectra for the precursor (top) and $X^9 C_{8\text{dis}}$ (bottom). For the precursor, the spectrum obtained is characteristic of xanthan³⁶ with a peak at 1.46 ppm attributed to the pyruvate groups, a peak at 1.90 ppm corresponding to free acetate due to the depolymerization procedure and a peak at 2.16 ppm attributed to the acetate groups. No impurity or remaining

reagents are observed. Thus, the purification procedure is proved to be efficient to remove all the unreacting octylamine and byproducts of the reaction.

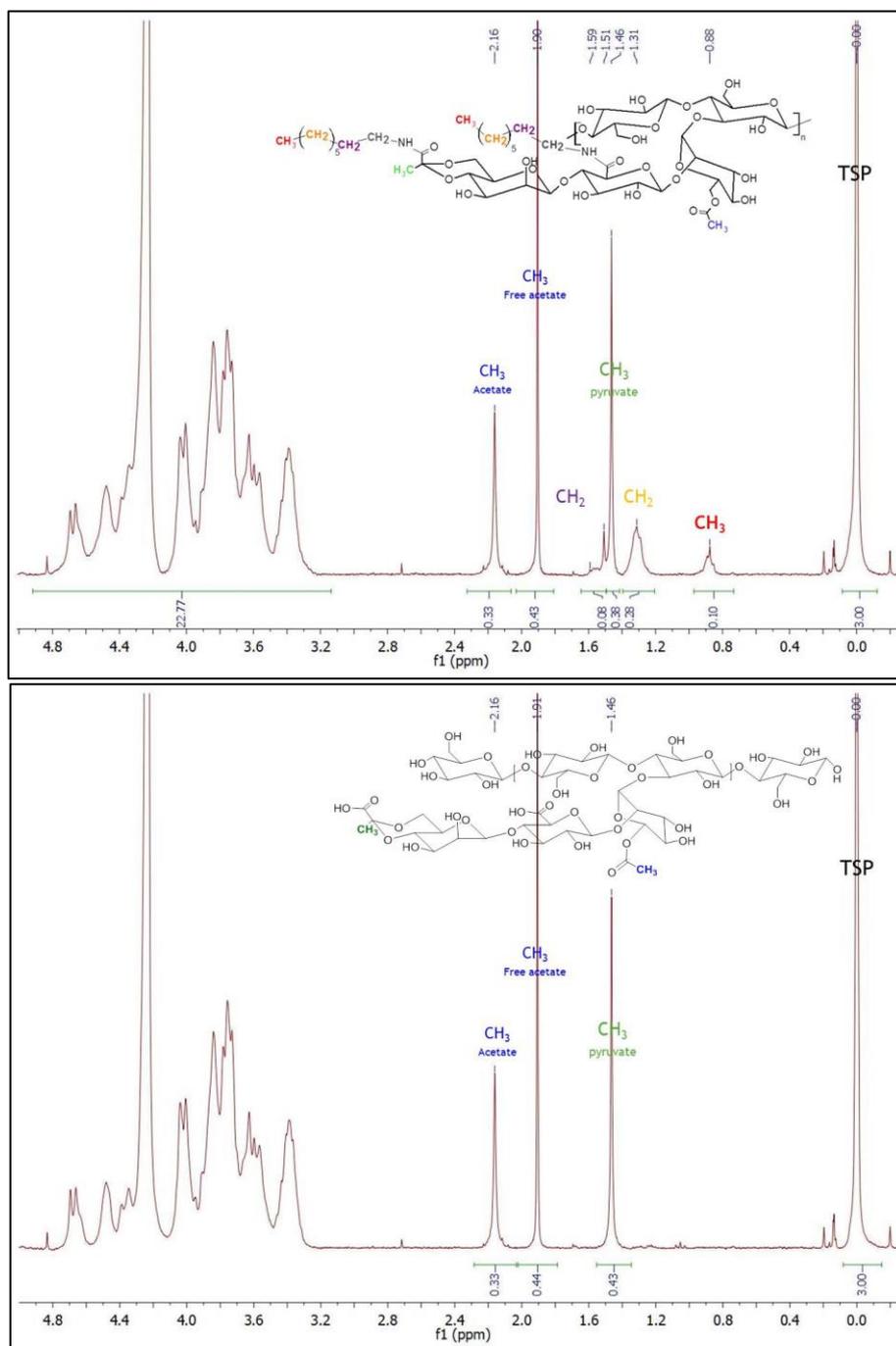


Figure 1: ¹H NMR spectra of the precursor (top) and X⁹C₈dis (bottom) in D₂O at 80 °C.

On the other hand, after modification, additional peaks are detected. The ones at 0.88 ppm are attributed to the three terminal methyl protons of the grafted octyl chain, the peak at 1.59 ppm for the two non-chemically equivalent CH₂ protons in β-position compared to the amide function and the peak at 1.31 ppm attributed to the six others CH₂ protons. The pyruvate peak was split into two peaks: the first one at 1.46 ppm corresponding to pyruvate groups that were not affected by the

modification and the second one at 1.51 ppm corresponding to pyruvate groups bonded to an amide function. Therefore, it is possible to roughly estimate the proportions of modified pyruvic acid and glucuronic acid by integration of these two peaks.

All the data obtained for modification under both disordered and ordered conformations were analyzed and compared. Results, presented in Figure 2A, show that, for the modification in DMSO, the pyruvic and glucuronic functions are grafted within the same proportions. Hence, under this disordered conformation both pyruvic and glucuronic acid functions have the same reactivity as a consequence of identical accessibility. For the modification under helical conformation, most of the modified functions are located on the pyruvic acid (between 80 and 100%). This could be explained by a better accessibility of the pyruvic acid functions that are located at the chain extremity while the glucuronic acids are much less accessible to react due to their involvement in hydrogen bonds that stabilize the helix^{19,37}.

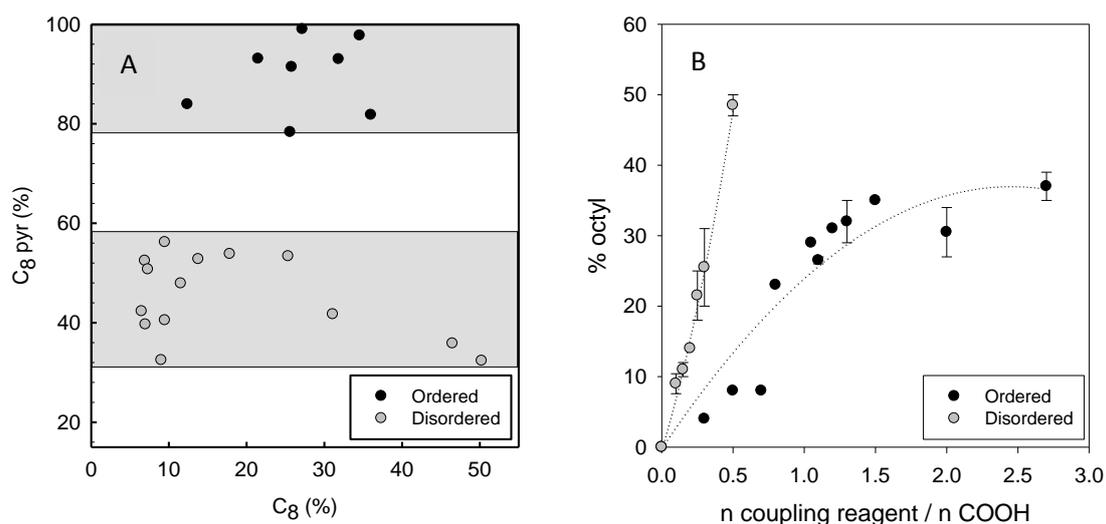


Figure 2: (A) Evolution of the relative pyruvic acid grafting density as a function of the overall grafting density. (B) Evolution of the overall grafting density as a function of the coupling reagents quantity.

Figure 2B presents the overall octyl groups grafting density as a function of the conditions of modification, for both ordered and disordered conformations. As clearly visible on Figure 2B, adjusting the stoichiometry of the coupling reagents allows controlling the grafting density for both conformations, thus giving access to a wide range of hydrophobically modified xanthan derivatives.

In addition, results indicate that the modification performed in DMSO is also more efficient and the grafting density increases linearly with the coupling agents' quantity. This can be explained by the better accessibility of glucuronic acid groups under disordered conformation as mentioned above. Precipitation of the modified polymer in water was observed when HBTU and triethylamine were added in quantity higher than 0.5 equivalents. In that case, we assumed that the polymer was too

much grafted with hydrophobic moieties to remain soluble in water. So in order to keep the derivatives water-soluble, the maximum grafting density is here around 50%.

In water, the reaction reached a maximum of grafting density around 40%. Since the pyruvate density is 50% for the present xanthan, this is consistent with the previous results on the poor accessibility of the glucuronic groups.

○ Derivative conformation

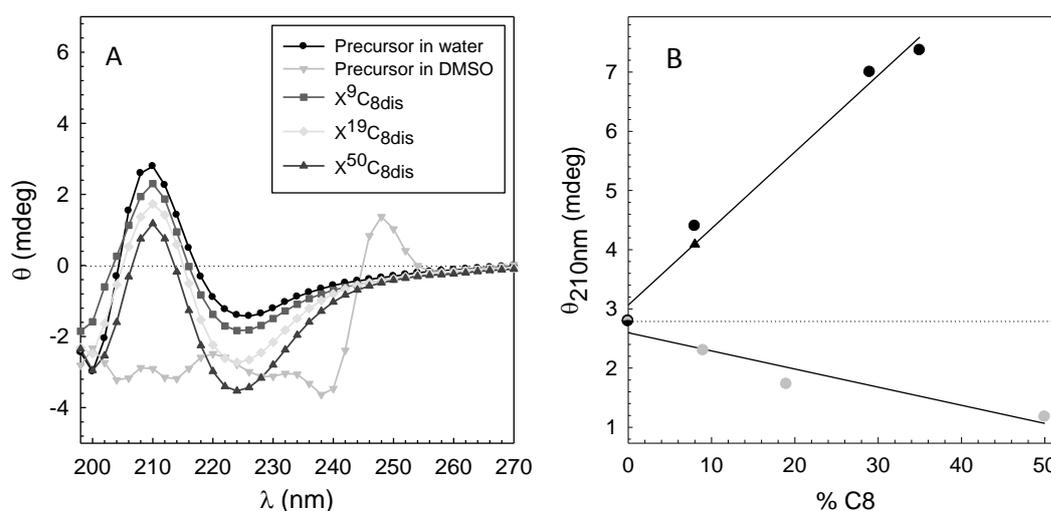


Figure 3: (A) Circular dichroism spectra of the precursor in water and in DMSO, X^9C_{8dis} , $X^{19}C_{8dis}$ and $X^{50}C_{8dis}$ in water at 1 g/L. (B) Evolution of ellipticity at 210nm as function of the grafting density for modified xanthan under ordered (black symbols), and disordered conformations (grey symbols). The black triangle corresponds to xanthan modified under ordered conformation and then disordered in DMSO.

Prior to rheological characterization of the amphiphilic xanthan, chain's conformation in aqueous solution after modification was characterized by circular dichroism. Figure 3A shows circular dichroism spectra for precursor and derivatives modified in DMSO at different grafting densities in buffered water. Note that both precursor in DMSO and in water exhibited the same CD spectra once poured in water, we plot only the precursor obtained in DMSO for clarity. All spectra display a positive band at 210 nm, corresponding to the carboxylic functions, and a negative band at 225 nm, attributed to the acetyl groups of the polymer side chain. These bands are characteristic features of xanthan chain under ordered conformation^{19,38,39}. These results show that after modification under disordered conformation, amphiphilic derivatives are able to adopt a reordered conformation when poured back in buffered water. Nevertheless, the absolute intensity of the band at 210 nm is decreasing with increasing grafting density while the amplitude of the band at 225 nm is increasing. The degree of xanthan chain ordering can be characterized by the intensity of the band at 210 nm, the higher the intensity the more ordered the xanthan is^{38,39}. In figure 3B, the intensity of the band at

210 nm is plotted as a function of the grafting density for derivatives modified under both ordered and disordered conformation. For xanthan modified under ordered conformation, the presence of hydrophobic moieties reinforces the chain ordering as already stated in a previous study⁴⁰. On the other hand, for xanthan modified under disordered conformation, these moieties cause a progressive decrease in the chain rigidity. The decrease of the band at 225 nm confirms the disordering as the grafting density increases³⁸. These observations suggest that the two methods of modification have opposite impacts on the organization of xanthan chains in solution and, consequently, on the rheological properties as well (see next part).

So here, we demonstrate that after disordering xanthan in DMSO, the latter is able to reorder once poured in water. On the one hand, precursor owns the same degree of ordering before and after being disordered in DMSO. On the other hand, modified xanthans in DMSO have their degree of ordering decreasing when grafting density increases. For instance, $X^{50}C_{8dis}$ is about 2.4 times less ordered than the precursor. Finally, as already mentioned above, glucuronic acid functions are known to stabilize the ordered conformation by H-bonding. In DMSO, these functions are significantly modified through grafting, thus the modified groups are no more able to contribute to the helix stabilization. This probably explains the chains disordering with increasing grafting density in the case of xanthan modified in DMSO.

- Rheology

First of all, the viscoelastic properties of precursors, for both ordered and disordered modification procedures, have been studied over a wide range of temperatures. From the frequency dependence curves of G' and G'' as a function of the temperature, it is possible to build a master curve by the means of frequency-temperature superposition^{21,41,42}. As shown in figure 4, both precursors exhibit the typical features of a xanthan solution⁴¹. At high frequencies and low temperatures, the precursors behave like a weak gel due to intermolecular hydrogen bonds, with G' higher than G'' and a low frequency dependence for both moduli. On the other hand, at low frequencies and high temperatures, the latter exhibit a liquid-like behavior. Moreover, the temperature dependence of the viscoelastic properties of xanthan can be described by an Arrhenius' law (see the inset of Figure 4). The activation energies of both precursors are nearly the same: 68 kJ/mol for the one prepared under its disordered conformation and 60 kJ/mol for the one under its ordered conformation, both being within the order usually reported for unmodified xanthan^{21,41}. As shown in Figure 4, both curves superimpose very well for G' and G'' over the entire temperature and frequency range investigated. Hence both precursors have the same behavior thus indicating that no degradation of the polymer occurs during dissolution and purification process; otherwise, it shows that the

precursor obtained in DMSO is able to reorder the same way when poured back in water which confirms the results gathered from circular dichroism analysis.

The same approach was applied to xanthan modified under its disordered conformation. As an example, Figure 5A represents the frequency dependence of G' and G'' at different temperatures for X^0C_{8dis} . From 20 °C to 40 °C, the modified polymer behaves as a visco-elastic liquid similar to that observed for the precursor³⁰. Above 50 °C, a dramatic change in viscoelastic properties occurs (see Figure 5B).

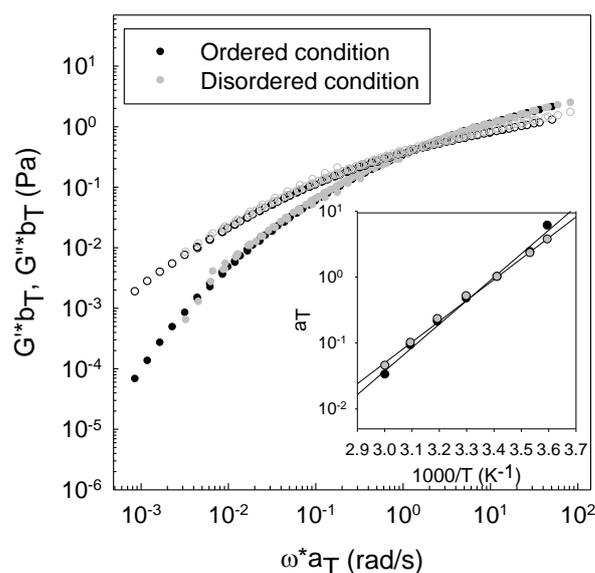


Figure 4: Frequency-temperature master curves of the frequency dependence of the storage G' (filled symbols) and loss G'' (open symbols) modulus for the ordered and disordered precursor at 2 g/L ($T_{ref}=20^\circ\text{C}$). Inset: Horizontal shift factors (a_T) as a function of the inverse absolute temperature.

Indeed, the system displays a chemical gel-like behavior with G' higher than G'' within the whole range of frequencies with both moduli frequency independent. Construction of a master-curve then becomes no more possible. This is most likely due to the strong hydrophobic interactions which are allowed thanks to chains flexibility. Moreover, no relaxation of the chain is observed within the studied frequency range nor with temperature, which is unexpected for this length of alkyl chains. The system remains gelified after cooling but it can be broken down by applying a strong shear and then goes back to the liquid behavior (data not shown). Similar results were observed with modified polymers with higher grafting density.

The frequency dependence of the shear moduli as a function of time at 20°C has also been investigated. The previous section has shown that the modified polymers, once in aqueous media, behave as gels increasing temperature; nevertheless this phenomenon also occurs with time as visible on Figure 5C. For this sample, the system behaves as a liquid with $G'' > G'$ until 6120 seconds;

then both moduli strongly raise and an abrupt transition occurs thus the system exhibits a gel-like behavior. This sudden transition from liquid to solid behavior with both temperature and time could be related to a percolation mechanism⁴³ (see Figure 5B and 5C). Frequency sweep after gelation demonstrates that both moduli were frequency independent with G' about 20 times higher than G'' (result not shown). Similar results were observed at lower concentrations. Of course, the final values of both moduli decrease with decreasing the concentration but gelation of the system still occurs at concentration as low as 0.05 g/L. These results suggest a promising application for such xanthan derivative as a gelling agent since it can form a gel even at very low concentrations.

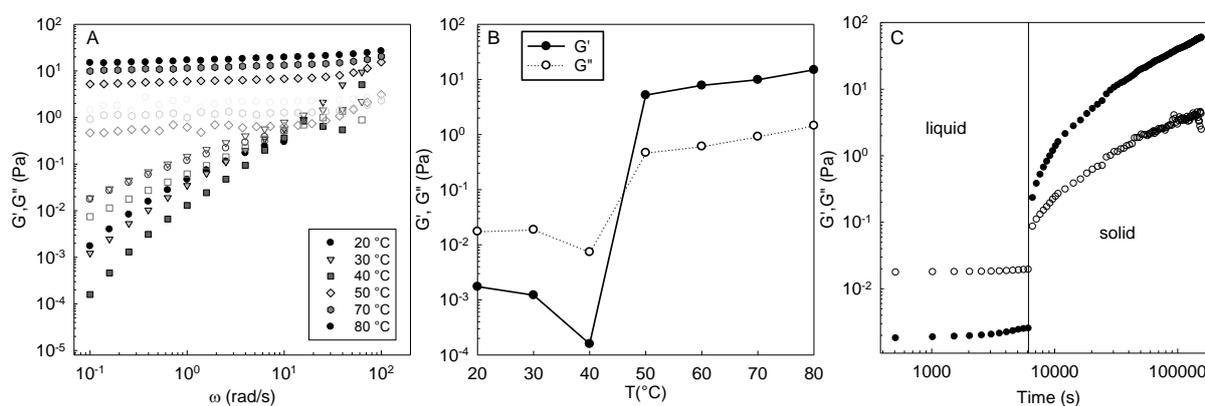


Figure 5: A) Frequency dependence of the storage G' (filled symbols) and loss G'' (open symbols) shear moduli at different temperatures for X^9C_{8dis} at 2 g/L. B) Temperature dependence of G' and G'' shear moduli at $\omega = 0.1$ rad/s. C) Time dependence of G' (filled symbols) and G'' (open symbols) shear moduli at 20 °C and $\omega = 0.1$ rad/s for X^9C_{8dis} at 2 g/L.

The conformation adopted by the polymer during the grafting procedure has a major impact on the rheological properties (see Figure 6). On the one hand, xanthan modified under ordered conformation exhibits similar behavior as pristine xanthan. Results show that the helical conformation, stabilized via hydrogen bonds, is lowly affected by the chemical modification, only the chain relaxation is strongly slowed down, up to 30 000 times slower for the most grafted compared to the precursor³⁰. The high stiffness of xanthan helices does not allow hydrophobic moieties to self-associate as usually observed for flexible amphiphilic polymers. Hydrophobically modified xanthan under its ordered conformation are amphiphilic but not associative polymers³⁰. On the other hand, xanthan modified under its disordered conformation is able to partially reorder in aqueous solution as shown by circular dichroism. Increasing the grafting density leads to a progressive increase in the chain flexibility. The latter is in favor of the hydrophobic interactions which dominate the organization of the chains in solution, leading to a chemical gel-like behavior with G' and G'' frequency independent and no relaxation of the chain in the studied frequency and temperature range.

These different behaviors could be explained by the conformation adopted by the polymer during the modification. Indeed, depending on the conformation, the two grafting sites (pyruvic and glucuronic acids) do not have the same accessibility. For the modification under ordered conformation, we previously evidenced that most of the modified functions are located on the pyruvic acids. Thus, glucuronic acids remain unmodified and, therefore, able to form hydrogen bonds to stabilize the helix, leading to the typical rheological behavior of ordered xanthan.

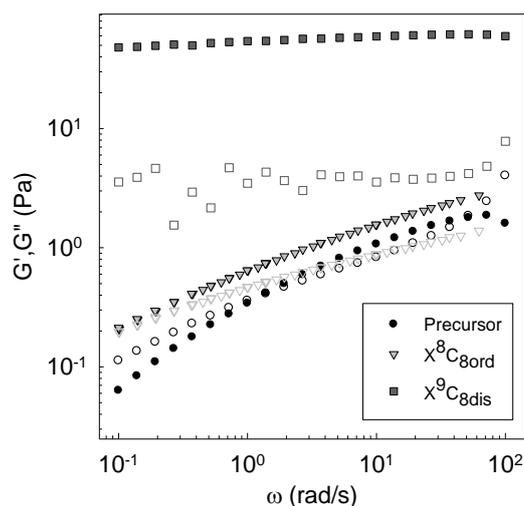


Figure 6: Frequency dependence of the storage G' (filled symbols) and loss G'' (open symbols) shear moduli at 20°C for precursor, X^8C_{8ord} and X^9C_{8dis} at 2 g/L.

On the contrary, due to their better accessibility in DMSO, glucuronic acids are more grafted in these conditions and, consequently, no more available to maintain the hydrogen bonds. This induces the helix destabilization, leading to a decrease in the backbone rigidity and promotes the association of hydrophobic moieties. Hence glucuronic acids play an essential role in the conformation adopted by the modified polymer once poured back in water, depending on whether they are affected or not by the modification.

To confirm this hypothesis and to better understand the impact of the chains conformation on the rheological properties, we decided to compare the re-organization of a xanthan modified under its ordered conformation then disordered in DMSO with another one directly grafted under its disordered conformation. To this aim, a xanthan derivative prepared under its ordered conformation was poured in DMSO, stirred at 80 °C during 4h for complete dissolution and then at room temperature overnight. Afterwards, the solution went through successive dialysis steps against DMSO for 24h in order to complete the disordering of the derivative chains and then against distilled and ultrapure water for 7 days.

Circular dichroism measurements were conducted in water for X^8C_{8ord} before and after dialysis against DMSO. CD measurement in DMSO was also done to confirm that the modified chain can be

disordered. As expected, X^8C_{8ord} before dialysis exhibits a highly ordered conformation as illustrated by the intense band at 210 nm (see figure 3B). On the other hand, after being disordered in DMSO and then poured back in water, the very same sample still exhibits an ordered conformation. Nevertheless, the band at 210 nm appears less intense than before dialysis but still more intense than X^8C_{8dis} (see the black triangle in Figure 3B). Hence, this proves that xanthan modified under its ordered conformation then disordered is able to reorder but in a lesser extent compared to its initial state (data not shown). Yet, modified xanthan under its ordered conformation is still able to adopt a more rigid conformation after the disordering treatment in DMSO than the one modified under its disordered conformation, because the former has more non modified glucuronic functions available for stabilizing the helix than the latter. Hence, these results tend to confirm the major role of the glucuronic acids on xanthan conformation.

The viscoelastic properties of both systems, before disordering and after reordering, were studied and Figure 7 presents the resulting master curves for X^8C_{8ord} . From a general point of view, frequency-temperature superposition was possible after dialysis in DMSO while it was not possible for derivative directly modified in DMSO. X^8C_{8ord} after dialysis exhibits the typical rheological behavior of xanthan modified under its ordered conformation. However, after the dialysis in DMSO, the relaxation time of the system decreases showing a rise of the chains dynamics, characteristic of a less rigid helix. This result is consistent with circular dichroism that proves that chains ordering decreases after dialysis.

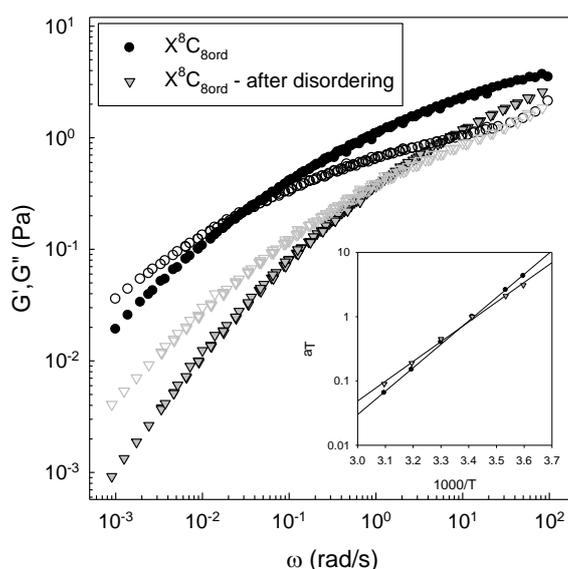


Figure 7: Frequency-temperature master curves of the frequency dependence of the storage G' (filled symbols) and loss G'' (open symbols) shear moduli at different temperatures ($T_{ref}=20^{\circ}C$) for X^8C_{8ord} before and after dialysis in DMSO at 2 g/L. Inset: Horizontal shift factors (a_T) as a function of the inverse absolute temperature.

Because they do not have the same behavior, it is important to distinguish xanthan modified under disordered conformation to the one modified under its ordered form, then disordered in DMSO and finally let reordering in water. This study demonstrates that gelation of the system only occurs when the polymer is modified under its disordered conformation and confirms that the chain stiffness during modification has a strong impact on associative and physicochemical properties of amphiphilic xanthan which is undoubtedly related to the grafting sites.

- Conclusion

The objective of the current work was to study the impact of the backbone stiffness on both conformation and viscoelastic properties of hydrophobically modified xanthan. To that purpose, two modification protocols of xanthan on both ordered and disordered conformation are required. Xanthan modification under ordered conformation and its characterization have already been reported³⁰. Herein we developed an efficient protocol to modify xanthan under its disordered conformation in a controlled manner which has never been done so far to the best of our knowledge. We demonstrated that after modification under its disordered conformation xanthan can readopt an ordered conformation once poured back in water. However, xanthan ordering is much less than for pristine xanthan and the order decreases with increasing grafting density. The opposite tendency was observed when modified under ordered conformation. As a consequence, viscoelastic properties are also completely different. On the one hand, xanthan modified under ordered conformation behave similarly to pristine xanthan with a relaxation time that increases with increasing grafting density by a sticky relaxation process, which is attributed to the increase in backbone rigidity. On the other hand, xanthan modified under disordered conformation forms a gel with increasing temperature or with time most likely akin to a percolation mechanism. The gel formation was observed for concentration as low as 0.05 g/L that we attribute to intermolecular hydrophobic interactions which are possible thanks to the gain in backbone flexibility. In addition, we demonstrated that depending on the chains conformation during modification, the grafting distribution between pyruvic acid and glucuronic acid dramatically changes which is responsible of the observed results: a great thickening ability when the backbone is highly rigid or a gelling property if the chains are more flexible. This proves the intimate relation between the polymer structure and its macroscopic properties. These properties are of important interest for both academic and industrial application as texturing agent.

Acknowledgements:

C. F. and A. R. acknowledge the Région Haute Normandie for supporting this work.

References:

- (1) Prabakaran, M. Review Paper: Chitosan Derivatives as Promising Materials for Controlled Drug Delivery. *J. Biomater. Appl.* **2008**, *23* (1), 5–36.
- (2) Devi, N.; Sarmah, M.; Khatun, B.; Maji, T. K. Encapsulation of Active Ingredients in Polysaccharide-Protein Complex Coacervates. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *239*, 136–145.
- (3) Ma, L.; Chen, H.; Zhang, Y.; Zhang, N.; Fu, L. Chemical Modification and Antioxidant Activities of Polysaccharide from Mushroom *Inonotus Obliquus*. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89* (2), 371–378.
- (4) Charpentier-Valenza, D.; Merle, L.; Mocanu, G.; Picton, L.; Muller, G. Rheological Properties of Hydrophobically Modified Carboxymethylcelluloses. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *60* (1), 87–94.
- (5) Babak, V. G.; Skotnikova, E. A.; Lukina, I. G.; Pelletier, S.; Hubert, P.; Dellacherie, E. Hydrophobically Associating Alginate Derivatives: Surface Tension Properties of Their Mixed Aqueous Solutions with Oppositely Charged Surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *225* (2), 505–510.
- (6) Akiyama, E.; Kashimoto, A.; Fukuda, K.; Hotta, H.; Suzuki, T.; Kitsuki, T. Thickening Properties and Emulsification Mechanisms of New Derivatives of Polysaccharides in Aqueous Solution. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *282* (2), 448–457.
- (7) Rouzes, C.; Durand, A.; Leonard, M.; Dellacherie, E. Surface Activity and Emulsification Properties of Hydrophobically Modified Dextrans. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *253* (1), 217–223.
- (8) Mayol, L.; Biondi, M.; Russo, L.; Malle, B. M.; Schwach-Abdellaoui, K.; Borzacchiello, A. Amphiphilic Hyaluronic Acid Derivatives toward the Design of Micelles for the Sustained Delivery of Hydrophobic Drugs. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102*, 110–116.
- (9) Hassani, L. N.; Hendra, F.; Bouchemal, K. Auto-Associative Amphiphilic Polysaccharides as Drug Delivery Systems. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (11–12), 608–614.
- (10) Wever, D. A. Z.; Picchioni, F.; Broekhuis, A. A. Polymers for Enhanced Oil Recovery: A Paradigm for Structure-Property Relationship in Aqueous Solution. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (11), 1558–1628.
- (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) Desbrieres, J.; Martinez, C.; Rinaudo, M. Hydrophobic Derivatives of Chitosan: Characterization and Rheological Behaviour. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *19* (1), 21–28.
- (13) Yoshida, K.; Sato, T.; Osumi, T.; Ulset, A.-S. T.; Christensen, B. E. Conformation of Carboxylated Schizophyllan in Aqueous Solution. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *134*, 1–5.
- (14) Mendes, A. C.; Baran, E. T.; Nunes, C.; Coimbra, M. A.; Azevedo, H. S.; Reis, R. L. Palmitoylation of Xanthan Polysaccharide for Self-Assembly Microcapsule Formation and Encapsulation of Cells in Physiological Conditions. *Soft Matter* **2011**, *7*, 9647–9658.

- (15) Jansson, P.; Kenne, L.; Lindberg, B. Structure of the Extracellular Polysaccharide from *Xanthomonas Campestris*. *Carbohydr. Res.* **1975**, *45* (1), 275–282.
- (16) Garcia-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gomez, E. Xanthan Gum: Production, Recovery, and Properties. *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18* (7), 549–579.
- (17) Casas, J. A.; Santos, V. E.; Garcia-Ochoa, F. Xanthan Gum Production under Several Operational Conditions : Molecular Structure and Rheological Properties. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, No. 26, 282–291.
- (18) Papagianni, M.; Psomas, S. K.; Batsilas, L.; Paras, S. V.; Kyriakidis, D. A. Xanthan Production by *Xanthomonas Campestris* in Batch Culture. *Process Biochem.* **2001**, *37*, 73–80.
- (19) Milas, M.; Rinaudo, M. Conformational Investigation on the Bacterial Polysaccharide Xanthan. *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 189–196.
- (20) Matsuda, Y.; Biyajima, Y.; Sato, T. Thermal Denaturation, Renaturation, and Aggregation of a Double-Helical Polysaccharide Xanthan in Aqueous Solution. *Polym. J.* **2009**, *41* (7), 526–532.
- (21) Choppe, E.; Puaud, F.; Nicolai, T.; Benyahia, L. Rheology of Xanthan Solutions as a Function of Temperature, Concentration and Ionic Strength. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (4), 1228–1235.
- (22) Capron, I.; Brigand, G.; Muller, G. Thermal Denaturation and Renaturation of a Fermentation Broth of Xanthan: Rheological Consequences. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, *23* (3), 215–225.
- (23) Lecourtier, J.; Chauveteau, G.; Muller, G. Salt-Induced Extension and Dissociation of a Native Double-Stranded Xanthan. *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8* (5), 306–310.
- (24) Sato, T.; Norisuye, T.; Fujita, H. Double-Stranded Helix of Xanthan: Dimensional and Hydrodynamic Properties in 0.1 M Aqueous Sodium Chloride. *Macromolecules* **1984**, *17* (12), 2696–2700.
- (25) Sato, T.; Norisuye, T.; Fujita, H. Double-Stranded Helix of Xanthan in Dilute Solution: Evidence from Light Scattering. *Polym. J.* **1984**, *16* (4), 341–350.
- (26) Gils, P. S.; Ray, D.; Sahoo, P. K. Characteristics of Xanthan Gum-Based Biodegradable Superporous Hydrogel. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *45* (4), 364–371.
- (27) Shalviri, A.; Liu, Q.; Abdekhodaie, M. J.; Wu, X. Y. Novel Modified Starch–Xanthan Gum Hydrogels for Controlled Drug Delivery: Synthesis and Characterization. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79* (4), 898–907.
- (28) Bejenariu, A.; Popa, M.; Le Cerf, D.; Picton, L. Stiffness Xanthan Hydrogels: Synthesis, Swelling Characteristics and Controlled Release Properties. *Polym. Bull.* **2008**, *61* (5), 631–641.
- (29) Mendes, A. C.; Baran, E. T.; Reis, R. L.; Azevedo, H. S. Fabrication of Phospholipid–Xanthan Microcapsules by Combining Microfluidics with Self-Assembly. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (5), 6675–6685.
- (30) Roy, A.; Comesse, S.; Grisel, M.; Hucher, N.; Souguir, Z.; Renou, F. Hydrophobically Modified Xanthan: An Amphiphilic but Not Associative Polymer. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1160–1170.
- (31) Wu, S.-J.; Wu, J.-H.; Xia, L.-Z.; Chu, C.; Liu, D.; Gong, M. Preparation of Xanthan-Derived Oligosaccharides and Their Hydroxyl Radical Scavenging Activity. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92* (2), 1612–1614.
- (32) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. L’hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (15), 1269–1272.

- (33) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bamwarth, W.; Gillessen, D. New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (15), 1927–1930.
- (34) Sureshbabu, V. V.; Lalithamba, H. S.; Narendra, N.; Hemantha, H. P. New and Simple Synthesis of Acid Azides, Ureas and Carbamates from Carboxylic Acids: Application of Peptide Coupling Agents EDC and HBTU. *Org Biomol Chem* **2010**, *8* (4), 835–840.
- (35) Adam, S.; Kaufmann, F. A New Class of Potent Antiproliferative Glycolipids. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *59* (3), 255–261.
- (36) Rinaudo, M.; Milas, M.; Lambert, F. ¹H and ¹³C NMR Investigation of Xanthan Gum. *Macromolecules* **1983**, *16* (5).
- (37) Ross-Murphy, S. B.; Morris, V. J.; Morris, E. R. Molecular Viscoelasticity of Xanthan Polysaccharide. In *Faraday Symposia of the Chemical Society*; Royal Society of Chemistry, 1983; Vol. 18, pp 115–129.
- (38) Morris, E. R.; Rees, D. A.; Young, G.; Walkinshaw, M. D.; Darke, A. Order-Disorder Transition for a Bacterial Polysaccharide in Solution. A Role for Polysaccharide Conformation in Recognition between Xanthomonas Pathogen and Its Plant Host. *J. Mol. Biol.* **1977**, *110* (1), 1–16.
- (39) Capron, I.; Brigand, G.; Muller, G. About the Native and Renatured Conformation of Xanthan Exopolysaccharide. *Polymer* **1997**, *38* (21), 5289–5295.
- (40) Roy, A. N.; Benyahia, L.; Grisel, M.; Renou, F. Shear Interfacial Viscoelasticity of Native and Hydrophobically Modified Xanthan at Oil/Water Interface. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 887–894.
- (41) Renou, F.; Petibon, O.; Malhiac, C.; Grisel, M. Effect of Xanthan Structure on Its Interaction with Locust Bean Gum: Toward Prediction of Rheological Properties. *Food Hydrocoll.* **2013**, *32* (2), 331–340.
- (42) Pelletier, E.; Viebke, C.; Meadows, J.; Williams, P. A. A Rheological Study of the Order–Disorder Conformational Transition of Xanthan Gum. *Biopolymers* **2001**, *59* (5), 339–346.
- (43) Rubinstein, M.; Colby, R. H.; Gillmor, J. R. Dynamic Scaling for Polymer Gelation. *Chem. Phys.* **1989**, *51*, 66–74.

En résumé :

Le protocole développé dans le DMSO permet de greffer des chaînes hydrophobes sur les fonctions acide carboxylique du xanthane sous forme désordonnée. A notre connaissance, il s'agit du premier exemple décrit de modification chimique du xanthane sous cette forme. Des xanthanes modifiés sous forme ordonnée ont également été obtenus grâce à un protocole développé par A. Roy. Nous avons donc accès à une large gamme de dérivés amphiphiles du xanthane. Ainsi, il est possible d'étudier l'impact de la rigidité de la chaîne lors de la modification sur les propriétés en solution.

Il avait été démontré auparavant que le xanthane modifié sous forme ordonnée présente un comportement similaire au précurseur. La conformation hélicoïdale, stabilisée par liaisons hydrogène, s'avère peu affectée par la modification chimique. Néanmoins, les greffons hydrophobes ralentissent très fortement la dynamique de relaxation des chaînes amphiphiles, selon un processus qualifié de « relaxation collante ». Ce phénomène est d'autant plus marqué que la densité de greffage est élevée. La rigidité de la chaîne empêche son repliement sur elle-même pour former des microdomaines hydrophobes. Par conséquent, les xanthanes modifiés sous **forme ordonnée** sont des polymères **amphiphiles** mais **non associatifs**.

A l'inverse, les xanthanes modifiés sous forme désordonnée sont capables de se réordonner partiellement en solution aqueuse. L'augmentation du taux de greffage entraîne une diminution de la rigidité de la chaîne. Cette flexibilité de la chaîne est favorable aux interactions hydrophobes entre les greffons, interactions qui dictent l'organisation des chaînes en solution et sont responsables du comportement de gel. De plus, nous avons montré que les conditions de modification chimique sont déterminantes puisqu'un xanthane modifié sous forme ordonnée puis désordonné dans le DMSO ne présente absolument pas ce type de comportement. Ainsi, les xanthanes modifiés sous forme désordonnée sont donc des polymères **amphiphiles associatifs**.

De ce fait, nous avons pu établir à l'aide d'analyses en RMN que selon la conformation adoptée par le polymère pendant la modification, les sites de greffage notamment les acides glucuronique sont plus ou moins accessibles. Or, ces acides sont responsables de la stabilisation de l'hélice *via* des liaisons hydrogène, expliquant que leur modification impacte de façon majeure la conformation du polymère modifié et de la même façon ses propriétés en solution.

Ces résultats nous permettent donc de conclure qu'il y a bien un impact de la rigidité de la chaîne polymère lors de la modification chimique sur les propriétés associatives en solution et confirmant ainsi, dans le cas du xanthane, qu'il existe une relation entre l'organisation de la chaîne polymère et les propriétés qui en découlent.

Ouverture : Greffage de la benzylamine

Les résultats obtenus précédemment suggèrent la possibilité d'un greffage régiosélectif selon la conformation adoptée par le polymère dans le milieu réactionnel.

L'objectif de cette étude est de parvenir à greffer deux amines différentes d'une part sur les acides pyruvique et d'autre part sur les fonctions acide glucuronique. Pour la deuxième amine, nous avons sélectionné la benzylamine. Ce choix se justifie par le fait qu'en RMN, les protons aromatiques sortent entre 6 et 9 ppm et sont ainsi facilement reconnaissables et distinguables des autres protons présents sur le polymère.

Pour parvenir à cet objectif, la réaction se fait en deux étapes successives.

- Tout d'abord, l'octylamine est greffée sur le xanthane sous sa forme ordonnée. En effet, le protocole de modification dans l'eau permet de cibler majoritairement les acides pyruvique du fait de leur meilleure accessibilité sous cette conformation. Ainsi, afin de greffer un maximum d'acides pyruvique, la quantité d'octylamine introduite est :

$$\frac{n_{\text{octylamine}}}{n_{\text{COOH}}} = 2,7$$

Le polymère obtenu est alors purifié par différentes étapes de dialyse avant d'être lyophilisé.

- Le polymère obtenu lors de la première étape est alors dissous dans du DMSO. Cette fois ci, on cherche à greffer la benzylamine préférentiellement sur les fonctions acide glucuronique du xanthane sous sa forme désordonnée. Le protocole de modification du xanthane dans le DMSO permet de greffer de façon équivalente les deux acides (même accessibilité), or du fait de la première partie de la réaction, les acides pyruviques ne sont peu disponibles (voir le Tableau 6). La quantité de matière de benzylamine testée est de :

$$\frac{n_{\text{benzylamine}}}{n_{\text{COOH}}} = 0,2$$

La purification du milieu réactionnel est de nouveau réalisée par dialyses.

La Figure 43 présente les spectres RMN obtenus lors de la 1^{ère} et de la 2^{ème} étape de modification. Après la 1^{ère} étape (voir la Figure 43A), on constate bien la présence des pics correspondant aux protons de la chaîne alkyle de l'octylamine : les trois protons du groupement méthyle terminal à 0,88 ppm, les protons CH₂ de la chaîne alkyle à 1,31 ppm et les deux protons du CH₂ situé en position β de la fonction amide à 1,59 ppm. La densité de greffage en octylamine est de 30 %. Après la 2^{ème} étape (voir Figure 43B), on observe l'apparition d'un pic supplémentaire vers 7,4 ppm caractéristique d'un cycle aromatique. La densité de greffage en benzylamine est de 14 %.

Nous avons vu que la densité de greffage maximale pour que le polymère reste soluble en solution aqueuse après greffage des chaînes octyles est d'environ 50 %. Il ne faut donc pas dépasser ce taux de greffage en densité de greffage d'octyle et de benzyle cumulé, ici on obtient 44 %.

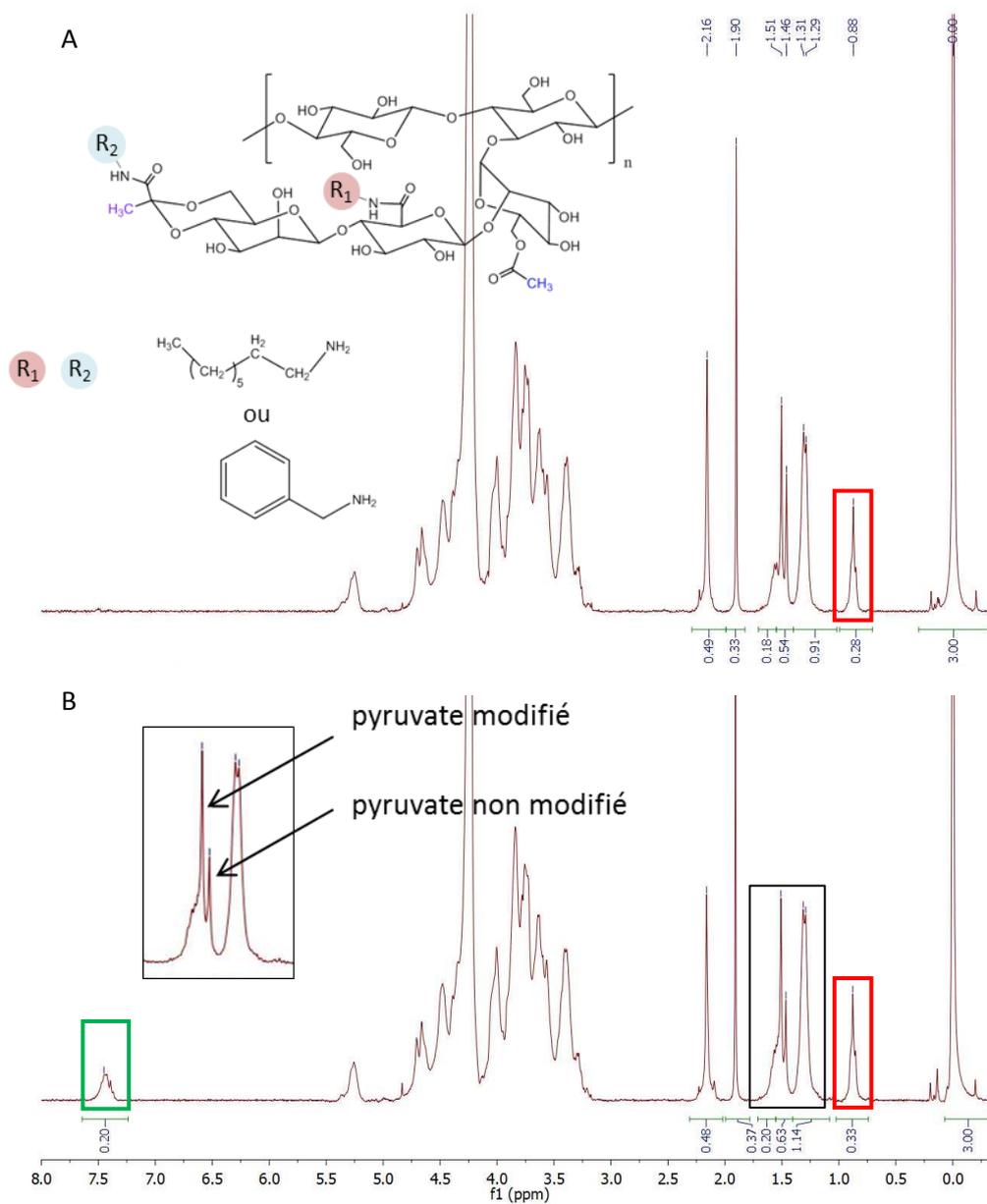


Figure 43 : Spectre RMN ^1H du xanthane modifié (A) dans l'eau avec une densité de greffage en octylamine de 30 % puis (B) dans le DMSO avec une densité de greffage en benzylamine de 14 %.

Par ailleurs, sur les spectres RMN, on observe un dédoublement du pic des pyruvates : un pic à 1,46 ppm correspondant aux pyruvates qui n'ont pas été modifiés et un deuxième à 1,51 ppm pour les pyruvates qui ont formé une liaison amide (Voir la Figure 43). Ainsi, par intégration de ces deux pics, il est possible d'estimer la proportion de groupements pyruvate modifiés à chaque étape. Les

données obtenues sont présentées dans le Tableau 6. Comme prévu, pour la 1^{ère} étape, la grande majorité des octyles greffés est située sur les pyruvates. Le xanthane étudié possédant 0,49 groupements pyruvate par unité de répétition et la densité de greffage en octyle étant de 30 %, une plus faible proportion des fonctions acides pyruvique restent disponibles pour la suite de la réaction.

Tableau 6 : Répartition de la densité de greffage à chaque étape entre les acides pyruvique et les acides glucuronique.

	Taux de greffage	% relatif d'acide pyruvique modifié	% relatif d'acide glucuronique modifié
1^{ère} étape	% octyl = 30 %	80	20
2^{ème} étape	% benzyl = 14 %	55	45

Néanmoins, après la 2^{ème} étape, on constate que le greffage des benzylamine est quasi statistique, comme observé précédemment dans le cas du greffage de l'octylamine sur le xanthane sous forme désordonnée.

L'ensemble de ces observations démontre qu'il n'est pas possible de greffer regioselectivement deux amines sur les fonctions acide carboxylique du xanthane en utilisant un protocole en deux étapes. Afin d'obtenir cette regioselectivité, il faudrait fonctionnaliser la totalité des acides pyruvique lors de la 1^{ère} étape.

Il serait pertinent de déterminer l'impact du greffage de la benzylamine sur l'organisation de la chaîne polymère en solution ainsi que sur ses propriétés rhéologiques. Cette étude n'a pas été réalisée dans le cadre de cette thèse.

Ces résultats ne sont que préliminaires puisque seulement deux synthèses ont été réalisées. Ils offrent cependant des perspectives intéressantes, notamment sur la possibilité de greffer deux groupements apportant des fonctions spécifiques différentes (anti bactérienne, anti fongique ...).

Partie 2 : Application des xanthanes amphiphiles à la stabilisation des émulsions

Cette deuxième partie présente les principaux résultats obtenus lors de l'application des xanthanes modifiés hydrophobiquement soit sous forme ordonnée, soit sous forme désordonnée à la stabilisation des émulsions. L'intérêt de cette partie consiste en la compréhension du comportement des xanthanes amphiphiles en émulsion. Elle s'articule autour de deux publications.

Afin de pouvoir comparer les différentes émulsions, il nous a fallu tout d'abord développer un protocole de formulation reproductible. Différents paramètres ont été étudiés :

- Composition : les émulsions étudiées ont une composition simple. Une phase grasse composée d'isononyl isononanoate (20 % m/m) et une phase aqueuse contenant le xanthane modifié (80 % m/m). En effet, l'objectif est de comprendre les phénomènes mis en jeu pour un système modèle. Les proportions de chaque phase ont été choisies de façon à se rapprocher des systèmes réels.
- Température : le contrôle de la température des deux phases est un paramètre important afin d'assurer la répétabilité du protocole. Ainsi, nous avons choisi de travailler à 30 °C ce qui permet de contrôler la température sans affecter la conformation du xanthane.
- Vitesse et temps d'homogénéisation : nous avons dû nous assurer que les xanthanes modifiés n'étaient pas dégradés pendant le processus d'émulsification. Dans ce but, nous avons testé différents couples vitesse/temps d'homogénéisation qui permettraient à la fois d'émulsionner le système sans détériorer les propriétés du xanthane. Ces dernières ont été étudiées avant et après homogénéisation par rhéologie. Le couple sélectionné pour notre protocole est 20 000 tour/min pendant 3 minutes.

Le protocole de formulation une fois fixé, des émulsions contenant du xanthane modifié sous forme ordonnée ont été préparées, sans ajout supplémentaire de tensioactif. L'objectif était de pouvoir conclure sur l'impact de la concentration en polymère ainsi que de la densité de greffage sur la microstructure et les propriétés des émulsions, afin de comprendre les phénomènes mis en jeu dans la stabilisation/déstabilisation de ces émulsions.

Ces travaux ont été valorisés par la publication suivante : « Hydrophobically modified xanthan: thickening and surface active agent for highly stable oil in water emulsion », acceptée dans Carbohydrate Polymers.

Publication 2: Hydrophobically Modified Xanthan: thickening and surface active agent for highly stable Oil in Water Emulsions

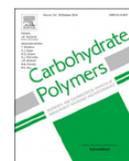
Carbohydrate Polymers 205 (2019) 362–370



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Hydrophobically modified xanthan: Thickening and surface active agent for highly stable oil in water emulsions



Céline Fantou^a, Sébastien Comesse^a, Frédéric Renou^b, Michel Grisel^{a,*}

^a Normandie Univ, UNILEHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, 76600 Le Havre, France

^b Le Mans Université, IMMM UMR-CNRS 6283, Polymères, Colloïdes, Interfaces, 72085 Le Mans Cedex 9, France

ARTICLE INFO

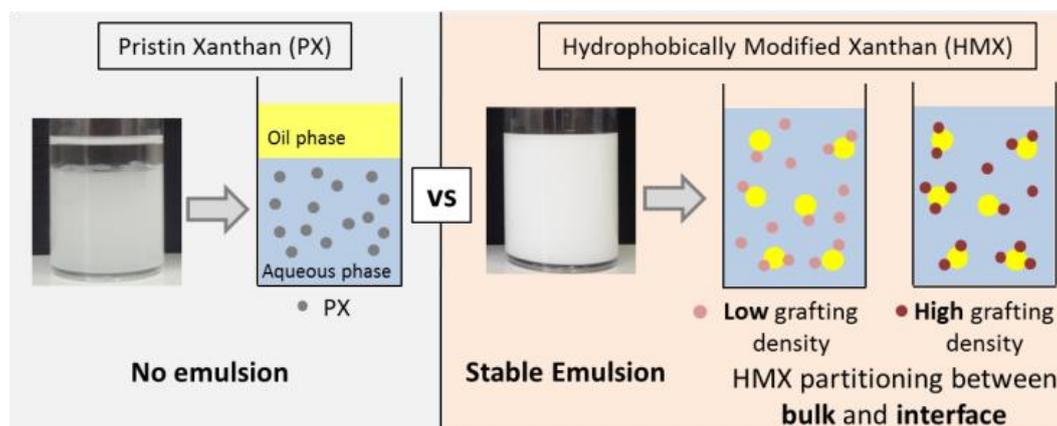
Keywords:

Hydrophobically modified xanthan
Surfactant free emulsion
Thickener
Surface active
Emulsion stability
Partitioning

ABSTRACT

Oil-in-water (O/W) emulsions were prepared using exclusively a hydrophobically modified xanthan (HMX) under ordered conformation without any surfactant. A series of HMX differing in grafting density were utilized at different concentrations. It was demonstrated that HMX stabilizes O/W emulsions where pristine xanthan do not. Indeed, in some cases, emulsions with HMX proved to be homogeneous and stable over months. Emulsions microstructure and rheological properties were investigated over time as a function of HMX concentration and grafting density in order to determine the mechanisms governing this efficient stability. The higher the HMX concentration is, the better the emulsions stability. However, unexpectedly, increasing the HMX grafting density leads to faster destabilization. The whole set of results demonstrate that the stability of the emulsions against coalescence and creaming is explained by partitioning of HMX molecules between bulk and interface, thus split between viscifying the aqueous phase and stabilizing the interface.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.052>



- Abstract

Oil-in-water (O/W) emulsions were prepared using exclusively a hydrophobically modified xanthan (HMX) under ordered conformation without any surfactant. A series of HMX differing in grafting density were utilized at different concentrations. It was demonstrated that HMX stabilizes O/W emulsions where pristine xanthan (PX) do not. Indeed, in some cases, emulsions with HMX proved to be homogeneous and stable over months. Emulsions microstructure and rheological properties were investigated over time as a function of HMX concentration and grafting density in order to determine the mechanisms governing this efficient stability. On the one hand, the higher the HMX concentration the better is the emulsions stability. On the other hand, unexpectedly, increasing the HMX grafting density leads to faster destabilization. The whole results demonstrate that the stability of the emulsions against coalescence and creaming is explained by partitioning of HMX molecules between bulk and interface, thus split between viscosifying the aqueous phase and stabilizing the interface.

1. Introduction

Oil-in-water (O/W) emulsions are widely employed for industrial applications including foods, cosmetics, pharmaceuticals or agrochemicals. Since the contact between oil and water molecules is energetically unfavorable, emulsions are thermodynamically unstable¹. Indeed, they tend to undergo destabilization processes such as flocculation, coalescence, creaming or sedimentation and Ostwald ripening². However, kinetically metastable emulsions can be obtained by adding emulsifiers and thickening agent for instance³. Emulsifiers display surface activity and may adsorb at the O/W interface, thus favoring dispersion and stabilization of the oil droplets⁴. Among other thickening agents, polysaccharides are widely used for their great ability to increase the aqueous phase viscosity, leading to slow down droplets motion⁵; nevertheless such molecules usually own non-adsorbing character so they do not favor the interface stability. Among them, xanthan is the most used due to its outstanding thickening properties^{6,7}. Xanthan is an anionic bacterial polysaccharide whose structure is composed of a cellulosic backbone of β -D-glucose substituted on every two units with a charged trisaccharide side chain that includes a D-glucuronic acid between two D-mannoses⁸. Acetate and pyruvates groups can be present on inner and terminal mannoses of the side chain respectively⁹. Xanthan can adopt two different conformations¹⁰ in an aqueous solution: an ordered, rigid double-helix strand structure at low temperature and high ionic strength and a disordered, flexible coil state at high temperature and low ionic strength. The impact of xanthan concentration on O/W emulsions physicochemical properties has been intensively studied^{7,11,12}. In all cases, due to xanthan molecules poor interfacial properties, addition of low molecular emulsifiers remains

necessary to reach O/W emulsions stability. It has also been established that the presence of low amount of xanthan increases the rate of emulsion creaming due to depletion flocculation effect¹³⁻¹⁵. Nevertheless, the use of low molecular weight surfactants has been recently denounced due to toxicological and environmental considerations^{16,17}. On this basis, among other strategies the use of amphiphilic polysaccharides, such as hydrophobically modified starch¹⁸ or dextran¹⁹, has been extensively studied during the last decades in order to stabilize emulsions.

In a previous study, a series of amphiphilic xanthan derivatives was obtained by grafting alkyl residues onto their backbones under their ordered conformations²⁰. The study of the rheological properties of these derivatives at the O/W interface shows that the presence of grafted moieties strongly favors the interfacial adsorption of amphiphilic chains²¹, hence confirming the potential stabilizing properties for O/W dispersions. Based on these preliminary results, it was anticipated that such modified xanthan may combine both powerful thickening and emulsifying properties, thus preventing the use of additional surfactants.

The present study focuses on the investigation of hydrophobically modified xanthan derivatives (HMX) stabilizing properties of O/W emulsions. The strategy consists of reaching dispersions stability by taking profit of both thickening and interfacial properties of HMX, without further any addition of a low molecular weight surfactant. For this purpose, emulsions were prepared using amphiphilic xanthans at different concentrations and with grafting densities comprised between 8 and 32 %. All the emulsions properties and stability were studied over time with varying HMX content in order to understand the mechanisms governing emulsions stability.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The xanthan was provided by Danisco (France). Depending on the fermentation process²² or post fermentation treatment⁹, substitution degree of acetate and pyruvate on the trisaccharidic side chain varies and have an impact on the polymer properties²³. These substitution degrees can be determined by ¹H NMR²⁴; the xanthan used in this study owns substitution degrees of acetate and pyruvate are 0.87 and 0.49, respectively. In others words, this xanthan owns in average 0.87 acetate and 0.49 pyruvate functions per repeating unit^{20,25}. The moisture content determined by thermo gravimetric analysis and the protein content, determined by the Bradford procedure were 11.1 % and 0.1 %, respectively. Ultra-pure grade water was used for all the preparations. Hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Acros Organics; sodium chloride (NaCl) and sodium azide (NaN₃) used as preservative were from Sigma Aldrich. Isononyl isononanoate used as

the oil phase for all the emulsions was kindly given by Stearinerie Dubois (Boulogne Billancourt, France).

2.2. Synthesis and characterization of hydrophobically modified xanthan

HMX under ordered conformation were obtained based on a procedure described by A. Roy et al., 2014. Indeed, octyl residues were grafted onto the carboxylic functions of the polysaccharide *via* a peptidic coupling reaction between acidic moieties of xanthan and octylamine. On HMX NMR spectra in comparison with the one of xanthan, additional peak corresponding to octyl grafted moieties are detected and the grafting density was adjusted as previously described²⁰.

The nomenclature applied for the corresponding polysaccharides is X^AC₈, where A is the grafting density and 8 corresponds to the number of carbon atoms in the alkyl chain.

2.3. Protocol for emulsion preparation

Aqueous solutions of xanthan (pristine xanthan PX or hydrophobic derivative HMX) at concentration ranging from 0.0125 to 1.125 % w/w in water were prepared and stirred using a magnetic stirrer at room temperature (20 to 25°C) overnight. The pH was adjusted to 4.3 with 0.1 M HCl and the ionic strength to 1000 µS/cm with NaCl. 300 ppm of NaN₃ was added to the aqueous solution to prevent bacterial growth. All emulsions were O/W containing 20% oil (w/w) as presented in Table 1. This percentage was fixed since it corresponds to a common emulsions composition.

The overall content (100 % w/w) is adjusted by the quantity of water (Quantum Satis).

Table 1: Composition of the formulated system

	Content % (w/w)	Phase
Isononyl isononanoate	20	Oil phase
Xanthan (PX or HMX)	0.01 to 0.9	Aqueous phase
Preservative	0.025	
Ultrapure water	QS	

Due to the limited quantities of xanthan derivatives available, a formulation protocol adapted for emulsifying small quantity (20g) was developed based on both the literature (Kuhn & Cunha, 2012; Saharudi et al., 2016) combined with a preliminary study. Before mixing, each phase was pre-heated separately at 30 °C for 30 min. Phases were then mixed together and homogenized at 20 000 rpm for 3 min using a T25 digital ultra-turrax (IKA, Freiburg, Germany) equipped with the dispersing head S25N-10G. Each emulsion was prepared in duplicate to check preparation process reliability.

Emulsion with non-modified xanthan was prepared following the same procedure and used as reference.

Once prepared, all emulsions were stored at room temperature. Ageing was assessed by visual observations, optical microscopy and particle size distribution through granulometry measurements. In addition, rheological properties were analyzed on both solutions and emulsions using flow and oscillatory modes.

2.4. Methods

2.4.1. Visual observations

The macroscopic aspect of the emulsions was evaluated visually by means of photographs just after formulation and over time. Thus, it is possible to observe whether the entire oil phase was initially emulsified but also to follow the macroscopic destabilization phenomena during aging.

2.4.2. Droplet size distribution

Emulsion droplets size was measured by static light scattering using a laser diffraction particle size analyzer SALD-7500 nano (Shimadzu Co., Ltd, Japan) equipped with a violet semi-conductor laser (405 nm) and a reverse Fourier optical system. Emulsions were first diluted in deionized water prior to measurement in order to achieve absorption parameter equal to 0.15. Then, the dispersion introduced in the batch cell (7 cm³) and stirred during the measurement to assure dispersion homogeneity. A refractive index of 1.45, corresponding to the oil dispersed phase, was used. Each measurement was performed twice. Data were analyzed using software Wing SALD II.

In order to highlight creaming process a specific test protocol was developed; it consists in sampling separately 0.2 mL of the top and the bottom of the emulsion container at specific height of the tube using a graduated pipette, directly after emulsification and then over time (after 1, 2, 3, 7, 14 and 30 days). The total emulsion height was 40 mm. The analysis of the emulsion top refers to a sampling at 5 mm below the upper surface, in order to avoid sampling of the oil phase if any. For the bottom, sampling was performed 5 mm from the bottom of the container.

Characterizations after one day will be referred as D+1; the same designation applies to other periods. Additionally, most stable emulsions were monitored over months.

2.4.3. Optical Microscopy

Emulsions microstructure (top and bottom, according to the sampling procedure described in the previous paragraph) was observed, at room temperature, by means of an optical microscope at a magnification of x20 (DMLP/DC 300, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a camera

and controlled by the Leica Application Suite software. Leica IM 1000 software was used to analyze the micrograph.

2.4.4. Rheology

Oscillatory shear studies were carried out with a stress controlled rheometer HR3 (TA Instruments) with a Peltier temperature control device using a cone-plate aluminium geometry (diameter, 60 mm; cone angle, 2°00'43''; gap, 59 µm) for the pristine xanthan and xanthan derivatives solutions. Solvent evaporation was prevented by covering the geometry with low viscosity silicon oil. The storage (G') and loss (G'') moduli were measured within the linear viscoelasticity domain at different temperature from 5 to 80 °C in order to build the viscosity master curve^{26,27}. Polymer solutions from 0.0125 to 0.4 % w/w were prepared as mentioned above and centrifuged for 3 min to get rid of air bubbles. Aluminum parallel plate geometry (diameter, 60 mm; gap, 200 µm) was used to study emulsions.

Emulsions flow properties were obtained as a function of shear rate during a decreasing ramp from 100 to 0.01s⁻¹ during 300s at 20°C. The procedure included a conditioning step that consisted in applying a pre-shear at 50s⁻¹ for 60s, and then samples were left relaxing for 2 min prior to measurement. Emulsions were measured immediately after formulation in order to avoid the potential effects of emulsion's destabilization. Indeed, no destabilization is observed within the first few hours after formulation. Therefore, there no significant evolution of the system within the measurement, hence the rheological data correspond to a undisturbed emulsion.

2.4.5. Thermogravimetric analysis

In order to determine the xanthan concentration in the aqueous phase, emulsions were first centrifuged at 8 000 g for 20 min. Then the aqueous phase was analyzed by thermogravimetry. These measurement were performed using a Setsys apparatus (Setaram Instrumentation, Caluire-et-Cuire, France), equipped with the Calisto software (version 1.54a, Setaram Instrumentation, Caluire-et-Curie, France). About 80 mg of xanthan solution are weighted in an alumina crucible. Heating procedure is performed under air as follow:

- Equilibration at 110°C during 45 min
- Temperature ramp from 110°C to 550°C at a rate of 20°C/min
- Isotherm at 550°C during 10 min

2.4.6. Homogeneity and Stability criteria for emulsions

The emulsions were characterized with considering two criteria, namely homogeneity and stability.

On the one hand, emulsions were considered as homogeneous as far as both droplet size and distribution were identical over the entire volume (from top to bottom) of the sample.

This criterion was evaluated from initial state (24h after emulsion preparation) over the whole period of ageing.

On the other hand, the different phenomenon involved in emulsions ageing, namely creaming, flocculation and coalescence, were carefully considered by mean of particle size analyses in order to understand the mechanisms implicated in the stabilization / destabilization phenomenon.

3. Results and Discussion

Without any surfactant, preliminary results demonstrated that PX, as expected, does not stabilize emulsion at all as phase separation occurred immediately or within only few hours after emulsion preparation for PX concentration up to 0.9 % w/w despite its very good suspending ability. These results clearly confirmed that native xanthan is a non-adsorbing polysaccharide and therefore does not exhibit any interfacial stabilizing properties^{13,28}. Therefore, the first part of this paper focuses on the utilization of HMX in emulsion to evaluate its stabilizing properties compared to PX. At this stage, it is important pointing out that both PX and its amphiphilic derivatives were studied within the same concentration regime. Indeed, both PX and HMX polymers own an overlap concentration C^* around 0.2 g/L as determined by rheology. This is consistent with the values were earlier reported in the literature for native xanthan polysaccharide^{29,30}.

First of all, the impact of the polymer concentration on emulsion stabilization has been investigated, using X^8C_8 at five concentrations ranging from 0.01 to 0.32 % w/w. Droplet size distributions of these systems after 24h are presented in Figure 1, with superimposing both bottom and top samplings. Thus, the closer the bottom and top particle size distributions the more homogeneous the mixture. For clarity, results obtained for emulsion with 0.32 % w/w of X^8C_8 are not presented as the corresponding data are similar to the one with 0.2 %w/w.

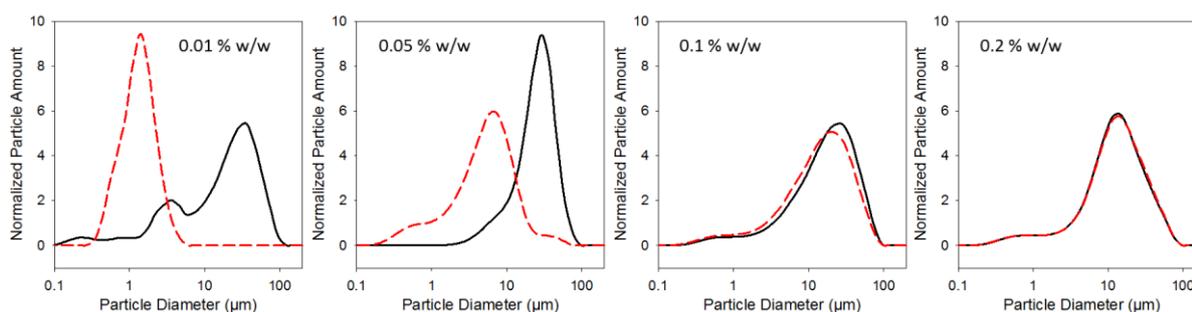


Figure 1: Emulsion particle size distribution at different X^8C_8 concentrations after 24 h. Solid and dashed lines refer to sampling at the top and the bottom of the emulsion respectively.

For the lower HMX contents, it is obvious that destabilization occurs quickly after formulation. Indeed, as shown in Figure 1, the emulsion bottom is only composed of small droplets when the top

part presents a huge distribution of larger droplets. This can be explained by the oil droplets migration from the bottom to the top of the emulsion corresponding to an inhomogeneity thought creaming phenomenon. Additionally, an oil layer on the emulsion top was observed which was attributed either to a non-emulsified oil portion due to insufficient HMX content and/or to the occurrence of coalescence, proving that the emulsion is not stable at all. For emulsions with 0.05 and 0.1 % w/w of X^8C_8 , the emulsion bottom still shows droplets smaller than the top. However, the difference in the droplet size between the bottom and the top is strongly reduced with increasing the polymer concentration. The oil layer on the top is no longer observed, thus confirming that emulsifying character is improved as HMX concentration increases. Finally, when the HMX concentration reaches 0.2 % w/w, the emulsion initially appears homogeneous as the droplet size distribution is identical on the whole sample height as visible on Figure 1.

In addition, the latter emulsion was monitored over time either from microstructure and macroscopic aspects in order to investigate the ability for HMX to get long term stable emulsions without adding any low molecular weight surfactant. As presented in Figure 2, both top and bottom droplet distribution after 1 and 120 days superimpose perfectly. Indeed, neither creaming nor coalescence was observed within 4 months. Thus, such an emulsion with 0.2 % w/w HMX can be considered as very stable.

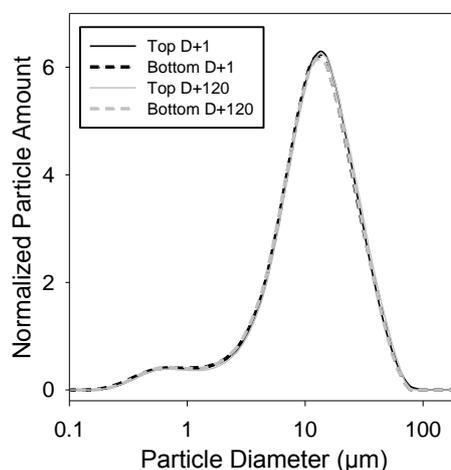


Figure 2: Emulsion particle size distribution at 0.2 % w/w in modified X^8C_8 polymer. Solid line and dash line refer to the top and the bottom of the emulsion, respectively.

As stipulated above, similar results were observed at higher polymer concentrations. In fact a HMX concentration of 0.2 % w/w clearly appears efficient enough to get stable emulsion in spite of fairly low amphiphilic polymer content. Thus, when compared to PX and as far as it is used at a sufficient concentration (above C^*), amphiphilic $X8C8$ undoubtedly allows getting homogeneous and stable O/W dispersions over months. It is important to point out that the HMX content necessary for

reaching such stable emulsion remains quite low, at most similar to the level usually employed when utilizing unmodified xanthan as a thickener combined with surfactants¹⁸. Indeed, it is important to stress that HMX appears much more efficient than any combination of xanthan with classical surfactants. In this latter case the level of surfactant necessary for reaching emulsion stability is above several % as described for Tween 201^{8,31} or whey protein isolate⁷, thus much more than the lonely HMX content in the present study.

Based on these first promising results and in order to better understand the mechanisms responsible for the stabilizing ability of HMX, a series of further investigations were performed with considering “fairly but not too stable” O/W emulsions in order to follow the evolution of the dispersions within a reasonable time scale. Different parameters will then be simultaneously investigated such as the effect of HMX concentration and the influence of HMX alkyl grafting density.

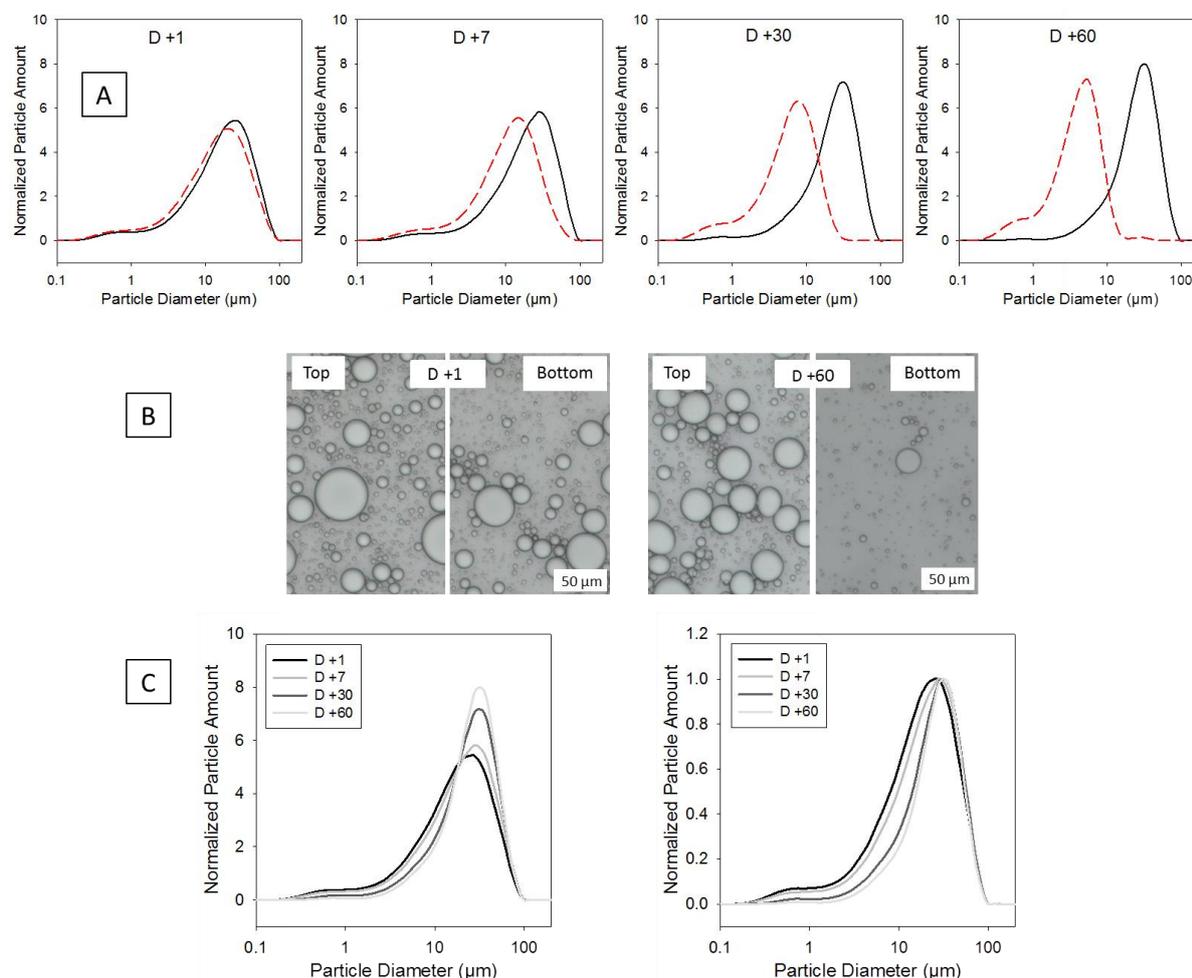


Figure 3: (A) Emulsion particle size distribution at 0.1 % w/w X^8C_8 at different time after preparation. Solid line and dash line refer to the top and the bottom of the emulsion, respectively. (B) Optical microscopy image of the corresponding emulsion at D +1 and D+60, respectively. (C) Particle size distribution of the top of the emulsion (left: non normalized; right: normalized) at 0.1% w/w X^8C_8 at different time after preparation.

In a first step, emulsions' ageing was investigated for a system prepared with 0.1 % w/w X8C8 HMX. Figure 3 shows the evolution of this emulsion over 2 months through both droplet size measurement and optical microscopy. Results presented in Figure 3 A clearly show that the top and the bottom emulsions microstructure, which appears initially fairly similar, becomes more and more different with time. First, one can notice that the bottom droplet size distribution is progressively shifted to lower values with time due to the impoverishment in larger droplets. These results issued from granulometric data are obviously confirmed by microscopic observations as visible in Figure 3 B.

Initially no significant difference can be perceived between the emulsion top and bottom parts. On the contrary after two months, the emulsion bottom only presents few small droplets while more numerous large droplets are observed on the top as a consequence of creaming. Nevertheless, it is noticeable that once migrated to the top part of the emulsion, the droplets size does not evolve significantly with time. In order to confirm these observations, the emulsion particle size distribution corresponding to the emulsion top were superimposed as illustrated in Figure 3 C (left). Over time, result shows that the size distribution becomes thinner and higher. Two hypotheses are possible to explain this increase: either the small droplets remain at the bottom since they cream more slowly, or there is coalescence. In the Figure 3 C (right), droplet size distribution have been normalized by the curve maximum height. One can clearly observe that the maximum position does not evolve much with storage time thus proving that no significant coalescence occurred within a period of 60 days.

Based on these observations, it appears that the main phenomenon responsible for emulsions destabilization is creaming, coalescence remaining quite limited. This also clearly allows establishing that the HMX molecules are extremely efficient for stabilizing the O/W interface. The droplets are mainly subject to creaming but highly resistant to coalescence over months.

To summarize, emulsion with 0.1 % w/w of X⁸C₈ undergoes a destabilization process through creaming that actually intervenes quite rapidly as it starts no later than the day after emulsion preparation but no coalescence was observed. Nevertheless, creaming can be strongly slowed down or even stopped for periods of months by increasing X⁸C₈ concentration as exposed earlier in the paper (See Figure 2).

The same approach was applied to investigate the impact of the grafting density on emulsion stability. Emulsions at different concentrations were prepared using HMX owning an octyl grafting density comprised between 8 % and 32 %. The photographs of the corresponding emulsions 24 h after preparation are presented in Figure 4. One day after preparation, all the emulsions at a low concentration (0.01 % w/w) present three phases: a thin oil layer on the top, then a creamed layer of

oil droplet and finally the continuous phase at the bottom. As visible in Figure 4, when increasing the HMX concentration to 0.05 % w/w and 0.1 % w/w, the emulsions with X^8C_8 and $X^{13}C_8$ appear stable since they look homogeneous from a macroscopic point of view.

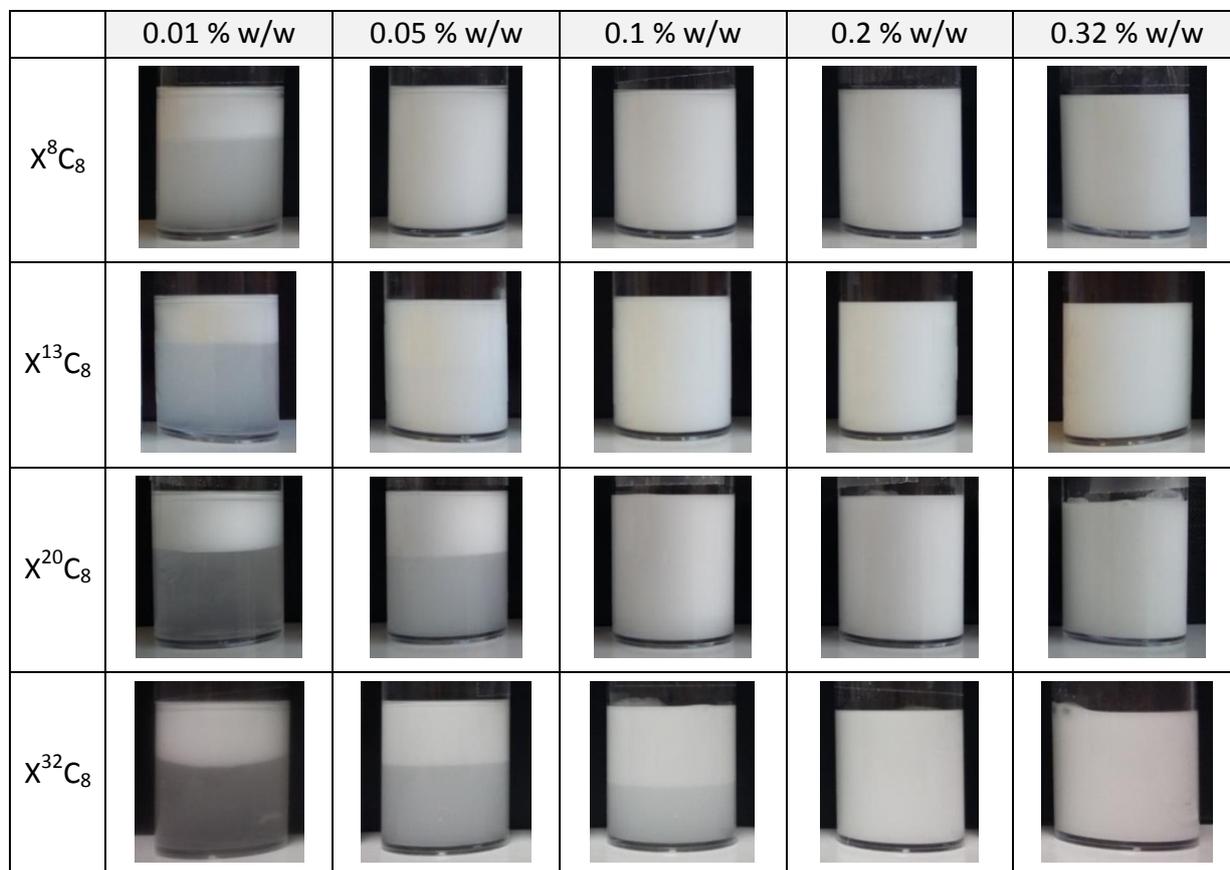


Figure 4: Photographs of the different emulsions after 24h as a function for HMX grafting density and concentration in the emulsion.

However, still for the same polymer content, emulsions prepared with HMX of higher grafting densities show a marked creaming, which seems to be more and more pronounced as the grafting density rises. This clearly evidences that the extent of the phase separation (or instability) is strongly influenced by the HMX concentration as well as the octyl grafting density of HMX. For 0.2 % w/w and 0.32 % w/w, emulsions appear macroscopically stable whatever the grafting density. Thus, in accordance with the previous section, whatever the amphiphilic xanthan grade used, emulsion homogeneity can be improved by increasing the HMX concentration.

Similarly to the previous section focusing on X^8C_8 , the droplet size distribution was monitored over time for series of emulsions prepared with HMX of different grafting densities.

Firstly, emulsions were characterized as homogeneous and stable over months whatever the HMX grafting density as far as the polymer content was above 0.2% (results not shown); this being in good accordance with previous observations. Thus, experiments for investigating stability focused on

émulsions prepared with a total HMX content of 0.1% (w/w) as corresponding to emulsions with apparent homogeneity and sufficient stability for monitoring over time, for the four grafting densities investigated.

Figure 5 reports the evolution of the droplet size distributions for both the bottom and the top part of the emulsions, for a total period of 1 month.

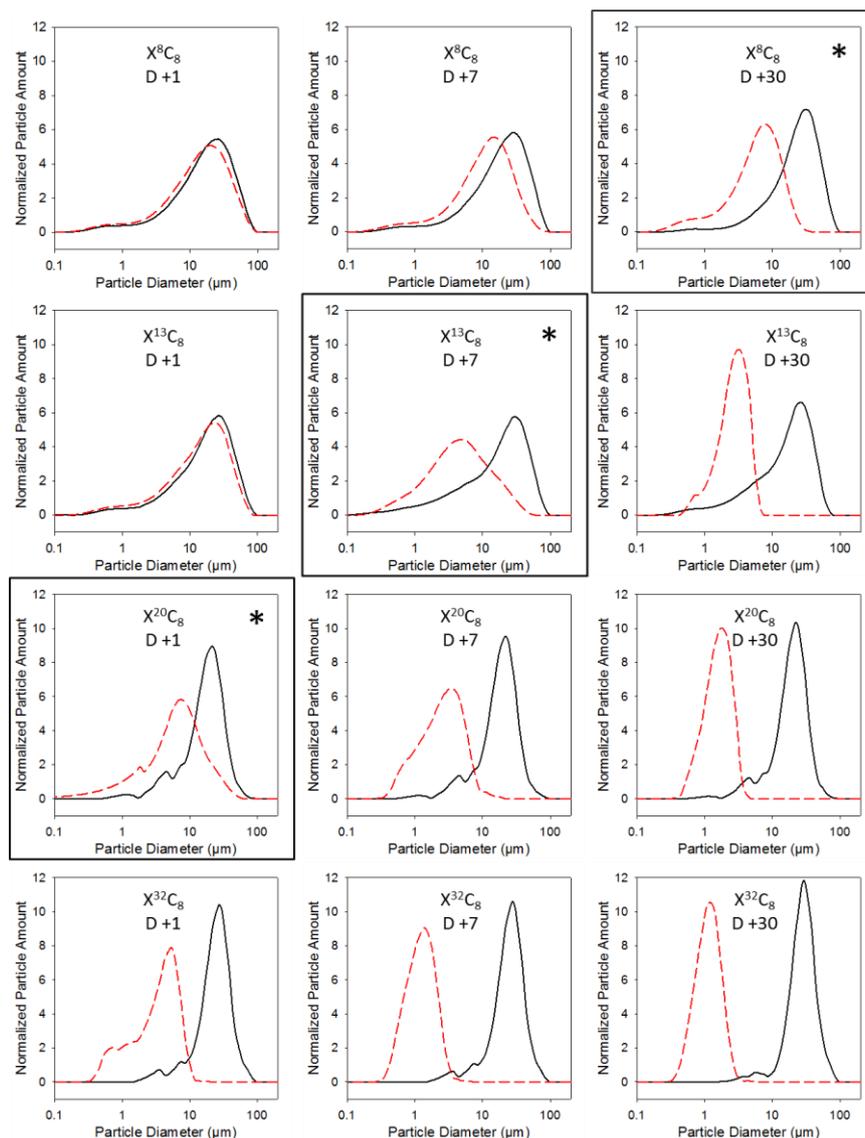


Figure 5: Emulsion particle size distribution at 0.1 % w/w in HMX with different grafting densities. Solid line and dash refer to the top and the bottom of the emulsion respectively.

Only three sets of data are represented, corresponding to 1, 7 and 30 days of aging to keep the figure clear. Firstly, after one-day emulsions with X^8C_8 and $X^{13}C_8$ behave similarly, both emulsion top and bottom part droplet distributions being nearly superimposed. However, emulsions with $X^{20}C_8$ clearly behave differently as the emulsion bottom part initially presents a smaller droplet size distribution compared to the top. This difference is even more pronounced for $X^{32}C_8$. Indeed, for the emulsion

prepared with $X^{32}C_8$, two very distinct droplet size distributions are initially observed, the bottom part containing small droplets, and the top owning larger ones. These results are consistent with creaming process as evidenced through macroscopic observations. After one month, the emulsion top and bottom presented a completely different profile, especially for the highest grafting density. Nevertheless, the droplet size distribution does not evolve with time on the top of the emulsion for all the grafting density. Thus, all the emulsions could be considered as stable as no coalescence occurred (no phase separation) but non homogeneous since presenting markedly different microstructures if comparing top and bottom parts (creaming).

To sum up, the way the emulsions evolved over time remains the same whatever the polymer grafting density, only the kinetic being accelerated with increasing grafting density. As an illustration the emulsions profiles for the one with X^8C_8 after 1 month, the one with $X^{13}C_8$ after 7 days and, finally, to the one with $X^{20}C_8$ after one day look quite similarly (the corresponding graphs are marked with * on Figure 5).

Such a result is of primary importance as increasing the polymer grafting density unexpectedly leads to a faster emulsion destabilization at 0.1%. This surprising behavior has been investigated and discussed in the next section.

To better understand the phenomenon involved in creaming processes of emulsions prepared with HMX, viscosity of the emulsions and the corresponding aqueous phases were investigated.

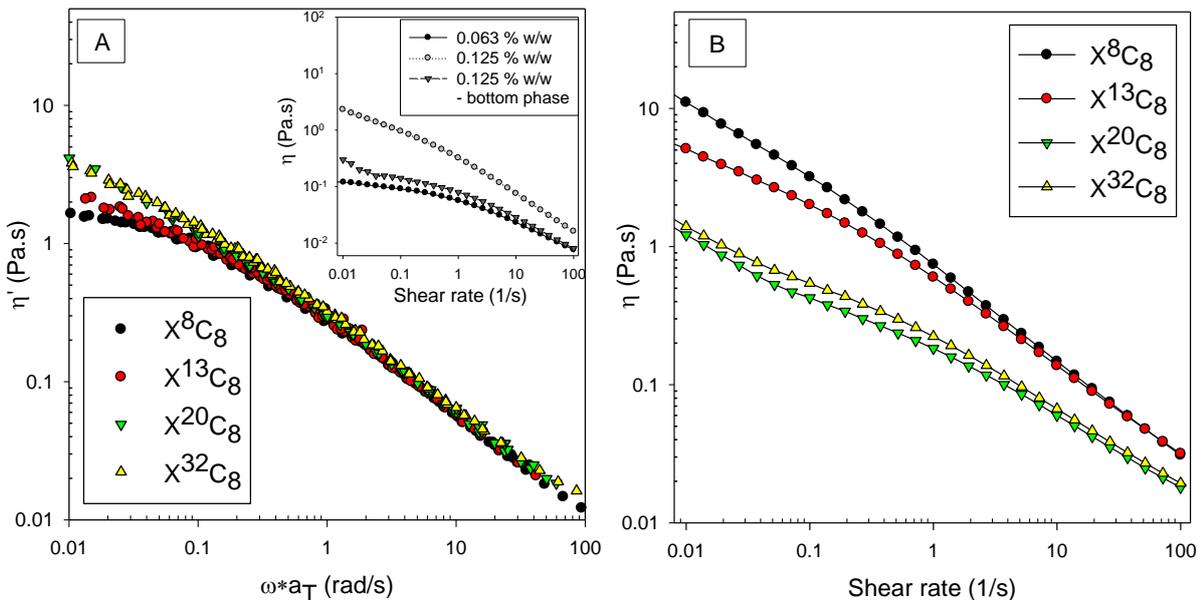


Figure 6: (A) Master curves of the dynamic viscosity (η') of the solutions as a function of $\omega \cdot a_T$ with $T_{ref} = 20^\circ C$ at 0.125 % w/w. Inset: Flow curves of the solutions for $X^{20}C_8$ at $20^\circ C$ at 0.125% w/w and 0.063% w/w and the bottom phase of the emulsion prepared with 0.125% w/w of $X^{20}C_8$. (B) Viscosity of the emulsions with 0.1 % w/w of modified polymer as a function of shear rate at $20^\circ C$.

Figure 6A shows the master curves of dynamic viscosity (η') for HMX solutions at 0.125 % (w/w), for different grafting densities. This polymer concentration was chosen as corresponding to the actual xanthan concentration in the aqueous phase for emulsions prepared at 0.1 % w/w. As already reported for amphiphilic xanthan by A. Roy et al., 2014, at high shear rates, all modified xanthans behave similarly whatever the grafting density. Indeed, whatever the grafting density HMX exhibits a shear-thinning behavior and flow curves perfectly superimpose for shear rates higher than 1 s^{-1} . However, at low frequencies, the different HMX tend to a Newtonian plateau (e.g. $\eta_0 \approx 1.5 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ for $\omega = 0.01 \text{ rad/s}$ for X^8C_8). The higher the grafting density the higher the plateau viscosity becomes.

Thus, consistently with the works done by Roy et al.²⁰, the presence of grafted moieties onto the xanthan backbone affects only the flow behavior of the solutions at low shear rate by slowing down the chains relaxation due to sticky relaxation^{26,32}.

On the other hand, Figure 6B reports the flow curves of emulsions prepared with the series of HMX corresponding to one studied on Figure 6A at 0.1 % w/w (thus the same polymer concentration as in the aqueous phase). All emulsions clearly display a shear thinning behavior at a shear rate between 100 and 0.01 s^{-1} . Surprisingly at first glance, inversely to the corresponding solutions, emulsions viscosity sharply decreases with increasing grafting density. In addition, it is interesting to point out that emulsions viscosity is higher than the one of the corresponding solutions for low grafting density HMX while the opposite is observed when grafting density increase.

Such a bewildering behavior may be explained by two distinct characters of xanthan amphiphilic derivatives: on the one hand the octyl moieties tend to adsorb at the O/W interface thus allows forming and stabilizing the oil droplets. On the other hand, xanthan acts as a viscosifier that increases the suspending properties of the aqueous phase, hence slows down creaming. In other words, with increasing grafting density, more moieties tend to adsorb at the O/W interface; nevertheless, alkyl group being grafted onto the polymer backbone, the latter is also pulled away from bulk to the interface, thus, leading to impoverish the aqueous phase in xanthan molecules. Consequently, the aqueous phase viscosity is lowered thus favoring droplets creaming. This phenomenon is reinforced when the grafting density increases as HMX – oil affinity increases when grafting density rises.

In order to confirm these hypotheses, the different emulsions with 0.1 % (w/w) of HMX were centrifuged in order to accelerate creaming and to remove all droplets from the aqueous phase. The viscosity of the bottom phase was then analyzed (as illustrated for $X^{20}C_8$ in the inset of Figure 6). As expected, the corresponding viscosity is much lower (about 1 decade) than the HMX solution at 0.125 % (w/w). For comparison, the viscosity of the same HMX at half the concentration (0.063 %) is

also plotted. One can observe that the viscosity of the latter is pretty close to the one of the bottom phase. Hence the HMX concentration in the bottom phase is close to half its initial value ($C_{ini}=0.125\%$). Therefore, the rest of the HMX has likely migrated to the interface.

In order to emphasize this observation, the actual HMX concentration present in the bulk was determined as follow: first emulsions were centrifuged according to the procedure detailed in the experimental section. Then the HMX content in the aqueous lower phase (C_{bulk}) was estimated by TGA (see experimental section). Corresponding results are reported in Table 2, the estimated ratio of HMX concentration between bulk and interface is also mentioned. One can observe that the concentration in the bottom phase is less than its initial concentration whatever the HMX grafting density. For instance, the bulk concentration for $X^{32}C_8$ is only 35% of its initial value (thus almost divided by 3). Hence this clearly demonstrates that HMX is actually portioned between bulk of the aqueous phase and droplet interface. Moreover, it is striking that the higher the grafting density the more the HMX is adsorbed at the oil/water interfaces. These data undoubtedly confirmed our hypothesis on the partitioning of HMX between bulk and interface. These results are crucial in explaining the way emulsions behave initially and age depending on the HMX grafting density.

Table 2: HMX concentration in the emulsion bulk phase and estimation of the HMX distribution between the Bulk and the Interface. Reference value is $C_{ini} = 0.125\%$ (w/w).

Sample	C_{bulk} (% w/w)	Estimated ratio Bulk vs Interface
X^8C_8	0.11	88/12
$X^{13}C_8$	0.099	79/21
$X^{20}C_8$	0.072	58/42
$X^{32}C_8$	0.044	35/65

It is important reminding that whatever the HMX grafting density, the total amount of polymer used to prepare the emulsions here (0.1% w/w) is not sufficient to reach high stability. Based on the results for the HMX partition between both the bulk and the interface, the emulsions aqueous continuous phase viscosity appears too low to prevent efficiently creaming. Indeed, as suggested by our hypothesis, when increasing the polymer grafting density, HMX molecules being more and more adsorbed at the oil/water interface so that oil droplets are more stabilized while the aqueous phase viscosity decreases thus favoring creaming but without any coalescence.

Noteworthy, concerning emulsions with HMX at 0.2 % (w/w), the same phenomenon may occur but the polymer concentration is high enough to both stabilize the interface and to maintain the viscosity

sufficiently high to limit creaming. Thus, this explains why emulsions prepared with at least 0.2 % (w/w) of modified polymer are homogeneous and stable over months whatever the grafting density.

To sum up, all these observations confirm the essential role of HMX concentration on emulsion stabilization. A compromise exists between thickening properties and interface stabilization by amphiphilic xanthan derivative that governs either stabilization or destabilization of the emulsions due to HMX chains partitioning between bulk and interface that depends on the grafting density.

4. Conclusion

In this work, the potential of HMX to stabilize O/W emulsions was investigated. Xanthan was chemically modified under its ordered conformation by grafting octyl moieties from 8% up to 32%. The effects of both the polymer concentration and grafting density were investigated in such a way that it was possible to determine the mechanisms responsible for the ability of HMX to get stable emulsions.

First, it was demonstrated that HMX alone, without additional surfactant, is a highly efficient emulsion stabilizer since it allows getting homogeneous emulsions with long term stability without any creaming, coalescence or phase separation where PX does not produce any emulsion. Such a remarkable ability for HMX to stabilize O/W emulsions was observed whatever the grafting density (ranging from 8 to 32%) as far as the polymer content was above a polymer concentration close to the critical overlap concentration (0.2% w/w).

In addition, "fairly but not too stable" O/W emulsions obtained at low HMX concentration with various grafting density were studied. Both the homogeneity and microscopic properties evaluated at initial state and during ageing over several weeks allowed understanding the mechanisms involved in the emulsions formation and the stabilization/destabilization phenomena. Indeed, it was unambiguously established that the HMX molecules are actually partitioned between the bulk (water continuous phase) and the O/W interface. The lower the HMX grafting density the higher the HMX portion dispersed within the bulk, while the higher the HMX grafting density the more polymer molecules condensed at the oil-water interface. Obviously, such a result is explained by the difference of polymer hydrophilic / lipophilic character, this balance depending on the polymer grafting density. So the homogeneity evolution over time for the corresponding emulsions is governed by the HMX partitioning between both bulk and the interface. On the one hand, amphiphilic molecules do adsorb at the oil droplet interface, therefore allowing its formation, its stabilization and preventing coalescence. On the other hand, the polymer molecules dispersed in the aqueous continuous phase induce viscosity enhancement, the latter limits droplets creaming. Here it was demonstrated that very stable O/W emulsions can be obtained in the presence of

hydrophobically modified xanthan without any addition of conventional surfactant. This finding may open up promising applications in formulations that require little or no surfactant in order to limit their toxicological and environmental impact. Finally, a controlled modification protocol was developed and allowed the formulation of stable emulsions whose stability can be tuned by both HMX concentration and grafting density.

- Acknowledgments

Authors thank the French Ministry for Research and Education for research grant and the Region Normandie and FEDER for financial supports.

- References

- (1) Tadros, T. F. Emulsion Science and Technology: A General Introduction. *Emuls. Sci. Technol. T F Tadros* **2009**, 1–56.
- (2) Robins, M. M. Emulsions — Creaming Phenomena. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, 5 (5–6), 265–272.
- (3) Dickinson, E. Hydrocolloids at Interfaces and the Influence on the Properties of Dispersed Systems. *Food Hydrocoll.* **2003**, 17 (1), 25–39.
- (4) Dickinson, E.; Golding, M. Rheology of Sodium Caseinate Stabilized Oil-in-Water Emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 191 (1), 166–176.
- (5) Paraskevopoulou, A. Stabilization of Olive Oil - Lemon Juice Emulsion with Polysaccharides. *Food Chem.* **2005**, 90 (4), 627–634.
- (6) Hennock, M.; Rahalkar, R. R.; Richmond, P. Effect of Xanthan Gum upon the Rheology and Stability of Oil-Water Emulsions. *J. Food Sci.* **1984**, 49 (5), 1271–1274.
- (7) Sun, C.; Gunasekaran, S.; Richards, M. P. Effect of Xanthan Gum on Physicochemical Properties of Whey Protein Isolate Stabilized Oil-in-Water Emulsions. *Food Hydrocoll.* **2007**, 21 (4), 555–564.
- (8) Jansson, P.; Kenne, L.; Lindberg, B. Structure of the Extracellular Polysaccharide from *Xanthomonas Campestris*. *Carbohydr. Res.* **1975**, 45 (1), 275–282.
- (9) Casas, J. A.; Santos, V. E.; Garcia-Ochoa, F. Xanthan Gum Production under Several Operational Conditions : Molecular Structure and Rheological Properties. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 26, 282–291.
- (10) Milas, M.; Rinaudo, M. Conformational Investigation on the Bacterial Polysaccharide Xanthan. *Carbohydr. Res.* **1979**, 76, 189–196.
- (11) Hemar, Y.; Tamehana, M.; Munro, P. A.; Singh, H. Influence of Xanthan Gum on the Formation and Stability of Sodium Caseinate Oil-in-Water Emulsions. *Food Hydrocoll.* **2001**, 15, 513–519.
- (12) Ye, A.; Hemar, Y.; Singh, H. Enhancement of Coalescence by Xanthan Addition to Oil-in-Water Emulsions Formed with Extensively Hydrolysed Whey Proteins. *Food Hydrocoll.* **2004**, 18 (5), 737–746.
- (13) Cao, Y.; Dickinson, E.; Wedlock, D. J. Creaming and Flocculation in Emulsions Containing Polysaccharide. *Food Hydrocoll.* **1990**, 4 (3), 185–195.

- (14) McClements, D. . Comments on Viscosity Enhancement and Depletion Flocculation by Polysaccharides. *Food Hydrocoll.* **2000**, *14* (2), 173–177.
- (15) Dickinson, E.; Ma, J.; Povey, M. J. W. Creaming of Concentrated Oil-in-Water Emulsions Containing Xanthan. *Food Hydrocoll.* **1994**, *8* (5), 481–497.
- (16) Olkowska, E.; Polkowska, Ż.; Namieśnik, J. Analytics of Surfactants in the Environment: Problems and Challenges. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5667–5700.
- (17) Makkar, R. S.; Rockne, K. J. Comparison of Synthtic Surfactants and Biourfactants in Enhancing Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22* (10), 2280–2292.
- (18) Krstonošić, V.; Dokić, L.; Nikolić, I.; Milanović, M. Influence of Xanthan Gum on Oil-in-Water Emulsion Characteristics Stabilized by OSA Starch. *Food Hydrocoll.* **2015**, *45*, 9–17.
- (19) Rouzes, C.; Durand, A.; Leonard, M.; Dellacherie, E. Surface Activity and Emulsification Properties of Hydrophobically Modified Dextrans. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *253* (1), 217–223.
- (20) Roy, A.; Comesse, S.; Grisel, M.; Hucher, N.; Souguir, Z.; Renou, F. Hydrophobically Modified Xanthan: An Amphiphilic but Not Associative Polymer. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1160–1170.
- (21) Roy, A. N.; Benyahia, L.; Grisel, M.; Renou, F. Shear Interfacial Viscoelasticity of Native and Hydrophobically Modified Xanthan at Oil/Water Interface. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 887–894.
- (22) Garcia-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gomez, E. Xanthan Gum: Production, Recovery, and Properties. *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18* (7), 549–579.
- (23) Shatwell, K. P.; Sutherland, I. W.; Ross-Murphy, S. B. Influence of Acetyl and Pyruvate Substituents on the Solution Properties of Xanthan Polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* **1990**, *12* (2), 71–78.
- (24) Rinaudo, M.; Milas, M.; Lambert, F. 1H and 13C NMR Investigation of Xanthan Gum. *Macromolecules* **1983**, *16* (5), 816–819.
- (25) Fantou, C.; Roy, A. N.; Dé, E.; Comesse, S.; Grisel, M.; Renou, F. Chemical Modification of Xanthan in the Ordered and Disordered States: An Open Route for Tuning the Physico-Chemical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *178*, 115–122.
- (26) Choppe, E.; Puaud, F.; Nicolai, T.; Benyahia, L. Rheology of Xanthan Solutions as a Function of Temperature, Concentration and Ionic Strength. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (4), 1228–1235.
- (27) Pelletier, E.; Viebke, C.; Meadows, J.; Williams, P. A. A Rheological Study of the Order–Disorder Conformational Transition of Xanthan Gum. *Biopolymers* **2001**, *59* (5), 339–346.
- (28) Gunning, P. A.; Hibberd, D. J.; Howe, A. M.; Robins, M. M. Gravitational Destabilization of Emulsions Flocculated by Non-Adsorbed Xanthan. *Food Hydrocoll.* **1988**, *2* (2), 119–129.
- (29) Milas, M.; Rinaudo, M.; Knipper, M.; Schuppiser, J. L. Flow and Viscoelastic Properties of Xanthan Gum Solutions. *Macromolecules* **1990**, *23* (9), 2506–2511.
- (30) Cuvelier, G.; Launay, B. Concentration Regimes in Xanthan Gum Solutions Deduced from Flow and Viscoelastic Properties. *Carbohydr. Polym.* **1986**, *6* (5), 321–333.
- (31) Vélez, G.; Fernández, M. A.; Muñoz, J.; Williams, P. A.; English, R. J. Role of Hydrocolloids in the Creaming of Oil in Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (1), 265–269.
- (32) Aubry, T.; Moan, M. Rheological Behavior of a Hydrophobically Associating Water Soluble Polymer. *J. Rheol.* **1994**, *38* (6), 1681–1692.

En résumé :

Du xanthane modifié sous forme ordonnée a été utilisé en tant qu'agent stabilisant pour les émulsions H/E. Nous avons fait varier la concentration en polymère modifié (de 0.01 % à 0.32 % m/m) ainsi que la densité de greffage (de 8 % à 32 %), afin de déterminer l'impact de ces deux paramètres sur le comportement des émulsions.

Contrairement au xanthane seul, nous avons pu démontrer que certaines émulsions contenant du xanthane modifié restent macroscopiquement homogènes et stables pendant plusieurs mois, la concentration en polymère jouant clairement un rôle primordial. En effet, les émulsions contenant 0.1 % m/m de xanthanes modifiés subissent des phénomènes de déstabilisation au cours du temps, notamment du crémage, alors que celles avec 0.2 % m/m sont stables pendant plusieurs mois.

Il a été observé, de façon surprenante, que l'augmentation du taux de greffage entraîne une déstabilisation plus rapide des émulsions. La rhéologie comparée des solutions et des émulsions des différents grades de xanthanes modifiés a permis d'élucider cette particularité. D'un côté, dans le cas des solutions de polymères, il a été montré que les interactions hydrophobes entre les chainons greffés sont à l'origine du pouvoir suspensif accru des dérivés ; celui-ci est d'autant plus accentué que la densité de greffage est élevée. A l'inverse, les courbes d'écoulement des émulsions montrent que la viscosité diminue avec l'augmentation du taux de greffage. Ces résultats peuvent être expliqués par l'adsorption des groupements octyles à l'interface eau/huile pour former et stabiliser les gouttelettes d'huile. Plus le polymère est greffé, plus il va avoir tendance à s'adsorber à l'interface, ce qui conduit à appauvrir sa teneur dans la phase aqueuse. La viscosité de celle-ci n'est alors plus suffisante pour ralentir le crémage, ce qui explique la perte de stabilité des émulsions avec l'augmentation du taux de greffage.

Le comportement des xanthanes modifiés en émulsion se traduit ainsi par un partitionnement compétitif entre la stabilisation de l'interface H/E et le maintien de la viscosité de la phase continue.

Publication 3: « Impact of backbone stiffness and hydrophobic chain length of modified xanthan on oil in water emulsion stabilization »

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons vu qu'il est possible, grâce à deux protocoles distincts, de greffer des chaînes octyles (C_8) sur le squelette du xanthane sous forme ordonnée¹³⁶ et sous forme désordonnée¹, permettant ainsi d'avoir accès à une large gamme de dérivés amphiphiles du xanthane. De plus, le protocole de modification développé dans le cas du xanthane sous forme désordonnée dans le DMSO s'est avéré particulièrement efficace et a également permis de greffer des chaînes dodécyles (C_{12}) et hexadécyles (C_{16}).

Il s'avère que la conformation adoptée par le polymère pendant le processus de greffage a un impact majeur sur ses propriétés rhéologiques en solution : le xanthane modifié hydrophobiquement sous forme désordonnée (XMHD) possède un caractère associatif, contrairement au xanthane modifié sous forme ordonnée (XMHO).

Compte tenu des propriétés rhéologiques en solution différentes des xanthane modifiés hydrophobiquement, nous nous sommes intéressés à leur impact dans le cas des émulsions. Ainsi des émulsions contenant du XMHD ont été préparées et dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de la longueur de la chaîne ainsi que du taux de greffage sur les propriétés stabilisantes en émulsion. Dans un deuxième temps, nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus précédemment pour des émulsions contenant XMHO afin de conclure sur l'influence éventuelle de la rigidité du squelette du xanthane sur les propriétés en émulsion.

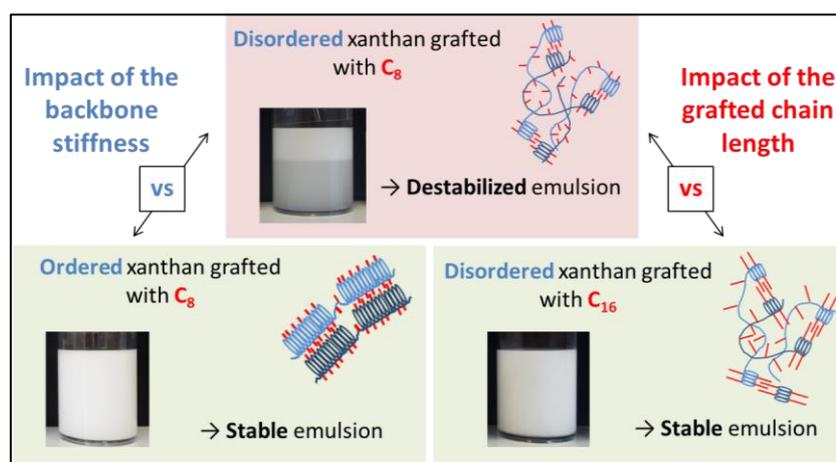
Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés ci-après et ont été soumis pour publication dans Carbohydrate Polymers.

Impact of backbone stiffness and hydrophobic chain length of modified xanthan on oil in water emulsion stabilization

Céline Fantou^a, Sébastien Comesse^a, Frédéric Renou^{b*} and Michel Grisel^{a*}

^a NormandieUniv, UNILEHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, 76600 Le Havre, France.

^b Le Mans université, IMMM UMR-CNRS 6283, Polymères, Colloïdes, Interfaces, 72085 Le Mans cedex 9, France



- Abstract

The impact of xanthan chemical modification under both ordered and disordered conformations on oil-in-water (O/W) emulsion stabilization was investigated. While both hydrophobically modified xanthan (HMX) are able to stabilize the O/W interface, a dramatic difference was observed macroscopically.

When HMX_{ord} (ordered conformation) could produce stable emulsions at concentrations equal or higher than 0.2 % w/w, HMX_{dis} (disordered conformation) led mostly by creaming to unstable systems whatever the concentration studied.

Moreover, in the case of HMX_{dis}, the role of the grafted chain length was investigated and two different behaviors were observed depending on the grafting unit. It was demonstrated that the cornerstone of these emulsion stability was the rheological properties of the continuous phase and that this one was governed by two main factors: the partitioning of HMX_{dis} between the interface and the continuous phase and the viscosifying ability of the polymer, the latter being directly linked to the backbone stiffness.

1. Introduction

Due to energetically unfavorable contact between oil and water, emulsions tend to undergo destabilization processes over time such as flocculation, coalescence, creaming or sedimentation and Ostwald ripening¹, which can lead to a macroscopic phase separation. Therefore many studies have been devoted to insure emulsion stability by adding thickening agents, mainly polysaccharides², and/or emulsifiers such as surfactant^{3,4}, solid particle⁵ or polymeric surfactants^{6,7}. Indeed, since the pioneering work of Landoll⁸ on interfacial properties of hydrophobically modified cellulose, polymeric surfactants based on polysaccharides have been intensively studied because of the abundance of raw material, water solubility, biocompatibility and biodegradability. Moreover, due to amphiphilic character, these polysaccharides display unusual physicochemical properties which are related, on the one hand, to their capacity to self-associate in aqueous solution^{9,10} and on the other hand to their ability to adsorb at the O/W interface^{11,12}. These properties suggest potential applications for amphiphilic polysaccharides as stabilizing agents for O/W emulsions.

Xanthan is one of the most used polysaccharide for stabilizing emulsions, especially thanks to its outstanding thickening properties^{13,14}. Unfortunately the poor interfacial properties of xanthan make it unable to stabilize O/W interfaces unless combined with molecular surfactants to form and stabilize the emulsion. Xanthan is an anionic extracellular polysaccharide produced by *Xanthomonas campestris*. Its main chain is composed of β -D-glucose substituted on every two units with a charged trisaccharidic side chain containing a D-glucuronic acid between 2 D-mannoses. In aqueous media, xanthan can adopt two distinct conformations¹⁵. One is a rigid ordered double-stranded helical structure at low temperature and high ionic strength while the other one is a disordered flexible coil at high temperature and low ionic strength¹⁶. The helix to coil transition is reversible and is accompanied by a sharp decrease of the storage modulus leading to distinct rheological properties as a consequence of very different backbone rigidity^{17,18}.

In previous works, xanthan was modified under both ordered¹⁹ and disordered²⁰ conformations in order to investigate the impact of the chain stiffness on associative properties²⁰. It has been demonstrated that depending on the conformation during chemical modification, amphiphilic xanthan exhibited completely different behaviors in aqueous solution. Moreover, hydrophobically modified xanthan under ordered conformation (HMX_{ord}) is able, under specific conditions, to efficiently stabilize emulsions over months without any addition of surfactant²¹.

The present study focuses first on the ability for HMX_{dis} to stabilize O/W emulsions in order to conclude on the impact of the backbone stiffness (HMX_{dis} vs HMX_{ord}) on the stabilizing properties in emulsions at the same concentration and grafting density. Then, the influence of HMX_{dis} grafting

density was studied to further understand the mechanisms involved in the stabilization/destabilization phenomena.

In addition, as the modification protocol in DMSO allows to solubilize and so to graft longer alkyl chains, the impact of the grafted chain length at various grafting densities was investigated.

2. Materials and Methods

1.1. Materials

The xanthan was supplied by Danisco (France). Xanthan was characterized by ^1H NMR in order to determine the substitution degrees of pyruvate and acetate, which were respectively 0.49 and 0.87. The moisture content, measured by thermo gravimetric analysis, was 10.1 % and the protein content, determined by the Bradford procedure was 0.1 %. *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) was purchased from Alfa Aesar, triethylamine (Et_3N), *n*-hexadecylamine and sodium azide (NaN_3) from Sigma Aldrich, *n*-octylamine, *n*-dodecylamine, DMSO and sodium chloride (NaCl) from Carlo Erba. All reagents were used without further purification and ultra-pure water was used as solvent for all the characterizations. Emulsions were prepared using isononyl isononanoate as oil phase, provided by Stearinerie Dubois (Boulogne Billancourt, FRANCE).

1.2. Synthesis of hydrophobically modified xanthan

Amphiphilic properties were conferred to xanthan under both ordered and disordered conformation thanks to two distinct protocols. Whatever the polymer backbone conformation, alkyl residues were grafted onto the polysaccharide carboxylic groups *via* a peptidic coupling reaction between acidic moieties of xanthan and amine function of the alkylamine. Chemically modified xanthan derivatives under ordered conformation were obtained following the procedure developed by Roy et al.¹⁹. The modification process of xanthan under disordered conformation was described in a previous study²⁰. Moreover, the latter which takes place in DMSO enables to solubilize and graft amines bearing longer alkyl chains.

All xanthan derivatives obtained either under ordered and disordered conformation and described in the present paper kept water soluble at the level studied.

The nomenclature applied for the modified polysaccharides is $X^A C_B$, where A is the grafting density (*i.e.*, the number of alkyl groups per 100 repeating units) and B is the number of carbon atoms in the alkyl chain. In addition, $X^A C_{B\text{ord}}$ and $X^A C_{B\text{dis}}$ correspond to a polymer modified under its ordered and its disordered conformation, respectively.

1.3. Emulsion preparation

1.3.1. Xanthan solutions

Amphiphilic xanthan aqueous solutions were prepared at concentrations ranging from 0.0125 to 0.4 % w/w. For that purpose, HMX powder was first dispersed in ultrapure water and stirred overnight at room temperature using magnetic stirrer. The pH was then adjusted to 4.3 with 0.1 M HCl and the ionic strength to 1 mS/cm using NaCl. 300 ppm of NaN_3 were added to avoid bacterial growth.

1.3.2. Formulation protocol

All emulsions were O/W containing 20% oil (w/w) oil phase and the overall content (100 % w/w) is adjusted by the quantity of water (Quantum Satis).

As reported in another study²¹, a formulation protocol adapted for emulsifying small quantity (20 g) was developed. Each phase was first prepared and pre-heated separately at 30 °C for 30 minutes. Then, the oil phase was poured into the aqueous phase. Both were mixed together and homogenized at 20 000 rpm for 3 minutes using a T25 digital ultra-turrax (IKA, Freiburg, Germany) equipped with the dispersing head S25N-10G. Each emulsion was prepared in duplicate to check preparation process and results reliability.

Once prepared, emulsions were stored at room temperature and their aging was studied over time through visual observations and particle size distribution by mean of granulometry measurements. In addition, both solutions and emulsions rheological properties were analyzed using flow and oscillatory modes.

1.4. Characterization methods

1.4.1. Characterization of hydrophobically modified xanthan

In order to determine the HMX grafting density, 300 MHz ^1H NMR spectra were recorded at 80 °C, using a Bruker Avance 300 spectrometer and a procedure described by Roy et al.¹⁹.

Prior to NMR analysis, chemical depolymerization using hydrogen peroxide in alkaline solution was necessary to decrease the viscosity of xanthan aqueous solutions and was conducted according to Wu et al.²². Then, polymer solutions were prepared in D_2O at 5 g/L in the presence of $5 \cdot 10^{-3}$ M of TSP as chemical shift (in ppm) and internal quantification reference.

1.4.2. Visual observations

The macroscopic aspect of the emulsions was visually assessed just after formulation and then monitored over time. Thereby, it is possible to evaluate the HMX initial ability to emulsify the mixture and to follow the macroscopic destabilization phenomena during aging.

1.4.3. Droplets size distribution

Emulsions droplets size were analyzed by static light scattering using a laser diffraction particle size analyzer SALD-7500 nano (Shimadzu Co., Ltd, Japan) equipped with a violet semi-conductor laser (405 nm) and a reverse Fourier optical system. Prior to analysis, emulsions were diluted in deionized water to achieve absorption parameter equal to 0.15. Once introduced in the batch cell, dispersions were stirred continuously during the measurement to assure homogeneity. According to the oil dispersed phase, a refractive index of 1.45 was used. Each measurement was performed in duplicate. Data were analyzed using the software Wing SALD II. In order to highlight destabilization processes, especially creaming, a specific test protocol was developed which consists in sampling separately 0.2 mL of the top and the bottom of the emulsion container at specific height of the tube using a graduated pipette, directly after emulsification and then over time (after 1, 2, 3, 7, 14 and 30 days). The total emulsion height was 40 mm. The analysis of the emulsion top refers to a sampling at 5 mm below the upper surface, in order to avoid sampling in the oil phase if any. For the bottom, sampling was performed 5 mm from the bottom of the container.

1.4.4. Rheology

Xanthan derivatives solutions ranging from 0.0125 % w/w to 0.4 % w/w were prepared as mentioned above and centrifuged for 3 minutes to remove air bubbles. Oscillatory shear studies were carried out with a stress controlled rheometer HR3 (TA Instruments) with a Peltier temperature control device using a cone-plate aluminium geometry (diameter, 60 mm; cone angle, 2°00'43''; gap, 59 µm). Solvent evaporation was avoided by covering the geometry with low viscosity silicon oil. The storage (G') and loss (G'') moduli were measured as a function of the frequency (from 0.1 to 100 rad/s) within the linear viscoelasticity domain. Flow properties as a function of shear rate were obtained during a decreasing ramp from 100 to 0.01 s⁻¹ for 300 s at 20°C. Prior to measurement, a pre-shear was applied at 50 s⁻¹ for 60 s, and then samples were left relaxing for 2 min. For the emulsions, a parallel plate aluminum geometry (diameter, 60 mm; gap, 200 µm) was used. Emulsions were measured immediately after formulation in order to ensure analyzing homogeneous system. It is important to point out that no destabilization was detected within the first hours after formulation. Thus, the rheological data correspond to a homogeneous emulsion.

3. Results and Discussion

3.1. Impact of the chain stiffness

In a previous study²⁰, it was reported that amphiphilic xanthan exhibits completely different behaviors in solution depending on its conformation during modification due to a difference in backbone stiffness once poured back in water. Moreover, thanks to their amphiphilic character, xanthan derivatives can be utilized to form and stabilize O/W emulsions. HMX_{ord} behavior in emulsion was previously studied²¹. Thus, this section aims to determine HMX_{dis} ability to stabilize O/W emulsions and then to compare its behavior with that of HMX_{ord} in order to conclude on the impact of the chain stiffness on their stabilizing properties in emulsion.

First of all, the effect of polymer concentration on emulsion stabilization was investigated. X⁷C_{8dis} was used at five distinct concentrations ranging from 0.01 to 0.32 % w/w. Results show that as far as the HMX contents remains lower than or equal to 0.1 % w/w, destabilization occurs quickly after formulation. Indeed, no later than 24 h after preparation, creaming is already macroscopically observed and even macroscopic phase separation (data not shown). Thus, these systems clearly destabilize too quickly to allow any extensive study. By increasing the HMX concentration to 0.2 % w/w and above, the emulsions remained macroscopically homogenous after one day thus allowing studying the evolution of the dispersions within a reasonable time scale.

On this basis and to investigate the impact of HMX stiffness, two emulsions containing 0.2 % of xanthan owning similar low grafting density (X⁷C_{8dis} and X⁸C_{8ord}) were prepared following the same protocol and then monitored over one month by means of droplets size measurement. For clarity, only the results corresponding to 1, 7 and 30 days of aging are presented in this paper.

As reported in Figure 1 A for X⁸C_{8ord}, both top and bottom droplet distribution after 1 and 30 days superimpose perfectly. Indeed, neither creaming nor coalescence was observed even for a much longer period²¹. Thus, such an emulsion with 0.2 % w/w HMX_{ord} can be considered as highly stable.

Oppositely, for the emulsion containing X⁷C_{8dis}, no later than after one day, the bottom droplet size distribution appears slightly shifted to lower values compared to the one for the top of the emulsion, this exhibiting signs of early destabilization. This difference is strongly accentuated over time as the emulsion bottom droplet size becomes smaller as it more and more impoverishes in large oil droplets, while the top phase did not evolve much. Indeed, once migrated to the top part of the emulsion, the droplets size does not evolve significantly with time. Moreover, no oil layer on the emulsion top was detected. Thus, the emulsion destabilization mechanism is mainly creaming, the coalescence being limited.

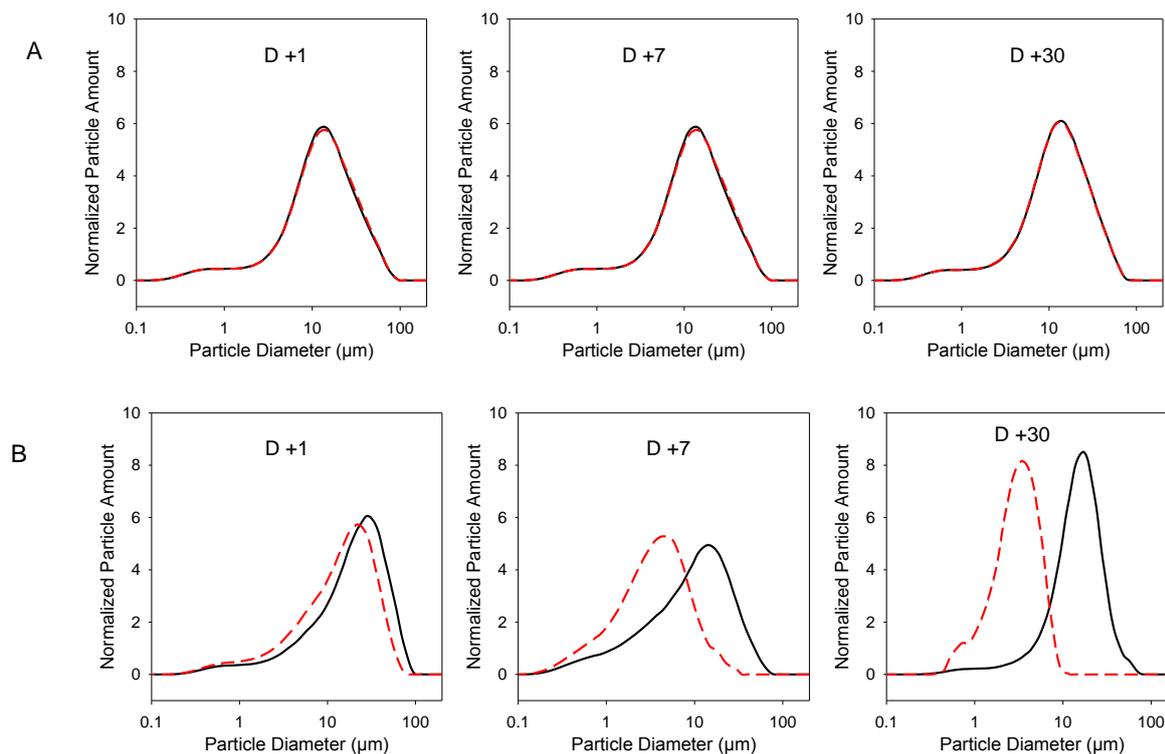


Figure 1: Variations of normalized particle amount as a function of emulsion droplet size with time at 0.2 % w/w in (A) X^8C_{8ord} and (B) X^7C_{8dis} . Solid line and dash refer to the top and the bottom of the emulsion respectively.

Hence, data from Figure 1 clearly demonstrate that X^8C_{8ord} is much more efficient than X^7C_{8dis} to avoid creaming.

In order to explain this difference in stability, the evolution of the low shear viscosity as a function of HMX concentration for both X^8C_{8ord} and X^7C_{8dis} aqueous solutions has been measured (see Figure 2). Flow curves, obtained over a wide polymer concentration range, illustrate that all solutions display a shear thinning behavior. Low shear rate viscosity is experimentally determined either corresponding to the value at the Newtonian plateau or by fitting the curve with Carreau-Yasuda model for intermediate concentration where the Newtonian plateau was not directly accessible within the shear rate range studied. For the most concentrated solutions, viscosity at $10^{-2} s^{-1}$ was plotted.

One can observe that the HMX_{ord} viscosity is markedly higher than the one for HMX_{dis} on the whole range of concentrations and is about 1 decade higher above C^* (which is about 0.007 % and 0.03 % for X^8C_{8ord} and X^7C_{8dis} , respectively). Therefore, in this study, all emulsions were compared far above C^* thus within the same concentration regime. An example of flow curves is presented in the inset of Figure 2 for the polymer solutions at 0.25 % w/w, that corresponds to the concentration employed in the emulsions studied in Figure 1.

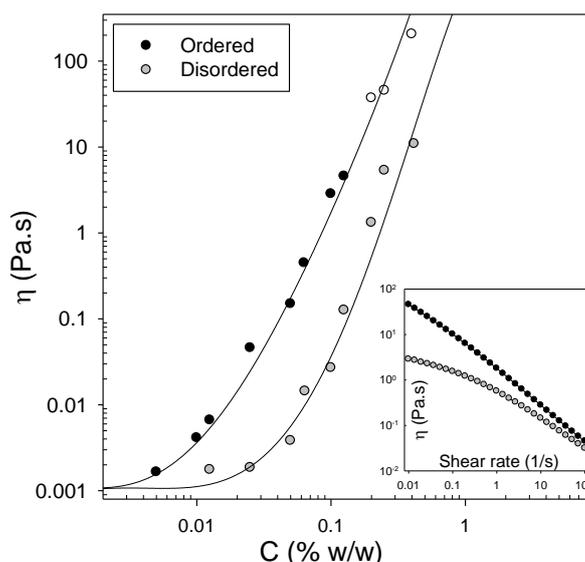


Figure 2: Evolution of the solution viscosity as a function of the HMX concentration for X^8C_{8ord} and X^7C_{8dis} . Filled symbols correspond to low shear viscosity obtained with Carreau-Yasuda model, open symbols correspond to the viscosity at low shear rate ($10^{-2} s^{-1}$). Solid lines are guides to the eye. Inset: Flow curve at 0.25 % w/w and 20°C.

In a previous study²¹, it has been established that emulsion stabilization with HMX is a compromise between thickening properties and interface stabilization. Indeed, octyl moieties grafted onto the polymer backbone tend to adsorb at the O/W interface thus allows forming and stabilizing the oil droplets but, consequently, leading to impoverish the HMX content in the aqueous phase. Consequently, the aqueous phase viscosity is decreased thus favoring droplets creaming.

In this case, in addition to HMX partitioning between the bulk and the interface, the significant difference in viscosity evidenced between X^8C_{8ord} and X^7C_{8dis} may explain, at least partially, the difference for their ability to prevent creaming.

3.2. Impact of the grafting density

The same approach was applied to investigate the impact of the grafting density on emulsion stability. To this end, emulsions at different concentrations were prepared using HMX_{ord} and HMX_{dis} owning a C_8 grafting density comprised between 7 % and 35 %.

On the one hand, for emulsion containing HMX_{ord} , whatever the grafting density neither creaming nor coalescence was observed within 3 months. Such an emulsion stability can be explained by the fact that in the case of HMX_{ord} , the solutions viscosity increases with the grafting density^{19,21}. Thus, despite partitioning which more and more favors the interface stabilization with increasing grafting density, the viscosity of the continuous phase remains sufficiently high to retard creaming.

On the other hand, it was previously established in this paper that emulsions containing 0.2 % w/w of X^7C_{8dis} destabilized mainly through creaming (See Figure 1 B). It was anticipated that the higher the grafting density the more the amphiphilic polymer migrates to the interface as observed with HMX_{ord} at 0.1 % w/w²¹. To confirm this hypothesis, the droplet size distributions changings for both the bottom and the top part of the emulsions containing 0.2 % w/w of $X^{15}C_{8dis}$ and $X^{35}C_{8dis}$ were investigated over one month (see Figure 3).

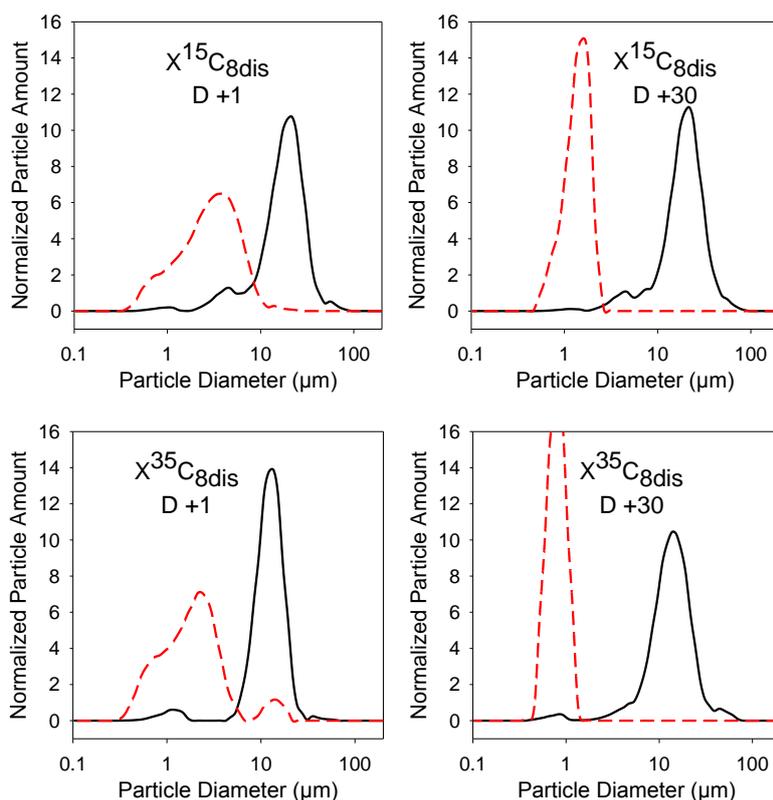


Figure 3: Variations of normalized particle amount as a function of emulsion droplet size at 0.2 % w/w in HMX_{dis} with different grafting densities after one day and one month. Solid line and dash refer to the top and the bottom of the emulsion respectively.

One can notice that, as expected, the creaming rate is accelerated with increasing grafting density. Indeed, for the emulsions prepared with $X^{15}C_{8dis}$ and $X^{35}C_{8dis}$, two distinct droplet populations are already observed no later than one day after preparation. After one month, phase separation is macroscopically detected with a top creamed layer composed of large oil droplets and an aqueous phase with no more large droplets but only containing a low quantity of small droplets in the bottom phase. Nevertheless, even though oil droplets are highly concentrated at the emulsion top due to creaming, the corresponding size does not evolve over time, thus proving that coalescence is absent or very limited. In addition, it is important to note that no creamed oily phase was observed whatever the HMX_{dis} used thus illustrating the HMX efficiency to stabilize O/W interphases.

Thus for HM_{dis} , increasing grafting density leads to a faster emulsion destabilization, that may be attributed to an increase of HMX partitioning in favor of the O/W interface with increasing grafting density, thus strongly decreases the HM_{dis} concentration in the bulk, and therefore its viscosity. Consequently, the creaming is much faster within increasing grafting density. A quite similar phenomenon has been demonstrated for emulsion stabilized with HM_{ord} ²¹.

So, following the same methodology, rheological measurements were performed in order to understand emulsion behavior with increasing HMX grafting density. To this aim, flow behavior of the solutions and the corresponding emulsions was analyzed and results are reported in Figure 4.

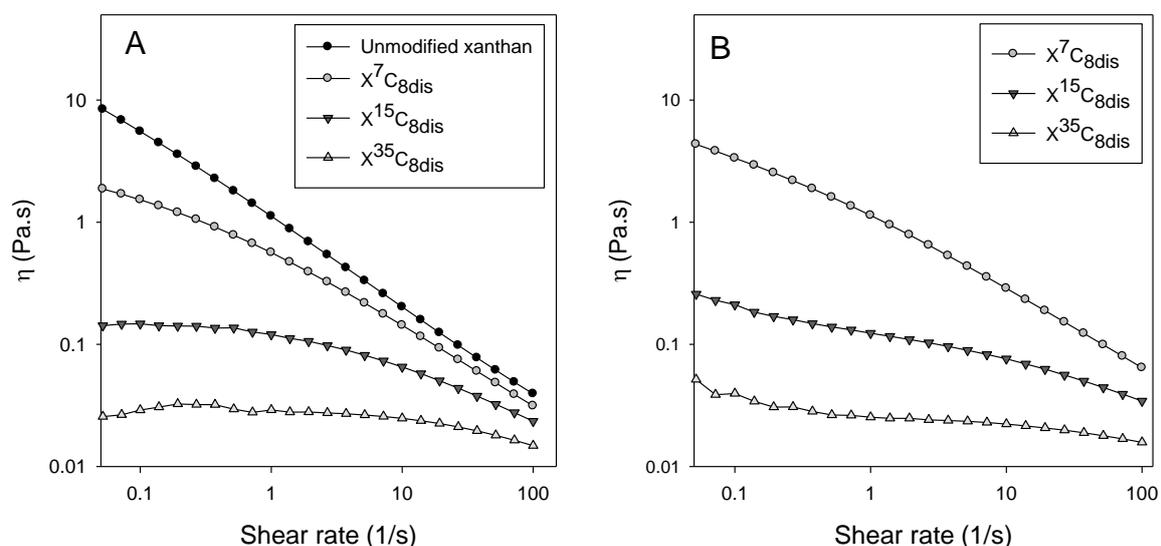


Figure 4: Viscosity as a function of shear rate for (A) the solutions at 0.25 % w/w and (B) the emulsions after emulsification at 0.2 % w/w in HMX_{dis} .

As clearly visible in Figure 4 A, increasing the grafting density leads to a sharp decrease of the solution viscosity. These results can be explained by the progressive decrease in the chain rigidity due to the higher quantity of octyl moieties; this was proved elsewhere through circular dichroism analysis²⁰. In addition, one can notice a dramatic decrease of there is more than 2 decades difference in viscosity between unmodified xanthan and $X^{35}C_{8dis}$ at the same concentration at low shear rate.

As expected, the same behavior is observed in emulsion (see Figure 4 B), as a decrease of the viscosity with increasing grafting density is evidenced. For the emulsion prepared with X^7C_{8dis} , the viscosity is higher than the corresponding solution due to the contribution of the dispersed phase. However, both the solutions and the emulsions viscosity measured for $X^{15}C_{8dis}$ and $X^{35}C_{8dis}$ behave almost similarly. As previously established, this result can be explained by the migration of HMX to the O/W interface to the detriment of the bulk. As a consequence, the aqueous continuous phase is

impoverished in HMX so its viscosity becomes less and less sufficient to retard creaming. This phenomenon is more and more pronounced as the grafting density increases.

To summarize, on the one hand, HMX_{ord} at concentration as low as 0.2 % is efficient to stabilize the O/W interface and to maintain the oil droplets dispersion homogeneous thanks to its high viscosity of the continuous phase; oppositely this is not the case for HMX_{dis}.

Indeed, emulsion stabilization with HMX_{dis} is governed by two phenomena: i) increasing the grafting density leads to a decrease in backbone rigidity and as a consequence, a decrease of the solution viscosity; ii) adsorption of octyl moieties at the O/W interface leading to impoverish the aqueous phase in HMX molecules and thus a decrease of the aqueous phase viscosity. Thereby, both phenomena do contribute to decrease the emulsion stability containing HMX_{dis} as the grafting density increases.

Finally, one can consider that emulsion stabilization using HMX_{ord} and HMX_{dis} is mainly governed by the viscosity of the aqueous continuous phase which is related to the polymer backbone stiffness.

Another way to impact the chain stiffness is, at the same grafting density, to increase the alkyl chain length. Since the modification protocol under the disordered conformation was performed in DMSO, it made it possible to solubilize and so to graft longer alkyl chains. Thus, a series of HMX_{dis} owning different alkyl chain lengths with different grafting rate was prepared, and studied for its ability to form and stabilize emulsions. This study will be the subject of the next section.

3.3. Impact of the grafted chain length

Controlled grafting of octylamine on xanthan under its disordered conformation has been fully described in a previous study²⁰. Briefly, the reaction takes place in one step in DMSO using uronium chemistry^{23,24} and a preliminary acidification step is necessary to render xanthan soluble. A solution of acidified xanthan at 1 g/L in DMSO was prepared and stirred at 80°C for 4 h to assure complete dissolution. Then, it was cooled down to room temperature, *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), triethylamine and octylamine were added at the same time and the reaction was left under stirring for 18h. Obtained modified polymers were purified by successive dialysis against distilled then ultrapure water and finally freeze-dried.

The very same method was applied to graft longer alkyl chains namely *n*-dodecylamine (C₁₂) or *n*-hexadecylamine (C₁₆), which are soluble in DMSO. The medium was left under stirring until complete solubilization of these amines before the addition of triethylamine and HBTU. All the reactions were performed keeping the polymer concentration at 1 g/L in order to avoid a too high viscosity of the medium.

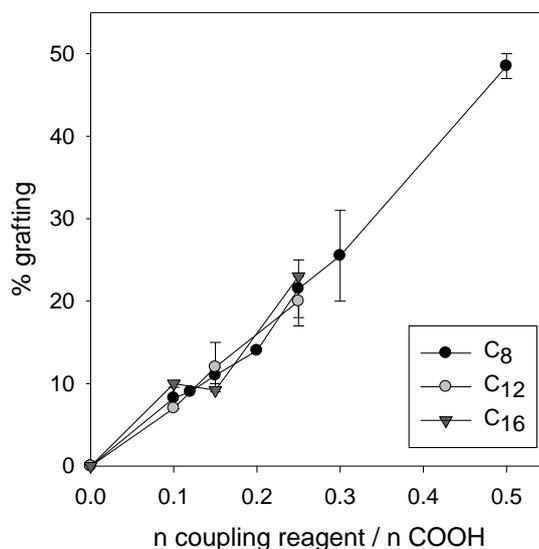


Figure 5: Evolution of the overall grafting density as a function of the coupling reagents quantity for the chemical modification of xanthan under its disordered conformation in DMSO (determined by ^1H NMR).

Figure 5 presents the overall amine groups grafting density as a function of the coupling reagent stoichiometry with respect to xanthan repeating unit as determined by ^1H NMR. This reaction shows a good and very similar efficiency whatever the length of the alkylamine since the conversion is around 80 %, moreover, adjusting the coupling reagents stoichiometry enables a precise control of the grafting density. These observations can be explained by the good accessibility of both xanthan grafting sites (pyruvic and glucuronic acids) under disordered conformation, as already established in a previous publication²⁰. However, chemically modified polymers were no more water soluble above a certain grafting density that depends on the grafted chain length. Hence, in order to keep the derivatives water-soluble, the maximum grafting density was estimated and found to be around 50 % for octylamine while for dodecylamine and for hexadecylamine, this maximum was around 20 %. As expected, the longer the amine chain length, the less the HMX_{dis} water soluble.

The last part of the present study focuses on the use of a series of HMX_{dis} in emulsion, all differing by the alkyl chains length but similar substitution degrees ($\text{X}^7\text{C}_{8\text{dis}}$, $\text{X}^7\text{C}_{12\text{dis}}$ and $\text{X}^{10}\text{C}_{16\text{dis}}$); this methodology was envisaged in order to evaluate the alkyl chain length impact on the O/W stabilizing properties.

Figure 6 shows the evolution of the droplet size distributions for both the bottom and the top part of the emulsions, each HMX_{dis} grade being monitored over a period of one month.

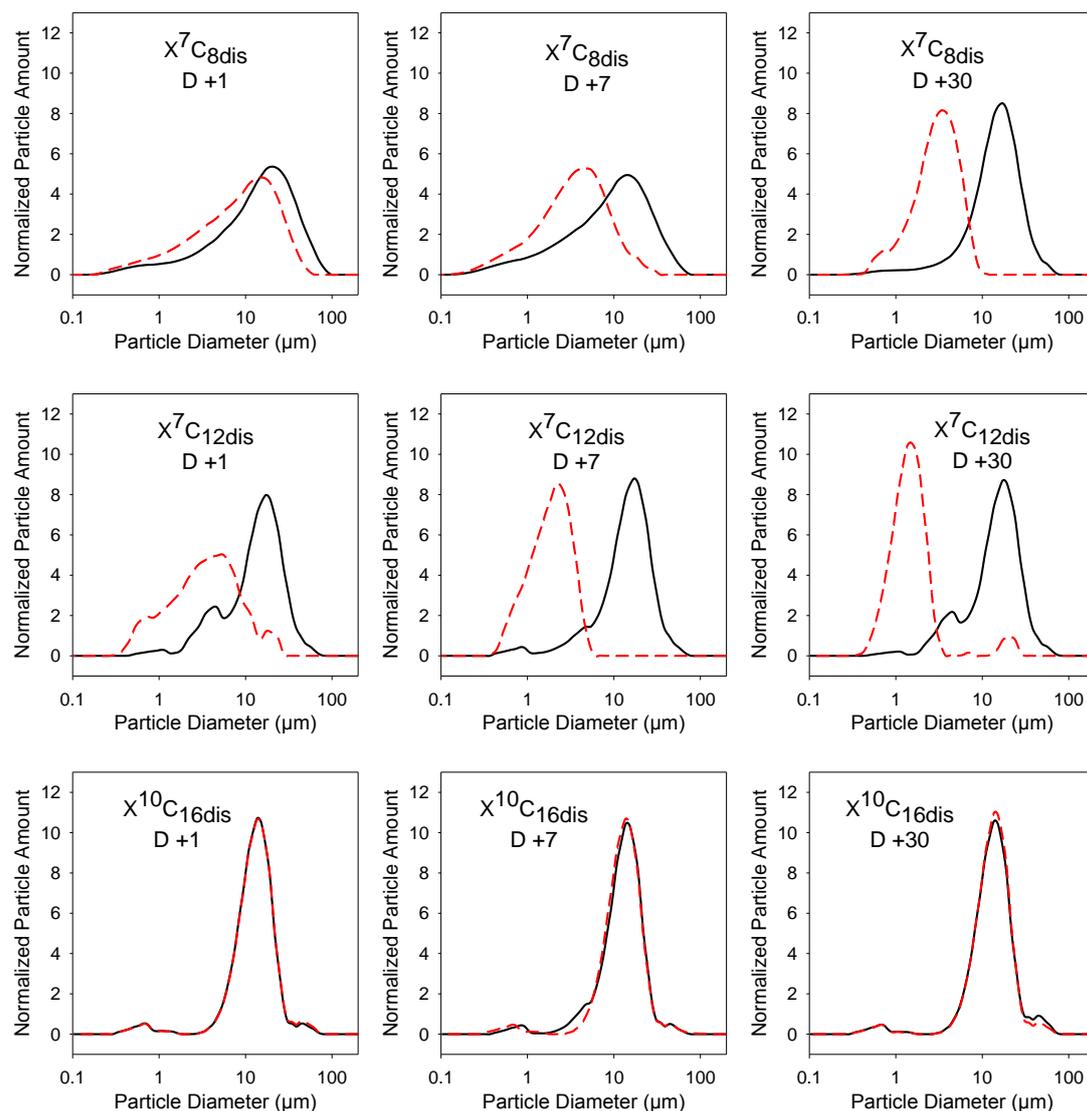


Figure 6: Variations of normalized particle amount as a function of emulsion droplet size with time for HMx_{dis} at 0.2 % w/w with different alkyl chain length. Solid line and dash refer to the top and the bottom of the emulsion, respectively.

On the one hand, as previously established in this study, the emulsion containing 0.2 % w/w of X^7C_{8dis} destabilized quite fast mainly through creaming.

When compared to emulsion prepared with X^7C_{8dis} , over the entire period, the difference between the emulsion top and bottom is initially and then over the whole period of time more and more pronounced for emulsions containing X^7C_{12dis} , as a result of creaming acceleration. However, no marked coalescence is detected as the top distribution superimposes well over time thus demonstrating that X^7C_{12dis} efficiently stabilizes the oil/water interface.

In addition, similar results are obtained for emulsions with X^7C_{8dis} and X^7C_{12dis} at 0.32 % w/w (data not shown). Therefore, these first results clearly indicate that increasing the polymer concentration simply slows down the destabilization but still remains insufficient to produce stable emulsions.

Oppositely, emulsions prepared with $X^{10}C_{16dis}$, can be considered as highly stable as both the top and bottom droplet distribution perfectly superimpose for each tested period. In this later case, neither creaming or coalescence is observed within one month and even after 4 months of storage (data not shown). This result clearly illustrates that once a sufficient alkyl chain length attained, the HMX_{dis} becomes efficient for reaching high emulsions stability.

To sum up, this work evidences that increasing the grafted chain length from C_8 to C_{12} is not in favor of emulsion stabilization as creaming rate is enhanced, while HMX_{dis} with grafted with C_{16} produces highly stable emulsions. This behavior was investigated and discussed in the next section aiming to understand the phenomena involved.

To this end, the flow properties of each derivative in aqueous solution and the corresponding emulsion were studied and reported in Figure 7.

As evidenced on the flow curve presented in Figure 7 A, both X^7C_{8dis} and X^7C_{12dis} display a shear thinning behavior within the whole shear rate range investigated. Both tend to a Newtonian plateau at low shear but, the longer the grafted chain the lower the plateau viscosity. On the contrary, $X^{10}C_{16dis}$ exhibits a completely different behavior corresponding to a weak gel. These results are confirmed by oscillatory measurements (see the inset of Figure 7 A). Indeed, X^7C_{8dis} and X^7C_{12dis} behave as visco-elastic liquids. In addition, increasing the grafted chain length leads to a decrease of the relaxation time. This appears surprising compared to the literature for flexible amphiphilic polymers. Usually, with increasing the grafted chain length, the relaxation phenomenon is slowed down. However for amphiphilic xanthan, the relaxation is not only related to the residing time of the hydrophobic moieties within the nodes of the network but mainly due to a gain in the backbone flexibility which accelerates the chain relaxation. Such a flexible characteristic explains the lower viscosity observed for X^7C_{12dis} . Furthermore, the inset of Figure 7 A clearly indicates that $X^{10}C_{16dis}$ displays a gel-like behavior with G' higher than G'' within the whole range of frequencies, both moduli being nearly frequency independent at low frequency as already described for flexible amphiphilic associative polysaccharides²⁵. Indeed, this property could be attributed to hydrophobic interactions between the grafted moieties which dominate the chain organization and thus the rheological properties in solution.

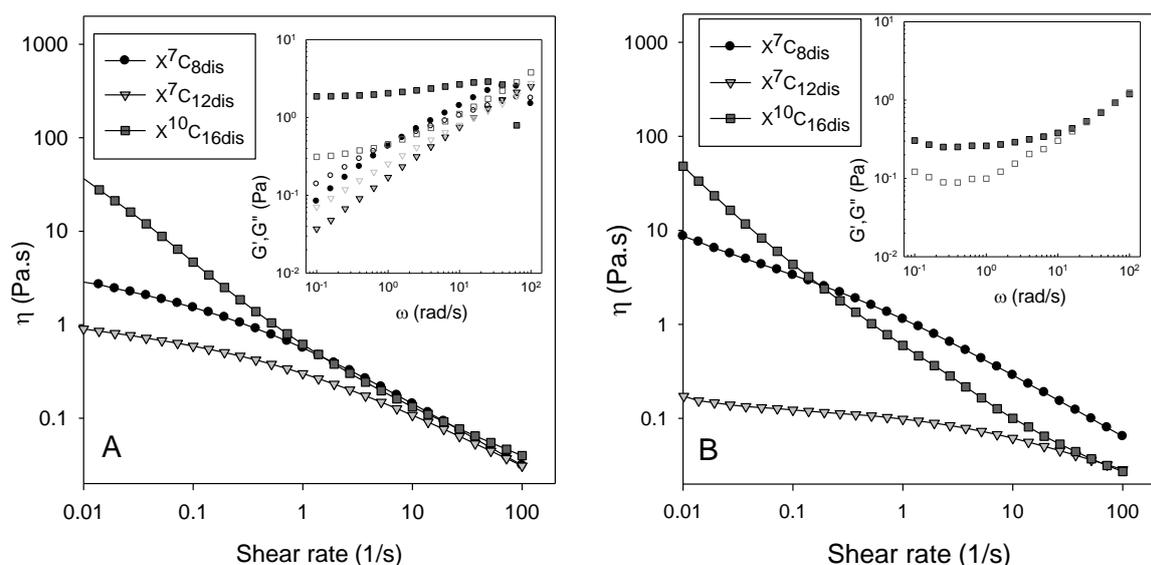


Figure 7: (A) Viscosity as a function of shear rate for xanthane derivatives solutions with different chain length at 0.25 % w/w and 20°C. Inset: Frequency dependence of the storage G' (filled symbols) and loss G'' (open symbols) shear moduli of the solutions. (B) Viscosity as a function of shear rate for the corresponding emulsions.

Corresponding emulsions, containing the same polymer content, were characterized through the same rheological experiment as depicted in Figure 7 B. Like the solutions, emulsions present two different behaviors. On the one hand, emulsions containing X^7C_{8dis} and X^7C_{12dis} display a shear thinning behavior, with viscosity decreasing with increasing chain length; this appears consistent with the behavior evidenced for corresponding solutions, but the chain length impact appears more pronounced for emulsions. Indeed, in solution the viscosity of X^7C_{12dis} is 3 times lower than X^7C_{8dis} while it is almost two decades lower in emulsion. In addition, for emulsion containing X^7C_{8dis} , the viscosity is higher than the one of the corresponding solution while the opposite is observed for X^7C_{12dis} . Usually, emulsion viscosity is significantly higher than the one of the corresponding solution due to the O/W interface contribution, as it is for X^7C_{8dis} . Nevertheless, the contradictory behavior reported for X^7C_{12dis} may be explained once again by HMX_{dis} partitioning between the bulk and the interface. With increasing the grafted chain length, the concentration of HMX_{dis} adsorbed at the O/W interface may be increased to the detriment of the continuous phase as was observed for HXM_{ord} with increasing grafting density²¹ and HMX_{dis} in this paper. On the other hand, the gel behavior reported for $X^{10}C_{16dis}$ solution is also observed for the corresponding emulsion, as confirmed by the marked viscoelastic properties (see the inset of Figure 7 B). Consequently, the emulsion stability may be easily explained by droplets entrapment within the gel structure. Similar results have been

obtained for an emulsion containing C_{12dis} but with a higher grafting density, namely $X^{17}C_{12dis}$ (data not shown), thus clearly confirming this statement.

4. Conclusion

The present work demonstrated that, under the same conditions (the same chain length, grafting density and concentration) HMX_{ord} and HMX_{dis} are both able to emulsify an oil phase thus forming an emulsion. However, these two octyl grafted xanthan derivatives do not own the same efficiency to stabilize the dispersion. Indeed, emulsions containing HMX_{ord} are highly stable as no creaming or coalescence is observed over 4 months, even at low concentration (down to 0.1%). On the contrary, whatever the concentration, emulsions containing HMX_{dis} undergoes destabilization mainly through creaming. In addition, the latter phenomenon is more and more pronounced with increasing grafting density. It was demonstrated that HMX_{dis} split between bulk and O/W interface; the more grafted, the more the polymer at the interface to the detriment of the bulk. The decrease in HMX_{dis} concentration in the bulk leads to a drop in emulsion viscosity that accelerates the creaming. Thus the emulsion stabilization with HMX_{dis} is a compromise between thickening properties and interface stabilization. Moreover, increasing the grafting density and/or increasing the grafted chain length induced a loss in backbone rigidity that also diminishes solution viscosity, for the grafting density studied.

Finally, totally different behavior I observed when increasing the HMX_{dis} grafted chain length to C_{16} as it induces the formation of a gel in the continuous phase, and the corresponding emulsions therefore show a very high stability.

To conclude, this work allowed demonstrating that more than the O/W interface stabilization, the rheological property of the continuous aqueous phase appears as the key parameter in the emulsion stabilization containing HMX.

5. Acknowledgments

Authors thank the French Ministry for Research and Education for research grant and the Region Normandie and FEDER for financial supports.

References

- (1) Robins, M. M. Emulsions — Creaming Phenomena. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5* (5–6), 265–272.
- (2) Paraskevopoulou, A. Stabilization of Olive Oil - Lemon Juice Emulsion with Polysaccharides. *Food Chem.* **2005**, *90* (4), 627–634.
- (3) Krstonošić, V.; Dokić, L.; Nikolić, I.; Milanović, M. Influence of Xanthan Gum on Oil-in-Water Emulsion Characteristics Stabilized by OSA Starch. *Food Hydrocoll.* **2015**, *45*, 9–17.
- (4) Opawale, F. O.; Burgess, D. J. Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactants on Water-in-Oil Emulsion Stability. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *197* (1), 142–150.
- (5) Chevalier, Y.; Bolzinger, M.-A. Emulsions Stabilized with Solid Nanoparticles: Pickering Emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *439*, 23–34.
- (6) Durand, A.; Dellacherie, E. Neutral Amphiphilic Polysaccharides: Chemical Structure and Emulsifying Properties. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, *284* (5), 536–545.
- (7) Rotureau, E.; Leonard, M.; Marie, E.; Dellacherie, E.; Camesano, T. A.; Durand, A. From Polymeric Surfactants to Colloidal Systems (1): Amphiphilic Dextrans for Emulsion Preparation. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *288* (1–3), 131–137.
- (8) Landoll, L. M. Nonionic Polymer Surfactants. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1982**, *20* (2), 443–455.
- (9) Desbrieres, J. Autoassociative Natural Polymer Derivatives: The Alkylchitosans. Rheological Behaviour and Temperature Stability. *Polymer* **2004**, *45* (10), 3285–3295.
- (10) 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.
- (11) Rouzes, C.; Durand, A.; Leonard, M.; Dellacherie, E. Surface Activity and Emulsification Properties of Hydrophobically Modified Dextrans. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *253* (1), 217–223.
- (12) Roy, A. N.; Benyahia, L.; Grisel, M.; Renou, F. Shear Interfacial Viscoelasticity of Native and Hydrophobically Modified Xanthan at Oil/Water Interface. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 887–894.
- (13) Hennock, M.; Rahalkar, R. R.; Richmond, P. Effect of Xanthan Gum upon the Rheology and Stability of Oil-Water Emulsions. *J. Food Sci.* **1984**, *49* (5), 1271–1274.
- (14) Sun, C.; Gunasekaran, S.; Richards, M. P. Effect of Xanthan Gum on Physicochemical Properties of Whey Protein Isolate Stabilized Oil-in-Water Emulsions. *Food Hydrocoll.* **2007**, *21* (4), 555–564.
- (15) Milas, M.; Rinaudo, M. Conformational Investigation on the Bacterial Polysaccharide Xanthan. *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 189–196.
- (16) Matsuda, Y.; Biyajima, Y.; Sato, T. Thermal Denaturation, Renaturation, and Aggregation of a Double-Helical Polysaccharide Xanthan in Aqueous Solution. *Polym. J.* **2009**, *41* (7), 526–532.
- (17) Capron, I.; Brigand, G.; Muller, G. Thermal Denaturation and Renaturation of a Fermentation Broth of Xanthan: Rheological Consequences. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, *23* (3), 215–225.

- (18) Choppe, E.; Paud, F.; Nicolai, T.; Benyahia, L. Rheology of Xanthan Solutions as a Function of Temperature, Concentration and Ionic Strength. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (4), 1228–1235.
- (19) Roy, A.; Comesse, S.; Grisel, M.; Hucher, N.; Souguir, Z.; Renou, F. Hydrophobically Modified Xanthan: An Amphiphilic but Not Associative Polymer. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1160–1170.
- (20) Fantou, C.; Roy, A. N.; Dé, E.; Comesse, S.; Grisel, M.; Renou, F. Chemical Modification of Xanthan in the Ordered and Disordered States: An Open Route for Tuning the Physico-Chemical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *178*, 115–122.
- (21) Fantou, C.; Comesse, S.; Renou, F.; Grisel, M. Hydrophobically Modified Xanthan: Thickening and Surface Active Agent for Highly Stable Oil in Water Emulsions. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *205*, 362–370.
- (22) Wu, S.-J.; Wu, J.-H.; Xia, L.-Z.; Chu, C.; Liu, D.; Gong, M. Preparation of Xanthan-Derived Oligosaccharides and Their Hydroxyl Radical Scavenging Activity. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92* (2), 1612–1614.
- (23) Adam, S. HBTU: A Mild Activating Agent of Muramic Acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2* (6), 571–574.
- (24) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (15), 1269–1272.
- (25) 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.

En résumé :

Du xanthane modifié sous forme désordonnée (XMHD) a été utilisé en tant qu'agent stabilisant pour les émulsions. Afin d'étudier des systèmes « stables mais pas trop », la concentration en polymère modifié a été fixée à 0,2 % m/m et nous avons fait varier la longueur de la chaîne greffée (C_8 , C_{12} et C_{16}) ainsi que la densité de greffage (de 7 % à 35 %).

A cette concentration, XMHD est capable d'émulsionner la totalité de la phase grasse. Néanmoins, les émulsions obtenues subissent des phénomènes de déstabilisation au cours du temps, notamment du crémage. Ce phénomène est accentué par augmentation de la longueur de la chaîne (C_{12}) ou du taux de greffage. Cependant, lorsque la longueur de la chaîne greffée atteint 16 carbones ou un taux de greffage suffisant, le xanthane modifié présente un comportement de gel en solution aqueuse et les émulsions correspondantes restent macroscopiquement homogènes et stables pendant plusieurs mois.

Ainsi, pour des taux de greffage similaires, XMHD et XMHO sont tous les deux capable de former l'émulsion mais ils n'ont pas la même aptitude à la stabilisation de celle-ci. D'une part, XMHO est un stabilisant très efficace car l'émulsion reste stable pendant plusieurs mois, et cette stabilité est observée quel que soit le taux de greffage. D'autre part, les émulsions contenant XMHD se déstabilisaient au cours du temps par crémage. Même en augmentant la concentration en HMX, aucune émulsion homogène n'a été obtenue.

Ces observations démontrent que l'augmentation de la flexibilité de la chaîne polymère ne permet pas d'améliorer les propriétés stabilisantes en émulsion.

En effet, des analyses rhéologiques ont montré que XMHD présente une plus faible viscosité que XMHO sur toute la gamme de concentration étudiée. Or, les résultats présentés dans la partie précédente ont permis d'établir que pour stabiliser les émulsions H/E, le XMH se répartit entre la stabilisation de l'interface H/E (pour éviter la coalescence) et le maintien de la viscosité de la phase continue (pour retarder le crémage). Ainsi, les XMH sont capables de stabiliser efficacement l'interface (H/E) puisque la coalescence est limitée voire inexistante, mais la viscosité de la phase continue n'est pas suffisante pour empêcher le crémage. Ces résultats peuvent expliquer en partie la meilleure stabilité des émulsions contenant du XMHO.

Partie 3 : Etude complémentaire et perspectives

L'objectif de cette troisième partie est l'étude de trois systèmes complémentaires, d'une part afin de mettre en évidence l'intérêt de la modification chimique du xanthane pour des applications en formulation et d'autre part pour approfondir davantage la compréhension des phénomènes régissant la formation et la stabilisation/déstabilisation des émulsions.

Les résultats présentés dans cette partie sont préliminaires et une étude plus poussée reste nécessaire pour pouvoir conclure sur les différents phénomènes mis en jeu.

Cette étude complémentaire est constituée de 3 sous parties comme illustrée par la Figure 44. Par souci de clarté, le xanthane modifié sous forme désordonnée est représenté schématiquement sous la forme d'une pelote statistique, bien que nous ayons montré dans notre première publication que celui-ci a la capacité de se réordonner plus ou moins partiellement, différemment de la forme ordonnée, en solution¹.

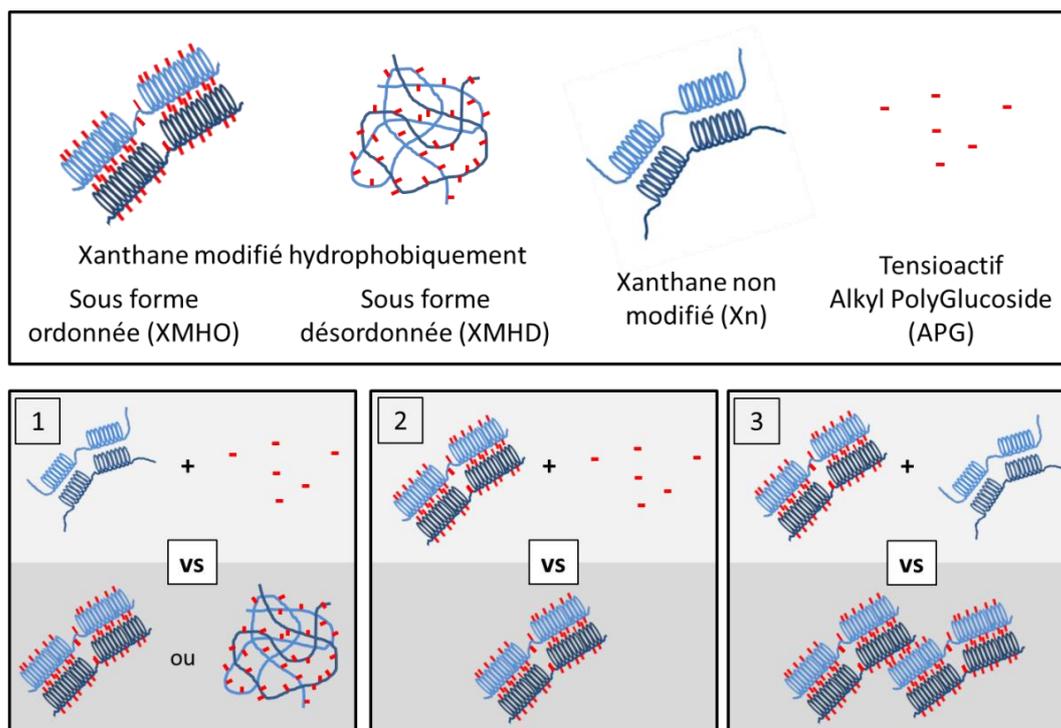


Figure 44 : Représentation schématique des trois études de cette partie

1- Dans une première étude, des émulsions ont été préparées avec du xanthane non modifié (Xn) et un tensioactif moléculaire (émulsion conventionnelle) afin de comparer le pouvoir stabilisant de ce dernier à celui du xanthane modifié hydrophobiquement sous ses deux conformations (XMHO et XMHD).

2- Puis, le même tensioactif a été ajouté à une émulsion contenant XMHO dans le but de pouvoir déterminer l'impact de ce tensioactif sur la stabilité des émulsions et l'existence éventuelle d'interactions ou de compétition entre ces deux composés amphiphiles.

3- Dans une dernière partie et à partir des résultats obtenus dans la partie précédente, les caractéristiques et la stabilité d'émulsions préparées à partir d'un mélange de Xn et XMHO ont été étudiées, pour tenter de mettre en évidence les effets combinés de chacune des gommes.

3.1. Comparaison du pouvoir stabilisant des émulsions contenant du xanthane modifié et des émulsions conventionnelles

De par leur caractère amphiphile, les xanthanes modifiés hydrophobiquement présentent des applications potentielles en tant qu'agent stabilisant notamment pour les émulsions. En effet dans la partie précédente, nous avons démontré, sous certaines conditions notamment de concentration, la capacité des xanthanes modifiés à émulsionner la totalité de la phase grasse et à stabiliser les gouttelettes d'huile, permettant d'obtenir des émulsions macroscopiquement homogènes et stables pendant plusieurs mois.

A ce stade, l'apport du greffage des chaînes alkyles sur la molécule de xanthane demeure incertain, en particulier par rapport à des émulsions conventionnelles stabilisées par des tensioactifs moléculaires. Il apparaissait donc nécessaire de vérifier si un simple mélange de tensioactifs moléculaires avec du xanthane non modifié chimiquement, comme souvent utilisé dans la littérature, apporterait ou non des propriétés équivalentes aux émulsions. Ainsi, nous nous sommes intéressés à comparer le pouvoir stabilisant des émulsions avec du xanthane modifié hydrophobiquement sous forme ordonnée ou sous forme désordonnée (XMHO et XMHD respectivement) et des émulsions conventionnelles contenant du xanthane non modifié (Xn) et un tensioactif moléculaire.

Un alkyl polyglucoside C₈-C₁₀ (APG), a été sélectionné pour cette étude en raison de sa structure chimique proche de celle des XMH synthétisés au cours de ce travail. En effet, les APG sont des tensioactifs non ioniques produits à partir d'huile végétale et d'amidon²²⁴ et sont composés d'une partie hydrophile dérivée d'un sucre et d'une partie hydrophobe composée d'une chaîne alkyle. Du fait du processus industriel impliquant une réaction de condensation entre des sucres et des alcools hydrophiles ou encore des alcools gras, le produit final est souvent composé d'un mélange, appelé PolyGlucoside. L'APG est alors caractérisé par la longueur de sa chaîne alkyle et le nombre moyen d'unités de glucose de sa molécule²²⁵. Dans notre cas, l'APG utilisé possède un degré de polymérisation moyen de 1,6 et des chaînes alkyles C₈ et C₁₀ dans le ratio 63/37. Ainsi, la structure de la partie hydrophobe de ce tensioactif est donc très similaire à celle du xanthane modifié. Les

similitudes structurales entre le xanthane modifié hydrophobiquement et le mélange xanthane natif + APG font de ces deux systèmes distincts de bons candidats en vue de comparer leur pouvoir stabilisant d'émulsion.

Afin de confronter les résultats de cette partie avec l'ensemble des données de la thèse, la composition de base et le protocole de formulation des émulsions sont identiques à ce qui a été décrit précédemment.

Pour rappel, la phase grasse représente 20 % m/m de l'émulsion et est composée exclusivement d'isononanoate d'isononyle.

La phase aqueuse (80 % m/m) est constituée de xanthane et d'APG. Les solutions aqueuses contenant ces deux constituants sont préparées séparément. De par sa structure chimique, l'APG présente une meilleure solubilité dans la phase aqueuse. Sur la base d'essais préliminaires réalisés pour optimiser le processus de préparation des mélanges et émulsions, l'ajout du tensioactif est donc réalisé avant émulsification à partir d'un pré – mélange concentré.

L'objectif de cette étude est de pouvoir comparer le pouvoir stabilisant des deux systèmes : XMH et Xn + APG. Ainsi, l'APG a été introduit dans les émulsions de façon à ce qu'il y ait la même proportion de chaînes hydrophobes que pour des xanthanes modifiés avec des densités de greffage comprises entre 8 % et 35 %.

A partir du calcul suivant, il est possible de déterminer la masse d'APG à introduire dans l'émulsion.

Soit pour le xanthane modifié, on a :

$$\% C_8 = \frac{nC_8}{n_{UR}} * 100$$

Avec % C₈, le taux de greffage

nC₈ et n_{UR}, la quantité de matière de chaîne octyle et de l'unité de répétition, respectivement

Pour rappel, la partie hydrophobe de l'APG est constituée d'un mélange de chaîne alkyle C₈ et C₁₀. Ainsi, pour l'APG, on fait l'approximation suivante :

$$nC_8 = nC_8/C_{10} = n_{APG}$$

Avec n_{APG} et nC₈ – C₁₀, la quantité de matière en APG et en chaîne octyle et dodécyle de l'APG, respectivement

Finalement, on obtient m_{APG} , la masse d'APG à introduire :

$$m_{APG} = \left(\% C_8 * \frac{m_{XMH}}{M_{Xn}} \right) * \frac{pC_8 * M_{C8}}{pC_{10} * M_{C10}} * M_{APG}$$

Avec m_{XMH} , la masse introduite en XMH

M_{Xn} , M_{C10} , M_{C8} et M_{APG} , les masses molaires de l'unité de répétition du xanthane, des chaînes décyle et octyle et de l'APG, respectivement

pC_8 et pC_{10} , les proportions molaires en C_8 et C_{10} de l'APG

A partir de l'équation précédente, on constate bien que la quantité à introduire en APG est directement reliée au taux de greffage ainsi qu'à la concentration en XMH.

Les masses d'APG correspondantes sont répertoriées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Quantité d'APG à introduire en fonction du taux de greffage et de la concentration en XMH.

Concentration en XMH (% m/m)	Quantité d'APG (en mg / % m/m)							
	Taux de greffage							
	8		15		20		35	
0,1	0,7	0,004	1,3	0,007	1,6	0,008	2,9	0,015
0,2	1,3	0,007	2,5	0,013	3,3	0,017	5,8	0,029
0,32	2,1	0,011	4	0,02	5,3	0,027	9,3	0,047

Sur la base des résultats obtenus dans la partie précédente, trois concentrations en Xn ont été étudiées : 0,1, 0,2 et 0,32 % m/m. La quantité d'APG introduite est donc ajustée de façon à correspondre à chacun des taux de greffage et concentrations des XMH. A partir du Tableau 7, 12 émulsions ont ainsi été préparées. Nous avons choisi de ne présenter ici que les résultats correspondant à des émulsions contenant du xanthane modifié avec des densités de greffage extrêmes, soit 8 % et 35 %, cela sous les deux conformations (ordonnée et désordonnée).

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à des quantités d'APG correspondant à des densités de greffage d'environ 8 %, noté X^8APG . Les photographies des émulsions correspondantes 24h après leur préparation sont présentées en Figure 45.

On peut remarquer, sur la Figure 45, que quelle que soit la concentration en APG, une importante couche huileuse transparente est observée à la surface de l'émulsion. Ces résultats suggèrent que la quantité introduite en APG n'est pas suffisante pour émulsionner la totalité de la phase grasse.

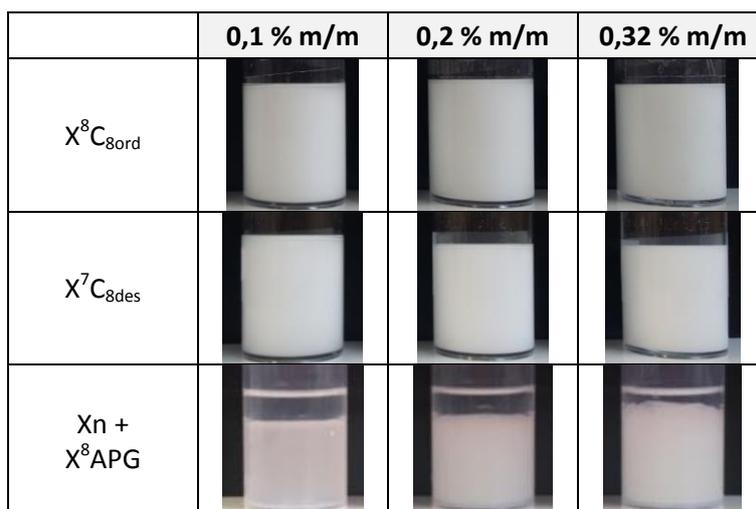


Figure 45 : Photographie des émulsions contenant du X^8C_{8ord} , du X^7C_{8des} et un système composé de Xn et d'APG à différentes concentration à J+1.

A l'inverse, le xanthane modifié sous forme ordonnée comme sous forme désordonnée permet d'obtenir des émulsions macroscopiquement homogènes après 24h pour toutes les concentrations étudiées.

Une série homologue d'essais de formulation a été menée en utilisant des quantités d'APG équivalentes aux xanthanes étudiés les plus greffés, noté $X^{35}APG$. Les résultats sont présentés en Figure 46.

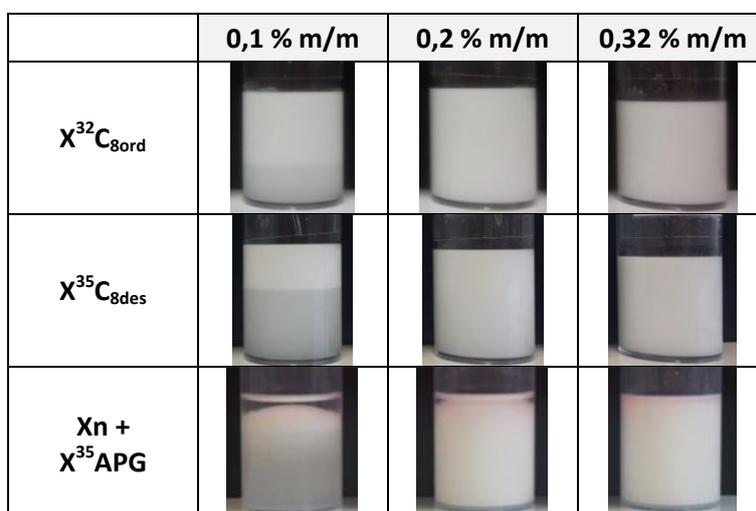


Figure 46 : Photographie des émulsions contenant du $X^{32}C_{8ord}$, du $X^{35}C_{8des}$ et un système composé de Xn et d'APG à différentes concentration à J+1.

Comme attendu, l'augmentation de concentration en APG permet d'émulsionner une proportion plus élevée de phase grasse. Cependant, même pour les quantités les plus importantes d'APG, une fine couche d'huile est toujours observée en haut de l'émulsion.

Les résultats obtenus ne sont pas surprenants. En effet, les émulsions conventionnelles contiennent généralement une quantité de tensioactif nettement supérieure aux essais réalisés ici, au minimum 1 % m/m de tensioactif pour assurer l'émulsification²²⁶.

Pour les émulsions contenant du xanthane modifié, et pour chacune des concentrations testées l'émulsification est initialement totale, démontrant ainsi l'importante capacité d'émulsification du xanthane amphiphile. Néanmoins, du crémage est visible un jour seulement après émulsification lorsque la concentration en XMH n'est que de 0,1 % m/m. Cette observation est conforme aux résultats décrits dans la Partie 2.

Ainsi, nous avons comparé des émulsions contenant soit XMH soit Xn + APG avec une quantité de segments hydrophobes égale aux différents taux de greffage. Cette étude permet de constater que l'APG ne permet pas d'obtenir des émulsions macroscopiquement homogènes après 24h, contrairement à XMH. Les phénomènes de stabilisation mis en jeu semblent donc différents.

A partir des résultats obtenus dans le paragraphe précédent, nous avons augmenté la quantité d'APG dans le but d'obtenir un système totalement émulsifié à J +1 pour chaque concentration étudiée.

Pour cette partie, le choix de X^8C_{8ord} se justifie encore une fois par le fait que c'est le polymère modifié qui permet d'obtenir les émulsions les plus homogènes et stables dans le temps (voir la Partie 2).

Le Tableau 8 présente les quantités de matière de chaîne alkyle nécessaires pour émulsionner la totalité de la phase grasse dans le cas de l'APG et de X^8C_{8ord} . Ces quantités ont été déterminées expérimentalement.

Tableau 8 : Quantité de matière de chaîne alkyle (en mol) pour l'APG et pour X^8C_{8ord}

Concentration en xanthane (Xn ou XMH) (% m/m)	$n_{C_8-C_{10}APG}$ (mol)	$n_{C_8 X^8C_{8ord}}$ (mol)	$\frac{n_{C_8/C_{10}APG}}{n_{C_8 X^8C_{8ord}}}$
0,1	$8,0 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	45
0,2	$6,7 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$	19
0,32	$4,3 \cdot 10^{-5}$	$5,7 \cdot 10^{-6}$	7,5

Prenons le cas d'une émulsion contenant 0,1 % m/m en xanthane (natif ou modifié). Afin d'émulsionner totalement la phase grasse, il est nécessaire d'introduire 45 fois plus d'APG que de chaînes C_8 apportées par le X^8C_{8ord} . Par conséquent, il est possible de conclure que le xanthane modifié possède donc un pouvoir émulsifiant très nettement supérieur au système Xn + APG.

On remarque également que le rapport diminue avec l'augmentation de la concentration en xanthane. Ce résultat peut s'expliquer par l'action viscosifiante de la phase continue du xanthane qui permet de ralentir la migration des gouttelettes au sein de l'émulsion et donc de retarder leur coalescence immédiatement après émulsification.

La Figure 47 présente des photographies des émulsions correspondantes ont été prises après 24 h et après 1 mois.

Xn (% m/m)	APG (% m/m)	Photographie des émulsions		X ⁸ C _{8ord} (% m/m)	Photographie des émulsions	
		J +1	J +30		J +1	J +30
0,1	0,15			0,1		
0,2	0,1			0,2		
0,32	0,08			0,32		

Figure 47 : Photographies des émulsions contenant différentes concentrations en Xn et en APG, ainsi que des émulsions contenant différentes concentrations en X⁸C_{8ord} à J +1.

Comme le montre la Figure 47, la totalité de la phase grasse a bien été initialement émulsionnée. Après un mois de stockage à température ambiante, des différences d'évolution très marquées sont observées entre les deux systèmes. En effet, pour une concentration en xanthane de 0,1 % m/m, les émulsions contenant de l'APG présentent une séparation de phase très prononcée. La phase supérieure est composée de la phase crémée riche en gouttelettes d'huile alors que la partie inférieure est constituée d'une phase aqueuse, limpide. La déstabilisation de cette émulsion est très rapide puisque le début du crémage était déjà observable à J +1. Comme présenté dans la publication 2, l'émulsion contenant X⁸C_{8ord} à 0,1 % m/m présente également du crémage mais le phénomène est beaucoup plus lent puisqu'un mois l'émulsion semble toujours macroscopiquement homogène.

Pour rappel, les émulsions contenant une concentration en xanthane modifiée sous forme ordonnée supérieure ou égale à 0.2 % m/m restent homogènes et stables pendant plusieurs mois.

A l'inverse, les émulsions contenant de Xn + APG présentées sur la Figure 47 subissent un phénomène de crémage, celui-ci étant d'autant plus marqué et rapide que la concentration en xanthane est faible.

Afin d'étudier et de comparer les différentes émulsions, des analyses de granulométrie ont été réalisées. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'ajout du tensioactif sur la taille des gouttelettes 24 h après émulsification, comparé à des émulsions contenant X^8C_{8ord} . Par soucis de clarté, seuls les résultats des analyses granulométriques de la partie supérieure des émulsions sont représentés en Figure 48.

En effet, les résultats des analyses réalisées sur la partie inférieure sont en effet parfaitement cohérents avec les observations réalisées sur la partie supérieure, sans pour autant apporter d'éléments de compréhension supplémentaires.

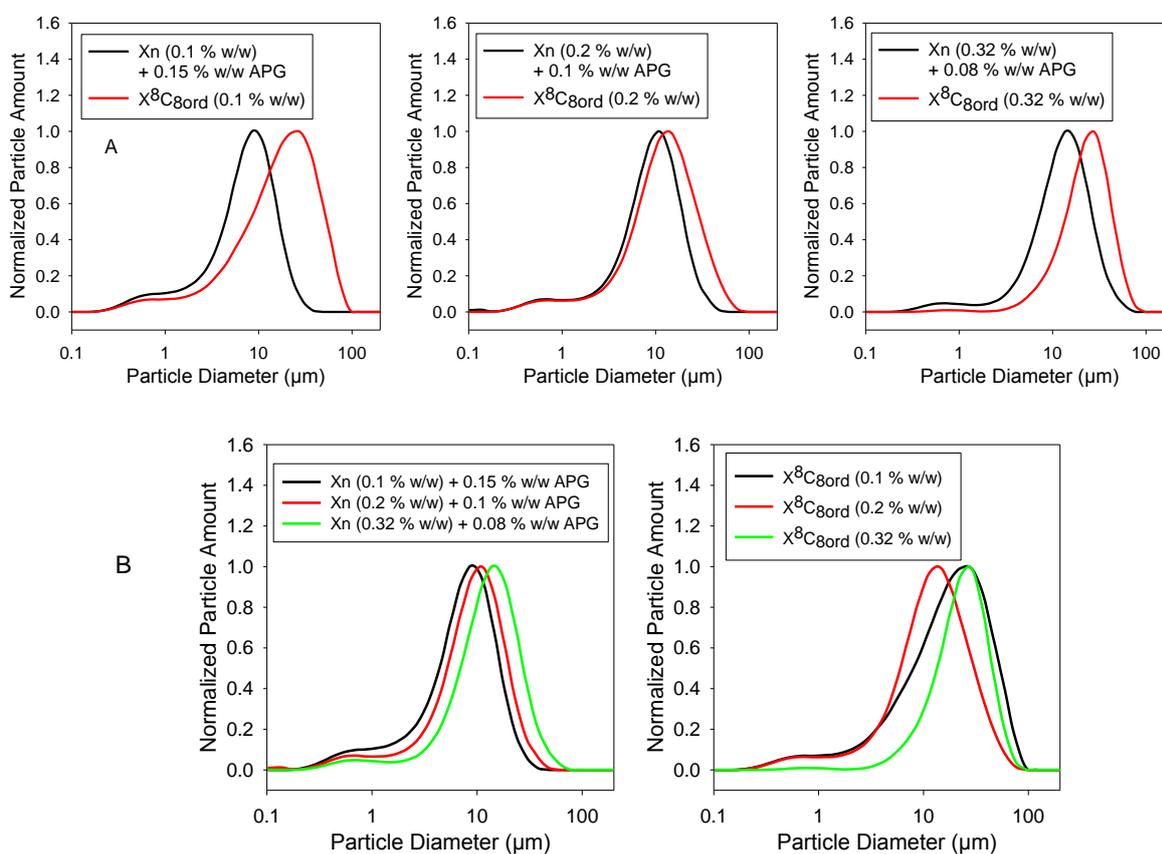


Figure 48 : (A) Comparaison de la distribution de la taille des gouttelettes du haut de l'émulsion contenant soit du xanthane non modifié et de l'APG soit X^8C_{8ord} pour différentes concentrations à J +1. (B) Evolution de la taille des gouttes pour les émulsions contenant Xn + APG ou X^8C_{8ord} .

La Figure 48 A montre que quelle que soit la concentration en polymère, les émulsions contenant de l'APG présentent des gouttelettes plus petites que celles contenant X^8C_{8ord} . On observe également

sur la Figure 48 B que la taille des gouttelettes augmente avec la diminution de la quantité d'APG, bien que la concentration en xanthane augmente. Tout ceci est cohérent avec le fait que le xanthane étant un polysaccharide non adsorbant, il n'a pas d'effet sur la taille des gouttelettes¹⁵³.

La présence d'APG permet donc de contrôler la taille des gouttelettes de l'émulsion et, logiquement, cette dernière augmente lorsque la concentration en APG diminue.

Dans le cas des émulsions préparées avec X^8C_{8ord} , on remarque que la taille des gouttelettes est minimale pour une concentration de 0,2 % m/m, puis la taille des gouttelettes augmente de nouveau avec la concentration (voir la Figure 48 B). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que dans le cas du xanthane modifié, des interactions inter et/ou intramoléculaires entre les groupements hydrophobes peuvent se produire et ainsi entraîner une compétition entre ces interactions et la stabilisation de l'interface. Afin de conclure sur ce point, une étude plus approfondie reste nécessaire.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'évolution de la taille des gouttelettes dans le temps. L'objectif étant d'observer les phénomènes mis en jeu lors du vieillissement des émulsions.

Tout comme précédemment, les photographies suffisent à mettre clairement en évidence les phénomènes de crémage. Ainsi, seuls les résultats correspondant à la partie supérieure de l'émulsion sont présentés en Figure 49.

En premier lieu, pour l'émulsion contenant 0,1 % m/m en Xn et 0,15 % m/m en APG, les distributions de taille des gouttelettes après un jour et un mois se superposent parfaitement, il n'y a donc pas de coalescence. Des résultats similaires sont observés pour l'émulsion contenant 0,2 et 0,1 % m/m en Xn et en APG, respectivement. Mais lorsque la quantité en APG diminue à 0,08 %, on observe après un mois que la distribution de taille des gouttelettes se décale très légèrement vers des tailles plus élevées, ce qui peut correspondre à un début de phénomène de coalescence.

Cette analyse permet donc de constater que malgré le crémage important, après plusieurs semaines de vieillissement les gouttelettes ont majoritairement gardé leur intégrité, sans à ce stade observer de déstructuration irréversible de l'émulsion.

A l'inverse, une légère coalescence est observée pour les émulsions contenant 0,1 % m/m X^8C_{8ord} , coalescence qui disparaît lorsque la concentration en polymère augmente.

L'augmentation de la stabilité de l'émulsion avec la concentration en xanthane modifié peut s'expliquer dans ce cas par les effets combinés de l'augmentation de la viscosité de la phase continue et du nombre de fonctions hydrophobes présentes sur le squelette du polysaccharide, permettant de stabiliser davantage l'interface eau-huile, et ainsi empêcher la coalescence.

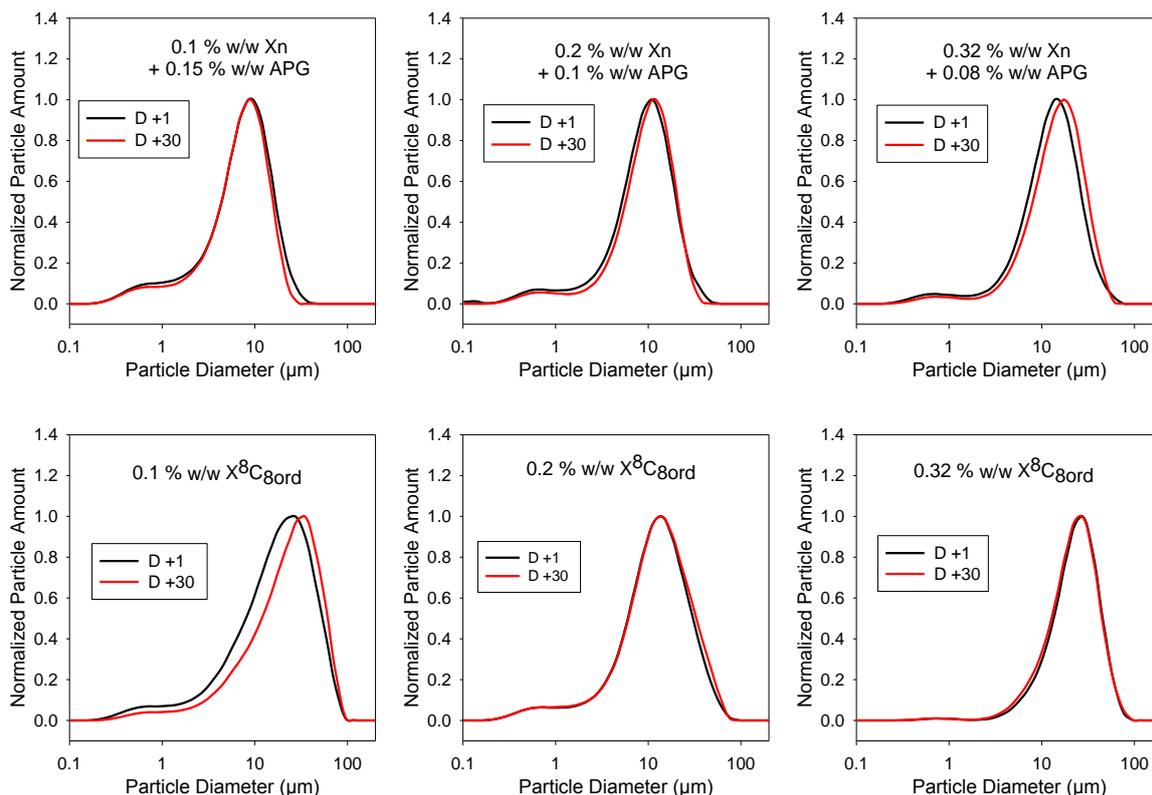


Figure 49 : Evolution dans le temps de la distribution de la taille des gouttelettes du haut de l'émulsion contenant soit du xanthane non modifié et de l'APG soit X⁸C_{8ord} à différentes concentrations.

Pour résumer, les résultats obtenus dans cette étude montrent que les deux systèmes (XMH et Xn + APG) permettent chacun, dans des conditions bien définies, de préparer des émulsions. Néanmoins, ces dernières ne présentent pas la même stabilité, majoritairement vis-à-vis du phénomène de crémage.

Nos résultats démontrent que les mécanismes mis en jeu dans les processus de stabilisation des émulsions sont clairement différents.

Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence que le xanthane modifié a un pouvoir émulsifiant très nettement supérieur à l'APG. En effet, contrairement aux émulsions contenant l'APG (en proportions équivalentes en termes de chaînes alkyles), les émulsions contenant XMH sont macroscopiquement homogènes après un jour, malgré de très faibles quantités de fonctions hydrophobes disponibles pour stabiliser l'interface eau-huile.

En augmentant la quantité d'APG, il est possible d'émulsifier la totalité de la phase grasse, mais un crémage important reste observable. Ce résultat est cohérent avec la littérature, en particulier il peut s'expliquer par le phénomène de floculation par déplétion bien connu dans le cas des émulsions

contenant du xanthane¹⁸⁷. Ainsi, l'augmentation de la concentration en xanthane, pour une quantité fixe d'APG, permet de limiter le crémage par augmentation de la viscosité de la phase continue.

De plus, les analyses granulométriques ont montré que le principal phénomène responsable de la déstabilisation des émulsions est le crémage, la coalescence restant dans tous les cas très limitée. Cela permet également d'établir que les deux systèmes sont efficaces pour stabiliser les interfaces eau/huile en les rendant résistantes à la coalescence sur la période étudiée.

Pour conclure, le xanthane modifié ne se comporte pas uniquement comme la combinaison d'un xanthane natif et d'un tensioactif. Ces résultats confirment donc l'intérêt de la modification chimique du xanthane pour des applications à la stabilisation des émulsions.

3.2. Impact de l'ajout d'un tensioactif sur la stabilité des émulsions contenant du xanthane modifié

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier l'impact de l'ajout d'un tensioactif (APG) sur les caractéristiques et la stabilité d'émulsions préparées à partir de xanthane modifié. Pour les mêmes raisons que dans le paragraphe précédent, nous avons choisi pour cette étude d'utiliser le xanthane modifié sous forme ordonnée.

L'objectif était ici de déterminer si l'ajout du tensioactif permet d'améliorer la stabilité des émulsions ou au contraire entraîne une compétition entre l'APG et XMHO qui pourrait être due à des interactions, ou encore à une adsorption préférentielle de l'un de ces deux composants à l'interface.

Une émulsion contenant X^6C_{8ord} à une concentration de 0,1 % m/m a été utilisée comme référence. X^6C_{8ord} est issu d'un nouveau lot de synthèse et, nous avons pu vérifier que X^6C_{8ord} et X^8C_{8ord} présentent des comportements similaires en émulsion.

Comme déjà évoqué précédemment, cette émulsion subit un phénomène de crémage, mais dans une échelle de temps permettant d'étudier l'influence du tensioactif ajouté sur les caractéristiques initiales et le vieillissement des émulsions.

Des émulsions contenant X^6C_{8ord} et deux concentrations en APG ont été préparées en utilisant un protocole de formulation identique à celui décrit précédemment.

Nous avons choisi de travailler avec une concentration faible en APG de 0,05 % m/m, correspondant à une quantité de chaînes alkyles introduites ne permettant pas l'émulsification complète du système. Une concentration en APG de 0,15 % m/m a également été sélectionnée puisqu'elle correspond à la quantité maximale de tensioactif introduite dans l'étude précédente afin d'émulsionner la totalité de la phase grasse.

Les photographies des émulsions contenant X^6C_{8ord} seul et avec différentes concentrations d'APG après préparation (J +1) et après 30 jours de stockage à température ambiante (J +30) sont présentées en Figure 50. Ainsi, il sera possible de faire un lien avec l'étude précédente en comparant une émulsion contenant 0,15 % m/m d'APG et soit du xanthane modifié X^6C_{8ord} soit du xanthane non modifié, Xn.

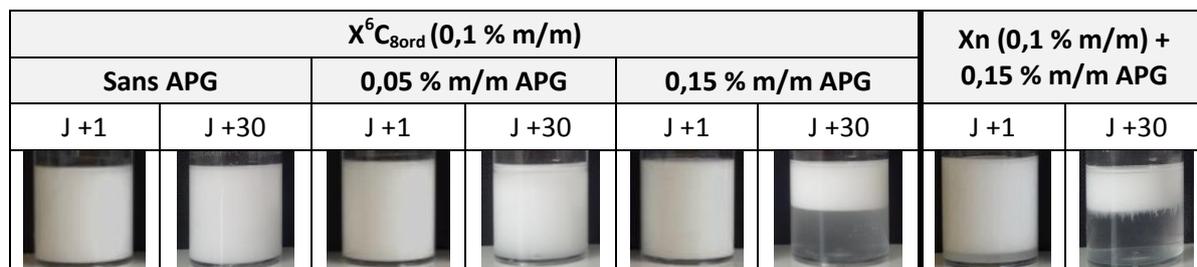


Figure 50 : Photographie à différents temps des émulsions contenant 0,1 % m/m en polymères (X^6C_{8ord} ou Xn) et différentes concentrations en APG.

A partir de la Figure 50, on constate que seules deux émulsions apparaissent macroscopiquement homogène après 1 mois : X^6C_{8ord} seul et avec 0,05 % m/m d'APG. Des analyses granulométriques, selon le protocole de prélèvement du haut et du bas des échantillons, ont permis de montrer que ces deux émulsions présentent un crémage équivalent (résultats non présentés). Ce crémage n'est pas visible macroscopiquement à ce stade de l'étude. Il apparaît donc que l'ajout du tensioactif à faible concentration n'a pas d'impact significatif sur la microstructure initiale de l'émulsion tout comme il ne modifie pas son évolution au cours du vieillissement.

En revanche, lorsque la quantité d'APG est de 0,15 % m/m, on observe un crémage très marqué après 1 mois. Le comportement de cette émulsion est ainsi très comparable à l'émulsion contenant Xn et 0,15 % m/m d'APG. Ainsi, l'ajout de tensioactif est défavorable à la stabilisation de l'émulsion puisqu'il a, en quelque sorte, pour effet d'inhiber le pouvoir stabilisant du xanthane amphiphile en entraînant un crémage plus rapide de l'émulsion.

Afin de comprendre les phénomènes mis en jeu, nous avons étudié l'évolution du profil granulométrique des gouttelettes des émulsions présentées ci-dessus au cours du temps. La Figure 51 représente la distribution de taille de gouttelettes de la partie supérieure de chaque émulsion 24 h après leur préparation et après un mois.

Dans tous les cas, les profils de distribution de taille apparaissent identiques, démontrant ainsi l'absence de coalescence au cours du temps.

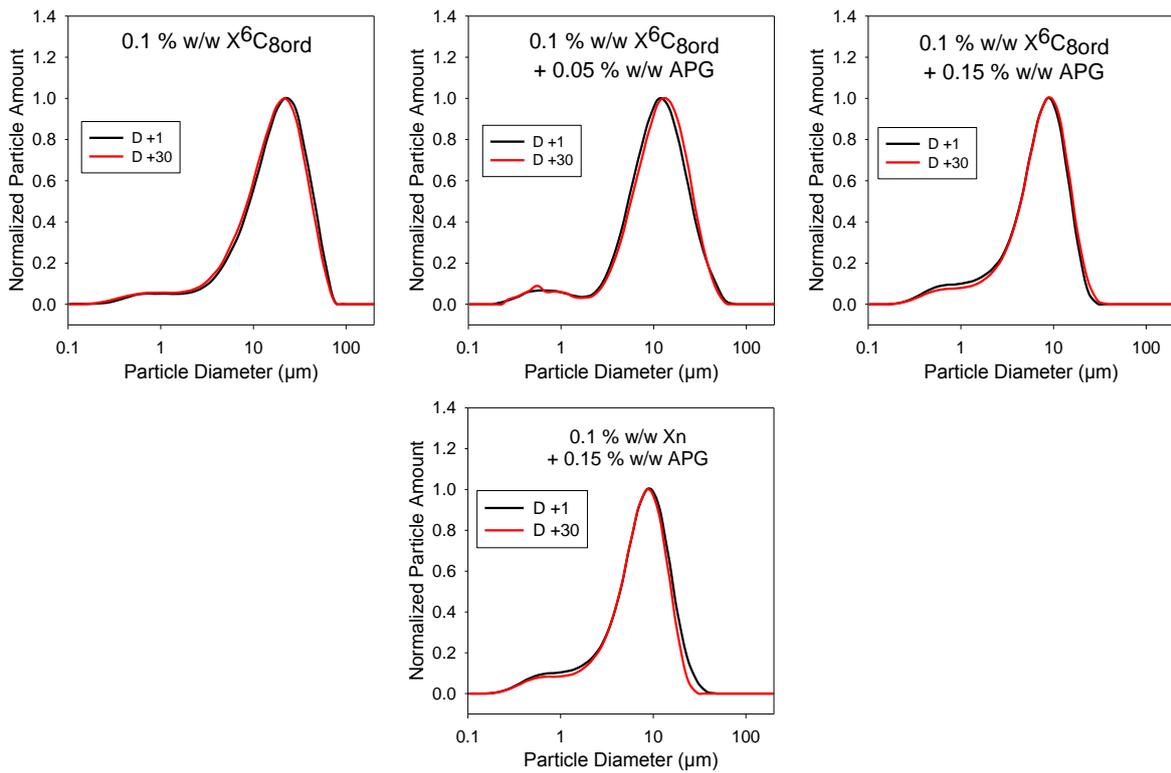


Figure 51 : Evolution dans le temps de la distribution de la taille des gouttelettes du haut de l'émulsion contenant 0,1 % m/m de X⁶C_{8ord} ou Xn et différentes concentrations en APG.

L'ajout du tensioactif a cependant un impact sur la taille des gouttelettes. En effet, comme on peut le voir sur la Figure 52, l'émulsion contenant X⁶C_{8ord} présente des tailles de gouttelettes sensiblement plus grosses comparée aux autres émulsions. L'augmentation de la quantité d'APG entraîne ainsi une diminution significative de la taille des gouttelettes.

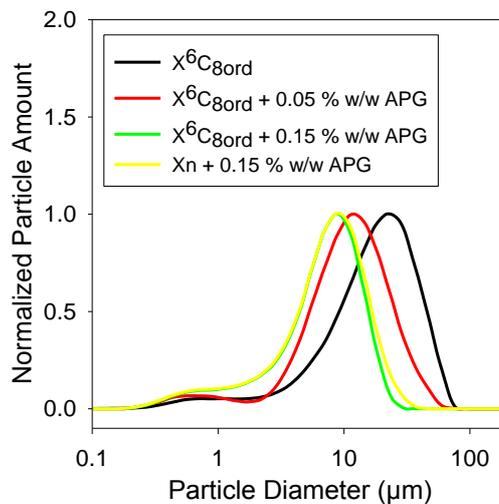


Figure 52 : Comparaison de la distribution de la taille des gouttelettes du haut de l'émulsion contenant 0,1 % m/m en polymère (X⁶C_{8ord} ou Xn) et différentes concentrations en APG à J+1.

De plus, on observe que les émulsions contenant 0,15 % m/m en APG en présence de X^6C_{8ord} ou de Xn présentent des profils granulométriques très similaires. Ainsi, en plus de se comporter de manière identique d'un point de vue macroscopique au cours du vieillissement comme souligné précédemment, la présence d'APG en quantité suffisante (0,15% dans cet exemple) conditionne très majoritairement la structure initiale de l'émulsion, et également son évolution au cours du temps, que ce soit en présence de xanthane natif ou amphiphile.

Les résultats présentés dans cette étude montrent qu'il y a une compétition entre l'APG et XMH. Quoiqu'il en soit, si l'APG permet d'obtenir des émulsions plus fines, son ajout dans les émulsions en présence de xanthane (modifié ou non) ne permet pas d'améliorer leur stabilité. Nous avons même observé le phénomène inverse avec l'augmentation du phénomène de crémage. En revanche, l'interface eau/huile reste stable puisqu'il n'y a pas de coalescence.

Une des hypothèses probable pour expliquer ces résultats est que la présence du tensioactif entraîne une accentuation du phénomène de déstabilisation de l'émulsion. En effet, du fait de sa petite taille, le tensioactif peut s'adsorber de façon préférentielle à l'interface eau-huile en comparaison au xanthane amphiphile. En raison d'une saturation de cette interface, le xanthane modifié ne peut plus (partiellement ou totalement) s'adsorber à l'interface huile/eau et est alors relargué en phase aqueuse. Ce phénomène est été illustré par la Figure 50 dans le cas des émulsions contenant 0,15 % m/m d'APG.

En outre, il ne faut pas exclure que des interactions, par exemple de type hydrophobe, peuvent tout à fait se produire entre l'APG et XMHO.

Ces résultats demeurent à ce stade préliminaires et soulèvent de nombreuses questions. Plusieurs études complémentaires s'avèrent nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les phénomènes observés.

En premier lieu, il serait pertinent d'analyser la composition de la phase inférieure de l'émulsion, par ATG ou rhéologie. En effet, nous avons reporté dans la publication 2 que les XMH se partitionnent entre la phase continue (« bulk ») et l'interface.

L'extrait sec réalisé par ATG permettrait de déterminer précisément la masse de XMH contenue dans un échantillon de la phase inférieure de l'émulsion et donc la concentration en XMH de celle-ci. Connaissant la concentration initiale en polymère, l'autre partie est donc adsorbée à l'interface eau/huile.

Par rhéologie, la technique est un peu différente et consiste à comparer la courbe d'écoulement de la phase inférieure de l'émulsion dont la concentration en XMH est inconnue avec des courbes

d'écoulement obtenue pour des solutions dont la concentration est cette fois connue. On obtient ainsi un ordre de grandeur de la concentration en XMH de cette solution.

Il est ensuite possible de corréler les données obtenues par les deux techniques.

Pour X^8C_{8ord} seul, le ratio bulk/interface est d'environ 90/10. Pour confirmer l'hypothèse exposée ci-dessus, il faudrait montrer que ce rapport évolue en faveur du bulk en présence de l'APG.

Pour aller plus loin, il serait également pertinent d'étudier d'autres paramètres afin de mieux comprendre l'impact du tensioactif sur la formation initiale de l'émulsion et son mécanisme d'action dans la stabilisation des émulsions contenant du xanthane modifié. Parmi les pistes d'études et dans la continuité des travaux de cette thèse, il serait pertinent d'étudier l'impact de la concentration en polymère, du taux de greffage ainsi que de la rigidité de la chaîne en réalisant la même étude avec XMHD. Enfin, l'effet de la nature même du tensioactif serait intéressant à investiguer, en étudiant par exemple l'addition d'un tensioactif fréquemment utilisé en formulation comme le Tween 20.

3.3. Etude d'émulsions contenant du xanthane modifié et du xanthane natif

Nous avons vu dans les parties précédentes de ce manuscrit, et plus particulièrement dans la publication 2, que le phénomène de déstabilisation régissant les émulsions contenant du xanthane modifié est quasi exclusivement le résultat d'un processus de crémage. En effet, l'adsorption des chainons hydrophobes à l'interface eau/huile entraîne un appauvrissement de la phase aqueuse continue en xanthane. La viscosité de celle-ci n'est alors plus suffisante pour empêcher les gouttelettes de migrer, provoquant le crémage. Comme cela a pu être établi, ce phénomène est amplifié avec l'augmentation du taux de greffage sans pour autant qu'un phénomène significatif de coalescence ne soit observé.

Ainsi, pour compléter les résultats précédents, nous nous sommes intéressés dans cette dernière partie à élaborer et étudier des émulsions combinant du xanthane et du xanthane modifié sous forme ordonnée. L'hypothèse ici est que le xanthane modifié servirait principalement à stabiliser l'interface tandis que le xanthane natif apporterait une augmentation de viscosité de la phase continue, améliorant ainsi la stabilité des émulsions. Ainsi, il serait également possible de limiter la quantité de matière nécessaire en XMH. Parmi les résultats escomptés, cette partie devrait permettre de mettre en évidence la complémentarité potentielle de chacun des deux types de xanthane, modifié et non modifié, dans le processus de formation et de stabilisation des émulsions.

Pour cette partie, nous avons choisi d'étudier deux grades de xanthane modifiés sous forme ordonnée X^6C_{8ord} et $X^{32}C_{8ord}$. Parmi les différentes stratégies d'étude envisageables, ce choix se justifie

du fait que les dérivés amphiphiles XMHO du xanthane apparaissent être les dérivés amphiphiles les plus prometteurs pour la stabilisation des émulsions (voir la 1^{ère} étude de ce chapitre).

Les comportements en émulsion de X^8C_{8ord} et $X^{32}C_{8ord}$ ont été reportés dans la Partie 2 et nous avons constaté que ces deux dérivés induisent des stabilités bien différentes du fait d'une partition distincte entre les deux phases.

Les émulsions ont été préparées en suivant le même protocole de formulation que décrit précédemment, en prenant comme référence une concentration totale en polymère de 0,1 % m/m. Nous avons préparé des émulsions contenant 0,05 % m/m de polymère modifié, complétées par 0,05 % m/m de Xn, correspondant ainsi à une concentration totale en polymère identique à la référence.

Les émulsions obtenues ont été observées à J +1 puis stockées à température ambiante. Dans le but d'étudier et de comparer les deux systèmes, leur évolution au cours du temps a été évaluée par des observations visuelles et des mesures de granulométrie. De plus, des analyses des propriétés rhéologiques ont été réalisées à la fois sur les émulsions et les solutions aqueuses des polymères et mélanges de polymères correspondant, cela dans le but de comprendre les phénomènes responsables de la stabilisation ou déstabilisation des émulsions.

La Figure 53 présente les émulsions obtenues avec X^6C_{8ord} et le mélange X^6C_{8ord}/Xn à différents temps de stockage.

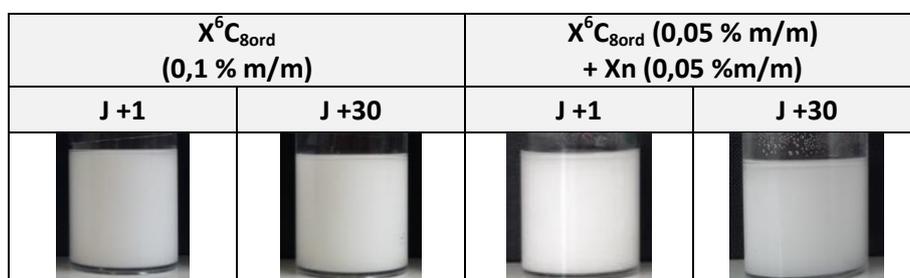


Figure 53 : Photographie à différents temps des émulsions contenant soit 0,1 % m/m de X^6C_{8ord} soit 0,05 % m/m de X^6C_{8ord} et 0,05 % m/m de Xn.

Si pour les deux émulsions l'essentiel du mélange apparaît émulsionné, un léger relargage d'huile est observé après formulation pour l'émulsion contenant le mélange de polymères, contrairement à l'émulsion contenant le xanthane modifié seul. Celui-ci peut être attribué à la faible concentration en xanthane modifié, insuffisante pour émulsionner correctement la totalité de la phase grasse. Dans les deux cas, on observe que les émulsions ne semblent pas évoluer macroscopiquement au bout de 1 mois de stockage.

La Figure 54 montre les photographies des émulsions préparées selon la même méthodologie, en utilisant cette fois le grade de xanthane fortement modifié, $X^{32}C_{8ord}$. Contrairement aux observations

faites précédemment, des différences sont notables entre les 2 systèmes contenant $X^{32}C_{8ord}$ seul ou en mélange. Comme vu dans la Partie 2, l'émulsion contenant $X^{32}C_{8ord}$ se déstabilise rapidement puisqu'un crémage marqué est visible dès 24 h après formulation, instabilité qui s'accroît au cours du temps.

A l'inverse, on observe une nette amélioration pour les émulsions contenant le mélange de polymères puisque celle-ci apparaît macroscopiquement homogène, y compris au terme d'un mois de stockage. De plus, la totalité de la phase grasse a été cette fois émulsifiée. Les résultats obtenus dans la Partie 2 permettent d'expliquer ce phénomène. En effet, l'augmentation du taux de greffage et donc du nombre de fonctions hydrophobes, induit une concentration plus importante du polymère modifié à l'interface eau/huile, à défaut de la phase continue.

Une faible quantité de xanthane à fort taux de greffage suffit ainsi à la formation des gouttelettes d'huile, la présence du xanthane non modifié jouant ici le rôle de stabilisant de la dispersion.

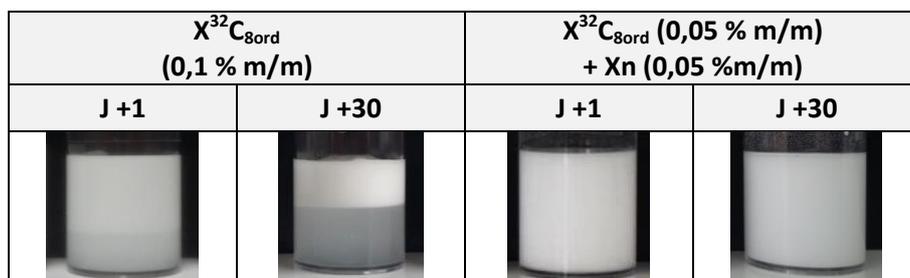
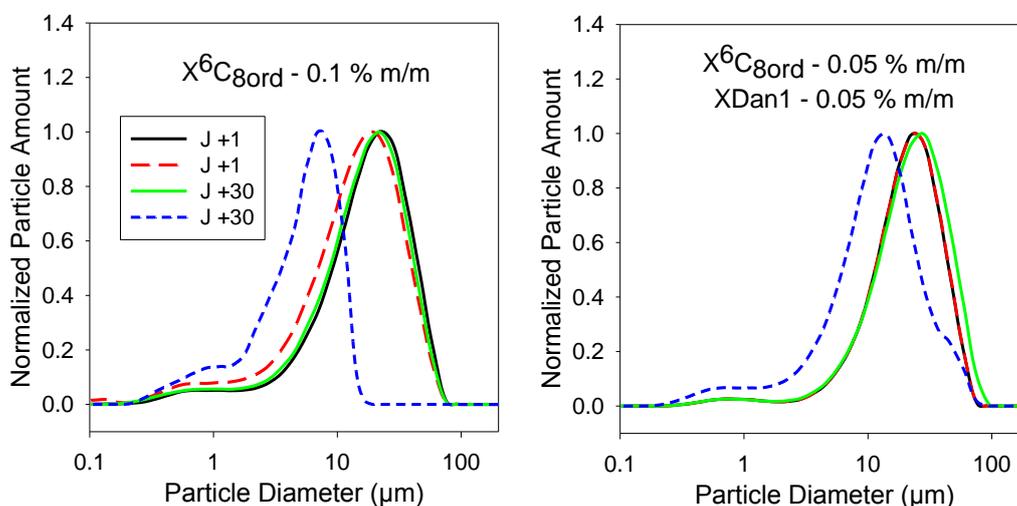


Figure 54 : Photographie à différents temps des émulsions contenant soit 0,1 % m/m de $X^{32}C_{8ord}$ soit 0,05 % m/m de $X^{32}C_{8ord}$ et 0,05 % m/m de Xn.

Ces observations macroscopiques ont été complétées par des analyses granulométriques du haut et du bas de chacune des émulsions décrites ci-dessus, afin de connaître la structure et les phénomènes éventuels de vieillissement de ces émulsions. Les résultats sont donnés sur la Figure 55.



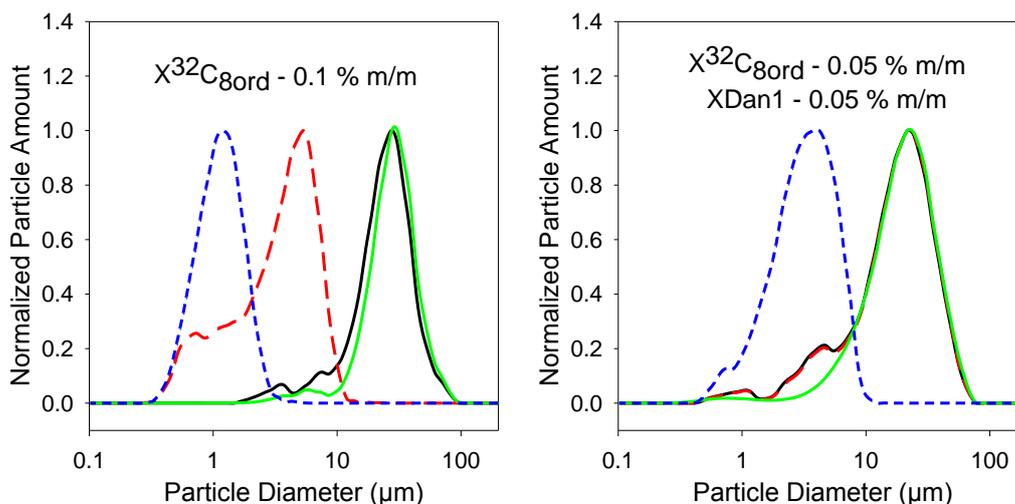


Figure 55 : Distribution de la taille des gouttelettes du haut (trait plein) et du bas (trait pointillé) des émulsions contenant soit 0,1 % m/m de polymère modifié (X^6C_{8ord} ou $X^{32}C_{8ord}$) soit un mélange de 0,05 % m/m polymère modifié (X^6C_{8ord} ou $X^{32}C_{8ord}$) et 0,05 % m/m de Xn.

Pour l'émulsion contenant 0,1 % m/m de X^6C_{8ord} , le phénomène de crémage semble être perceptible dès 24h. En effet, on constate que la distribution de la taille des gouttelettes du bas de l'émulsion est très légèrement décalée vers des tailles de gouttelettes plus petites, ce phénomène s'accroissant avec le temps. Pour l'émulsion contenant le mélange X^6C_{8ord}/Xn , les distributions du haut et du bas de l'émulsion sont initialement parfaitement superposées. Cependant, la distribution mesurée après un mois atteste d'un phénomène de crémage. Néanmoins, comparée à l'émulsion préparée uniquement avec X^6C_{8ord} , on peut remarquer que la différence de distribution entre le haut et le bas de l'émulsion après un mois est moins marquée pour l'émulsion composée du mélange X^6C_{8ord}/Xn . Pour cette dernière, la cinétique de déstabilisation par crémage semble donc ralentie, confirmant l'effet stabilisant du xanthane non modifié. Cependant, après un mois de stockage, un très léger début de coalescence semble être observé et peut être attribué à la faible concentration en xanthane modifié. La comparaison entre les deux systèmes reste difficile, notamment du fait que les deux émulsions ne présentent pas le même état initial.

Pour l'émulsion contenant $X^{32}C_{8ord}$ seul, les distributions de taille des gouttelettes du haut et du bas sont bien distinctes dès l'analyse à J +1, contrairement à l'émulsion contenant le mélange $X^{32}C_{8ord}/Xn$ pour laquelle on constate une parfaite superposition des distributions de taille. Après un mois de stockage, les deux émulsions présentent du crémage, celui-ci étant plus prononcé pour l'émulsion contenant seulement $X^{32}C_{8ord}$. On constate notamment que les distributions de taille des gouttelettes de l'émulsion préparées avec $X^{32}C_{8ord}$ à J +1 semblent similaires à celles contenant le mélange $X^{32}C_{8ord}/Xn$ à J +30. De plus, cette fois-ci, aucun phénomène de coalescence n'est observé.

Ces résultats confirment que l'ajout de xanthane non modifié dans l'émulsion contenant du xanthane modifié permet de ralentir significativement le phénomène de crémage, conformément à ce qui est classiquement décrit dans la littérature comme une propriété caractéristique du xanthane à stabiliser des dispersions^{198,227}.

Afin de mieux comprendre les phénomènes responsables du ralentissement du crémage, nous nous sommes intéressés aux propriétés en écoulement des émulsions (mesurées à J +1) et des solutions de polymères préparées pour leur obtention. Les courbes correspondantes sont reportées en Figure 56.

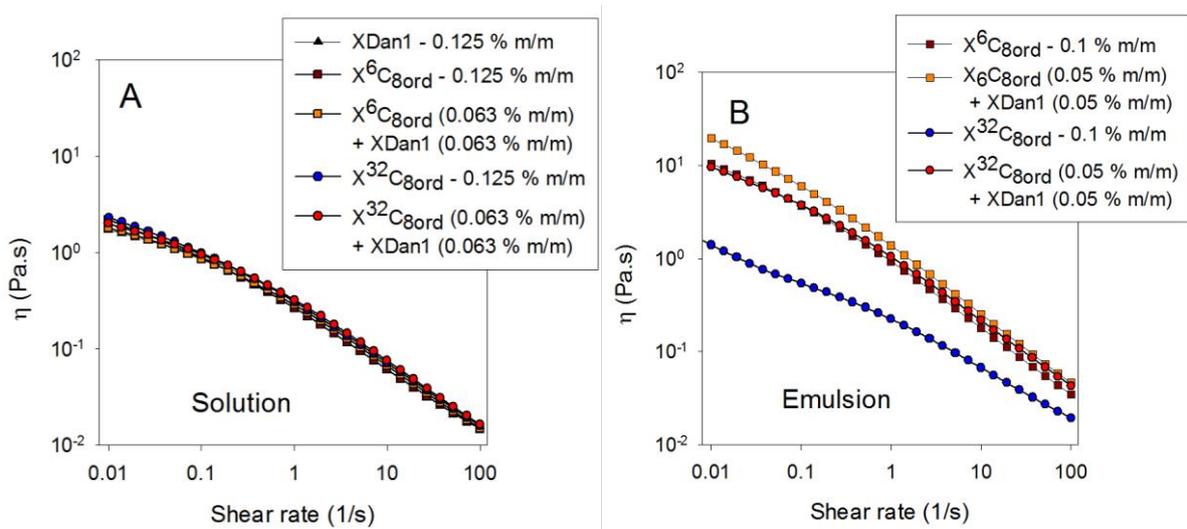


Figure 56 : Courbe d'écoulement (A) des solutions contenant soit 0,125 % m/m de polymère modifié ou non (X_n , X^6C_{8ord} ou $X^{32}C_{8ord}$) soit un système composé de 0,063 % m/m polymère modifié (X^6C_{8ord} ou $X^{32}C_{8ord}$) et 0,063 % m/m de X_n et (B) des émulsions correspondantes.

D'une part, les courbes d'écoulement des solutions de polymères pour un taux de cisaillement allant de 0,01 à 100 s^{-1} ont été étudiées (Voir la Figure 56A). Que ce soit pour les polymères seuls ou les mélanges, les courbes d'écoulement apparaissent toutes très similaires, quasi-superposées dans toute la gamme de taux de cisaillement étudiée.

D'autre part, les courbes d'écoulement des émulsions correspondantes ont été réalisées dans la même gamme de cisaillement et représentées en Figure 56B. On observe que pour les deux taux de greffage étudiés, la viscosité de l'émulsion contenant le mélange est nettement supérieure (presque d'une décade pour le xanthane le plus greffé) à la viscosité de l'émulsion contenant le polymère modifié seul.

Ces différentes de viscosité peuvent s’expliquer par le fait que XMHO se partitionne entre le bulk et l’interface. La concentration effective en polymère dans la phase continue est donc plus importante dans le cas du mélange, ainsi la viscosité de l’émulsion est également plus élevée.

Ces résultats sont en parfaite cohérence avec les observations tant macroscopiques que microscopiques faites précédemment, et expliquent l’amélioration de la stabilité des émulsions contenant le mélange des deux polymères.

Dans une dernière étape, afin de compléter les résultats précédents, la phase aqueuse de l’émulsion a été analysée afin de déterminer la concentration effective en polymère. En effet, nous avons vu dans la Partie 2 que XMHO se partitionne entre la phase continue (« bulk ») et l’interface. En particulier, nous avons pu établir que plus la densité de greffage du polymère est élevée, plus il s’adsorbe à l’interface eau-huile. L’exemple le plus significatif est celui de $X^{32}C_{8ord}$ pour lequel le ratio bulk/interface est de 35/65. Il s’agit donc ici d’établir pour ces systèmes, la partition en polymères (modifié ou non) entre le bulk et l’interface.

Pour cela, afin d’isoler efficacement la phase aqueuse de la phase grasse, les émulsions contenant 0.05 % m/m en XMH et 0.05 % m/m en Xn ont été centrifugées à 8000 g pendant 20 minutes, puis caractérisées en écoulement. Les résultats obtenus sont représentés en Figure 57.

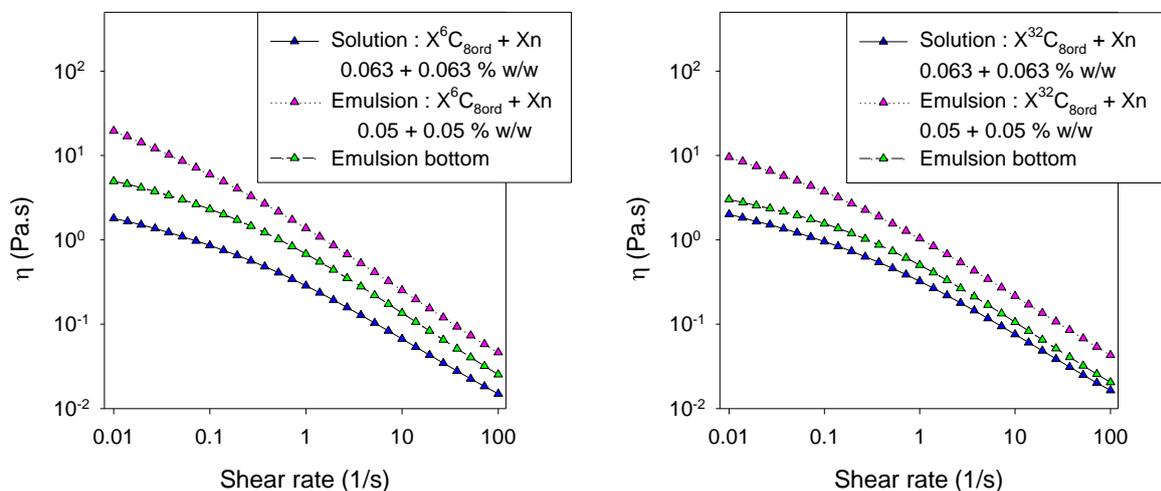


Figure 57 : Comparaison des courbes d’écoulement des solutions, des émulsions correspondantes et de la phase inférieure de l’émulsion après centrifugation, dans le cas de X^6C_{8ord} et $X^{32}C_{8ord}$.

Comme établi précédemment, la viscosité du mélange XMH/Xn en solution est inférieure à la viscosité de l’émulsion correspondante. On observe également que la viscosité de la partie basse apparaît supérieure à la viscosité du mélange en solution. Ces résultats peuvent paraître surprenants

puisque si la totalité des polymères se retrouve dans la phase continue, la viscosité de cette dernière devrait être au maximum égale à la viscosité de la solution initiale.

Cette observation a été confirmée après de nouvelles mesures réalisées à l'issue d'une nouvelle période de centrifugation à 12 000 g pendant 4 h, ceci afin de s'assurer que l'intégralité du xanthane présent en phase aqueuse a bien été débarrassée de la phase émulsionnée. En effet, les courbes d'écoulement obtenues sont exactement les mêmes.

Pour expliquer ces résultats, plusieurs hypothèses ont été envisagées.

Tout d'abord, même si cela est peu probable, on peut supposer que la séparation effectuée lors de la centrifugation ne soit pas totale et qu'il subsiste de gouttelettes d'huile dans la phase aqueuse, ces dernières pouvant être responsables de la viscosité mesurée. Egalement, après une telle accélération, il est également probable que le xanthane ait partiellement sédimenté entraînant ainsi un gradient de concentration dans la phase inférieure. Enfin, des interactions synergiques entre le Xn et XMHO sont possibles et celles – ci pourraient s'accroître au cours du temps entraînant une augmentation de la viscosité de la solution après un mois. Il serait donc pertinent d'étudier l'évolution de la viscosité des deux systèmes (solution et émulsion) au cours du temps.

Il apparaît que les analyses rhéologiques réalisées ne permettent donc pas, à ce stade, de comprendre la stabilisation des émulsions par les mélanges xanthane modifié / xanthane non modifié. Des analyses complémentaires s'avèreraient donc nécessaires. Par exemple, une analyse par ATG de cette phase inférieure pourrait permettre d'éliminer certaines de ces hypothèses.

Les différents résultats obtenus dans cette étude nous ont permis de montrer qu'il est possible d'améliorer la stabilité de nos émulsions en combinant xanthane modifié et xanthane non modifié. Ce dernier permet en effet d'augmenter la viscosité de l'émulsion et ainsi de ralentir le phénomène de crémage, validant ainsi l'hypothèse de départ.

Pour les émulsions contenant XMHO seul, l'augmentation du taux de greffage n'est pas favorable puisqu'elle entraîne une accélération de la déstabilisation par crémage. En revanche, les XMHO avec un fort taux de greffage présentent un intérêt dans le cadre des mélanges Xn/MHO pour la stabilisation des émulsions. Dans ce cas, une quantité plus faible de xanthane modifié s'avère suffisante pour former et stabiliser efficacement l'interface eau/huile. La consommation en XMHO est donc réduite permettant ainsi d'avoir un système plus rentable.

Cependant, une étude plus approfondie s'avère indispensable afin de comprendre la formation et la stabilisation des émulsions par le mélange des deux xanthanes. Enfin, il pourrait également être intéressant d'étudier l'effet du ratio Xn/MHO sur les caractéristiques des émulsions, et ainsi conclure sur les mécanismes de stabilisation mis en jeu pour ces émulsions.

Conclusion de la partie

Cette étude a permis d’obtenir des résultats complémentaires permettant d’approfondir la compréhension des phénomènes régissant la formation et la stabilisation/déstabilisation des émulsions contenant du xanthane modifié hydrophobiquement.

La Figure 58 résume les différents systèmes étudiés et les résultats obtenus en termes de stabilisation des émulsions dans ces trois études. Pour chaque comparaison, le système permettant d’obtenir la formulation la plus stable est représenté sur un fond vert.

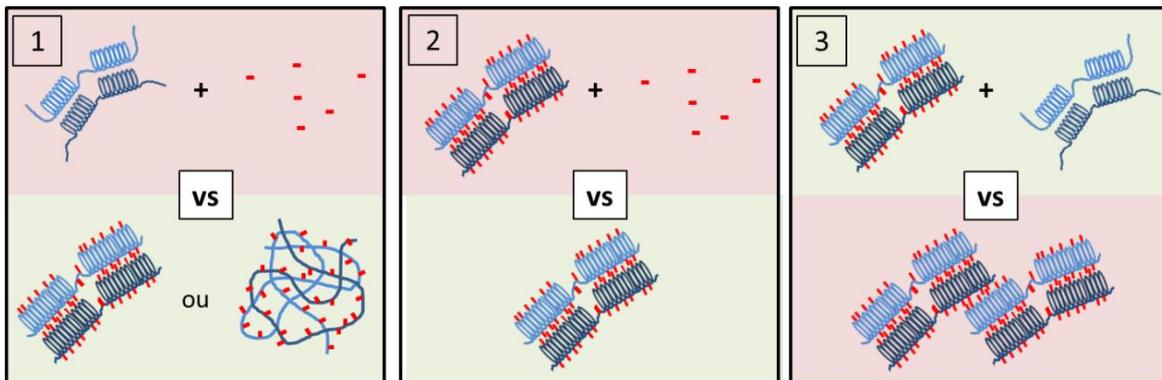


Figure 58 : Schéma bilan des trois études de cette partie

Tout d’abord, nous avons montré que les XMH ont un pouvoir émulsifiant nettement supérieur à un tensioactif moléculaire (ici, l’APG). Sous certaines conditions, les émulsions contenant XMHO sont stables pendant des mois. Contrairement aux émulsions contenant l’APG, pour lesquelles une accentuation importante du phénomène de crémage a été observée. Ainsi, ces résultats mettent clairement en évidence l’intérêt de la modification chimique du xanthane pour des applications en formulation et plus particulièrement pour la stabilisation des émulsions.

Puis, nous avons observé que l’ajout du tensioactif en complément de XMH n’est pas favorable à la stabilisation des émulsions. En effet, une fois encore, la présence de l’APG entraîne un crémage important des gouttelettes d’huile. Les phénomènes mis en jeu restent encore à être clairement identifiés.

Pour finir, nous nous sommes intéressés à une émulsion combinant Xn et XMHO. Les résultats obtenus sont très prometteurs. Une faible quantité de XMHO à fort taux de greffage est suffisante pour émulsionner la phase grasse et stabiliser l’interface eau/huile alors que le contrôle de la viscosité de la phase aqueuse continue est assuré par Xn.

Le ratio Xn/XMHO idéal reste encore à être déterminé mais cette piste offre des perspectives très intéressantes pour la stabilisation des émulsions, tout en s’affranchissant de l’utilisation de tensioactif moléculaire.

Conclusion Générale

L'objectif de ces travaux de thèse était de déterminer l'impact de la rigidité du squelette hydrophile d'un polysaccharide lors de sa modification chimique visant à le rendre amphiphile, sur les propriétés associatives en solution ainsi que sur les propriétés stabilisantes en émulsion.

A cette fin, le xanthane a été sélectionné pour cette étude car ce polysaccharide peut adopter, selon les conditions expérimentales, deux conformations différentes en solution : l'une sous forme ordonnée hélicoïdale rigide à basse température et force ionique élevée et l'autre sous forme désordonnée de type pelote flexible à haute température et/ou faible force ionique.

Les travaux se sont articulés selon 3 grands axes. Tout d'abord, un protocole de modification chimique permettant de greffer des chaînes alkyles hydrophobes sur le xanthane **sous forme désordonnée** a été développé. Puis, les **propriétés en solution** de ces dérivés amphiphiles ont été étudiées et comparées à celles des polymères modifiés sous forme ordonnée. Enfin, les différents xanthanes amphiphiles ont été appliqués à la **stabilisation des émulsions**. Le but était de pouvoir comprendre la relation entre la conformation adoptée par les chaînes modifiées et les propriétés observées que ce soit en solution ou en émulsion.

Nous avons pu mettre au point un protocole permettant de greffer efficacement des chaînes hydrophobes sur les fonctions acide carboxylique du xanthane sous forme désordonnée *via* une réaction de couplage peptidique en une étape dans le DMSO. A notre connaissance, il s'agit du premier exemple décrit dans la littérature de modification chimique du xanthane sous cette forme.

Si nous nous sommes principalement intéressés au greffage de chaînes octyles (C_8), ce protocole de modification a également permis de greffer des chaînes dodécyles (C_{12}) et hexadécyles (C_{16}). Ainsi, nous avons pu accéder à une large gamme de dérivés amphiphiles du xanthane.

Il a été démontré que la conformation adoptée par le polymère pendant le processus de greffage a un impact majeur sur la regioselectivité du greffage ainsi que sur les propriétés observées en solution.

Il apparaît que le xanthane modifié sous forme ordonnée (XMHO) présente un comportement similaire au précurseur. La conformation hélicoïdale, stabilisée par liaisons hydrogène, s'avère renforcée par la modification chimique. La présence des greffons hydrophobes ne modifie pas les mécanismes de relaxation des chaînes amphiphiles, mais ralentit très fortement la dynamique de relaxation des chaînes amphiphiles, selon un processus qualifié de « relaxation collante ». Ce phénomène est d'autant plus marqué que la densité de greffage est élevée. La rigidité de la chaîne empêche son repliement sur elle-même pour former des microdomaines hydrophobes. Par

conséquent, les xanthanes modifiés **sous forme ordonnée** sont des polymères amphiphiles mais **non associatifs**.

Les xanthanes modifiés sous forme désordonnée (XMHD) sont capables de se réordonner partiellement en solution aqueuse. Cette fois-ci, l'augmentation du taux de greffage tend à déstabiliser la conformation hélicoïdale, ce qui entraîne une diminution de la rigidité de la chaîne. Cette flexibilité est favorable aux interactions hydrophobes qui gouvernent l'organisation des chaînes en solution et sont responsables du comportement de gel. Ainsi, il s'avère que les xanthanes modifiés **sous forme désordonnée** sont des polymères **amphiphiles associatifs**.

Ces observations nous permettent de conclure qu'il y a donc un impact majeur de la rigidité de la chaîne polymère sur les propriétés associatives en solution.

Cette différence de comportement peut s'expliquer par la conformation adoptée par le polymère pendant la modification qui impacte la régiosélectivité du greffage. En effet, selon si le xanthane est sous forme ordonnée ou désordonnée, les sites de greffage notamment les acides glucuronique sont plus ou moins accessibles. Si le greffage sous forme ordonnée se fait principalement sur les acides pyruvique, le greffage sous forme désordonnée se fait de façon quasi statistique sur les acides pyruvique et glucuronique. Or, ces derniers contribuent à la stabilisation de l'hélice *via* des liaisons hydrogène, expliquant que leur modification chimique impacte de façon majeure la conformation du polymère.

Le caractère amphiphile des xanthanes modifiés permet d'envisager des applications potentielles, en particulier en tant qu'agent stabilisant notamment pour les émulsions.

Contrairement au xanthane seul, les xanthanes amphiphiles sont capables d'émulsionner les systèmes H/E sélectionnés dans le cadre de notre travail, sans ajout de tensioactifs moléculaires. De plus, sous certaines conditions notamment dès que la concentration en polymère devient suffisante, les émulsions contenant des XMHO sont particulièrement stables. En effet, pour une concentration de 0,1 % m/m, les émulsions subissent des phénomènes de déstabilisation au cours du temps, principalement du crémage, alors que celles avec 0,2 % m/m sont stables pendant plusieurs mois. La concentration minimale nécessaire pour former et stabiliser les émulsions s'avère donc relativement faible comparée aux émulsions plus conventionnelles contenant un agent épaississant ainsi qu'un tensioactif moléculaire, généralement en quantité supérieure ou égale à 1 % m/m.

L'augmentation du taux de greffage entraîne une déstabilisation plus rapide des émulsions. Afin de comprendre les phénomènes mis en jeu, des mesures rhéologiques sur les solutions et sur les émulsions ont été réalisées. D'un côté, les interactions hydrophobes entre les chaînons greffés sont à l'origine du pouvoir suspensif accru des dérivés en solution, celui-ci étant d'autant plus marqué que

le taux de greffage est élevé. D'un autre côté, la viscosité des émulsions diminue avec l'augmentation du taux de greffage.

Ces résultats au premier abord surprenants peuvent néanmoins s'expliquer par la capacité des groupements octyles à s'adsorber à l'interface H/E. Ainsi, plus le polymère est greffé, plus il va avoir tendance à s'adsorber à l'interface H/E au détriment de la phase continue. La viscosité de celle-ci n'est, alors, plus suffisante pour ralentir efficacement le crémage. En effet, des analyses de la phase inférieure de l'émulsion ont montré que plus le taux de greffage est élevé, plus la teneur en xanthane dans celle-ci est faible, ce qui explique la perte de stabilité des émulsions avec l'augmentation du taux de greffage.

Néanmoins, il est important de souligner que l'interface H/E reste très stable puisqu'aucun phénomène de coalescence n'est observé.

Les XMHD sont également capables de former des émulsions. Pour autant, ces dernières présentent des phénomènes de déstabilisation par crémage quelle que soit la concentration en polymère et le taux de greffage. Afin d'obtenir des émulsions parfaitement stables dans le temps (ni coalescence ou crémage), il est nécessaire d'augmenter la longueur de la chaîne greffée à 16 carbones. En effet, dans ce cas, le xanthane modifié présente un comportement de gel en solution aqueuse, comportement qui est retrouvé en émulsion et qui, par conséquent, stoppe tout crémage et coalescence.

Les émulsions contenant du XMHO sont donc plus stables que celles avec du XMHD. Une explication de ce comportement repose sur la plus faible viscosité des XMHD sur toute la gamme de concentration par rapport aux XMHO.

Pour conclure, le comportement des xanthanes modifiés en émulsion se traduit par une répartition compétitive entre la stabilisation de l'interface H/E, pour éviter la coalescence, et le maintien de la viscosité de la phase continue afin de retarder le crémage.

Une étude complémentaire nous a également permis de montrer que le xanthane modifié ne se comporte pas seulement comme la combinaison d'un xanthane natif et d'un tensioactif. En effet, un système composé de xanthane non modifié et d'un tensioactif moléculaire, introduit de façon à ce qu'il y ait la même proportion de chaînes hydrophobes que pour des xanthanes modifiés, possède un pouvoir émulsifiant nettement inférieur aux XMH. De plus, les émulsions obtenues présentent une accentuation importante du phénomène de crémage. Ces résultats confirment donc l'intérêt de la modification chimique du xanthane pour des applications à la stabilisation des émulsions.

Pour conclure, les différents objectifs initiaux de ce travail ont donc été pleinement atteints. Grâce au développement d'un protocole de modification chimique du xanthane sous forme désordonnée, nous avons pu démontrer l'impact majeur de la régiosélectivité du greffage sur la conformation des

xanthanes modifiés en solutions et donc sur leur caractère associatif mais également les propriétés stabilisantes en émulsion.

Sur cette base, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Afin de mieux comprendre les différentes stabilités des émulsions contenant XMHO et XMHD, on pourrait s'interroger sur la concentration du polymère modifié à l'interface H/E, notamment en fonction de la rigidité de la chaîne.

De plus, les résultats présentés dans l'étude complémentaire sont, à ce jour, préliminaires. Des analyses supplémentaires restent nécessaires pour confirmer les observations faites. En particulier, nous avons observé que l'ajout d'un tensioactif en complément de XMH n'est pas favorable à la stabilisation des émulsions. Il serait donc intéressant de déterminer les phénomènes liés à cette déstabilisation et peut être mettre en évidence des interactions spécifiques entre les XMH et le tensioactif.

Par ailleurs, nous avons pu démontrer le potentiel prometteur de combiner du xanthane natif et du xanthane modifié pour la stabilisation des émulsions. En effet, une faible quantité de xanthane modifié s'avère suffisante pour stabiliser l'interface H/E et le xanthane natif permet de maintenir la viscosité de la phase continue. Néanmoins, une étude plus approfondie s'avère indispensable afin de comprendre les phénomènes mis en jeu et de mettre au point un système optimal qui permettrait de stabiliser efficacement les émulsions tout en s'affranchissant de l'utilisation de tensioactif moléculaire.

Références Bibliographiques

- (1) Fantou, C.; Roy, A. N.; Dé, E.; Comesse, S.; Grisel, M.; Renou, F. Chemical Modification of Xanthan in the Ordered and Disordered States: An Open Route for Tuning the Physico-Chemical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *178*, 115–122.
- (2) Fantou, C.; Comesse, S.; Renou, F.; Grisel, M. Hydrophobically Modified Xanthan: Thickening and Surface Active Agent for Highly Stable Oil in Water Emulsions. *Accepted* **2019**.
- (3) Jeanes, A.; Pittsley, J. E.; Senti, F. R. Polysaccharide B-1459: A New Hydrocolloid Polyelectrolyte Produced from Glucose by Bacterial Fermentation. *J. Appl. Polym. Sci.* **1961**, *5* (17), 519–526.
- (4) Rosalam, S.; England, R. Review of Xanthan Gum Production from Unmodified Starches by *Xanthomonas Campestris* Sp. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39* (2), 197–207.
- (5) Casas, J. A.; García-Ochoa, F. Viscosity of Solutions of Xanthan/Locust Bean Gum Mixtures. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79* (1), 25–31.
- (6) Secouard, S.; Grisel, M.; Malhiac, C. Flavour Release Study as a Way to Explain Xanthan–Galactomannan Interactions. *Food Hydrocoll.* **2007**, *21* (8), 1237–1244.
- (7) Hublik, G. Xanthan. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*; Elsevier, 2012; pp 221–229.
- (8) Palaniraj, A.; Jayaraman, V. Production, Recovery and Applications of Xanthan Gum by *Xanthomonas Campestris*. *J. Food Eng.* **2011**, *106* (1), 1–12.
- (9) Casas, J. A.; Santos, V. E.; Garcia-Ochoa, F. Xanthan Gum Production under Several Operational Conditions : Molecular Structure and Rheological Properties. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 282–291.
- (10) Amanullah, A.; Satti, S.; Nienow, A. W. Enhancing Xanthan Fermentations by Different Modes of Glucose Feeding. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14* (2), 265–269.
- (11) Vashitz, O.; Sheintuch, M. Analysis of Polymer Synthesis Rates during Steady-State Growth of *X. Campestris*. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37* (4), 383–385.
- (12) Krishna Leela, J.; Sharma, G. Studies on Xanthan Production from *Xanthomonas Campestris*. *Bioprocess Eng.* **2000**, *23* (6), 687–689.
- (13) Garcia-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gomez, E. Xanthan Gum: Production, Recovery, and Properties. *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18* (7), 549–579.
- (14) Habibi, H.; Khosravi-Darani, K. Effective Variables on Production and Structure of Xanthan Gum and Its Food Applications: A Review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2017**, *10*, 130–140.
- (15) Sharma, B. R.; Naresh, L.; Dhuldhoya, N. C.; Merchant, S. U.; Merchant, U. C. Xanthan Gum - A Boon to Food Industry. *Food Promot. Chron.* **2006**, *1*(5), 27–30.
- (16) Jang, H. Y.; Zhang, K.; Chon, B. H.; Choi, H. J. Enhanced Oil Recovery Performance and Viscosity Characteristics of Polysaccharide Xanthan Gum Solution. *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, *21*, 741–745.
- (17) Jansson, P.; Kenne, L.; Lindberg, B. Structure of the Extracellular Polysaccharide from *Xanthomonas Campestris*. *Carbohydr. Res.* **1975**, *45* (1), 275–282.
- (18) Torres, L. G.; Brito, E.; Galindo, E.; Choplin, L. Viscous Behaviour of Xanthan Aqueous Solutions from a Variant Strain of *Xanthomonas Campestris*. *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, *75* (1), 58–64.

- (19) Papagianni, M.; Psomas, S. K.; Batsilas, L.; Paras, S. V.; Kyriakidis, D. A. Xanthan Production by *Xanthomonas Campetris* in Batch Culture. *Process Biochem.* **2001**, *37*, 73–80.
- (20) Kool, M. M.; Gruppen, H.; Sworn, G.; Schols, H. A. Comparison of Xanthans by the Relative Abundance of Its Six Constituent Repeating Units. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98* (1), 914–921.
- (21) Kool, M. M.; Gruppen, H.; Sworn, G.; Schols, H. A. The Influence of the Six Constituent Xanthan Repeating Units on the Order–Disorder Transition of Xanthan. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *104*, 94–100.
- (22) Abbaszadeh, A.; Lad, M.; Janin, M.; Morris, G. A.; MacNaughtan, W.; Sworn, G.; Foster, T. J. A Novel Approach to the Determination of the Pyruvate and Acetate Distribution in Xanthan. *Food Hydrocoll.* **2015**, *44*, 162–171.
- (23) Young, S.-L.; Martino, M.; Kienzle-Sterzer, C.; Torres, J. A. Potentiometric Titration Studies on Xanthan Solutions. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *64* (1), 121–127.
- (24) Richardson, R. K.; Ross-Murphy, S. B. Non-Linear Viscoelasticity of Polysaccharide Solutions. 2: Xanthan Polysaccharide Solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **1987**, *9* (5), 257–264.
- (25) Milas, M.; Rinaudo, M. Conformational Investigation on the Bacterial Polysaccharide Xanthan. *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 189–196.
- (26) Choppe, E.; Puaud, F.; Nicolai, T.; Benyahia, L. Rheology of Xanthan Solutions as a Function of Temperature, Concentration and Ionic Strength. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (4), 1228–1235.
- (27) Christensen, B. E.; Smidsroed, O.; Elgsaeter, A.; Stokke, B. T. Depolymerization of Double-Stranded Xanthan by Acid Hydrolysis: Characterization of Partially Degraded Double Strands and Single-Stranded Oligomers Released from the Ordered Structures. *Macromolecules* **1993**, *26* (22), 6111–6120.
- (28) Milas, M.; Rinaudo, M. Properties of Xanthan Gum in Aqueous Solutions: Role of the Conformational Transition. *Carbohydr. Res.* **1986**, *158*, 191–204.
- (29) Lecourtier, J.; Chauveteau, G.; Muller, G. Salt-Induced Extension and Dissociation of a Native Double-Stranded Xanthan. *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8* (5), 306–310.
- (30) Sato, T.; Norisuye, T.; Fujita, H. Double-Stranded Helix of Xanthan in Dilute Solution: Evidence from Light Scattering. *Polym. J.* **1984**, *16* (4), 341–350.
- (31) Morris, E. R.; Rees, D. A.; Young, G.; Walkinshaw, M. D.; Darke, A. Order-Disorder Transition for a Bacterial Polysaccharide in Solution. A Role for Polysaccharide Conformation in Recognition between *Xanthomonas* Pathogen and Its Plant Host. *J. Mol. Biol.* **1977**, *110* (1), 1–16.
- (32) Foss, P. Thermal Stability and Chain Conformational Studies of Xanthan at Different Ionic Strengths. *Carbohydr. Polym.* **1987**, *7* (6), 421–433.
- (33) Matsuda, Y.; Biyajima, Y.; Sato, T. Thermal Denaturation, Renaturation, and Aggregation of a Double-Helical Polysaccharide Xanthan in Aqueous Solution. *Polym. J.* **2009**, *41* (7), 526–532.
- (34) Jones, S. A.; Goodall, D. M.; Cutler, A. N.; Norton, I. T. Application of Conductivity Studies and Polyelectrolyte Theory to the Conformation and Order-Disorder Transition of Xanthan Polysaccharide. *Eur. Biophys. J.* **1987**, *15* (3).
- (35) Camesano, T. A.; Wilkinson, K. J. Single Molecule Study of Xanthan Conformation Using Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (4), 1184–1191.

- (36) Capron, I.; Alexandre, S.; Muller, G. An Atomic Force Microscopy Study of the Molecular Organisation of Xanthan. *Polymer* **1998**, *39* (23), 5725–5730.
- (37) Moffat, J.; Morris, V. J.; Al-Assaf, S.; Gunning, A. P. Visualisation of Xanthan Conformation by Atomic Force Microscopy. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *148*, 380–389.
- (38) Pelletier, E.; Viebke, C.; Meadows, J.; Williams, P. A. A Rheological Study of the Order–Disorder Conformational Transition of Xanthan Gum. *Biopolymers* **2001**, *59* (5), 339–346.
- (39) Capron, I.; Brigand, G.; Muller, G. Thermal Denaturation and Renaturation of a Fermentation Broth of Xanthan: Rheological Consequences. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, *23* (3), 215–225.
- (40) Shatwell, K. P.; Sutherland, I. W.; Dea, I. C. M.; Ross-Murphy, S. B. The Influence of Acetyl and Pyruvate Substituents on the Helix-Coil Transition Behaviour of Xanthan. *Carbohydr. Res.* **1990**, *206* (1), 87–103.
- (41) Christensen, B. E.; Smidsrød, O. Hydrolysis of Xanthan in Dilute Acid: Effects on Chemical Composition, Conformation, and Intrinsic Viscosity. *Carbohydr. Res.* **1991**, *214* (1), 55–69.
- (42) Holzwarth, G.; Ogletree, J. Pyruvate-Free Xanthan. *Carbohydr. Res.* **1979**, *76* (1), 277–280.
- (43) Smith, I. H.; Symes, K. C.; Lawson, C. J.; Morris, E. R. Influence of the Pyruvate Content of Xanthan on Macromolecular Association in Solution. *Int. J. Biol. Macromol.* **1981**, *3* (2), 129–134.
- (44) Tako, M.; Nakamura, S. Rheological Properties of Deacetylated Xanthan in Aqueous Media. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48* (12), 2987–2993.
- (45) Rochefort, W. E.; Middleman, S. Rheology of Xanthan Gum: Salt, Temperature, and Strain Effects in Oscillatory and Steady Shear Experiments. *J. Rheol.* **1987**, *31* (4), 337–369.
- (46) Roy, A. Synthèse et Caractérisation de Dérivés Amphiphiles Du Xanthane, Université du Havre, 2015.
- (47) Moorhouse, R.; Walkinshaw, M. D.; Arnott, S. Xanthan Gum - Molecular Conformation and Interactions. *Am. Chem. Soc.* **1977**, *45*, 90–102.
- (48) Okuyama, K.; Arnott, S.; Moorhouse, R.; Walkinshaw, M. D.; Atkins, E. D. T.; Wolf-Ullish, C. Fibre Diffraction Studies of Bacterial Polysaccharides. *Am. Chem. Soc.* **1980**, *141*, 411–427.
- (49) Norton, I. T.; Goodall, D. M.; Frangou, S. A.; Morris, E. R.; Rees, D. A. Mechanism and Dynamics of Conformational Ordering in Xanthan Polysaccharide. *J. Mol. Biol.* **1984**, *175* (3), 371–394.
- (50) Milas, M.; Wayne, F. R.; Printz, S. Conformations and Flexibility of Native and Re-Natured Xanthan in Aqueous Solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *18*, 211–221.
- (51) Liu, W.; Sato, T.; Norisuye, T.; Fujita, H. Thermally Induced Conformational Change of Xanthan in 0.01M Aqueous Sodium Chloride. *Carbohydr. Res.* **1987**, *160*, 267–281.
- (52) Liu, W.; Norisuye, T. Thermally Induced Conformation Change of Xanthan: Interpretation of Viscosity Behaviour in 0.01 M Aqueous Sodium Chloride. *Int. J. Biol. Macromol.* **1988**, *10*, 44–49.
- (53) Muller, G.; Lecourtier, J. Temperature-Induced Extension and Dissociation of Native Xanthan. *Carbohydr. Polym.* **1988**, *9* (3), 213–225.
- (54) Capron, I.; Brigand, G.; Muller, G. About the Native and Renatured Conformation of Xanthan Exopolysaccharide. *Polymer* **1997**, *38* (21), 5289–5295.
- (55) Kawakami, K.; Norisuye, T. Second Virial Coefficient for Charged Rods: Sodium Xanthan in Aqueous Sodium Chloride. *Macromolecules* **1991**, *24* (17), 4898–4903.

- (56) Gulrez, S. K. H.; Al-Assaf, S.; Fang, Y.; Phillips, G. O.; Gunning, A. P. Revisiting the Conformation of Xanthan and the Effect of Industrially Relevant Treatments. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90* (3), 1235–1243.
- (57) Stokke, B. T.; Elgsaeter, A.; Smidsrod, O. Electron Microscopic Study of Single- and Double-Stranded Xanthan. *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8* (4), 217–225.
- (58) Morris, E. R. Ordered Conformation of Xanthan in Solutions and “Weak Gels”: Single Helix, Double Helix – or Both? *Food Hydrocoll.* **2019**, *86*, 18–25.
- (59) Bouldin, M.; Kulicke, W.-M.; Kehler, H. Prediction of the Non-Newtonian Viscosity and Shear Stability of Polymer Solutions. *Colloid Polym. Sci.* **1988**, *266* (9), 793–805.
- (60) Bertola, V. Dynamic Wetting of Dilute Polymer Solutions: The Case of Impacting Droplets. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2013**, *193–194*, 1–11.
- (61) Cuvelier, G.; Launay, B. Concentration Regimes in Xanthan Gum Solutions Deduced from Flow and Viscoelastic Properties. *Carbohydr. Polym.* **1986**, *6* (5), 321–333.
- (62) Milas, M.; Rinaudo, M.; Knipper, M.; Schuppiser, J. L. Flow and Viscoelastic Properties of Xanthan Gum Solutions. *Macromolecules* **1990**, *23* (9), 2506–2511.
- (63) Wyatt, N. B.; Liberatore, M. W. Rheology and Viscosity Scaling of the Polyelectrolyte Xanthan Gum. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *114* (6), 4076–4084.
- (64) Southwick, J. G.; Lee, H.; Jamieson, A. M.; Blackwell, J. Self-Association of Xanthan in Aqueous Solvent-Systems. *Carbohydr. Res.* **1980**, *84* (2), 287–295.
- (65) Tinland, B.; Maret, G.; Rinaudo, M. Reptation in Semidilute Solutions of Wormlike Polymers. *Macromolecules* **1990**, *23* (2), 596–602.
- (66) Rodd, A. B.; Dunstan, D. E.; Boger, D. V. Characterisation of Xanthan Gum Solutions Using Dynamic Light Scattering and Rheology. *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42* (2), 159–174.
- (67) Morris, E. R.; Cutler, A. N.; Ross-Murphy, S. B.; Rees, D. A.; Price, J. Concentration and Shear Rate Dependence of Viscosity in Random Coil Polysaccharide Solutions. *Carbohydr. Polym.* **1981**, *1* (1), 5–21.
- (68) Dobrynin, A.; Rubinstein, M. Theory of Polyelectrolytes in Solutions and at Surfaces. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30* (11), 1049–1118.
- (69) Arendt, O.; Kulicke, W.-M. Determination of the Viscoelastic Properties of a Homologous Series of the Fermentation Polymer Xanthan Gum. *Angew. Makromol. Chem.* **1998**, *259* (1), 61–67.
- (70) Callet, F.; Milas, M.; Rinaudo, M. Influence of Acetyl and Pyruvate Contents on Rheological Properties of Xanthan in Dilute Solution. *Int. J. Biol. Macromol.* **1987**, *9* (5), 291–293.
- (71) Khouryieh, H. A.; Herald, T. J.; Aramouni, F.; Alavi, S. Intrinsic Viscosity and Viscoelastic Properties of Xanthan/Guar Mixtures in Dilute Solutions: Effect of Salt Concentration on the Polymer Interactions. *Food Res. Int.* **2007**, *40* (7), 883–893.
- (72) Ross-Murphy, S. B.; Morris, V. J.; Morris, E. R. Molecular Viscoelasticity of Xanthan Polysaccharide. *Faraday Symp. Chem. Soc.* **1983**, *18*, 115–129.
- (73) Whitcomb, P. J.; Macosko, C. W. Rheology of Xanthan Gum. *J. Rheol.* **1978**, *22* (5), 493–505.
- (74) Renou, F.; Petibon, O.; Malhiac, C.; Grisel, M. Effect of Xanthan Structure on Its Interaction with Locust Bean Gum: Toward Prediction of Rheological Properties. *Food Hydrocoll.* **2013**, *32* (2), 331–340.

- (75) 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* **2003**, *44* (26), 7917–7924.
- (76) Lacík, I.; Selb, J.; Candau, F. Compositional Heterogeneity Effects in Hydrophobically Associating Water-Soluble Polymers Prepared by Micellar Copolymerization. *Polymer* **1995**, *36* (16), 3197–3211.
- (77) Narrainen, A. P.; Pascual, S.; Haddleton, D. M. Amphiphilic Diblock, Triblock, and Star Block Copolymers by Living Radical Polymerization: Synthesis and Aggregation Behavior. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2002**, *40* (4), 439–450.
- (78) 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.
- (79) Desbrières, J.; Martinez, C.; Rinaudo, M. Hydrophobic Derivatives of Chitosan: Characterization and Rheological Behaviour. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *19* (1), 21–28.
- (80) Laruelle, G.; François, J.; Billon, L. Self-Assembly in Water of Poly(Acrylic Acid)-Based Diblock Copolymers Synthesized by Nitroxide-Mediated Polymerization: Self-Assembly in Water of Poly(Acrylic Acid)-Based Diblock Copolymers Synthesized by Nitroxide-Mediated Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25* (21), 1839–1844.
- (81) Beaudoin, E.; Hiorns, R. C.; Borisov, O.; François, J. Association of Hydrophobically End-Capped Poly(Ethylene Oxide). 1. Preparation of Polymers and Characterization of Critical Association Concentrations. *Langmuir* **2003**, *19* (6), 2058–2066.
- (82) Desbrieres, J. Autoassociative Natural Polymer Derivatives: The Alkylchitosans. Rheological Behaviour and Temperature Stability. *Polymer* **2004**, *45* (10), 3285–3295.
- (83) Winnik, M. A.; Yekta, A. Associative Polymers in Aqueous Solution. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, *2* (4), 424–436.
- (84) 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.
- (85) Berret, J. Fluorocarbon Associative Polymers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8* (3), 296–306.
- (86) Rouzes, C.; Durand, A.; Leonard, M.; Dellacherie, E. Surface Activity and Emulsification Properties of Hydrophobically Modified Dextrans. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *253* (1), 217–223.
- (87) Ezzell, S. A.; Hoyle, C. E.; Creed, D.; McCormick, C. L. Water-Soluble Copolymers. 40. Photophysical Studies of the Solution Behavior of Associative Pyrenesulfonamide-Labeled Polyacrylamides. *Macromolecules* **1992**, *25* (7), 1887–1895.
- (88) Souguir, Z.; Roudesli, S.; Picton, E. L.; Le Cerf, D.; About-Jaudet, E. Novel Cationic and Amphiphilic Pullulan Derivatives I: Synthesis and Characterization. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43* (12), 4940–4950.
- (89) Landoll, L. M. Nonionic Polymer Surfactants. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1982**, *20* (2), 443–455.

- (90) Wei, Y.; Cheng, F.; Hou, G.; Sun, S. Amphiphilic Cellulose: Surface Activity and Aqueous Self-Assembly into Nano-Sized Polymeric Micelles. *React. Funct. Polym.* **2008**, *68* (5), 981–989.
- (91) Zhang, L. Cellulosic Associative Thickeners. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45* (1), 1–10.
- (92) Babak, V. G.; Skotnikova, E. A.; Lukina, I. G.; Pelletier, S.; Hubert, P.; Dellacherie, E. Hydrophobically Associating Alginate Derivatives: Surface Tension Properties of Their Mixed Aqueous Solutions with Oppositely Charged Surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *225* (2), 505–510.
- (93) Leonard, M.; De Boisseson, M. R.; Hubert, P.; Dalençon, F.; Dellacherie, E. Hydrophobically Modified Alginate Hydrogels as Protein Carriers with Specific Controlled Release Properties. *J. Controlled Release* **2004**, *98* (3), 395–405.
- (94) Nystrom, B.; Kjøniksen, A.-L.; Iversen, C. Characterization of Association Phenomena in Aqueous Systems of Chitosan of Different Hydrophobicity. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, 81–103.
- (95) Durand, A. Aqueous Solutions of Amphiphilic Polysaccharides: Concentration and Temperature Effect on Viscosity. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43* (5), 1744–1753.
- (96) Hassani, L. N.; Hendra, F.; Bouchemal, K. Auto-Associative Amphiphilic Polysaccharides as Drug Delivery Systems. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (11–12), 608–614.
- (97) Mayol, L.; Biondi, M.; Russo, L.; Malle, B. M.; Schwach-Abdellaoui, K.; Borzacchiello, A. Amphiphilic Hyaluronic Acid Derivatives toward the Design of Micelles for the Sustained Delivery of Hydrophobic Drugs. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *102*, 110–116.
- (98) Rotureau, E.; Marie, E.; Leonard, M.; Dellacherie, E.; Camesano, T. A.; Durand, A. From Polymeric Surfactants to Colloidal Systems (2): Preparation of Colloidal Dispersions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *288* (1–3), 62–70.
- (99) Akiyama, E.; Kashimoto, A.; Fukuda, K.; Hotta, H.; Suzuki, T.; Kitsuki, T. Thickening Properties and Emulsification Mechanisms of New Derivatives of Polysaccharides in Aqueous Solution. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *282* (2), 448–457.
- (100) Masunaga, H.; Sasaki, K.; Akiba, I. Convenient Method for Removing and Concentrating Hydrophobic Organic Compounds from Water with Amphiphilic Polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *103* (1), 641–643.
- (101) Kjøniksen, A.-L.; Beheshti, N.; Kotlar, H. K.; Zhu, K.; Nyström, B. Modified Polysaccharides for Use in Enhanced Oil Recovery Applications. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44* (4), 959–967.
- (102) Candau, F.; Regalado, E. J.; Selb, J. Scaling Behavior of the Zero Shear Viscosity of Hydrophobically Modified Poly(Acrylamide)s. *Macromolecules* **1998**, *31* (16), 5550–5552.
- (103) 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.
- (104) Kujawa, P.; Audibert-Hayet, A.; Selb, J.; Candau, F. Rheological Properties of Multisticker Associative Polyelectrolytes in Semidilute Aqueous Solutions. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2004**, *42* (9), 1640–1655.
- (105) Guo, X.; Abdala, A. A.; May, B. L.; Lincoln, S. F.; Khan, S. A.; Prud'homme, R. K. Rheology Control by Modulating Hydrophobic and Inclusion Associations in Modified Poly(Acrylic Acid) Solutions. *Polymer* **2006**, *47* (9), 2976–2983.

- (106) Sinquin, A.; Hubert, P.; Marchal, P.; Choplin, L.; Dellacherie, E. Rheological Properties of Semi-Dilute Aqueous Solutions of Hydrophobically Modified Propylene Glycol Alginate Derivatives. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1996**, *112* (2–3), 193–200.
- (107) 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.
- (108) Marrucci, G.; Bhargava, S.; Cooper, S. L. Models of Shear-Thickening Behavior in Physically Crosslinked Networks. *Macromolecules* **1993**, *26* (24), 6483–6488.
- (109) Desbrieres, J. Autoassociative Natural Polymer Derivatives: The Alkylchitosans. Rheological Behaviour and Temperature Stability. *Polymer* **2004**, *45* (10), 3285–3295.
- (110) McCormick, C. L.; Nonaka, T.; Johnson, C. B. Water-Soluble Copolymers: 27. Synthesis and Aqueous Solution Behaviour of Associative Acrylamide-N-Alkylacrylamide Copolymers. *Polymer* **1988**, *29* (4), 731–739.
- (111) Argillier, J.-F.; Audibert, A.; Lecourtier, J.; Moan, M.; Rousseau, L. Solution and Adsorption Properties of Hydrophobically Associating Water-Soluble Polyacrylamides. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1996**, *113* (3), 247–257.
- (112) Morishima, Y.; Kobayashi, T.; Nozakura, S. Amphiphilic Polyelectrolytes with Various Hydrophobic Groups: Intramolecular Hydrophobic Aggregation in Aqueous Solution. *Polym. J.* **1989**, *21* (3), 267–274.
- (113) Caputo, M.-R.; Selb, J.; Candau, F. Effect of Temperature on the Viscoelastic Behaviour of Entangled Solutions of Multisticker Associating Polyacrylamides. *Polymer* **2004**, *45* (1), 231–240.
- (114) Biggs, S.; Selb, J. Copolymers of Acrylamide/N-Alkylacrylamide in Aqueous Solution: The Effects of Hydrolysis on Hydrophobic Interactions. **1993**, *34* (3), 580–591.
- (115) Hourdet, D.; Gadgil, J.; Podhajecka, K.; Badiger, M. V.; Brûlet, A.; Wadgaonkar, P. P. Thermoreversible Behavior of Associating Polymer Solutions: Thermo thinning versus Thermo thickening. *Macromolecules* **2005**, *38* (20), 8512–8521.
- (116) Vallée, F.; Müller, C.; Durand, A.; Schimchowitsch, S.; Dellacherie, E.; Kelche, C.; Cassel, J. C.; Leonard, M. Synthesis and Rheological Properties of Hydrogels Based on Amphiphilic Alginate-Amide Derivatives. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (2), 223–228.
- (117) Chassenieux, C.; Nicolai, T.; Benyahia, L. Rheology of Associative Polymer Solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16* (1), 18–26.
- (118) Rubinstein, M.; Colby, R. H.; Gillmor, J. R. Dynamic Scaling for Polymer Gelation. *Chem. Phys.* **1989**, *51*, 66–74.
- (119) Jenkins, R. D.; Silebi, C. A.; El-Aasser, M. S. Steady-Shear and Linear-Viscoelastic Material Properties of Model Associative Polymer Solutions. In *Polymers as Rheology Modifiers*; Schulz, D. N., Glass, J. E., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1991; Vol. 462, pp 222–233.
- (120) Annable, T.; Buscall, R.; Ettelaie, R.; Whittlestone, D. The Rheology of Solutions of Associating Polymers: Comparison of Experimental Behavior with Transient Network Theory. *J. Rheol.* **1993**, *37* (4), 695–726.

- (121) Leibler, L.; Rubinstein, M.; Colby, R. H. Dynamics of Reversible Networks. *Macromolecules* **1991**, *24* (16), 4701–4707.
- (122) De Gennes, P. G. Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles. *J. Chem. Phys.* **1971**, *55* (2), 572–579.
- (123) Covin, A. Étude de La Modification Des Propriétés Rhéologiques Linéaires et Non Linéaires Par Ingénierie Moléculaire. Vers Le Contrôle Des Propriétés Adhésives de Matériaux Autocollants, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2011.
- (124) Bradshaw, I. J.; Nisbet, B. A.; Kerr, M. H.; Sutherland, I. W. Modified Xanthan—Its Preparation and Viscosity. *Carbohydr. Polym.* **1983**, *3* (1), 23–38.
- (125) Ghorai, S.; Sinhamahapatra, A.; Sarkar, A.; Panda, A. B.; Pal, S. Novel Biodegradable Nanocomposite Based on XG-g-PAM/SiO₂: Application of an Efficient Adsorbent for Pb²⁺ Ions from Aqueous Solution. *Bioresour. Technol.* **2012**, *119*, 181–190.
- (126) Behari, K.; Pandey, P. K.; Kumar, R.; Taunk, K. Graft Copolymerization of Acrylamide onto Xanthan Gum. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *46*, 185–189.
- (127) Mendes, A. C.; Baran, E. T.; Nunes, C.; Coimbra, M. A.; Azevedo, H. S.; Reis, R. L. Palmitoylation of Xanthan Polysaccharide for Self-Assembly Microcapsule Formation and Encapsulation of Cells in Physiological Conditions. *Soft Matter* **2011**, *7*, 9647–9658.
- (128) Bejenariu, A.; Popa, M.; Dulong, V.; Picton, L.; Le Cerf, D. Trisodium Trimetaphosphate Crosslinked Xanthan Networks: Synthesis, Swelling, Loading and Releasing Behaviour. *Polym. Bull.* **2009**, *62* (4), 525–538.
- (129) Mendes, A. C.; Baran, E. T.; Reis, R. L.; Azevedo, H. S. Fabrication of Phospholipid–Xanthan Microcapsules by Combining Microfluidics with Self-Assembly. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (5), 6675–6685.
- (130) Su, L.; Ji, W. K.; Lan, W. Z.; Dong, X. Q. Chemical Modification of Xanthan Gum to Increase Dissolution Rate. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *53*, 497–499.
- (131) Gils, P. S.; Ray, D.; Sahoo, P. K. Characteristics of Xanthan Gum-Based Biodegradable Superporous Hydrogel. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *45* (4), 364–371.
- (132) Shalviri, A.; Liu, Q.; Abdekhodaie, M. J.; Wu, X. Y. Novel Modified Starch–Xanthan Gum Hydrogels for Controlled Drug Delivery: Synthesis and Characterization. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79* (4), 898–907.
- (133) Panda, S.; Satpathy, M. A Review on Grafting and Applications of Xanthan Gum and Its Derivatives. *Int. J. Chem. Pharm. Rev. Res.* **2015**, *2* (2), 1–7.
- (134) Arimura, T.; Omagari, Y.; Yamamoto, K.; Kadokawa, J. Chemoenzymatic Synthesis and Hydrogelation of Amylose-Grafted Xanthan Gums. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *49* (4), 498–503.
- (135) Bejenariu, A.; Popa, M.; Le Cerf, D.; Picton, L. Stiffness Xanthan Hydrogels: Synthesis, Swelling Characteristics and Controlled Release Properties. *Polym. Bull.* **2008**, *61* (5), 631–641.
- (136) Roy, A.; Comesse, S.; Grisel, M.; Hucher, N.; Souguir, Z.; Renou, F. Hydrophobically Modified Xanthan: An Amphiphilic but Not Associative Polymer. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1160–1170.
- (137) Laffleur, F.; Michalek, M. Modified Xanthan Gum for Buccal Delivery—A Promising Approach in Treating Sialorrhoea. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 1250–1256.

- (138) Raynal, S.; Grossiord, J. L.; Seiller, M.; Clause, D. A Topical W/O/W Multiple Emulsion Containing Several Active Substances: Formulation, Characterization and Study of Release. *J. Controlled Release* **1993**, *26* (2), 129–140.
- (139) Chappat, M. Some Applications of Emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1994**, *91*, 57–77.
- (140) Walstra, P. Principles of Emulsion Formation. *Chem. Eng. Sci.* **1993**, *48* (2), 333–349.
- (141) Charcosset, C.; Limayem, I.; Fessi, H. The Membrane Emulsification Process—a Review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2004**, *79* (3), 209–218.
- (142) Schultz, S.; Wagner, G.; Urban, K.; Ulrich, J. High-Pressure Homogenization as a Process for Emulsion Formation. *Chem. Eng. Technol.* **2004**, *27* (4), 361–368.
- (143) Chanamai, R.; McClements, D. J. Dependence of Creaming and Rheology of Monodisperse Oil-in-Water Emulsions on Droplet Size and Concentration. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, *172* (1), 79–86.
- (144) Leong, T. S. H.; Wooster, T. J.; Kentish, S. E.; Ashokkumar, M. Minimising Oil Droplet Size Using Ultrasonic Emulsification. *Ultrason. Sonochem.* **2009**, *16* (6), 721–727.
- (145) Blijdenstein, T. B. J.; van der Linden, E.; van Vliet, T.; van Aken, G. A. Scaling Behavior of Delayed Demixing, Rheology, and Microstructure of Emulsions Flocculated by Depletion and Bridging. *Langmuir* **2004**, *20* (26), 11321–11328.
- (146) McClements, D. . Comments on Viscosity Enhancement and Depletion Flocculation by Polysaccharides. *Food Hydrocoll.* **2000**, *14* (2), 173–177.
- (147) Bouyer, E.; Mekhloufi, G.; Rosilio, V.; Grossiord, J.-L.; Agnely, F. Proteins, Polysaccharides, and Their Complexes Used as Stabilizers for Emulsions: Alternatives to Synthetic Surfactants in the Pharmaceutical Field? *Int. J. Pharm.* **2012**, *436* (1–2), 359–378.
- (148) Damodaran, S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *J. Food Sci.* **2005**, *70* (3), R54–R66.
- (149) Taylor, P. Ostwald Ripening in Emulsions. **1998**, *75*, 107–163.
- (150) Guéguen, J.; Popineau, Y.; Anisimova, I. N.; Fido, R. J.; Shewry, P. R.; Tatham, A. S. Functionality of the 2S Albumin Seed Storage Proteins from Sunflower (*Helianthus Annuus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (5), 1184–1189.
- (151) Al-Malah, K. I.; Azzam, M. O. J.; Omari, R. M. Emulsifying Properties of BSA in Different Vegetable Oil Emulsions Using Conductivity Technique. *Food Hydrocoll.* **2000**, *14* (5), 485–490.
- (152) Dickinson, E.; Golding, M.; Povey, M. J. W. Creaming and Flocculation of Oil-in-Water Emulsions Containing Sodium Caseinate. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185* (2), 515–529.
- (153) Li, Y.; Hu, M.; Xiao, H.; Du, Y.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Controlling the Functional Performance of Emulsion-Based Delivery Systems Using Multi-Component Biopolymer Coatings. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *76* (1), 38–47.
- (154) Keowmaneechai, E.; McClements, D. J. Influence of EDTA and Citrate on Physicochemical Properties of Whey Protein-Stabilized Oil-in-Water Emulsions Containing CaCl₂. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (24), 7145–7153.
- (155) Sun, C.; Gunasekaran, S.; Richards, M. P. Effect of Xanthan Gum on Physicochemical Properties of Whey Protein Isolate Stabilized Oil-in-Water Emulsions. *Food Hydrocoll.* **2007**, *21* (4), 555–564.

- (156) Novales, B.; Papineau, P.; Sire, A.; Axelos, M. A. V. Characterization of Emulsions and Suspensions by Video Image Analysis. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *221* (1–3), 81–89.
- (157) Tadros, T. F. Fundamental Principles of Emulsion Rheology and Their Applications. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1994**, *91*, 39–55.
- (158) Barnes, H. A. Rheology of Emulsions — a Review. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1994**, *91*, 89–95.
- (159) Pal, R. Effect of Droplet Size on the Rheology of Emulsions. *AIChE J.* **1996**, *42* (11), 3181–3190.
- (160) Tadros, T. F. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In *Emulsion formation and stability*; John Wiley & Sons; 2013; pp 1–75.
- (161) Sherman, P. Rheological Changes in Emulsions on Aging. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *27* (2), 282–293.
- (162) Tadros, T. Application of Rheology for Assessment and Prediction of the Long-Term Physical Stability of Emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, *108–109*, 227–258.
- (163) Mason, T. G. New Fundamental Concepts in Emulsion Rheology. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4* (3), 231–238.
- (164) Güzey, D.; McClements, D. J. Influence of Environmental Stresses on O/W Emulsions Stabilized by β -Lactoglobulin–Pectin and β -Lactoglobulin–Pectin–Chitosan Membranes Produced by the Electrostatic Layer-by-Layer Deposition Technique. *Food Biophys.* **2006**, *1* (1), 30–40.
- (165) Huang, X.; Kakuda, Y.; Cui, W. Hydrocolloids in Emulsions: Particle Size Distribution and Interfacial Activity. *Food Hydrocoll.* **2001**, *15* (4–6), 533–542.
- (166) Ye, A.; Hemar, Y.; Singh, H. Enhancement of Coalescence by Xanthan Addition to Oil-in-Water Emulsions Formed with Extensively Hydrolysed Whey Proteins. *Food Hydrocoll.* **2004**, *18* (5), 737–746.
- (167) Taherian, A. R.; Fustier, P.; Ramaswamy, H. S. Effect of Added Oil and Modified Starch on Rheological Properties, Droplet Size Distribution, Opacity and Stability of Beverage Cloud Emulsions. *J. Food Eng.* **2006**, *77* (3), 687–696.
- (168) Chantrapornchai, W.; Clydesdale, F.; McClements, D. J. Influence of Droplet Characteristics on the Optical Properties of Colored Oil-in-Water Emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *155* (2–3), 373–382.
- (169) Dubuisson, P.; Picard, C.; Grisel, M.; Savary, G. How Does Composition Influence the Texture of Cosmetic Emulsions? *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2018**, *536*, 38–46.
- (170) Tadros, T. F. Emulsion Science and Technology: A General Introduction. *Emuls. Sci. Technol. T F Tadros* **2009**, 1–56.
- (171) Roesch, R. R.; Corredig, M. Texture and Microstructure of Emulsions Prepared with Soy Protein Concentrate by High-Pressure Homogenization. *LWT - Food Sci. Technol.* **2003**, *36* (1), 113–124.
- (172) Dickinson, E. Hydrocolloids at Interfaces and the Influence on the Properties of Dispersed Systems. *Food Hydrocoll.* **2003**, *17* (1), 25–39.
- (173) Matthews, B. A.; Rhodes, C. T. Use of the Derjaguin, Landau, Verwey, and Overbeek Theory to Interpret Pharmaceutical Suspension Stability. *J. Pharm. Sci.* **1970**, *59* (4), 521–525.

- (174) Opawale, F. O.; Burgess, D. J. Influence of Interfacial Properties of Lipophilic Surfactants on Water-in-Oil Emulsion Stability. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *197* (1), 142–150.
- (175) Bancroft, W. D. The Theory of Emulsification, *V. J. Phys. Chem.* **1912**, *17* (6), 501–519.
- (176) Griffin, W. Classification of Surface-Active Agents by “HLB.” *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1949**, *1*, 311–326.
- (177) Davies, J. T.; Rideal, E. K. Interfacial Phenomena. *Acad. Press N. Y. Lond.* **1961**.
- (178) Olkowska, E.; Polkowska, Ż.; Namieśnik, J. Analytics of Surfactants in the Environment: Problems and Challenges. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5667–5700.
- (179) Makkar, R. S.; Rockne, K. J. Comparison of Synthetic Surfactants and Biourfactants in Enhancing Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22* (10), 2280–2292.
- (180) Durand, A.; Dellacherie, E. Neutral Amphiphilic Polysaccharides: Chemical Structure and Emulsifying Properties. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, *284* (5), 536–545.
- (181) Chevalier, Y.; Bolzinger, M.-A. Emulsions Stabilized with Solid Nanoparticles: Pickering Emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *439*, 23–34.
- (182) Dickinson, E. Hydrocolloids as Emulsifiers and Emulsion Stabilizers. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23* (6), 1473–1482.
- (183) Garti, N.; Reichman, D. Surface Properties and Emulsification Activity of Galactomannans. *Food Hydrocoll.* **1994**, *8* (2), 155–173.
- (184) Paraskevopoulou, A. Stabilization of Olive Oil - Lemon Juice Emulsion with Polysaccharides. *Food Chem.* **2005**, *90* (4), 627–634.
- (185) Krstonošić, V.; Dokić, L.; Dokić, P.; Dapčević, T. Effects of Xanthan Gum on Physicochemical Properties and Stability of Corn Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23* (8), 2212–2218.
- (186) Chanamai, R.; McClements, D. J. Comparison of Gum Arabic, Modified Starch, and Whey Protein Isolate as Emulsifiers: Influence of PH, CaCl₂ and Temperature. *J. Food Sci.* **2002**, *67* (1), 120–125.
- (187) Wu, Y.; Cui, W.; Eskin, N. A. M.; Goff, H. D. An Investigation of Four Commercial Galactomannans on Their Emulsion and Rheological Properties. *Food Res. Int.* **2009**, *42* (8), 1141–1146.
- (188) Jenkins, P.; Snowden, M. Depletion Flocculation in Colloidal Dispersions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1996**, *68*, 57–96.
- (189) Cao, Y.; Dickinson, E.; Wedlock, D. J. Creaming and Flocculation in Emulsions Containing Polysaccharide. *Food Hydrocoll.* **1990**, *4* (3), 185–195.
- (190) Asakura, S.; Oosawa, F. Interaction between Particles Suspended in Solutions of Macromolecules. *J. Polym. Sci.* **1958**, *33* (126), 183–192.
- (191) Fan, T.-H.; Tuinier, R. Hydrodynamic Interaction of Two Colloids in Nonadsorbing Polymer Solutions. *Soft Matter* **2010**, *6* (3), 647–654.
- (192) Rhim, J.-W. Physical and Mechanical Properties of Water Resistant Sodium Alginate Films. *LWT - Food Sci. Technol.* **2004**, *37* (3), 323–330.

- (193) Morris, E. R.; Rees, D. A.; Thom, D.; Boyd, J. Chiroptical and Stoichiometric Evidence of a Specific, Primary Dimerisation Process in Alginate Gelation. *Carbohydr. Res.* **1978**, *66* (1), 145–154.
- (194) Gómez-Díaz, D.; Navaza, J. M. Rheology of Food Stabilizers Blends. *J. Food Eng.* **2004**, *64* (2), 143–149.
- (195) Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt, A. Effect of Alginate and λ -Carrageenan on Tensile Properties and Water Vapour Permeability of Sodium Caseinate–Lipid Based Films. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74* (3), 419–426.
- (196) Gu, Y. S.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Influence of PH and Carrageenan Type on Properties of β -Lactoglobulin Stabilized Oil-in-Water Emulsions. *Food Hydrocoll.* **2005**, *19* (1), 83–91.
- (197) Eleya, M. M. O.; Turgeon, S. L. Rheology of K-Carrageenan and β -Lactoglobulin Mixed Gels. *Food Hydrocoll.* **2000**, *12*.
- (198) Hennock, M.; Rahalkar, R. R.; Richmond, P. Effect of Xanthan Gum upon the Rheology and Stability of Oil-Water Emulsions. *J. Food Sci.* **1984**, *49* (5), 1271–1274.
- (199) Parker, A.; Gunning, P. A.; Ng, K.; Robins, M. M. How Does Xanthan Stabilise Salad Dressing? *Food Hydrocoll.* **1995**, *9* (4), 333–342.
- (200) Wollenweber, C.; Makievski, A. V.; Miller, R.; Daniels, R. Adsorption of Hydroxypropyl Methylcellulose at the Liquid/Liquid Interface and the Effect on Emulsion Stability. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, *172* (1–3), 91–101.
- (201) Sun, W.; Sun, D.; Wei, Y.; Liu, S.; Zhang, S. Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Cellulose: Adsorption and Thickening Effect. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *311* (1), 228–236.
- (202) Wang, J.; Su, L.; Wang, S. Physicochemical Properties of Octenyl Succinic Anhydride-Modified Potato Starch with Different Degrees of Substitution. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *90*, 424–429.
- (203) Ye, F.; Miao, M.; Jiang, B.; Hamaker, B. R.; Jin, Z.; Zhang, T. Characterizations of Oil-in-Water Emulsion Stabilized by Different Hydrophobic Maize Starches. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *166*, 195–201.
- (204) Babak, V. G.; Desbrières, J. Dynamic Surface Tension of Hydrophobically Modified Chitosans. *Mendeleev Commun.* **2004**, *14* (2), 66–68.
- (205) Rotureau, E.; Leonard, M.; Marie, E.; Dellacherie, E.; Comesano, T. A.; Durand, A. From Polymeric Surfactants to Colloidal Systems (1): Amphiphilic Dextrans for Emulsion Preparation. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *288* (1–3), 131–137.
- (206) Stevens, C. V.; Meriggi, A.; Peristeropoulou, M.; Christov, P. P.; Booten, K.; Levecke, B.; Vandamme, A.; Pittevels, N.; Tadros, T. F. Polymeric Surfactants Based on Inulin, a Polysaccharide Extracted from Chicory. 1. Synthesis and Interfacial Properties. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (4), 1256–1259.
- (207) Yamaguchi, S.; Fukui, H.; Akiyoshi, K.; Sato, T.; Sunamoto, J. O/W-Emulsion as Formed by Cholesterol-Bearing Pullulan. *NIPPON KAGAKU KAISHI* **1992**, No. 2, 186–190.
- (208) Kawaguchi, Y.; Matsukawa, K.; Ishigami, Y. Conformational Changes of Hyaluronates with Partial Palmitoylation and the Adsorption Structures on the Surface of Oil Droplets. *Carbohydr. Polym.* **1993**, *20* (3), 183–187.

- (209) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (15), 1269–1272.
- (210) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bamwarth, W.; Gillessen, D. New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (15), 1927–1930.
- (211) Adam, S. HBTU: A Mild Activating Agent of Muramic Acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2* (6), 571–574.
- (212) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602.
- (213) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16* (2), 97–116.
- (214) Ducauze, C. J. Ch. 3 : Etude et calcul de quelques spectres de RMN; p 36.
- (215) Akoka, S. Une introduction à la résonance magnétique nucléaire. 17.
- (216) Pauli, G. F.; Chen, S.-N.; Simmler, C.; Lankin, D. C.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Napolitano, J. G. Importance of Purity Evaluation and the Potential of Quantitative ¹H NMR as a Purity Assay: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (22), 9220–9231.
- (217) Wu, S.-J.; Wu, J.-H.; Xia, L.-Z.; Chu, C.; Liu, D.; Gong, M. Preparation of Xanthan-Derived Oligosaccharides and Their Hydroxyl Radical Scavenging Activity. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92* (2), 1612–1614.
- (218) Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat. Protoc.* **2007**, *1* (6), 2876–2890.
- (219) Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. How to Study Proteins by Circular Dichroism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, *1751* (2), 119–139.
- (220) Šmidlehner, T.; Piantanida, I.; Pescitelli, G. Polarization Spectroscopy Methods in the Determination of Interactions of Small Molecules with Nucleic Acids – Tutorial. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 84–105.
- (221) Barnes, H. A.; Hutton, J. F.; Walters, K. *An Introduction to Rheology*; Elsevier, 1989.
- (222) Keck, C. M.; Müller, R. H. Size Analysis of Submicron Particles by Laser Diffraction—90% of the Published Measurements Are False. *Int. J. Pharm.* **2008**, *355* (1–2), 150–163.
- (223) Roy, A. N.; Benyahia, L.; Grisel, M.; Renou, F. Shear Interfacial Viscoelasticity of Native and Hydrophobically Modified Xanthan at Oil/Water Interface. *Food Hydrocoll.* **2016**, *61*, 887–894.
- (224) Pantelic, I. *Alkyl Polyglucosides: From Natural-Origin Surfactants to Prospective Delivery Systems*; Woodhead Publishing, 2014.
- (225) von Rybinski, W.; Hill, K. Alkyl Polyglycosides—Properties and Applications of a New Class of Surfactants. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (10), 1328–1345.
- (226) Miller, D.; Wiener, E.-M.; Turowski, A.; Thunig, C.; Hoffmann, H. O/W Emulsions for Cosmetics Products Stabilized by Alkyl Phosphates — Rheology and Storage Tests. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *152* (1–2), 155–160.
- (227) Hemar, Y.; Tamehana, M.; Munro, P. A.; Singh, H. Influence of Xanthan Gum on the Formation and Stability of Sodium Caseinate Oil-in-Water Emulsions. *Food Hydrocoll.* **2001**, *15*, 513–519.

Synthèse et caractérisation de dérivés amphiphiles du xanthane : application à la stabilisation d'émulsions

Les polysaccharides amphiphiles sont constitués d'un squelette hydrophile sur lequel sont greffés des groupements hydrophobes. Ils possèdent des propriétés rhéologiques accrues dues à leur capacité d'auto-organisation en solution aqueuse mais également interfaciales dues à leurs propriétés d'adsorption à l'interface huile/eau (H/E). Néanmoins, peu d'études s'intéressent à conférer ce type de propriétés à des polysaccharides complexes en termes de structure ou de conformation, comme le xanthane. En effet, ce polymère adopte en solution deux conformations distinctes selon les conditions expérimentales : une forme ordonnée hélicoïdale rigide et une forme désordonnée de type pelote flexible.

Partant de ce constat, l'objectif de ce travail de thèse est de déterminer l'impact de la rigidité du squelette du xanthane modifié hydrophobiquement sur les propriétés amphiphiles en solution mais également sur les propriétés stabilisantes en émulsion.

Il s'avère que la conformation adoptée par le polymère pendant le processus de greffage a un impact majeur sur ses propriétés rhéologiques : le xanthane modifié sous forme désordonnée possède un caractère associatif, contrairement au xanthane modifié sous forme ordonnée.

De plus, le xanthane modifié hydrophobiquement est capable, sous certaines conditions, de former et de stabiliser des émulsions H/E, sans ajout de tensioactif moléculaire, en se partitionnant entre stabilisation de l'interface H/E et maintien de la viscosité de la phase aqueuse continue.

Mots clés : xanthane, polysaccharide amphiphile, modification chimique, conformation, rhéologie, émulsion.

Synthesis and characterization of amphiphilic xanthan derivatives: application as emulsions stabilizers

Amphiphilic polysaccharides are composed of a hydrophilic backbone grafted with hydrophobic moieties. They show specific rheological properties due to their capacity to self-associate in solution, but also interfacial properties due to their ability to adsorb at the oil/water (O/W) interface. However, only few studies describe the chemical modification of complex heteropolysaccharides regarding their structure or their conformation, such as xanthan. Indeed, this polysaccharide can adopt in solution two distinct conformations depending on experimental conditions: an ordered rigid helix or a disordered flexible coil.

The objective of this work is to determine the impact of the chain stiffness of hydrophobically modified xanthan on associative properties in solution, but also on stabilizing properties in emulsion.

The conformation adopted by the polymer during the grafting procedure has a major impact on the rheological properties: xanthan modified under disordered conformation is an associative polysaccharide, contrary to xanthan modified under its ordered conformation.

In addition, hydrophobically modified xanthan is able, under certain conditions, to form and stabilize O/W emulsion, without further addition of molecular surfactant, by partitioning between stabilization of the O/W interface and viscosifying the continuous aqueous phase.

Key words: xanthan, amphiphilic polysaccharide, chemical modification, conformation, rheology, emulsion.