



HAL
open science

Détermination des natures des interactions entre polymères en solution aqueuse à l'échelle moléculaire par spectroscopie de fluorescence

Alexandre Cordinier

► **To cite this version:**

Alexandre Cordinier. Détermination des natures des interactions entre polymères en solution aqueuse à l'échelle moléculaire par spectroscopie de fluorescence. Autre. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMLH33 . tel-03285452

HAL Id: tel-03285452

<https://theses.hal.science/tel-03285452>

Submitted on 13 Jul 2021

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

Détermination des natures des interactions entre polymères en solution aqueuse à l'échelle moléculaire par spectroscopie de fluorescence

Présentée et soutenue par
Alexandre CORDINIER

Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2020
devant le jury composé de

M. Bruno Jean	Chargé de Recherche CNRS Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales	Rapporteur
M. Christian Sanchez	Professeur des Universités Université de Montpellier	Rapporteur
M. Luc Picton	Professeur des Universités Université de Rouen Normandie	Examineur
M. Jacques Mazoyer	Principal Scientist CARGILL	Examineur
M. Michel Grisel	Professeur des Universités Université Le Havre Normandie	Directeur de thèse
M. Nicolas Hucher	Maître de Conférences Université Le Havre Normandie	Co-encadrant de thèse

Thèse dirigée par Michel GRISEL et co-encadrée par Nicolas HUCHER au laboratoire URCOM

Remerciements

C'est au bout de ces quelques années de thèse que s'achève ce périple scientifique et humain au sein du navire URCOM.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse ; Messieurs Bruno Jean et Christian Sanchez qui ont accepté d'être examinateur, Monsieur Jacques Mazoyer pour son rôle d'examineur et Monsieur Luc Picton pour avoir accepté d'être le président du jury. J'ai apprécié leurs retours, leurs conseils et la discussion qui a eu lieu tout au long de la soutenance. Merci à vous qui m'avez accordé le grade de docteur en chimie.

Je n'en serais pas arrivé à ce stade sans mon directeur de thèse Michel Grisel et mon encadrant Nicolas Hucher. Un grand merci à eux pour leur implication, leurs conseils et leur bienveillance mais surtout pour leur patience.

Je remercie la région Normandie qui a financé ce projet.

Je remercie également Géraldine et Faustine pour leurs travaux indirectement relié à ce projet de recherche.

Merci à mon stagiaire Béranger Cadinot qui a fait un très bon travail et sur lequel j'ai pu m'appuyer.

Un très grand merci aux membres du laboratoire qui ont pu m'aider tout au long de mon projet de thèse. Merci à Odile, Marie-José pour les discussions entre deux salles ou deux étages, à Vincent L. le « MacGyver » de l'URCOM, à Faustine et Déborah toujours présentes et prêtes à aider et à dépanner.

Je tiens à remercier les anciens : Florine, Céline, Fanny, Emilie, Loïc, Momo, Pauline, Laura, Thomas, Julien mais également Lívia, Lucie, Omar, Mari'An' et Sabine ; pour l'ambiance dans le laboratoire et à l'extérieur et les tous bons moments passés ensemble. Je souhaite bon courage à ceux pour qui c'est bientôt la fin: Clément, Charbel, Ismaïl, Abdel, la fin est proche ! Bonne chance à la nouvelle génération de doctorants : Marie, Benjamin, Christine, Mira, Mohammad, Bérénice, Charlotte, Aurélie et David.

Merci également aux membres des différents ensembles musicaux du conservatoire Arthur Honegger dont O' Naig Hair avec qui j'ai passé de très bons moments et qui ont su également me faire apprécier la vie au Havre. Vive les pupitres des harpistes : Charlène, Catherine, Clémence et Fabienne. Je tiens à remercier tout particulièrement Alice.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille, mes amis et plus particulièrement, Monica, Audrey, Anne-Sophie, Lena, Morgane et Dasha pour leur soutien indéfectible tout au long de cette thèse.

Sommaire

Liste des abréviations	13
Liste des symboles	15
Table des Figures	17
Table des Tableaux	21
Introduction Générale	25
Chapitre I : Etat de l'art des connaissances sur les interactions moléculaires dans les systèmes polymères	27
1. Principales interactions moléculaires dans les solutions de polymères	28
1.1. Interactions dipôle-dipôle	28
1.1.1. Descriptions	28
1.1.1.1. Forces de Keesom	29
1.1.1.2. Forces de Debye	29
1.1.1.3. Force de London	30
1.1.2. Mise en évidence	31
1.2. Cas des micro-domaines hydrophobes	32
1.2.1. Description	32
1.2.2. Caractérisation	33
1.3. Les liaisons hydrogène	33
1.3.1. Description	33
1.3.2. Caractérisation	34
1.4. Interactions coulombiennes	35
1.4.1. Description	35
1.4.2. Mise en évidences	35
1.5. Quantification relative des interactions moléculaires en solution	36
1.5.1. Simulations numériques	36
1.5.2. Analyse micro-calorique	36
1.6. Concentration des solutions de polymère	37
1.6.1. Régimes de concentration des solutions de polymère	37

1.6.2. Détermination de la concentration critique de recouvrement C^*	38
1.6.3. Conclusion	39
1.7. Cas particulier des synergies d'interactions des mélanges xanthane/galactomannane	39
1.7.1. La gomme de xanthane	40
1.7.1.1. Sources, production et intérêts industriels	40
1.7.1.2. Structure chimique	40
1.7.1.3. Conformation en solution aqueuse	41
1.7.1.4. Température de transition conformationnelle T_m	41
1.7.1.5. Paramètres influençant T_m	44
1.7.1.5.1. La force ionique	44
1.7.1.5.2. Influence de la concentration et du pH	44
1.7.1.5.3. Groupements acétate et pyruvate	44
1.7.1.6. Rhéologie en solution aqueuse	46
1.7.1.6.1. A force ionique nulle	46
1.7.1.6.2. En présence de sels	46
1.7.1.6.3. Anisotropie des solutions de xanthane	46
1.7.1.7. Approche viscosimétrique	47
1.7.1.7.1. Viscosité intrinsèque	47
1.7.2. Les galactomannanes	48
1.7.2.1. Sources, production et intérêts industriels	48
1.7.2.2. Structure chimique	48
1.7.2.2.1. Ratio mannose/galactose	49
1.7.2.2.2. Distribution des unités de galactose	49
1.7.2.3. Propriétés des solutions de galactomannane	51
1.7.2.3.1. Approche viscosimétrique	53
1.7.2.3.1.1. Viscosité intrinsèque	53
1.7.3. Cas des mélanges xanthane/galactomannane	54
1.7.3.1. Modèles d'interaction	54
1.7.3.1.1. Influence de la structure des gommages	55
1.7.3.1.2. Du point de vue des interactions moléculaires ?	56

1.7.3.1.3. Cas particulier X/GM avec X déacétylé	58
Conclusion du Chapitre I	60
Références bibliographiques	61
Chapitre II : Matériels et Méthodes	67
2. La gomme de xanthane	68
2.1. Les gommages de galactomannane	68
2.2. Préparation des solutions et des mélanges	68
2.2.1. Préparation de la solution de tampon phosphate saline	68
2.2.2. Préparation de la solution mère de xanthane	68
2.2.2.1. Siccité de la solution mère de xanthane	69
2.2.3. Préparation des solutions mères de galactomannane	70
2.2.3.1. Etape de purification	70
2.2.3.2. Siccité des solutions mères de galactomannane	71
2.2.4. Préparation des mélanges X/GM	72
2.3. Caractéristiques des gommages	72
2.3.1. Dosage de protéines	72
2.3.2. Détermination des masses moléculaires	72
2.3.2.1. Calcul de M_v pour X	73
2.3.2.2. Calcul de M_v pour GdC1	73
2.3.3. Gomme de xanthane	74
2.3.3.1. Principe de la résonance magnétique nucléaire du proton	74
2.3.3.2. Calcul des fonctions acétate et pyruvate	75
2.3.3.3. Détermination de la température de transition conformationnelle	76
2.3.3.4. Principe de la polarimétrie	76
2.3.3.5. Mesure de T_m par rhéologie	78
2.3.3.6. Conclusion	79
2.3.4. Gomme de galactomannane	79
2.3.4.1. Détermination des ratios M/G et des DB	79
2.3.5. Récapitulatif des caractéristiques des gommages étudiées	80
2.4. Caractérisation des interactions à l'échelle microscopique	81

2.4.1. Principe de la fluorescence	81
2.4.1.1. Interactions dipôle-dipôle et hydrophobie du milieu	85
2.4.1.1.1. Préparation de la solution mère d'ANS	85
2.4.1.1.2. Dosage de la solution mère d'ANS	85
2.4.1.1.3. Conditions des analyses de fluorescence	86
2.4.1.1.4. Traitement des données brutes	86
2.4.1.2. Réseau de liaisons H (3HQ-Bf)	86
2.4.1.2.1. Synthèse de la sonde 3HQ-Bf	87
2.4.1.2.2. Dosage de la solution mère de 3HQ-Bf	87
2.4.1.2.3. Conditions des analyses de fluorescence	88
2.4.1.2.4. Traitement des données brutes	89
2.5. Caractérisation des systèmes X/GM à l'échelle macroscopique	89
2.5.1. Principe de la rhéologie	89
2.5.2. Analyses sur 50h (t_0 à 50h)	94
2.5.3. Analyses sur deux échelles de temps	94
2.5.3.1. Analyses aux temps courts (Fraction A $\Rightarrow t_0$ à 4h)	94
2.5.3.2. Analyses aux temps longs (Fraction B $\Rightarrow t > 47h$)	95
Références bibliographiques	96
 Chapitre III : Etude des mélanges xanthane/galactomannane à l'échelle macroscopique	 99
3. Préparation des solutions polysaccharidiques	100
3.1. Détermination de la siccité des solutions de polyélectrolytes	100
3.1.1. Introduction	100
3.1.2. Publication n°1	100
3.2. Solutions et mélanges de polysaccharides	109
3.2.1. Méthode d'agitation	109
3.2.2. Présence des sondes moléculaires dans les solutions polysaccharidiques	110
3.3. Etude de l'évolution des propriétés rhéologiques des mélanges X/GM à l'échelle macroscopique	110
3.3.1. Choix de la technique d'analyse	110
3.3.2. Etude de la cinétique de structuration des mélanges X/GM	111

3.3.2.1. Introduction	111
3.3.2.2. Publication n°2	111
Conclusion du Chapitre III	125
Références bibliographiques	126
Chapitre IV : Caractérisation des interactions en solution à l'échelle moléculaire	127
4. Développement de la méthodologie pour la caractérisation des interactions moléculaires en solution	128
4.1. Sélection de la technique de caractérisation	128
4.2. Sélection des sondes moléculaires	128
4.2.1. Choix de la sonde spécifique à la polarité et l'hydrophobicité du milieu	129
4.2.2. Choix de la sonde spécifique aux liaisons hydrogène	130
4.2.3. Conclusion	131
4.3. Mise au point des analyses à l'échelle moléculaire	132
4.3.1. Polarité et micro-domaines hydrophobes	132
4.3.1.1. Test de résistance à la photodégradation	132
4.3.1.2. Optimisation des paramètres d'acquisition spectrale	133
4.3.2. Réseau de liaisons hydrogène	133
4.3.2.1. Test de résistance à la photodégradation	133
4.3.2.2. Equivalences des bandes 1N* et 2N*	134
4.3.2.3. Influence de la concentration des solutions de polymère	134
4.3.2.4. Optimisation des paramètres d'acquisition spectrale	136
4.4. Caractérisation des phénomènes interactions moléculaires par spectroscopie de la fluorescence dans les solutions et mélanges X/GM	137
4.4.1. Mise en place d'une méthodologie	137
4.4.1.1. Introduction	137
4.4.1.2. Publication n°3	137
4.5. Structuration des interactions moléculaires	159
4.5.1. Introduction	159
4.5.2. Publication n°4	160
Conclusion du Chapitre IV	175
Références bibliographiques	176

Annexes : Evolution des interactions moléculaires au sein du système X/GdC1 _____	177
Chapitre V : Discussion Générale _____	179
Références bibliographiques _____	188
Annexes : Index des formules utilisées pour la détermination de $V_{\text{Hydrophobe}}$ _____	189
Conclusion Générale et Perspectives _____	193

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribose Nucléique
AFM	Atomic Force Microscopy
ANS	Acide 8-anilino-1-naphthalène sulfonique
ATD	Analyse Thermique Différentielle
ATG	Analyse Thermogravimétrique
CPA	Acide cis-parinarique
DB	Degré de Block
DHR	Discovery Hybrid Rheometer
DO	Densité Optique
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DS _a	Degré de Substitution en acétate
DS _p	Degré de Substitution en pyruvate
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DRX	Diffraction des Rayons X
FTIR	Fourier Transform InfraRed
GC	Gaz Chromatography
GdC	Gomme de Caroube
GG	Gomme Guar ou Guar Gum
GM	Galactomannanes
HPAEC	High Performance Exchange Anionic Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IE	Intensité(s) d'Emission
LBG	Locust Bean Gum
Liaisons H	Liaisons hydrogène
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PECs	Polyélectrolytes
PMPA	Acide benzoïque 4,3-méthyl-5-oxo-2-pyrazolin-1-yl
PRODAN	6-propionyl-2-(N,N-diméthylamino)-naphthalène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
TSP	2,2,3,3-trimethylsilyl)propionate de sodium deutéré
X	Xanthane

Liste des symboles

α	Pouvoir rotatoire
$[\alpha]$	Pouvoir spécifique
C	Concentration
C^*	Concentration critique de recouvrement
C^{**}	Concentration d'enchevêtrement
$C[\eta]$	Paramètre de recouvrement
D	Debye
ΔG	Variation d'enthalpie libre
ΔH	Variation d'enthalpie
$\Delta k'$	Paramètre d'interaction
ΔS	Variation d'entropie
Φ_f	Rendement quantique de fluorescence
$[\eta]$	Viscosité intrinsèque
η_0	Viscosité du solvant
η_1	Viscosité au taux de cisaillement de $1s^{-1}$
η_{sp}	Viscosité spécifique
η_{red}	Viscosité réduite
χ	Electronégativité
Ka	Constante d'affinité ou d'association
λ	Longueur d'onde
M_n	Masse moléculaire moyenne en nombre
M_v	Masse moléculaire viscosimétrique
M_w	Masse moléculaire moyenne en masse
M/G	Mannose/Galactose
μ	Moment dipolaire
NaCl	Chlorure de sodium
PC	Polysaccharide Content
T	Température
T_m	Température de transition conformationnelle
U_{vdw}	Energie totale de van der Waals

Table des Figures

Figure I.1: Représentation des interactions de Keesom _____	29
Figure I.2: Représentation des interactions de Debye _____	30
Figure I.3: Schéma de la réorganisation des molécules d'eau (les atomes d'hydrogène sont de couleur blanche et les atomes d'oxygène sont de couleur bleue) autour d'une cavité hydrophobe ^[6] _____	32
Figure I.4: Exemples de schémas de liaison H a) dans un polysaccharide; b) dans une protéine _____	34
Figure I.5 : a) Principes de fonctionnement d'un microcalorimètre b) Acquisition et _____	36
Figure I.6: Régimes de concentration a) dilué b) début du recouvrement des chaînes c) semi-dilué et d) concentré d'après Fontanille et Gnanou ^[1] _____	38
Figure I.7: Concentration critique de recouvrement C^* pour des solutions de Polyoxyde d'éthylène (PEO), Carboxyméthylcellulose (CMC) et de Cellulose polyanionique; représentations a) de η_{sp} en fonction du paramètre de recouvrement b) de η_1 en fonction de la concentration en polymère d'après Benchabane ^[52] _____	39
Figure I.8: Structure chimique générique d'une macromolécule de xanthane _____	40
Figure I.9: Macromolécule de xanthane a) vue de profil de l'hélice et b) vue selon l'axe de l'hélice ^[104] _____	43
Figure I.10: Modèle proposé d'après Tako ^[107] de la structure quaternaire du xanthane incluant les associations intra et intermoléculaires (lignes en gras) en solution _____	45
Figure I.11 : Schématisation simplifiée des liaisons hydrogène (lignes discontinues) dans une unité de répétition d'une macromolécule de xanthane [A et B = unités de β (1→4)-D-glucopyranose; C = unité de α (1→3)-D-mannopyranose ; D = unité de β (1→2)-glucuronique et E = unité de β (1→4)-D-mannopyranose] d'après les hypothèses de Millane et Wang 1990 ^[108] et Chandrasekaran et Radha 1997 ^[109] (flèches rouges) et proposition d'interprétation de l'hypothèse de Tako et al., 1984 ^[107] (Figure I.10; flèches vertes) _____	45
Figure I.12: Structure chimique générique d'un galactomannane _____	48
Figure I.13: Les différents types de distribution des unités galactose a) aléatoire b) régulier et c) par bloc _____	51
Figure I.14: Structure d'un gel de galactomannane proposé par Dea et collaborateurs ^[57] _____	51
Figure I.15: Schématisation simplifiée des liaisons hydrogène (lignes discontinues) dans trois unités de répétition d'une macromolécule de guaran [M/G = 1,67 ; M = unités de β (1→4)-D-mannopyranose et G = unités de α (1→6)-D-galactopyranose] ; Liaisons hydrogènes intrachaine, interchaîne et ponts aqueux ; d'après les travaux de Chandrasekaran et coéquipiers ^[147] _____	52
Figure I.16: Module de stockage G' en fonction du ratio xanthane/galactomannane des systèmes suivants (□) Xanthane/Guar à 25°C (○) Xanthane/Caroube à 10°C (■) Xanthane/Caroube à 40°C (◇) Xanthane/Caroube à 60°C et (△) Xanthane/Caroube à 80°C d'après Fernandes ^[149] _____	54

Figure I.17: Modèles d'interaction entre Xanthane et Galactomannanes a) proposés par Dea et Morris ^[57] b) proposé par McCleary ^[137] et c) proposé par Cairns ^[60]	55
Figure I.18 : Représentation schématique du quatrième modèle d'interaction entre le xanthane et le guaran d'après Chandrasekaran et Radha ^[109]	57
Figure I.19: Modèle "Clef-Serrure" proposé par Tako ^[58] entre le galactomannane (GM) et le a) xanthane (X) non modifié b) Xanthane (X') déacétylé	58
Figure II.20: a) Représentation de la perte de masse en fonction du temps (courbe modèle) b) Protocole expérimentale	69
Figure II.21: a) Tube de centrifugation contenant une solution de GdC1 (fin du 1 ^{er} cycle) b) Exemples de culots issus d'une solution de GdC1 aux quatre stades de centrifugation	71
Figure II.22: Schéma de la polarisation de la lumière blanche	76
Figure II.23: Schéma (de gauche à droite) très simplifié d'expérience de polarimétrie sur une solution de xanthane; α est l'angle de rotation observé	77
Figure II.24: Exemple de graphique du pouvoir rotatoire en fonction de la température et de sa dérivée en fonction de la température pour une solution de xanthane (X)	77
Figure II.25: Exemple de rhéogramme représentant le module G'' en fonction de la température	78
Figure II.26: Diagramme de Perrin-Jablonski ^[15] et temps caractéristiques des différents phénomènes liés à l'absorption d'un photon	82
Figure II.27: Schéma très simplifié d'une expérience de spectroscopie optique (fluorescence par exemple) avec I_0 l'intensité du rayonnement incident, I l'intensité du rayonnement transmis et I_A l'intensité du rayonnement absorbé	83
Figure II.28: Sonde moléculaire d'acide 8-anilino-1-naphthalène sulfonique (ANS)	85
Figure II.29: Spectre UV-Visible de la sonde ANS	85
Figure II.30: Sonde moléculaire 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf)	86
Figure II.31: Schéma de la synthèse de la 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone ^[18]	87
Figure II.32: Spectre UV-Visible de la sonde 3HQ-Bf	88
Figure II.33: Schéma d'expérience de cisaillement d'un matériau solide avec h la hauteur, S la surface, \vec{F} la force appliquée pour effectuer le cisaillement et x le déplacement ; $t=t_0+\Delta t$.	90
Figure II.34: Schéma de la contrainte τ représentée en fonction de la déformation γ pour un solide idéal	90
Figure II.35: Schéma d'expérience de cisaillement d'un matériau liquide avec h la hauteur, \vec{F} la force appliquée pour effectuer le cisaillement et \vec{v} la vitesse.	91
Figure II.36: Schéma de la contrainte τ représentée en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ pour un liquide idéal	91
Figure II.37: Schéma d'un essai dynamique; suivi de la déformation γ en fonction du temps t	92
Figure II.38: Exemples de balayage en déformation des systèmes X/GdC1 100/0 (■; □), 50/50 (▲; △) et 70/30 (●; ○)	93

Figure II.39: Schéma d'une géométrie type Cône/Plan	94
Figure II.40: Schéma d'une géométrie cylindres concentriques ou couette	95
Figure III.41: (a) Scheme of the protocol of the TGA and (b) Scheme of a classical thermogram of a buffered xanthan solution	103
Figure III.42: Thermogram of a buffered saline XG solution representing the mass loss (% , solid black line) and the DTG curve (%/min, light red line).The vertical black dotted lines stand for the different mass loss phase delimitations. Water loss was intentionally hidden to improve the observation of polysaccharide degradation steps.	105
Figure III.43: a) Chemical structure of xanthan gum and b) Generic chemical structure of galactomannan gum	113
Figure III.44 : a) Evolution of the storage modulus G' over time for X-LBG1 (Δ) 20-80, (\times) 30-70, (\diamond) 40-60, ($+$) 50-50 and (∇) 70-30 mixtures b) Values of the storage modulus G' of X-LBG1 system once stabilized and (--) is a fit curve (OriginPro8; Fit GaussAmp)	116
Figure III.45: Logarithm of the storage modulus $\text{Log}(G')$ represented as a function of logarithm of time $\text{Log}(t)$ of X-LBG1 (\times) 30-70, (\blacksquare) 35-65, (\diamond) 40-60, (\circ) 45-55 and ($+$) 50-50 mixture ratios	117
Figure III.46: Logarithm of the storage modulus $\text{Log}(G')$ represented as a function of logarithm of time $\text{Log}(t)$ of ($+$) X-LBG1, (\blacksquare)X-LBG2, (\circ)X-GG1 and (Δ) X-GG2 mixtures at a 50-50 ratio (w/w)(Fraction A)	118
Figure III.47: Valeurs du module de stockage en fonction de la composition du mélange X/GdC1 (Fraction B)	124
Figure IV.48: Structure chimie de la sonde ANS	129
Figure IV.49: a) Structure chimique de la sonde 3HQ-Bf b) Les trois états d'excitation de la sonde 3HQ-Bf proposés par Bilokin ^[12]	130
Figure IV.50: Exemple de spectre d'émission de fluorescence de la sonde 3HQ-Bf dans la solution de tampon phosphate saline	130
Figure IV.51: Spectres de la sonde ANS issus du test de résistance au photoblanchiment de la sonde ANS a) courbes brutes b) courbes modélisées	132
Figure IV.52: Spectres de la sonde 3HQ-Bf issus du test de photoblanchiment	134
Figure IV.53: Spectre de fluorescence (mode scan) de la sonde 3HQ-Bf dans des mélanges X/GdC1 50/50 à 0,1%, 0,2% et 1% (m/m)	135
Figure IV.54: Structure chimique de la sonde 3HQT	135
Figure IV.55: Spectre d'émission de 3HQ-Bf dans un mélange X/GdC1 a) (40/60) ; b); et c) à t=0 (en bleu) et à t = 24h (en vert)	136
Figure IV.56: Chemical structures of a) 8-anilino-1-naphtalensulfonic acid (ANS) and b) 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf)	142
Figure IV.57: Photobleaching resistance tests of a) ANS probe and b) 3HQ-Bf probe in phosphate buffer (pH 7.4)	144

Figure IV.58: ANS spectrum a) in Water/Acetone mixtures as a function of %Acetone (v/v) b) in different organic solvents	145
Figure IV.59: a) Wavelength at EI_{max} with the background band representing the spectral resolution (5 nm) and b) Hydrophobic micro-domains intensity values at equilibrium state as a function of X proportion in X/LBG mixtures at a total polymer concentration of 0.2% (w/w)	147
Figure IV.60: 3HQ-Bf in X/LBG mixtures at (■) 0.1%; (○) 0.2% and (△) 1% (w/w)	148
Figure IV.61: Examples of 3HQ-Bf signals at (-) $t=0$ and (--) $t>24h$ in a) LBG solution b) X/LBG 60/40 mixture at 0.2% (w/w)	149
Figure IV.62: Hydrogen bond network index EI_{1N^*}/EI_{T^*} at equilibrium state	150
Figure IV.63: a) Chemical structure of 8-anilino-1-naphthalensulfonic acid (ANS) and b) Chemical structure of 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf)	164
Figure IV.64: a) Examples of EI_{ANS} evolution over time and b) Representation of $\text{Log}(EI_{ANS})$ as a function of $\text{Log}(\text{time})$ between $t=0,08h$ $t=30min$ $0.5h$ and trend lines for X/LBG1 (--)30/70, (..)80/20 and (-.-) 100/0 ratios	165
Figure IV.65: a) Examples of EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio evolution over time and b) Representation of $\text{Log}(EI_{1N^*}/EI_{T^*})$ as a function of $\text{Log}(\text{time})$ between $t=0,08h$ and $t=0.5h$ and trend lines for X/LBG1 (--)0/100, (..)40/60 and (-.-) 50/50 ratios	167
Figure V.66 : Exemples de structurations à l'échelle globale (G' ; +) et locale a) microdomaines hydrophobes (*) b) réseau de liaisons hydrogène (x) pour le mélange X/GdC1 50/50	180
Figure V.67 : Exemples de structurations à l'échelle globale (G') et locale a) microdomaines hydrophobes b) réseau de liaisons hydrogène pour le mélange X/GdC1 30/70 (-;x), 40/60 (--;-), 60/40 (..;) et 70/30 (-.;◆)	180
Figure V.68 : Propriétés viscoélastiques (G' ; +) a) interactions hydrophobes (*) et b) liaisons hydrogène (x) en fonction de la composition du mélange X/GdC1	182
Figure V.69: Schéma du volume de la sonde ANS	183
Figure V.70 : Triangle quelconque ABC	189
Figure V.71 : Tétraèdre irrégulier possédant 6 arrêtes de longueur a, b, c, d, e et f	190

Table des Tableaux

Tableau I.1: Contributions relatives (%) des trois termes de l'interaction attractive de van der Waals calculées pour une mole de paires de molécules (T = 298°K) ; données issues du livre d'Alain Gerschel 1995 ^[2]	31
Tableau I.2: Valeurs des degrés de substitution des groupements acétate et pyruvate	41
Tableau I.3: valeurs de températures de transition conformationnelle du xanthane	43
Tableau I.4: Valeurs de viscosités intrinsèques $[\eta]$ et la constante de Huggins k_H	47
Tableau I.5: Valeurs des ratios Mannose/Galactose et des degrés de bloc	50
Tableau I.6: Valeurs de viscosités intrinsèques $[\eta]$ et de la constante de Huggins k_H	53
Tableau II.7: Echantillons de galactomannane	68
Tableau II.8: Nombre de cycles par échantillon de galactomannane	71
Tableau II.9: Taux de protéine des différentes gommages	72
Tableau II.10: Valeurs expérimentales des ratios M/G et des DB des galactomannanes	80
Tableau II.11: Tableau récapitulatif des caractéristiques des polysaccharides utilisés	80
Tableau II.12: Longueurs d'onde d'irradiation (3HQ-Bf) des mélanges X/GM pour l'étude des liaisons hydrogène	89
Tableau III.13: Comparaison des valeurs des modules de stockage (G') d'un mélange X/GdC1 80/20 sans (Témoin) et contenant la sonde ANS	110
Tableau IV.14: Valeurs moyennes des longueurs d'onde aux maxima d'intensité d'émission ($\bar{\lambda}_{IE\max}$) en fonction du temps d'analyse	158
Tableau IV.15: Caractéristiques de GG2	158
Tableau IV.16: Valeurs des grandeurs viscoélastiques et données spectroscopiques des mélanges X/GdC2 et X/GG2	159
Table III.1: $PC_{\text{experimental}}$ values of five XG stock solutions#	106
Table III.2: Slope for the variation of $\log(G')$ versus $\log(t)$ X-LBG1 mixture ratios at short times (first 30 minutes)	117
Table III.3: Kinetic values of structuration for X-GM 50-50 mixtures at short times (first 30 minutes Fraction A) and G' values (after 48h Fraction B)	118
Table IV.4: Gum main characteristics	141
Table IV.5: Example of raw IE of the $1N^*$ and T^* spectral bands for X/LBG 60/40 at t=24h (extracted data of one on the three repeated experiences)	144
Table IV.6: Storage modulus (G'), loss modulus (G''), loss tangent ($\tan\delta$) and spectroscopic data values of X/GM samples	152
Table IV.7: Characteristics of the galactomannan samples	163
Table IV.8: Trend line slopes of X/LBG1 composition mixtures for hydrophobic micro-domains	166
Table IV.9: trend line Slopes of X/LBG1 composition mixtures for hydrogen bond network	167

Table IV.10: Trend line slopes of X/GM composition mixtures for hydrophobic micro-domains and the H-bond network _____170

Introduction Générale

Les interactions moléculaires sont omniprésentes et s'expriment dans tous les états de la matière. Dans le domaine de la physico-chimie des polymères, de nombreux travaux s'intéressent à l'étude des interactions moléculaires dite « faibles » dans la matière molle. Ces interactions non-covalentes et de faible énergie comparées aux liaisons covalentes, sont pour la plupart d'entre elles réversibles ; c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se créer et de se défaire à volonté. Cette spécificité peut conférer à certains matériaux des propriétés physico-chimiques particulières comme par exemple, la réversibilité après déstructuration ou encore la régénération pour les matériaux auto-réparant. L'étude des interactions faibles a donné naissance dans les années 1990 au domaine de la chimie supramoléculaire. De nouveaux outils d'analyse de très haute technologie permettent de nos jours de les caractériser de manière plus approfondie et ce tout en abaissant l'échelle d'observation jusqu'à atteindre pour les plus performantes d'entre elles le niveau moléculaire. Néanmoins certains verrous techniques subsistent, pour lesquels il apparaît nécessaire de développer de nouvelles approches afin de pouvoir mieux caractériser les interactions moléculaires. La très grande majorité des approches analytiques disponibles pour appréhender les interactions à l'échelle moléculaire nécessite pour être mises en œuvre la plupart du temps de perturber l'état du système étudié; parmi les conséquences, cette perturbation peut inhiber, masquer ou renforcer, biaiser voire fausser tout ou partie des informations recherchées. On peut citer comme exemples de perturbations: étape de lyophilisation de l'échantillon, utilisation d'un agent chaotropique pour détecter des liaisons hydrogène, etc. En outre, une perturbation peut avoir des conséquences d'autant plus marquées que les systèmes étudiés présentent de faibles interactions, tels par exemple les polymères en solution, notamment dans le cas de systèmes dilués ou peu concentrés.

C'est ce constat qui constitue la motivation première de notre travail, qui vise à proposer une approche analytique originale pour caractériser les interactions moléculaires existant entre polymères en solution aqueuse et ce au niveau moléculaire, le tout sans perturber le système étudié. Ces travaux de thèse se sont articulés selon deux axes principaux; le développement d'une méthodologie pour la caractérisation des interactions moléculaires d'une part, et l'application de la méthodologie à des solutions et mélanges xanthane/galactomannane (X/GM) d'autre part. L'ambition de ce travail est de proposer une méthode universelle permettant d'appréhender les interactions en solution pour tous types de systèmes, notamment à base de polymères. Ce travail méthodologique constitue à lui seul une démarche inédite. Le choix des polymères pour ce travail, X et GM, repose sur l'existence bien connue d'une synergie d'interaction dans des conditions spécifiques (température, ratio de mélange, etc.) entre ces deux polymères naturels, tout en sachant qu'étonnamment les mécanismes d'interaction responsables de cette synergie demeurent toujours sujets à discussion. Ainsi, outre son caractère innovant pour l'étude générale des interactions moléculaires en solution, une des

applications immédiates de cet outil sera d'apporter des réponses nouvelles concernant les mécanismes d'interaction / association responsables des propriétés de synergie entre gommés de xanthane et de galactomannanes.

Ce manuscrit contient cinq chapitres qui s'appuient sur des publications soumises à des journaux à comités de lecture, ou qui le seront prochainement.

Le premier chapitre décrit l'état de l'art concernant les principales interactions moléculaires rencontrées dans les systèmes polymères et leur caractérisation physico-chimique ainsi que les travaux antérieurs concernant l'association du xanthane avec les galactomannanes.

Le Chapitre II décrit l'ensemble des matériels et méthodes utilisés tout au long de ce travail, ainsi que les protocoles et procédés mis en place au préalable afin d'obtenir des résultats fiables.

Dans le Chapitre III sont exposés les résultats issus de la caractérisation au niveau macroscopique (synergie d'interaction, cinétique de gélation) des systèmes xanthane/galactomannane.

La méthodologie de caractérisation des interactions moléculaires et l'application de cette dernière aux mélanges xanthane/galactomannane est évoquée dans le Chapitre IV.

Le Chapitre V est une discussion générale reprenant l'ensemble des résultats principaux obtenus au cours de ces travaux de thèse.

Finalement, le manuscrit s'achève par une conclusion générale ainsi que par les perspectives qui en découlent.

Chapitre I : Etat de l'art des connaissances sur les interactions moléculaires dans les systèmes polymères

1. Principales interactions moléculaires dans les solutions de polymères	28
1.1. Interactions dipôle-dipôle	28
1.1.1. Descriptions	28
1.1.1.1. Forces de Keesom	29
1.1.1.2. Forces de Debye	29
1.1.1.3. Force de London	30
1.1.2. Mise en évidence	31
1.2. Cas des micro-domaines hydrophobes	32
1.2.1. Description	32
1.2.2. Caractérisation	33
1.3. Les liaisons hydrogène	33
1.3.1. Description	33
1.3.2. Caractérisation	34
1.4. Interactions coulombiennes	35
1.4.1. Description	35
1.4.2. Mise en évidences	35
1.5. Quantification relative des interactions moléculaires en solution	36
1.5.1. Simulations numériques	36
1.5.2. Analyse micro-calorique	36
1.6. Concentration des solutions de polymère	37
1.6.1. Régimes de concentration des solutions de polymère	37
1.6.2. Détermination de la concentration critique de recouvrement C^*	38
1.6.3. Conclusion	39
1.7. Cas particulier des synergies d'interactions des mélanges xanthane/galactomannane	39
1.7.1. La gomme de xanthane	40
1.7.1.1. Sources, production et intérêts industriels	40
1.7.1.2. Structure chimique	40
1.7.1.3. Conformation en solution aqueuse	41
1.7.1.4. Température de transition conformationnelle T_m	41
1.7.1.5. Paramètres influençant T_m	44
1.7.1.5.1. La force ionique	44
1.7.1.5.2. Influence de la concentration et du pH	44
1.7.1.5.3. Groupements acétate et pyruvate	44
1.7.1.6. Rhéologie en solution aqueuse	46
1.7.1.6.1. A force ionique nulle	46
1.7.1.6.2. En présence de sels	46
1.7.1.6.3. Anisotropie des solutions de xanthane	46
1.7.1.7. Approche viscosimétrique	47
1.7.1.7.1. Viscosité intrinsèque	47
1.7.2. Les galactomannanes	48
1.7.2.1. Sources, production et intérêts industriels	48
1.7.2.2. Structure chimique	48
1.7.2.2.1. Ratio mannose/galactose	49
1.7.2.2.2. Distribution des unités de galactose	49
1.7.2.3. Propriétés des solutions de galactomannane	51
1.7.2.3.1. Approche viscosimétrique	53
1.7.2.3.1.1. Viscosité intrinsèque	53
1.7.3. Cas des mélanges xanthane/galactomannane	54
1.7.3.1. Modèles d'interaction	54
1.7.3.1.1. Influence de la structure des gommes	55
1.7.3.1.2. Du point de vue des interactions moléculaires ?	56
1.7.3.1.3. Cas particulier X/GM avec X déacétylé	58
Conclusion du Chapitre I	60
Références bibliographiques	61

Les interactions de toutes natures peuvent se manifester sous différentes formes et aux différentes échelles de l'univers comme par exemple l'interaction forte (échelle atomique); l'interaction gravitationnelle (échelle astronomique); etc. Les interactions moléculaires quant à elles interviennent à l'échelle microscopique et sont pour la plupart responsables de la cohésion de la matière et parfois même indispensables à certains phénomènes biologiques ou non comme les interactions enzyme/substrat; entre les chaînes d'acide désoxyribose nucléique (ADN) ou encore entre la β -cyclodextrine et l'adamantane. Le domaine de la chimie qui s'intéresse à l'étude des interactions moléculaires non-covalente est celui de la chimie supramoléculaire. Cette chimie fut en grande partie étudiée par Jean-Marie Lehn qui obtint avec Donald James Cram et Charles John Pedersen, le prix Nobel de Chimie en 1987 pour leur travaux dans ce domaine particulier de la chimie. Les interactions inter et intramoléculaires conduisent à une certaine organisation des systèmes moléculaires. Elles ne modifient pas la nature des espèces moléculaires mais dépendent de la structure chimique des espèces dans lesquelles elles interviennent et ont une influence sur le comportement des macromolécules en solution. Par exemple, les gels physiques peuvent se structurer et se déstructurer un nombre illimité de fois car les interactions moléculaires peuvent se rompre et se reformer grâce à leur caractère non-covalent. Un autre exemple où ces différents types d'interaction sont très présents est celui des complexes hôtes-invités. Les « liaisons » intermoléculaires les plus connues sont les interactions dipôle-dipôle (présentes dans tous les systèmes moléculaires), les liaisons hydrogène (Liaisons H) dans les systèmes protiques et les interactions coulombiennes dans les systèmes chargés. Les énergies des interactions moléculaires impliquées sont généralement faibles; néanmoins, elles ont des valeurs supérieures à l'énergie liée à l'agitation thermique (« kT », mouvement brownien).

1.Principales interactions moléculaires dans les solutions de polymères

1.1.Interactions dipôle-dipôle

1.1.1.Descriptions

Les interactions dipôle-dipôle sont les résultantes des forces de van der Waals qui sont des forces d'attraction intra et intermoléculaires s'exerçant entre dipôles.

En chimie, la polarité est définie par la répartition des charges partielles positives et négatives dans un dipôle. Un dipôle est la conséquence d'une répartition non symétrique dans l'espace ^{et}/ou dans le temps des charges positives et négatives dans une entité chimique (molécule, groupement fonctionnel, liaison). Cette répartition asymétrique des charges s'explique par la différence d'électronégativité des atomes qui constituent l'entité chimique. Une liaison chimique est d'autant plus polaire que la différence d'électronégativité est grande entre les atomes constituant la molécule ou participant à la liaison chimique. Le nuage électronique sera plus dense du côté de l'atome le plus électronégatif.

Un dipôle électrostatique est défini par son moment dipolaire qui est généralement noté μ et s'exprime en Debye. Les différences de polarité qu'il peut y avoir au sein de liaisons chimiques

peuvent contribuer à l'apparition de forces d'attraction ou de répulsion et à la création d'interaction non-covalentes ; il est parlé alors d'interactions intermoléculaires (entre macromolécules) ou intramoléculaires (au sein d'une même macromolécule). Les interactions de Van der Waals se définissent à partir des variations des moments dipolaires en fonction de l'environnement proche du soluté. Ces forces impliquant des moments dipolaires peuvent naturellement s'orienter afin que les pôles (charges partielles δ^- et δ^+) coïncident (de l'ordre de l'Ångström). Les interactions totales de van der Waals se composent de trois termes : les forces de Keesom, de Debye et de London.

1.1.1.1. Forces de Keesom

Les forces de Keesom correspondent à l'attraction mutuelle de deux dipôles permanents. L'énergie d'interaction ε_K est donnée par la relation suivante^[1] :

$$\varepsilon_k = -\frac{2\mu^4}{3RT} \times r^{-6} \quad \text{Equation I.1}$$

μ est le moment dipolaire du groupement polarisé, r la distance inter-dipolaire, R la constante des gaz parfait et T la température absolue. Ces interactions sont notamment présentes dans les polymères ayant des groupements polaires tels que les esters cellulosiques.

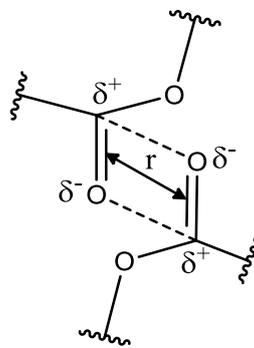


Figure I.1: Représentation des interactions de Keesom

δ^- et δ^+ représentent les charges partielles.

1.1.1.2. Forces de Debye

Les forces de Debye (ou forces de d'induction) correspondent à l'attraction mutuelle d'un dipôle permanent avec un dipôle induit sur un groupement moléculaire polarisable voisin. Un dipôle non nul peut être créé ponctuellement dans une molécule à l'approche d'un dipôle permanent. La polarisabilité est la capacité d'un atome (ou un groupe d'atomes) à déformer son nuage électronique sous influence d'un dipôle à proximité. Les forces de Debye sont définies par la relation suivante^[1]:

$$\varepsilon_D = -2\alpha\mu^4 r^{-6}$$

Equation I.2

α est la polarisabilité du groupement moléculaire polarisable.

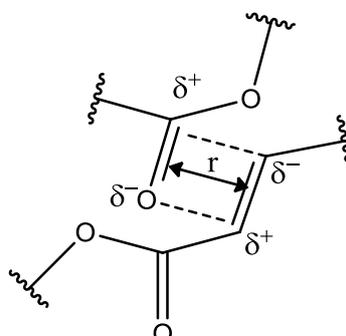


Figure I.2: Représentation des interactions de Debye

1.1.1.3. Force de London

Les forces de London (ou forces de dispersion) sont la conséquence d'une dissymétrie de la configuration électronique instantanée des atomes. L'énergie développée entre deux dipôles instantanés est donnée par la relation suivante^[1]:

$$\varepsilon_L = -\frac{3}{2} \left[\frac{\alpha_1 \alpha_2 I_1 I_2}{(I_1 + I_2)} \right] r^{-6}$$

Equation I.3

α_1 et α_2 correspondent aux polarisabilités des groupements interactifs, I_1 et I_2 les énergies d'ionisation correspondantes. Ces forces sont plus énergétiques que les celles de Keesom ou celles de Debye ($0,5$ à 30 kJ.mol^{-1})^[1] interviennent dans tous les composés, notamment dans ceux qui ne possèdent pas de groupements polaires.

Des exemples de valeurs d'énergie des interactions de van der Waals sont indiquées dans le **Tableau I.1.**

Tableau I.1: Contributions relatives (%) des trois termes de l'interaction attractive de van der Waals calculées pour une mole de paires de molécules (T = 298°K) ; données issues du livre d'Alain Gerschel 1995^[2]

Molécules	μ^a (D)	% Keesom	% Debye	% London	U_{vdw}^b (kJ.mol ⁻¹)
Ne	0	0	0	100	0,27
Ar	0	0	0	100	0,55
Xe	0	0	0	100	0,94
CO	0,11	0,0006	0,0003	99,99	0,64
CH ₄	0	0	0	100	1,49
HCl	1,08	9	5	86	3,42
HBr	0,78	2	2	96	3,79
HI	0,38	0,1	0,5	99,4	4,06
CH ₃ Cl	1,87	24	8	68	3,96
NH ₃	1,47	34	9	57	6,22
H ₂ O	1,85	69	7	24	17,35

^a μ : Moment dipolaire μ en Debye (D)

^b U_{vdw} : Energie totale des interactions de van der Waals

En regardant les valeurs dans le **Tableau I.1**, les interactions de London (dipôle induit-dipôle induit) sont largement majoritaires dans les molécules citées en exemple. En se focalisant sur les halogénures d'hydrogène (HCl, HBr et HI), nous pouvons conclure que l'électronégativité (χ) a directement une influence sur la part des interactions de London étant donné que $\chi(\text{Cl}) > \chi(\text{Br}) > \chi(\text{I})$. Il ne faut pas également oublier le cas de la molécule d'eau (H₂O) qui se distingue des autres par la part majoritaire (69%) des interactions de Keesom (dipôle-dipôle). De plus, nous pouvons voir que l'eau possède une valeur de son moment dipolaire la plus élevée : $\mu_{\text{eau}} = 1,85$ D ; d'après l'expression des forces de Keesom, il est logique d'observer l'énergie totale des interactions de van der Waals la plus élevée. Il y a aussi deux autres cas : chlorure de méthyle (CH₃Cl) et ammoniac (NH₃) où les interactions de Keesom représentent une part relativement importante ; respectivement 24% et 34%. Un deuxième critère tel que la géométrie des molécules doit être pris en compte pour expliquer ces différences. En effet, d'après la théorie des groupes et des règles de symétrie moléculaire, H₂O appartient au groupe C_{2v}, CH₃Cl et NH₃ appartiennent toutes les deux au groupe C_{3v}. Le fait d'appartenir à des groupes de symétrie différents peut expliquer les valeurs différentes observées ainsi que les propriétés propres de chaque molécule. CH₃Cl et NH₃ appartenant au même groupe de symétrie justifierait le fait que l'on observe des valeurs similaires concernant la part de chaque interaction de van der Waals dans l'énergie globale (U_{vdw}) pour ces deux molécules.

1.1.2. Mise en évidence

Grâce à la technique de microscopie à force atomique (AFM) et en utilisant une sonde colloïdale (pointe AFM sphérique), ces forces furent mesurées par Notley et son équipe^[3] entre des surfaces celluloseuses, une surface plane et des sphères couvrant la pointe AFM, en solution saline (1 mM

NaCl ; pH 3,5) tout en éloignant les surfaces l'une de l'autre. Dans ce cas précis, l'énergie d'interaction est définie par :

$$E_{vdw} = \frac{-A}{6D^2} \quad \text{Equation I.4}$$

Avec D le rayon de la sphère cellulosique et A la constante de Hamaker. La constante de Hamaker développée par Hugo Christiaan Hamaker^[4] dans le cadre d'une étude portant sur les interactions corps-corps entre particules. Après avoir déterminé la constante de Hamaker ($A=3,5.10^{-21}$ Joules soit $2,2.10^{-2}$ eV), les auteurs ont démontré grâce à un graphique représentant la force normalisée par rapport à la surface de la sphère cellulosique en fonction de la distance relative entre les deux surfaces que les forces de van der Waals sont essentiellement des forces attractives dont les valeurs évoluent de manière décroissante avec l'augmentation de la distance de séparation ; de $\sim 0,013$ à ~ 0 mN.m⁻¹ de 0 à 50 nm.

1.2.Cas des micro-domaines hydrophobes

1.2.1.Description

Ces phénomènes interactionnels sont la conséquence directe de l'existence des forces de van der Waals et sont d'origine entropique^[5-9]. Elles sont exclusivement liées aux phénomènes de solvation ou non de groupements apolaires dans des solvants plutôt polaires et protiques comme l'eau ou le chloroforme par exemple. Lorsqu'un soluté apolaire est dans l'eau, il s'opère une réorganisation des molécules d'eau autour des groupements apolaires ce qui amène à la création de micro-domaines hydrophobes (**Figure I.3**).

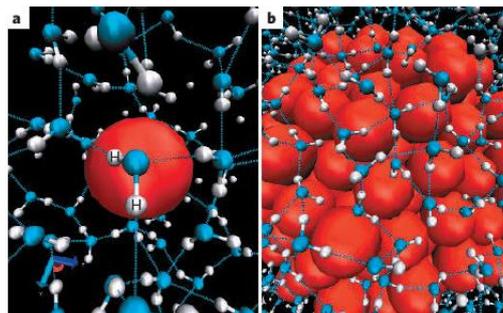


Figure I.3: Schéma de la réorganisation des molécules d'eau (les atomes d'hydrogène sont de couleur blanche et les atomes d'oxygène sont de couleur bleue) autour d'une cavité hydrophobe ^[6]

Le réseau initial de liaisons H formé par les molécules d'eau se remodèle en formant des structures locales type cage (enveloppe d'hydratation) enveloppant les groupements apolaires hydrophobes. L'orientation des molécules d'eau impliquées dans ces enveloppes est restreinte ce qui implique une variation d'entropie ΔS négative. Les micro-domaines hydrophobes peuvent également se regrouper ; en effet, lorsque deux domaines hydrophobes se rencontrent, il y a formation d'une seule cage

d'hydratation ce qui implique une plus petite surface exposée donc un nombre de molécules d'eau ordonnées inférieur à celui impliquant la formation de deux cages d'hydratation. Lorsque des sections hydrophobes se rapprochent entre elles, cela a pour effet de diminuer les distances entre ces dernières et par conséquent favoriser les interactions de van der Waals. Par abus de langage, la formation de domaines hydrophobes sont peuvent également appelés « interactions hydrophobes » dans la littérature.

En solution aqueuse et en fonction de leur concentration en solution et de la température, les molécules ou les macromolécules amphiphiles telles que les tensio-actifs ou des copolymères à bloc s'auto-assemblent. Ces composés amphiphiles ont la propriété de former des micelles au cœur hydrophobe et à l'écorce hydrophile (⇒ micelle normale) ou des structures encore plus complexes comme des phases lamellaires, hexagonales ou cubique^[10,11].

1.2.2.Caractérisation

Kato et Nakai^[12] quant à eux comme Alizadeh et son équipe^[13] ont utilisé la spectroscopie de fluorescence afin de caractériser l'hydrophobicité des protéines en utilisant des sondes moléculaires sensibles aux micro-domaines hydrophobes. En effet, dans leur étude, ils utilisent respectivement l'acide cis-parinarique (CPA) ou le 6-propionyl-2-(N,N-diméthylamino)-naphtalène (PRODAN) et l'acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique (ANS) dont l'extinction de fluorescence est directement provoquée par la présence de molécule d'eau.

Les différentes phases sous lesquelles s'auto-assemblent les molécules amphiphiles en solution aqueuse peuvent également être identifier par cryo-microscopie à transmission^[14,15]. Dans le domaine de la nanolithographie pour des applications dans la microélectronique, il d'usage de s'intéresser à l'auto-assemblage de copolymère à bloc amphiphiles, où des domaines hydrophobes (créé à partir des blocs hydrophobes du copolymère) peuvent clairement être identifiés et localisés à l'aide de clichés issus de l'AFM^[16] en distinguant les zones contrastées (zones lumineuses et zones sombres).

1.3.Les liaisons hydrogène

1.3.1.Description

Les liaisons hydrogène (liaisons H) sont différentes des interactions de van der Waals car elles sont plus énergétiques (5 à 40 kJ.mol⁻¹ en fonction de la longueur et de l'angle de la liaison)^[1,9,17]. La forte polarité des liaisons mises en jeu et la petite taille de l'atome d'hydrogène permettant une grande proximité des groupements interactifs peuvent expliquer leur intensité. Elles peuvent se voir attribuer une origine électrostatique ou ionique et dans certains cas, un caractère covalent.

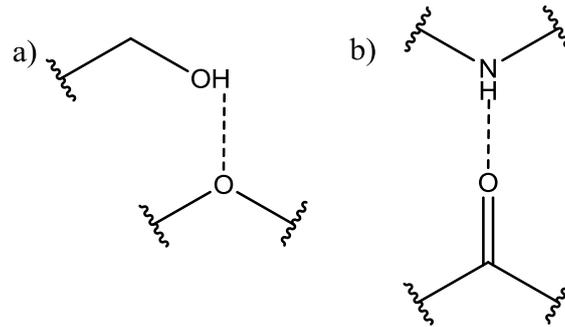


Figure 1.4: Exemples de schémas de liaison H a) dans un polysaccharide; b) dans une protéine

Elles se créent entre un atome d'hydrogène porté par un atome fortement électronégatif et un autre groupement moléculaire possédant également un atome fortement électronégatif (**Figure 1.4**). Ce sont par conséquent des interactions directionnelles^[18]. Dans les systèmes présentant des liaisons H telles que OH---H, ce qui est le cas pour les polysaccharides, la distance d'une telle liaisons est évaluée à $2,8 \pm 0,1$ Å. Elles sont responsables des cohésions particulièrement élevées dans les systèmes polymères naturels tels que dans l'acide désoxyribose nucléique (ADN; lien entre les deux brins d'ADN), dans les protéines (hélices α et feuillets β , structures I^{aire}, II^{aire}, III^{aire} et IV^{aire}), dans les polysaccharides (rhéologie: comportement en solution) et dans les polymères synthétiques (polyamides, polyesters etc.).

1.3.2.Caractérisation

Il existe plusieurs méthodes pour révéler la présence des liaisons hydrogène (liaisons H) dans un système contenant des molécules protiques. Une des manières de montrer leur existence est de comparer les températures d'ébullition entre des molécules protiques et aprotiques. Le fait que les molécules protiques puissent établir des liaisons H justifie qu'elles présentent des températures d'ébullition supérieures à celles des composés aprotiques. En effet, afin de les vaporiser, il faut fournir plus d'énergie pour rompre ces liaisons H qui participe davantage à la cohésion en les molécules protiques.

Afin de les mettre en évidence, il est également souvent utilisé un agent chaotrope comme par exemple l'urée ou le chlorure de guanidine. Ces agents chaotropiques ont pour fonction de fragiliser les liaisons H et provoquent le plus souvent, une dénaturation dans le cas des protéines^[19,20] et de l'ADN ou une perte non négligeable des propriétés viscoélastiques de solution de polymères^[21]. Afin d'obtenir des renseignements additionnels sur la stabilité des protéines, Tareste et des co-équipiers^[22] ont pu isoler une liaison H dans l'eau entre deux surfaces cylindriques recouvertes chacune d'une monocouche de lipides possédant une tête capable d'établir des liaisons H dans l'eau. Après isolation d'une liaison H en écartant les deux cylindres l'un de l'autre, ils ont déterminé l'énergie de cette liaison à $0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (soit $2,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Sweetman et co-équipiers^[23] ont pu obtenir des images par

AFM dans lesquelles il est possible d'identifier clairement la position des liaisons hydrogène entre des molécules de naphthalène tétracarboxylique diimide.

En faisant varier la température, l'hygrométrie et les conditions de solvation (eau ou eau lourde), les chercheurs Maréchal et Chanzy^[24] ont pu proposer une cartographie des liaisons hydrogène dans les films de cellulose en utilisant la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR) dans différentes conditions.

Les liaisons H peuvent aussi être caractérisées en solution par diffusion des neutrons^[25] technique basée sur l'interaction entre un faisceau de neutron et la matière; à l'aide de plusieurs techniques spectroscopiques de résonance magnétique nucléaire (RMN) comme par exemple en exploitant les constantes de couplage caractéristiques^[26], en comparant les coefficients de diffusion (DOSY)^[27]. Elles peuvent également être caractérisées par la technique de diffusion Raman basée sur l'interaction rayonnement-matière^[28].

1.4.Interactions coulombiennes

1.4.1.Description

Des groupements anioniques (carboxylates, sulfonates etc) présents dans certains polymères (polyanions^[29,30]) associés à des cations monovalents issus eux-mêmes éventuellement de polycations (polyphosphoniums^[31], poly(arylène-imidazolium)^[32]) forment des paires d'ions donnant lieu à de la réticulation physique dans les systèmes macromoléculaires^[33,34]. Lorsque des polymères polyanioniques sont en présence de cations métalliques divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , etc), il peut se former des ponts entre les chaînes, comme dans le cas de l'alginate de sodium en présence d'ions calciums^[35,36]. Il existe le cas également des complexes de polyélectrolytes (PECs) en solution ayant lieu entre un polymère cationique et un polymère anionique^[37].

1.4.2.Mise en évidences

Lorsqu'il est étudié des espèces chargées, il est généralement fait une étude sur le comportement des contre-ions qui écrantent les charges des polyélectrolytes en solutions (évolution de la conductivité en solution par exemple^[38]). Il est aussi étudié généralement le comportement du soluté chargé en présence et en l'absence de contre-ions. Dans la publication de Fuoss *et al.*^[39], ils ont montré que le pic de viscosité réduite (η_{red}) de solutions de poly-4-vinylpyridine généralement observé à faible concentration C en polyélectrolyte disparaît suite à l'ajout de seulement 0,001M de bromure de potassium (KBr) en attribuant cette disparition à la diminution des répulsions intramoléculaires grâce aux ions bromures (Br^-); et plus la quantité de sel augmente dans la solution et plus la courbe ($\eta_{red} = f[C]$) possède l'allure classique de celle d'un polymère neutre. Pour la même raison, Dubas et co-

équipiers^[40] ont montré que le gonflement des films multicouches de polyélectrolytes est fortement dépendant de la force ionique en solution et aussi de la nature du polyélectrolyte.

1.5. Quantification relative des interactions moléculaires en solution

1.5.1. Simulations numériques

Ces méthodes de quantification sont le plus souvent toutes basées sur des calculs théoriques utilisant plusieurs théories telle que la théorie probabiliste pour les calculs ab initio et débouchant le plus souvent sur des simulations numériques^[41]. Ces études permettent parfois d'avoir de bonnes prédictions et de bonnes corrélations avec les résultats expérimentaux.

Du point de vu expérimental, une technique à ce jour en plein essor permet de quantifier les interactions moléculaires pour des systèmes en solution: la titration calorimétrie isotherme.

1.5.2. Analyse micro-calorique

La titration isotherme calorimétrique (ITC; **Figure I.5a**) permet d'étudier les interactions entre molécules ou macromolécules (ligand ; récepteur)^[42-44]. Basée sur le même principe de fonctionnement qu'un appareil de calorimétrie différentielle à balayage (DSC : Differential Scanning Calorimetry). Elle se distingue en grande partie de la DSC par le fait qu'il est possible de détecter de faibles variations de température non détectées en DSC en plus d'effectuer des injections pendant la mesure. La cellule de référence s'ajuste en température en permanence avec la cellule de mesure qui subit des variations de température à chaque injection de molécules « réceptrices »; d'où l'emploi de l'adjectif « isotherme ». Le volume d'injection est fixe et l'intervalle de temps entre chaque injection est identique.

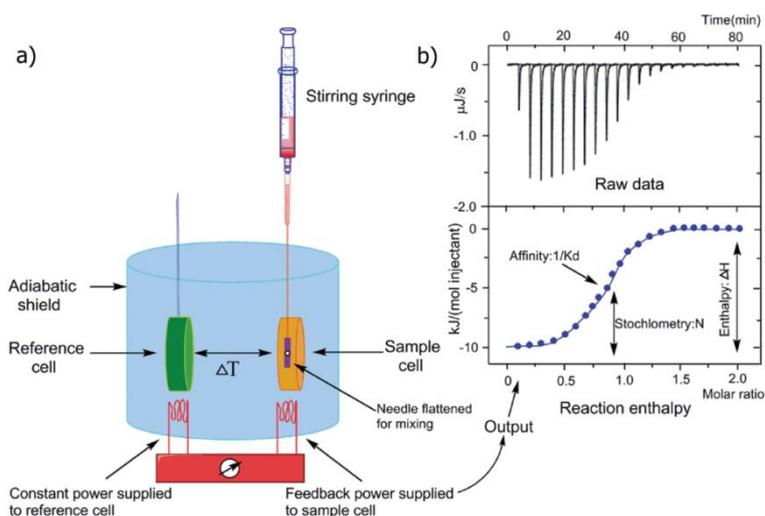


Figure I.5 : a) Principes de fonctionnement d'un microcalorimètre b) Acquisition et exploitation des données, Schéma issu de Song et co-équipiers^[45]

L'ITC permet d'accéder à la variation d'enthalpie de « complexe » de macromolécules ΔH , également à la constante d'affinité (ou d'association) K_a (M^{-1}) et la stœchiométrie N (**Figure I.5b**). La variation d'enthalpie ΔH est reliée directement à la quantité d'énergie nécessaire à la rupture ^{et/ou} à la création de liaisons qu'elles soient covalentes ou non. Grâce à ces deux valeurs, il est donc possible de calculer les variations d'énergie libre ΔG et d'entropie ΔS . ΔS est liée au changement solvation ^{et/ou} de conformation. Lorsque la valeur de ΔG est positive, l'association est qualifiée d'exergonique ; l'association entre les deux composés se fait spontanément. Au contraire, lorsque la valeur de ΔG est négative, l'association est dite endergonique. L'ITC permet donc de déterminer le paramètre thermodynamique prépondérant (ΔH ou ΔS) dans l'association entre le ligand et le récepteur et de quantifier en termes d'énergie et de manière relative des interactions intermoléculaires mais pas de les discriminer de manière absolue.

1.6. Concentration des solutions de polymère

Une solution contenant qu'un seul type de polymère (solution "homopolymérique") peut présenter des comportements rhéologiques significativement différents et ce, en ne faisant uniquement varier la concentration en polymère. Il est défini des régimes de concentrations pour lesquels le soluté développe ou pas des interactions intra et/ou interchaîne.

1.6.1. Régimes de concentration des solutions de polymère

A très faible concentration, il n'y a aucune interaction intermoléculaire mais seulement des interactions intramoléculaires. Lorsque la concentration augmente à un point critique, des interactions intermoléculaires commencent à apparaître. La variation de la concentration module la présence des interactions au niveau moléculaire et par extension, le comportement de la solution polymère au niveau macroscopique.

Dans des conditions de bonne solvation et donc en fonction de la concentration, il peut être défini des régimes de concentration: régime dilué, semi-dilué et concentré^[46]. Les régimes dilué et semi-dilué sont délimités par la concentration critique de recouvrement notée C^* . Le régime concentré apparaît pour une concentration largement supérieure à C^* (**Figure I.6**).

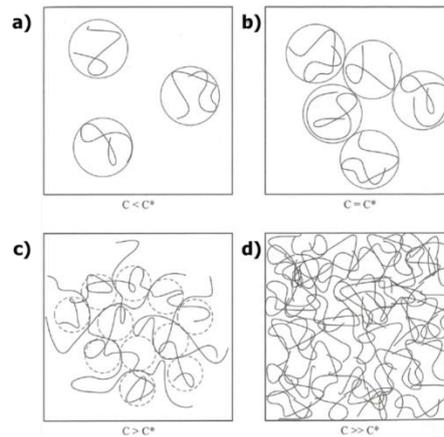


Figure I.6: Régimes de concentration a) dilué b) début du recouvrement des chaînes c) semi-dilué et d) concentré d'après Fontanille et Gnanou^[1]

En régime dilué (Figure I.6a), les chaînes polymère n'interagissent pas entre elles et possèdent leur propre volume appelé blob^[46]. Lors du recouvrement (Figure I.6b), les blobs commencent à se rapprocher les uns des autres tout en conservant leur volume propre. A $C = C^*$, la compacité des blobs, qui peuvent être apparentés à des sphères, atteint sa valeur maximale ($\approx 0,74$) correspondant à un empilement compact. Au-delà de C^* , les blobs "s'effacent"; les chaînes de polymère commencent à s'interpénétrer et des interactions interchaîne s'ajoutent aux interactions intra-chaîne.

1.6.2. Détermination de la concentration critique de recouvrement C^*

Il est généralement utilisé la méthode de Huggins^[47] pour déterminer la valeur de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ nécessaire pour déterminer C^* . Cette méthode nécessite de déterminer en amont les valeurs de la viscosité spécifique (η_{sp}) et la viscosité réduite (η_{red}). La viscosité spécifique est définie par le rapport de la différence entre la viscosité de la solution (η) et celle du solvant (η_0) divisé par la viscosité du solvant (η_0). La viscosité réduite (η_{red}) est le rapport entre η_{sp} et la concentration en polymère (C). La viscosité intrinsèque $[\eta]$ est définie comme la limite de la viscosité réduite (η_{red}) lorsque la concentration en polymère (C) tend vers la valeur 0. Il est à noter que $[\eta]$ peut varier en fonction de différents paramètres (température, salinité, etc.) ce qui peut permettre de donner des informations relatives sur l'état d'hydratation du polymère et en donner des éléments d'informations sur les interactions polymère-solvant.

Afin de déterminer C^* , il est généralement utilisé la représentation d'Utracki et Simha^[48] consistant à tracer la viscosité spécifique (η_{sp}) en fonction du paramètre de recouvrement noté « $C \cdot [\eta]$ ». Il est alors souvent observé changement de pente, bien marqué dans le cadre des polymères synthétique et plus tenu en ce qui concerne les polymères naturels^[49], intervenant à la concentration critique de recouvrement C^* délimitant les régimes dilué et semi-dilué. Le changement de pente n'est

généralement pas aussi marqué^[50,51] comparé à ce qui peut être représenté **Figure 1.7a**; C^* représente plutôt une plage de concentrations qu'une valeur unique.

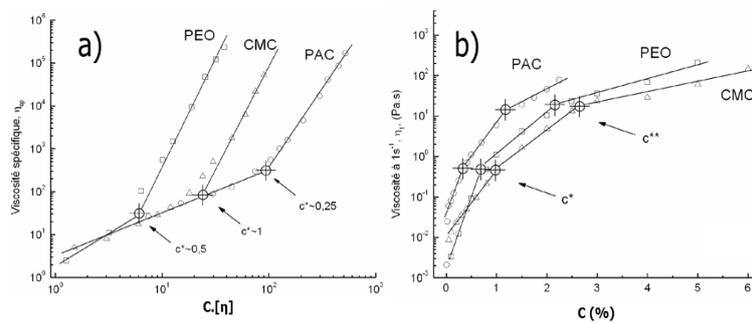


Figure 1.7: Concentration critique de recouvrement C^* pour des solutions de Polyoxyde d'éthylène (PEO), Carboxyméthylcellulose (CMC) et de Cellulose polyanionique; représentations a) de η_{sp} en fonction du paramètre de recouvrement b) de η_1 en fonction de la concentration en polymère d'après Benchabane^[52]

Il existe d'autres méthodes graphiques pour déterminer plus simplement C^* ; par exemple, il peut être utilisé un des paramètres du modèle de Cross^[53] qui modélise l'écoulement de systèmes pseudo-plastiques, la viscosité à taux de cisaillement nul notée η_0 (qui peut se noter également $[\eta]_0$) et la représenter en fonction de la concentration C en polymère. Sur le même principe, Benchabane et coéquipiers^[54] ont représenté la viscosité apparente au taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ égal à 1 s^{-1} notée η_1 (**Figure 1.7b**). Dans leur cas, ils obtiennent les mêmes valeurs de C^* et C^{**} quel que soit le mode de représentation graphique.

1.6.3. Conclusion

Les interactions jouent un rôle essentiel dans tous les phénomènes observés concernant les solutions de polymère qu'ils soient d'origine biologique ou non. Chaque type d'interaction se manifeste essentiellement en fonction de la composition chimique et du nombre des entités présentes en solution et ne possèdent pas la même influence en fonction de leurs différentes natures (différentes énergies impliquées). Malgré leur caractère hétérogène, ces interactions moléculaires peuvent coexister soit en compétition les unes par rapport aux autres soit en concertation les unes avec les autres engendrant, dans des cas particuliers, des synergies d'interaction.

1.7. Cas particulier des synergies d'interactions des mélanges xanthane/galactomannane

Parmi les polysaccharides existants et qui sont déjà utilisés dans l'industrie, quelques-uns sont connus pour interagir fortement entre eux en solution dans le cas de mélanges binaires voire même

ternaires^[55,56]. Dans des conditions particulières, des mélanges peuvent présenter des propriétés nettement plus importantes en termes de viscosité par exemple des propriétés des gommages seules en solution. Dans ce cas précis, il est alors utilisé le terme de synergie d'interaction; phénomène qui sera décrit plus en détail dans le paragraphe 1.7.3. Le cas des mélanges aqueux gomme de xanthane, gomme de galactomannane constitue un des systèmes les plus connus et le plus largement étudié depuis plus d'une cinquantaine d'années^[57-76]. Avant tout étude du mélange des deux gommages, il est important de se pencher sur ces polysaccharides qui présentent chacun une grande variabilité structurale qui gouverne de leurs propriétés en solution et qui va être exposée dans les paragraphes suivants.

1.7.1. La gomme de xanthane

1.7.1.1. Sources, production et intérêts industriels

Le xanthane (X) est un biopolymère produit par fermentation bactérienne aérobie de *Xanthomonas campestris*^[29,30]. Il est utilisé principalement dans le domaine agro-alimentaire pour ses propriétés épaississantes et stabilisantes notamment dans les émulsions. Son nom commercial est gomme de xanthane référencée, en alimentaire, sous le code **E415**. Les solutions de xanthane peuvent aussi être utilisées dans le domaine pétrolier, notamment pour la récupération assistée du pétrole^[77,78].

1.7.1.2. Structure chimique

Le xanthane est un hétéropolysaccharide constitué d'une chaîne principale d'unités $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucopyranose. Sur cette chaîne principale, il y a une chaîne latérale secondaire trisaccharidique toutes les deux unités de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucopyranose^[79,80] (**Figure I.8**). Cette chaîne latérale est constituée d'une unité d' $\alpha(1\rightarrow3)$ -D-mannopyranose, suivie d'une unité d'acide $\beta(1\rightarrow2)$ -glucuronique et se terminant par une unité de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-mannopyranose.

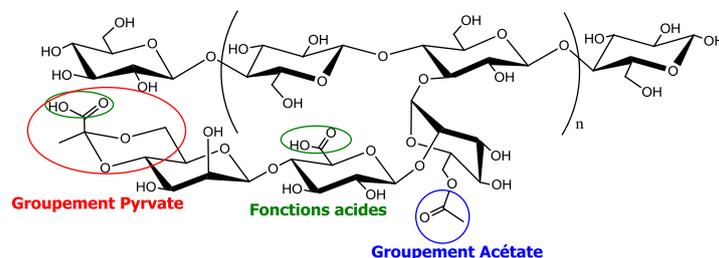


Figure I.8: Structure chimique générique d'une macromolécule de xanthane

Des études ont montré que selon les conditions de culture ou des modifications effectuées sur les souches bactériennes de *Xanthomonas campestris*, la chaîne latérale peut se retrouver plus ou moins substituée par des groupements pyruvate et acétate^[81-85]. Dans l'un de ces cas, l'unité d' α -D-mannopyranose se voit substituée par un groupement acétate en C6 et les hydroxyles situés en

position C4 et C6 de l'unité de β -D-mannopyranose qui peuvent également être partiellement substitués par un groupement pyruvate. Des modifications post-production peuvent également intervenir pour contrôler les degrés de substitution en groupements pyruvate et acétate ($DS_{acétate}$; $DS_{pyruvate}$)^[86]. $DS_{acétate}$ et $DS_{pyruvate}$ sont généralement déterminés à l'aide de la RMN^[87-90].

Tableau I.2: Valeurs des degrés de substitution des groupements acétate et pyruvate

Méthode		$DS_{Acétate}$	$DS_{Pyruvate}$	Références	Commentaires
RMN	I	0,39	0,9	Smith <i>et al.</i> 1981 ^[87]	Hydrolyse acide et enzymatique (lactate déshydrogénase) pour déterminer teneur en pyruvate (P) puis RMN pour trouver le ratio (R) de DS_{pyr} (x) et DS_{ac} (y); puis $R=x/y$
	II	0,34	0,85		
	III	0,44	0,67		
	IV	0,34	0,79		
	V	0,39	0,53		
	VI	0,32	0,35		
RMN		0,75	0,40	Milas <i>et al.</i> 1986 ^[91]	
Potentiométrie		1	0,57	Capron 1996 ^[92]	Remarque.: Avec conductimétrie, impossible de distinguer Pyr. de l'acide Glucoronique * Déterminé par RMN
RMN		0,61	0,39	Esquenet 2003 ^[89]	
RMN	X1	0,87	0,49	Aguni 2009 ^[90]	Formules de Esquenet 2003 ^[89]
	X2	0,31	0,10		
	X3	0,76	0,53		
	X4	0,13	0,52		
	X5	0,41	0,63		
	X6	0,75	0,58		
	X7	0,71	0,61		
	X8	0,66	0,47		

Esquenet^[89] a mis en place dans le cadre de ses travaux de thèse une méthodologie qui consiste à exploiter le spectre du proton du xanthane obtenu par RMN, de relever les aires sous les pics correspondants aux groupements acétate, pyruvate et à la référence moléculaire externe utilisée (exemples: acétate de sodium, triméthylsilylpropanoate de sodium deutéré (TSP-d₄), etc.) afin de déterminer les degrés de substitution. Il peut s'avérer primordial dans certains cas de connaître les degrés de substitution car ils peuvent avoir un impact sur les propriétés physico-chimiques du xanthane en solution^[87].

1.7.1.3. Conformation en solution aqueuse

1.7.1.4. Température de transition conformationnelle T_m

En fonction des conditions du milieu, le xanthane peut adopter trois conformations différentes^[93]. A force ionique (I) élevée et basse température (0,1M NaCl ; 30°C), le xanthane est sous forme native (forme **ordonnée I**). Si le polysaccharide microbien est chauffé au-dessus d'une température caractéristique notée T_m et/ou que I est inférieure à 10^{-4} M, alors il adopte une conformation **désordonnée (III)**; il est dit dénaturé. La transition ordre-désordre, c'est-à-dire le passage de l'état natif à l'état dénaturé est un processus irréversible. De ce fait, le xanthane est généralement

étudié soit sous sa forme renaturée (ordonnée II) soit sous sa forme désordonnée (III) rarement sous sa forme native (ordonnée I). En diminuant la température telle que $T < T_m$ ou en augmentant I telle que $I > 10^{-4}M$, les chaînes de xanthane retrouvent une conformation ordonnée différente de la conformation ordonnée à l'état natif; le xanthane est qualifié de renaturé (forme **ordonnée II**).

Etat Natif (I) → Etat Dénaturé (III) ⇌ Etat Renaturé (II)

Plusieurs techniques permettent de mettre en évidence cette transition ordre-désordre et de caractériser les conformations du xanthane obtenues. Par exemple, en rhéologie^[88,94-97], la T_m peut se déterminer au moment où les propriétés viscoélastiques (module élastique G' et module visqueux G'') s'effondrent lorsque la température augmente ; en RMN^[98,99] en suivant par exemple l'évolution de l'air sous le pic correspondant aux protons du groupement acétate en fonction de la température. Ou encore à l'aide de la polarimétrie^[93,98,100-102] en repérant le point d'inflexion (changement de courbure) dans l'évolution de l'angle de déviation α_D en fonction de la température. Pelletier et al.^[103] ont quant à eux déterminé la T_m de leur échantillon de xanthane grâce à une analyse thermique différentielle (ATD) en repérant le pic endothermique caractéristique de la transition ordre-désordre.

Tableau I.3: valeurs de températures de transition conformationnelle du xanthane

Méthodes	Conditions	T _m (°C)	Références	Commentaires
Polarimétrie	6 mM NaCl	≈ 40*	Milas <i>et al.</i> 1986 ^[91]	* valeurs des T _m estimées d'après graphique; C _{xanthane} = 0,07% (m/m)
	11 mM NaCl	≈ 50*		
	16 mM NaCl	≈ 60*		
	28 mM NaCl	≈ 70*		
Low Shear	10 mM NaCl	≈ 50*		* valeurs de T _m estimée d'après graphique
Mesures de conductance (G)	C _{xanthane} = 0,01% (m/m)	≈55*		* valeurs de T _m estimée d'après graphique Solution de xanthane ayant la même conductance (G) qu'une solution aqueuse de NaCl à 25°
Polarimétrie	8 mM NaCl; C _{xanthane} =0,3% (m/m)	52	Foss 1987 ^[98]	
RMN	C _{xanthane} =0,3% (m/m)	67		δ _{ppm} (Ac.) =référence interne; référence externe p-DCbenzène (CCl ₄)
Calculs empiriques	10 mM NaCl	49±13	Capron 1996 ^[92]	Holzwarth 1976: T _m =122+30.log[Na ⁺] à 10 mM NaCl
	100 mM NaCl	87±5		Milas 1979: T _m =125+43.log[Na ⁺] à 100 mM NaCl
DSC	8 mM NaCl; C _{xanthane} =1% (m/m)	52	Pelletier <i>et al.</i> 2001 ^[103]	
Polarimétrie	10 mM NaCl	63	Aguni 2009 ^[90]	
		80		
		68		
		53		
		53		
		58		
		48		
67				

Contrairement à l'étude en solution, Moorhouse et coéquipiers^[104] ont caractérisé le xanthane à l'état solide à l'aide de la Diffraction des rayons X (DRX). Ils ont montré que le xanthane adopte la forme d'une simple hélice de type 5₁ avec un pas de 4,7 nm, les chaînes latérales étant repliées le long de la chaîne principale (**Figure I.9**). Ils émettent ainsi l'hypothèse que cette conformation serait identique à la forme native du xanthane en solution aqueuse.

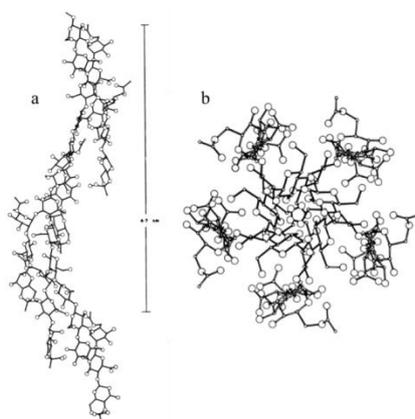


Figure I.9: Macromolécule de xanthane a) vue de profil de l'hélice et b) vue selon l'axe de l'hélice^[104]

Il peut être observé dans le **Tableau I.3**, une variation de T_m allant de 40°C à presque 90°C. Dans des conditions similaires d'analyse (≈10 mM NaCl) T_m peut être égale à 50°C^[91] ou à 80°C^[90]. Ces

variations des valeurs de T_m reflètent directement dans la plus part des cas, l'influence de la composition chimique du xanthane et nous indique ici que les différents auteurs cités dans le tableau n'ont surement pas étudié le même échantillon de xanthane.

1.7.1.5. Paramètres influençant T_m

Il est à noter que plusieurs paramètres tels que le pH, I ou la proportion en groupements pyruvate et acétate peuvent influencer T_m . L'impact de ces paramètres va être discuté dans les paragraphes suivants.

1.7.1.5.1. La force ionique

Milas et Rinaudo^[105] ont démontré que T_m est proportionnelle au logarithme décimal de la force ionique I. Ceci s'explique par le fait que l'écrantage des charges négatives portées par les chaînes latérales est d'autant plus fort que I augmente. L'ajout de sel revient donc à atténuer les interactions électrostatiques répulsives et donc à stabiliser la forme hélicoïdale du biopolymère.

1.7.1.5.2. Influence de la concentration et du pH

Dans les travaux de Bejenariu et co-équipiers^[106] ont montré que T_m diminue lorsque la concentration et le pH augmentent. En effet, plus la concentration augmente et plus la mobilité des chaînes diminue car des liaisons hydrogène se créent entre les chaînes de xanthane ce qui oblige à plus chauffer. En revanche, plus le milieu est alcalin et plus la probabilité pour que tous les groupements acides carboxyliques soient déprotonés (répulsions électrostatiques) ce qui facilite la transition conformationnelle.

1.7.1.5.3. Groupements acétate et pyruvate

Il a été montré par Moorhouse^[104], Holzwarth^[100] et Smith^[87] en faisant varier DS_{pyruvate} et $DS_{\text{acétate}}$ dans la chaîne latérale du xanthane que les groupements pyruvate déstabilisent l'hélice. Le fait que les groupements pyruvate portent des charges induit des répulsions électrostatiques intramoléculaires entre la chaîne principale et la chaîne latérale qui s'opposent à la formation d'une hélice compacte. Ce qui signifie que les groupements pyruvate rendent l'hélice plus labile donc plus facile à mettre en mouvement lorsqu'il y a apport de chaleur et qui se traduit donc au final par une diminution de la T_m . En effet, en l'absence totale de pyruvate une augmentation de la T_m est observée. Néanmoins, Smith^[87] émet l'hypothèse que le groupement pyruvate au travers son groupement méthyl qui serait impliqué dans des interactions apolaires intermoléculaires ce qui pourrait expliquer en partie l'association des chaînes des xanthane en solution.

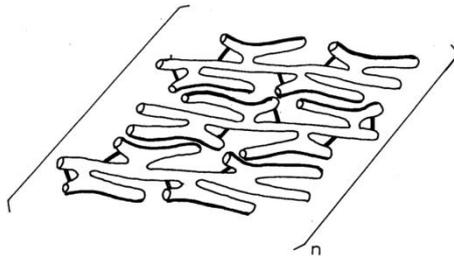


Figure I.10: Modèle proposé d'après Tako^[107] de la structure quaternaire du xanthane incluant les associations intra et intermoléculaires (lignes en gras) en solution

Tako^[107] et co-équipiers ont mis en évidence le fait que la chaîne latérale devenait plus flexible après avoir subi une étape de déacétylation. Suite à cette observation, ils ont ainsi émis l'hypothèse que les groupements acétate seraient impliqués dans des interactions intramoléculaires avec le squelette de la chaîne principale (**Figure I.10**), réduisant par conséquent la mobilité de la chaîne latérale. Cette hypothèse confirme celle de Smith^[87] où le méthyl du pyruvate serait impliqués dans l'association des chaînes de xanthane entre elles en solution comme il est illustré **Figure I.10**.

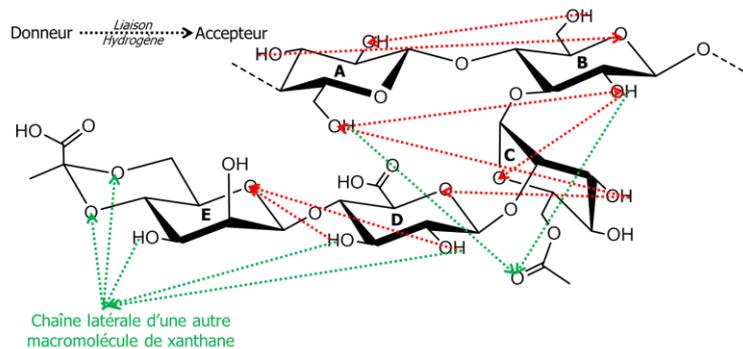


Figure I.11 : Schématisation simplifiée des liaisons hydrogène (lignes discontinues) dans une unité de répétition d'une macromolécule de xanthane [A et B = unités de β (1→4)-_D-glucopyranose; C = unité de α (1→3)-_D-mannopyranose ; D = unité de β (1→2)-glucuronique et E = unité de β (1→4)-_D-mannopyranose] d'après les hypothèses de Millane et Wang 1990^[108] et Chandrasekaran et Radha 1997^[109] (flèches rouges) et proposition d'interprétation de l'hypothèse de Tako et al., 1984^[107] (Figure I.10; flèches vertes)

Grâce à des expériences de DRX et de modélisations numériques, Millane^[108] et Chandrasekaran^[109] ont proposé une représentation des liaisons hydrogène au sein d'une unité de répétition d'une macromolécule de xanthane (**Figure I.11**). Les longueurs des flèches sur la **Figure I.11** sont évidemment relatives étant données qu'elles ne respectent pas les longueurs et les angles dièdres déterminés par les deux auteurs^[108,109]. En prenant en compte ce détail, leur schématisation permet de se rendre compte de la disposition spatiale de la chaîne latérale par rapport à la chaîne principale et confirme sa direction vers l'extrémité non réductrice de la chaîne principale. Ces résultats restent toutefois à prendre avec des précautions car pour effectuer leurs calculs d'angle et de longueur de liaison ils ont imposé le fait que le xanthane soit sous sa forme solide et non en solution aqueuse.

1.7.1.6. Rhéologie en solution aqueuse

Les solutions de xanthanes adoptent un comportement rhéologique différent en fonction de la concentration en polysaccharide (interaction interchaîne) et de la salinité du milieu (conformation). Wyatt et ses partenaires^[110] se sont intéressés à la rhéologie du xanthane en s'appuyant sur les travaux de Dobrynin^[111] en faisant varier distinctement ces deux paramètres: régimes de concentration et force ionique (I). Ils ont ainsi montré les effets suivants :

1.7.1.6.1. A force ionique nulle

Les solutions de xanthane se comportent comme une solution de polymère ordinaire; les courbes d'écoulement font apparaître un plateau newtonien aux faibles taux de cisaillement et rhéofluidifiant quand ce dernier augmente. Dans le cadre de leur échantillon, les solutions de xanthane sont newtoniennes pour des concentrations inférieures à 0,002%(m/m).

1.7.1.6.2. En présence de sels

En présence de sel NaCl (50 mM), il est également observé un comportement rhéofluidifiant à partir de 0,008%(m/m). Cependant les valeurs de viscosité diminuent (≈ 1 décade) ce qui est classique dans le cas des polyélectrolytes. La présence de sel diminue les répulsions électrostatiques et permet aux chaînes de former des structures plus compactes. Les chaînes de xanthane ne sont plus dans une conformation étendue. Dans cette conformation, les chaînes développent moins d'interactions avec les chaînes voisines ce qui résulte à une diminution de la viscosité. Pour des raisons identiques, C^*_{NaCl} est nettement plus élevée que $C^*_{I=0}$; respectivement $\sim 0,02\%$ (m/m) et $0,007\%$ (m/m).

1.7.1.6.3. Anisotropie des solutions de xanthane

Plusieurs équipes de recherches^[105,112-116] ont mis en évidence grâce notamment à des expériences de microscopie à lumière polarisée le caractère anisotrope des solutions de xanthane. Lorsqu'il est appliqué un cisaillement entre deux polariseurs, des zones biréfringentes apparaissent. Cette biréfringence est visible uniquement pour des solutions de xanthane dont la concentration est au moins supérieure à 0,7% (m/m) d'après les travaux d'Allain et co-équipiers^[115]. Ces zones anisotropes, qualifiées de mésophases disparaissent lorsque les solutions sont chauffées à une température proche de la T_m . Les auteurs ont principalement associé l'existence de ces mésophases avec la forme d'hélice semi-rigide qu'adoptent les chaînes de xanthane en solution. En effet, sous cette conformation, les chaînes de xanthane peuvent être assimilées à des particules en forme de bâtonnets liés entre eux principalement par des liaisons hydrogène et engendreraient l'apparition de ces zones anisotropes responsables de la biréfringence observée en microscopie à lumière polarisée à

une température inférieure à T_m ($T \ll T_m$). Lim et son équipe^[112] ont démontré également que cette biréfringence augmente avec la concentration en polymère dans le milieu. Ils citent et appliquent dans leur étude les calculs de Flory^[117] permettant de déterminer la fraction volumique minimale pour laquelle les mésophases se créent mais ces calculs nécessitent de connaître de nombreux paramètres intrinsèques au xanthane tels que la longueur de l'hélice, son diamètre, la masse linéique d'une chaîne, le volume spécifique et bien d'autres.

1.7.1.7. Approche viscosimétrique

La viscosimétrie capillaire est souvent utilisée car elle permet d'obtenir des informations assez rapidement sur leur dimension et leur masse; paramètres reliés à leur volume hydrodynamique en solution.

1.7.1.7.1. Viscosité intrinsèque

Il a été recensé de manière non exhaustive, les valeurs de viscosité intrinsèque et de la constante de Huggins pour le xanthane en solution.

Tableau I.4: Valeurs de viscosités intrinsèques $[\eta]$ et la constante de Huggins k_H

Méthodes	Conditions expérimentales	$[\eta]^a$ (mL/g)	k_H	Références	Commentaires	
Low Shear	0,1 M NaCl; 25°	10500	0,44	Milas <i>et al.</i> 1985 ^[118]		
	0,1 M NaCl; 25°	7100	*nc	Milas <i>et al.</i> 1986 ^[88]	Forme native (I)	
		10600			Forme ordonnée (II)	
	0,1 M NaCl; 25°	4930		Cuvelier <i>et al.</i> 1986 ^[119]	Prétraitement thermique du xanthane à 80°C (1h) avant analyse	
	$l = 0,30$ et pH 6,5	7534 ± 2717	2,5	Dhami <i>et al.</i> 1995 ^[120]		
	0,1 M NaCl	7150	0,6	Capron 1996 ^[92]		
	0,1 M NaCl	1600 ± 200	0,625	Esquenet 2003 ^[89]		
0,25 M NaCl, 35°	5600	0,94	Secouard <i>et al.</i> 2007 ^[121]			
Viscosimétrie à bille	0,01 M NaCl; 35°; X1	2730	1,34	Aguni 2009 ^[90]	X pour xanthane	
	0,01 M NaCl; 35°; X2	2440	0,96			
	0,01 M NaCl; 35°; X3	2700	1,23			
	0,01 M NaCl; 35°; X4	2790	0,81			
Viscosimétrie capillaire	0,1 M NaCl	1399	0,774	Brunchi <i>et al.</i> 2014 ^[122]		
	0,01 M NaCl; 0,075% (m/m)	25°	2420	*nc	Masuelli 2014 ^[123]	
		30°	2372			
		35°	2345			
		40°	2267			
		45°	2177			
	50°	2231				
0,09 M NaCl; 30°	4300	0,44	Chauveteau 1982 ^[124]			
0,1 M NaCl; 25°	1230		Ojjo <i>et al.</i> 2007 ^[125]			

^a Déterminée à l'aide de la méthode de Huggins

*Valeurs non communiquées (nc) par les auteurs

Il peut être observé (**Tableau I.4**) que les valeurs de $[\eta]$ sont comprises entre 1400 et 12 300 ml/g. En moyenne, il peut être observé que les valeurs de $[\eta]$ obtenues avec un rhéomètre low shear sont

supérieures comparé aux autres méthodes utilisées (viscosimètres à bille et capillaire). Ceci peut être dû effectivement au fait que les échantillons sont plus fortement cisailés dans le cas des viscosimètres à bille ou capillaire contrairement aux low shear designés spécialement pour travailler aux très faible taux de cisaillement. Dans le cas des travaux de Masuelli^[123], il peut être décelé une influence de la température. Lorsque celle-ci augmente (25° à 50°), $[\eta]$ diminue légèrement (2400 à 2200 ml/g). Cette diminution peut être corrélée à une partielle diminution du volume hydrodynamique de la macromolécule hydratée. Au final, lorsque que l'on regarde le tableau ci-dessus, il n'est pas possible d'affirmer que telle ou telle valeur de $[\eta]$ du xanthane est la bonne car tous les auteurs ont étudié des échantillons de xanthane dont les caractéristiques intrinsèques sont sûrement différentes et dans la plupart des cas peu indiquées. Il s'agit donc à chaque fois d'une valeur de $[\eta]$ d'un échantillon de xanthane obtenu dans des conditions particulières. Ces valeurs non-exhaustives de $[\eta]$ du **Tableau I.4** peuvent être comparées entre elles uniquement dans le cas où il est connu ces propriétés intrinsèques telles que la masse molaire, la conformation, les taux de groupements acétate et pyruvate, etc.

1.7.2. Les galactomannanes

1.7.2.1. Sources, production et intérêts industriels

Les galactomannanes (GM) se trouvent majoritairement dans l'albumen, partie de la graine chez les *Leguminosae* qui correspond à la réserve nutritive chez les angiospermes (plantes à fleurs). Il est à noter qu'ils peuvent également avoir une origine microbienne^[126]. La caroube (**E410**), la guar (**E412**), la tara (**E417**) ou encore le fenugrec sont issus respectivement du caroubier, de *Cyamopsis tetragonoloba*, de *Caesalpinia spinosa* et des graines de fenugrec. Parmi ces galactomannanes, seules la caroube, la guar et la tara montrent un débouché industriel significatif^[127] et notamment dans le domaine de l'agro-alimentaire.

1.7.2.2. Structure chimique

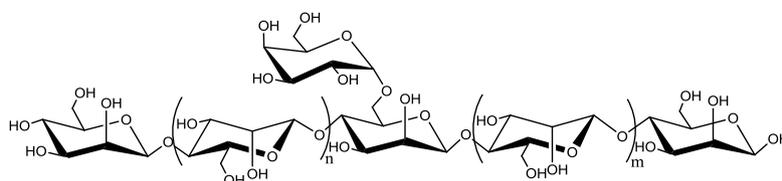


Figure I.12: Structure chimique générique d'un galactomannane

Les galactomannanes sont des polysaccharides dont les chaînes sont constituées d'unités de β -D-mannopyranose ("Mannose") reliées entre elles par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ osidique. Les unités de mannose sont substituées partiellement par des unités α -D-galactopyranose ("Galactose") avec des liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow6)$ (**Figure I.12**).

Le ratio Mannose/Galactose (M/G) ainsi que la distribution des unités galactose varient selon la variété de graine dont sont extraits les galactomannanes. Les méthodes d'extraction et de purification de ces hydrocolloïdes peuvent aussi faire varier le ratio M/G^[128].

1.7.2.2.1. Ratio mannose/galactose

Comme dit précédemment, le ratio Mannose/Galactose (M/G) est dépendant de la source végétale ce qui définit par conséquent la nature du galactomannane considérée^[127]: par exemple, un ratio M/G \approx 4 pour les caroubes; un ratio M/G \approx 1,8 pour les guar et un ratio M/G \approx 3 pour les gommages de tara. Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ étant dépendant des résidus galactoses présents sur les chaînes de mannose, le ratio M/G peut être déterminé en utilisant la polarimétrie^[129,130]. Après avoir subi une hydrolyse enzymatique ou acide afin d'obtenir des fragments de chaîne substitués ou non (mannose, mannobiose, mannotriose, etc.) quantifiables, il peut également être déterminé en utilisant la chromatographie gazeuse^[131] (GC) ou la chromatographie liquide haute performance^[132,133] (HPLC).

1.7.2.2.2. Distribution des unités de galactose

Daas *et al.*^[132,134] ont défini un paramètre, le **Degré de Bloc (DB)** qui peut nous renseigner sur la distribution des unités galactose le long des chaînes de mannose en connaissant la valeur du ratio M/G.

Tableau I.5: Valeurs des ratios Mannose/Galactose et des degrés de bloc

Méthode	M/G	DB (%)	Références
Hydrolyse acide (H ₂ SO ₄) + colorimétrie	2,8±0,2		Launay 1997 ^[70]
HPAEC-PAD	Cassia C12	8,4	42,2
	Guar G26-D	3,9	36,8
	Guar G62	1,6	18,3
	Guar G64a	1,6	
	Guar G64b	1,6	15,3
	Guar G64c	1,6	14,9
	Guar G65	1,5	14,8
	Guar G66	1,5	17,3
	Guar G67a	1,5	11,5
	Guar G67b	1,5	10,8
	Guar G67c	1,5	11,6
	Guar G70	1,4	15,8
	Guar H80 ^c	1,2	6,4
	Caroube L29a	3,5	48,0
	Caroube L29b	3,5	32,9
	Caroube L29c	3,5	46,0
	Caroube L30	3,4	25,4
	Caroube L32	3,2	36,3
Mannane M2	48,5	67,4	
Tara T34	2,9	41,1	
Tara T35	2,9	29,6	
GC-FID	PJM	1,39	Azero 2002 ^[131]
HPLC-UV	Guar GG	1,39	34±3
	Tara TG	2,96	87±6
	Caroube C1	3,3 ^a	74 ^b
	Caroube C2	3,32 ^a	96,7 ^b
	Caroube C3	3,2 ^a	95,1 ^b
	Caroube C4	3,39 ^a	88,2 ^b
	Guar G1	1,52 ^a	30,3 ^b
	Guar G2	1,23 ^a	71,4 ^b
	Guar G3	1,45 ^a	32,9 ^b
	Guar G4	1,83 ^a	33,1 ^b
	Guar G5	1,44 ^a	46,7 ^b
	Guar G6	1,61 ^a	47 ^b

Le DB représente en pourcentage le nombre total de résidus mannose non-substitués par gramme de galactomannane. Pour le déterminer, Daas et collaborateurs, ont mis au point une hydrolyse enzymatique^[132] spécifique par l'endo β-D-Mannase (*Aspergillus niger-oryzae*^[135]). Cette enzyme à la particularité d'hydrolyser les liaisons osidiques type β(1→4). Les différents types de fragments sont classiquement quantifiés par HPLC^[132,133]. Il se calcule par la relation suivante :

$$DB = \sum_{i=1}^4 n_{x_i} \left[\frac{1}{\left(\frac{n_{mannose_total}}{m_{GM}} \right) \left(1 - \frac{DS}{100} \right)} \right] \times 100 \quad \text{Equation I.5}$$

Avec :

- n = Nombre de mole en μmol
- x_i = Fragment non substitué de mannose constitué de i unité(s) de mannose
- m_{GM} = Masse de galactomannane en gramme (g)

- DS = Degré de substitution en galactose

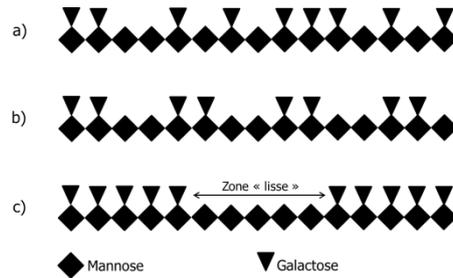


Figure I.13: Les différents types de distribution des unités galactose a) aléatoire b) régulier et c) par bloc

En fonction de la valeur du ratio M/G et de la manière dont sont réparties les unités de galactose, il peut être distingué trois types de distribution qui sont illustrées dans la **Figure I.13**. Il est à noter qu'il peut être observé différents types de distribution des unités galactose le long des chaînes de mannose dans la même classe de galactomannane comme démontré par Grisel et coéquipiers^[136] en s'inspirant des travaux de McCleary et Matheson^[137,138].

Ce paramètre généralement négligé peut se révéler important pour la compréhension des mécanismes d'interaction entre le xanthane et les galactomannanes proposés dans la littérature présentée dans le paragraphe **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

1.7.2.3. Propriétés des solutions de galactomannane

La solubilité des galactomannanes dans l'eau dépend fortement du nombre d'unités galactose. En effet, les unités galactose génèrent une gêne stérique et empêchent les chaînes de galactomannane d'interagir via des interactions intermoléculaires.

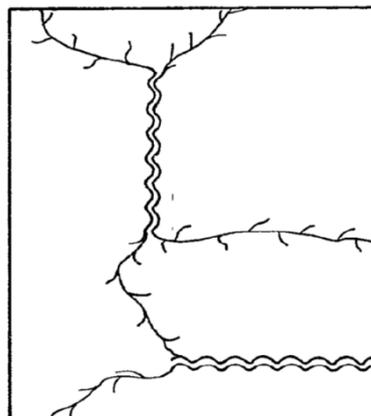


Figure I.14: Structure d'un gel de galactomannane proposé par Dea et collaborateurs^[57]

Les solutions aqueuses de galactomannane présentent un comportement type rhéofluidifiant^[139-142]. Les galactomannanes font partie du groupe des polysaccharides qui forment des pelotes statistiques

désordonnées en solution aqueuse^[143,144]. Néanmoins, les propriétés rhéologiques des gommés de galactomannane se trouvent être différentes de ce qui est généralement observé pour ce groupe de polysaccharides. En effet, contrairement à la majorité des polymères, la relation empirique de Cox-Merz ne s'applique pas aux galactomannanes et particulièrement aux basses fréquences et faibles taux de cisaillement^[143]; la même observation a été effectuée par Kulicke^[145] dans le cas des polyacrylamides dans l'eau également. Le mannose étant un épimère du glucose en C2, les chaînes de mannose peuvent former des zones cristallines^[146], comme pour la cellulose, stables et localisées (**Figure I.14**) expliquant en majeure partie la raison pour laquelle, les caroubes sont plus difficilement solubilisables dans l'eau que les guaras. Ces zones cristallines seraient la conséquence de la présence d'interactions intermoléculaires incarnées par des liaisons hydrogène préférentiellement localisées entre zones faiblement substituées en unité galactose^[146].

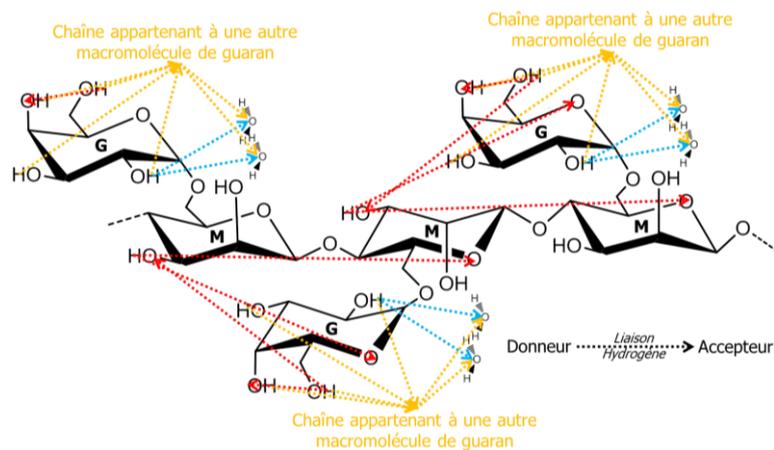


Figure I.15: Schématisation simplifiée des liaisons hydrogène (lignes discontinues) dans trois unités de répétition d'une macromolécule de guaran [M/G = 1,67 ; M = unités de β (1 \rightarrow 4)-mannopyranose et G = unités de α (1 \rightarrow 6)-D-galactopyranose] ; Liaisons hydrogènes intrachaine, interchaîne et ponts aqueux ; d'après les travaux de Chandrasekaran et coéquipiers^[147]

De même que pour le xanthane et toujours grâce à des expériences de DRX et de modélisations numériques, Chandrasekaran et collaborateurs^[147] ont proposé une représentation des liaisons hydrogène au sein d'une chaîne de guaran (M/G = 1,67 ; **Figure I.15**). Les longueurs des flèches sur la **Figure I.15** sont évidemment relatives étant données qu'elles ne respectent pas les longueurs et les angles dièdres déterminés par les deux auteurs. Contrairement au schéma proposé par Dea *et al.*^[57] (**Figure I.14**), les auteurs^[147] suggèrent dans le cas présent des liaisons hydrogène interchaîne entre les unités galactose pour expliquer en partie l'empilement des chaînes de guaran. Ces résultats restent cependant à prendre également avec des précautions car pour effectuer leurs calculs d'angle et de longueur de liaison ils ont imposé le fait que le guaran soit sous sa forme solide cristallin et non sous la forme d'une chaîne libre en solution aqueuse. De plus, ces calculs ont été effectués dans le cas particulier du guaran et non pas été réalisés pour une caroube, une tara, etc.

1.7.2.3.1. Approche viscosimétrique

De même que pour le xanthane, la viscosimétrie capillaire peut être utilisée pour déterminer les dimensions et les masses des galactomannanes en solution aqueuse.

1.7.2.3.1.1. Viscosité intrinsèque

De même que pour le xanthane, Il a été recensé de manière non exhaustive, dans le **Tableau I.6**, les valeurs de viscosité intrinsèque et de la constante de Huggins pour les galactomannanes en solution.

Tableau I.6: Valeurs de viscosités intrinsèques $[\eta]$ et de la constante de Huggins k_H

Méthode		Conditions exp.	$[\eta]$ (mL/g)	k_H	Références
Viscosimétrie capillaire	Guar G7	25° ?	1170	1,4	[141]
	Caroube L1		770	0,64	
	Caroube L2		930	0,72	
	Caroube L3		1010	0,86	
	Caroube L4		1120	0,89	
	Caroube L5		1000	1,12	
	Caroube L	Eau; 25°	1410	0,64	[70]
		0,34 M NaCl	980	0,55	
Guar G	Eau; 25°	1270	0,45		
	0,34 M NaCl	1060	0,55		
Low Shear	PJM	Eau; 25°C	940	0,78	[131]
Viscosimétrie capillaire	Caroube LBG	Eau; 25±0,1°C	1260	/	[148]
	Tara		1420		
	Guar	25°C; pH = 7	1639	0,79	[97]
		40°C; pH = 7	1607	0,73	
	Caroube	0,01 M NaCl; 35°	1010	0,9	[49]
	Guar		720	0,78	
	Caroube C1	0,01 M NaCl; 35°C	768	0,6	[90]
	Caroube C2		1170	1	
Guar G1	1260		0,91		
Guar G2	1490		0,81		

En comparaison avec le xanthane, les valeurs de $[\eta]$ des galactomannanes sont nettement inférieures. Il n'y a pas de différences notables cependant entre les différentes natures des galactomannanes étudiés. Une influence de la salinité peut être remarquée dans le cas des travaux de Launay et coéquipiers^[70] et plus spécifiquement dans le cas de la gomme de caroube. En effet, $[\eta]$ chute de ~ 1400 à 980 mL.g^{-1} . Il peut être noté également que la constante de Huggins k_H diminue également de 0,64 à 0,55 ce qui signifie que les conditions de solvatation sont moins bonnes en présence de sel. Les caroubes possédant par définition, moins d'unités galactose que les guar; les chaînes sont par conséquent moins bien solvatées étant donné que le sel ajouté monopolise des molécules d'eau. Dans cette configuration, les chaînes sont donc peu enclin à développer des

interactions polymère-solvant et leur sphère d'hydratation (V_H) s'en voit diminuer d'où la diminution de $[\eta]$ en présence de sel.

1.7.3.Cas des mélanges xanthane/galactomannane

Les mélanges à base de xanthane et de galactomannane (X/GM) présentent dans des conditions particulières un phénomène de synergie d'interaction entre les deux gommes se manifestant le plus souvent par une gélification accru du système^[57-76]. Le système xanthane/galactomannane en solution aqueuse présente, dans les conditions favorisant l'apparition de la synergie, des propriétés viscoélastiques nettement supérieures à la somme des propriétés viscoélastiques (modules G' et G'') des solutions de xanthane et de galactomannane étudiées séparément (**Figure I.16**).

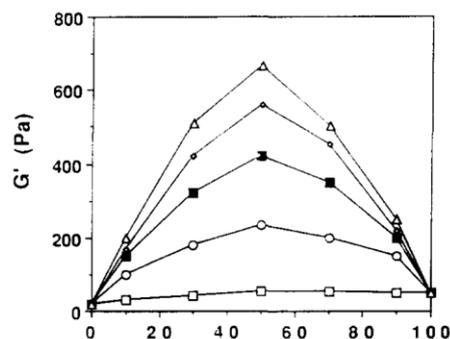


Figure I.16: Module de stockage G' en fonction du ratio xanthane/galactomannane des systèmes suivants (□) Xanthane/Guar à 25°C (○) Xanthane/Caroube à 10°C (■) Xanthane/Caroube à 40°C (◇) Xanthane/Caroube à 60°C et (△) Xanthane/Caroube à 80°C d'après Fernandes^[149]

De nombreux paramètres favorisant ou non le phénomène de synergie entre les deux polysaccharides doivent être déterminés tels que la connaissance des structures fines des gommes utilisées, la concentration, la température, etc. Ceux-ci peuvent s'avérer cruciaux dans la compréhension du phénomène de synergie et aider à décrypter les quelques désaccords observés entre les modèles d'interaction suggérés présentés dans les paragraphes suivants.

1.7.3.1.Modèles d'interaction

En raison des grandes variabilités structurales des gommes de xanthane et de galactomannane ; il n'est pas surprenant que les modèles d'interaction proposés dans la littérature^[57,58,60,150] soient parfois similaires ou montrent des désaccords. De plus, la non communication de certains auteurs sur les caractéristiques intrinsèques des gommes utilisées dans leurs travaux nous prive d'éléments de compréhension quant à l'association xanthane/galactomannane. Cependant, il a été mis en évidence des pistes intéressantes afin de lever les verrous sur la compréhension de la synergie d'interaction entre les gommes de xanthane et de galactomannane.

1.7.3.1.1. Influence de la structure des gommés

Suite à leurs résultats issus de l'activité optique et de la RMN, Dea^[57] et Morris^[150] ont postulé que le xanthane sous forme ordonnée (II) interagissait avec les zones dépourvues en substituants galactose des galactomannanes (zones lisses) types caroube ou guar (**Figure I.17a**). Ils se sont penchés sur l'impact de la nature du galactomannane étudié sans en étudier la structure fine et ont observé que la gomme de xanthane interagissait préférentiellement avec la gomme de caroube. Il faudra attendre quelques années plus tard avec McCleary^[137] qui étudia également l'association xanthane/Galactomannane en s'intéressant cette fois-ci à la structure fine des galactomannanes en procédant à des hydrolyses enzymatiques. Suite aux modes d'action des enzymes qu'il utilise, notamment la driselase β -D-mannanase. Il en déduit que les unités galactoses doivent nécessairement être placées du même côté le long des chaînes de mannose (**Figure I.17b**). Pour que le galactomannane adopte une telle conformation, les unités galactoses doivent être séparées par un nombre impair d'unités de mannose. Il en déduit également, après avoir analysé les produits de dégradation de la guar, le peu d'interaction qu'il y a entre le xanthane et la guar qui présente peu voire aucune zones non substituées en résidus galactose. Il est donc retrouvé à la suite de ces travaux l'idée de l'existence de zones lisses dans certains galactomannanes qui favoriseraient l'association avec la chaîne ordonnée du xanthane. Ses résultats se sont vus confirmer un peu plus tard par les travaux de McCleary et Matheson^[138] lors de l'étude de plusieurs modes d'action d'enzymes dont *Aspergillus niger* β -D-mannanase, sur des galactomannanes et le glucomannane.

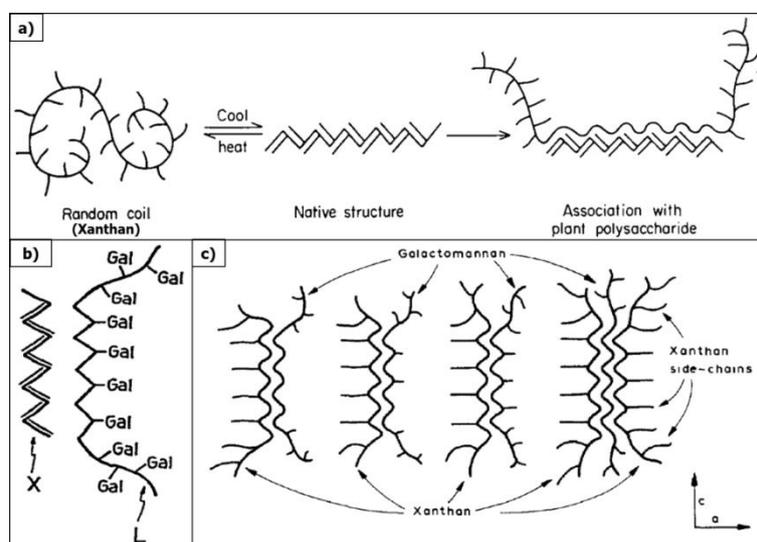


Figure I.17: Modèles d'interaction entre Xanthane et Galactomannanes a) proposés par Dea et Morris^[57] b) proposé par McCleary^[137] et c) proposé par Cairns^[60]

L'impact des zones lisses chez les galactomannanes est également proposé par les travaux de Cairns^[60] qui utilisa principalement les diffractions aux rayons X (DRX) pour caractériser l'association X/GM. Bien qu'il s'agisse toujours de l'association entre zones lisses des galactomannanes (zones de jonction) et une chaîne de xanthane; le xanthane est ici sous sa forme flexible (désordonnée). Il a

observé que le système géliait uniquement lorsque le xanthane était sous forme désordonnée d'où le modèle d'interaction (**Figure I.17c**) représentant le xanthane avec les chaînes latérales regroupées d'un même côté et différents types de galactomannane. Le quatrième schéma du modèle de Cairns représentant une chaîne de galactomannane entourée par deux chaînes de xanthane ("Sandwich") renforce l'idée de l'importance des zones lisses dans l'association xanthane/galactomannane. De plus, en comparaison avec les κ -carraghénanes et les furcellaranes, seules les systèmes à base de xanthane et de gomme de caroube ou de tara présentent des motifs de diffraction; les auteurs en ont conclu que la compatibilité entre le squelette cellulosique du xanthane et le squelette de mannose des caroubes ou des taras était un paramètre à ne pas négliger. Grisel et collaborateurs^[136] ont caractérisé finement les différentes gommes de caroube et de guar utilisées lors de leur étude en s'inspirant des travaux de McCleary^[137,138]. Leur caractérisation approfondie a notamment démontré que des galactomannanes d'une même nature peuvent avoir une distribution des résidus galactoses différente, ce qui est une confirmation des travaux de Daas^[132]. En effet, afin de caractériser la distribution des unités galactoses, deux paramètres se révèlent indispensables: le ratio M/G et le DB. Dans leurs travaux, Daas et collaborateurs^[132] ont montré que deux gommes de caroube, échantillons L29a et L29b (**Tableau I.5**), possédant toutes les deux une valeur de M/G égale à 3,5, elles ne possèdent pas la même valeur de DB ($\pm 1,5\%$), respectivement égales à 48% et 32,9%. Avec ces résultats, il serait légitime de penser qu'un xanthane n'interagira pas obligatoirement de la même manière avec deux galactomannanes appartenant à la même catégorie (caroubes, guar, tara, etc.).

Même si au cours de ces différents travaux présentés ci-dessus, il a été explicitement évoqué l'implication des interactions moléculaires entre le xanthane et les galactomannanes, ces dernières n'ont pas fait l'objet d'une caractérisation systématique afin de préciser leurs natures et leurs rôles dans le phénomène de synergie.

1.7.3.1.2. Du point de vue des interactions moléculaires ?

Dans un premier temps, l'identification des interactions impliquées lors de l'association xanthane/galactomannane a été étudié par plusieurs groupes de chercheurs^[49,109,121,136,151,152]. Chandrasekaran et Radha^[109] ont analysé des fibres de xanthane et de guaran seules et en mélange. Ils ont allié la modélisation moléculaire et les DRX afin de proposer trois modèles d'association. Ils ont discerné les éventuelles connections assurées par des liaisons hydrogène entre la chaîne principale^{et/ou} la chaîne latérale de xanthane et la chaîne de mannose du guaran. Les auteurs ont cherché à démontrer que les liaisons hydrogène seraient responsables des augmentations des propriétés viscoélastiques (augmentation de module de stockage G' notamment) observé dans la littérature. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs ont proposé un quatrième modèle où les liaisons hydrogène sont les plus nombreuses. La chaîne de xanthane et de guaran sont entrelacées formant une seule et même hélice (hélice hybride) donnant lieu à des liaisons hydrogène spécifiquement entre les résidus

galactose et les groupements acétate et pyruvate pouvant rigidifier cette hélice hybride. Il est à remarquer que leur représentation moléculaire de la chaîne de xanthane montre l'implication du groupement acétate du xanthane et des résidus galactose du guaran dans la stabilisation de cette hélice hybride via une série de liaisons hydrogène (**Figure I.18**).

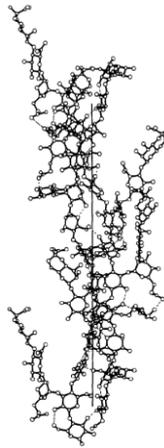


Figure I.18 : Représentation schématique du quatrième modèle d'interaction entre le xanthane et le guaran d'après Chandrasekaran et Radha^[109]

Une autre approche a consisté à étudier la rétention d'arômes dans des matrices xanthane/galactomannane^[121,151-153] afin de démontrer la présence d'interaction hydrophobes dans le système. Après avoir montré l'influence de la concentration en xanthane sur la rétention d'arôme^[154] dans une étude précédente, Secouard et al.^[121] ont montré que le limonène qu'ils ont utilisé comme sonde moléculaire apolaire était plus retenue dans les matrices xanthane/caroube que dans les matrices xanthane/guar. Ces résultats corroborent le fait que l'association entre le xanthane et la caroube est plus intense. Le fait que cette molécule apolaire soit retenue dans des proportions synergétiques prouve bien qu'il y a création de microdomaines hydrophobes. Ces résultats furent confirmés par la suite par les travaux de Jouquand^[151,153] et ceux de Y. Aguni^[90], avec comme sonde moléculaire l'ethyl décanoate, qui soulignent aussi la participation éventuelle des protéines intrinsèques à l'édification de ces domaines hydrophobes. Le fait que la rétention d'arômes soit moins prononcée dans les matrices xanthane/guar peut provenir de possibles phénomènes de démixtion ayant lieu entre les deux polyosides. En effet, C. Schorsch^[114] a mis en évidence une séparation de phase (auto-organisation du xanthane en solution) suite à des observations réalisées à l'aide la microscopie à lumière polarisée. Néanmoins, il n'a pas été possible de voir un tel déphasage par microscopie de fluorescence (deux marqueurs fluorescents différents liés de manière covalente à chacun des deux polymères) à cette échelle d'observation. Ces résultats furent confirmés par les travaux de Y. Aguni^[90] qui a étudié les propriétés intrinsèques des gommés de xanthane et de galactomannane seules et en mélange en régime dilué. En utilisant les paramètres d'interaction établis par Cragg et Bigelow^[155] ($\Delta k'$), il a pu en déduire qu'il y avait très peu d'interactions dans les systèmes xanthane/guar et parle même d'incompatibilité entre le xanthane et la guar.

1.7.3.1.3. Cas particulier X/GM avec X déacétylé

Dea et coéquipiers^[57] font partie de l'une des premières équipes de chercheurs à avoir remarqué que la déacétylation du xanthane en présence de gomme de caroube renforçait la gélification du système. De même, suite à des analyses rhéologiques, Tako^[58] et son équipe ont trouvé que la valeur du module de stockage (G') des mélanges aqueux xanthane/caroube était deux fois plus élevée dans le cas où le xanthane est déacétylé. Suite à des travaux antérieurs concernant le xanthane seul en solution^[107], ils ont mis en évidence le fait que la chaîne latérale était plus mobile après avoir subi une déacétylation. Par conséquent, la chaîne latérale étant plus labile, ils ont émis l'hypothèse que cette dernière était plus apte à se déformer pour bien s'inclure entre les motifs galactose de la gomme de caroube et de ce fait maximiser l'association des deux polysaccharides qui adopteraient une conformation type "Clef-Serrure" (**Figure I.19**).

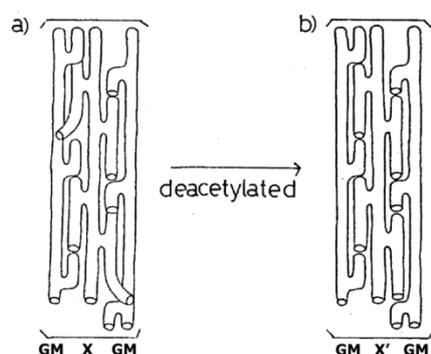


Figure I.19: Modèle "Clef-Serrure" proposé par Tako^[58] entre le galactomannane (GM) et le a) xanthane (X) non modifié b) Xanthane (X') déacétylé

En 2016, un autre groupe de chercheurs japonais composé de Takemasa et Nishinari^[76] ont investigué les mécanismes d'interaction entre un xanthane déacétylé et une gomme de caroube au niveau moléculaire en réalisant des expériences de RMN NOESY bidimensionnelle (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). La RMN NOESY permet concrètement d'identifier la proximité spatiale entre deux noyaux d'hydrogène distants, et ce jusqu'à 4,5Å^[156]. Ils ont observé des tâches de corrélation entre les protons anomériques des unités mannose et galactose issues des galactomannanes et les protons du méthyl appartenant au groupement pyruvate. Leurs travaux innovants posent éventuellement la première pierre à l'édifice pour la compréhension des mécanismes d'interaction xanthane/galactomannane malgré le fait que le xanthane et la gomme de caroube étudiés aient été modifiés, par réduction du degré de polymérisation. Les masses molaires des deux gommes étant trop importantes (ordre de grandeur $\sim 10^6$ g.mol⁻¹) et rendant par conséquent l'acquisition des signaux en RMN difficile, voire impossible, les auteurs ont procédé à des réductions des masses (M_w) par irradiation sonore (ou sonication) pour le xanthane et par hydrolyse enzymatique pour la gomme de caroube afin d'obtenir des échantillons ayant des masses molaires diminuées d'un ordre de grandeur ($\sim 10^5$ g.mol⁻¹). De plus, l'échantillon de xanthane utilisé est un xanthane préalablement déacétylé

(avant ultrasonication) car il a été montré par Tako et collaborateurs^[66,107] que la gélification du système était plus importante dans ses conditions. Ainsi, Takemasa et Nishinari^[76] ont souhaité maximiser leur chance de mettre en évidence un signal caractéristique de la présence d'interaction spatiale entre proton tout en travaillant avec un échantillon de xanthane pas assez représentatif des xanthanes naturels (non modifiés).

Conclusion du Chapitre I

Le grand intérêt porté sur ces polymères naturels par les industriels a suscité et suscite encore de nombreuses études afin de lever les verrous sur les mécanismes d'interaction qui restent encore sujet à discussion. Nombre de ces études sur les mélanges xanthane/galactomannane s'appuient sur des observations réalisées à l'échelle macroscopique pour comprendre des mécanismes ayant lieu à l'échelle moléculaire; ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi le débat est toujours ouvert. De plus, ces deux gommés présentent toutes les deux une grande variabilité structurale qui ne facilite pas ce débat.

De même, un grand intérêt s'est développé à l'étude des interactions moléculaires car elles sont parfois la clef pour comprendre certains phénomènes physico-chimiques qui restent encore à ce jour soit méconnus soit toujours sujet à débat. Mais leur caractérisation en solution aqueuse reste peu aisée et très peu développée. Des techniques telles que l'AFM, les spectroscopies IR, Raman, RMN ou encore les techniques de diffusion des neutrons et diffraction des rayons X permettent de mettre en évidence chacune un ou plusieurs types d'interaction moléculaire. Mais l'emploi de ces techniques, aussi efficaces soient elles, imposent généralement une préparation d'échantillon qui perturbe irréversiblement ou dénature le ou les solutés analysés.

Un des objectifs principaux de ces travaux de thèse consiste justement à mettre au point une méthodologie innovante afin de caractériser les différents types d'interactions en solution aqueuse et ceux à l'échelle moléculaire le tout sans dénaturer le ou les systèmes étudiés.

Une fois cette méthodologie mise en place, elle sera appliquée à l'étude des mélanges xanthane/galactomannane (X/GM) afin d'accroître notre compréhension sur les mécanismes d'association ayant lieu lors de la synergie entre le xanthane et les galactomannanes.

Références bibliographiques

- [1] M. Fontanille, Y. Gnanou, *Chimie et physico-chimie des polymères*, Dunod, Paris, **2014**.
- [2] A. Gerschel, *Liaisons intermoléculaires: Les forces en jeu dans la matière condensée*, **1995**.
- [3] S. M. Notley, B. Pettersson, L. Wågberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13930–13931.
- [4] H. C. Hamaker, *Physica* **1937**, *10*, 1058–1072.
- [5] G. Némethy, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1967**, *6*, 195–206.
- [6] D. Chandler, *Nature* **2005**, *437*, 640–647.
- [7] R. H. Garrett, C. M. Grisham, B. Lubochinsky, *Biochimie*, De Boeck Université, Paris, **2000**.
- [8] K. A. Sharp, B. Madan, *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 4343–4348.
- [9] P. W. Atkins, J. De Paula, *Chimie Physique*, De Boeck, Bruxelles, **2013**.
- [10] T. F. Tadros, *An Introduction to Surfactants*, De Gruyter, Berlin ; Boston, **2014**.
- [11] G. Wanka, H. Hoffmann, W. Ulbricht, *Macromolecules* **1994**, *27*, 4145–4159.
- [12] A. Kato, S. Nakai, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1980**, *624*, 13–20.
- [13] N. Alizadeh-Pasdar, E. C. Y. Li-Chan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 328–334.
- [14] P. K. Vinson, J. R. Bellare, H. T. Davis, W. G. Miller, L. E. Scriven, *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142*, 74–91.
- [15] A. Meister, A. Blume, *Polymers* **2017**, *9*, 521.
- [16] J. Raybin, J. Ren, X. Chen, R. Gronheid, P. F. Nealey, S. J. Sibener, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 7717–7723.
- [17] G. R. Desiraju, T. Steiner, *The Weak Hydrogen Bond: In Structural Chemistry and Biology*, Oxford University Press, Oxford, **2001**.
- [18] E. Arunan, G. R. Desiraju, R. A. Klein, J. Sadlej, S. Scheiner, I. Alkorta, D. C. Clary, R. H. Crabtree, J. J. Dannenberg, P. Hobza, H. G. Kjaergaard, A. C. Legon, B. Mennucci, D. J. Nesbitt, *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83*, DOI 10.1351/PAC-REP-10-01-01.
- [19] R. F. Greene, C. N. Pace, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 5388–5393.
- [20] Z. S. Derewenda, L. Lee, U. Derewenda, *Journal of Molecular Biology* **1995**, *252*, 248–262.
- [21] A. Jaishankar, M. Wee, L. Matia-Merino, K. K. T. Goh, G. H. McKinley, *Carbohydrate Polymers* **2015**, *123*, 136–145.
- [22] D. Tareste, F. Pincet, E. Perez, S. Rickling, C. Mioskowski, L. Lebeau, *Biophysical Journal* **2002**, *83*, 3675–3681.
- [23] A. M. Sweetman, S. P. Jarvis, H. Sang, I. Lekkas, P. Rahe, Y. Wang, J. Wang, N. R. Champness, L. Kantorovich, P. Moriarty, *Nature Communications* **2014**, *5*, DOI 10.1038/ncomms4931.
- [24] Y. Maréchal, H. Chanzy, *Journal of Molecular Structure* **2000**, *523*, 183–196.
- [25] F. Cavillon, Caractérisation de La Liaison Hydrogène Dans Des Systèmes Moléculaires d'intérêt Biologique Par Diffusion de Neutrons, Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille I, **2004**.
- [26] F. Cordier, S. Grzesiek, *Journal of Molecular Biology* **2002**, *317*, 739–752.
- [27] G. S. Kapur, E. J. Cabrita, S. Berger, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 7181–7185.
- [28] A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, Y. Guinet, A. Hédoux, L. Paccou, D. Prévost, M. Descamps, *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 881–887.
- [29] S. P. Rogovin, R. F. Anderson, M. C. Cadmus, *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* **1961**, *3*, 51–63.
- [30] A. Jeanes, J. E. Pittsley, F. R. Senti, *Journal of Applied Polymer Science* **1961**, *5*, 519–526.
- [31] C. Ornelas-Megiatto, P. R. Wich, J. M. J. Fréchet, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 1902–1905.
- [32] J. Fan, A. G. Wright, B. Britton, T. Weissbach, T. J. G. Skalski, J. Ward, T. J. Peckham, S. Holdcroft, *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 1089–1093.
- [33] H. Fukuda, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1980**, *53*, 837–840.
- [34] J. Kötz, S. Kosmella, *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, *168*, 505–513.
- [35] A. Haug, O. Smidsrød, B. Larsen, S. Gronowitz, R. A. Hoffman, A. Westerdahl, *Acta Chemica Scandinavica* **1965**, *19*, 341–351.
- [36] O. Smidsrød, A. Haug, B. Larsen, S. Gronowitz, R. A. Hoffman, A. Westerdahl, *Acta Chemica Scandinavica* **1965**, *19*, 329–340.

- [37] A. F. Thünemann, M. Müller, H. Dautzenberg, J.-F. Joanny, H. Löwen, in *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II* (Ed.: M. Schmidt), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2004**, pp. 113–171.
- [38] J. Chen, J. A. Heitmann, M. A. Hubbe, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, *223*, 215–230.
- [39] R. M. Fuoss, U. P. Strauss, *J. Polym. Sci.* **1948**, *3*, 602–603.
- [40] S. T. Dubas, J. B. Schlenoff, *Langmuir* **2001**, *17*, 7725–7727.
- [41] V. Riffet, Interactions non-covalentes et propriétés physico-chimiques de petits systèmes biologiques: approches théoriques, Ecole Polytechnique, **2014**.
- [42] A. Arnaud, L. Bouteiller, *Langmuir* **2004**, *20*, 6858–6863.
- [43] G. Bai, L. M. N. B. F. Santos, M. Nichifor, A. Lopes, M. Bastos, *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 405–413.
- [44] L. Aberkane, J. Jasniewski, C. Gaiani, J. Scher, C. Sanchez, *Langmuir* **2010**, *26*, 12523–12533.
- [45] C. Song, S. Zhang, H. Huang, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, DOI 10.3389/fmicb.2015.01049.
- [46] P. G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., **1979**.
- [47] M. L. Huggins, *Journal of the American Chemical Society* **1942**, *64*, 2716–2718.
- [48] L. Utracki, R. Simha, *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* **1963**, *1*, 1089–1098.
- [49] S. Secouard, Rétenion du limonène au sein de matrices polysaccharidiques à base de xanthane et de galactomannanes, Université Le Havre, **2004**.
- [50] Y. Ren, P. R. Ellis, S. B. Ross-Murphy, Q. Wang, P. J. Wood, *Carbohydrate Polymers* **2003**, *53*, 401–408.
- [51] Y. Ren, P. R. Ellis, I. W. Sutherland, S. B. Ross-Murphy, *Carbohydrate Polymers* **2003**, *52*, 189–195.
- [52] A. Benchabane, K. Wilfried Ebagninin, K. Benyounes, K. Bekkour, *Concentrations critiques dans les solutions de polymère. Application sur les solutions aqueuses de PEO et de CMC*, Conference Paper · January 2007 with 248 Reads Conference: 42ème Colloque Annuel Du Groupe Français De Rhéologie - Rhéologie Des Systèmes Évolutifs, At Clermont-Ferrand (France), **2007**.
- [53] M. M. Cross, *Journal of Colloid Science* **1965**, *20*, 417–437.
- [54] Benchabane, Etude Du Comportement Rhéologique de Mélanges Argiles - Polymères. Effets de l'ajout de Polymères, Strasbourg 1, **2006**.
- [55] A. A. Agoub, A. M. Smith, P. Giannouli, R. K. Richardson, E. R. Morris, *Carbohydrate Polymers* **2007**, *69*, 713–724.
- [56] I. Santacruz, C. Baudín, M. I. Nieto, R. Moreno, *Journal of the European Ceramic Society* **2003**, *23*, 1785–1793.
- [57] I. C. M. Dea, E. R. Morris, D. A. Rees, E. J. Welsh, H. A. Barnes, J. Price, *Carbohydrate Research* **1977**, *57*, 249–272.
- [58] M. Tako, A. Asato, S. Nakamura, *Agricultural and Biological Chemistry* **1984**, *48*, 2995–3000.
- [59] M. Tako, S. Nakamura, *Carbohydrate Research* **1985**, *138*, 207–213.
- [60] P. Cairns, M. J. Miles, V. J. Morris, G. J. Brownsey, *Carbohydrate Research* **1987**, *160*, 411–423.
- [61] G. Cuvelier, C. Tonon, B. Launay, *Food Hydrocolloids* **1987**, *1*, 583–585.
- [62] N. W. H. Cheetham, E. N. M. Mashimba, *Carbohydrate Polymers* **1988**, *9*, 195–212.
- [63] G. Cuvelier, B. Launay, *Carbohydrate Polymers* **1988**, *8*, 271–284.
- [64] K. P. Shatwell, I. W. Sutherland, S. B. Ross-Murphy, I. C. M. Dea, *Carbohydrate Polymers* **1990**, *14*, 29–51.
- [65] K. P. Shatwell, I. W. Sutherland, S. B. Ross-Murphy, I. C. M. Dea, *Carbohydrate Polymers* **1990**, *14*, 115–130.
- [66] M. Tako, *Carbohydrate Polymers* **1991**, *16*, 239–252.
- [67] R. O. Mannion, C. D. Melia, B. Launay, G. Cuvelier, S. E. Hill, S. E. Harding, J. R. Mitchell, *Carbohydrate Polymers* **1992**, *19*, 91–97.
- [68] D. F. Zhan, M. J. Ridout, G. J. Brownsey, V. J. Morris, *Carbohydrate Polymers* **1993**, *21*, 53–58.
- [69] T. M. B. Bresolin, P. C. Sander, F. Reicher, M. R. Sierakowski, M. Rinaudo, J. L. M. S. Ganter, *Carbohydrate Polymers* **1997**, *33*, 131–138.
- [70] B. Launay, G. Cuvelier, S. Martinez-Reyes, *Carbohydrate Polymers* **1997**, *34*, 385–395.
- [71] C. Schorsch, C. Garnier, J.-L. Doublier, *Carbohydrate Polymers* **1997**, *34*, 165–175.

- [72] J. A. Casas, F. García-Ochoa, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, *79*, 25–31.
- [73] J. Higiro, T. J. Herald, S. Alavi, *Food Research International* **2006**, *39*, 165–175.
- [74] J. Higiro, T. J. Herald, S. Alavi, S. Bean, *Food Research International* **2007**, *40*, 435–447.
- [75] F. Renou, O. Petibon, C. Malhiac, M. Grisel, *Food Hydrocolloids* **2013**, *32*, 331–340.
- [76] M. Takemasa, K. Nishinari, *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120*, 3027–3037.
- [77] E. I. Sandvik, J. M. Maerker, in *Extracellular Microbial Polysaccharides* (Eds.: P.A. Sandford, A. Laskin), AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D. C., **1977**, pp. 242–264.
- [78] I. Lazar, I. G. Petrisor, T. F. Yen, *Petroleum Science and Technology* **2007**, *25*, 1353–1366.
- [79] P. Jansson, L. Kenne, B. Lindberg, *Carbohydrate Research* **1975**, *45*, 275–282.
- [80] L. D. Melton, L. Mindt, D. A. Rees, *Carbohydrate Research* **1976**, *46*, 245–257.
- [81] M. C. Cadmus, C. A. Knutson, A. A. Lagoda, J. E. Pittsley, K. A. Burton, *Biotechnology and Bioengineering* **1978**, *20*, 1003–1014.
- [82] J. A. Casas, V. E. Santos, F. García-Ochoa, *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, *26*, 282–291.
- [83] F. Kamal, H. Mehrgan, M. M. Assadi, S. A. Mortazavi, *Iranian Biomedical Journal* **2003**, *7*, 91–98.
- [84] N. E. Harding, J. M. Cleary, D. K. Cabañas, I. G. Rosen, K. S. Kang, *Journal of Bacteriology* **1987**, *169*, 2854–2861.
- [85] W. C. Wernau, *Xanthomonas Bipolymer for Use in Displacement of Oil from Partially Depleted Reservoirs*, **1981**, US4296203 A.
- [86] I. J. Bradshaw, B. A. Nisbet, M. H. Kerr, I. W. Sutherland, *Carbohydrate Polymers* **1983**, *3*, 23–38.
- [87] I. H. Smith, K. C. Symes, C. J. Lawson, E. R. Morris, *International Journal of Biological Macromolecules* **1981**, *3*, 129–134.
- [88] M. Milas, M. Rinaudo, *Carbohydrate Research* **1986**, *158*, 191–204.
- [89] C. Esquenet, Propriétés Structurales et Dynamiques Des Solutions de Polyélectrolytes Rigides et Semi-Rigides et de Polysaccharides Associatifs, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, **2003**.
- [90] Y. Aguni, Contribution à la compréhension des mécanismes d'interaction xanthane/galactimannane, Université Le Havre, **2009**.
- [91] M. Milas, M. Rinaudo, *Carbohydrate Research* **1986**, *158*, 191–204.
- [92] I. Capron, Traitement thermique des moûts de fermentation et organisation moléculaire du xanthane, conséquence rhéologique, Université de Rouen, **1996**.
- [93] J. Lecourtier, G. Chauveteau, G. Muller, *International Journal of Biological Macromolecules* **1986**, *8*, 306–310.
- [94] F. Callet, M. Milas, M. Rinaudo, *Carbohydrate Polymers* **1989**, *11*, 127–137.
- [95] K. Kawakami, Y. Okabe, T. Norisuye, *Carbohydrate Polymers* **1990**, *14*, 189–203.
- [96] I. Capron, G. Brigand, G. Muller, *International Journal of Biological Macromolecules* **1998**, *23*, 215–225.
- [97] H.-C. Lee, D. A. Brant, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 742–753.
- [98] P. Foss, *Carbohydrate Polymers* **1987**, *7*, 421–433.
- [99] A. Gamini, J. de Bleijser, J. C. Leyte, *Carbohydrate Research* **1991**, *220*, 33–47.
- [100] G. Holzwarth, J. Ogletree, *Carbohydrate Research* **1979**, *76*, 277–280.
- [101] I. T. Norton, D. M. Goodall, S. A. Frangou, E. R. Morris, D. A. Rees, *Journal of Molecular Biology* **1984**, *175*, 371–394.
- [102] W. Liu, T. Sato, T. Norisuye, H. Fujita, *Carbohydrate Research* **1987**, *160*, 267–281.
- [103] E. Pelletier, C. Viebke, J. Meadows, P. A. Williams, *Biopolymers* **2001**, *59*, 339–346.
- [104] R. Moorhouse, M. D. Walkinshaw, S. Arnott, in *Extracellular Microbial Polysaccharides* (Eds.: P.A. Sandford, A. Laskin), AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D. C., **1977**, pp. 90–102.
- [105] M. Milas, M. Rinaudo, *Carbohydrate Research* **1979**, *76*, 189–196.
- [106] A. Bejenariu, M. Popa, L. Picton, D. Le Cerf, *Revue Roumaine de Chimie* **2010**, *55*, 147–152.
- [107] M. Tako, S. Nakamura, *Agricultural and Biological Chemistry* **1984**, *48*, 2987–2993.
- [108] R. P. Millane, B. Wang, *Carbohydrate Polymers* **1990**, *13*, 57–68.
- [109] R. Chandrasekaran, A. Radha, *Carbohydrate Polymers* **1997**, *32*, 201–208.
- [110] N. B. Wyatt, M. W. Liberatore, *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *114*, 4076–4084.
- [111] A. V. Dobrynin, R. H. Colby, M. Rubinstein, *Macromolecules* **1995**, *28*, 1859–1871.
- [112] T. Lim, J. T. Uhl, R. K. Prud'homme, *Journal of Rheology* **1984**, *28*, 367–379.
- [113] J. O. Carnali, *J. Appl. Polym. Sci.* **1991**, *43*, 929–941.

- [114] C. Schorsch, Etude rhéologique et structurale des mélanges gomme xanthane/gomme guar, Université Paris IX; ENSIA, **1995**.
- [115] C. Allain, J. Lecourtier, G. Chauveteau, *Rheol Acta* **1988**, *27*, 255–262.
- [116] T. M. B. Bresolin, M. Milas, M. Rinaudo, J. L. M. S. Ganter, *International Journal of Biological Macromolecules* **1998**, *23*, 263–275.
- [117] P. J. Flory, *Macromolecules* **1978**, *11*, 1138–1141.
- [118] M. Milas, M. Rinaudo, B. Tinland, *Polymer Bulletin* **1985**, *14*, 157–164.
- [119] G. Cuvelier, B. Launay, *Carbohydrate Polymers* **1986**, *6*, 321–333.
- [120] R. Dhami, S. E. Harding, T. Jones, T. Hughes, J. R. Mitchell, K. To, *Carbohydrate Polymers* **1995**, *27*, 93–99.
- [121] S. Secouard, M. Grisel, C. Malhiac, *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 1237–1244.
- [122] C.-E. Brunchi, S. Morariu, M. Bercea, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *122*, 512–519.
- [123] M. A. Masuelli, *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry* **2014**, *2*, 37–43.
- [124] G. Chauveteau, *Journal of Rheology* **1982**, *26*, 111–142.
- [125] N. K. O. Ojijo, E. Shimoni, *Journal of Texture Studies* **2007**, *38*, 100–115.
- [126] P. A. J. Gorin, J. F. T. Spencer, *Canadian Journal of Chemistry* **1968**, *46*, 2299–2304.
- [127] V. D. Prajapati, G. K. Jani, N. G. Moradiya, N. P. Randeria, B. J. Nagar, N. N. Naikwadi, B. C. Variya, *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *60*, 83–92.
- [128] M. A. Cerqueira, A. C. Pinheiro, B. W. S. Souza, Á. M. P. Lima, C. Ribeiro, C. Miranda, J. A. Teixeira, R. A. Moreira, M. A. Coimbra, M. P. Gonçalves, A. A. Vicente, *Carbohydrate Polymers* **2009**, *75*, 408–414.
- [129] E. R. Morris, *Food Gels*, Springer Netherlands, Dordrecht, **1990**.
- [130] J. P. Doyle, P. Giannouli, E. J. Martin, M. Brooks, E. R. Morris, *Carbohydrate Polymers* **2006**, *64*, 391–401.
- [131] E. G. Azero, C. T. Andrade, *Polymer Testing* **2002**, *21*, 551–556.
- [132] P. J. H. Daas, H. A. Schols, H. H. J. de Jongh, *Carbohydrate Research* **2000**, *329*, 609–619.
- [133] N. Tapie, C. Malhiac, N. Hucher, M. Grisel, *Journal of Chromatography A* **2008**, *1181*, 45–50.
- [134] P. J. H. Daas, K. Meyer-Hansen, H. A. Schols, G. A. De Ruiter, A. G. J. Voragen, *Carbohydrate Research* **1999**, *318*, 135–145.
- [135] K.-E. Eriksson, M. Winell, B. Larsen, A. Haug, J. Paasivirta, *Acta Chemica Scandinavica* **1968**, *22*, 1924–1934.
- [136] M. Grisel, Y. Aguni, F. Renou, C. Malhiac, *Food Hydrocolloids* **2015**, *51*, 449–458.
- [137] B. B. McCleary, *Carbohydrate Research* **1979**, *71*, 205–230.
- [138] B. V. McCleary, E. Nurthen, F. R. Tarevel, J.-P. Joseleau, *Carbohydrate Research* **1983**, *118*, 91–109.
- [139] A. M. Elfak, G. Pass, G. O. Phillips, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1979**, *30*, 439–444.
- [140] L. Ben-Kerrou, *International Journal of Pharmaceutics* **1980**, *5*, 59–65.
- [141] J. L. Doublier, B. Launay, *Journal of Texture Studies* **1981**, *12*, 151–172.
- [142] W. Sittikijyothin, D. Torres, M. P. Gonçalves, *Carbohydrate Polymers* **2005**, *59*, 339–350.
- [143] E. R. Morris, A. N. Cutler, S. B. Ross-Murphy, D. A. Rees, J. Price, *Carbohydrate Polymers* **1981**, *1*, 5–21.
- [144] E. R. Morris, *Carbohydrate Polymers* **1990**, *13*, 85–96.
- [145] W.-M. Kulicke, R. S. Porter, *Rheologica Acta* **1980**, *19*, 601–605.
- [146] J. E. Fox, in *Thickening and Gelling Agents for Food* (Ed.: A.P. Imeson), Springer US, Boston, MA, **1997**, pp. 262–283.
- [147] R. Chandrasekaran, A. Radha, K. Okuyama, *Carbohydrate Research* **1998**, *306*, 243–255.
- [148] D. R. Picout, S. B. Ross-Murphy, K. Jumel, S. E. Harding, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 761–767.
- [149] P. B. Fernandes, *Journal of Food Engineering* **1995**, *24*, 269–283.
- [150] E. R. Morris, D. A. Rees, G. Young, M. D. Walkinshaw, A. Darke, *Journal of Molecular Biology* **1977**, *110*, 1–16.
- [151] C. Jouquand, Y. Aguni, C. Malhiac, M. Grisel, *Food Hydrocolloids* **2008**, *22*, 1097–1104.
- [152] S. Secouard, C. Malhiac, M. Grisel, B. Decroix, *Food Chemistry* **2003**, *82*, 227–234.
- [153] C. Jouquand, C. Malhiac, M. Grisel, in *Developments in Food Science*, Elsevier, **2006**, pp. 421–424.
- [154] S. Secouard, C. Malhiac, M. Grisel, B. Decroix, *Food Chemistry* **2003**, *82*, 227–234.

- [155] L. H. Cragg, C. C. Bigelow, *Journal of Polymer Science* **1955**, *16*, 177–191.
- [156] H. N. Cheng, T. G. Neiss, *Polymer Reviews* **2012**, *52*, 81–114.
- [157] V. K. Srinivasan, *International Journal of Mathematical Education in Science and Technology* **2010**, *41*, 979–990.
- [158] E. C. Cho, *Applied Mathematics Letters* **1995**, *8*, 71–73.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

2. La gomme de xanthane	68
2.1. Les gommages de galactomannane	68
2.2. Préparation des solutions et des mélanges	68
2.2.1. Préparation de la solution de tampon phosphate saline	68
2.2.2. Préparation de la solution mère de xanthane	68
2.2.2.1. Siccité de la solution mère de xanthane	69
2.2.3. Préparation des solutions mères de galactomannane	70
2.2.3.1. Etape de purification	70
2.2.3.2. Siccité des solutions mères de galactomannane	71
2.2.4. Préparation des mélanges X/GM	72
2.3. Caractéristiques des gommages	72
2.3.1. Dosage de protéines	72
2.3.2. Détermination des masses moléculaires	72
2.3.2.1. Calcul de M_v pour X	73
2.3.2.2. Calcul de M_v pour GdC1	73
2.3.3. Gomme de xanthane	74
2.3.3.1. Principe de la résonance magnétique nucléaire du proton	74
2.3.3.2. Calcul des fonctions acétate et pyruvate	75
2.3.3.3. Détermination de la température de transition conformationnelle	76
2.3.3.4. Principe de la polarimétrie	76
2.3.3.5. Mesure de T_m par rhéologie	78
2.3.3.6. Conclusion	79
2.3.4. Gomme de galactomannane	79
2.3.4.1. Détermination des ratios M/G et des DB	79
2.3.5. Récapitulatif des caractéristiques des gommages étudiées	80
2.4. Caractérisation des interactions à l'échelle microscopique	81
2.4.1. Principe de la fluorescence	81
2.4.1.1. Interactions dipôle-dipôle et hydrophobie du milieu	85
2.4.1.1.1. Préparation de la solution mère d'ANS	85
2.4.1.1.2. Dosage de la solution mère d'ANS	85
2.4.1.1.3. Conditions des analyses de fluorescence	86
2.4.1.1.4. Traitement des données brutes	86
2.4.1.2. Réseau de liaisons H (3HQ-Bf)	86
2.4.1.2.1. Synthèse de la sonde 3HQ-Bf	87
2.4.1.2.2. Dosage de la solution mère de 3HQ-Bf	87
2.4.1.2.3. Conditions des analyses de fluorescence	88
2.4.1.2.4. Traitement des données brutes	89
2.5. Caractérisation des systèmes X/GM à l'échelle macroscopique	89
2.5.1. Principe de la rhéologie	89
2.5.2. Analyses sur 50h (t_0 à 50h)	94
2.5.3. Analyses sur deux échelles de temps	94
2.5.3.1. Analyses aux temps courts (Fraction A $\Rightarrow t_0$ à 4h)	94
2.5.3.2. Analyses aux temps longs (Fraction B $\Rightarrow t > 47h$)	95
Références bibliographiques	96

Ce Chapitre II énumère les échantillons de gomme de xanthane et de gommes de galactomannane utilisés, leur préparation et relate les différentes techniques analytiques utilisées lors de ce projet.

2. La gomme de xanthane

Durant ce projet, une seule gomme de xanthane fournie par Degussa (Cargill France) fut utilisée. L'échantillon de xanthane est noté X dans les manuscrits des publications qui sont dans les chapitres III et IV.

2.1. Les gommes de galactomannane

Quatre échantillons de galactomannane, deux gommes de caroube et deux gommes guar, furent utilisés lors de ce projet et sont listés dans le **Tableau II.7**.

Tableau II.7: Echantillons de galactomannane

Nom	Notation française	Notation anglaise*	Fournisseurs
Gomme de caroube 1	GdC1	LBG1	Viscogum Bj Degussa
Gomme de caroube 2	GdC2	LBG2	Farine de caroube SBI
Gomme guar 1	GG1	GG1	Meryprodor 100 Danisco
Gomme guar 2	GG2	GG2	Farine de guar SBI

*Dans les manuscrits des publications figurant dans les Chapitres III et IV; LBG = Locust Bean Gum et GG = Guar Gum

2.2. Préparation des solutions et des mélanges

2.2.1. Préparation de la solution de tampon phosphate saline

Une solution de tampon phosphate (NaH_2PO_4) provenant de la société Rhône Poulenc et contenant du sel de chlorure de sodium (NaCl) provenant du fournisseur Labogros est préparée afin de fixer le pH à 7,4 et de maintenir le xanthane sous sa forme ordonnée semi-rigide. Les concentrations NaH_2PO_4 et en NaCl sont respectivement de 0,02M et 0,01M.

2.2.2. Préparation de la solution mère de xanthane

Pour préparer 250g d'une solution mère de gomme de xanthane purifiée à ~1,3% en masse, il a été utilisé le protocole suivant :

Il faut peser une masse de xanthane de 3,75g environ exactement. Il est pesé 246,15g de solution tampon saline (0,02M NaH_2PO_4 et 0,01M NaCl ; pH =7,4 ; section II.3.1) dans un bécher métallique.

Le bécher métallique est placé dans un bain-marie d'eau froide pour éviter tout échauffement pendant l'agitation mécanique. L'agitateur mécanique (IKA LaboTechnik) est descendu de telle sorte que la pâle soit au centre dans la solution. Au début, l'agitation est mise en fonctionnement à basse vitesse. Il est introduit dans le bécher les 0,1 g (400 ppm) d'azoture de sodium (NaN_3) pour éviter toute prolifération bactérienne. Il est ensuite introduit progressivement à l'aide d'une spatule la poudre de xanthane purifiée en la saupoudrant. Au fur et mesure que la poudre de xanthane est introduite, la vitesse d'agitation est augmentée jusqu'à atteindre au final 19 200 tours/min. La solution est laissée sous agitation pendant 6h à température ambiante. La solution est ensuite séparée en deux parties de volumes équivalents dans deux cristallisoirs métalliques puis recouvert chacun avec une feuille d'aluminium pour éviter la poussière environnante. La solution de xanthane (répartie dans les deux cristallisoirs métalliques) est dégazée au maximum sous vide à température ambiante. La solution est ensuite transvasée dans un pot de polypropylène et stockée au frais dans un réfrigérateur.

2.2.2.1. Siccité de la solution mère de xanthane

La siccité de la solution mère de xanthane est déterminée en effectuant une analyse thermogravimétrique (ATG) qui a lieu sous air. L'appareil utilisé pour cette analyse est un Setaram SetSys 1200 et le protocole est en partie décrit dans la **Figure II.20b**. Entre 20 et 30 mg de solution mère de xanthane sont prélevés à l'aide d'une micropipette et introduit dans la nacelle et noter précisément la masse pesée ($m_{\text{Echantillon}}$). A la fin de l'analyse, il est obtenu la courbe suivante (**Figure II.20a**) :

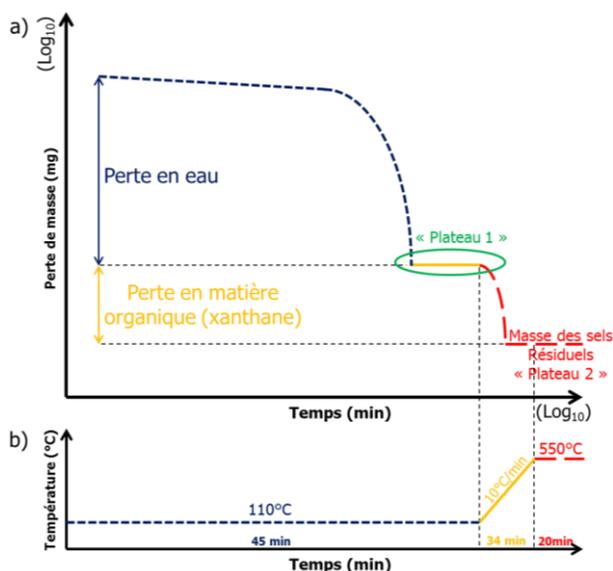


Figure II.20: a) Représentation de la perte de masse en fonction du temps (courbe modèle) b) Protocole expérimentale

La siccité de la solution mère de xanthane en milieu tamponné est calculée comme suit :

$$Siccité_{SolutionXanthane}(\%) = \left(\frac{m_{plateau1} - m_{plateau2}}{m_{Echantillon}} \right) \times 100 \quad \text{Equation II.6}$$

$m_{plateau}$ et $m_{Sels\ résiduels}$ sont des valeurs moyennes des valeurs prises aux deux plateaux (Plateau 1 et Plateau 2). La mise en place de cette analyse a donné lieu à une publication (Chapitre III section III.1.1.2).

2.2.3. Préparation des solutions mères de galactomannane

Pour préparer 250g d'une solution mère de galactomannane à ~1,3% en masse, il a été utilisé le protocole suivant :

Une masse de 3,75g environ de poudre de galactomannane est préalablement pesée. Une fois le bain-marie à la bonne température (83°C), 246,15g d'eau ultra pure dont la résistivité est systématiquement vérifiée ($\rho \geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) au moment de la collecte sont pesés dans un bécher métallique qui est placé ensuite dans le bain-marie. Il est introduit dans le bécher les 0,1 g (400 ppm) d'azoture de sodium (NaN_3), pour éviter la prolifération bactérienne. Il est ensuite introduit progressivement à l'aide d'une spatule la poudre de galactomannane en la saupoudrant. Au fur et mesure que la poudre de galactomannane est introduite, la vitesse d'agitation (agitateur mécanique IKA LaboTechnik) est augmentée jusqu'à atteindre au final 1440 tour/min. La solution est laissée sous agitation pendant 3h. Au bout de 3h, la solution est ramenée à température ambiante grâce un bain-marie et laissée sous agitation mécanique à 1440 tour/min pendant 3h supplémentaires.

2.2.3.1. Etape de purification

Les solutions de galactomannane brutes ainsi préparées contiennent des impuretés insolubles. Pour les retirer, il est utilisé la technique de centrifugation (centrifugeuse Sigma 3-30K) en utilisant les conditions suivantes :

- ✓ T = 20°C
- ✓ Force centrifuge relative (RCF) = 14 000xg
- ✓ Durée = 58 minutes

40 à 45g de solution brute sont pesés dans des tubes de centrifugation de 50mL (Corning). Six tubes équimassiques sont placés dans le rotor et centrifugés. Une fois la solution brute centrifugée dans son intégralité (\Rightarrow 1^{er} cycle de centrifugation ; **Figure II.21a**), la solution est récupérée en la laissant couler librement et répartie dans d'autres tubes de centrifugation pour un prochain cycle de

centrifugation. L'opération est répétée jusqu'à que le culot de chaque tube diminue fortement (**Figure II.21b**) ; la solution doit ainsi s'éclaircir au fur et à mesure qu'elle est centrifugée.

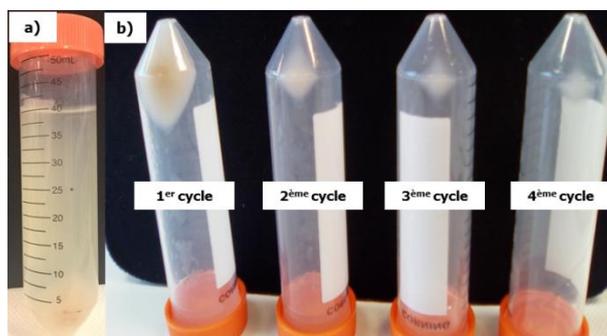


Figure II.21: a) Tube de centrifugation contenant une solution de GdC1 (fin du 1^{er} cycle) b) Exemples de culots issus d'une solution de GdC1 aux quatre stades de centrifugation

Le nombre de cycle de centrifugation est adapté pour chaque échantillon de galactomannane (**Tableau II.8**). Le culot marron lors de la première centrifugation doit s'éclaircir et diminuer en taille au fur et à mesure des cycles de centrifugation.

Tableau II.8: Nombre de cycles par échantillon de galactomannane

Echantillons	Nombre de cycles nécessaires de centrifugation
GdC1	4
GdC2	1
GG1	3
GG2	3

A la fin de l'étape de purification, les solutions sont transvasées chacune dans un pot blanc en polypropylène.

2.2.3.2. Siccité des solutions mères de galactomannane

Une fois purifiée, il est prélevé et pesé trois à quatre échantillons de solution de galactomannane purifiée entre 1,2 et 1,3g de solution de galactomannane (m_{Solution}) dans une coupelle (préalablement pesée) en aluminium (\varnothing 43 mm $\Rightarrow m_{\text{Coupelle}}$, Heathrow Scientific). La coupelle est placée ensuite dans une étuve à 103°C pendant une nuit. Enfin, la coupelle est placée dans un dessiccateur pendant 20-25 minutes et pesée ($\Rightarrow m_{\text{Extraitsec}}$). La siccité de la solution de galactomannane est calculée comme suit :

$$Siccité_{\text{SolutionGalactomannane}}(\%) = \left(\frac{m_{\text{Extraitsec}} - m_{\text{Coupelle}}}{m_{\text{Solution}}} \right) \times 100 \quad \text{Equation II.7}$$

2.2.4. Préparation des mélanges X/GM

Les solutions comme les mélanges X/GM sont toutes préparées à une concentration totale en polysaccharide égale à 0,2% en masse ; les densités des solutions de xanthane et de galactomannane sont prises comme étant égales à celle de l'eau. Les masses en solution mère de xanthane ^{et/ou} de galactomannane sont pesées dans un bécher en verre. Puis, il est pesé la masse de solution de tampon phosphate saline jusqu'à en obtenir la quantité suffisante. Le tout est agité magnétiquement avec l'aide d'un barreau aimanté et d'un agitateur magnétique (agitateur mécanique IKA LaboTechnik) pendant 20-30 minutes en ajustant la vitesse d'agitation de telle sorte qu'il y ait un vortex qui se crée dans la solution. La solution ^{et/ou} mélange est considéré(e) comme assez agité(e) lorsque elle/il est homogène visuellement (absence de nodules de polysaccharide issus des solutions mères). Finalement, les solutions sont centrifugées à pour enlever les bulles d'air:

- ✓ Centrifugeuse Sigma 3-30K
- ✓ T = 20°C
- ✓ Durée = 5 minutes

RCF = 5 000g

2.3. Caractéristiques des gommés

2.3.1. Dosage de protéines

Le taux de protéine des gommés utilisés a été déterminé en utilisant la méthode de Bradford^[1]. Cette méthode qui requiert l'utilisation d'un spectromètre UV-Visible, consiste à utiliser un pigment, le bleu de Coomassie dont le maximum d'absorption est situé à 465 nm. En formant un complexe pigment-protéine, le maximum d'absorption du bleu de Coomassie est déplacé à 595 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la γ -globuline^[2] comme protéine étalon. La densité optique (DO) à 595 nm est mesurée en fonction de quantités croissantes en protéine pour déterminer, de manière efficace et rapide, la teneur en protéine (% massique) dans les échantillons des polysaccharides cités dans le **Tableau II.9**.

Tableau II.9: Taux de protéine des différentes gommés

	X	GdC1	GdC2	GG1	GG2
Taux de protéine (% massique)	4,7±0,4	1,22±0,03	< 0,1	1,33±0,15	0,34±0,08

2.3.2. Détermination des masses moléculaires

Les masses molaires viscosimétriques (M_v) seront déterminées grâce à un viscosimètre capillaire type Ubbelohde avec les paramètres suivants:

- ✓ Volume de solution introduit dans le réservoir: 15 mL
- ✓ T = 20°C
- ✓ nombre de mesures: 4
- ✓ temps d'équilibration thermique: 15 min
- ✓ incrément en volume de la solution tampon: 4 mL

2.3.2.1. Calcul de M_v pour X

Relation de MHS pour le calcul de M_v dans le cas du xanthane d'après Milas et co-équipiers^[3] en solution et dont la force ionique I est égale à 0,1M; pour rappel, la force ionique I dans nos conditions analytiques de est égale à 0,13 M :

$$[\eta] = 1,72 \cdot 10^{-4} \cdot M_v^{1,14} \quad \text{Equation II.8}$$

En remaniant l'équation (**Equation II.8**), il est abouti à la relation suivante pour la détermination de M_v :

$$M_v = \left(\frac{[\eta]}{1,72 \cdot 10^{-4}} \right)^{\frac{1}{1,14}} \quad \text{Equation II.9}$$

Avec $[\eta]$ la viscosité intrinsèque exprimée en mL.g⁻¹. Il a été calculé une M_v égale à $1,46 \cdot 10^6$.

2.3.2.2. Calcul de M_v pour GdC1

Relation de MHS pour le calcul de M_v dans le cas des galactomannanes d'après les travaux de Doublier et Launay^[4]:

$$[\eta] = 11,55 \cdot 10^{-4} [(1-x) \cdot M_v]^{0,98} \quad \text{Equation II.10}$$

En remaniant l'équation (**Equation II.10**), il est abouti à la relation suivante pour la détermination de M_v :

$$M_v = \left(\frac{[\eta]}{11,55 \cdot 10^{-4}} \right)^{\frac{1}{0,98}} \times \frac{1}{(1-x)} \quad \text{Equation II.11}$$

Avec x étant défini tel que: $x = \frac{G}{G+M}$ avec G = Galactose et M = Mannose. x est calculé pour

$$\text{GdC1 tel que : } \frac{M}{G} = 2,7 = \frac{2,7}{1} = \frac{27}{10} \Rightarrow x = \frac{10}{10+27} \approx 0,27$$

Au final, il est calculé une M_v pour GdC1 égale à $1,67 \cdot 10^6$.

2.3.3. Gomme de xanthane

Comme il l'a été mentionné dans le **Chapitre I**, le xanthane est une macromolécule possédant une chaîne latérale secondaire sur laquelle il peut y avoir des groupements acétate et pyruvate en fonction des conditions de production. Afin de caractériser entièrement notre gomme de xanthane, plusieurs mesures ont été réalisées, utilisant la spectroscopie RMN, la rhéologie et la polarimétrie.

2.3.3.1. Principe de la résonance magnétique nucléaire du proton

La résonance magnétique nucléaire du proton plus connue sous son terme abrégé RMN ^1H est une technique de caractérisation structurelle couramment utilisée en chimie moléculaire comme macromoléculaire. Comme son nom l'indique, cette technique exploite la sensibilité des atomes d'hydrogène aux champs magnétiques ; cette sensibilité peut être assimilée au rapport gyromagnétique noté γ propre à chaque atome ; $\gamma_H = 2,68 \cdot 10^8 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$. Lors d'une expérience RMN ^1H , tous les moments magnétiques de spin $\vec{\mu}$ des atomes d'hydrogène sont assimilés à la grandeur noté \vec{M}_0 appelée aimantation. Cette aimantation \vec{M}_0 est alignée dans l'axe du champ magnétique appliqué \vec{B}_0 (axe Oz) et est considérée comme étant dans un état d'équilibre. Cet équilibre est perturbé en appliquant un deuxième champ magnétique \vec{B}_1 pendant une très courte période de temps équivalent à quelques microsecondes (impulsion). \vec{M}_0 basculée dans le plan (xOy) retourne dans son état d'équilibre en tournant autour de l'axe (Oz \Rightarrow autour de \vec{B}_0) selon la fréquence de précession libre de Larmor ω_0 définie telle que :

$$\omega_0 = \gamma_H \cdot B_0 \quad \text{Equation II.12}$$

En effectuant une transformée de Fourier au signal de précession libre ou « free induction decay » (FID), il est obtenu un spectre RMN où l'intensité est représentée en fonction de la fréquence ou du déplacement chimique δ exprimé en partie par million (ppm).

Les spectres RMN ^1H ont été acquis à 80°C ($353,15^\circ\text{K}$) sur un appareil Brücker Avance III HD Ultrashield™ 300 MHz équipé d'une sonde SEI inverse ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) à haute sensibilité en proton. L'échantillon a été préparé comme suit :

- ✓ Solution de xanthane à 0,5% (m/m) à partir de la solution mère de xanthane
- ✓ Lyophilisation de l'échantillon dans un pilulier
- ✓ Solubiliser l'échantillon solide dans du D_2O afin d'obtenir une concentration de 5 g.L^{-1} et l'échantillon est à nouveau lyophilisé (pour réaliser un échange chimique proton/deutérium des hydrogènes mobiles des macromolécules, et, ainsi, simplifier le spectre). Cette étape est effectuée une deuxième fois.

L'échantillon présentant une haute viscosité, il est dépolymérisé selon les travaux de Wu et son équipe^[5] :

- ✓ 7,4 μL de soude (NaOH) et 25 μL d'eau oxygénée (H_2O_2) sont ajoutés à 1,5 mL d'une solution deutérée de xanthane
- ✓ Agitation magnétique à 80°C pendant 1h puis refroidi dans un bain de glace
- ✓ La solution est lyophilisée
- ✓ L'échantillon est dissout dans du D_2O contenant $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de la molécule référent ($\delta = 0$ ppm): 2,2,3,3-d(4)-3-(triméthylsilyl)propanoate de sodium (TSP)

Le nombre de scans est égal à 256 afin d'obtenir un rapport signal/bruit correct et les paramètres d'acquisition sont optimisés (après évaluation des T_1 moyens) pour une exploitation quantitative des spectres RMN.

2.3.3.2. Calcul des fonctions acétate et pyruvate

La méthode permettant la détermination des taux de groupement acétate et pyruvate sur la chaîne latérale du xanthane a été développée par Catherine Esquet^[6] dans le cadre de ses travaux de thèse.

Soit A le nombre de mole de groupements acétate et P le nombre de mole de groupements pyruvate par gramme de polymère ; ils sont définis tels que :

$$A = \frac{I_{\text{acétate}} \cdot [\text{TSP}]}{\frac{I_{\text{TSP}}}{3} \times [\text{X}]} \quad \text{et} \quad P = \frac{I_{\text{pyruvate}} \cdot [\text{TSP}]}{\frac{I_{\text{TSP}}}{3} \times [\text{X}]} \quad \text{Equations II.13 et II.14}$$

Avec $I_{\text{acétate}}$, I_{pyruvate} et I_{TSP} les intégrations des pics de l'acétate, du pyruvate et du TSP, $[\text{TSP}]$ la concentration de la référence (mol.L^{-1}) et $[\text{X}]$ la concentration en xanthane (g.L^{-1}).

On définit DS_A et DS_P , respectivement le degré de substitution en groupements acétate et pyruvate, comme étant le nombre de groupements acétate ou pyruvate par unité de répétition et s'exprimant en pourcentage (%) tels que :

$$DS_A = \frac{A \times M_{xanthane}}{(1 - (P \times M_{pyruvate} - A \times M_{acétate}))} \quad \text{Equation II.15}$$

$$DS_P = \frac{P \times M_{xanthane}}{(1 - (P \times M_{pyruvate} - A \times M_{acétate}))} \quad \text{Equation II.16}$$

Avec $M_{xanthane}$, $M_{acétate}$ et $M_{pyruvate}$ les masses molaires respectivement de l'unité de répétition du xanthane sans acétate ni pyruvate (824 g.mol^{-1}), du groupement acétate (43 g.mol^{-1}) et du pyruvate (72 g.mol^{-1}). Pour notre échantillon de xanthane, un $DS_A = 35\%$ et un $DS_P = 65\%$ ont été déterminés.

2.3.3.3. Détermination de la température de transition conformationnelle

Le xanthane est une macromolécule qui peut adopter deux conformations en solution aqueuse en fonction de la force ionique ^{et/ou} de la température. Il peut se trouver soit sous la forme d'une hélice semi-rigide ou soit sous la forme d'une pelote semi-flexible. Lors de ce projet, nous avons travaillé avec le xanthane essentiellement sous sa forme d'hélice semi-rigide dans les mélanges X/GM. Nous avons donc déterminé sa température de transition conformationnelle (T_m) à l'aide de deux techniques analytiques : la polarimétrie et la rhéologie rotative.

2.3.3.4. Principe de la polarimétrie

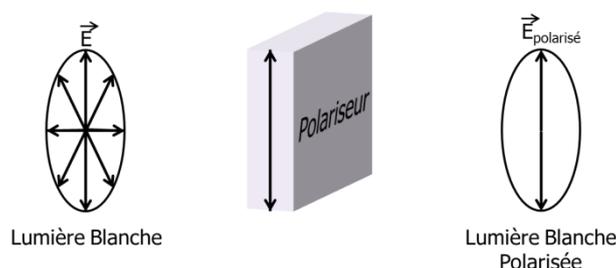


Figure II.22: Schéma de la polarisation de la lumière blanche

La lumière est une onde électromagnétique dans laquelle il y a un champ électrique \vec{E} et un champ magnétique \vec{B} . Le champ \vec{E} oscille selon un plan appelé champ de polarisation. Dans le cas de la lumière blanche, il peut y avoir plusieurs plans de polarisation qui peuvent être réunis en un seul lorsque la lumière traverse un filtre polariseur et se retrouve ainsi polarisée (**Figure II.22**). Certaines

molécules ou macromolécules comme la gomme de xanthane ont la propriété d'être chirale et ont le pouvoir de faire dévier le plan de polarisation.

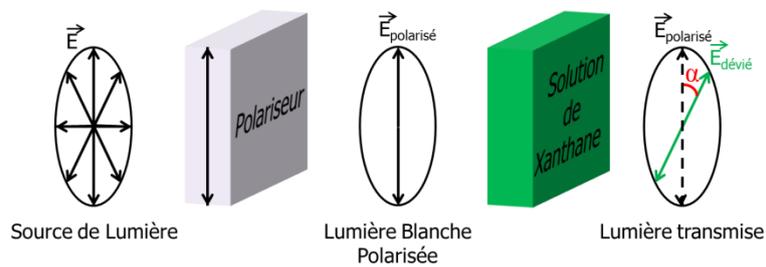


Figure II.23: Schéma (de gauche à droite) très simplifié d'expérience de polarimétrie sur une solution de xanthane; α est l'angle de rotation observé

Il est alors possible de calculer l'angle de rotation observé α (appelé aussi pouvoir rotatoire) grâce à la loi de Biot tel que :

$$\alpha = [\alpha]l.c \quad \text{Equation II.17}$$

Avec $[\alpha]$ le pouvoir spécifique qui dépend de la température, de la longueur d'onde utilisée et du solvant ; l la longueur de la cuve en décimètre et c la concentration en gramme par millilitre.

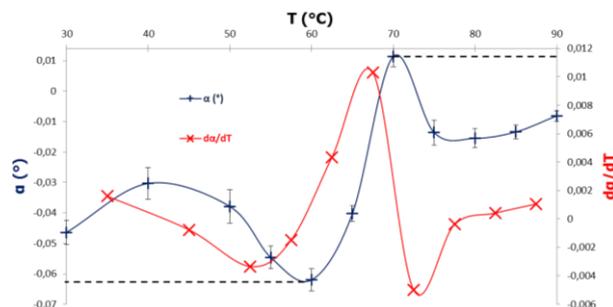


Figure II.24: Exemple de graphique du pouvoir rotatoire en fonction de la température et de sa dérivée en fonction de la température pour une solution de xanthane (X)

Comme le xanthane change de conformation au-dessus de sa T_m , nous avons donc relevé les valeurs du pouvoir rotatoire en fonction de la température (**Figure II.24**). Il est généralement obtenu une courbe sigmoïde ; les lignes discontinues indiquent l'allure de la courbe $\alpha = f(T)$ dans le cas idéal. Les analyses de polarimétrie ont toutes été réalisées sur un polarimètre Perkin-Elmer 241 dans les conditions suivantes :

- ✓ Solution de xanthane préparée à 0,1% (m/m) à partir de la solution mère de xanthane
- ✓ Lampe à mercure $\Rightarrow \lambda = 436 \text{ nm}$
- ✓ Longueur de la cuve = 1 dm
- ✓ Une mesure du blanc est effectuée avec la solution de tampon phosphate saline

- ✓ Durée d'équilibration thermique = 20 minutes
- ✓ $30 < T < 90^{\circ}\text{C}$; relevé des valeurs d' α tous les 10°C jusqu'à 60°C puis tous les 5°C jusqu'à 90°C
- ✓ Nombre de valeurs relevées à chaque température = 10

Les analyses ont été faites en triplicat. La T_m a été déterminée à $66 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.3.3.5. Mesure de T_m par rhéologie

La rhéologie est la science qui étudie l'écoulement de la matière. Grâce à cette science, il est possible de mesurer les propriétés viscoélastiques symbolisées par deux grandeurs notées G' et G'' qui sont respectivement le module élastique et le module visqueux. Le principe de la rhéologie est expliqué plus en détail dans la section II.6.

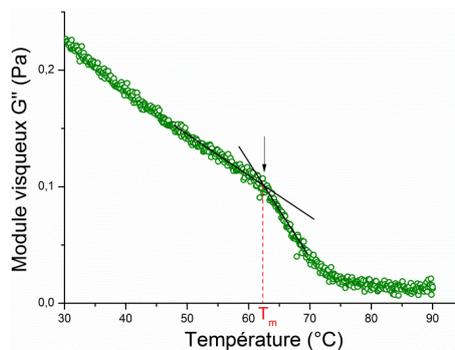


Figure II.25: Exemple de rhéogramme représentant le module G'' en fonction de la température

Lorsque le xanthane change de conformation dans le sens hélice \rightarrow pelote, une diminution de la viscosité comme dans les travaux de Choppe et co-équipiers^[7] ou une diminution des propriétés viscoélastiques comme dans les de Pelletier et co-équipiers^[8] sont observées. Seul le module visqueux G'' a été tracé car le point de rupture des propriétés viscoélastiques est plus discernable (**Figure II.25**). Les analyses ont d'ailleurs été basées sur le protocole développé par Pelletier et son équipe telles que :

- ✓ Rhéomètres rotatifs à contrainte imposée Discovery Hybrid Rheometers (DHR) de chez TA Instruments
- ✓ Solution de xanthane préparée à 0,1% (m/m) à partir de la solution mère de xanthane
- ✓ Balayage des modules G' et G'' pour déterminer le domaine linéaire de mesure à 30°C et 90°C
- ✓ Durée d'équilibration = 5 minutes
- ✓ $30^{\circ}\text{C} < T < 90^{\circ}\text{C}$
- ✓ Vitesse de chauffage : $1^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$
- ✓ Déformation $\delta = 1\%$
- ✓ Fréquence = 1 Hz

Les analyses ont été effectuées en triplicat et la T_m du xanthane a été déterminée à $64 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3.3.6. Conclusion

En fixant la température de nos analyses des systèmes X/GM ayant lieu aux échelles macroscopique (rhéologie) et microscopique (spectrophotométrie de fluorescence) à 20°C , nous sommes assurés que notre échantillon de xanthane (X) en milieu tamponné salin reste sous sa forme dénaturé (ordonnée $II^{[9]}$) à savoir une hélice semi-rigide.

2.3.4. Gomme de galactomannane

2.3.4.1. Détermination des ratios M/G et des DB

Il est défini pour les galactomannanes le paramètre du ratio mannose/galactose noté M/G qui rend compte de manière quantitative l'état de substitution des chaînes de mannose par les résidus galactose. Nous avons utilisé la méthode proposée par Dahi et co-équipiers^[10] qui consiste à isoler les sucres (hydrolyse acide) puis à les dérivatiser en leur greffant deux équivalents d'agent de dérivatisation (acide benzoïque 4-3-méthyl-5-oxo-2-pyrazolin-1-yl=PMPA) pour les détecter. Les échantillons ont été préparés de la manière suivante :

- ✓ Une solution de PMPA est préparée au préalable en dissolvant les cristaux de PMPA dans un mélange méthanol/eau ultra pure ($\rho \geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) en ajustant le pH entre 7,8 et 8 et en obtenant une concentration C_{PMPA} égale à 0,15 M.
- ✓ Environ 5g de solution mère de GM sont pesés dans un tube scellé.
- ✓ L'échantillon est congelé dans un bain d'azote (N_2 liquide) et lyophilisé sous vide et à basse température dans un lyophilisateur (CHRIST Alpha 1-4 LD) afin d'enlever le liquide.
- ✓ L'échantillon est conditionné sous atmosphère inerte (Argon).
- ✓ L'échantillon solide subit ensuite une hydrolyse acide à l'acide trifluoroacétique (4 M) pendant 4h à 100°C .
- ✓ L'échantillon est ensuite lavé au méthanol (~ 20 à $40 \mu\text{L}$ ajoutés puis évaporés sous vide) trois fois. A la fin du troisième lavage, l'échantillon est transféré dans un tube eppendorf d'un mL et est séché sous flux d'azote (N_2 gaz).
- ✓ La dérivatisation s'effectue en ajoutant 1 mL de solution de PMPA dans le tube eppendorf (passage au vortex) à 70°C pendant 2h.
- ✓ L'échantillon est placé ensuite dans un bain de glace et $150 \mu\text{L}$ d'HCl 2M sont ajoutés pour faire précipiter l'excédent de PMPA (passage au vortex).
- ✓ L'échantillon est centrifugé (15°C ; $5\,000xg$; 10 min.)

- ✓ L'échantillon est finalement analysé en LC (Agilent 1200 LC de chez Agilent Technologies)-MS/ESI (6340 de chez Agilent Technologies) afin de quantifier les fragments d'oligosaccharide selon la procédure décrite dans dahi et co-équipiers^[10].

Daas et son équipe^[11] ont défini un autre paramètre concernant les galactomannanes et qui est le degré de bloc (DB). En connaissant le ratio M/G, il peut renseigner sur la distribution des unités galactose le long des chaînes de mannane. Afin de déterminer les valeurs de DB, il suffit de remplacer l'étape d'hydrolyse acide par une étape de dégradation enzymatique et de procéder ensuite à l'étape de dérivation au PMPA proposée par Tapie et co-équipiers^[12] qui est similaire à celle décrite ci-dessus. L'enzyme utilisée est l'endo- β -D-mannase qui engendre des scissions des liaisons β -1,4 entre les unités de mannose préférentiellement dans les zones non-substituées en galactose^[13].

Les valeurs des ratios M/G et des DB des galactomannanes étudiés sont listées dans le **Tableau II.10**.

Tableau II.10: Valeurs expérimentales des ratios M/G et des DB des galactomannanes

	GdC1	GdC2	GG1	GG2
Ratio M/G	2,7	3	1,4	1,5
DB (%)	95	74	33	30

Ces valeurs sont issues de la thèse de Y. Aguni^[2] qui a réalisé sa thèse de doctorat au sein du laboratoire URCOM.

2.3.5. Récapitulatif des caractéristiques des gommes étudiées

Il a été rassemblé dans le **Tableau II.11** toutes les données concernant les gommes analysées dans le cadre de cette thèse.

Tableau II.11: Tableau récapitulatif des caractéristiques des polysaccharides utilisés

Nom commercial	Appellation	Notation française	Notation anglaise	Fournisseurs	Protéine (%)	DS_A (%)	DS_P (%)	Ratio M/G	DB (%)	M_v x10⁶
Xanthane faiblement acétylé	Xanthane	X	X	Degussa (CARGILL)	4,7±0,4	35	65			1,46
Viscogum Bj	Gomme de Caroube 1	GdC1	LBG1	Degussa (CARGILL)	1,22±0,03			2,7	95	1,67
Farine de caroube	Gomme de Caroube 2	GdC2	LBG2	SBI	< 0,1			3	74	1,09
Meryprodor 100	Gomme Guar 1	GG1	GG1	Danisco	1,33±0,15			1,4	33	2,67
Farine de guar	Gomme Guar 2	GG2	GG2	SBI	0,34±0,08			1,5	30	2,47

2.4. Caractérisation des interactions à l'échelle microscopique

2.4.1. Principe de la fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une technique basée sur la photoluminescence de certaines molécules et permet de sonder des phénomènes physico-chimiques à l'échelle moléculaire. Ces molécules photoluminescentes sont appelées sondes moléculaires de fluorescence ou simplement sondes de fluorescence. Elles possèdent la particularité d'avoir des groupements fluorophores qui permettent d'absorber une énergie lumineuse (excitation \Rightarrow photons incidents) et de la réémettre sous la forme d'un rayonnement lumineux en se désexcitant (photons émis). Leurs structures chimiques impliquent souvent l'existence d'un ou plusieurs cycles aromatiques et hétérocycliques. Les sondes de fluorescence peuvent être divisées en trois catégories:

- ✓ Les sondes intrinsèques: Présence de fluorophores dans la structure chimique du composé à analyser ; exemple de l'acide aminé tryptophane (W) dans les protéines^[16].
- ✓ Les sondes extrinsèques liées de façon covalente: Création d'une liaison covalente (greffage) entre une sonde de fluorescence et le composé à analyser^[17].
- ✓ Les sondes extrinsèques : Association interactionnelle de la sonde au composé à analyser de manière non-covalente^[18-21].

Une mesure type de fluorescence consiste à exciter la sonde de fluorescence en lui envoyant des photons (faisceau de lumière pulsé): c'est le phénomène d'absorption. La sonde passe d'un état électronique singulet fondamental S_0 à un état électronique singulet excité S_n ($n \geq 1$). Suite à cette absorption de photons, la sonde moléculaire se désexcite de manière non-radiative (sous-niveaux vibrationnels des états excités et conversion interne [IC]) en revenant à l'état fondamental excité S_1 . Elle se désexcite de façon radiative (émission de photons) uniquement lors du passage de l'état fondamental excité S_1 à l'état fondamental S_0 : c'est le phénomène d'émission de fluorescence (règle de Kasha^[22]). Le phénomène de fluorescence est schématisé sur la **Figure II.26**. Il existe aussi le cas du passage inter-système, passage de l'état fondamental excité S_1 à l'état fondamental excité triplet T_1 plus bas en énergie (changement de multiplicité de spin) qui est responsable du phénomène de phosphorescence. La phosphorescence correspond au passage de l'état fondamental excité T_1 à l'état fondamentale S_0 . La fluorescence et la phosphorescence sont caractérisées chacune par des temps bien distincts.

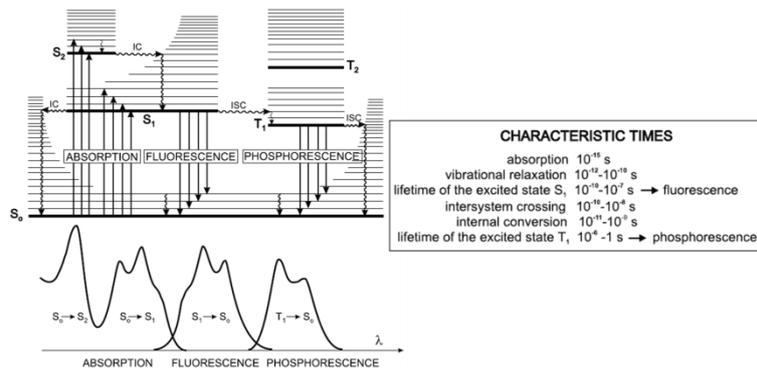


Figure II.26: Diagramme de Perrin-Jablonski^[15] et temps caractéristiques des différents phénomènes liés à l'absorption d'un photon

Les constantes de vitesse correspondent à l'inverse des durées de vie τ associées :

- ✓ $\tau_r = \frac{1}{k_r^S}$ avec τ_r : durée de vie radiative et k_r^S : constante de vitesse de désexcitation radiative par émission de fluorescence.
- ✓ $\tau_S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S}$ avec τ_S : durée de vie de l'état excité S_1 et k_{nr}^S : constante de vitesse de désexcitation non radiative.
- ✓ $k_{nr}^S = k_{CI}^S + k_{CIS}^S$ avec k_{CI}^S constante de vitesse pour la conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$ et k_{CIS}^S : constante de vitesse pour la conversion inter-système (CIS).

En spectroscopie de fluorescence, il est défini pour chaque sonde moléculaire un rendement quantique de fluorescence ϕ_F tel que :

$$\phi_F = \frac{\text{Nombre.de.photons.émis}}{\text{Nombre.de.photons.absorbés}} = \frac{k_r^S}{\sum_i k_i} \quad \text{Equation II.18}$$

Avec k_i : constantes de vitesse de l'ensemble des phénomènes (dont la fluorescence) pouvant dépeupler l'état excité S_1 . A Chaque sonde de fluorescence correspond un rendement quantique de fluorescence ϕ_F rendant compte de façon relative de l'efficacité de l'émission de fluorescence par rapport aux autres phénomènes en compétition pour dépeupler l'état excité. ϕ_F représente donc la fraction de molécules excitées retournant au niveau S_0 avec émission de fluorescence.

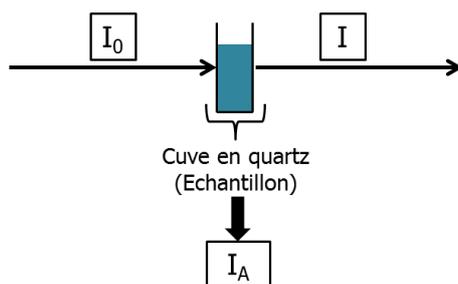


Figure II.27: Schéma très simplifié d'une expérience de spectroscopie optique (fluorescence par exemple) avec I_0 l'intensité du rayonnement incident, I l'intensité du rayonnement transmis et I_A l'intensité du rayonnement absorbé

L'intensité de fluorescence (IE) dépend de l'intensité du rayonnement absorbé I_A selon la relation :

$$IE = I_A \times \phi_F \times k \quad \text{Equation II.19}$$

Avec k facteur purement instrumental dans lequel sont pris en compte plusieurs paramètres tels que les largeurs des fentes d'excitation et d'émission, l'angle d'observation, etc. D'après la **Figure II.27**, il est possible d'écrire **Equation II.20**:

$$I_A = I_0 - I \quad \text{Equation II.20}$$

Avec I_0 l'intensité du rayonnement incident, I l'intensité du rayonnement transmis. D'après la loi de Beer-Lambert, la densité optique DO est définie telle que :

$$DO = \text{Log} \frac{I_0}{I} = \varepsilon.l.c \quad \text{Equation II.21}$$

Avec ε le coefficient d'extinction molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l la longueur de la cuve de fluorescence et c la concentration du composé étudié (mol.L^{-1}). En sachant que « $\text{Log}x = \frac{\text{Ln}x}{\text{Ln}10}$ » et que $\text{Ln}10 \sim 2,303$,

l'**Equation II.21** peut être réécrite telle que :

$$I = I_0 \cdot e^{-2,303\varepsilon.l.c} \quad \text{Equation II.22}$$

Pour rappel « $e^{-x} \approx 1 - x$ » en effectuant un développement limité au premier ordre et dans le cas où la valeur de x est faible, ce qui est notre cas car nous travaillons avec des concentrations c en sonde fluorescente très faibles. Ceci nous amène à combiner l'**Equation II.20** et **Equation II.22** telles que :

$$I_A = I_0 \cdot 2,303 \cdot \varepsilon.l.c \quad \text{Equation II.23}$$

Ainsi, l'**Equation II.19** peut se réécrire telle que :

$$IE = I_0 \cdot 2,303 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot c \cdot \phi_f \cdot k$$

Equation II.24

En admettant que I_0 est constant et que le rendement quantique de fluorescence est indépendant de la longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}), alors IE est proportionnelle au coefficient d'extinction molaire ε et à la concentration c du composé étudié.

Il existe d'autres phénomènes autres que ceux qualifiés de non radiatifs qui peuvent causer de l'extinction de fluorescence (« quenching »):

- ✓ Extinction dynamique : processus lié à la collision du fluorophore avec une espèce présente dans le milieu (molécule de dioxygène, amines aliphatiques ou aromatiques etc) engendrant une désexcitation. Ce processus est contrôlé par la diffusion.
- ✓ Extinction statique : processus lié à la formation d'un complexe non fluorescent entre le fluorophore et l'extincteur à l'état fondamental S_0 .

Toutes les analyses de fluorescence ont été réalisées à l'état stationnaire sur un spectrophotomètre de fluorescence (CARY VARIAN) muni d'un module contrôleur de température de type Peltier (Agilent Technologies). Après centrifugation, la solution est divisée en deux fractions de 15g chacune : fraction de contrôle dite « Témoin » (solution seule) et une fraction « échantillon » (solution + sonde de fluorescence : ANS ou 3HQ-Bf). Pour la fraction Echantillon_{ANS}, il est introduit un volume de solution mère d'ANS afin d'obtenir la concentration finale de $C_{ANS} = 8 \mu\text{M}$. De même, pour la fraction Echantillon_{3HQ-Bf}, il est introduit un volume de solution mère de 3HQ-Bf de telle sorte d'obtenir une concentration finale de $C_{3HQ-Bf} = 5,16 \mu\text{M}$. La fraction Echantillon est pipetée 15 fois à l'aide d'une micropipette (VWR) réglée sur 4 mL pour homogénéiser la concentration de la sonde qui a été introduite. La fin de la phase d'homogénéisation (fin des 15 pipetages) correspond à t_0 . La fraction Témoin est aussi homogénéisée au même titre que la fraction Echantillon afin de subir le même traitement. 2 à 3 mL de chaque fraction sont pipetés et introduits dans des cuves en quartz (Hellma). La fraction Témoin est toujours analysée en premier.

2.4.1.1. Interactions dipôle-dipôle et hydrophobie du milieu

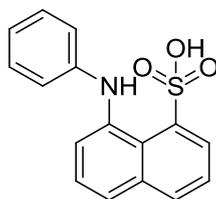


Figure II.28: Sonde moléculaire d'acide 8-anilino-1-naphthalène sulfonique (ANS)

Pour la caractérisation au niveau moléculaire des interactions dipôle-dipôle et hydrophobe, il a été sélectionné la sonde acide 8-anilino-1-naphthalène sulfonique (ANS) qui est disponible commercialement (SIGMA).

2.4.1.1.1. Préparation de la solution mère d'ANS

Une quantité de poudre d'ANS est solubilisée dans de l'eau ultra-pure ($\rho \geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) et agitée magnétiquement pendant une durée de 6h.

2.4.1.1.2. Dosage de la solution mère d'ANS

La concentration de la solution mère d'ANS a été déterminée par spectrophotométrie UV-Visible (UV-1800 Shimadzu). La bande spectrale d'intérêt pour relever la densité optique (DO) se situe vers 350 nm (**Figure II.29**) et le coefficient d'extinction molaire ε est égale à $4,95 \cdot 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ selon les travaux d'Alizadeh-Pasdar et Li-Chan^[23]. Les conditions des mesures sont les suivantes :

- ✓ Seuil de détection = 0,001
- ✓ Nombre de répétitions par point= 5
- ✓ Balayage $600 > \lambda > 220 \text{ nm}$

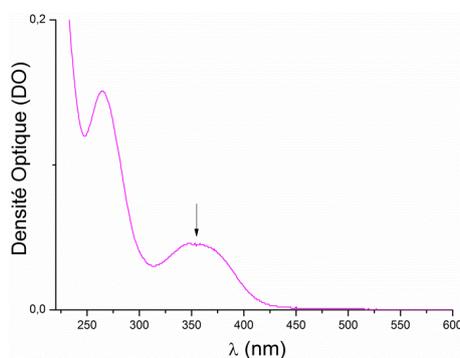


Figure II.29: Spectre UV-Visible de la sonde ANS

Avant chaque série de mesure, une correction fine de la ligne de base a été effectuée. Les mesures ont été réalisées quatre fois.

2.4.1.1.3. Conditions des analyses de fluorescence

Les analyses ont été effectuées avec les conditions suivantes:

- ✓ T= 20°C
- ✓ Longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex} = 390$ nm
- ✓ Plage de balayage : $440 < \lambda < 740$ nm
- ✓ Fente d'excitation = 5 nm
- ✓ Fente d'émission = 5 nm
- ✓ Vitesse de balayage = 600 nm.min⁻¹
- ✓ Tension du photomultiplicateur = 750 volts

Pour l'obtention d'un point de mesure, 5 scans successifs ont été acquis à chaque fois pour des raisons statistiques. Les points furent acquis toutes les 5 min de 0 à 1h, puis toutes les heures entre 2 et 4h et entre 24 et 31h. Les analyses ont toutes été réalisées en triplicat.

2.4.1.1.4. Traitement des données brutes

Les données issues de chaque série de 5 spectres acquis sont moyennées. Les intensités d'émission (IE) de la cuve Témoin (bruit de fond) sont systématiquement retranchées des IE calculées des séries de spectres acquis entre t=5 minutes et t= 31h. Les spectres ont tous été normalisés à 740 nm. Dans les conditions dans lesquelles nous avons opéré (faible concentration de sondes dans milieu turbide), il fut nécessaire de lisser les courbes brutes, relativement bruitées, en utilisant une fonction type polynomiale (OriginPro 8 SR4 v8.0951 ; B951) comme pour le lissage type Savitzky-Golay. Pour chaque spectre ainsi modélisé, la valeur de l'intensité d'émission maximale IE_{max} a été relevée et ne correspond pas exactement à la valeur brute. Les données ont subi une analyse de la variance (ANOVA) avec Xlstat (version: 14.0.6023.1000). Les valeurs des écarts-types des intensités d'émission moyennées sont égaux au grand maximum à 23%.

2.4.1.2. Réseau de liaisons H (3HQ-Bf)

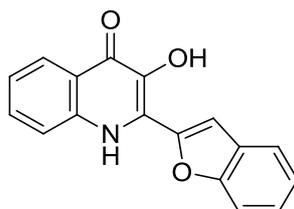


Figure II.30: Sonde moléculaire 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf)

Afin de caractériser le réseau de liaisons hydrogène dans les mélanges X/GM, il a été sélectionné la sonde 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf).

2.4.1.2.1. Synthèse de la sonde 3HQ-Bf

La sonde 3HQ-Bf n'est pas disponible dans le commerce, il est donc nécessaire de la synthétiser. Nous avons pour cela repris le protocole de synthèse proposé par Bilokin' et son équipe^[18].

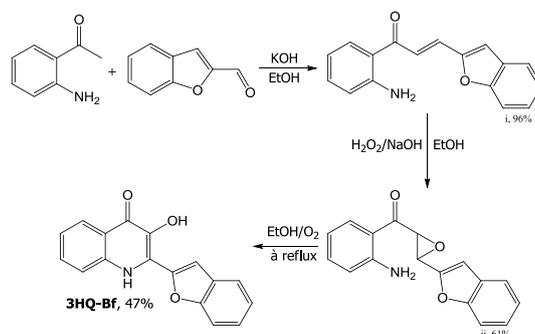


Figure II.31: Schéma de la synthèse de la 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone^[18]

A la fin de la synthèse, les cristaux de 3HQ-Bf sont dissouts au-dessus de la limite de solubilité dans du méthanol (Fischer, grade HPLC) pendant 6h. La limite de solubilité est de l'ordre de grandeur de quelques mM (spectrophotométrie UV-Visible ; UV-1800 Shimadzu). La solution est ensuite centrifugée dans les conditions suivantes :

- ✓ Centrifugeuse 3-30K
- ✓ T= 20°C
- ✓ RCF= 500xg
- ✓ Durée= 15 minutes

Le culot (solide) est récupéré et stocké dans un bécher en verre inactinique. Le surnageant liquide est quant à lui stocké dans un bécher en verre inactinique.

2.4.1.2.2. Dosage de la solution mère de 3HQ-Bf

La concentration de la solution mère de 3HQ-Bf a été déterminée par spectrophotométrie UV-Visible (UV-1800 Shimadzu). La bande spectrale d'intérêt pour relever la densité optique (DO) se situe vers 384 nm et le coefficient d'extinction molaire ϵ est égale à $17,7 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ selon les travaux de Bilokin' et coéquipiers^[18]. Les conditions des mesures sont les suivantes :

- ✓ Seuil de détection = 0,001
- ✓ Nombre de répétitions par point= 5

- ✓ Balayage $600 > \lambda > 220$ nm

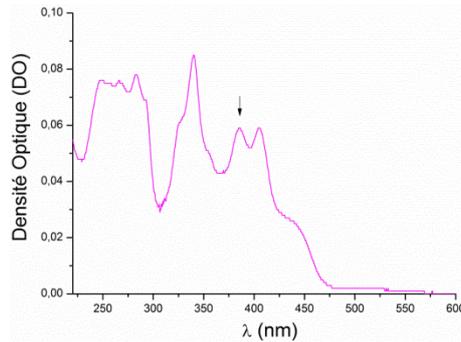


Figure II.32: Spectre UV-Visible de la sonde 3HQ-Bf

Avant chaque série de mesure, une correction fine de la ligne de base a été effectuée. Les mesures ont été également réalisées quatre fois.

2.4.1.2.3. Conditions des analyses de fluorescence

Les analyses ont été effectuées avec les conditions suivantes:

- ✓ $T = 20^{\circ}\text{C}$
- ✓ Longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm
- ✓ Fente d'excitation = 5 nm
- ✓ Fente d'émission = 5 nm
- ✓ Tension du photomultiplicateur = 800 volts

La sonde 3HQ-Bf étant très sensible, seules les longueurs d'ondes aux maxima des bandes spectrales d'intérêt ($1N^*$, $2N^*$ et T^*) sont acquises. En fonction des compositions des mélanges X/GM, les maxima des bandes $1N^*$, $2N^*$ et T^* peuvent se situer à des longueurs d'onde λ légèrement différentes que nous avons vérifiées en effectuant une analyse au préalable en mode balayage en utilisant les conditions suivantes :

- ✓ $T = 20^{\circ}\text{C}$
- ✓ Longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm
- ✓ Plage de balayage : $350 < \lambda < 700$ nm
- ✓ Fente d'excitation = 5 nm
- ✓ Fente d'émission = 5 nm
- ✓ Vitesse de balayage = $120 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$
- ✓ Tension du photomultiplicateur = 800 volts
- ✓ Facteur de lissage type Savitzky-Golay = 15

Dans le cas de l'étude du réseau de liaisons hydrogène (3HQ-Bf), les mélanges X/GM ont donc été irradiés tels que :

Tableau II.12: Longueurs d'onde d'irradiation (3HQ-Bf) des mélanges X/GM pour l'étude des liaisons hydrogène

	Composition	λ_{1N}^* (nm)	λ_{2N}^* (nm)	λ_T^* (nm)
X/GdC1	0/100	393	414	511
	20/80	393	414	507
	30/70	393	414	507
	40/60	393	414	507
	50/50	393	414	511
	60/40	393	414	507
	70/30	393	414	511
	80/20	393	414	511
	100/0	393	414	511
X/GdC2	50/50	393	414	511
X/GG1	50/50	393	414	505
X/GG2	50/50	393	414	507

Tous les mélanges X/GM étudiés ont également été irradiés à $\lambda = 700$ nm afin de normaliser les données à cette longueur d'onde. Pour l'obtention d'un point, 5 mesures successives ont été effectuées à chaque fois pour des raisons statistiques. Cette opération a été réalisée toutes les 5 min de 0 à 1h, puis toutes les heures entre 2 et 4h et entre 24 et 31h. Les analyses ont toutes été réalisées en triplicat.

2.4.1.2.4. Traitement des données brutes

Les valeurs des IE issues de chaque série de 5 mesures sont moyennées. Les IE de la cuve Témoin (bruit de fond) sont systématiquement retranchées des IE calculées des séries de mesures acquises entre $t=5$ minutes et $t= 31h$. Les valeurs des IE sont les valeurs brutes et ont toutes été normalisées à 700 nm. Les données ont subi une analyse de la variance (ANOVA) avec Xlstat (version: 14.0.6023.1000). Les valeurs des écarts-types des intensités brutes d'émission calculées sont égales au grand maximum à 9%.

2.5. Caractérisation des systèmes X/GM à l'échelle macroscopique

2.5.1. Principe de la rhéologie

La rhéologie est le domaine de la science qui étudie l'écoulement de la matière qu'elle soit liquide, solide, gazeuse ou à l'interface entre deux états de la matière. Lors de ce projet, nous avons utilisées des rhéomètres rotatifs à contrainte imposée type Discovery Hybrid Rheometer (DHR) munis de contrôleur de température de type Peltier plan de chez TA Instruments.

Cas des matériaux solides :

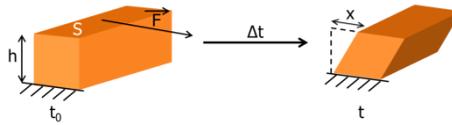


Figure II.33: Schéma d'expérience de cisaillement d'un matériau solide avec h la hauteur, S la surface, \vec{F} la force appliquée pour effectuer le cisaillement et x le déplacement ; $t=t_0+\Delta t$.

La contrainte de cisaillement τ est définie telle que :

$$\tau = \frac{F}{S} \quad \text{Equation II.25}$$

Avec F la valeur de la force appliquée et S la surface sur laquelle est appliquée la force F . La déformation γ est définie telle que :

$$\gamma = \frac{x}{h} \quad \text{Equation II.26}$$

Avec le déplacement du matériau solide après une durée Δt et h la hauteur du solide à t_0 . Le module de cisaillement G est défini tel que :

$$G = \frac{F \cdot h}{S \cdot x} = \frac{\tau}{\gamma} \quad \text{Equation II.27}$$

Ainsi, avec un module G ayant une valeur constante, la contrainte τ et la déformation γ sont proportionnelles dans le cas d'un solide idéal \Rightarrow Solide de Hooke (**Figure II.34**).

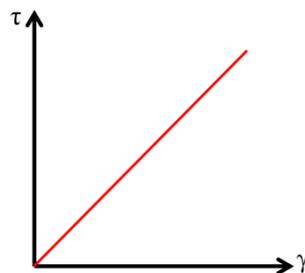


Figure II.34: Schéma de la contrainte τ représentée en fonction de la déformation γ pour un solide idéal

Cas des liquides :

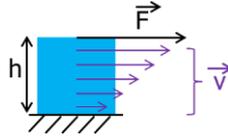


Figure II.35: Schéma d'expérience de cisaillement d'un matériau liquide avec h la hauteur, \vec{F} la force appliquée pour effectuer le cisaillement et \vec{v} la vitesse.

Lorsqu'un cisaillement est appliqué à la surface d'un liquide, un gradient de vitesse s'établit. Chaque couche de liquide possède alors une vitesse qui lui est propre et constante. Ainsi la contrainte de cisaillement τ pour un liquide est définie telle que :

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \text{Equation II.28}$$

Avec η la viscosité (en Pa.s) et $\dot{\gamma}$ le taux (ou vitesse) de cisaillement défini tel que :

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} \quad \text{Equation II.29}$$

Avec v la vitesse et h la hauteur du liquide. Ainsi, avec une viscosité ayant une valeur constante, la contrainte τ et la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ sont proportionnelles dans le cas d'un liquide idéal \Rightarrow Liquide newtonien (**Figure II.36**).

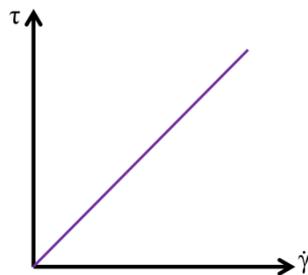


Figure II.36: Schéma de la contrainte τ représentée en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ pour un liquide idéal

Analyses dynamiques des matériaux intermédiaires:

Dans le cas de la représentation de la contrainte τ en fonction de la déformation γ dans le cas des solides (**Figure II.34**) ou en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ dans le cas liquides (**Figure II.36**) ces matériaux qui ne sont pas 100% solides ni 100% liquides n'affichent plus une réponse linéaire. En effet, leurs réponses dévient car le module G ou la viscosité η peuvent varier en fonction de plusieurs paramètres comme par exemple le temps, la température, la composition du matériau (présence de charges, solutés), etc.

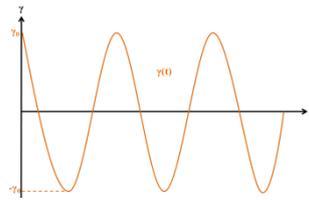


Figure II.37: Schéma d'un essai dynamique; suivi de la déformation γ en fonction du temps t

Afin d'analyser les propriétés mécaniques de ces matériaux, il est réalisé une étude dynamique (essais oscillatoires) où il est suivi la variation de la contrainte τ ou la déformation γ au cours du temps :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \cos(\omega.t) \quad \text{Equation II.30}$$

Avec γ_0 l'amplitude de la déformation et ω la pulsation ou fréquence angulaire. Deux cas limites peuvent être observés :

- ✓ Le cas d'un comportement purement élastique ; la contrainte est définie telle que :

$$\tau(t) = G \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega.t) \quad \text{Equation II.31}$$

- ✓ Le cas d'un liquide newtonien ; développement de l'**Equation II.28**:

$\tau(t) = \eta \cdot \gamma_0 \frac{d \cos(\omega.t)}{dt} = -\eta \cdot \gamma_0 \cdot \omega \cdot \sin(\omega.t)$ or « $-\sin(\omega.t) = \cos(\omega.t + \frac{\pi}{2})$ », ce qui nous amène à écrire l'équation suivante :

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega.t + \delta) \quad \text{Equation II.32}$$

En posant $\tau_0 = \eta \cdot \gamma_0 \cdot \omega$ et $\delta = \frac{\pi}{2}$; δ représentant le déphasage. En général, pour les analyses réalisées en mode oscillant, la sollicitation est retranscrite par l'**Equation II.30** et la réponse est retranscrite par l'**Equation II.32** où $\delta \in \left[0; \frac{\pi}{2}\right]$. En utilisant les règles de trigonométrie, l'**Equation**

II.32 peut être développée telle que :

$$\begin{aligned} \tau(t) &= \tau_0 \cdot \cos(\omega.t) \cdot \cos(\delta) - \tau_0 \cdot \sin(\omega.t) \cdot \sin(\delta) \\ \tau(t) &= \tau_0 \cdot \cos(\omega.t) \cdot \cos(\delta) + \tau_0 \cdot \sin(\delta) \cdot \cos(\omega.t + \frac{\pi}{2}) \end{aligned}$$

$$\tau(t) = \underbrace{\frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos(\delta)}_{\text{Module Elastique } G'} \cdot \underbrace{\gamma_0 \cdot \cos(\omega t)}_{\text{Solide de Hooke « partie élastique »}} + \underbrace{\frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \sin(\delta)}_{\text{Module Visqueux } G''} \cdot \underbrace{\gamma_0 \cdot \left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right)}_{\text{Liquide newtonien « partie visqueuse »}}$$

Equation II.33

Grâce aux analyses en mode oscillation, il est possible de caractériser et de déterminer les propriétés viscoélastiques représentées par les modules élastique G' et visqueux G'' (**Equation II.33**) qui sont exprimés en Pascal (Pa).

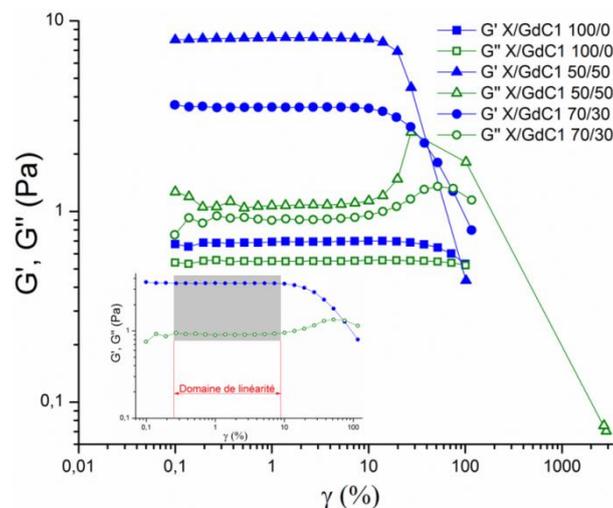


Figure II.38: Exemples de balayage en déformation des systèmes X/GdC1 100/0 (■; □), 50/50 (▲; △) et 70/30 (●; ○)

G' et G'' dépendent uniquement de la pulsation ω . Avant de réaliser des analyses en mode oscillation, il est nécessaire de s'assurer que les modules G' et G'' ne varient pas en fonction de la déformation γ ; il faut donc définir ce que l'on appelle le domaine linéaire de mesure comme montré sur la **Figure II.38** en effectuant une analyse appelé balayage en déformation. Les mesures sont uniquement valables dans le domaine linéaire. Le domaine de linéarité a été défini pour chaque mélange et solution X/GM en utilisant les conditions suivantes :

- ✓ $T=20^{\circ}\text{C}$
- ✓ Durée d'équilibration = 5 minutes
- ✓ Fréquence angulaire = $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$
- ✓ $0,1 < \gamma < 100 \%$
- ✓ Enregistrement de 7 à 10 points par décade

Les balayages en déformation ont été effectués deux fois (duplicata).

2.5.2. Analyses sur 50h (t_0 à 50h)

Des premières analyses rhéologiques ont été réalisées sur le mélange de référence X/GdC1 afin d'estimer le temps de stabilisation du système X/GdC1 correspondant au moment où les propriétés viscoélastiques (modules de stockage et de perte G' et G'') n'évolue plus dans le temps. Ces premières analyses ont permis de justifier la durée attendue avant d'effectuer des mesures des propriétés viscoélastiques lorsque le système est dans un état stable, à l'équilibre. Afin de mettre les échantillons dans un même état initial, les échantillons analysés en rhéologie subissent une phase d'homogénéisation où les solutions et mélanges sont pipetés avec une micropipette (VWR) réglée sur un volume de 4 mL. Les caractéristiques de la géométrie Cône/Plan (C/P) en aluminium utilisée sont de posséder un diamètre de 40 mm, un angle tronqué de $1^{\circ}59'38''$ et un gap de 47 μm .

Les conditions de mesures sont les suivantes :

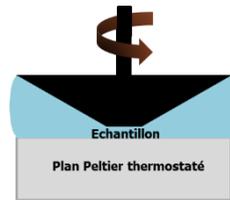


Figure II.39: Schéma d'une géométrie type Cône/Plan

- ✓ $T=20^{\circ}\text{C}$
- ✓ Durée = 50h
- ✓ Echantillonnage = 10 secondes par point
- ✓ $\omega = 10 \text{ rad.s}^{-1}$

Le taux de déformation γ (en %) a été ajusté pour chaque système analysé afin que la mesure s'effectue dans le domaine de linéarité. Afin que l'échantillon ne s'évapore pas, de l'huile de silicone est ajoutée en surface de l'échantillon à l'aide d'une pipette pasteur.

2.5.3. Analyses sur deux échelles de temps

Afin d'analyser les solutions et mélanges aux temps courts et aux temps longs en optimisant le temps d'analyse. Pour ce faire, les solutions et mélanges fraîchement préparés ont été divisés en deux fractions (**A** et **B**) d'environ exactement 17g chacune. La **Fraction A** est analysée directement après la phase d'homogénéisation et la **Fraction B** est analysée 47h après la phase d'homogénéisation.

2.5.3.1. Analyses aux temps courts (Fraction A $\Rightarrow t_0$ à 4h)

Les solutions et les mélanges (**Fraction A**) fraîchement préparés affichent de faibles viscosités et la géométrie recommandée^[24,25] pour analyser les fluides de faibles viscosité est la géométrie dite couette ou cylindre concentrique (**Figure II.40**).

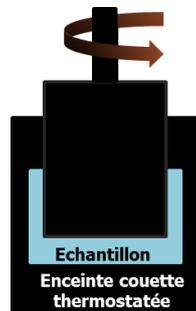


Figure II.40: Schéma d'une géométrie cylindres concentriques ou couette

Au même titre que les systèmes X/GM analysés en spectroscopie de fluorescence, ceux analysés en rhéologie subissent également une phase d'homogénéisation où les solutions et mélanges sont pipetés avec une micropipette (VWR) réglée sur un volume de 4 mL. Ainsi les systèmes analysés en spectroscopie de fluorescence et en rhéologie sont mis dans un état initial identique. Cette phase d'homogénéisation est chronométrée et ce jusqu'à l'obtention du premier point de l'analyse rhéologique ; cette durée est prise en compte pour le lancement des analyses rhéologiques effectuées à $t = t_0 + 47h$. L'analyse rhéologique consiste à balayer les modules G' et G'' en fonction du temps. Les caractéristiques de la géométrie couette utilisée lors des mesures sont de posséder un diamètre interne de 27,98 mm, d'un diamètre externe de 30 mm, une longueur de 42,11 mm et un gap de 1,2 mm.

Les conditions de mesures sont les suivantes :

- ✓ $T = 20^\circ\text{C}$
- ✓ Durée = 4h
- ✓ Echantillonnage = 10 secondes par point
- ✓ $\omega = 1 \text{ rad.s}^{-1}$

Le taux de déformation γ (en %) a été ajusté pour chaque système analysé afin que la mesure s'effectue dans le domaine de linéarité. Afin que l'échantillon ne s'évapore pas, de l'huile de silicone est ajoutée en surface de l'échantillon à l'aide d'une pipette pasteur.

2.5.3.2. Analyses aux temps longs (Fraction B $\Rightarrow t > 47h$)

Les mélanges et solutions X/GM laissés au repos (**Fraction B**) dans une salle climatisée à 18°C sont analysés à $t_0 + 47h$. De même, l'analyse consiste également à balayer les modules G' et G'' en fonction

du temps. Etant donné que les propriétés viscoélastiques (modules G' et G'') des systèmes X/GM sont stables, nous avons opté pour utiliser une géométrie type Cône/Plan (**Figure II.39**) afin de perturber le moins possible les systèmes X/GM lors de la mesure. Les caractéristiques de la géométrie en aluminium C/P utilisée sont de posséder un diamètre de 60 mm, un angle tronqué de $2^{\circ}00'43''$ et un gap de 59 μm .

Les conditions de mesures sont les suivantes :

- ✓ $T=20^{\circ}\text{C}$
- ✓ Durée = 3h10
- ✓ Echantillonnage = 10 secondes par point
- ✓ $\omega=1 \text{ rad.s}^{-1}$

De même, le taux de déformation γ (en %) a été ajusté pour chaque système analysé afin que la mesure s'effectue dans le domaine de linéarité. Pour éviter l'évaporation de l'échantillon, de l'huile de silicone est ajoutée en surface de l'échantillon à l'aide d'une pipette pasteur.

Références bibliographiques

- [1] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [2] Y. Aguni, Contribution à la compréhension des mécanismes d'interaction xanthane/galactimannane, Université Le Havre, **2009**.
- [3] M. Milas, M. Rinaudo, B. Tinland, *Polym. Bull.* **1985**, *14*, 157–164.
- [4] J. L. Doublier, B. Launay, *J. Texture Stud.* **1981**, *12*, 151–172.
- [5] S.-J. Wu, J.-H. Wu, L.-Z. Xia, C. Chu, D. Liu, M. Gong, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1612–1614.
- [6] C. Esquenet, Propriétés Structurales et Dynamiques Des Solutions de Polyélectrolytes Rigides et Semi-Rigides et de Polysaccharides Associatifs, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, **2003**.
- [7] E. Choppe, F. Puaud, T. Nicolai, L. Benyahia, *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 1228–1235.
- [8] E. Pelletier, C. Viebke, J. Meadows, P. A. Williams, *Biopolymers* **2001**, *59*, 339–346.
- [9] M. Milas, M. Rinaudo, *Carbohydr. Res.* **1986**, *158*, 191–204.
- [10] A. Dahi, B. M.-L. Abdellahi, M. F. Deida, N. Hucher, C. Malhiac, F. Renou, *Food Hydrocoll.* **2019**, *86*, 2–10.
- [11] P. J. H. Daas, H. A. Schols, H. H. J. de Jongh, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 609–619.
- [12] N. Tapie, C. Malhiac, N. Hucher, M. Grisel, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1181*, 45–50.
- [13] B. B. McCleary, *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 205–230.
- [14] B. Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, De Boeck Université, Bruxelles, **2004**.
- [15] B. Valeur, I. John Wiley & Sons, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [16] E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, M. N. Ivkova, *Photochem. Photobiol.* **1973**, *18*, 263–279.
- [17] M. D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13343–13346.
- [18] M. D. Bilokin', V. V. Shvadchak, D. A. Yushchenko, G. Duportail, Y. Mély, V. G. Pivovarenko, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 545–553.
- [19] K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 2176–2180.
- [20] M. M. Martin, L. Lindqvist, *J. Lumin.* **1975**, *10*, 381–390.
- [21] M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, *Bioorganic Chem.* **2005**, *33*, 415–425.
- [22] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14.

- [23] N. Alizadeh-Pasdar, E. C. Y. Li-Chan, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 328–334.
- [24] T. G. Mezger, *Rhéologie appliquée: à la découverte de la rhéologie avec Joe Flow*, **2017**.
- [25] GFP, J.-F. Tassin, *Initiation à La Science Des Polymères-Physique Des Polymères à l'Etat Fondu*, GFP, Nantes, **2010**.

Chapitre III : Etude des mélanges xanthane/galactomannane à l'échelle macroscopique

3. Préparation des solutions polysaccharidiques	100
3.1. Détermination de la siccité des solutions de polyélectrolytes	100
3.1.1. Introduction	100
3.1.2. Publication n°1	100
3.2. Solutions et mélanges de polysaccharides	109
3.2.1. Méthode d'agitation	109
3.2.2. Présence des sondes moléculaires dans les solutions polysaccharidiques	110
3.3. Etude de l'évolution des propriétés rhéologiques des mélanges X/GM à l'échelle macroscopique	110
3.3.1. Choix de la technique d'analyse	110
3.3.2. Etude de la cinétique de structuration des mélanges X/GM	111
3.3.2.1. Introduction	111
3.3.2.2. Publication n°2	111
Conclusion du Chapitre III	125
Références bibliographiques	126

3.Préparation des solutions polysaccharidiques

3.1.Détermination de la siccité des solutions de polyélectrolytes

3.1.1.Introduction

L'objectif de cette étude est de développer une méthode simple afin de déterminer de manière fiable la teneur en polyélectrolyte comme par exemple le xanthane, dans une solution contenant des sels. Etudier un polysaccharide en solution aqueuse tel que le xanthane signifie qu'il faut nécessairement travailler avec une concentration massique exprimée en gramme par gramme (% m/m) ou en gramme par litre (g.L⁻¹). Afin de déterminer la teneur en polysaccharide, trois méthodes principales existent à l'heure actuelle. La première est basée sur des mesures de spectrophotométrie UV-Vis^[1] ; elle est précise mais nécessite un temps de préparation assez conséquent. La deuxième méthode consiste à réaliser des extraits secs^[2] mais les calculs peuvent s'avérer très complexes lorsqu'il y a présence de sels dans la solution. La dernière méthode consiste à calculer la concentration théorique en se référant aux masses pesées (poudre de xanthane, sel, tampon, etc.), cependant, des décalages significatifs entre la concentration calculée théoriquement et celle déterminée expérimentalement sont fréquents. Afin de parer à tous ces désagréments, nous proposons ici une méthode pour déterminer la teneur en polyélectrolyte dans les solutions salines basée sur l'analyse thermogravimétrique (ATG) ; c'est l'objet de la Publication n°1 qui suit.

3.1.2.Publication n°1

Après une première soumission au « Journal of thermal Analysis and Calorimetry » non aboutie, cette publication va être soumise au journal « Carbohydrate Polymers », afin d'être de nouveau reviewer par un comité de lecture.

A simple and reliable methodology for the determination of polyelectrolyte solution concentration using thermo-gravimetric analysis

Alexandre Cordinier, Nicolas Hucher, Michel Grisel

Normandie Univ, UNIHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, 76600 Le Havre, France

Abstract: The determination of the exact amount of any polysaccharide once solubilized in a given media remains much difficult due to numerous factors such as the presence of impurities, non-soluble species, added salts or buffer. Thus the calculation of the Polysaccharide Content (PC), as often performed by using the dry weight method, is tricky and often unreliable. Therefore, a new methodology to determinate PC in aqueous saline buffered solution in a reliable and simpler way by using thermo-gravimetric analysis was developed; an example is given in the case of xanthan polysaccharide.

Keywords: Polysaccharide Content, Polyelectrolyte, TGA, Xanthan Solution

Introduction

Polymers are macromolecules which are constituted of monomer units. Natural polymers such as polysaccharides are often used in solution and most of the time in aqueous solutions due to viscosity enhancement or gelling properties. Among polysaccharides threesome are natural polyelectrolytes such as hyaluronic acid^[1], xanthan^[2-4], alginates^[5,6], etc.

These kinds of polymers bear on their repeated unit a chemical group which is charged according to the pH of the solution. According to the ionic strength in solutions, as a result of charge hindering, the conformation of polyelectrolytes classically varies from random coil at high ionic strength to stiffer conformation when ionic strength decreases. Furthermore, in some cases polysaccharides such as xanthan gum (XG) can adopt specific conformations which can be under the form of a rigid helix (low ionic strength / low temperature) or under the form of a semi-flexible chain^[3,7]. In all the cases, it is therefore necessary to add both electrolytes (e.g. monovalent salts) and a buffer to fully control the polyelectrolyte conformation in solution.

In order to prepare aqueous polysaccharide solution at a desired concentration, it is often weighed the amount of required polysaccharide powder whose moisture content is generally estimated beforehand thanks to thermal gravimetric analyses (TGA). To control carbohydrate content of such solution, the phenol-sulfuric acid method based on colorimetric tests developed in the 60s by Dubois^[8] is still used in some studies^[9-12]. Despite its efficacy this method remains fairly complex and time consuming as it requires multiple preparation steps. In addition possible errors can occur due to accidental contamination by cellulose lint and, finally, requires the use of sulfuric acid and phenol which are problematic for health and the environment. It has been recently updated by another method also based on UV-Vis spectroscopy measurements by Albalasmeh and co-workers^[13]. Nevertheless,

according to the authors themselves, this method might not be suitable for polysaccharide gums which may contain proteins as these later could interfere with the optic density measured. There is another method to determine the polysaccharide content in aqueous solution consisting on drying polymer solution samples in an oven. In presence of salts it leads to complex calculations and the precision of this method is no equivalent to the-one of the TGA.

In addition to that, most of the polysaccharides require fairly long hydration time before reaching entire solubilisation^[14-16] which could lead to unexpected concentrations due to water evaporation during gum solubilisation or loss of polysaccharide powder during the introduction step, and also due to poorly or non-soluble residues present in the sample. Therefore, as it is crucial to get the exact concentration for any polysaccharide sample, many researchers proposed experimental tools in order to reach this information. Among others, Thermo-Gravimetric Analysis is a highly reliable method, often used to assess the thermal stability of a compound^[17-19] or a material^[20]; thus, it is undoubtedly a promising technique to assess the exact polysaccharide concentration in any solution, in the presence or not of added species such as salts.

In this paper, it is described an original, rapid and efficient methodology based on TGA which reveals to be a relevant and useful tool to simply ascertain the polysaccharide content (PC) in an aqueous solution in presence of salts. This methodology, which is not intent to assess the degradation mechanisms of polysaccharides in solution, was successfully applied to XG stock solutions in the presence of added electrolytes.

Experimental section

Materials

Xanthan Gum (XG) powder was kindly provided by Degussa (France). Sodium dihydrogenophosphate buffer (NaH_2PO_4) was provided by Rhône Poulenc, sodium chloride (NaCl) was provided by Labogros (France) and the bactericide sodium azide (NaN_3) by Aldrich. Ultra-pure water was obtained from an Easypure UV Compact ultrapure water system (Barnstead). Polysaccharide content determination of buffered saline XG solution was conducted under air on a Setsys TGA 1200 SETARAM thermal gravimetric analyzer using an alumina cell (Al_2O_3) and thermocouple wires to monitor the temperature. Experiments were performed in triplicate to ensure results reliability.

Xanthan characteristics and solution preparation

Moisture content of the XG sample was determine through TGA (triplicate) at a value of $13.0 \pm 0.4\%$. Its degrees of substitution of acetate and pyruvate groups are respectively equal to 35% and 65% and its viscosimetric molecular mass determined by capillary viscosity measurements at a value of $1.46 \cdot 10^6$. In order to obtain stock solution at a polysaccharide content around 1.5% w/w, accurately about $3.75 \pm 0.001\text{g}$ ($m_{\text{XG powder}}$) of xanthan gum powder XG were gradually dissolved with the equivalent of 400 ppm (0.1g) of NaN_3 by mechanical stirring in accurately about $246.15 \pm 0.1\text{g}$ (m_{Buffer}) of phosphate buffer (0.02M NaH_2PO_4 ; pH 7.4) containing 0.01M of NaCl in order to keep XG in its

native form^[21]. Mixture was stirred for 6h to ensure total polysaccharide solubilisation. To solubilize a polysaccharide such as XG involves generally an increase of viscosity of the aqueous medium^[22–24]. Hence, during the stirring phase, air is unfortunately introduced in the medium. Air bubbles were removed under vacuum as it has been realized in Huang and coworkers' work^[25], and the final solution was kept at 5°C prior to use.

Methodology

An amount of 40 to 60 mg of XG stock solution is precisely weighed into the alumina cell (Al₂O₃) before each analysis. This mass, which is the initial mass of the sample, is set as m_i . The thermogravimetric analysis protocol shown on **Figure III.41a** was set as follows: the first step consists of an isotherm at 110°C for 45 minutes to remove water molecules until the weight loss reaches the first value plateau (**Figure III.41b**). The first plateau value is denoted as m_2 . This first step is crucial as the duration may be adjusted to ensure reaching a plateau corresponding to a constant mass m_2 denoting complete water release. Then the sample is heated at a rate of 10°C per minute from 110°C to 550°C during 34 minutes to reach a final temperature of 550°C to ensure the polysaccharide total degradation and the loss of everything but non-volatile compounds. This temperature was chosen according to a previous study on wheat straw polysaccharides from Lawther *et al*^[26]. The temperature is then maintained constant for 20 minutes until a second plateau is reached (**Figure III.41b**). The final mass affiliated to this second plateau is denoted as m_4 .

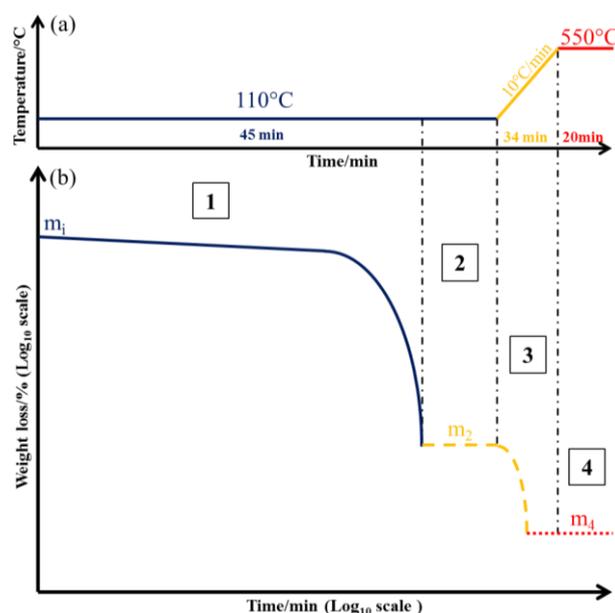


Figure III.41: (a) Scheme of the protocol of the TGA and (b) Scheme of a classical thermogram of a buffered xanthan solution

Four distinct zones (1, 2, 3 and 4) can therefore be delimited as illustrated on the scheme (**Figure III.41b**); zones 2 and 4 correspond to two mass plateau values, denoted m_2 and m_4 , respectively. The theoretical and experimental values of the polysaccharide content, PC_{theo} and $PC_{\text{experimental}}$ are calculated as follows:

$$PC_{theo} = \left[\frac{m_{XGpowder} \times \left(\frac{100 - x}{100} \right)}{m_{XGpowder} + m_{Buffer}} \right] \times 100 \quad \text{and} \quad PC_{experimental}(\%) = \frac{(m_2 - m_4)}{m_i} \times 100$$

m_i , m_2 and m_4 are expressed in mg; m_2 and m_4 are the mean values at the first and the second plateau, respectively.

PC_{theo} is equal to $1.31 \pm 0.04\%$. PC_{theo} is an estimation based on the purity of the raw materials. Precise and accurate $PC_{experimental}$ values can be toughly determined using colorimetric methods as set up by Dubois et al., 1956^[8] or Albalasmeh and coworkers^[13] which can unfortunately provide biased results due to the presence of protein in the analysed natural compounds such as XG. Therefore calculate PC_{theo} is a solution although $PC_{experimental}$ values are vulnerable to hazards of the preparation of polymer solution.

Data analysis

Results were presented as the mean value \pm standard deviation (SD). XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France version 2012.1.01) was used to perform the statistical analyses of the collected data. The t and z parametric test (Student test) was applied to the results using a confidence interval α of 5% to spot the significant differences between PC_{theo} which is the theoretical mean and $PC_{experimental}$ values ($p < 0.05$).

Results and Discussion

m_2 corresponds to the mass of the dehydrated XG and of the salts as, at this temperature, no degradation can occur for these compounds^[27,28]. This means that the mass loss which occurs during the first isothermal treatment at 110°C is only water molecules. It can be noticed that in this study that XG decomposition is followed by another weight loss as visible on **Figure III.42** thanks to the derivative thermo-gravimetry (DTG; light red line) around 430°C. Thanks to Banach^[28] and coworkers' work this specific mass loss may be explained by the loss of water molecules during the condensation of sodium dihydrogen orthophosphate anions (NaH_2PO_4) with the rising temperature into sodium dihydrogen pyrophosphate ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) such as:



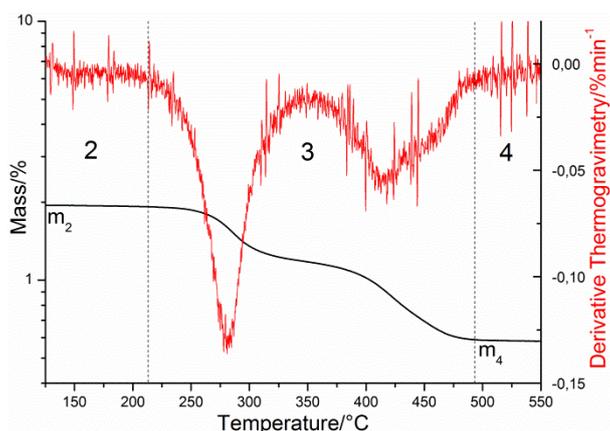


Figure III.42: Thermogram of a buffered saline XG solution representing the mass loss (% , solid black line) and the DTG curve (%/min, light red line).The vertical black dotted lines stand for the different mass loss phase delimitations. Water loss was intentionally hidden to improve the observation of polysaccharide degradation steps.

As already stated in the introduction, XG is a polyelectrolyte whose ordered form is kept by the presence of salt at a concentration higher than 10^{-4} M. Consequently a saline phosphate buffered solution was used for the polymer solution preparation to keep XG under its ordered form on the one hand, and to keep the pH at 7.4 on the other hand. This leads to an ionic strength equal to 0.13M. Thus it is hypothesized that the ashes (m_4) were only made of minerals which might also be initially present in XG powder sample^[31–33].

The experimental curve reported on **Figure III.42** allows delimitating three characteristic zones (2, 3 and 4) as expected. Zone 1, non-visible on **Figure III.42**, corresponds to the initial water loss during the isothermal treatment at 110°C. Therefore the first plateau value, in zone 2 corresponds to the sample mass once dehydrated, therefore only containing XG powder and salts (m_2). Several studies^[27,31,32,34] have indeed shown for XG and other polysaccharides such as hyaluronic acid^[35], alginate^[36], chitin and chitosan^[37], that their degradation temperature was clearly above 200°C. Zohuriaan and co-workers^[27] have shown that XG degradation temperature occurred at 290.8°C under a nitrogen atmosphere. In our case, due to highly degrading conditions (atmosphere under air), thermo-gravimetric analysis performed on XG allowed estimating its degradation temperature at $282.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (**Figure III.42**) which is in good agreement with the literature^[27,31,32,34,38,39]. Then, XG entirely deteriorates in zone 3 during the protocol heating step from 110 to 550°C, thus only inorganic salts and minerals keep present in the crucible.

m_2 and m_4 corresponding to the plateau values allow calculating the Polysaccharide Content (PC) of each experiment ; results obtained through 3 to 5 repetitions clearly indicate a good repeatability for this method for all prepared XG solutions as it is shown in Table III.1. A $\text{PC}_{\text{experimental}}$ of $1.31 \pm 0.08\%$ (w/w) was calculated for the studied XG stock solution in this paper (XG stock solution #1).

Table III.1: PC_{experimental} values of five XG stock solutions#

XG solution#	PC _{experimental} (%) [*]	PC _{theo} (%) [*]
#1	1.31±0.08	1.31±0.04
#2	1.35±0.03	
#3	1.28±0.02	

^{*}p-value > 0.05 and $\alpha = 0.05$

The Student test confirms that there is no significant difference ($p > 0.05$) between PC_{theo} and PC_{experimental} values of XG solutions #1, #2 and #3; thus meaning a good reliability of this method.

Complementary experiments on XG solution #1 following the same heating protocol step but with heating up to 900°C were performed to check the method performance, with no significant difference (1.29±0.04%) thus allowing validating the proposed protocol (result not shown). As the total degradation temperatures of the main known polysaccharides^[27] such as chitosan, hydroxyethyl cellulose, sodium carboxymethyl cellulose and so on occur for a temperature under 400°C; this confirms that heating above 550°C it is not necessary to reach expected results with good precision, reproducibility and reliability.

As it has been previously written in this paper, PC_{theo} is an estimation based on the purity of the raw materials and is consequently dependent of hazard risk due to the preparation of the polymer solution. Indeed XG solution preparation steps such as removing air bubbles under vacuum can lead to a significant water loss which cannot be noticed by the manipulator. Tests were conducted with no precise control of this step and the evolution of the XG stock solution were determined through our methodology, giving new PC_{experimental} values equal to 1.57±0.02% and 1.58±0.01%. Despite their good reproducibility, these PC_{experimental} values exemplified that wrong concentration can be easily obtain and the importance to dispose of such simple, fast, reproducible and reliable method such as the-one described in this paper to determine the siccidity of natural raw material such as polysaccharides whose quality can change from a batch to another.

Conclusions

A new methodology to determine the polysaccharide content in XG saline buffered aqueous solutions using TGA was proposed and fully described in this paper. Unlikely the Dubois' method as well as the improved methods based on Dubois'works which is time consuming by requiring lots of sample preparation steps, this new methodology interestingly appears highly reliable and quite easy to achieve. Besides, it showed that TGA lets to ignore uncontrolled preparation step parameters such as for example, the room temperature, in order to obtain very accurate and reliable PC_{experimental} values. It is obvious that such a method is generalizable to any natural polymer sample poured in solution even at low concentration and in the presence or not of salts and minerals.

Acknowledgements

The authors acknowledge the European Union and the Haute Normandie region for financial supports to this project and the Region Normandie for research grant.

References

- [1] R. L. Cleland, J. L. Wang, D. M. Detweiler, *Macromolecules* **1982**, *15*, 386–395.
- [2] A. Jeanes, J. E. Pittsley, F. R. Senti, *J. Appl. Polym. Sci.* **1961**, *5*, 519–526.
- [3] J. Lecourtier, G. Chauveteau, G. Muller, *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8*, 306–310.
- [4] B. Tinland, M. Rinaudo, *Macromolecules* **1989**, *22*, 1863–1865.
- [5] O. Smidsrød, A. Haug, B. Larsen, S. Gronowitz, R. A. Hoffman, A. Westerdahl, *Acta Chem. Scand.* **1965**, *19*, 329–340.
- [6] A. Haug, O. Smidsrød, B. Larsen, S. Gronowitz, R. A. Hoffman, A. Westerdahl, *Acta Chem. Scand.* **1965**, *19*, 341–351.
- [7] M. Milas, M. Rinaudo, *Carbohydr. Res.* **1986**, *158*, 191–204.
- [8] Michel. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, Fred. Smith, *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356.
- [9] C. Kierulf, I. W. Sutherland, *Carbohydr. Polym.* **1988**, *9*, 185–194.
- [10] K.-S. Song, S.-M. Cho, J. Lee, H.-M. Kim, S.-B. Han, K.-S. Ko, I.-D. Yoo, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1995**, *43*, 2105–2108.
- [11] C. C. Wang, S. C. Chang, B. S. Inbaraj, B. H. Chen, *Food Chem.* **2010**, *120*, 184–192.
- [12] Y. Liu, G. Huang, J. Hu, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 1304–1307.
- [13] A. A. Albalasmeh, A. A. Berhe, T. A. Ghezzehei, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *97*, 253–261.
- [14] J. A. Lopes da Silva, M. P. Gonçalves, *Food Hydrocoll.* **1990**, *4*, 277–287.
- [15] J. A. Casas, V. E. Santos, F. García-Ochoa, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 282–291.
- [16] Y. Aguni, Contribution à la compréhension des mécanismes d'interaction xanthane/galactimannane, Université Le Havre, **2009**.
- [17] K. Schlichte, T. Kratzke, S. Kaskel, *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, *73*, 81–88.
- [18] D. K. Chattopadhyay, D. C. Webster, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 1068–1133.
- [19] S. B. Bothara, S. Singh, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, S1031–S1035.
- [20] H. Qin, S. Zhang, C. Zhao, M. Feng, M. Yang, Z. Shu, S. Yang, *Polym. Degrad. Stab.* **2004**, *85*, 807–813.
- [21] I. Capron, G. Brigand, G. Muller, *Polymer* **1997**, *38*, 5289–5295.
- [22] E. Bylaite, J. Adler-Nissen, A. S. Meyer, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3577–3583.
- [23] D. J. McClements, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5604–5611.
- [24] M. S. Ibrahim, J. Valencony, S. King, M. Murray, A. Szczygiel, B. D. Alexander, P. C. Griffiths, *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *529*, 588–598.
- [25] C. Huang, Q. Chen, Z. Wang, *IEEE Trans. Compon. Packag. Manuf. Technol.* **2013**, *3*, 1107–1113.
- [26] J. M. Lawther, R. Sun, W. B. Banks, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 667–675.
- [27] M. J. Zohuriaan, F. Shokrolahi, *Polym. Test.* **2004**, *23*, 575–579.
- [28] M. Banach, A. Makara, *J. Chem. Eng. Data* **2011**, *56*, 3095–3099.
- [29] H.-J. de Jager, L. C. Prinsloo, *Thermochim. Acta* **2001**, *376*, 187–196.
- [30] W. L. Hill, S. B. Hendricks, E. J. Fox, J. G. Cady, *Ind. Eng. Chem.* **1947**, *39*, 1667–1672.
- [31] C. G. Mothé, D. Z. Correia, F. P. de França, A. T. Riga, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2006**, *85*, 31–36.
- [32] A. Parikh, D. Madamwar, *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 1822–1827.
- [33] P. M. A. Klaic, A. M. Nunes, A. da S. Moreira, C. T. Vendruscolo, A. S. Ribeiro, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1895–1900.
- [34] P. S. Gils, D. Ray, P. K. Sahoo, *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *45*, 364–371.
- [35] R. Barbucci, R. Rappuoli, A. Borzacchiello, L. Ambrosio, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2000**, *11*, 383–399.
- [36] R. R. Mallepally, I. Bernard, M. A. Marin, K. R. Ward, M. A. McHugh, *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *79*, 202–208.

- [37] A. T. Paulino, J. I. Simionato, J. C. Garcia, J. Nozaki, *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64*, 98–103.
- [38] S. Faria, C. L. de Oliveira Petkowicz, S. A. L. de Moraes, M. G. H. Terrones, M. M. de Resende, F. P. de França, V. L. Cardoso, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86*, 469–476.
- [39] R. M. D. Soares, A. M. F. Lima, R. V. B. Oliveira, A. T. N. Pires, V. Soldi, *Polym. Degrad. Stab.* **2005**, *90*, 449–454.

En résumé:

La méthode générale proposée consiste à utiliser l'Analyse Thermo Gravimétrique (ATG) pour déterminer avec précision la concentration de solution aqueuse d'un polyélectrolyte donné, préparé en solution diluée ou semi-diluée, en présence ou non de sel(s) ajouté(s). La publication repose sur l'exemple d'une solution de xanthane préparée en présence de sel et en milieu tamponné. En pratique, une faible quantité de solution de gomme de xanthane, comprise entre 20 à 30 mg (masse m_1), préparée initialement à 1,5% (m/m) dans le cas présent, subit un protocole de chauffage bien défini utilisant une balance thermogravimétrique (ATG). La perte de masse est suivie en fonction de la température et du temps. Lors de la première isotherme de température réalisée à 110°C jusqu'à ce que la masse de l'échantillon se stabilise, l'eau est éliminée et l'échantillon est plus constitué à ce stade que de la gomme et des sels ajoutés (masse m_2). Puis, la température est augmentée progressivement ($10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) jusqu'à 550°C sous air afin de procéder à la dégradation complète du xanthane par pyrolyse et élimination de toute matière organique. A l'issue de cette montée en température, la température est maintenue constante à 550°C jusqu'à stabilisation. A ce stade et d'après la force ionique (I) de la solution initiale ($I=0,13\text{M}$), le résidu n'étant plus constitué que de sels minéraux (masse m_4), il est possible de déterminer précisément la teneur en xanthane en retranchant la masse des sels minéraux (m_4) de la masse de l'échantillon constitué de gomme de xanthane et de sels (m_2) et en divisant le tout par la masse initiale de solution introduite dans la nacelle d'ATG. Les résultats obtenus permettent de valider la fiabilité et la précision de cette méthode générale, qui est facilement transposable à tout type de polyélectrolytes en solution aqueuse.

3.2.Solutions et mélanges de polysaccharides

3.2.1.Méthode d'agitation

Afin de préparer les mélanges de gommes (dont les concentrations exactes ont pu être systématiquement vérifiées et ajustées grâce au protocole décrit précédemment), nous avons opté dans un premier temps pour l'utilisation d'une agitation magnétique. Cette technique a été privilégiée à l'agitation au vortex car elle assure un meilleur contrôle sur les paramètres d'agitation tels que la vitesse et la température. Une fois la sonde moléculaire sélectionnée introduite dans la solution ou le mélange de polysaccharide(s), nous nous sommes interrogés sur la façon optimale d'homogénéiser la sonde dans le milieu, afin que cette phase d'homogénéisation n'engendre pas de perte de matière (sonde en particulier) et n'ait ainsi aucun effet sur la concentration de sonde. Après plusieurs tentatives infructueuses et comparaison de différentes méthodes au laboratoire, nous avons opté pour une méthode d'homogénéisation sous forts cisaillements à l'aide d'une micropipette (plusieurs aspirations et relargages successifs) plutôt que l'agitation magnétique, cette dernière pouvant causer une perte de matière conséquente étant donné les volumes des solutions.

3.2.2. Présence des sondes moléculaires dans les solutions polysaccharidiques

L'utilisation de petites molécules dans les polymères est très courant, notamment dans les matériaux dit plastifiés afin de les rendre plus souples^[4]. Il nous est apparu évident de vérifier si l'introduction de petites molécules telles que les sondes de fluorescence utilisées dans ce travail dans les solutions de polysaccharides modifient de manière significative les propriétés viscoélastiques à l'échelle macroscopique.

Tableau III.13: Comparaison des valeurs des modules de stockage (G') d'un mélange X/GdC1 80/20 sans (Témoin) et contenant la sonde ANS

Echantillon	G' (Pa)
Témoin	0,95±0,05
X/GdC1 80/20+ANS	1,02±0,19

Pour cela, le module élastique G' a été mesuré pour un mélange donné, X/GdC1 80/20 en l'absence et en présence de la sonde moléculaire ANS à la concentration de travail des analyses de fluorescence ($8 \cdot 10^{-6}M$). Afin d'analyser les mélanges dans leur état d'équilibre (stable à l'échelle macroscopique), les analyses rhéologiques ont été effectuées à $t=t_0+47h$ pendant une durée de 3h. Ces analyses ont été effectuées en triplicat et les résultats sont présentés dans la **Tableau III.13**). Les deux valeurs ainsi déterminées sont statistiquement équivalentes. De ce fait, nous pouvons en conclure que l'introduction de sondes moléculaires dans les quantités fixées dans le cadre de notre étude, n'engendre aucune modification des propriétés viscoélastiques des mélanges xanthane/galactomannane étudiés.

3.3. Etude de l'évolution des propriétés rhéologiques des mélanges X/GM à l'échelle macroscopique

3.3.1. Choix de la technique d'analyse

Dans le cadre de ce projet, les gommés de xanthane et de galactomannane qui appartiennent à la classe des polysaccharides, et plus largement des matériaux polymères, ont été étudiées. Afin de caractériser de tels systèmes et tout particulièrement les solutions de polymère dans leur globalité, c'est-à-dire, à l'échelle macroscopique, des analyses rhéologiques sont couramment utilisées^[5]; la rhéologie étant la science de l'écoulement de la matière. Les propriétés viscoélastiques, notamment exprimées au travers les modules élastique G' et visqueux G'' en fonction de diverses variables telles que le temps (t) ou la déformation (γ), permettent ainsi de caractériser les systèmes.

3.3.2. Etude de la cinétique de structuration des mélanges X/GM

L'objectif de ce travail étant de caractériser les interactions en solutions au sein d'un système à base de polysaccharides, seuls ou en mélange, il était important dès le début de l'étude de s'assurer de contrôler parfaitement l'état d'organisation de tous les systèmes au plan macroscopique avant d'envisager de les appréhender à l'échelle moléculaire. Des travaux préliminaires menés dans cette optique, combinés aux rares informations disponibles, souvent parcellaires et évasives, concernant la compréhension de la cinétique de structuration des mélanges après préparation, nous ont amenés à nous intéresser spécifiquement à cet aspect. C'est l'objet de cette partie du manuscrit.

3.3.2.1. Introduction

Lors de la mise au point du procédé de préparation des solutions de xanthane, de galactomannane et du mélanges des deux gommes, des analyses de contrôle visant d'une part à s'assurer de la répétabilité et de la reproductibilité du procédé et d'autre part à s'assurer que le système étudié soit dans un état d'équilibre (\Rightarrow stabilité des modules G' et G'' en fonction du temps), ont été systématiquement mises en œuvre. Ces analyses de contrôle consistent à mesurer les valeurs des modules de stockage et de perte (G' et G'') d'une même solution ou mélange de polysaccharides, ponctuellement et régulièrement au cours d'une période temporelle allant jusqu'à 50 heures.

Nous avons pu constater logiquement que les modules G' et G'' évoluent au cours du temps dès la phase de préparation des mélanges de gommes, avec un temps nécessaire pour atteindre l'équilibre qui varie très sensiblement en fonction de la composition des mélanges (notamment le ratio X/GM). Ce « temps de structuration » n'est pas toujours mentionné dans la littérature, et très peu d'études^[10,12] se sont focalisées sur cette période transitoire. En particulier, Les publications relatives aux mélanges xanthane/galactomannane mentionnent tout juste des temps d'attente avant analyse d'une nuit^[6-8], de 16h^[9], de 21h^[10] ou encore de 24h^[11] avant de procéder à toute analyse de caractérisation, sans jamais s'intéresser aux variations pourtant très significatives de ce temps en fonction des ratios des 2 gommes. C'est tout l'objet de la Publication n°2 dans laquelle a été étudiée l'évolution du comportement, avant équilibration du système, des solutions des gommes seules et en mélange en faisant varier la composition du mélange xanthane/galactomannane.

3.3.2.2. Publication n°2

Investigation of the Gelation Process of Xanthan-Galactomannan Systems

Alexandre Cordinier, Nicolas Hucher, Michel Grisel

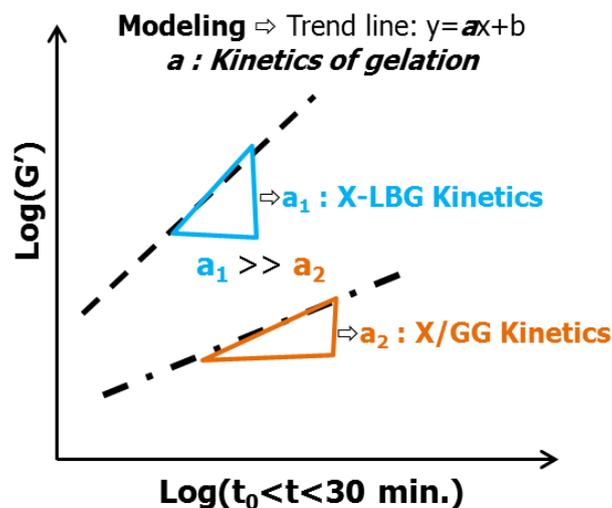
Normandie Univ, UNIHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, 76600 Le Havre, France

Corresponding author:

Abstract: Many polysaccharides are known to strongly interact thus developing synergies; this is typically the case of aqueous xanthan/galactomannan mixtures that may form gels in given conditions. Nevertheless, in this latter case, the parameters governing the kinetics of gelation still remain poorly documented. Thus, the goal in this present work is to investigate the way both polysaccharides interact with each other once mixed together, since the initial state until reaching equilibrium. To this end, rheological behaviour of xanthan-galactomannan (Locust Bean Gums LBG and Guar Gums GG) mixtures was monitored over time.. It had been shown for a X-LBG mixture that kinetics of structuration are faster at synergistic proportions at the very beginning of the monitoring (first 30 minutes). The kinetics of structuration are three times faster for X-LBG systems than for X-GG systems proving that there is an influence of the microstructure of GM.

Key words: Gelation, Polysaccharides, Xanthan, Galactomannan, Kinetics, Interactions

Graphical abstract



Highlights

- Xanthan/Galactomannan gelation takes several hours
- Xanthan/Galactomannan gelation process occurs fast at the synergistic mixture ratios

- The higher is the M/G ratio, the faster occurs the gelation process

1. Introduction

Polysaccharides are generally natural polymers obtained from renewable and sustainable resources. Nowadays they are increasingly used in several industrial domains such as oil recovery(Lazar, Petrisor, et Yen 2007; Sandvik et Maerker 1977) , packaging(Cazón et al. 2017; Tajik et al. 2013). Cosmetic products(Bais et al. 2005; Katzbauer 1998; Semenzato, Costantini, et Baratto 2014) and food applications(Jiang et al. 2019; Maxwell et al. 2012) often use such natural polymers as rheological modifiers. Some of those polysaccharides are also combined as they are known to exhibit a synergy of interaction which is expressed generally by a system gelation as for examples in the xyloglucan-gellan(Nitta et al. 2003); the xanthan-glucomannan(Paradossi et al. 2002) or in the xanthan/galactomannan(Grisel et al. 2015; Mannion et al. 1992; Renou et al. 2013) mixtures.

Gelation point is defined such as the viscosity of the analyzed system tends to an infinite value(Nič et al. 2009). However gel state does usually not occur suddenly as it is illustrated for konjac glucomannan systems(Yoshimura et Nishinari 1999; Zhang et al. 2001) and for gelatin systems(Fonkwe, Narsimhan, et Cha 2003; Goudoulas et Germann 2017). As a striking example, literature related to xanthan-galactomannan (X-GM) mixtures often indicates time periods such as "over a night"(Bresolin et al. 1997; Chandrasekaran et Radha 1997; Zhan et al. 1993), « 14 hours »(Fernandes 1995), « 16 hours »(Shatwell et al. 1990b) or "24 hours"(Shatwell et al. 1990a) once the mixture step performed, prior to any analysis.

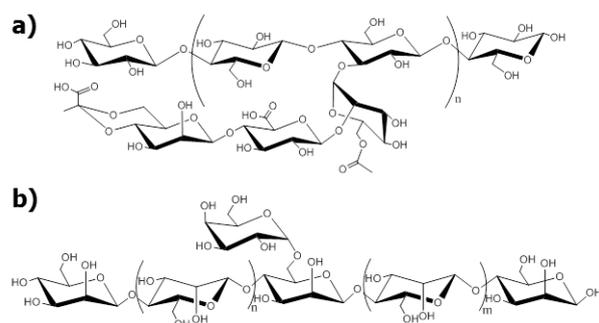


Figure III.43: a) Chemical structure of xanthan gum and b) Generic chemical structure of galactomannan gum

Xanthan (X) is an exopolysaccharide derived from biotechnology(Jeanes, Pittsley, et Senti 1961; Rogovin, Anderson, et Cadmus 1961). It is composed of a main chain of β-D-glucopyranose units ("glucose") and a trisaccharide side chain(Jansson, Kenne, et Lindberg 1975; Melton, Mindt, et Rees 1976); its chemical structure is presented on **Figure III.43a**. Galactomannans (GM; **Figure III.43b**) are polysaccharides extracted from plant seeds (*Leguminosæ*). They are composed of 1,4-β-D-mannopyranose units ("mannose") which are partially substituted by 1,6-galactopyranose residue ("galactose")(Prajapati et al. 2013). For these polysaccharides, a mannose to galactose ratio (M/G) is defined and its value varies according to its origin(Prajapati et al. 2013). Besides, knowing the M/G ratio, repartition of galactose residue can be determined through LC-MS experiments (Daas, Schols, et

de Jongh 2000) in order to know the way galactose residues are distributed along mannose chains of galactomannans. X-GM aqueous mixtures are very well-known to develop a synergy of interaction where specific properties such as viscosity, viscoelasticity, gel strength, etc. are enhanced as compared to those of xanthan or galactomannan solutions (Fernandes 1995; Tako, Asato, et Nakamura 1984). This synergy can be highlighted through different methods, mostly rheology (Higiro, Herald, et Alavi 2006; Renou et al. 2013).

Only few studies describe xanthan/galactomannan system gelation process; Fernandes (Fernandes 1995) demonstrated by recording the values of the visco-elastic moduli (G' and G'') over time that for xanthan/locust bean gum mixture samples, gelation occurred after a period of time ranging from 60 to 90 minutes according to preparation conditions. In another study Casas and García-Ochoa (Casas et García-Ochoa 1999) showed by monitoring the dynamic viscosity over time of their xanthan/locust bean gum mixture samples that a steady state was reached after a minimum time period of 12 hours. It is obvious that both teams proceeded their investigations on different gum samples on the one hand, with different preparation conditions on the other hand. Nevertheless, such differences may appear highly confusing thus making it necessary to thoroughly investigate more deeply the gelation following the mixing step.

In this paper, xanthan-galactomannan mixture gelation process was investigated through rheological measurements (e.g. G' storage modulus monitored over time). In particular, this study focuses on the first 30 minutes corresponding to the time range where the evolution of X/GM viscoelastic properties is the most significant. Experimental results show that the microstructure of GM does have an impact on the X-GM kinetics of structuration.

2. Experimental section

2.1 Materials

Polysaccharide powders Locust bean Gum 1 (LBG1) and Xanthan gum (X) were kindly provided by Degussa (France). Locust Bean Gum 2 (LBG2) was provided by Cargill (France). Guar Gum (GG1) and Guar Gum (GG2) were respectively provided by Danisco and Cargill (France). M/G ratios of LBG1, LBG2, GG1 and GG2 were determined as described in Dahi and co-workers' protocol (Dahi et al. 2019) and are respectively equal to 2.7, 3, 1.4 and 1.52. Degrees of blockiness (DB) were determined and calculated according to Tapie and co-workers' work (Tapie et al. 2008) and are respectively equal to 95.1%, 74%, 32.9% and 30.3%. Na_2HPO_4 was provided by Rhône Poulenc, NaCl was provided by Labogros (France) and the bactericide sodium azide (NaN_3) by Aldrich. Methanol for HPLC was provided by Carlo Erba and ultra-pure water was obtained from an Easypure UV Compact ultrapure water system (Barnstead).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of gum solutions and mixtures

Xanthan gum powder (X) was dissolved in the presence of 400 ppm of NaN_3 by mechanical stirring for at least 6h in aqueous media containing a phosphate buffer (pH 7.4) and NaCl 0.01M in order to keep

X in its ordered form. X stock solution dry-solid content was determined by dehydrated 40 to 60 mg of X stock solution sample at 110°C for 45 minutes. The exact polysaccharide content was calculated thanks to the masses of the dehydrated sample. X stock solution was then stocked at 4°C for a maximum of 2 months. Each galactomannan gum (LBG1, LBG2, GG1 and GG2) powder was dispersed at 83°C for 3h in ultra-pure water under mechanical stirring. Then an additional 3h of mechanical stirring at room temperature in a water bath was performed and 400ppm of NaN₃ was added. Then, each galactomannan stock solution was centrifuged at 14,000g for 1 hour as many times as necessary to remove non-soluble residues. Dry extracts using an oven (105°C) allowed the determination of the final galactomannan stock solutions concentration of supernatant.

Once each gums solution prepared separately, 40g of X-GM mixtures were prepared by weighting from each polysaccharide stock solution to get the final concentrations of each polysaccharide at the desired gum ratio. The total polysaccharide concentration was fixed at 0.2% w/w for gum solutions and mixtures. All X-GM mixtures were magnetically stirred for at least 20 minutes to assure homogenization, and then centrifuged at 500g for 5 minutes at 20°C to remove air bubbles.

2.2.2. Rheological measurements

Once prepared, polysaccharide solutions and xanthan/galactomannan mixtures were characterized through rheological experiments. Once checked the linear viscoelastic domain for each system, the evolution of viscoelastic properties was monitored within the linear viscoelastic domain at 20°C over a period of time up to 50 hours. Experiments were carried out with controlled stress rheometers (DHR series, TA Instruments) equipped with a Peltier temperature control device. Depending on the mixture, either an aluminum cone/plate geometry (40 mm; 1°59'38"; 47 μm) or aluminum concentric cylinders (DIN rotor, bob diameter, inner diameter 27.98 mm, outer diameter 30 mm; length, 42.11 mm; gap, 1.2 mm) were used.

For all rheological experiments, water evaporation was prevented by covering the sample with low viscosity silicon oil. Prior to measurement, gum solutions and mixtures were homogenized through high strength with a micropipette through a series of suction/releases in order to ensure the polysaccharide mixtures were initially fully disorganized.

3. Results and Discussion

3.1. Gelation process of the X-LBG1 system

Figure III.44a gives the evolution of the storage modulus G' recorded over 50 hours for X-LBG1 ratios ranging from 20-80 to 70-30, at total polymer content of 0.2% w/w as a function of time (h). It is striking that steady state needs more than 24h to be achieved, especially near the optimum of synergy. This illustrates and explains why it is important to leave "at rest" X-GM system to reach stabilization in order to realize analyses or measurements of a stable system. Same observations were made also for X-LBG mixtures by Fernandes(Fernandes 1995) and Casas and García-Ochoa(Casas et García-Ochoa 1999). As it has been explained in the introduction X-LBG1 system which exhibits a synergy of interaction after 48h of monitoring even at low polysaccharide concentration (0.2% w/w)

(**Figure III.44b**). The optimum of synergy occurs for a composition at X-LBG1 50-50 which is in good accordance with the literature(Mannion et al. 1992; Renou et al. 2013; Wang, Wang, et Sun 2002). One can observed that the closer to the synergistic X-LBG1 ratio it is, the longer time period is to reach stabilization. Thanks to these results, it is obvious that X-LBG1 ratio sharply influences the gelation mixtures process: the further away from maximum synergy, the faster the system reaches equilibria. Thus, next section aims to focus on the early stage of the mixtures evolution.

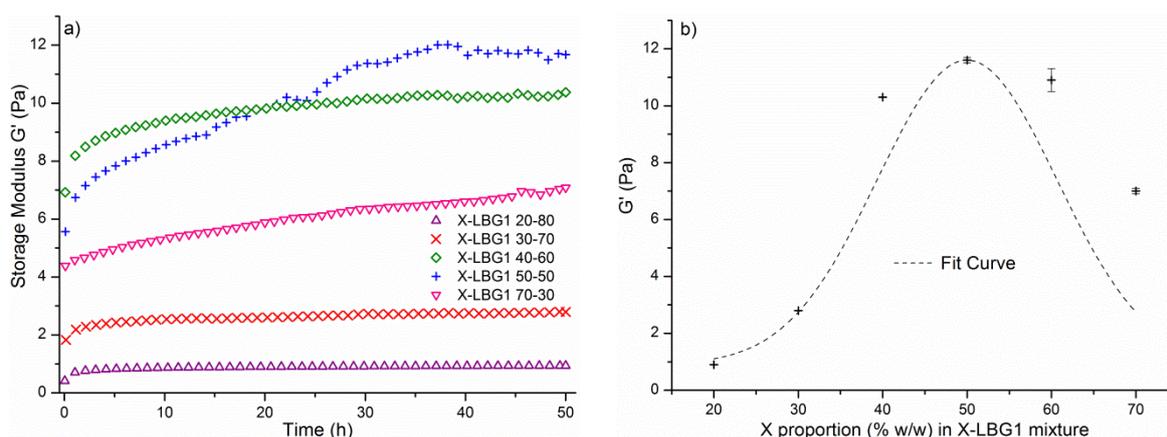


Figure III.44 : a) Evolution of the storage modulus G' over time for X-LBG1 (Δ) 20-80, (\times) 30-70, (\diamond) 40-60, ($+$) 50-50 and (∇) 70-30 mixtures b) Values of the storage modulus G' of X-LBG1 system once stabilized and (--) is a fit curve (OriginPro8; Fit GaussAmp)

The most significant variation of G' is indeed observed at the very early stage of the experiment corresponding to the very first hours of monitoring **Figure III.44a**. Monteiro and her co-workers(Monteiro et al. 2005) also showed that the most significant variations of the G' occur at the very beginning of samples preparation, for a time period equal to 30 minutes for Galactomannan-whey protein systems. Based on this observation, further kinetic studies of the present study were focused on short times, corresponding to the first 30 minutes which has never been studied yet for X-GM systems in the literature. Figure 3 reports the evolution of G' (Pa) versus time (minutes) with using a double logarithm scale. Trend line given for X-LBG1 50-50 illustrates the linear law, thus allowing calculating the slope for the variation of $\log(G')$ with $\log(t)$. Slopes for all X-LBG1 mixture ratios are reported in **Table III.2**. Slopes directly express the G' evolution rate, in other words the kinetics of structuration of X-LBG1 system at the early stage of its structuration phase.

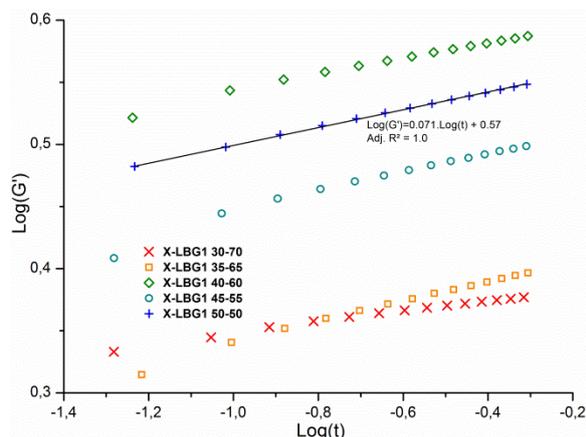


Figure III.45: Logarithm of the storage modulus $\text{Log}(G')$ represented as a function of logarithm of time $\text{Log}(t)$ of X-LBG1 (×) 30-70, (□) 35-65, (◇) 40-60, (○) 45-55 and (+) 50-50 mixture ratios

Table III.2: Slope for the variation of $\text{log}(G')$ versus $\text{log}(t)$ X-LBG1 mixture ratios at short times (first 30 minutes)

X-LBG1 ratios	Slope $\times 10^{-2}$
20-80	4.4±1
30-70	5.9±1
35-65	8.3±1
40-60	6.5±2
45-55	8.0±1
50-50	7.1±2
60-40	2.2±1
70-30	3.1±0
80-20	3.3±0

First, one can observe that the variation of the viscoelastic properties is the quickest around and at the optimum of synergy. Then, in a lesser extent, a slower kinetic is observed for X-LBG systems with high LBG content and, finally, the kinetic of systems structuration is the lowest for maximum X content. There is statistically no difference between kinetics of the following X-LBG1 ratios: 35-65, 40-60, 45-55 and 50-50 which means that these X-LBG1 ratios own the same kinetics of structuration around the optimum of synergy. Fast kinetics of structuration at short times (first 30 minutes) may certainly illustrate the spontaneous character of the X-LBG1 association around the synergistic X-LBG1 ratios; nevertheless, although for the same synergistic ratios a much longer time period to get G' stabilization is necessary. It is interesting to notice that the fastest kinetics of X-LBG1 structuration occur for synergistic X-LBG1 ratios where the stabilization time is paradoxically the longer. Such similar behaviour was already described by Zhang and co-workers' works (Zhang et al. 2001) for konjac glucomannane systems according molecular weight of KGM samples. This may result from a competition between different kind of interactions at the molecular scale, this inducing the occurrence of initial temporary interactions that may progressively be replaced by permanent ones. Such speculation will deserve to be investigated by analyses at the molecular scale, as it will be described in a future paper.

3.2. Influence of the microstructure of galactomannans

In order to investigate the influence of the polysaccharides microstructure on the X-GM system structuration kinetics, a series of galactomannan (GM) samples owning different microstructure (as revealed by M/G and DB values) were mixed with the same xanthan (X) sample at a unique ratio of 50-50 which by the way was determined as the synergistic ratio of X-LBG1 system. Thus, in addition to the previous LBG1 sample, three further galactomannan samples were tested: a second locust bean gum denoted LBG2 and two guar gums defined as GG1 and GG2, respectively. All these GM gums characteristics is reported in "Materials" section of the present article. These X-GM 50-50 mixtures

were analyzed through the same rheological experiment conditions as previously utilized for X-LBG1 mixtures (recording G' over the first 30 minutes). $\text{Log}(G')$ versus $\text{Log}(t)$ was then plotted in a bilogarithmic representation for each X-GM mixture as visible on **Figure III.46**.

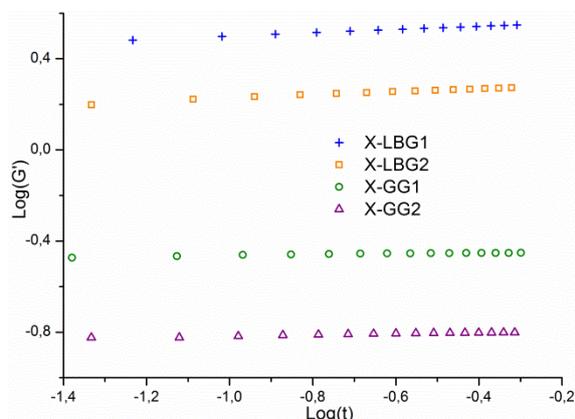


Figure III.46: Logarithm of the storage modulus $\text{Log}(G')$ represented as a function of logarithm of time $\text{Log}(t)$ of (+) X-LBG1, (■) X-LBG2, (○) X-GG1 and (△) X-GG2 mixtures at a 50-50 ratio (w/w) (Fraction A)

Table III.3: Kinetic values of structuration for X-GM 50-50 mixtures at short times (first 30 minutes Fraction A) and G' values (after 48h Fraction B)

X-GM 50-50 Samples	Slope $\times 10^{-2}$	G' (Pa)
X-LBG1	7.1±2	3.9±0.7
X-LBG2	6.7±1	3.1±0.1
X-GG1	2.3±0.0	0.16±0.01
X-GG2	2.7±1	0.15±0.04

Trend line slope values as listed in **Table III.3** reflect the kinetics of structuration of X-GM 50-50 systems at short times (first 30 minutes). Slope values as determined for the two X-LBG systems are statistically the same, while they are also statistically the same for X-GG systems; however, X-LBG and X-GG system kinetics of structuration appear statistically different. Thus, the quickest kinetics of structuration are observed for X-LBG mixtures, these lasts being almost three times higher when compared to X-GG ones. Thus X-LBG association occurs faster than for X-GG systems suggesting that X-LBG system association is more spontaneous than for X-GG system association. Furthermore, the G' storage modulus values at steady state (**Table III.3**) for all the X-GM mixtures at 50-50 are far higher for X-LBG systems than for X-GG systems. These results confirm previous studies showing that X better interacts with LBG (Dea et al. 1977; Grisel et al. 2015; McCleary 1979; Morris et al. 1977; Renou et al. 2013). At the macroscopic scale, both LBG behave in the same way with X and so do both GG either. Compared to GG, LBG having a higher M/G ratio and usually higher DB own much more smooth zones (zones without galactose residues) which enhances the association with X explaining why faster kinetics of structuration occur for the X-LBG systems. Monteiro and her team showed in their study on galactomannan-soy protein (GM-SP) system that the gelation time was governed by the M/G ratio. Their results demonstrate indeed that the gelation threshold (when $G' > G''$) is reached more rapidly when the M/G ratio was high. They also showed that the higher is the M/G ratio value, the higher is the G' storage modulus value which is obtained for GM-SP systems. The M/G ratio defined for GM polysaccharide is then a key parameter governing X-GM interaction mechanisms.

4. Summary

It has been shown in this study that at a total polysaccharide concentration of 0.2% (w/w), synergy between X and LBG1 had been able to be determined at X-LBG1 50-50. The gelation process between X and GM gums takes time and the gelation period is known as modulated by both the X-GM ratio and also by the polysaccharides microstructure, particularly for GM ones. At short times (the first 30 minutes) which corresponds to the very beginning of the gelation process, X-LBG system exhibit faster kinetics of structuration than for X-GG systems which illustrates the spontaneous character of the association of the two gums in aqueous solutions. Furthermore, kinetics are increasingly faster for X-LBG1 mixture ratios when the ratios are close to the synergy. In addition, microstructure of polysaccharide is important to better understand gelation's kinetics. The M/G ratio which is defined for GM polysaccharides, modulates indeed the gelation process at the short times (first 30 minutes) is definitely a key parameter to better understand the X-GM association. This may result from a competition between different kind of interactions at the molecular scale, this inducing the occurrence of initial temporary interactions that may progressively be replaced by permanent ones. Indeed, H-bonds settle first at the early stage of structuration of the X-LBG1 system but stabilize themselves only after the hydrophobic interactions first stabilize. Such speculation will deserve to be investigated by analyses at the molecular scale by studying the effect of another additional parameter such as temperature, as it will be described in a future paper.

Acknowledgements

The authors acknowledge the European Union and the Haute Normandie region for financial supports to this project and the Region Normandie for research grant.

References

- Bais, D., A. Trevisan, R. Lapasin, P. Partal, et C. Gallegos. 2005. « Rheological Characterization of Polysaccharide–Surfactant Matrices for Cosmetic O/W Emulsions ». *Journal of Colloid and Interface Science* 290(2):546–56. doi: 10.1016/j.jcis.2005.04.044.
- Bresolin, T. M. B., P. C. Sander, F. Reicher, M. R. Sierakowski, M. Rinaudo, et J. L. M. S. Ganter. 1997. « Viscometric Studies on Xanthan and Galactomannan Systems ». *Carbohydrate Polymers* 33(2–3):131–38. doi: 10.1016/S0144-8617(97)00051-9.
- Casas, J. A., et F. García-Ochoa. 1999. « Viscosity of Solutions of Xanthan/Locust Bean Gum Mixtures ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(1):25–31. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199901)79:1<25::AID-JSFA164>3.0.CO;2-D.
- Cazón, Patricia, Gonzalo Velazquez, José A. Ramírez, et Manuel Vázquez. 2017. « Polysaccharide-Based Films and Coatings for Food Packaging: A Review ». *Food Hydrocolloids* 68:136–48. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.09.009.
- Chandrasekaran, R., et A. Radha. 1997. « Molecular Modeling of Xanthan: Galactomannan Interactions ». *Carbohydrate Polymers* 32(3–4):201–8. doi: 10.1016/S0144-8617(97)00007-6.
- Daas, Piet J. H., Henk A. Schols, et Harmen H. J. de Jongh. 2000. « On the Galactosyl Distribution of Commercial Galactomannans ». *Carbohydrate Research* 329(3):609–19. doi: 10.1016/S0008-6215(00)00209-3.
- Dahi, Abdellatif, Bah Mohamed-Lemine Abdellahi, Mohamed Fadel Deida, Nicolas Hucher, Catherine Malhiac, et Frédéric Renou. 2019. « Chemical and Physicochemical Characterizations of the Water-Soluble Fraction of the Commiphora Africana Exudate ». *Food Hydrocolloids* 86:2–10. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.10.032.

- Dea, Iain C. M., Edwin R. Morris, David A. Rees, E. Jane Welsh, Howard A. Barnes, et Jeffrey Price. 1977. « Associations of like and Unlike Polysaccharides: Mechanism and Specificity in Galactomannans, Interacting Bacterial Polysaccharides, and Related Systems ». *Carbohydrate Research* 57:249-72. doi: 10.1016/S0008-6215(00)81935-7.
- Fernandes, Paulo B. 1995. « Influence of Galactomannan on the Structure and Thermal Behaviour of Xanthan/Galactomannan Mixtures ». *Journal of Food Engineering* 24(2):269-83. doi: 10.1016/0260-8774(94)P2647-N.
- Fonkwe, Linus G., Ganesan Narsimhan, et Alice S. Cha. 2003. « Characterization of Gelation Time and Texture of Gelatin and Gelatin–Polysaccharide Mixed Gels ». *Food Hydrocolloids* 17(6):871-83. doi: 10.1016/S0268-005X(03)00108-5.
- Goudoulas, Thomas B., et Natalie Germann. 2017. « Phase Transition Kinetics and Rheology of Gelatin-Alginate Mixtures ». *Food Hydrocolloids* 66:49-60. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.12.018.
- Grisel, Michel, Youssef Aguni, Frédéric Renou, et Catherine Malhiac. 2015. « Impact of Fine Structure of Galactomannans on Their Interactions with Xanthan: Two Co-Existing Mechanisms to Explain the Synergy ». *Food Hydrocolloids* 51:449-58. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.05.041.
- Higiro, J., T. J. Herald, et S. Alavi. 2006. « Rheological Study of Xanthan and Locust Bean Gum Interaction in Dilute Solution ». *Food Research International* 39(2):165-75. doi: 10.1016/j.foodres.2005.07.011.
- Jansson, Per-erik, Lennart Kenne, et Bengt Lindberg. 1975. « Structure of the Extracellular Polysaccharide from *Xanthomonas Campestris* ». *Carbohydrate Research* 45(1):275-82. doi: 10.1016/S0008-6215(00)85885-1.
- Jeanes, Allene, J. E. Pittsley, et F. R. Senti. 1961. « Polysaccharide B-1459: A new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation ». *Journal of Applied Polymer Science* 5(17):519-26. doi: 10.1002/app.1961.070051704.
- Jiang, Yang, Lingli Liu, Bijia Wang, Xuexia Yang, Zhize Chen, Yi Zhong, Linping Zhang, Zhiping Mao, Hong Xu, et Xiaofeng Sui. 2019. « Polysaccharide-Based Edible Emulsion Gel Stabilized by Regenerated Cellulose ». *Food Hydrocolloids* 91:232-37. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.028.
- Katzbauer, Barbara. 1998. « Properties and Applications of Xanthan Gum ». *Polymer Degradation and Stability* 59(1-3):81-84. doi: 10.1016/S0141-3910(97)00180-8.
- Lazar, I., I. G. Petrisor, et T. F. Yen. 2007. « Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) ». *Petroleum Science and Technology* 25(11):1353-66. doi: 10.1080/10916460701287714.
- Mannion, Richard O., Colin D. Melia, Bernard Launay, Gerard Cuvelier, Sandra E. Hill, Steven E. Harding, et John R. Mitchell. 1992. « Xanthan/Locust Bean Gum Interactions at Room Temperature ». *Carbohydrate Polymers* 19(2):91-97. doi: 10.1016/0144-8617(92)90118-A.
- Maxwell, Ellen G., Nigel J. Belshaw, Keith W. Waldron, et Victor J. Morris. 2012. « Pectin – An Emerging New Bioactive Food Polysaccharide ». *Trends in Food Science & Technology* 24(2):64-73. doi: 10.1016/j.tifs.2011.11.002.
- McCleary, Barry B. 1979. « Enzymic Hydrolysis, Fine Structure, and Gelling Interaction of Legume-Seed d-Galacto-d-Mannans ». *Carbohydrate Research* 71(1):205-30. doi: 10.1016/S0008-6215(00)86071-1.
- Melton, Laurence D., Lothar Mindt, et David A. Rees. 1976. « Covalent Structure of the Extracellular Polysaccharide from *Xanthomonas Campestris*: Evidence from Partial Hydrolysis Studies ». *Carbohydrate Research* 46(2):245-57. doi: 10.1016/S0008-6215(00)84296-2.
- Milas, M., et M. Rinaudo. 1984. « On the Existence of Two Different Secondary Structures for the Xanthan in Aqueous Solutions ». *Polymer Bulletin* 12(6):507-14. doi: 10.1007/BF00958656.
- Milas, Michel, et Marguerite Rinaudo. 1986. « Properties of Xanthan Gum in Aqueous Solutions: Role of the Conformational Transition ». *Carbohydrate Research* 158:191-204. doi: 10.1016/0008-6215(86)84017-4.
- Monteiro, Sónia R., Claudia Tavares, Dmitry V. Evtuguin, Nuno Moreno, et J. A. Lopes da Silva. 2005. « Influence of Galactomannans with Different Molecular Weights on the Gelation of Whey Proteins at Neutral PH ». *Biomacromolecules* 6(6):3291-99.
- Morris, E. R., D. A. Rees, G. Young, M. D. Walkinshaw, et A. Darke. 1977. « Order-Disorder Transition for a Bacterial Polysaccharide in Solution. A Role for Polysaccharide Conformation in Recognition between *Xanthomonas* Pathogen and Its Plant Host ». *Journal of Molecular Biology* 110(1):1-16. doi: 10.1016/S0022-2836(77)80095-8.

- Nič, Miloslav, Jiří Jiráč, Bedřich Košata, Aubrey Jenkins, et Alan McNaught, éd. 2009. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*. 2.1.0. Research Triangle Park, NC: IUPAC.
- Nitta, Yoko, Bo S. Kim, Katsuyoshi Nishinari, Mayumi Shirakawa, Kazuhiko Yamatoya, Toshio Oomoto, et Iwao Asai. 2003. « Synergistic Gel Formation of Xyloglucan/Gellan Mixtures as Studied by Rheology, DSC, and Circular Dichroism ». *Biomacromolecules* 4(6):1654-60. doi: 10.1021/bm034103w.
- Paradossi, Gaio, Ester Chiessi, Alberto Barbiroli, et Dimitrios Fessas. 2002. « Xanthan and Glucomannan Mixtures: Synergistic Interactions and Gelation ». *Biomacromolecules* 3(3):498-504. doi: 10.1021/bm010163v.
- Prajapati, Vipul D., Girish K. Jani, Naresh G. Moradiya, Narayan P. Randeria, Bhanu J. Nagar, Nikhil N. Naikwadi, et Bhavesh C. Variya. 2013. « Galactomannan: A Versatile Biodegradable Seed Polysaccharide ». *International Journal of Biological Macromolecules* 60:83-92. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.017.
- Renou, Frédéric, Odile Petibon, Catherine Malhiac, et Michel Grisel. 2013. « Effect of Xanthan Structure on Its Interaction with Locust Bean Gum: Toward Prediction of Rheological Properties ». *Food Hydrocolloids* 32(2):331-40. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.01.012.
- Rogovin, S. P., R. F. Anderson, et M. C. Cadmus. 1961. « Production of Polysaccharide with *Xanthomonas Campestris* ». *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 3(1):51-63. doi: 10.1002/jbmte.390030107.
- Sandvik, E. I., et J. M. Maerker. 1977. « Application of Xanthan Gum for Enhanced Oil Recovery ». P. 242-64 in *Extracellular Microbial Polysaccharides*. Vol. 45, édité par P. A. Sandford et A. Laskin. WASHINGTON, D. C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
- Semenzato, Alessandra, Alessia Costantini, et Giovanni Baratto. 2014. « Green Polymers in Personal Care Products: Rheological Properties of Tamarind Seed Polysaccharide ». *Cosmetics* 2(1):1-10. doi: 10.3390/cosmetics2010001.
- Shatwell, Karolyn P., Ian W. Sutherland, Simon B. Ross-Murphy, et Iain C. M. Dea. 1990a. « Influence of the Acetyl Substituent on the Interaction of Xanthan with Plant Polysaccharides — I. Xanthan-Locust Bean Gum Systems ». *Carbohydrate Polymers* 14(1):29-51. doi: 10.1016/0144-8617(90)90005-D.
- Shatwell, Karolyn P., Ian W. Sutherland, Simon B. Ross-Murphy, et Iain C. M. Dea. 1990b. « Influence of the Acetyl Substituent on the Interaction of Xanthan with Plant Polysaccharides — II. Xanthan-Guar Gum Systems ». *Carbohydrate Polymers* 14(2):115-30. doi: 10.1016/0144-8617(90)90025-N.
- Tajik, Sima, Yahya Maghsoudlou, Faramarz Khodaiyan, Seid Mahdi Jafari, Mehran Ghasemlou, et Mehran Aalami. 2013. « Soluble Soybean Polysaccharide: A New Carbohydrate to Make a Biodegradable Film for Sustainable Green Packaging ». *Carbohydrate Polymers* 97(2):817-24. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.037.
- Tako, Masakuni, Atsushi Asato, et Sanehisa Nakamura. 1984. « Rheological Aspects of the Intermolecular Interaction between Xanthan and Locust Bean Gum in Aqueous Media ». *Agricultural and Biological Chemistry* 48(12):2995-3000. doi: 10.1080/00021369.1984.10866638.
- Tapie, N., C. Malhiac, N. Hucher, et M. Grisel. 2008. « Determination of Galactose and Mannose Residues in Natural Galactomannans Using a Fast and Efficient High-Performance Liquid Chromatography/UV Detection ». *Journal of Chromatography A* 1181(1-2):45-50. doi: 10.1016/j.chroma.2007.12.027.
- Wang, F., Y. J. Wang, et Z. Sun. 2002. « Conformational Role of Xanthan in Its Interaction with Locust Bean Gum ». *Journal of Food Science* 67(7):2609-14. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08786.x.
- Yoshimura, M., et K. Nishinari. 1999. « Dynamic Viscoelastic Study on the Gelation of Konjac Glucomannan with Different Molecular Weights ». *Food Hydrocolloids* 13(3):227-33. doi: 10.1016/S0268-005X(99)00003-X.
- Zhan, D. F., M. J. Ridout, G. J. Brownsey, et V. J. Morris. 1993. « Xanthan-Locust Bean Gum Interactions and Gelation ». *Carbohydrate Polymers* 21(1):53-58. doi: 10.1016/0144-8617(93)90117-M.

Zhang, H., M. Yoshimura, K. Nishinari, M. a. K. Williams, T. J. Foster, et I. T. Norton. 2001. « Gelation Behaviour of Konjac Glucomannan with Different Molecular Weights ». *Biopolymers* 59(1):38-50. doi: 10.1002/1097-0282(200107)59:1<38::AID-BIP1004>3.0.CO;2-A.

En résumé:

Comme déjà souligné par Fernandes^[12] et Casas et García-Ochoa^[10] sans réellement rentrer dans les détails, les propriétés notamment rhéologiques des mélanges X/GM évoluent dès leur mélange jusqu'à atteindre un état d'équilibre. L'absence de description précise du processus d'organisation, notamment au plan de son évolution jusqu'à stabilisation de ces mélanges est la motivation de la présente étude. Notre objectif est donc de mettre en lumière et apporter des éléments de compréhension inédits quant à l'étape de structuration des mélanges X/GM. Nous avons montré dans un premier temps que les propriétés rhéologiques d'un mélange X/GM donné mettent davantage de temps à se stabiliser lorsqu'il s'agit de proportions proches de l'optimum de synergie. Ce résultat laisse à penser que la structuration fait intervenir des interactions de natures différentes, qui sont susceptibles d'entrer en compétition tout au long du processus. Ainsi, à mesure que le système s'organise et subit une forte augmentation de ses propriétés rhéologiques, notre hypothèse est que ces interactions se font et se défont jusqu'à atteindre un état d'équilibre, ce phénomène étant logiquement d'autant plus ralenti que la viscosité / viscoélasticité du milieu augmente du fait justement de sa structuration. Nous avons pu en partie confirmer cette hypothèse par les approches utilisant des sondes moléculaires, décrites dans le Chapitre IV.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes focalisés sur l'évolution des mélanges X/GM aux temps courts, notamment par des approches cinétiques. Après avoir effectué un traitement mathématique des données, nous avons ainsi pu comparer les cinétiques de structuration des mélanges X/GM en fonction du ratio X/GM et également en fonction de la microstructure du GM. Dans tous les cas, les cinétiques de structuration les plus rapides ont été observées pour les proportions en gommés proches de l'optimum de synergie, soulignant le caractère spontané de l'association entre les deux gommés. La cinétique s'avère plus rapide dans le cas des mélanges xanthane/caroube comparés aux mélanges xanthane/guar et semble ainsi suivre la hiérarchie bien connue de l'intensité de synergie X/GM.

Au bilan, pour un mélange X/GM donné, deux comportements cinétiques différents ont pu être mis en évidence selon qu'on se focalise aux temps courts ou aux temps longs. De plus, au-delà de l'effet de la microstructure du GM sur l'intensité de synergie telle que classiquement décrite au plan macroscopique dans la littérature pour les mélanges X/GM, la microstructure du GM impacte très fortement la cinétique initiale d'évolution du mélange. Cette observation indique que la mise en place des interactions est d'autant plus rapide que la structure des gommés y est favorable. Ce résultat sera également complété par les approches à l'échelle moléculaire présentée dans le Chapitre IV de cette thèse.

En complément :

Dans la Publication 2, les résultats illustrés dans la **Figure III.44** sont issus d'un premier protocole opératoire comportant notamment une phase d'homogénéisation à l'aide d'un cisaillement avec une micropipette afin de mettre les échantillons dans un même état initial et permettant d'analyser les propriétés rhéologiques du mélange X/GdC1 pendant une période de plus de 48h. Ces analyses étant très longues, le protocole opératoire fut optimisé afin d'avoir des informations aux temps courts et aux temps longs une fois que les solutions et mélanges sont stabilisés tout en réduisant le temps d'analyse. Pour rappel ce protocole optimisé est décrit dans le **Chapitre II** (sections 2.5.3.1 et 2.5.3.2 de t_0 à 4h **Fraction A**) et les temps longs ($t > 47$ h **Fraction B**; **Figure III.47**).

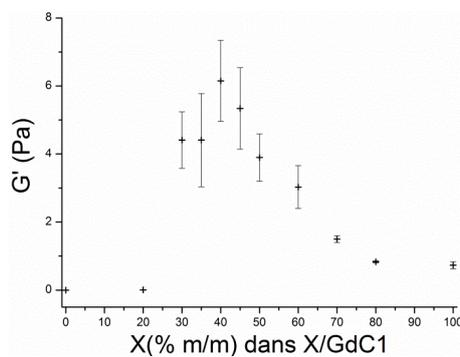
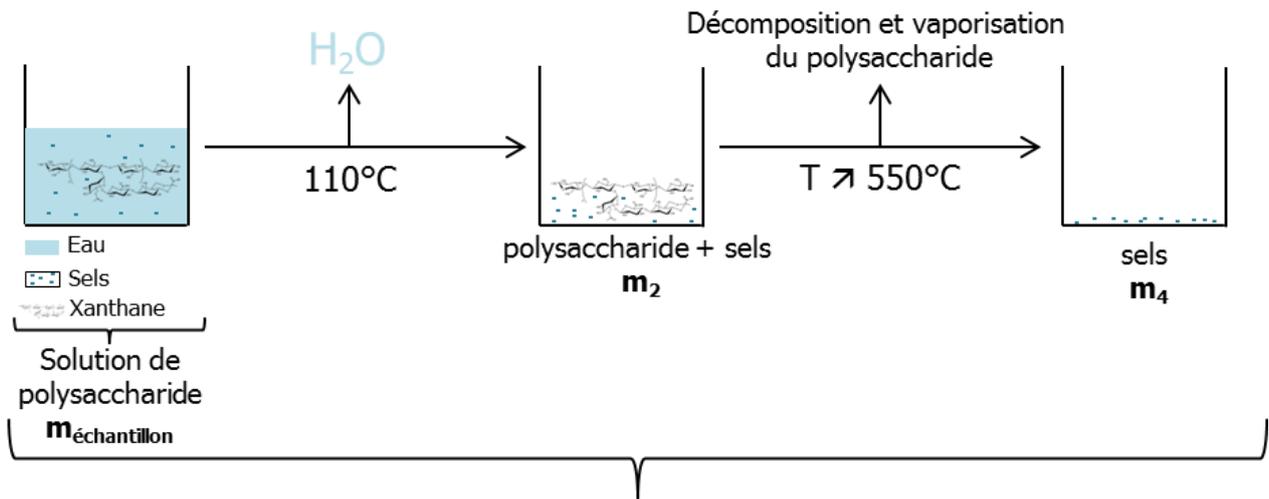


Figure III.47: Valeurs du module de stockage en fonction de la composition du mélange X/GdC1 (Fraction B)

Afin d'analyser les échantillons de la Fraction B, nous sommes obligés de verser délicatement environ 1 mL d'échantillon sur le plan Peltier du rhéomètre. Malgré toute la délicatesse employée, l'échantillon est un minimum perturbé d'où les trois heures d'analyses nécessaires à sa stabilisation. Ce transfert d'échantillon du bécher au plan Peltier peut expliquer pourquoi il est observé des valeurs de module élastique G' légèrement inférieures comparé à celles de la **Figure III.44**. Un optimum de synergie a été redéterminé à la composition X/GdC1 de 40/60. Il est donc trouvé un optimum de synergie différent comparé avec celui des échantillons analysés une période de temps de 50h. Cette différence peut certainement s'expliquer par l'utilisation de protocoles opératoires différents. Néanmoins, des analyses statistiques (test de Student) sur les résultats obtenus avec la Fraction B (**Figure III.47**) ont montré que les valeurs de G' pour X/GdC1 40/60 et 50/50 sont statistiquement différentes. Ces analyses statistiques suggèrent donc que l'optimum de synergie pour le mélange de référence se situerait plus entre X/GdC1 40/60 et 50/50. Pour la suite de ce manuscrit, il sera considéré la composition X/GdC1 40/60 comme l'optimum de synergie d'interaction à l'échelle macroscopique pour X/GdC1 en gardant à l'esprit que cet optimum de synergie d'interaction se situe plutôt entre X/GdC1 40/60 et 50/50 (\Rightarrow plage de synergie).

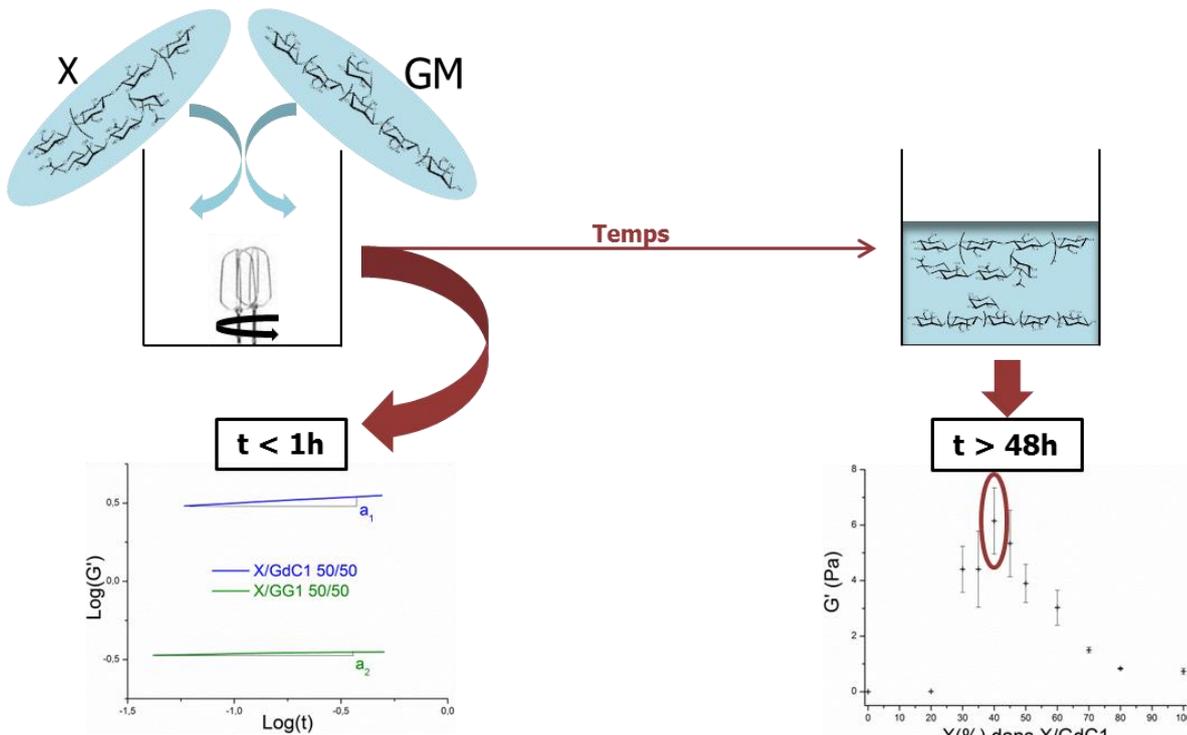
Conclusion du Chapitre III

Détermination de la siccité des solutions salines de polysaccharide



$$\text{Siccité (\%)} = \left(\frac{m_2 - m_4}{m_{\text{échantillon}}} \right) \times 100$$

Etude cinétique de la structuration des systèmes X/GM



Etude cinétique ⇒ «Modélisation»: $\text{Log}(G') = a \cdot \text{Log}(t) + b$

- ✓ Valeurs élevées de **a** dans les proportions synergétiques
- ✓ Valeurs faibles de **a** pour les proportions hors synergie
- ✓ $a_{X/GdC} > a_{X/GG} \Rightarrow$ Association spontanée X/GdC
exemple: $a_1 > a_2$

Mélanges X/GM (0,2% m/m) gélifiés:

- ✓ Propriétés viscoélastiques stables pour tous les ratios de mélange X/GdC1
- ✓ **Synergie d'interaction** à 40/60 pour X/GdC1

Références bibliographiques

- [1] Michel. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, Fred. Smith, *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356.
- [2] Y. Aguni, Contribution à la compréhension des mécanismes d'interaction xanthane/galactimannane, Université Le Havre, **2009**.
- [3] M. J. Zohuriaan, F. Shokrolahi, *Polym. Test.* **2004**, *23*, 575–579.
- [4] M. G. A. Vieira, M. A. da Silva, L. O. dos Santos, M. M. Beppu, *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 254–263.
- [5] GFP, J.-F. Tassin, *Initiation à La Science Des Polymères-Physique Des Polymères à l'Etat Fondu*, GFP, Nantes, **2010**.
- [6] D. F. Zhan, M. J. Ridout, G. J. Brownsey, V. J. Morris, *Carbohydr. Polym.* **1993**, *21*, 53–58.
- [7] T. M. B. Bresolin, P. C. Sander, F. Reicher, M. R. Sierakowski, M. Rinaudo, J. L. M. S. Ganter, *Carbohydr. Polym.* **1997**, *33*, 131–138.
- [8] R. Chandrasekaran, A. Radha, *Carbohydr. Polym.* **1997**, *32*, 201–208.
- [9] K. P. Shatwell, I. W. Sutherland, S. B. Ross-Murphy, I. C. M. Dea, *Carbohydr. Polym.* **1990**, *14*, 29–51.
- [10] J. A. Casas, F. García-Ochoa, *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 25–31.
- [11] K. P. Shatwell, I. W. Sutherland, S. B. Ross-Murphy, I. C. M. Dea, *Carbohydr. Polym.* **1990**, *14*, 115–130.
- [12] P. B. Fernandes, *J. Food Eng.* **1995**, *24*, 269–283.
- [13] S. R. Monteiro, C. Tavares, D. V. Evtuguin, N. Moreno, J. A. Lopes da Silva, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3291–3299.
- [14] J. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, Wiley, **1995**.
- [15] J.-M. Lehn, *Polym. Int.* **2002**, *51*, 825–839.

Chapitre IV : Caractérisation des interactions en solution à l'échelle moléculaire

4. Développement de la méthodologie pour la caractérisation des interactions moléculaires en solution	128
4.1. Sélection de la technique de caractérisation	128
4.2. Sélection des sondes moléculaires	128
4.2.1. Choix de la sonde spécifique à la polarité et l'hydrophobicité du milieu	129
4.2.2. Choix de la sonde spécifique aux liaisons hydrogène	130
4.2.3. Conclusion	131
4.3. Mise au point des analyses à l'échelle moléculaire	132
4.3.1. Polarité et micro-domaines hydrophobes	132
4.3.1.1. Test de résistance à la photodégradation	132
4.3.1.2. Optimisation des paramètres d'acquisition spectrale	133
4.3.2. Réseau de liaisons hydrogène	133
4.3.2.1. Test de résistance à la photodégradation	133
4.3.2.2. Equivalences des bandes 1N* et 2N*	134
4.3.2.3. Influence de la concentration des solutions de polymère	134
4.3.2.4. Optimisation des paramètres d'acquisition spectrale	136
4.4. Caractérisation des phénomènes interactions moléculaires par spectroscopie de la fluorescence dans les solutions et mélanges X/GM	137
4.4.1. Mise en place d'une méthodologie	137
4.4.1.1. Introduction	137
4.4.1.2. Publication n°3	137
4.5. Structuration des interactions moléculaires	159
4.5.1. Introduction	159
4.5.2. Publication n°4	160
Conclusion du Chapitre IV	175
Références bibliographiques	176
Annexes : Evolution des interactions moléculaires au sein du système X/GdC1	177

Introduction

Dans ce chapitre, nous exposons une méthodologie permettant d'identifier à l'échelle moléculaire des interactions spécifiques telles que les interactions dipôle-dipôle, la formation de microdomaines hydrophobes ou encore les liaisons hydrogène. La méthodologie proposée est appliquée aux systèmes composés de xanthane et de galactomannane afin de pouvoir caractériser les interactions ayant lieu dans de tels systèmes mais également afin de pouvoir éventuellement proposer des explication ou confirmer des hypothèses déjà émises au sujet de ces systèmes particuliers présentant une synergie d'interaction. Dans une première partie, il est détaillé la mise en place de notre méthodologie de caractérisation ; les résultats sont principalement exposés dans les manuscrits de la Publication n°3 et de la Publication n°4.

4.Développement de la méthodologie pour la caractérisation des interactions moléculaires en solution

4.1.Sélection de la technique de caractérisation

Parmi toutes les techniques permettant de caractériser les interactions moléculaires en solution (énoncées de manière non exhaustive dans le chapitre I), une s'est imposée d'elle-même par rapport aux objectifs visés. Premièrement, il s'agit d'une technique d'analyse non destructrice permettant donc d'effectuer des analyses à l'échelle moléculaire en parallèle sur l'exact même système. Il est possible de caractériser les interactions moléculaires en solution (directement dans le milieu étudié et pas uniquement en surface) simplement en utilisant des sondes spécifiques en libre diffusion dans les solutions analysées. De plus, dans le cadre de notre étude, l'utilisation de sondes en très faible quantité ne perturbe en aucun cas notre système à l'échelle macroscopique comme nous l'avons démontré dans le chapitre III. Tous ces critères font de la spectroscopie de fluorescence une technique de choix et adaptée dans le cadre de ce projet.

4.2.Sélection des sondes moléculaires

La deuxième étape de la méthodologie a été de réaliser une étude bibliographique des sondes moléculaires sensibles à des interactions spécifiques. Des sondes ont été présélectionnées et ont subi des tests préliminaires pour affiner notre sélection. Ces travaux ont été réalisés par Igor Petukhov¹. A la suite de ces travaux préliminaires, il a été mis en évidence en particulier la présence des interactions hydrophobes et de liaisons hydrogène dans les solutions de polysaccharides étudiées. Par conséquent, il fut retenu deux sondes; une sonde moléculaire spécifique à l'hydrophobie et à la polarité du milieu : l'acide 8-anilino-1-naphthalène sulfonique (ANS), utilisée sous sa forme basique et

¹ Travaux non publiés

une deuxième sonde spécifique aux liaisons hydrogène : la 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf).

4.2.1. Choix de la sonde spécifique à la polarité et l'hydrophobicité du milieu

Afin de caractériser l'hydrophobie du milieu et les interactions dipôle-dipôle, l'acide 1-anilino-8-sulfonate de naphthalène-1,8-diol (ANS, **Figure IV.48**) fut sélectionnée. Elle a été utilisée par le passé pour dénombrer les sites spécifiques sur des protéines telles que l'albumine de sérum bovin^[1] ou l'apomyoglobine et l'apohémoglobine^[2]. Son rendement quantique de fluorescence est fortement influencé par la présence de molécules d'eau, l'un de ses extincteurs de fluorescence communément appelés "quencher". Ce rendement quantique est 10 à 100 fois supérieur lorsque la sonde est au contact de protéines que lorsque cette sonde se trouve dans l'eau seule^[1,3]. De plus, Stryer et co-équipiers^[2] ont mis en évidence la sensibilité à la polarité du milieu de l'ANS en l'étudiant dans des alcools tels que l'éthanol, le n-propanol ou encore le n-butanol. Ils observent en effet, que lorsque la chaîne carbonée de l'alcool s'agrandit, l'intensité d'émission de la sonde augmente (reflet, à nouveau, de la sensibilité de la sonde à la présence de molécules d'eau) et la longueur d'onde au maximum d'émission se décale vers le "bleu" (⇒ "Blue shift"). Dans le cadre de son étude, Freedman et Radda^[3] ont redémontré la sensibilité à la polarité de la sonde en montrant que les sites dénombrés correspondent à une mesure de la solubilité de l'ANS dans les zones apolaires de la membrane étudiée. Il a été également montré que le rendement quantique de fluorescence de l'ANS reste inchangé en fonction des sels ou de la solution tampon utilisée dans le milieu d'étude^[4].



Figure IV.48: Structure chimie de la sonde ANS

De ce fait, cette sonde de fluorescence fut très utilisée pour l'étude des protéines^[1,2,5,6], des membranes biologiques^[3,7-9] ou des structures de type membranaire^[4,10,11]. En ce qui concerne son utilisabilité dans le cadre de ce travail, les tests préliminaires effectués en amont par Igor Pethukov ont démontré que l'intensité d'émission de la sonde ANS était, parmi les autres sondes du même type, le moins impacté par la présence des protéines intrinsèques présentes généralement dans les polymères naturels tels que les polysaccharides.

4.2.2. Choix de la sonde spécifique aux liaisons hydrogène

De même que pour la sonde ANS, nous avons également effectué une recherche bibliographique afin de trouver une sonde capable de caractériser les liaisons hydrogène selon le cahier des charges défini pour ce projet de recherche. Notre intérêt s'est porté sur la sonde 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf, **Figure IV.49a**) développée par l'équipe de Bilokin^[12] dans le but d'obtenir une sonde de fluorescence sensible aux liaisons hydrogène. Ils l'ont développée sans lui affecter d'application particulière; application que nous lui avons trouvée dans le cadre de notre projet afin de caractériser les liaisons hydrogène au sein des solutions et mélanges de polymère.

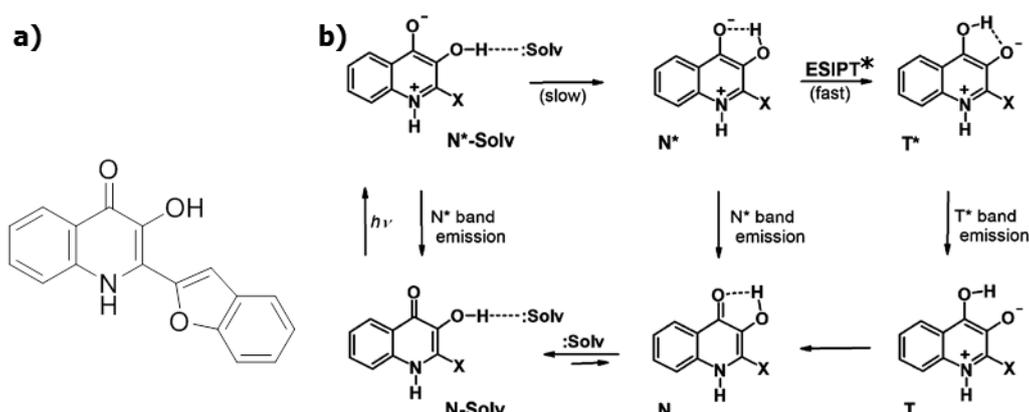


Figure IV.49: a) Structure chimique de la sonde 3HQ-Bf b) Les trois états d'excitation de la sonde 3HQ-Bf proposés par Bilokin^[12]

* **ESIPT**: Excited State Intramolecular Proton Transfert

A l'état excité, cette molécule a la particularité de présenter un transfert de proton (entre les positions 3 et 4 **Figure IV.49a**) qui peut se voir influencer par la présence de liaisons hydrogène d'où sa sensibilité à ces dernières.

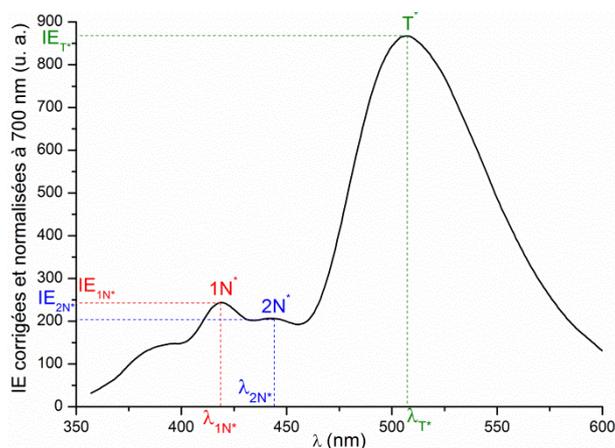


Figure IV.50: Exemple de spectre d'émission de fluorescence de la sonde 3HQ-Bf dans la solution de tampon phosphate saline

Ces trois états d'excitation (**Figure IV.49b**) donnent lieu à trois bandes spécifiques sur le spectre d'émission de fluorescence: les bandes $1N^*$, $2N^*$ et T^* . Afin d'évaluer l'intensité des liaisons hydrogène

localisées dans l'environnement proche de 3HQ-Bf il est calculé le ratio des intensités d'émission (IE) des bandes spectrales N* et T* (**Figure IV.50**) :

$$\frac{I_{N^*}}{I_{T^*}} \text{ ou } \frac{IE_{N^*}}{IE_{T^*}} \quad \text{Equation IV.34}$$

Selon l'étude réalisée par Bilokin^[12] et les conclusions qu'il en a déduit, plus la valeur de ce ratio est élevée et plus l'intensité des liaisons hydrogène environnantes est forte d'après une échelle construite dans un premier temps par Abraham^[13]. Le caractère ratiométrique de cette sonde permet de s'affranchir de la concentration effective en solution contrairement à la sonde ANS qui doit être introduite dans les solutions toujours à la même concentration pour pouvoir être capable de faire une comparaison entre les résultats.

4.2.3. Conclusion

Afin de sonder à l'échelle moléculaire l'hydrophobie au travers de la formation de microdomaines hydrophobes et déceler les changements de polarité du milieu, il a été retenu la sonde ANS. A savoir que plus les microdomaines hydrophobes formés sont nombreux et plus les IE de la sonde ANS vont avoir des valeurs élevées; ce qui nous permettra par la suite d'échelonner, si le cas se présente, l'intensité des interactions hydrophobes.

L'exploitation des données issues de la sonde 3HQ-Bf caractérisant les liaisons hydrogène nous permet d'établir directement une échelle de grandeur. En effet, plus la valeur du ratio des IE entre les bandes N* et T* est élevée et plus les liaisons hydrogène environnantes peuvent être considérées comme intenses.

Ainsi les deux sondes sélectionnées, ANS et 3HQ-Bf, nous permettent dans un premier temps de caractériser clairement et distinctement respectivement l'hydrophobie, les interactions dipôle-dipôle et les liaisons hydrogène au sein des solutions et mélanges de polymère. De plus, testées chacune séparément dans un milieu simple (tampon d'hydrogénophosphate de sodium NaH₂PO₄), il est discriminé les phénomènes liés au milieu tamponné seul des phénomènes interactionnels liés aux solutions et mélanges de polymère (X/GM). Elles nous permettent également de hiérarchiser chaque type de phénomène interactionnel séparément de manière relative en fonction de leurs intensités respectives.

4.3.Mise au point des analyses à l'échelle moléculaire

Après avoir choisi l'ANS comme sonde spécifique aux interactions hydrophobes pour notre étude, nous avons dû procéder à des analyses préliminaires afin de nous assurer de la fiabilité des résultats obtenus.

4.3.1.Polarité et micro-domaines hydrophobes

4.3.1.1.Test de résistance à la photodégradation

Lors de nos analyses de l'hydrophobie du milieu (microdomaines hydrophobes), il est réalisé plus de 115 scans en sachant que la vitesse de balayage est fixée à 600 nm par minute. La sonde ANS subit donc un temps d'irradiation total cumulé de 57 minutes et 30 secondes. Pour une durée d'irradiation d'environ une heure, il nous a paru important de nous questionner sur la tenue des propriétés de fluorescence de l'ANS sur la durée d'une analyse. Nous avons donc effectué un test de résistance de la sonde dans de la solution tampon de référence (tampon phosphate) face aux phénomènes de photodégradation qui pourraient intervenir et causer une perte des propriétés de fluorescence et donc une perte d'une partie de l'information.

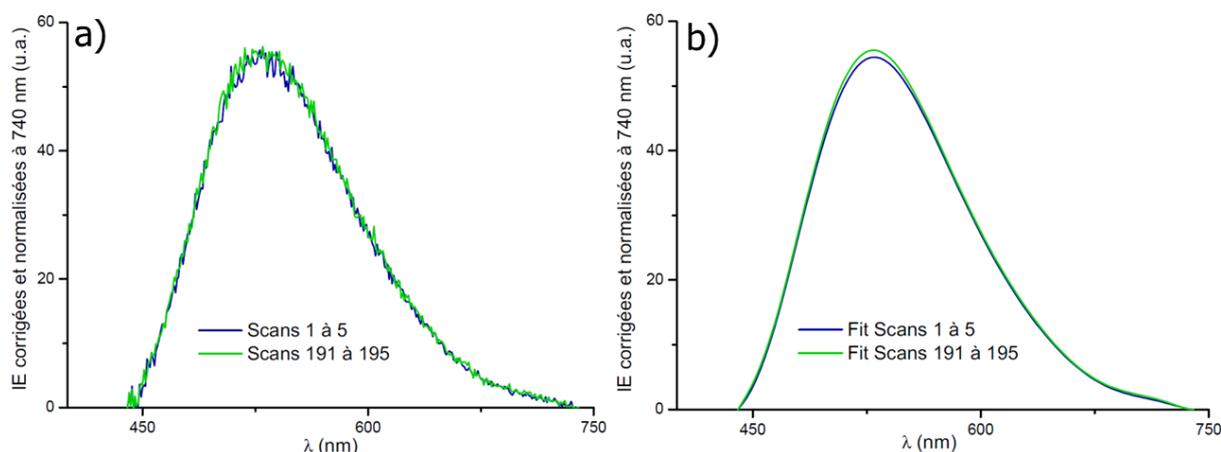


Figure IV.51: Spectres de la sonde ANS issus du test de résistance au photoblanchiment de la sonde ANS a) courbes brutes b) courbes modélisées

Le test s'est déroulé selon les conditions suivantes: 20°C; $440 < \lambda < 740$ nm; $\lambda_{\text{ext}} = 390$ nm; $v_{\lambda} = 600$ nm/min et PMT = 800 Volts dans 15g de solution tampon salin (homogénéisation: 15 pipetages). 39 séries composées de 5 scans (durant chacun 30 secondes) ont été effectuées. La sonde a donc été irradiée pendant une durée totale de 1h 37 min 30s.

Sur la **Figure IV.51a** ont été superposés les spectres de fluorescences corrigées de la 1^{ère} série (moyenne des 5 premiers scans) et ceux de la 39^{ème} série (moyenne des scans 191 à 195). Pour plus de clarté, ces spectres et ceux acquis par la suite (qui sont, à ces échelles d'émission de fluorescence, relativement bruités) sont modélisés par des équations types polynômiales comme il est montré sur la **Figure IV.51b**. Nous pouvons observer que les deux spectres sont superposables; les intensités

d'émission (IE) maximales se situant à la même longueur d'onde ($\lambda_{IE_{max}} = 530,9 \text{ nm}$) ne diffèrent seulement que de 2%. Aucune diminution de l'intensité d'émission de fluorescence n'est observée au cours de temps. Ceci signifie donc que la sonde ANS est résistante au photoblanchiment dans le cadre de nos analyses.

4.3.1.2.Optimisation des paramètres d'acquisition spectrale

Dans le cas de la sonde ANS, les analyses de fluorescence ont été effectuées en mode "Scan" (détection des IE sur une plage définie de longueurs d'onde) de façon à nous permettre d'accéder, en même temps, aux intensités d'émission (IE \Rightarrow hydrophobie du milieu) et aux éventuels variations de $\lambda_{IE_{max}}$ (polarité du milieu). Les paramètres d'acquisition (détaillés dans le Chapitre II) tels que les largeurs des fentes d'excitation et d'émission, la vitesse de scan et autres, ont été ajustés en effectuant des compromis entre les différents paramètres afin d'obtenir des signaux exploitables.

4.3.2.Réseau de liaisons hydrogène

De même que pour la sonde ANS, la sonde 3HQ-Bf, a également subi des analyses préliminaires afin d'écarter tout biais analytique.

4.3.2.1.Test de résistance à la photodégradation

Lors de nos analyses préliminaires concernant la caractérisation du réseau de liaisons hydrogène, il est réalisé plus de 115 scans en sachant que la vitesse de balayage est fixée à 120 nm par minute. La sonde 3HQ-Bf subit donc un temps d'irradiation total cumulé de 5h et 35 minutes et 25 secondes. Pour une durée d'irradiation durant plusieurs heures, il nous a paru important également de nous questionner sur la tenue des propriétés de fluorescence de 3HQ-Bf sur la durée d'une analyse. Nous avons donc de nouveau effectué un test de résistance de la sonde dans de la solution tampon de référence (NaH_2PO_4) face aux phénomènes de photodégradation qui pourraient intervenir et causer une perte des propriétés de fluorescence et donc une perte d'une partie de l'information.

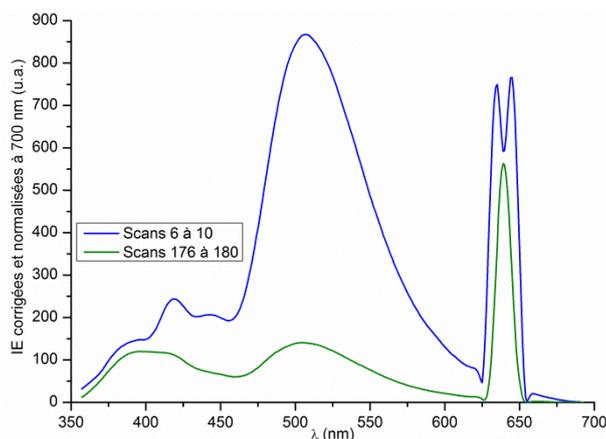


Figure IV.52: Spectres de la sonde 3HQ-Bf issus du test de photoblanchiment

Dans le cadre d'une analyse préliminaire de l'évolution des liaisons hydrogène avec le temps, nous avons constaté une diminution du signal de fluorescence. Cette diminution s'accompagne avec une fusion des bandes N* ne permettant plus une exploitation fiable des données et une diminution très marquée de l'intensité d'émission relative à la bande T* (**Figure IV.52**).

4.3.2.2. Equivalences des bandes 1N* et 2N*

En se basant sur une partie des travaux d'Igor Petukhov consistant à solubiliser la sonde 3HQ-Bf dans différents milieux aqueux (eau ultra pure, solution tampon, etc.), les valeurs du ratio calculé à partir des IE des bandes spectrales 1N* et 2N* (**Figure IV.50**) se sont révélées équivalentes après les

avoirs comparées :
$$\frac{IE_{1N^*}}{IE_{T^*}} = \frac{IE_{2N^*}}{IE_{T^*}}$$

4.3.2.3. Influence de la concentration des solutions de polymère

Lors de nos tests préliminaires, nous avons également fait varier la concentration totale de polymère dans le milieu. Dans le cas de la sonde 3HQ-Bf, il a été observé qu'il est difficile d'obtenir un signal exploitable si la concentration en polymère totale est supérieure à 2 g.L⁻¹. En effet, comme il peut être observé sur la **Figure IV.53**, seule la bande T* est perceptible mais les deux bandes N* (1N* et 2N*) sont très mal définies voire inexistantes.

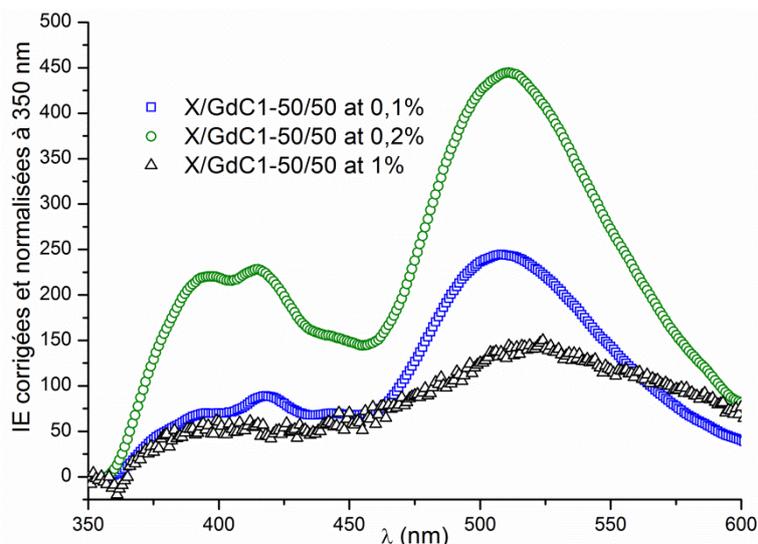


Figure IV.53: Spectre de fluorescence (mode scan) de la sonde 3HQ-Bf dans des mélanges X/GdC1 50/50 à 0,1%, 0,2% et 1% (m/m)

Cependant, il a été montré par Yushchenko^[14] pour une sonde de fluorescence appartenant à la même famille que 3HQ-Bf, la 2-(2-thienyl)-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQT; **Figure IV.54**), que la valeur du ratio calculé entre les bandes N^* et T^* peut se voir influencer par la viscosité du milieu. En effet, il semblerait qu'une augmentation de viscosité du milieu favoriserait l'état d'excitation N^* au lieu de T^* ce qui se traduit par une diminution des IE pour les bandes N^* au détriment de l'IE de la bande T^* . Ceci engendre également en plus de la diminution des IE, une fusion des bandes N^* qui ne permet plus de les distinguer et de ce fait, rend le calcul de la valeur du ratio $\frac{EI_{1N^*}}{EI_{T^*}}$ impossible. Nous avons

donc fait le choix de travailler avec des solutions de polymères dont la concentration totale en polysaccharide est égale à 2 g.L^{-1} ($\Leftrightarrow 0,2\% \text{ m/m}$), valeur pour laquelle la viscosité du milieu ne semble pas avoir d'influence sur les paramètres mesurés.

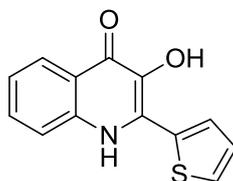


Figure IV.54: Structure chimique de la sonde 3HQT

Il serait plausible d'émettre l'hypothèse que cette favorisation de l'état d'excitation N^* serait due au blocage de la rotation du groupement benzofuryl pour la sonde 3HQ-Bf ou du thiényl de la sonde 3HQT. Si ces hypothèses se révèlent justes, les sondes 3HQ-Bf et 3HQT pourrait également être utilisées comme indicateurs relatifs de viscosité d'une solution de polymère au même titre que la sonde 4-(diméthylamino)benzonitrile (DMABN)^[15]. Les mesures réalisées semblent néanmoins indiquer que cette sensibilité à la viscosité reste faible.

4.3.2.4. Optimisation des paramètres d'acquisition spectrale

Dans le cas de l'étude des interactions hydrogène, les analyses de fluorescence ont été effectuées par mesure des IE à des longueurs d'onde spécifiques (λ_{1N^*} , λ_{2N^*} et λ_{T^*}).

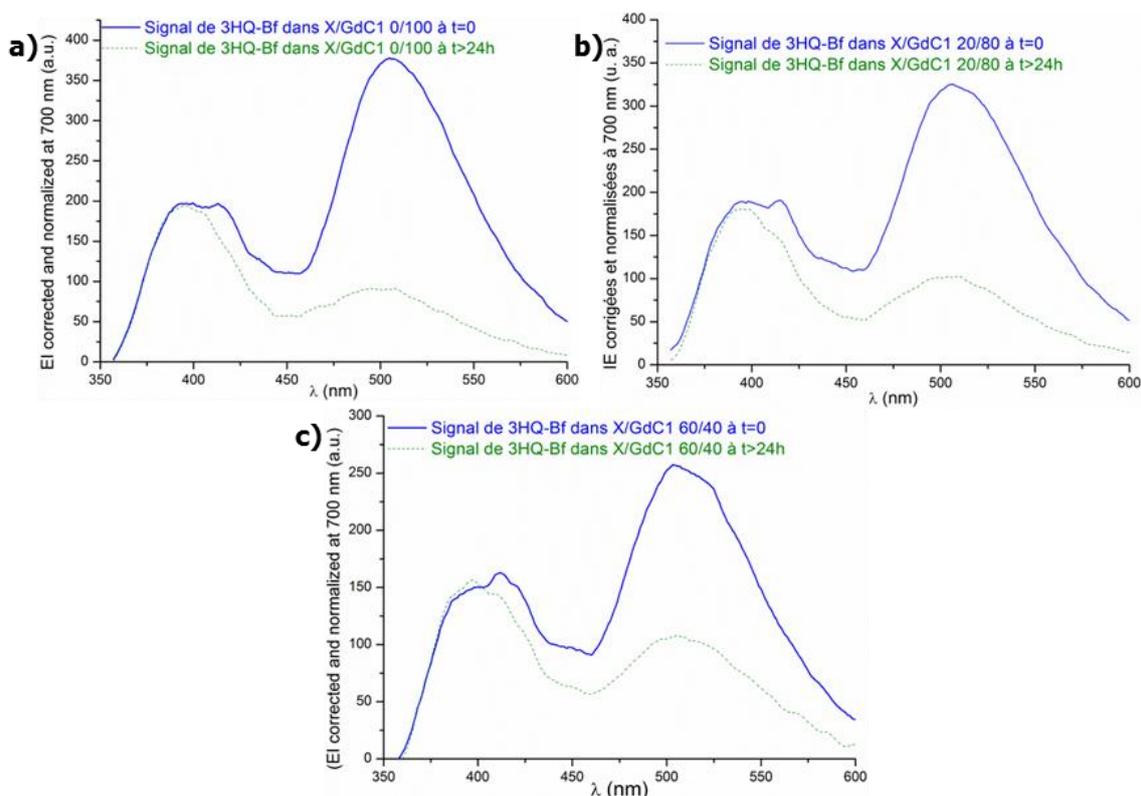


Figure IV.55: Spectre d'émission de 3HQ-Bf dans un mélange X/GdC1 a) (40/60) ; b); et c) à $t=0$ (en bleu) et à $t = 24h$ (en vert)

Bien que dans la publication de Bilokin^[12] il est stipulé que 3HQ-Bf est très peu sensible à la polarité d'un milieu, nous nous sommes tout de même assurés des valeurs des longueurs d'onde des bandes $1N^*$, $2N^*$ et T^* en effectuant des analyses préliminaires avant chaque analyse en mode scan (balayage sur une plage de longueurs d'onde λ ; de 350 à 700 nm). Etant donné que la sonde 3HQ-Bf est sensible à la photodégradation, nous avons effectué uniquement deux scans : un scan à $t=0$ et un scan à $t>24h$. Ceci explique la faible résolution spectrale des spectres présentés sur **Figure IV.55a**, **Figure IV.55b** et **Figure IV.55c**. Nous pouvons observer que les bandes $1N^*$, $2N^*$ et T^* possèdent les mêmes longueurs d'onde λ_{1N^*} , λ_{2N^*} et λ_{T^*} . 3HQ-Bf étant une sonde ratiométrique, et le milieu ne semblant pas avoir d'influence sur les $\lambda_{IE_{max}}$ il est donc tout à fait justifié de réaliser nos mesures dans ces conditions. Il peut être remarqué également que dans les trois exemples présentés, l'IE de la bande T^* diminue de manière significative ce qui prouve bien que l'environnement proche de la sonde n'est clairement pas le même entre $t=0$ et $t>24h$. Nous pouvons en conclure que le réseau de liaisons hydrogène s'organise différemment au cours du temps pour les systèmes étudiés. A la suite de ces

résultats, il a été décidé de retenir les valeurs du ratio $\frac{EI_{1N^*}}{EI_{T^*}}$ car la bande $2N^*$ n'est pas toujours discernable.

4.4.Caractérisation des phénomènes interactions moléculaires par spectroscopie de la fluorescence dans les solutions et mélanges X/GM

4.4.1.Mise en place d'une méthodologie

4.4.1.1.Introduction

Dans cette publication nous revenons sur la mise en place de la méthodologie concernant la caractérisation des interactions moléculaires qui a déjà été en grande partie expliquée dans les sections précédentes. Il est aussi exposé les résultats suite à l'application de notre méthodologie aux solutions aqueuses de xanthane (X), de galactomannane (GM) et aux mélanges X/GM qui ont été explorés à l'échelle moléculaire une fois que ceux-ci aient atteint leur état d'équilibre.

4.4.1.2.Publication n°3

Cette publication est en cours de finalisation en vue d'une soumission au journal « Biomacromolécules ».

Innovative Methodology to Characterize, at the Molecular Scale, Interactions in Polysaccharide Aqueous Solutions

Alexandre Cordinier, Igor Pethukov, Nicolas Hucher, Michel Grisel
Normandie Univ, UNIHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, 76600 Le Havre, France

Abstract: Characterizing molecular interactions at the microscopic level remains difficult and therefore represents a key target to better understand macromolecule and biomacromolecule behaviour in solution, alone or in mixtures with others. Nevertheless accurate characterisation in liquid media, especially in aqueous solutions without causing any perturbation of the system in which they are studied is therefore quite difficult. To this purpose the present paper describes an innovative methodology based on fluorescence spectrophotometry. Two molecular fluorescent probes, namely 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) and 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf), were selected to characterize respectively the dipole-dipole interactions, hydrophobic micro-domains and hydrogen bondings. As a support to study molecular interactions xanthan, galactomannan and corresponding mixtures which are well-known to exhibit a synergy of interactions in well-defined mixture conditions were chosen. Once the methodology set up, the existence of the three types of interactions in these systems was demonstrated, thus allowing elucidating the mechanisms of interactions at molecular scale.

1. Introduction

Molecular interactions are essential to maintain cohesion between different compounds in materials or biological phenomena such as enzyme/substrate complex formations^[1]. In solution molecular interactions are non-covalent and are essentially dependent on the distance of interaction between the chemical entities or groups. They can be either intramolecular like for α -helix in secondary structure protein^[2] or intermolecular interactions such as between two DNA strands^[3]. Among the different types of non-covalent interactions, the H-bonds, the dipole-dipole (also named van der Waals interactions) in which are included the creation of hydrophobic micro-domains, the electrostatic interactions are far the most frequent molecular phenomenon which are encountered in aqueous polymer media^[4-6]. A precision has to be made about the term hydrophobic micro-domains which are often referenced as hydrophobic interactions in the literature. The creation of such hydrophobic domains is mainly due to a reorganization of the water molecules^[7,8] solvating apolar hydrophobic parts of a solute in aqueous solution.

Nowadays, there is no reliable methodology allowing to fully characterize the molecular interactions within polymer aqueous solutions without strongly disturbing the system. As an example, chaotropic agents such as urea^[5] or guanidine hydrochloride^[9] are often used to show the presence of H-bonds; unfortunately these compounds strongly interfere with the H-bond network by "breaking" the H-Bonds, hence the name of "H-bond breakers" which is also used for this class of chemical agents. Another way for evidencing the presence of H-bonds is to analyze the characteristic vibration bands in FTIR spectra^[10]; to this end sample preparation is necessary with removing liquid from the sample, often using freeze-drying, thus making the system highly different from solution initial state. Another striking example is dipole-dipole interactions that can be monitored by atomic force microscopy^[11](AFM); nevertheless this powerful technique is not directly applicable in the liquid state. Highlighting electrostatic interactions is generally conducted with studying the effect of the absence or the presence of salts in polyelectrolyte solutions via potentiometric titrations for example^[12,13]. In the field of nanolithography, AFM allows the observation and the direct localization of hydrophobic domains due to self-assembly phenomena of amphiphilic block copolymers^[14]. Such hydrophobic domains can also be observed through cryo-TEM images for self-assembled amphiphilic objects such as surfactants or amphiphilic bloc copolymers dispersed in solution^[15,16]. Then again, sample preparation such as freeze drying is required that may cause disruptions to interactions, thus making it necessary to develop non-disturbing tools for accurately investigating molecular interactions.

Among other techniques, fluorescence spectroscopy is a promising technique based on the use of small organic fluorescent dyes. It was already widely used to study molecular interactions in phospholipid bilayers^[17] to distinguish dipole-dipole interactions and hydrogen bonds, in organic solvent mixtures^[18] to detect and quantify alcohol components or in aqueous protein media^[19,20] to determine surface proteins hydrophobicity. Thus, fluorescent probes are advantageously sensitive to one or several specific interactions^[21] and can be interestingly present in free diffusion in the system.

As an example, 8-anilino-1-naphtalensulfonic acid (ANS) (**Figure IV.56a**) is a fluorescent probe mainly used under its basic form and which is specific to polar interactions and which go directly in hydrophobic micro-cavities (or micro-domains). There are several fluorescent probes owing similar fluorescent properties such as 6-propionyl-2-dimethylaminonaphthalen^[22], 1-N-Phénylnaphtthylamine^[23] and 2-anilidonaphthalen-6-sulfonic^[24] acid also respectively known as PRODAN, NPN and 2,6-ANS on which tests were realized. At the end, ANS was selected because of its fluorescent properties which are the less disturbed by the analytical conditions. Its fluorescent quantum yield is ten to hundred fold higher when ANS is surrounded with a protein if compared to pure water^[20,25] or on protein surfaces^[19]. It has been used to identify specific sites in proteins such as bovine serum albumin^[20] (BSA), apomyoglobin and apohemoglobine^[26]. ANS has also been applied for a long time in order to study biological membranes^[25] and membrane type structures^[27-29]. Stryer and co-workers^[26] demonstrated that fluorescent properties of ANS is strongly dependent on medium polarity^[30,31]. There is indeed a blue shift of the wavelength at the maximum emission intensity as far

as the solvent is non-polar. Therefore, ANS can advantageously bring information related to dipole-dipole interactions. Finally, Haynes and Staerk^[32] showed that ANS fluorescence quantum yield is not dependent on the pH between a scale ranging from 3 to 10 and not disturbed by the presence of salts in solution. As it has been described above, the ANS probe was used in many studies whose subjects were related to proteins but not in studies dealing with natural water-soluble polymer.

In addition, 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone also denoted as 3HQ-Bf probe (**Figure IV.56b**) is sensitive to hydrogen bonding. It was developed by Bilokin' and co-workers^[33]; it owns an excited state due to intramolecular proton transfer (ESIPT)^[33,34] which induces both dual fluorescence and ratiometric probe properties. In particular, the ratio between EI of the N* (1N* and 2N*) bands and EI of the T* ($E_{I_{N^*}}/E_{I_{T^*}}$) is affected by the relative density of the hydrogen bond network; the more intense the hydrogen bond network the higher the value of the ratio $E_{I_{N^*}}/E_{I_{T^*}}$. In his work, Bilokin' clearly established that $E_{I_{N^*}}/E_{I_{T^*}}$ is correlated to Abraham's parameter β , a parameter initially introduced by Kamlet and Taft^[35]. Based on this β parameter, they developed a hydrogen bond basicity (Hydrogen Bond Acceptor ability, HBA) scale which was further developed and completed by Abraham's works^[36,37]. Simply speaking, the higher is $E_{I_{N^*}}/E_{I_{T^*}}$ value, the richer environment of hydrogen bonds, this latter corresponding to a higher hydrogen bonds density.

In this paper it is presented an original methodology for characterizing hydrophobic micro-domains, dipole-dipole interactions and the H-bond network which can be developed in polysaccharide solutions and mixtures in aqueous medium. To achieve this goal, a model system consisting of two polysaccharides, namely xanthan gum (X) and galactomannans (GM), was prepared and used as a support to study the molecular interactions particularly when both gums are mixed in specific conditions.

2. Experimental Section

2.1. Materials

The fluorescence probe 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf) was prepared following a previously described procedure^[33]. 8-anilino-1-naphthalensulfonic acid (ANS) probe and the bactericide sodium azide (NaN_3) were provided by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Na_2HPO_4 was provided by Rhône-Poulenc (France), NaCl was provided by Labogros (Coueron, France). Methanol for HPLC was provided by Carlo Erba (Val de Reuil, France) and ultra-pure water (18.2 m Ω resistivity) was obtained from an Easypure UV Compact ultrapure water system (Thermo Scientific Barnstead, Illkirch, France). Both polysaccharide powders Locust bean Gum (LBG) and Xanthan gum (X) were kindly provided by Degussa (France). Guar Gum (GG) was provided by Danisco (France). Main characteristics of the gum samples used in the present work were determined and are listed in **Table IV.4**.

Table IV.4: Gum main characteristics

Gum	M_v^a $\times 10^6$	Protein (%w/w)	DS_{AC} (%) ^b	DS_{Py} (%) ^b	T_m (°C) ^c	M/G ratio ^d	Degree of Blocness (DB; %) ^e
X	1.46	4.7	35	65	64±1	/	/
LBG	1.6	1.22±0.03	/	/	/	2.7	95
GG	2.67	1.33±0.15	/	/	/	1.4	33

^aDetermined by viscometric measurements with an Ubbelohde tube

^bDetermined by H NMR spectroscopy according Esquenet protocol^[38]

^cMean value calculated according polarimetric and rheological measurements according Pelletier protocol^[39]

^dDertermined by HPLC analysis according Dahi and co-workers protocol^[40]

^e Calculated according Tapie and co-workers ^[41]

2.2. Preparation of probe stock solution

ANS powder was dissolved in ultra-pure water under magnetic stirring for at least 6h until total solubilization. 3HQ-Bf powder was first pre-dispersed in methanol above its solubility limit under magnetic stirring for at least 6h. Then the mixture was centrifuged at 500 g for 15 min and only the supernatant solution is kept. Probe stock solution concentrations were checked by an UV-Visible analysis (UV-1800, Shimadzu, Marne-la-Vallée, France); UV optic density band at 350 nm with a molar extinction coefficient ϵ equal to $4.95 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[42] and UV optic density band at 384 nm with a molar extinction coefficient ϵ equal to $17.7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[33].

2.3. Preparation of polysaccharide solutions

Xanthan gum powder X purified beforehand by the supplier and was used as received. X powder was gradually dissolved under mechanical stirring for at least 6h in a phosphate buffer (pH 7.4; Na_2HPO_4 at 0.02M) to fix pH. NaCl 0,01M was added to keep xanthan in its native form. Bactericide NaN_3 (400 ppm) was added to prevent bacterial degradation. X stock solution dry-solid content was determined with a thermal gravimetric analysis (TGA; Setsys TGA 1200, SETARAM, Caluire, France) by dehydrating a sample of X stock solution (40 to 60 mg) and by collecting at the end of the analysis the specific masses of the dehydrated sample and the one of the ashes. X stock solution was then kept for 2 months maximum at 4°C. Each galactomannan gum (LBG, GG) powder was dispersed at 83°C for 3h in ultra-pure water under mechanical stirring. Then an additional 3h of mechanical stirring at room temperature in a water bath was performed and 400ppm of NaN_3 was added. Then, the LBG and GG stock solutions were centrifuged at 14,000g for 1 hour as many times as necessary to remove non-soluble residues. Dry extracts using an oven (102°C) allowed the determination of the final galactomannan stock solutions concentration of supernatant. Galactomannan stock solutions were then kept for 2 months maximum at 4°C. 40g of X/GM mixtures were prepared from diluted solutions from each polysaccharide stock solution to get the desired total polysaccharide final concentrations. X/GM mixtures were magnetically stirred for at least 20 minutes in glass beaker and then centrifuged at 5000 g for 5 minutes at 20°C to remove air bubbles.

2.4. Fluorescence measurements

Fluorescence experiments were carried at steady state on a CARY VARIAN fluorescence spectrophotometer using a temperature controller Peltier device (Agilent Technologies, Massy, France). Once centrifuged, each polysaccharide solutions and X/GM mixtures was split in two 15g fractions: a control fraction (polysaccharides in phosphate buffer) and a sample fraction; this latter was added by a precise amount of florescent probe (ANS or 3HQ-bf) stock solution.

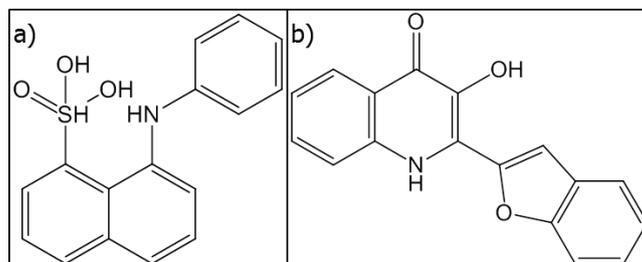


Figure IV.56: Chemical structures of a) 8-anilino-1-naphtalensulfonic acid (ANS) and b) 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf)

Both samples were then homogenized through high strength shear with using a micropipette (VWR; adjusted at 4mL), applying 15 successive suck / release. Then, approximately 3 mL of each fraction were put into two fluorescence quartz cells (Hellma). Fluorescence spectra were registered with and without probe to allow background noise correcting. Besides, in order to get usable and statistically reliable probe signals, five successive scans were performed per measurement; each measurement was performed in triplicate to minimize random fluorescence signals due to instrumental background noise.

Photo-stability tests were carried out for both ANS and 3HQ-Bf probes with parameters respectively set as followed: T = 20°C; excitation wavelengths = 390 nm (ANS) and 320 nm (3HQ-Bf); emission scans from 440 nm to 740 nm and from 350 to 700 nm; excitation slit =5 nm; emission slit =5 nm; scan speed = 600 nm/min (ANS) and 120 nm/min (3HQ-Bf); photomultiplier = 800 volts. ANS and 3HQ-Bf signals were smoothed using Savitzky-Golay algorithm.

2.4.1. Hydrophobic micro-domains and dipole-dipole interactions analyses using ANS probe

Acquisition parameters were set as follow: T = 20°C; excitation wavelength = 390 nm; emission scan from 440 nm to 740 nm; excitation slit =5 nm; emission slit =5 nm; scan speed = 600 nm/min; photomultiplier = 750 volts. For each sample, five successive scans were acquired to get a mean scan and its standard deviations. Scans were performed just after the homogenization phase and then every 5 minutes for 1h, and finally every hour until signal stabilization. All spectra were corrected and normalized at 740 nm. Data were then fitted with polynomial fit curve using OriginPro8 SR4 (v8.0951; B951) to get the maxima values (emission intensities (EI) and wavelengths at EI_{max}). Statistical analysis was made each time with an ANOVA using Xlstat® (version 14.0.6023.1000, Addinsoft, Paris, France). ANS spectra in different organic solvents were acquired as follow in order to check its dipole-

dipole interactions properties: excitation wavelength = 373 nm; emission scan from 440 nm to 740 nm; excitation slit =1.5 nm; emission slit =20 nm; scan speed = 120 nm/min; photomultiplier = 720 volts.

2.4.2. H-bond network analyses using 3HQ-Bf probe

Acquisition parameters were fixed as follow: T = 20°C; excitation wavelength = 320 nm; emission wavelengths = 393 nm (band 1N*), 414 nm (2N*) and 505 nm, 507 nm and 511 nm (Band T*) respectively for X/GG 50/50 mixture (0.2%wt), for X/LBG 20/80-30/70-40/60-60/40 X/LBG and for X/LBG mixtures 0/100-50/50-70/30-80/20-100/0; excitation slit =5 nm; emission slit =5 nm; photomultiplier = 800 volts. Each sample was analyzed within five successive analyses to get a mean of the raw IE and its standard deviations at each emission wavelength. Fluorescence analyses were performed just after the homogenization phase, then every 5 minutes for 1h and then every hour until signals stabilization. Wavelength shift checking analyses of λ_{1N^*} , λ_{2N^*} and λ_{T^*} were performed with the same instrumental parameters as described before and only one scan was registered at t=0 and t>24h. All spectra were corrected and normalized at 700 nm. Statistical analysis was made with an ANOVA using Xlstat®.

2.5. Rheological measurements

Oscillatory shear studies were carried out using a stress-controlled rheometer DHR2 (TA Instruments, Guyancourt, France) equipped with a cone/plate aluminum geometry (60 mm; angle, 2°00'43"; 59 μ m) and a Peltier temperature control device. Polysaccharide solutions and mixtures were kept at room temperature for 48h, and then were analyzed for 3h. Water loss was prevented by covering the sample with low viscosity silicon oil. The storage (G') and loss (G'') moduli were measured within the linear viscosity domain at 20°C. Acquisition parameters were set as follow: T= 20°C, sampling interval= 10 s/pt, angular frequency (ω) = 1 rad.s⁻¹. The same parameters were applied to the analyses checking the viscoelastic properties of X/GM mixtures with and without fluorescent probes.

3. Development of the methodology for the determination of interactions

3.1. Probes responses and stability testings

Samples were scanned in a range from 340 to 740 nm at 600 nm.min⁻¹ for ANS, while they were scanned in a range from 350 to 700 nm at 120 nm.min⁻¹ in the case of 3HQ-Bf. As visible on **Figure 2a**, fluorescence properties of ANS remain constant up to 200 scans thus indicating no probe degradation.

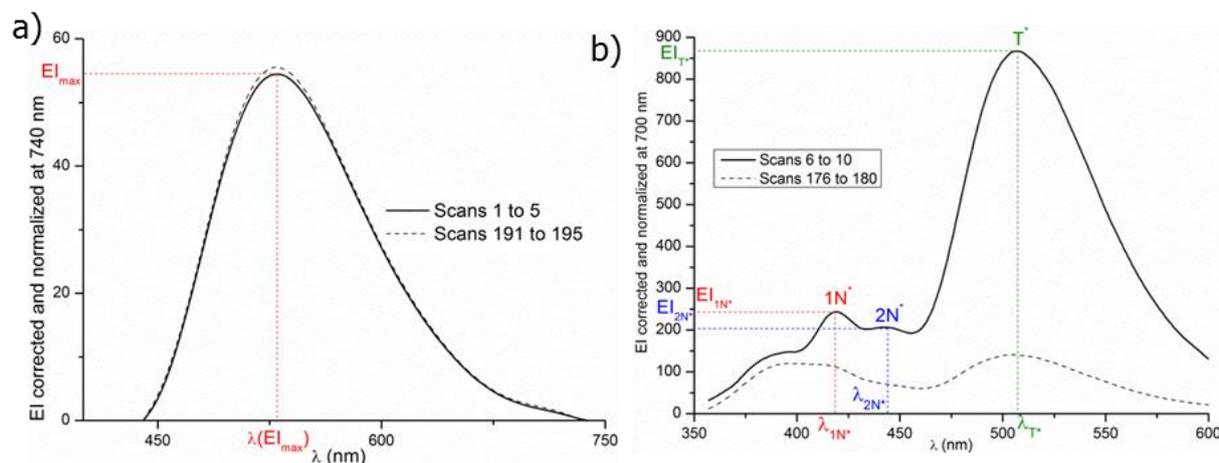


Figure IV.57: Photobleaching resistance tests of a) ANS probe and b) 3HQ-Bf probe in phosphate buffer (pH 7.4)

On the contrary, as visible on **Figure IV.57b**, a sharp decrease of 3HQ-Bf fluorescence spectra was observed after 180 scans whereas there was no change of medium. This allowed evidencing whitening effects due to excess of irradiation time exposure. On the basis of this result, it is necessary to limit the samples period of exposure for 3HQ-Bf to prevent probe degradation. Thus, only emission intensities (EI) at the specific spectral bands wavelengths $1N^*$, $2N^*$ and T^* were recorded to limit 3HQ-Bf probe photo-instability; we checked each time the standard deviations of the raw EI of the $1N^*$, $2N^*$ and T^* which were validated (**Table IV.5**).

Table IV.5: Example of raw IE of the $1N^*$ and T^* spectral bands for X/LBG 60/40 at t=24h (extracted data of one on the three repeated experiences)

	$1N^*$ (λ_{393} nm)	$2N^*$ (λ_{507} nm)
Raw EI (a.u.)	179	190
	187	188
	182	177
	187	172
	186	191
Mean value	184 ± 4	184 ± 9

3HQ-Bf was therefore irradiated 5 times at the specific band wavelengths $1N^*$, $2N^*$ and T^* corresponding to 393, 414 and 507 ± 4 nm (adjusted according to the studied medium), respectively thus ensuring 3HQ-Bf probe stability over the whole period of the samples measurements. Therefore both probes fluorescent signals were reliable and therefore could be used in the experimental conditions for studying dipole-dipole interactions, hydrophobic micro-domains and hydrogen bonding in Xanthan/Galactomannans (X/GMs) mixtures.

3.2. Selection and exploitation of the probes signal and intensity

As described earlier in this paper, ANS signal is useful as it gives access to 2 distinct key information: EI_{max} and wavelength at the maximum emission intensity $\lambda(EI_{max})$ values. EI_{max} value of ANS in saline phosphate buffer is equal to 33.7 ± 5.9 arbitrary units (a. u.), this value depending on the instrumental

parameters. Its associated wavelength at EI_{\max} is equal to 528 ± 2 nm which is close to the EI_{\max} wavelength value in water as determined at 515 nm by Stryer and his team^[26]. ANS sensitivity to dipole-dipole interactions was examined (**Figure IV.58a**) by studying ANS probe's behavior in a series of water/acetone mixtures with varying its proportions (v/v). Results indicate that EI_{\max} wavelength is shifted from 527 nm in pure water to 465 nm in 100% of acetone following a linear variation; this is consistent with the "blue shift" as previously described by Stryer *et al.*^[26] in water/ethanol mixtures. Additional experiments performed on ANS allowed observing that EI increases with the decrease of the solvent polarity (**Figure IV.58b**); again this is consistent with previous results described in Stryer's work^{[26][19,20,26]}. Both results undoubtedly confirm ANS sensitivity to medium polarity, and therefore its interest for the present work. Therefore in the following sections of this paper, variations of the raw EI_{ANS} and a shift of EI_{\max} will be respectively interpreted as a variations of the number^{and}/or the size of the hydrophobic micro-domains and the presence of dipole-dipole interactions in the studied aqueous medium; interpretations according to literature previously cited and according to the realized preliminary experiments and tests.

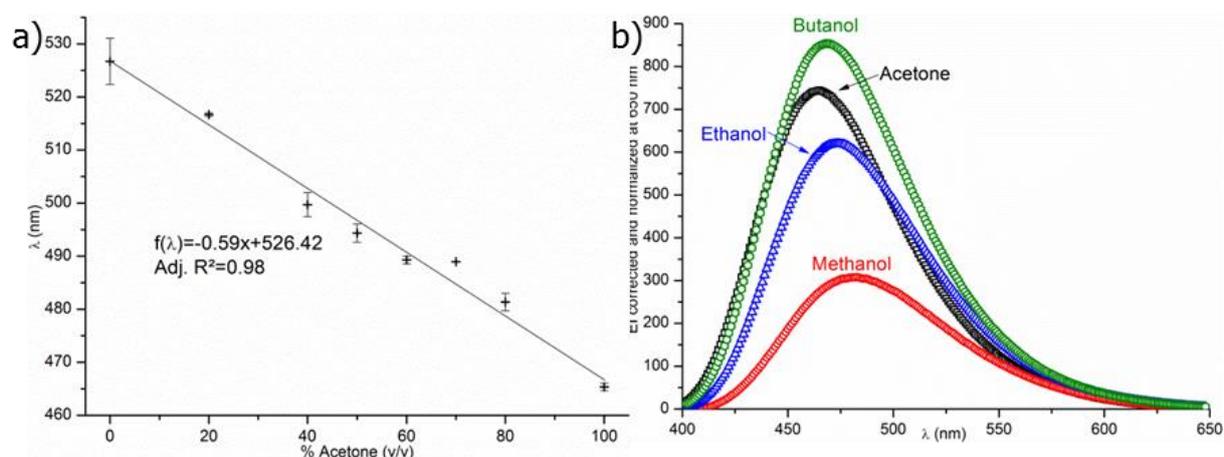


Figure IV.58: ANS spectrum a) in Water/Acetone mixtures as a function of %Acetone (v/v) b) in different organic solvents

EI_{1N^*}/EI_{T^*} and EI_{2N^*}/EI_{T^*} ratio values are respectively equal to 0.232 ± 0.020 and 0.221 ± 0.010 in saline phosphate buffer (results not shown). Therefore, both spectral bands $1N^*$ and $2N^*$ appear equivalent. For the following of this paper, it was decided to consider only the EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio to investigate the hydrogen bonding occurrence in X/LBG mixtures. In ultra-pure water, an EI_{2N^*}/EI_{T^*} ratio equal to 0.239 ± 0.012 was measured, which is close to ratio values in phosphate buffer. Nevertheless Bilokin^[33] determined a value equal to 0.296 in pure water, which appears far from the results obtained herein. Such a significant difference is difficult to explain as information related to experimental conditions used by these authors are not available. According to Bilokin's^[33] study on 3HQ-Bf and according several studies^[34,43,44] on dyes owning similar chemical structures and also an ESIPT such as 3HQ-Bf, it can be said that 3HQ-Bf is truly sensitive to the H-Bond network. Furthermore, thanks to Tomin's kinetic study^[45] on 3-hydroxychromones to which 3HQ-Bf belongs, it

has been proved for such dyes that a change of EI of both spectral bands N^* and T^* over a period of time is linked to the H-bond network organization which is linked to the H-bond density in aqueous media. Thus, in the present conditions and being cautious, a change of the value of EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio through time can be interpreted as the organization or the re-organization of the H-bond network in the studied aqueous medium. The higher is the ratio value, the denser is the H-bond network.

3.3. Transposition to molecular interaction study in polymer solutions and mixtures

Depending on the interactions to be characterized, ANS or 3HQ-Bf probes were added to aqueous polymer solutions at the molar concentrations of $8.10^{-6}M$ and $5.16.10^{-6}M$, respectively. In a first step, polysaccharide solutions and mixtures rheological properties were measured to check the absence of probe effects on the polymers viscoelastic properties, thus allowing ensuring no impact of the probes (especially plasticizer effect) on the polymers structuration and macroscopic properties. Storage moduli in X/LBG mixtures were indeed measured with and without the presence of a molecular probe once both gums are mixed. Storage and loss moduli were identical, thus clearly indicating that fluorescent molecular probes do not disturb, at this working concentration, the polymer system organization at the macroscopic level (results not shown).

3.3.1. Hydrophobic micro-domains and dipole-dipole interactions

Xanthan and Galactomannan aqueous solutions and mixtures spectra in the presence of ANS were investigated; wavelengths at the maximum emission intensity (EI_{max}) were collected and plotted as a function of X/LBG ratios. As visible on **Figure IV.59a**, there is only a slight decrease of wavelength (7 nm) from X/LBG 0/100 to X/LBG 100/0. Wavelength could be considered as constant with a mean value of 471 ± 3 nm when considering that emission split is set at 5 nm. It can therefore be concluded that, in spite of a slight decrease tendency, there is no significant polarity changing of the medium at any X/LBG mixture ratio, thus demonstrating the non-participation of polar interactions between both polysaccharides. On the opposite one can observe that for each mixture ratio, EI_{ANS} values are higher than EI_{ANS} as determined in saline phosphate buffer even for X and LBG pure solutions (**Figure IV.59b**); this clearly allows demonstrating the occurrence of hydrophobic micro-domains related to both polysaccharidic molecular species.

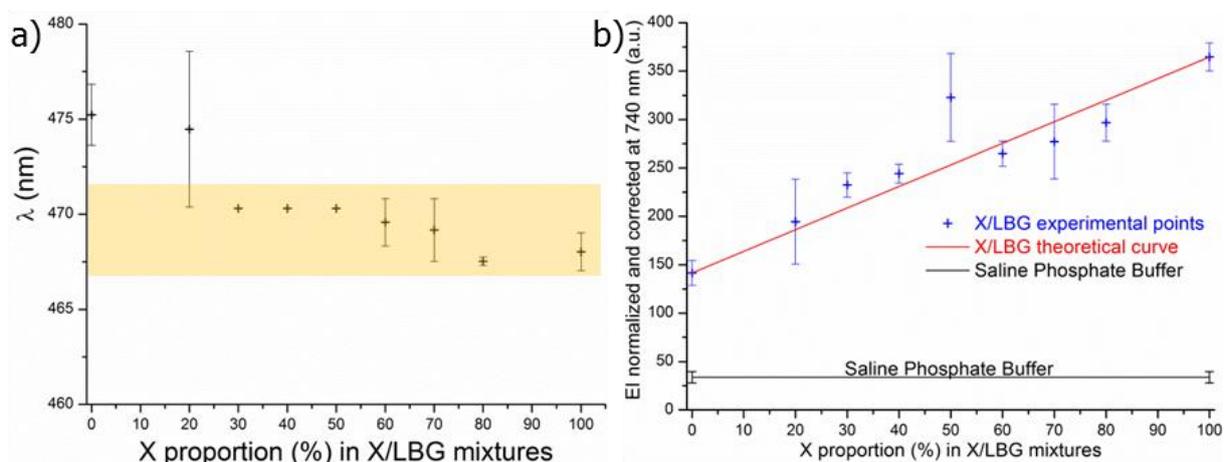


Figure IV.59: a) Wavelength at EI_{max} with the background band representing the spectral resolution (5 nm) and b) Hydrophobic micro-domains intensity values at equilibrium state as a function of X proportion in X/LBG mixtures at a total polymer concentration of 0.2% (w/w)

This original result confirms the occurrence of a self-organization phenomena for each gum in aqueous solution, as it was previously suggested by different authors through macroscopic approaches: for xanthan on the one hand by Schorsch^[46] mainly thanks to polarized microscopy observations, and for galactomannan gums on the other hand as demonstrated by Rinaudo^[47], Dakia and co-workers^[48] and especially for locust bean gum in dextran/locust bean gum mixtures as studied by Garnier and co-workers^[49]. According to **Figure IV.59b**, the higher Xanthan proportion in the X/LBG mixture, the more the hydrophobic micro-domains occurrence. In addition to that, EI_{ANS} variation follows a linear evolution, which reflects the absence of synergies, except for the 50/50 X/LBG ratio. Hence, with an EI_{ANS} value significantly deviating from the linear evolution, this proves that X and LBG associate to each other in a specific way around this ratio, which is close to these gums optimum synergistic rheological behavior ratio^[50–52]. Therefore, this shows a clear correlation between molecular hydrophobic micro-domains and the macroscopic observations. For the first time dipole-dipole interactions and hydrophobic micro-domains were characterized at the molecular scale in a complex medium such as aqueous polymer matrices through a methodology that can be applied to polysaccharide solutions and mixtures. The experiments suggest that some adjustments may be needed such as working at a low polymer concentration (0.2 % w/w) or working at very low concentration of ANS (8 μ M).

3.3.2. Hydrogen bond network

The hydrogen bond network was investigated with 3HQ-Bf dye. In a first step a set of experiments was performed for X/LBG 50/50 at different concentrations ranging from 0.1 to 1% w/w in order to estimate 3HQ-Bf fluorescence properties limit, especially in terms of polysaccharide concentration. **Figure IV.60** shows that the higher the total polysaccharide concentration, the less intense are the EI of the $1N^*$, $2N^*$ and T^* spectral bands. Furthermore, 3HQ-Bf signal intensity, especially for the N^* bands, thus inducing poorly usable signal.

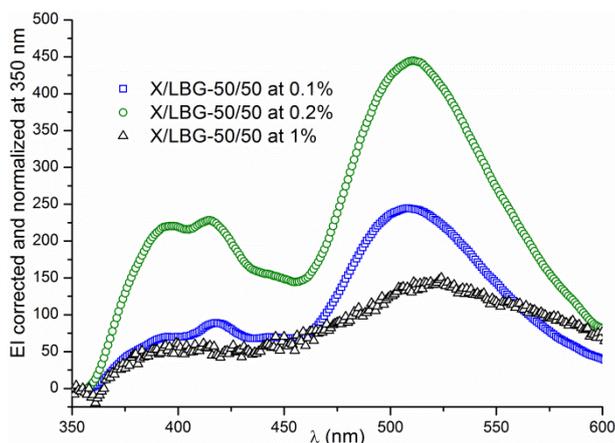


Figure IV.60: 3HQ-Bf in X/LBG mixtures at (■) 0.1%; (●) 0.2% and (△) 1% (w/w)

Thus, band ratios between the $1N^*$ or $2N^*$ bands and T^* band cannot be determined properly when the concentration is too high thus indicating that fluorescent properties may be affected by the medium viscosity. Yushchenko and co-workers^[44] showed a similar behavior for 2-(2-thienyl)-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQT), a fluorescent dye belonging to the same chemical family as 3HQ-Bf. These authors assume that the excitation state T^* would be privileged against the excitation state N^* thanks to the solvent shell reorganization in 3HQ-Bf molecule environment. This may be responsible for the N^* bands intensity lowering and then disappearing when the polymer concentration becomes too high.

As established above, in the present work, 3HQ-Bf fluorescence signal remains usable for a total polymer concentration up to 0.2% (w/w) without disturbing the dye ratiometry property. At the beginning, 3HQ-Bf was only a molecule synthesized to specifically evidence hydrogen bonding; thus using it in aqueous polymeric systems made it necessary to check several parameters. To this end, additional experiments with analyzing 3HQ-Bf probe sensitivity to dipole-dipole interactions was envisaged with the aim to check whether the wavelengths (λ_{1N^*} , λ_{2N^*} and λ_{T^*}) of the three specific bands $1N^*$, $2N^*$ and T^* are subject to shifts or not. For this purpose sets of scans were acquired for different X/LBG mixture ratios at $t=0$ and at $t>24h$ to minimize irradiation time exposure. In order to keep results clear, only the results corresponding to LBG solution and X/LBG 60/40 mixture are reported on **Figure IV.61 a** and **b**, respectively. As clearly visible on both figures there is a significant EI decreasing especially for the T^* spectral band between t_0 and $t>24h$, thus clearly proving that the hydrogen bond network did change. No significant wavelength shifts (vertical black dotted lines) occur over time thus meaning that medium polarity do not change as previously suggested by Bilokin' and co-workers^[33]. These results undoubtedly prove that data acquisition related to 3HQ-Bf by irradiating the probe at the specific unlike the $1N^*$ band, the $2N^*$ band is not observed on both spectra (**Figure IV.61**); hence EI_{1N^*} appeared much more reliable and was therefore chosen to calculate the ratio EI_{N^*}/EI_{T^*} . Thus, the whole results exposed in the present paper only consider results based on $1N^*$ band.

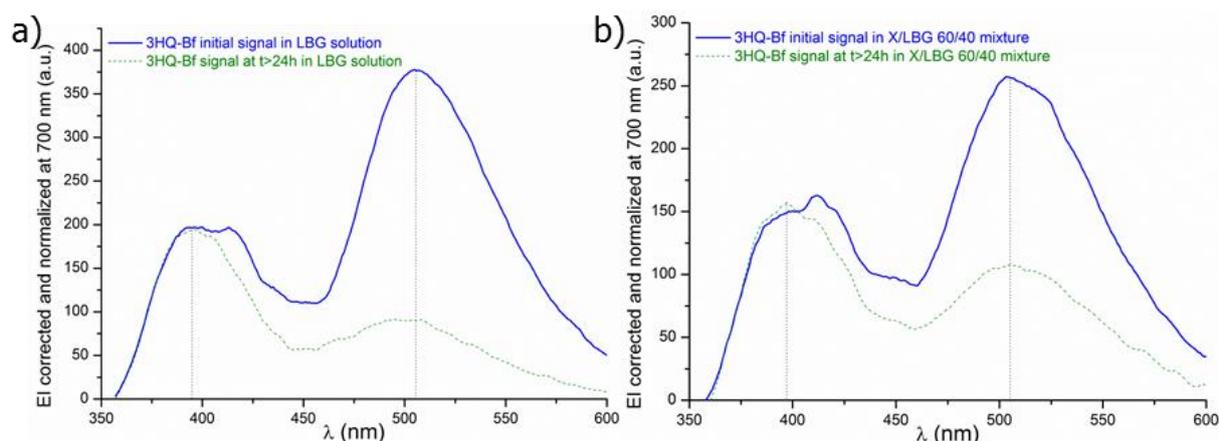


Figure IV.61: Examples of 3HQ-Bf signals at (-) $t=0$ and (---) $t>24$ h in a) LBG solution b) X/LBG 60/40 mixture at 0.2% (w/w)

Figure IV.62 represents the evolution of EI_{1N^*}/EI_{T^*} measured for different X/LBG ratios including pure X and LBG polysaccharide solutions for a total polymer concentration of 0.2%. This allows observing that whatever the polymer solutions and mixtures, the hydrogen bond network is more developed compared to solvent alone (saline phosphate buffer). This result is consistent with polysaccharidic molecules owning numerous hydroxyl groups thus favorable to the occurrence of hydrogen bonds^[47,48,53]. Nevertheless, the hydrogen bonds network appears more intense for solutions or mixtures enriched with LBG solution if compared to X ones; this result may be explained by different factors: in particular, both xanthan rigidity^[54] and polyelectrolyte character are obviously against the establishment of polymer-polymer intra- as inter-molecular interactions. On the opposite, LBG flexibility^[55] and neutral character may clearly favor molecular interactions through hydrogen bonding.

Undoubtedly hydrogen bonds are favoured in LBG pure solution and X/LBG owing high LBG polymer ratio. This result is in agreement with previous results performed by Chandrasekaran and co-workers on a guaran, a galactomannan gum [56]. On the basis of X-ray scattering experiments combined with numerical simulation, these authors demonstrated that guaran chain interconnect to each other through hydrogen bonds established between galactose residues of each chain. They assumed that their model could be applied to any kind of galactomannan. Thus, in the case of X/LBG mixtures, it is obvious that X chains disturb the hydrogen bond network simply by disrupting mostly hydrogen bonds which might be located between galactose residues.

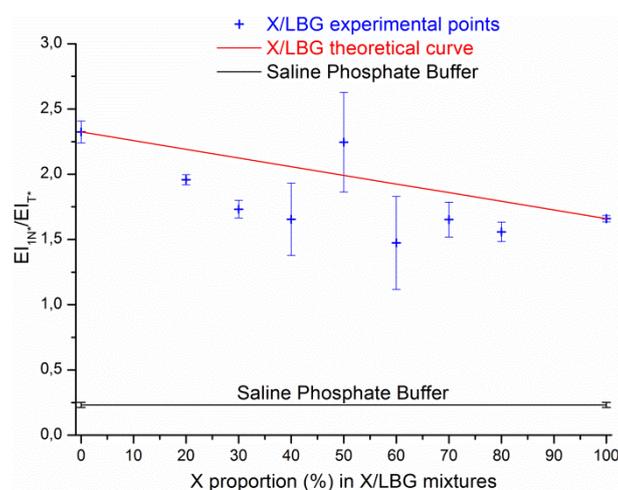


Figure IV.62: Hydrogen bond network index EI_{1N^*}/EI_{T^*} at equilibrium state as a function of %X in X/LBG mixtures at a total polymer concentration of 0.2% w/w.

Except for the 50/50 X/LBG mixture, it is noteworthy that all the X/LBG mixtures own a EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio significantly lower than the corresponding theoretical values as obtained by calculating the arithmetic mean of X and LBG combination with assuming no synergistic interactions between both gums; this illustrates that the hydrogen bond network organization is not reinforced but more likely to be weakened in the presence of both gums. Thus, X/LBG 50/50 again appears as a remarkable point, both gums X and LBG associate to each other in a very specific conformation strengthening the hydrogen bond network. It is striking that such a specific behavior, corresponding to high interactions intensity, was already observed for hydrophobic micro-domains creation as demonstrated earlier in this paper. Again, and for the first time, H-bond network was characterized at the molecular scale in a complex medium such as aqueous polymer matrices through a methodology that can also be applied to polysaccharide solutions and mixtures. The experiments also suggest that some adjustments may be required such as working at a low polymer concentration (0.2 % w/w) or working at very low concentration of 3HQ-Bf (5.16 μ M).

3.3.3. Molecular interactions in X/LBG mixture - a summary

In the presented conditions of analysis and having done multi-parametric tests (photobleaching test, fluorescence properties, etc.) it has been demonstrated on the one hand that a change of EI_{ANS} and a

bathochromic shift respectively mean a change in the intensity of the hydrophobic micro-domains and the existence of the dipole-dipole interactions. On the other hand for 3HQ-Bf probe, any evolution of the $E_{I_{1N^*}}/E_{I_{T^*}}$ ratio value can be interpreted as a change of the organization of the H-Bond network knowing that the higher is this ratio value, the more organized is the H-Bond network. This innovative methodology which undoubtedly enables the characterization of dipole-dipole interactions, hydrophobic micro-domains and of the H-bonds in an aqueous medium composed of a saline phosphate buffer solution was then applied to investigate such molecular interactions in aqueous X/GM mixtures. Results exposed above allowed demonstrating the existence of hydrophobic micro-domains, dipole-dipole interactions and hydrogen bonds in X/LBG system. These three types of interaction can occur either between both polymer chains (intermolecular interactions) or within each polysaccharide itself (intramolecular interactions) as it is suggested from the results in the case of pure polysaccharide solutions. Molecular synergies for hydrophobic interactions and H-bonds were revealed only for a unique X/LBG ratio at 50/50. $E_{I_{ANS}}$ and $E_{I_{1N^*}}/E_{I_{T^*}}$ ratio show indeed the highest values which means that at this specific mixture composition, hydrophobic interactions and the H-bond network are respectively the most intense and the densest. Nevertheless, despite their presence, dipole-dipole interactions clearly appear as background molecular interactions in the X/LBG associations. Thus, dipole-dipole interactions may play a minor role in the X/LBG mixtures properties if compared to both hydrophobic micro-domains and hydrogen bonds interactions. This new methodology has proven its efficacy for X/LBG system by applying strict conditions such as a total polymer concentration of 0.2% (w/w). This innovative methodology was able to measure molecular interactions in a complex medium composed of polysaccharides and their solutions and can also be used as a new tool in order to better understand dipole-dipole, hydrophobic micro-domains and H-bonds. It can be used to identify these three types of molecular interactions, to measure the intensities of these molecular interactions according the polymer mixture composition, to study the way they organize themselves and to study their establishments through time in order to analyze how each type of molecular interaction can be affected by another one (submission in progress). It can be applied to similar system such as X/GG known to also exhibit a synergy of interaction at the macroscopic scale.

3.4. Influence of the chemical structures of galactomannans

Both X and GM are well-known to exhibit a synergy of interaction in specific conditions. In the literature^[50,57,58], it has been showed that stronger gels are obtained mainly when X in its disordered form (semi-flexible chains) interacts with GM owning a few galactose residues showing that conformation and microstructure of these polysaccharides are important parameters. Based on macroscopic observation techniques, interactions models were proposed in the literature^[57,59,60] to better understand X/GM association in aqueous solution. But the authors did not come with the same agreement due to structural variability of xanthan and galactomannan samples used by the authors leaving the mechanisms of interaction between both gums still misunderstood. However attempts of elucidation were carried out at the molecular scale to know how and why X/GM mixture synergy

occurs; for example by studying intrinsic viscosities of both gums and of their mixtures^[61], by scrupulously characterizing X and GM gums^[62], by studying aroma retention in X/GMs matrices^[63-67] or by achieving 2D NOESY NMR experiments on X/LBG mixtures^[68].

Table IV.6: Storage modulus (G'), loss modulus (G''), loss tangent (Tanδ) and spectroscopic data values of X/GM samples

Samples	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tanδ	EI _{ANS} (a.u.)*	EI _{IN*} / EI _{T*}
X	0.73±0.10	0.59±0.05	0.80±0.03	365±14	1.7±0
LBG	2.4 10 ⁻⁴ ±0.6 10 ⁻⁴	1.1 10 ⁻² ±0.1 10 ⁻²	49±11	142±13	2.3±0.1
X/LBG 50/50	3.9±0.7	0.60±0.03	0.16±0.02	323±46	2.245±0.382
X/GG 50/50	0.16±0.01	0.27±0.13	1.72±0.94	280±26	0.794±0.064

* a.u. = arbitrary units of EI

In the present work, in order to link together macroscopic (rheology) and molecular (fluorescence spectroscopy) observations, another type of galactomannan Guar Gums GGs was fully characterized from structural point of view (GG: M/G = 1.4 and DB = 33%;

Table IV.4) and mixed with the same xanthan gum X at a single mixture ratio (50/50). Locust bean gums (LBGs) are well-known to have a higher M/G ratio than guar gums (GGs)^[69]. Comparison between both mixtures X/LBG and X/GG was made at a unique mixture ratio of 50/50 in order to determine the influence of the microstructure of the GM although X/GG mixture might not be at a maximum ratio. Another structural key property for galactomannans is the galactose residue distribution along the mannan main chain, defined as the degree of blockiness^[70]. From a general point of view, LBGs with a high DB combined with high M/G ratio generally own much more "smooth zones" (deprived of galactose unit) when compared to GG gums, these later owing much lower M/G ratios. Storage (G'), loss (G'') moduli values and the loss tangent (Tanδ) were measured once X/GM 50/50 mixtures at an equilibrium state (#48H) and reported on **Table IV.6**. Tanδ is defined as the ratio of the G'' loss modulus over the G' storage modulus (Tanδ = G''/G') and let to know whether the studied sample adopts a predominant elastic (G'>G'') or viscous (G'<G'') behavior. X/LBG mixture undoubtedly develops much higher viscoelastic properties as illustrated by rheological parameters on **Table IV.6** with storage modulus 4 times superior to the X/GG storage modulus. These results are in good agreement with the literature^[57,58]. According to **Table IV.6**, one can observe that guar gum owns strong structural differences which have clearly an impact on the molecular interactions. Indeed, EI of ANS probe differ with 40 arbitrary units meaning that hydrophobic micro-domains are much more present in X/LBG mixture when compared to X/GG mixture. Furthermore, the hydrogen bond network is also more developed; this result may due to X that preferably interacts with gum mannose residue that are less present for GG if compared to LBG. Since LBGs and GGs own different microstructures, GGs are known to be easier solubilized than LBGs which means they are more hydrophilic polymers than LBGs. Mannose being an epimer of glucose with C2, mannopyranan polymer chains tend to form stable crystalline zones such as cellulose^[71]. GGs possess more galactose residues along the mannosidic main backbone, thus limiting the occurrence of such crystalline zones

by (1) limiting mannanpyran chain association and (2) providing more hydroxyl groups that increase the polysaccharide hydrophilic character. LBGs are therefore more hydrophobic than GGs which may explain why hydrophobic micro-domains are more intense in the case of X/LBG systems rather than in X/GG systems. Concerning the hydrogen bond network, it can be hypothesized that X chains may interact preferentially with smooth zones of GM mainly by developing hydrogen bonds between both gums. GGs, unlike LBGs, own less of these smooth zones which could explain the different values of EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio between both systems studied. Finally, at the molecular level, X/LBG system shows more intense interactions than X/GG system which is also the case of what we can observe at the macroscopic scale with the visco-elastic properties of such systems.

4. Conclusion

In this work, a new methodology based on the use of fluorescent molecular dyes, namely ANS and 3HQ-Bf, was developed to characterize at the molecular scale either dipole-dipole interactions, hydrophobic micro-domains and H-bonds for polysaccharide solutions and mixtures in aqueous media. In a first step, both molecular probes behavior was investigated, each taken separately, in a simple aqueous medium consisting of saline phosphate buffer to ensure getting specific fluorescent responses according to their spectroscopic properties. All the parameters influencing the fluorescence properties were studied and optimized to make sure getting reliable results for the three specific interactions investigated. At the end of this first step and once the conditions of analysis fixed, it has been proposed a new analytic methodology making possible the characterization of dipole-dipole interactions, hydrophobic micro-domains and the H-bond network at the molecular scale in an aqueous medium.

This methodology being very efficient was then applied to xanthan (X) and galactomannan (GM) gums aqueous solutions and mixtures. Again protocols were developed and optimized to overcome the limits; in particular, a strict protocol for the preparation of polysaccharide solutions and mixtures, in the absence or in the presence of fluorescence probes, was developed, with keeping the total polymer concentration lower than 0.2% (w/w).

This methodology applied to aqueous X and GM gum solutions and mixtures turned out to be very efficient. The three types of interactions were clearly identified for X/GM systems, but dipole-dipole interactions were demonstrated as not playing a significant role in the foreground. Thanks to this innovative methodology, the roles of X and LBG at the molecular scale were brought to light; X clearly favors hydrophobic micro-domains while LBG mainly acts as hydrogen bond network promoter in X/LBG mixtures. A key result for the present study is that X/LBG mixtures do behave through a very specific manner at 50/50 (w/w) mixture ratio; present study clearly demonstrate that this specific X/LBG ratio exhibits both together the most intense hydrophobic micro-domains and the most developed hydrogen bond network; this striking unpublished result tends to demonstrate the existence of a simultaneous synergy at molecular level for both interactions at this specific mixture ratio of 50/50. It is interesting to note that the macroscopic synergy for the same X/LBG system, as classically measured through rheological tool, indicated an optimum ratio of 40/60 (results not

shown); therefore, the synergism of interactions may be interpreted in a different manner depending on the scale of observation.

To summarize, through an illustration for polysaccharidic solutions and mixtures, this paper describes a fully original tool to investigate molecular interactions in aqueous media. It is obvious that this methodology based on fluorescence measurements is reliable and efficient to characterize molecular interactions in polymer aqueous media. These first results are far promising and let think that this methodology may be extended to any polymeric systems (either natural or not) to characterize and understand the mechanisms involved for intra/intermolecular interactions at the molecular level.

Acknowledgements

The authors acknowledge the European Union and the Haute Normandie region for financial supports to this project and the Region Normandie for research grant.

References

- [1] Y. M. Huang, G. A. Huber, N. Wang, S. D. Minter, J. A. McCammon, *Protein Sci.* **2018**, *27*, 463–471.
- [2] Y. Takano, A. Kusaka, H. Nakamura, *Biophys. Physicobiology* **2016**, *13*, 27–35.
- [3] C. B. Passos, P. S. Kuhn, M. C. Barbosa, *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* **2014**, *413*, 481–488.
- [4] M. Fontanille, Y. Gnanou, *Chimie et physico-chimie des polymères*, Dunod, Paris, **2014**.
- [5] A. Jaishankar, M. Wee, L. Matia-Merino, K. K. T. Goh, G. H. McKinley, *Carbohydr. Polym.* **2015**, *123*, 136–145.
- [6] O. Smidsrød, A. Haug, B. Larsen, S. Gronowitz, R. A. Hoffman, A. Westerdahl, *Acta Chem. Scand.* **1965**, *19*, 329–340.
- [7] D. Chandler, *Nature* **2005**, *437*, 640–647.
- [8] R. H. Garrett, C. M. Grisham, B. Lubochinsky, *Biochimie*, De Boeck Université, Paris, **2000**.
- [9] R. F. Greene, C. N. Pace, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 5388–5393.
- [10] Y. Maréchal, H. Chanzy, *J. Mol. Struct.* **2000**, *523*, 183–196.
- [11] N. A. Burnham, D. D. Dominguez, R. L. Mowery, R. J. Colton, *Phys. Rev. Lett.* **1990**, *64*, 1931–1934.
- [12] A. Katchalsky, *J. Polym. Sci.* **1951**, *7*, 393–412.
- [13] G. S. Manning, *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 443–449.
- [14] J. Raybin, J. Ren, X. Chen, R. Gronheid, P. F. Nealey, S. J. Sibener, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 7717–7723.
- [15] P. K. Vinson, J. R. Bellare, H. T. Davis, W. G. Miller, L. E. Scriven, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 74–91.
- [16] A. Meister, A. Blume, *Polymers* **2017**, *9*, 521.
- [17] A. S. Klymchenko, G. Duportail, A. P. Demchenko, Y. Mély, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2929–2941.
- [18] V. G. Pivovarenko, A. Wróblewska, J. Błażejowski, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *545*, 74–78.
- [19] A. Kato, S. Nakai, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* **1980**, *624*, 13–20.
- [20] G. Weber, L. B. Young, *J. Biol. Chem.* **1964**, *39*.
- [21] B. Valeur, I. John Wiley & Sons, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [22] C. A. Haskard, E. C. Y. Li-Chan, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2671–2677.
- [23] B. Loh, C. Grant, R. E. Hancock, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, *26*, 546–551.
- [24] N. B. Bam, J. L. Cleland, J. Yang, M. C. Manning, J. F. Carpenter, R. F. Kelley, T. W. Randolph, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1554–1559.
- [25] R. B. Freedman, G. K. Radda, *FEBS Lett.* **1969**, *3*, 150–152.
- [26] L. Stryer, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 482–495.
- [27] A. Azzi, S. Fleischer, B. Chance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *36*, 322–327.
- [28] D. H. Haynes, *J. Membr. Biol.* **1974**, *17*, 341–366.

- [29] J. Slavík, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **1982**, *694*, 1–25.
- [30] O. K. Gasymov, B. J. Glasgow, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2007**, *1774*, 403–411.
- [31] A. Roy, S. Comesse, M. Grisel, N. Hucher, Z. Souguir, F. Renou, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1160–1170.
- [32] D. H. Haynes, H. Staerk, *J. Membr. Biol.* **1974**, *17*, 313–340.
- [33] M. D. Bilokin', V. V. Shvadchak, D. A. Yushchenko, G. Duportail, Y. Mély, V. G. Pivovarenko, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 545–553.
- [34] D. A. Yushchenko, V. V. Shvadchak, A. S. Klymchenko, G. Duportail, Y. Mély, V. G. Pivovarenko, *New J Chem* **2006**, *30*, 774–781.
- [35] M. J. Kamlet, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 377–383.
- [36] M. H. Abraham, P. L. Grellier, D. V. Prior, J. J. Morris, P. J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 521.
- [37] M. H. Abraham, *J. Phys. Org. Chem.* **1993**, *6*, 660–684.
- [38] C. Esquenet, Propriétés Structurales et Dynamiques Des Solutions de Polyélectrolytes Rigides et Semi-Rigides et de Polysaccharides Associatifs, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, **2003**.
- [39] E. Pelletier, C. Viebke, J. Meadows, P. A. Williams, *Biopolymers* **2001**, *59*, 339–346.
- [40] A. Dahi, B. M.-L. Abdellahi, M. F. Deida, N. Hucher, C. Malhiac, F. Renou, *Food Hydrocoll.* **2019**, *86*, 2–10.
- [41] N. Tapie, C. Malhiac, N. Hucher, M. Grisel, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1181*, 45–50.
- [42] N. Alizadeh-Pasdar, E. C. Y. Li-Chan, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 328–334.
- [43] A. S. Klymchenko, A. P. Demchenko, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 461–468.
- [44] D. A. Yushchenko, V. V. Shvadchak, A. S. Klymchenko, G. Duportail, V. G. Pivovarenko, Y. Mély, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 10435–10438.
- [45] V. I. Tomin, A. P. Demchenko, P.-T. Chou, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2015**, *22*, 1–18.
- [46] C. Schorsch, Etude rhéologique et structurale des mélanges gomme xanthane/gomme guar, Université Paris IX; ENSIA, **1995**.
- [47] M. Rinaudo, *Food Hydrocoll.* **2001**, *15*, 433–440.
- [48] P. A. Dakia, B. Wathelet, M. Paquot, *Biotechnol. Agron. Société Environ.* **2010**, *14*, 213–223.
- [49] C. Garnier, C. Schorsch, J.-L. Doublier, *Carbohydr. Polym.* **1995**, *28*, 313–317.
- [50] F. Renou, O. Petibon, C. Malhiac, M. Grisel, *Food Hydrocoll.* **2013**, *32*, 331–340.
- [51] C. Schorsch, C. Garnier, J.-L. Doublier, *Carbohydr. Polym.* **1997**, *34*, 165–175.
- [52] F. Wang, Y.-J. Wang, Z. Sun, *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 2609–2614.
- [53] J. G. Southwick, H. Lee, A. M. Jamieson, J. Blackwell, *Carbohydr. Res.* **1980**, *84*, 287–295.
- [54] B. Tinland, M. Rinaudo, *Macromolecules* **1989**, *22*, 1863–1865.
- [55] G. A. Morris, T. R. Patel, D. R. Picout, S. B. Ross-Murphy, A. Ortega, J. Garcia de la Torre, S. E. Harding, *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72*, 356–360.
- [56] R. Chandrasekaran, A. Radha, K. Okuyama, *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 243–255.
- [57] I. C. M. Dea, E. R. Morris, D. A. Rees, E. J. Welsh, H. A. Barnes, J. Price, *Carbohydr. Res.* **1977**, *57*, 249–272.
- [58] E. R. Morris, D. A. Rees, G. Young, M. D. Walkinshaw, A. Darke, *J. Mol. Biol.* **1977**, *110*, 1–16.
- [59] P. Cairns, M. J. Miles, V. J. Morris, G. J. Brownsey, *Carbohydr. Res.* **1987**, *160*, 411–423.
- [60] M. Tako, A. Asato, S. Nakamura, *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2995–3000.
- [61] Y. Aguni, Contribution à la compréhension des mécanismes d'interaction xanthane/galactimannane, Université Le Havre, **2009**.
- [62] M. Grisel, Y. Aguni, F. Renou, C. Malhiac, *Food Hydrocoll.* **2015**, *51*, 449–458.
- [63] C. Jouquand, Y. Aguni, C. Malhiac, M. Grisel, *Food Hydrocoll.* **2008**, *22*, 1097–1104.
- [64] C. Jouquand, V. Ducruet, P. Giampaoli, *Food Chem.* **2004**, *85*, 467–474.
- [65] C. Jouquand, C. Malhiac, M. Grisel, in *Dev. Food Sci.*, Elsevier, **2006**, pp. 421–424.
- [66] S. Secouard, M. Grisel, C. Malhiac, *Food Hydrocoll.* **2007**, *21*, 1237–1244.
- [67] S. Secouard, C. Malhiac, M. Grisel, B. Decroix, *Food Chem.* **2003**, *82*, 227–234.
- [68] M. Takemasa, K. Nishinari, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 3027–3037.
- [69] V. D. Prajapati, G. K. Jani, N. G. Moradiya, N. P. Randeria, B. J. Nagar, N. N. Naikwadi, B. C. Variya, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *60*, 83–92.
- [70] P. J. H. Daas, H. A. Schols, H. H. J. de Jongh, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 609–619.

[71] J. E. Fox, in *Thick. Gelling Agents Food* (Ed.: A.P. Imeson), Springer US, Boston, MA, **1997**, pp. 262–283.

En résumé:

Lors de la mise au point notre méthodologie de caractérisation des interactions moléculaires, nous l'avons d'abord testée en milieu simple (solution tampon) pour nous assurer de son efficacité et du bon fonctionnement des sondes dans les conditions opératoires définies. Suite à cette étape, nous avons appliqué notre méthode aux solutions et mélanges X/GM pour lesquels il a été détecté la présence d'interactions dipôle-dipôle, l'hydrophobie du milieu et des liaisons H. Dans le cas du système X/GdC1, nous avons montré que les microdomaines hydrophobes sont plus nombreux lorsque la proportion en X augmente. A l'inverse, le réseau de liaisons H est plus organisé lorsque la proportion de GdC1 augmente. Pour ces deux phénomènes (formation de microdomaines hydrophobes et de liaisons H), nous avons mis en évidence pour la première fois l'existence de synergies à l'échelle moléculaires. Les interactions dipôle-dipôle ne montrent aucune évolution ni temporelle ni avec la composition du mélange X/GM. D'un point de vue comparatif, il a été observé des interactions plus intenses dans le cas du mélange X/GdC1 que dans celui de X/GG1 illustrant au passage que les GdC s'associent plus favorablement avec X que les GG même à l'échelle moléculaire. Ceci suggère fortement que les interactions moléculaires se créent préférentiellement au niveau des zones lisses des GM.

En complément:

Dans la **Publication n°3**, il a été montré que les interactions dipôle-dipôle, caractérisées grâce à la sonde ANS (longueur d'onde au maximum de l'intensité d'émission $\lambda_{IE \max}$), sont évidemment bien présentes vu la nature des solutés (polysaccharides). Mais comparés aux autres interactions moléculaires telles que les liaisons hydrogène et les phénomènes liés aux interactions comme la formation de microdomaines hydrophobes, elles n'interviennent pas présentement dans le mélange de référence X/GdC1 lorsqu'il est stabilisé aussi bien à l'échelle moléculaire qu'à l'échelle macroscopique.

Tableau IV.14: Valeurs moyennes des longueurs d'onde aux maxima d'intensité d'émission ($\bar{\lambda}_{IE \max}$) en fonction du temps d'analyse

	Ratio X/GM	$\bar{\lambda}_{IE \max}$ (nm) entre 0,08h et 34h
X/GdC1	0/100	476±1
	20/80	475±1
	30/70	471±1
	40/60	470±0
	50/50	470±0
	60/40	470±0
	70/30	470±1
	80/20	468±1
	100/0	469±1
X/GdC2	50/50	473±1
X/GG1	50/50	473±1
X/GG2	50/50	473±1

En effet, aucun changement significatif de la valeur de $\bar{\lambda}_{IE \max}$ en fonction de la composition du mélange X/GdC1. Il a listé dans le **Tableau IV.14** les valeurs des longueurs d'onde aux maxima d'émission $\bar{\lambda}_{IE \max}$ moyennées sur le temps d'une expérience ; c'est-à-dire une période de temps compris entre $\sim t_0$ (0,08h) et 34h pour tous les ratios de mélanges X/GdC1 et ceux des autres mélanges X/GM analysés. Pour rappel, la fente d'émission a été réglée à une longueur de 5nm d'ouverture, ce qui implique une précision des mesures de longueurs d'onde du même ordre de grandeur. Quel que soit le ratio ou les systèmes, aucun changement significatif de la valeur de $\bar{\lambda}_{IE \max}$ en fonction du temps ($\Delta \bar{\lambda}_{IE \max} \leq 5\text{nm}$). Là encore, les interactions dipôle-dipôle ne montrent statistiquement aucune évolution. Dans les deux dimensions dans lesquelles elles ont été analysées, composition des mélanges et temps, les interactions dipôle-dipôle ne montrent pas un rôle majeur dans l'association X-GM. Paradoxalement, à cause de leur nature, elles se révèlent tout de même indispensables à la création des microdomaines hydrophobes qui en sont la conséquence directe. Elles peuvent être donc considérées comme des interactions intervenant sur un plan secondaire.

Tableau IV.15: Caractéristiques de GG2

	Ratio M/G	Degré de bloc (DB ; %)
GdC2	3	74
GG2	1,5	30

Nous avons également fait une comparaison avec les systèmes X/GdC2 et X/GG2 procédant dans les mêmes conditions. Pour rappel, les caractéristiques intrinsèques des échantillons GdC2 et GG2 ont été listées dans le **Tableau IV.15**. Une fois de plus, comme pour la comparaison entre X/GdC1 et X/GG1 les propriétés viscoélastiques se révèlent, au niveau macroscopique, plus importantes dans le cas où X est mélangé avec une GdC qu'avec une GG (**Tableau IV.16**).

Tableau IV.16: Valeurs des grandeurs viscoélastiques et données spectroscopiques des mélanges X/GdC2 et X/GG2

	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tanδ (G''/G')	IE_{ANS} (u.a.)	IE_{1N*}/IE_{T*}
X/GdC2	3,1±0,1	0,65±0,02	0,21±0,01	277±39	0,549±0,031
X/GG2	0,15±0,04	0,17±0,03	1,16±0,06	217±12	0,667±0,073

Le système X/GG2 exhibe, au niveau moléculaire, des propriétés similaires au système X/GG1. A l'inverse, le système X/GdC2 ne montre pas des résultats similaires par rapport au système X/GdC1 au niveau macroscopique. L'hydrophobie du milieu est statistiquement aussi intense dans X/GdC2 que dans X/GG1 au ratio 50/50 (cf. **Table IV.6** et **Tableau IV.16**). De même, le réseau de liaisons hydrogène est moins structuré pour X/GdC2 que pour X/GG1 et X/GG2. L'échantillon GdC2 montre paradoxalement deux comportements différents aux deux échelles d'observation. En effet, au niveau macroscopique, elle interagit avec X de manière à obtenir un gel relativement fort mais développe de faibles interactions moléculaires. GdC2 possède un M/G et un DB respectivement égaux à 3 et 74%. Théoriquement, elle possède plus de zones lisses que les échantillons de GG (GG1 et GG2) mais elle en possède moins par rapport à l'échantillon GdC2. Une étude approfondie nécessite d'être menée pour avoir une meilleure compréhension du comportement au niveau moléculaire de X avec l'échantillon de galactomannane GdC2.

Cette méthodologie se révèle efficace et fiable pour caractériser les interactions moléculaires à l'échelle microscopique comparée à d'autres méthodes employées. Cette approche multi-échelle fut également utilisée par Di Lorenzo et ses co-équipiers^[16] pour déterminer les modules d'Young d'hydrogels constitués d'un copolymère de p(N-isopropylacrylamide-co-diméthylmalméimide) à l'échelle microscopique par AFM et à l'échelle macroscopique en utilisant la rhéologie. Suites aux différents résultats obtenus et présentés principalement dans les Chapitres III et IV, il est discuté dans ce chapitre l'existence ou non d'un lien de corrélation entre les phénomènes analysés aux deux échelles d'observation.

4.5.Structuration des interactions moléculaires

4.5.1.Introduction

Afin de nous assurer que nos mélanges X/GM aient atteint un état de stabilisation avant de procéder à nos analyses, nous avons dû suivre l'évolution des propriétés des systèmes X/GM au cours du temps jusqu'à que ces dernières se stabilisent. Dans cette quatrième publication, nous avons suivi l'évolution de la formation de microdomaines hydrophobes et l'établissement du réseau de liaisons hydrogène au cours du temps en nous focalisant principalement sur les trente premières minutes où les évolutions sont les plus fortes généralement lors de la structuration d'un système composé à base de galactomannane et de protéine de lait comme il a été montré dans les travaux de Monteiro et son équipe^[20]. Nous proposons une méthode d'exploitation des résultats pour mieux appréhender les cinétiques qui sont en jeu. Nous avons, en plus de notre mélange de référence X/GDC1, étendu notre

étude à d'autres systèmes X/GM en sélectionnant trois autres échantillons de galactomannane (GdC2, GG1 et GG2) donnant lieu à l'étude des mélanges suivant : X/GdC1, X/GdC2, X/GG1 et X/GG2 tous préparés à la proportion 50/50.

4.5.2.Publication n°4

Cette publication est en cours de finalisation en vue d'une soumission au journal « Carbohydrate Polymers ».

Establishment of Molecular Interactions in Aqueous Polymer Media: Examples of Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonds

Alexandre Cordinier, Nicolas Hucher, Michel Grisel

Normandie Univ, UNIHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, 76600 Le Havre, France

Abstract: Interaction synergies in aqueous xanthan/galactomannan (X/GM) mixtures are widely described in the literature. Nevertheless, most of the papers only focus on the understanding of systems once the equilibrium reached, and the way the system evolves from the initial mixing stage until equilibrium still remains misunderstood. Based on fluorescence measurements, the present work describes the establishment of hydrophobic micro-domains and hydrogen bonds at the early stage of development of X/GM systems. The creation of hydrophobic micro-domains at molecular synergistic X/GM ratios appears progressive unlike the one of the hydrogen bond network which occurs quicker at this specific ratio of 1:1. In addition, further investigations allowed revealing similar molecular organization for the Xanthan/Galactomannan mixtures involving locust bean gum (LBG) or guar gum (GG).

1. Introduction

In order to elaborate new materials (Coleman & Painter, 1995; Lee & Sigmund, 2002; Liu et al., 2019), biomaterials (Auzély-Velty, 2011; Bray & Merrill, 1973) or in order to better understand physiological phenomena such as DNA denaturation (Passos et al., 2014), protein conformation (Takano et al., 2016) or astringency perception (García-Estévez et al., 2018) for example, it is necessary to study molecular interactions occurring at any step of elaboration. The main interactions which are the most developed in such systems are hydrogen bonds, electrostatic interactions or dipole-dipole interactions (so called van der Waals interactions); establishment of hydrophobic micro-domains is the direct consequence of the existence of van der Waals interactions. These interactions are qualified as weak (Lehn, 1995) as they require no covalent bond formation and they often occur in polymeric systems in bulk (Coleman & Painter, 1995) or in solution (Goh et al., 2007; Nomura et al., 2001).

Nevertheless, the full characterization of the latter interactions without disturbing the studied system at the molecular level and within aqueous media remains quite difficult. In order to overcome this barrier, a methodology mostly based on fluorescence spectroscopy measurements was previously set up (publication in progress) to characterize dipole-dipole, hydrophobic micro-domains and the hydrogen bond network in polysaccharide solutions and mixtures. It had been shown that dipole-dipole interactions are present but might play a minor role in the background because no evolution through time was observed. To this purpose, two distinct fluorescent probes were selected: on the one hand, 8-anilino-1-naphthalensulfonic acid (ANS, **Figure IV.63a**) was used under its basic form for

its sensitivity to dipole-dipole and hydrophobicity since water is a quencher to its fluorescence emission (Alizadeh-Pasdar & Li-Chan, 2000; Weber & Farris, 1979). It gives then through its spectroscopic signal (emission intensity of ANS; EI_{ANS}) information about the organizations of the dipole-dipole interactions and the hydrophobic micro-domains in aqueous solutions. The higher the signal, the more numerous the hydrophobic micro-domains within the medium. A blue shift of the wavelength at the maximum of the EI_{ANS} , $\lambda_{EI_{max}}$, means that the medium becomes more polar. On the other hand, 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf, **Figure IV.63b**), synthetic fluorescent dye developed by Bilokin' and his team (Bilokin' et al., 2009) was selected for its properties to sense hydrogen bonds in its close environment. This probe is a ratiometric probe and the ratio value, which is the ratio between two specific spectral bands (N^* and T^* bands), gives information about the organization of H-bonds in aqueous media. A high ratio value (EI_{1N^*}/EI_{T^*}) means that the H-bond network is dense with H-bonds. Using fluorescent spectroscopy, molecular synergies for hydrophobic micro-domains and hydrogen bonds were brought out in xanthan/galactomannan mixtures at the same mixture ratio of 50/50. Xanthan (X) and Galactomannan (GM) solutions and mixtures preparation conditions involve high shear stress resulting in a much disrupted X/GM system far from equilibrium state.

In this paper, the evolutions of hydrophobic micro-domains and the hydrogen bond network were monitored over time at the molecular level from the initial mixing time of both polysaccharides until reaching equilibrium. The impact of the microstructure of two kinds of GMs (Locust Bean Gum LBG and guar Gum GG) on the X/Galactomannan organization was also investigated.

2. Experimental section

2.1. Chemical compounds

The fluorescence probe 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf) was prepared following a previously described procedure (Bilokin' et al., 2009). 8-anilino-1-naphthalensulfonic acid (ANS) probe was provided by SIGMA. Na_2HPO_4 was provided by Rhône Poulenc, NaCl was provided by Labogros (France) and the bactericide sodium azide (NaN_3) by Aldrich. Methanol for HPLC was provided by Carlo Erba and ultra-pure water was obtained from an Easypure UV Compact ultrapure water system (Barnstead). Polysaccharide powders Locust bean Gum #1 (LBG1) and Xanthan gum (X) were kindly provided by Degussa (France). Locust Bean Gum #2 (LBG2) was provided by Cargill (France). Guar Gum #1 (GG1) and Guar Gum #2 (GG2) were respectively provided by Danisco and Cargill (France). Xanthan gum powder X was previously purified by the supplier and was used as received. Its contains intrinsically and whose degrees of substitution of acetate and pyruvate group as determined by H NMR (Esquenet, 2003) are equal to 35% and 65%, respectively; it contains 4.7% of protein and its viscosimetric molecular mass M_v is equal to $1.46 \cdot 10^6$. Four distinct galactomannan gums were selected for this work. Characteristics of the galactomannan samples such as protein content, M/G ratio and the degree of blockness are listed in the **Table IV.7**.

Table IV.7: Characteristics of the galactomannan samples

Sample	Protein ^a (% w/w)	M/G ratio	DB ^b (%)
LBG1	1.22	2.7	95
LBG2	>0.1	3	74
GG1	1.33	1.4	33
GG2	0.34	1.5	30

^aDetermined thanks to the Bardfod's method(Bradford, 1976) as for the-one of X

^bDegrees of blockiness (DB) were determined and calculated according to the process proposed by Tapie and co-workers'work(Tapie et al., 2008)

2.2. Preparation of probe stock solution

ANS powder was dissolved in ultra-pure water under magnetic stirring for at least 6h. 3HQ-Bf powder was dissolved in methanol above its saturation under magnetic stirring for at least 6h. Then the solution is centrifuged at 500xg for 15 min and only the supernatant solution is kept. Probe stock solution concentrations were checked by an UV-Visible analysis (UV-1800 from Shimadzu; UV optic density band at 350 nm(Alizadeh-Pasdar & Li-Chan, 2000) and UV optic density band at 384 nm(Bilokin' et al., 2009)).

2.3. Preparation of polysaccharide solutions

Xanthan was gradually dissolved with the equivalent of 400 ppm of NaN₃ by mechanical stirring for at least 6h in a phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.01M NaCl in order to keep X in its ordered form. X stock solution dry-solid content was determined as follow: an exact amount (20 to 30 mg) of X stock solution was left dehydrated at 110°C for 45 minutes under compressed air using a Thermo Gravimetric Analyzer (TGA). Then temperature was raised to 550°C (10°C/min.) and hold at the maximum temperature for 20 minutes to fully degrade the organic matter then getting only ashes residues. Specific masses of the hydrated sample, the dehydrated sample and the mass of the ashes allow calculating the polysaccharide content. TGA apparatus Setsys 1200 SETARAM (France) was used. X stock solution was kept at 4°C up to 2 months prior to use. Each galactomannan gum (LBG1, LBG2, GG1 and GG2) powder was dispersed at 83°C for 3h in ultra-pure water under mechanical stirring. Then an additional 3h of mechanical stirring at room temperature in a water bath was performed and 400ppm of NaN₃ was added. Then, the LBG stock solution was centrifuged at 14,000g for 1 hour as many times as necessary to remove non-soluble residues. Dry extracts using an oven (105°C) allowed the determination of the final galactomannan stock solutions concentration of supernatant. 40g of X/GM mixtures were prepared from diluted solutions from each polysaccharide stock solution to get the desired concentrations of total polysaccharide. All X/GM mixtures were magnetically stirred for at least 20 minutes in glass beaker. They were then centrifuged at 500g for 5 minutes at 20°C to remove air bubbles.

2.4. Fluorescence measurements

All fluorescence experiments were carried at steady state on a CARY VARIAN fluorescence spectrophotometer using a temperature controller Peltier device (Agilent Technologies). After centrifugation, each polysaccharide solutions and X/GM mixtures was divided in two 15g fractions: a control fraction (polysaccharides in phosphate buffer) and a sample fraction (polysaccharide in phosphate buffer plus one of the two fluorescent dye ANS or 3HQ-Bf).

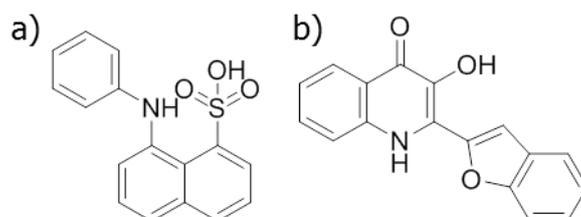


Figure IV.63: a) Chemical structure of 8-anilino-1-naphthalensulfonic acid (ANS) and b) Chemical structure of 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf)

A precise amount of fluorescent probe (ANS or 3HQ-bf) stock solution was added to this sample fraction. Both fractions were then homogenized through high strength shear with a micropipette (VWR; adjusted at 4mL) by making 15 successive aspiration / liberation. Then, 2 at 3 mL of each fraction were put into two fluorescence quartz cells (Hellma). Fluorescence spectra were registered with and without any probe to allow background noise corrections. Moreover, in order to get usable and statistically reliable probe signals, scans (for ANS) or wavelength selective irradiations (for 3HQ-Bf) were performed five successive times to get one measurement; each measurement point was done in triplicate to minimize random fluorescence signals due to instrumental background noise.

2.4.1. Hydrophobic micro-domains analyses

Acquisition parameters were as follow: T = 20°C; excitation wavelength = 390 nm; emission scan from 440 nm to 740 nm; excitation slit =5 nm; emission slit =5 nm; scan speed = 600 nm/min; photomultiplier = 750 volts. For all the samples, five successive scans were acquired to get a mean scan and its standard deviations. Scans were performed just after the homogenization phase, then every 5 minutes for 1h, and then regularly scanned every hour until signal stabilization. All spectra were corrected and normalized at 740 nm. Data were then fitted with polynomial fit curve using OrinPro8 to get the maxima values (emission intensities (EI) and wavelengths at EI_{max}). Statistical analysis was made each time with an ANOVA and Student tests using Xlstat.

2.4.2. H-bond network analyses

Acquisition parameters were performed as follow: T = 20°C; excitation wavelength = 320 nm; emission wavelengths = 393 nm (band 1N*), 414 nm (2N*) and 503 nm, 508 nm and 511 nm (Band T*) respectively for X/LBG1 0/100 solution (0.2%wt), 20/80-30-70-40-60-60/40 X/LBG2 mixtures and 50/50-70/30-80/20-100/0 X/LBG1 mixtures; excitation slit =5 nm; emission slit =5 nm;

photomultiplier = 800 volts. For all the samples, five successive analyses were acquired to get a mean of the raw IE and its standard deviations at each emission wavelength. Fluorescence analyses were done just after the homogenization phase, then every 5 minutes for 1h and then regularly realized every hour until signals stabilization. Statistical analyses were made with an ANOVA and Student tests using Xlstat.

3. Results and Discussion

3.1. Evolution of hydrophobic micro-domains

3.1.1. At short times: first 30 minutes

As previously explained in the introduction, hydrophobic micro-domains were characterized using ANS probe whose fluorescence quencher is water. To this purpose, EI_{ANS} was monitored over a time period of thirty hours. **Figure IV.64a** shows EI_{ANS} as a function of time for X/LBG1 30/70, 80/20 and 100/0 mixtures; results corresponding to other X/LBG1 ratios are not shown to keep the overall results clear. It is striking that in all cases EI_{ANS} evolves until reaching a plateau after a several hours. Except for X/LBG1 0/100, a progressive evolution of EI_{ANS} signal is observed during the first 30 minutes whatever the X/LBG1 ratio. Data were then processed for the purpose of obtaining kinetic data at the early stage of monitoring.

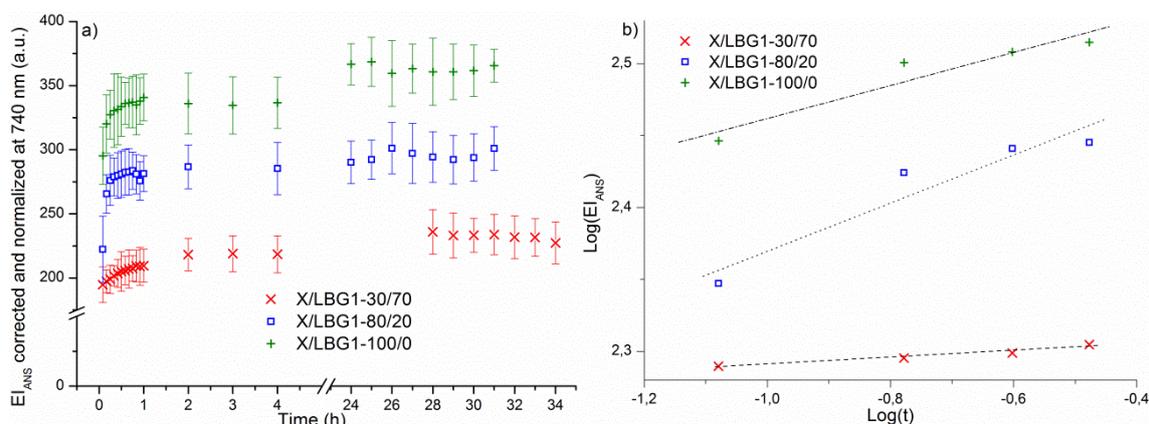


Figure IV.64: a) Examples of EI_{ANS} evolution over time and b) Representation of $\text{Log}(EI_{ANS})$ as a function of $\text{Log}(\text{time})$ between $t=0,08\text{h}$ $t=30\text{min}$ 0.5h and trend lines for X/LBG1 (--)30/70, (..)80/20 and (-.-) 100/0 ratios

Double decimal logarithmic representation of EI_{ANS} versus time within the first 30 minutes period of time is plotted on **Figure IV.64b**. Such a representation currently gives straight lines with slope value representing kinetic. Thus, slope values of the different X/LBG1 mixture ratios data points were calculated and reported in **Table IV.8** as a measure of the rate of hydrophobic micro-domains establishment. It is important to note that the coefficients of determination R^2 are equal or higher than 0.8 for all the systems, thus validating the double logarithmic representation model.

Table IV.8: Trend line slopes of X/LBG1 composition mixtures for hydrophobic micro-domains

X/LBG1 Mixture Ratio	Slope
0/100	0.09±0.03
20/80	0.07±0.01
30/70	0.04±0.00
40/60	0.05±0.02
50/50	0.05±0.02
60/40	0.05±0.01
70/30	0.12±0.00
80/20	0.13±0.01
100/0	0.07±0.00

It is striking that except for X/LBG1 70/30 and 80/20 ratios, slope values keep statistically identical thus meaning that most of the X/LBG1 mixtures behave similarly; therefore, one can conclude that except for specific X/LBG1 ratios there is no direct influence of one of the two gums, X nor LBG1, in the hydrophobic micro-domains establishment, even gums alone behaving in the same way. Nevertheless, both X/LBG1 mixtures corresponding to 70/30 and 80/20 behave differently, with significantly much higher values for the slope. Thus, one can conclude that the initial occurrence of hydrophobic micro-domains appears mainly driven by X polysaccharide, with a minimum X/LBG ratio of 2/1 necessary to allow such hydrophobic micro-domains formation.

3.1.2. At long times: after 24 hours

As visible on **Figure IV.64a**; one can observe that EI_{ANS} is constant after 24 hours, thus illustrating that hydrophobic micro-domain remain after formation and keep stable as no evolution is observed anymore. For X/LBG1 30/70, a plateau is reached hardly one hour afterwards. Unlike to what happens at short times, stabilization of the hydrophobic micro-domains are modulated by X. Indeed the more X is present in the X/LBG1 ratio mixture, the more EI_{ANS} takes time to stabilize. Indeed for X/LBG1 ratios 20/80, 30/70, 40/60 and 60/40, EI_{ANS} stabilize after about 10 hours or less whereas for X/LBG1 ratios 50/50, 70/30, 80/20 and 100/0 stabilization may certainly occur a bit later afterwards. As a reminder, it has been proved the existence of an optimal X/LBG1 ratio (50/50) for which there is a molecular synergy of the hydrophobic micro-domains. Then for the X/LBG1 ratios framing this synergy and for X/LBG1 30/70, in other words when X and LBG1 are quite equivalent in the mixture, kinetics of the establishment of the hydrophobic micro-domain formation occur gradually. At this point, it can be said there is a collaboration of X and LBG1 in order to elaborate hydrophobic micro-domains between both gums which requires more time unlike to X/LBG1 which are far from the molecular synergy poor or rich with X.

3.2. Evolution of the hydrogen bond network

3.2.1. At short times: first 30 minutes

Hydrogen bond network establishment was analyzed using 3HQ-Bf dye with considering the EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio. Similarly to the approach described above, EI_{1N^*}/EI_{T^*} was plotted as a function of time as visible on **Figure IV.65a**; once again only data of X/LBG1 0/100, 50/50 and 100/0 were plotted for clarity reasons. It is striking that whatever the X/LBG ratio EI_{1N^*}/EI_{T^*} value increases with time until reaching a plateau after at least 24 hours of monitoring. As it can be observed on **Figure IV.65a**, the evolution of EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio is the most significant at the early stage (first 30 minutes) of the experiment. Thus, in order to quantify this marked evolution, data were plotted on a bilogarithmic graph representing EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio versus time for a period on time of 30 minutes once the gums mixture prepared (**Figure IV.65b**).

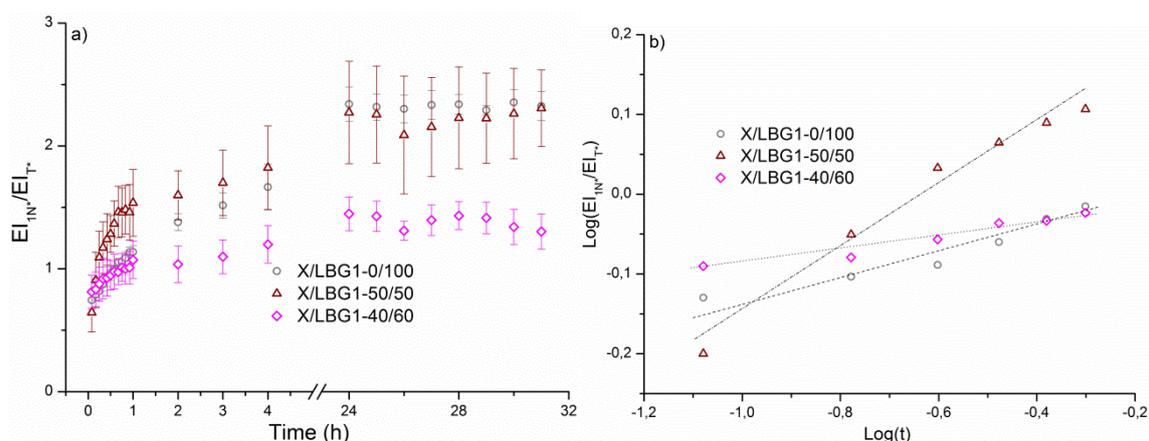


Figure IV.65: a) Examples of EI_{1N^*}/EI_{T^*} ratio evolution over time and b) Representation of $\text{Log}(EI_{1N^*}/EI_{T^*})$ as a function of $\text{Log}(\text{time})$ between $t=0,08\text{h}$ and $t=0,5\text{h}$ and trend lines for X/LBG1 (--)0/100, (..)40/60 and (-.-) 50/50 ratios

Only trend line for X/LBG1 is plotted for clarity reasons (**Figure IV.65b**); the trend line corresponding slope values are all X/LBG1 ratios are listed in **Table IV.9**, each representing the structuration rate of the hydrogen bond network occurrence for the X/LBG1 mixtures. The coefficients of determination R^2 are equal or higher than 0.81 except for X/LBG1 20/80 where R^2 is equal to 0.27.

Table IV.9: trend line Slopes of X/LBG1 composition mixtures for hydrogen bond network

X/LBG1 Mixture Ratio	Slope	Standard error	Determination coefficient R^2
0/100	0.15	0.02	0.85
20/80	0.03	0.01	0.27
30/70	0.12	0.02	0.93
40/60	0.13	0.03	0.84
50/50	0.40	0.09	0.96
60/40	0.15	0.06	0.81
70/30	0.21	0.15	0.88
80/20	0.36	0.27	0.96
100/0	0.15	0.05	0.91

As visible in **Table IV.9**, there is a good modelling a majority of X/LBG1 ratios slopes, except for X/LBG1 ratios 20/80, 70/30 and 80/20. As a reminder, the X/LBG1 system is initially fully unstructured due to the process of sample preparation prior to spectroscopic analysis; thus, X/LBG1 may behave differently depending on the type of interactions that take place first, considering that these latter may be in competition with others. This could explain why the modelling does not fit very well for both 70/30 and 80/20 ratios due to the simultaneous establishment of H-bonds and the hydrophobic micro-domains as evidence earlier in this paper. Thus, it can be assumed that these two types of interactions are competing in a narrow range of ratios corresponding to 70/30 and 80/20; in these cases, the hydrophobic micro-domains are primarily formed thus disturbing the one of H-bonds that therefore appear strongly varying over the first minutes of structuration. During this period of time, there may be indeed some polysaccharide chains micro-movements due to the coexistence of a semi-rigid chain (X) and a more flexible chain (LBG1); micro-movements which may also be due to the self-assembly of the hydrophobic segments located on both polysaccharide chains to induce hydrophobic micro-domains occurrence whose driving force is entropic origin(Chandler, 2005). Kinetics of all the X/LBG1 composition mixtures are statistically the same except for X/LBG1 which shows the highest kinetics of H-bond network establishment and which is equal to 0.4 ± 0.1 . X/LBG1 50/50 is exactly the synergistic ratio for the H-bonds once stabilization is reached in X/LBG1 mixtures. This means for this particular ratio that the structuration of the hydrogen bond network occurs quickly, almost three times faster than for the other X/LBG1 ratios meaning that the synergistic character at the microscopic scale actually boosts the H-bond network establishment. Thus, when compared to the hydrophobic micro-domains kinetics, faster kinetics are observed for the H-bonds than for those of hydrophobic micro-domains.

3.2.2. At long times: after 24 hours

Again for X/LBG1 compositions 0/100, 40/60, 50/50 and for all the others (**Figure IV.65a**; results not shown), the H-bond network stabilizes (no more evolution of EI_{IN^*}/EI_{T^*} with time). The H-bond network is at equilibrium state after at least 24h of monitoring. It stabilizes then after the establishment of the hydrophobic micro-domains which confirms the specific cases of X/LBG1 70/30 and 80/20 where the establishment of hydrophobic micro-domains firstly occurs in comparison with the one of the H-bond network.

4. Discussion

4.1. Molecular interaction network kinetics in a polysaccharide matrix

After polysaccharide solutions and mixtures have just been prepared, both types of interactions hydrophobic micro-domains and hydrogen bonds strongly organize during the first 30 minutes. It can be noticed that hydrophobic micro-domains globally stabilized much faster than the hydrogen bond network showing a ranking of the molecular interactions in X/LBG1 system. As the calculation were realized from the emission intensities (EI) of each probe (ANS and 3HQ-Bf), kinetics of both molecular interactions can be compared and the conclusion is that the hydrophobic micro-domains are the first-

ones to establish (gap of ~ 10 h). This can be explained by the natures of the analyzed molecular interactions. Unlike to the H-bonds which are directional interactions(Hunger et al., 2012), the hydrophobic micro-domains do not require specific arrangements. By definition, hydrophobic micro-domains due to the rearrangement of the solvation cage; the water molecules rearrange to minimize the surface contact with water molecules of the hydrophobic micro-domains(Chandler, 2005). The exposition of the hydrophobic chain sections may cost more energy than the creation of H-bonds; this can be an explanation why the hydrophobic micro-domains first establish to lower the cost of energy rather than the one of the H-bond network which may be less energetic to form. Therefore there is a real competition between both molecular interactions studied. This molecular competition is even more important that at short times (first 30 minutes) H-bonds show faster kinetics of establishment than for the hydrophobic micro-domains. At this point it can be clearly hypothesized that at the early stage of the structuration of X/LBG1 system, the H-bond network first forms itself but is not stable enough to prevail over the formation the formation of hydrophobic micro-domains which are entropy governed. It gets stabilized several hours after the hydrophobic micro-domains are stabilized even for X/LBG1 50/50 for which it is observed the fastest kinetics of H-bonds the in the first 30 minutes of monitoring and for which the H-bond network is the densest. At short times, both molecular interactions do not cooperate for energetic reasons but these same molecular interactions may cooperate when X/LBG1 is at equilibrium state cause both of them show an optimum of synergy at the same specific X /LBG1 ratio of 50/50. Hydrophobic micro-domains and H-bonds can cooperate such for a tripodal gelator developed by Zhou and coworkers(Zhou et al., 2006) which forms a bilayer by self-assembly thanks to the collaboration of hydrophobic and azobenzen-azobenzen interactions and of the H-bonds. This work brings out to light and confirms the time period that is usually awaited before realizing any experiment on polymer solutions; for examples, time periods equal to 16h for X/LBG systems(Shatwell et al., 1990a), 24h for X/Guar systems(Shatwell et al., 1990b) or a time period equal to a night of rest(Bresolin et al., 1997; Chandrasekaran & Radha, 1997; Zhan et al., 1993).

4.2. Impact of GM microstructures in X/GM mixtures

The evolution of the molecular interactions was monitored in different X/GM systems. Two types of galactomannan were selected, locust bean gums (LBG1 and LBG2) and guar gums (GG1 and GG2). Xanthan sample (X) was mixed with each of the selected galactomannan sample at a unique mixture ratio of 50/50 in order to truly compare the microstructure between each GM when they are mixed with the same xanthan X. The same calculations were used as in sections 3.1 and 3.2 and the trend line slope values are respectively listed in **Table IV.10**. The coefficients of determination R^2 are equal or higher than 0.91 except for X/GG2 for the H-bond network where R^2 is equal to 0.46.

Table IV.10: Trend line slopes of X/GM composition mixtures for hydrophobic micro-domains and the H-bond network

	Hydrophobic Micro-domains	H-bond network
X/GM-50/50	Slope	Slope
LBG1	0.05±0.02	0.40±0.09
LBG2	0.06±0.01	0.35±0.18
GG1	0.06±0.01	0.46±0.04
GG2	0.04±0.01	0.18±0.30

On one hand, statistically no significantly differences can be noticed between the two kinds of galactomannan (**Table IV.10**). At the early stage (first 30 minutes) of the development of the systems (X/LBGs or X/GGs) hydrophobic micro-domain organization kinetics are not influenced in any case by the nature of GM in X/GM mixtures. On the other hand, there statistically no difference between the H-bond network kinetics either which means that microstructures of GM also do not have an impact on the H-bond kinetics during the first 30 minutes (Erreur ! Source du renvoi introuvable. **Table IV.10**). At short times, faster kinetics are observed for hydrophobic micro-domains than for the H-bond network which confirms even with other studied systems such as X/GG system the molecular competition between both types of molecular interaction.

At long times, both molecular interactions stabilize whatever the GM used to be mixed with X at the X/GM ratio of 50/50 (results not shown). It is found at the microscopic scale for hydrophobic micro-domains and for the H-bonds the same behavior as it can be observed at the macroscopic scale. It is indeed observed stronger molecular properties for the X/LBG1 system rather than for X/GG systems. At the macroscopic scale, it is usually observed in the literature for X/LBG systems stronger visco-elastic properties rather than for X/GG systems (Dea et al., 1977; Grisel et al., 2015; McCleary, 1979; Morris, 1977; Renou et al., 2013). However, once the system is stabilized, X/LBG2 system show molecular properties for both types of interactions which are similar to the X/GG systems although the same X/LBG2 system show better visco-elastic properties at the macroscopic scale (results not shown). LBG2 DB value might bring an explanation but further investigations have to be carry on to understand its molecular behaviors.

4. Summary

In this work are presented results about the evolution of the hydrophobic micro-domains characterized by the ANS probe and the establishment of the hydrogen bond network characterized by the synthetic 3HQ-Bf at the very beginning (first 30 minutes) of the X/GM mixture development. Thanks to simple modellings, evolutions of both molecular interactions had been relatively quantified through the analysis of trend line slope values which reflect the kinetics of molecular establishment. At short times (first 30 minutes) and for X/LBG1 mixture, kinetics of establishment of the hydrophobic micro-domains are slower than for the kinetics of the H-bond network. Kinetics of H-bonds are indeed faster and especially for X/LBG1 50/50. But a competition between both types of molecular interactions was brought to light. Although the hydrophobic micro-domains own the slowest kinetics of

establishment at short times compared to the H-bonds, they stabilize first before the H-bond network which stabilizes several hours afterwards. The same ranking in the kinetics of establishment of molecular interactions had been also observed by studying different X/GM systems all prepared in the same way (X/GM 50/50). However, no significant impact of the different microstructures of the two types of GM (LBGs and GGs) used for this study was noticed by comparing the kinetics of organization of hydrophobic micro-domains and H-bonds in X/LBG1, X/LBG2, X/GG1 and X/GG2.

Acknowledgements

The authors acknowledge the European Union and the Haute Normandie region for financial supports to this project and the Region Normandie for research grant.

References

- Alizadeh-Pasdar, N., & Li-Chan, E. C. Y. (2000). Comparison of Protein Surface Hydrophobicity Measured at Various pH Values Using Three Different Fluorescent Probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(2), 328-334. <https://doi.org/10.1021/jf990393p>
- Auzély-Velty, R. (2011). Self-assembling polysaccharide systems based on cyclodextrin complexation : Synthesis, properties and potential applications in the biomaterials field. *Comptes Rendus Chimie*, *14*(2-3), 167-177. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2010.04.019>
- Bilokin', M. D., Shvadchak, V. V., Yushchenko, D. A., Duportail, G., Mély, Y., & Pivovarenko, V. G. (2009). Dual-Fluorescence Probe of Environment Basicity (Hydrogen Bond Accepting Ability) Displaying no Sensitivity to Polarity. *Journal of Fluorescence*, *19*(3), 545-553. <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0443-x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bray, J. C., & Merrill, E. W. (1973). Poly(vinyl alcohol) hydrogels for synthetic articular cartilage material. *Journal of Biomedical Materials Research*, *7*(5), 431-443. <https://doi.org/10.1002/jbm.820070506>
- Bresolin, T. M. B., Sander, P. C., Reicher, F., Sierakowski, M. R., Rinaudo, M., & Ganter, J. L. M. S. (1997). Viscometric studies on xanthan and galactomannan systems. *Carbohydrate Polymers*, *33*(2-3), 131-138. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00051-9)
- Chandler, D. (2005). Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, *437*(7059), 640-647. <https://doi.org/10.1038/nature04162>
- Chandrasekaran, R., & Radha, A. (1997). Molecular modeling of xanthan: Galactomannan interactions. *Carbohydrate Polymers*, *32*(3-4), 201-208. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00007-6)
- Coleman, M., & Painter, P. (1995). Hydrogen bonded polymer blends. *Progress in Polymer Science*, *20*(1), 1-59. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(94\)00038-4](https://doi.org/10.1016/0079-6700(94)00038-4)
- Dahi, A., Abdellahi, B. M.-L., Deida, M. F., Hucher, N., Malhiac, C., & Renou, F. (2019). Chemical and physicochemical characterizations of the water-soluble fraction of the Commiphora Africana exudate. *Food Hydrocolloids*, *86*, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.032>
- Dea, I. C. M., Morris, E. R., Rees, D. A., Welsh, E. J., Barnes, H. A., & Price, J. (1977). Associations of like and unlike polysaccharides: Mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems. *Carbohydrate Research*, *57*, 249-272. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81935-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81935-7)
- Esquenet, C. (2003). *Propriétés structurales et dynamiques des solutions de polyélectrolytes rigides et semi-rigides et de polysaccharides associatifs* [Université Joseph-Fourier-Grenoble I]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00005468/>

- García-Estévez, I., Ramos-Pineda, A. M., & Escribano-Bailón, M. T. (2018). Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception. *Food & Function*, *9*(3), 1294-1309. <https://doi.org/10.1039/C7FO02030A>
- Goh, K. K. T., Matia-Merino, L., Hall, C. E., Moughan, P. J., & Singh, H. (2007). Complex Rheological Properties of a Water-Soluble Extract from the Fronds of the Black Tree Fern, *Cyathea medullaris*. *Biomacromolecules*, *8*(11), 3414-3421. <https://doi.org/10.1021/bm7005328>
- Grisel, M., Aguni, Y., Renou, F., & Malhiac, C. (2015). Impact of fine structure of galactomannans on their interactions with xanthan: Two co-existing mechanisms to explain the synergy. *Food Hydrocolloids*, *51*, 449-458. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.041>
- Hunger, J., Sonnleitner, T., Liu, L., Buchner, R., Bonn, M., & Bakker, H. J. (2012). Hydrogen-Bond Dynamics in a Protic Ionic Liquid: Evidence of Large-Angle Jumps. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, *3*(20), 3034-3038. <https://doi.org/10.1021/jz301334j>
- Lee, S., & Sigmund, W. M. (2002). AFM study of repulsive van der Waals forces between Teflon AF™ thin film and silica or alumina. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *204*(1-3), 43-50. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)01118-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01118-9)
- Lehn, J. (1995). *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives* (1^{re} éd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/3527607439>
- Liu, W., Lustig, W. P., & Li, J. (2019). Luminescent Inorganic-organic Hybrid Semiconductor Materials for Energy-Saving Lighting Applications. *EnergyChem*, 100008. <https://doi.org/10.1016/j.enchem.2019.100008>
- McCleary, B. B. (1979). Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume-seed d-galacto-d-mannans. *Carbohydrate Research*, *71*(1), 205-230. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)86071-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)86071-1)
- Morris, E. R. (1977). Molecular Origin of Xanthan Solution Properties. In P. A. Sandford & A. Laskin (Éds.), *Extracellular Microbial Polysaccharides* (Vol. 45, p. 81-89). AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. <https://doi.org/10.1021/bk-1977-0045.ch006>
- Nomura, R., Tabei, J., & Masuda, T. (2001). Biomimetic Stabilization of Helical Structure in a Synthetic Polymer by Means of Intramolecular Hydrogen Bonds. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(34), 8430-8431. <https://doi.org/10.1021/ja015688+>
- Passos, C. B., Kuhn, P. S., & Barbosa, M. C. (2014). DNA denaturation in the rodlike polyelectrolyte model. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, *413*, 481-488. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2014.06.059>
- Renou, F., Petibon, O., Malhiac, C., & Grisel, M. (2013). Effect of xanthan structure on its interaction with locust bean gum: Toward prediction of rheological properties. *Food Hydrocolloids*, *32*(2), 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.012>
- Shatwell, K. P., Sutherland, I. W., Ross-Murphy, S. B., & Dea, I. C. M. (1990a). Influence of the acetyl substituent on the interaction of xanthan with plant polysaccharides—I. Xanthan-locust bean gum systems. *Carbohydrate Polymers*, *14*(1), 29-51. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90005-D](https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90005-D)
- Shatwell, K. P., Sutherland, I. W., Ross-Murphy, S. B., & Dea, I. C. M. (1990b). Influence of the acetyl substituent on the interaction of xanthan with plant polysaccharides—II. Xanthan-guar gum systems. *Carbohydrate Polymers*, *14*(2), 115-130. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90025-N](https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90025-N)
- Takano, Y., Kusaka, A., & Nakamura, H. (2016). Density functional study of molecular interactions in secondary structures of proteins. *Biophysics and Physicobiology*, *13*(0), 27-35. https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_27
- Tapie, N., Malhiac, C., Hucher, N., & Grisel, M. (2008). Determination of galactose and mannose residues in natural galactomannans using a fast and efficient high-performance liquid chromatography/UV detection. *Journal of Chromatography A*, *1181*(1-2), 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.027>
- Weber, G., & Farris, F. J. (1979). Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry*, *18*(14), 3075-3078. <https://doi.org/10.1021/bi00581a025>
- Zhan, D. F., Ridout, M. J., Brownsey, G. J., & Morris, V. J. (1993). Xanthan-locust bean gum interactions and gelation. *Carbohydrate Polymers*, *21*(1), 53-58. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(93\)90117-M](https://doi.org/10.1016/0144-8617(93)90117-M)

Zhou, Y., Yi, T., Li, T., Zhou, Z., Li, F., Huang, W., & Huang, C. (2006). Morphology and Wettability Tunable Two-Dimensional Superstructure Assembled by Hydrogen Bonds and Hydrophobic Interactions. *Chemistry of Materials*, *18*(13), 2974-2981. <https://doi.org/10.1021/cm052805h>

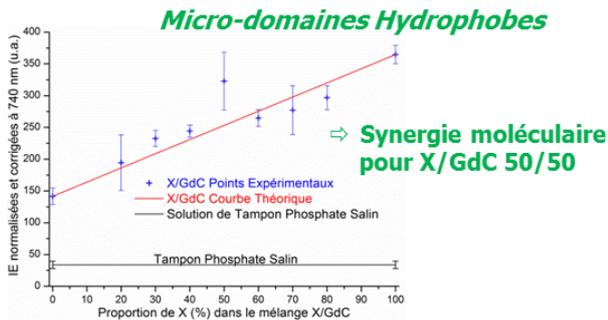
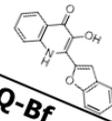
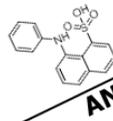
En résumé:

Dans cette Publication n°4, nous avons caractérisé pour la première fois la mise en place des interactions moléculaires dans les solutions et mélanges de xanthane et de galactomannane (X/GM). En effet, nous avons suivi l'évolution des interactions hydrophobes et celle de la mise en place du réseau de liaisons hydrogène au cours du temps juste après que les gommés aient été mélangés. Ces deux interactions spécifiques (hydrophobes et liaisons hydrogène) sont caractérisées grâce à la méthodologie mise en place et décrite dans la Publication n°3. Nous avons calculé le logarithme de IE_{ANS} et celui du ratio IE_{1N^*}/IE_{T^*} et nous les avons représentées chacune dans des graphiques bi-logarithmiques en fonction du temps. Suite à ce traitement des données, nous proposons une piste pour quantifier les cinétiques des interactions moléculaires aux temps courts (30 premières minutes) grâce aux pentes des droites de tendance modélisées. Les pentes nous renseignent en effet de manière relative sur les cinétiques d'évolution des interactions aux trente premières minutes. Nous avons observé que l'établissement des interactions hydrophobes est lent et progressif pour les compositions de mélange proches de la synergie moléculaire (X/GdC1 à 50/50; Publication n°3) que pour celles étant plus éloignées de cette synergie. Au contraire, à ce même ratio synergétique de 50/50, la cinétique d'organisation du réseau de liaisons hydrogène est maximale. Paradoxalement, à plus long terme ($t > 48h$), les interactions hydrophobes se stabilisent ($t_0 + \sim 3-4h$) contrairement au réseau de liaisons hydrogène qui se stabilise après une durée au moins supérieure à 24h. Cela suggère fortement que la création des interactions hydrophobes (qui sont en réalité des microdomaines hydrophobes), conséquence de regroupement des sections hydrophobes présentes sur les deux polysaccharides, prévaut devant la mise en place du réseau de liaisons hydrogène sauf dans le cas de X/LBG1 50/50. Ceci nous suggère donc l'existence d'une potentielle hiérarchisation à l'échelle moléculaire de la mise en place des interactions. Lors des 30 premières minutes de la structuration des gels X/GM, aucune différence significative n'a été détectée concernant les cinétiques d'interaction moléculaire étudiées entre les systèmes X/GdC X/GG. Par contre, lors de cette même période temporelle, il est toujours observé des cinétiques plus rapides pour le réseau de liaisons H que pour les interactions hydrophobes et ceux quel que soit le système X/GM 50/50 étudié.

Conclusion du Chapitre IV

Interactions Moléculaires des les Systèmes X/GM Etat d'équilibre

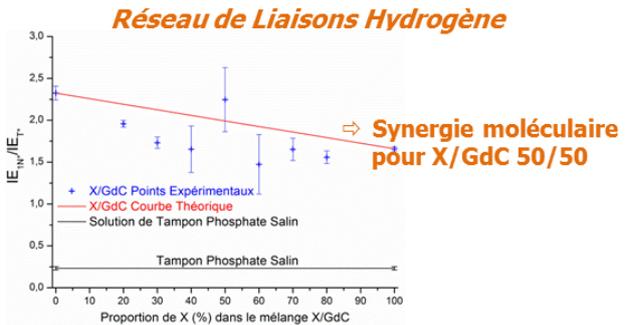
Caractérisation par Spectroscopie de Fluorescence



⇒ Plus nombreux dans X/GdC que dans X/GG

Interactions Dipôle-Dipôle

⇒ Présentent **mais** \emptyset d'intervention



⇒ Plus dense dans X/GdC que dans X/GG

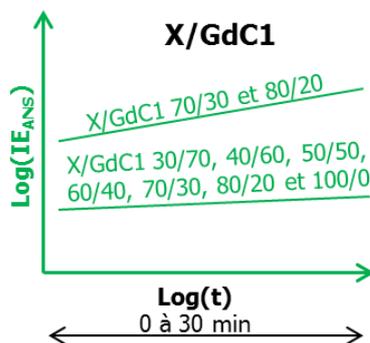
Structuration des Interactions Moléculaires dans les Systèmes X/GM Etat hors équilibre

Etude Cinétique sur les 30 premières minutes

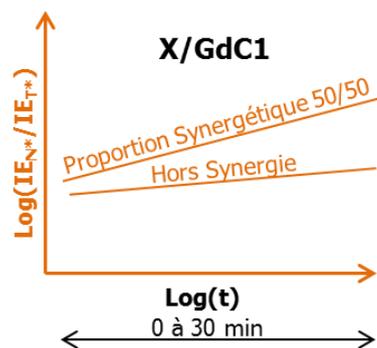
⇒ Stabilisation: ~4-5h

←Hiérarchisation→

⇒ Stabilisation > ~20h



⇒ \emptyset de différence de cinétique entre les systèmes X/GM



⇒ \emptyset de différence de cinétique entre les systèmes X/GM

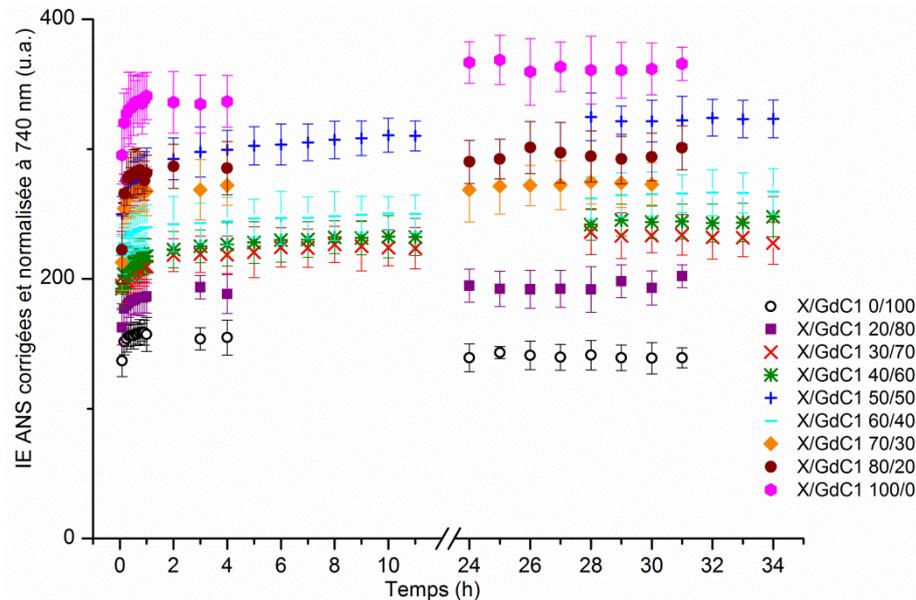
Cinétiques plus rapides pour les liaisons H que pour les microdomaines hydrophobes

Références bibliographiques

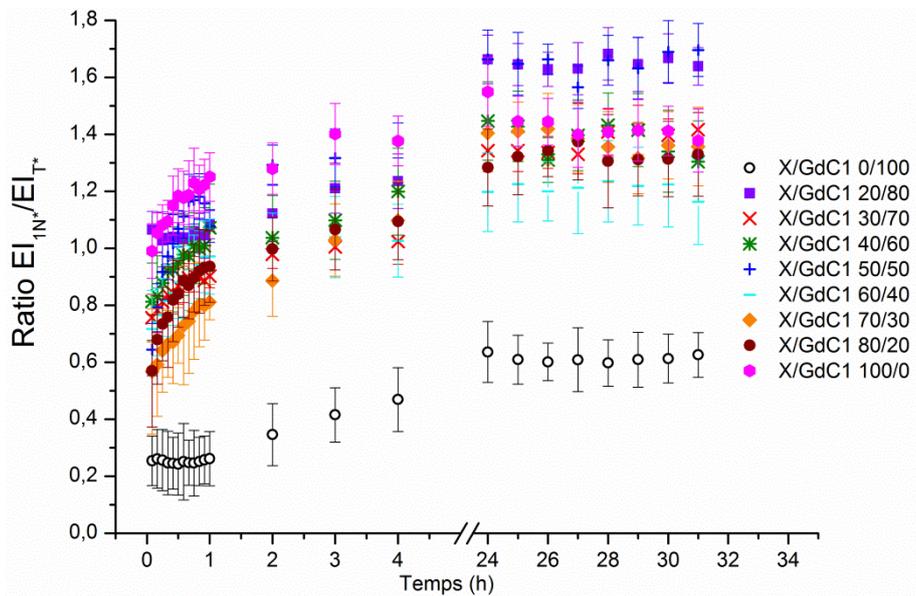
- [1] G. Weber, L. B. Young, *The Journal of Biological Chemistry* **1964**, *39*.
- [2] L. Stryer, *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13*, 482–495.
- [3] R. B. Freedman, G. K. Radda, *FEBS Letters* **1969**, *3*, 150–152.
- [4] D. H. Haynes, H. Staerk, *J. Membrin Biol.* **1974**, *17*, 313–340.
- [5] C. A. Haskard, E. C. Y. Li-Chan, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2671–2677.
- [6] M. Cardamone, N. K. Puri, *Biochem. J.* **1992**, *282*, 589–593.
- [7] N. Gains, A. P. Dawson, *Biochemical Journal* **1975**, *148*, 157–160.
- [8] N. Gains, A. P. Dawson, *J. Membrin Biol.* **1975**, *24*, 237–248.
- [9] D. H. Haynes, *J. Membrin Biol.* **1974**, *17*, 341–366.
- [10] A. Azzi, S. Fleischer, B. Chance, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1969**, *36*, 322–327.
- [11] J. Slavík, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1982**, *694*, 1–25.
- [12] M. D. Bilokin', V. V. Shvadchak, D. A. Yushchenko, G. Duportail, Y. Mély, V. G. Pivovarenko, *Journal of Fluorescence* **2009**, *19*, 545–553.
- [13] M. H. Abraham, *Journal of Physical Organic Chemistry* **1993**, *6*, 660–684.
- [14] D. A. Yushchenko, V. V. Shvadchak, A. S. Klymchenko, G. Duportail, V. G. Pivovarenko, Y. Mély, *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 10435–10438.
- [15] M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, *Bioorganic Chemistry* **2005**, *33*, 415–425.
- [16] P. B. Fernandes, *Journal of Food Engineering* **1995**, *24*, 269–283.
- [17] C. Schorsch, C. Garnier, J.-L. Dublier, *Carbohydrate Polymers* **1997**, *34*, 165–175.
- [18] Y. Aguni, Contribution à la compréhension des mécanismes d'interaction xanthane/galactimannane, Université Le Havre, **2009**.
- [19] V. B. Pai, S. A. Khan, *Carbohydrate Polymers* **2002**, *49*, 207–216.
- [20] S. R. Monteiro, C. Tavares, D. V. Evtuguin, N. Moreno, J. A. Lopes da Silva, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3291–3299.
- [21] X. Huang, C. S. Brazel, *Journal of Controlled Release* **2001**, *73*, 121–136.
- [22] J. Zeng, L. Yang, Q. Liang, X. Zhang, H. Guan, X. Xu, X. Chen, X. Jing, *Journal of Controlled Release* **2005**, *105*, 43–51.

Annexes : Evolution des interactions moléculaires au sein du système X/GdC1

Annexe 1 : Evolution des micro-domaines hydrophobes dans X/GdC1 (sonde ANS)



Annexe 1 : Evolution du réseau de liaisons H dans X/GdC1 (sonde 3HQ-Bf)



Chapitre V : Discussion Générale

Ce projet est né dans le but d'enrichir la littérature et de proposer à la communauté scientifique une méthode permettant de caractériser les interactions intermoléculaires entre polymères solubilisés dans des milieux aqueux et ce à l'échelle microscopique. Cette possibilité de caractériser de tels systèmes à ces échelles, tout en ayant la possibilité d'en caractériser les propriétés à l'échelle macroscopique, peut nous permettre de proposer des mécanismes moléculaires à la source des propriétés fonctionnelles observées pour les solutions aqueuses de polysaccharides. Par exemple, les mélanges Xanthane/Galactomannane (X/GM) ont été choisis car ce sont des systèmes polymères ayant la particularité de présenter une synergie d'interaction. Ce système fut le support de notre étude menée à l'échelle moléculaire.

Lors de ce projet, il a été question d'apporter des solutions et des réponses aux deux principales problématiques posées ci-dessus. Afin de répondre aux questions soulevées, nous avons analysé nos systèmes (mélanges de xanthane et de galactomannane à différents ratios de composition) simultanément aux deux échelles d'observation à savoir macroscopique et microscopique en utilisant comme outil d'analyse la rhéologie et la spectroscopie de fluorescence. Cette approche multi-échelle fut également utilisée par Di Lorenzo et ses coéquipiers^[1] pour déterminer les modules d'Young d'hydrogels constitué d'un copolymère de p(N-isopropylacrylamide-co-diméthylmalméimide) à l'échelle microscopique par AFM et à l'échelle macroscopique en utilisant la rhéologie. Suites aux différents résultats obtenus et présentés principalement dans les Chapitres III et IV, il est discuté dans ce chapitre l'existence ou non d'un lien de corrélation entre les phénomènes observés aux deux échelles.

Echelle macroscopique et échelle microscopique

Etat hors équilibre du système de référence X/GdC1

Nous avons mis en évidence dans la **Publication n°2** que notre système de référence X/GdC1 voyait ses propriétés viscoélastiques, tout particulièrement le module élastique G' , évoluer suite à notre protocole de préparation des solutions et des mélanges X/GM qui nécessite de fortement cisailer ces derniers. Il en va de même pour les autres mélanges étudiés (X/GdC2, X/GG1 et X/GG2) auxquels ont été appliquées les mêmes conditions de préparation. En effet, une phase d'évolution globale du système X/GM se produit à l'échelle macroscopique et cette évolution des propriétés viscoélastiques se manifestent significativement dans la première heure qui a lieu après la phase de mélange des gommés. Nous avons également observé une évolution du nombre de microdomaines hydrophobes et du réseau de liaisons hydrogène au cours du temps (**Publication n°3**).

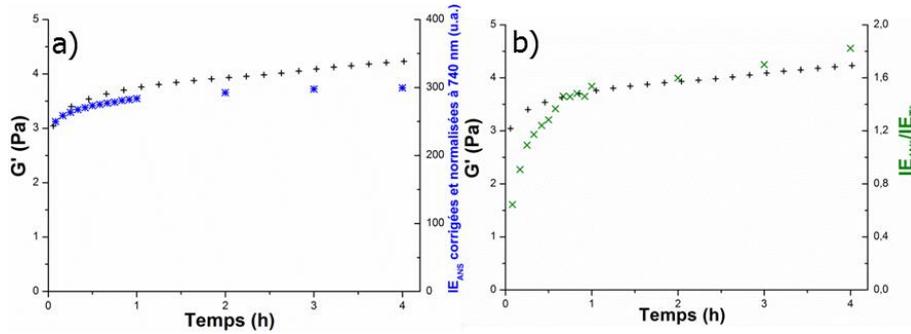


Figure V.66 : Exemples de structurations à l'échelle globale (G' ; +) et locale a) microdomaines hydrophobes (*) b) réseau de liaisons hydrogène (x) pour le mélange X/GdC1 50/50

Sur les **Figure V.66a** et **Figure V.66b**, nous pouvons voir un exemple d'établissement des propriétés viscoélastiques, des interactions hydrophobes et du réseau de liaisons hydrogène pour le mélange X/GdC1 50/50. Il est clair que les traitements appliqués aux solutions et aux mélanges de polymères ont des impacts directement à l'échelle microscopique et modulent la mise en place des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène dans notre cas ici présenté.

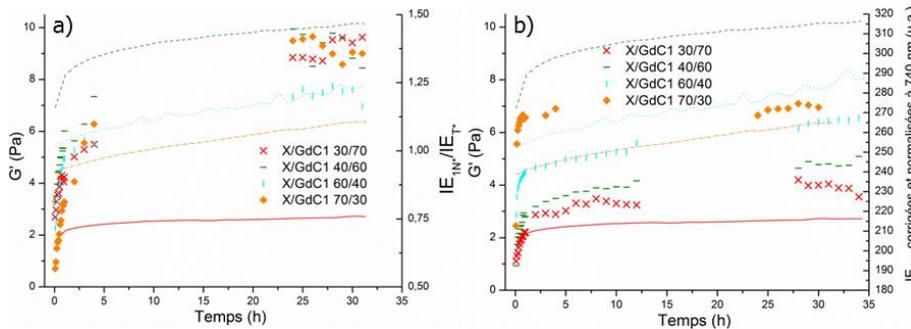


Figure V.67 : Exemples de structurations à l'échelle globale (G') et locale a) microdomaines hydrophobes b) réseau de liaisons hydrogène pour le mélange X/GdC1 30/70 (-; x), 40/60 (-;-; -), 60/40 (-.; |) et 70/30 (-.; ♦)

La **Figure V.66a** et la **Figure V.66b** montrent les évolutions des propriétés viscoélastiques (module de stockage G') du système X/GdC1 ainsi que celles des interactions hydrophobes et du réseau de liaisons hydrogène pour la composition X/GdC1 50/50. La **Figure V.67a** et la **Figure V.67b** en montrent autant pour les compositions X/GdC1 suivantes : 30/70, 40/60, 60/40 et 70/30. Comme dans le cas du mélange X/GdC1 50/50, il est retrouvé les mêmes schémas d'évolution aux niveaux microscopique et macroscopique. En effet, Il est observé de très fortes évolutions lors des premières minutes puis succèdent des évolutions plus douces tendant vers des valeurs asymptotiques jusqu'à stabilisation au bout d'un jour maximum pour les interactions moléculaires toutes confondues et plus de 48 heures pour le système X/GdC1. Cela nous permet d'affirmer que, et même dans le cas où les solutions auraient subi de moindre cisaillement lors de leur préparation, les propriétés au repos ne devraient être mesurées qu'après un temps suffisamment long. Une partie des résultats

contradictoires de la littérature sur les mécanismes d'interaction entre Xanthane et Galactomannanes pourraient donc provenir de mesures réalisées trop tôt après la préparation des mélanges.

Organisation hiérarchisée du système X/GdC1: microdoamaines hydrophobes versus réseau de liaisons hydrogène

Le système X/GdC1 qui est le mélange de référence au cœur de ce projet fut analysé à deux niveaux d'observation se trouvant aux antipodes sur l'échelle des grandeurs. Lorsque la mise en commun des gommés est effectuée, la construction d'un hydrogel s'effectue en plusieurs étapes qui ne se déroulent pas de manière simultanée. A long terme, l'hydrogel X/GdC1 se forme au bout d'une trentaine d'heures en moyenne alors que les interactions hydrophobes s'établissent en 3-4h et le réseau de liaisons hydrogène requiert une période d'au moins 24h pour se stabiliser. En d'autres termes, les micro-domaines hydrophobes inter/intra chaîne se forment en priorité et aux niveaux des zones lisses de GdC1 impliquant sûrement des contraintes conformationnelle aux deux types de chaînes présentes (X et GdC1), ce qui doit impliquer par la même occasion des mouvements de sections de chaîne appartenant aux deux gommés. Les liaisons hydrogène n'étant pas des liaisons covalentes sont bien connues pour avoir la capacité de se rompre et de se reformer facilement. . Une fois les chaînes « organisées », le réseau de liaison hydrogène, présent depuis le début, peut se stabiliser à condition que le système ne soit pas une nouvelle fois perturbé mécaniquement.

En termes de cinétique d'organisation, le comportement observé à l'échelle macroscopique ne reflète pas systématiquement celui observé à l'échelle microscopique. Dans la **Publication n°3**, nous avons montré que la cinétique de structuration sur les 30 premières minutes du système de référence X/GdC1 évolue plus rapidement pour les proportions synergétiques. Or à l'échelle moléculaire, nous observons (**Publication n°4**) le comportement inverse concernant la formation des microdomaines hydrophobes qui est lente et progressive aux proportions synergétiques; mélanges X/GdC1 de 30/70 à 60/40. En revanche le réseau de liaison hydrogène s'établit le plus rapidement à la synergie moléculaire qui lui ait associée, c'est-à-dire X/GdC1 50/50. Le fait que le système soit en constante évolution et par conséquent, très peu stable, peut induire ces différents comportements cinétiques perçus aux différentes échelles d'observation. Pour résumer, il y a un comportement cinétique similaire pour la cinétique de structuration du mélange X/GdC1 (aux proportions synergétiques) et celle du réseau de liaisons H à la synergie moléculaire mais un comportement cinétique inverse pour la formation des microdomaines hydrophobes. Il peut être formulé l'hypothèse suivante : aux temps courts, la structuration globale du système X/GdC1 serait davantage gouvernée par les interactions dites directionnelles type liaisons H qui se rompent et se créent facilement que par le regroupement de sections moléculaires hydrophobes nécessitant un arrangement spatial contraignant, mais plus omnidirectionnel.

A la stabilisation du système X/GdC1

Une fois le système X/GdC1 stabilisé à l'échelle macroscopique (aucune évolution des propriétés viscoélastiques) et à l'échelle microscopique (plus d'évolution des signaux spectroscopiques acquis), nous avons une fois de plus analysé les interactions moléculaires. Comme déterminé dans la **Publication n°2** et comme il est généralement fait lors d'une étude concernant les mélanges X/GM, une synergie d'interaction pour le mélange de référence X/GdC1 à la composition 40/60 qui pour rappel, se situe plus statistiquement entre 40/60 et 50/50 comme recensé dans la vaste bibliographie sur ce sujet. A l'échelle moléculaire, nous avons également mise en évidence des synergies moléculaires pour la formation de microdomaines hydrophobes et les liaisons hydrogène (**Publication n°3** ; **Figure V.68a** et **Figure V.68b**).

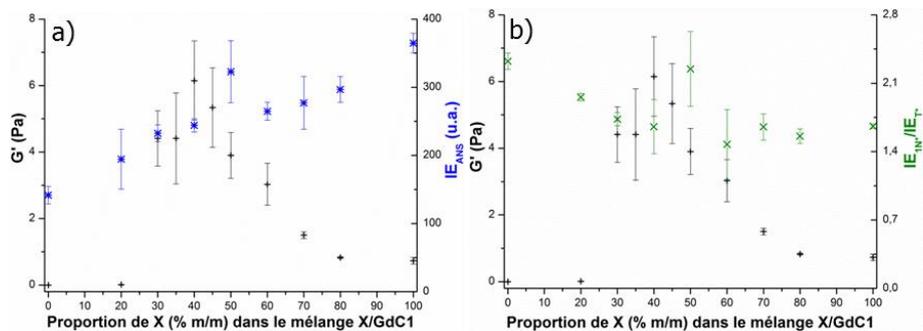


Figure V.68 : Propriétés viscoélastiques (G' ; +) a) interactions hydrophobes (*) et b) liaisons hydrogène (x) en fonction de la composition du mélange X/GdC1

Dans le cas des interactions hydrophobes et du réseau de liaisons hydrogène, nous pouvons observer des synergies moléculaires. Ces deux synergies moléculaires ont lieu pour la même composition du mélange X/GdC1 à 50/50. S'il y a bien des synergies aux deux échelles d'observation à savoir macroscopique et microscopique, celles-ci ont lieu pour des compositions différentes dans le cas du mélange X/GdC1. Cela nous laisse penser qu'il doit être tenu compte d'autres énergies moléculaires d'interaction, que nous n'avons pas caractérisé dans cette étude.

Volume du réseau de micro-domaines hydrophobes ?

Une question qu'il serait légitime de se poser est la taille des micro-domaines hydrophobes formés dans les gommés seules et dans les mélanges X/GM. Il n'est pas possible à l'heure actuelle de déterminer précisément ce volume avec la spectroscopie de fluorescence. Néanmoins, la sonde ANS étant une vraie sonde de fluorescence d'hydrophobie, son intensité d'émission de fluorescence est directement conditionnée par la présence de molécules d'eau. Son intensité d'émission est donc maximale lorsque l'ANS se situe au sein d'un de ces micro-domaines hydrophobes. Il est donc possible d'estimer approximativement le volume minimal occupé par une molécule d'ANS (V_{ANS}) dans un micro-domaine hydrophobe et par conséquent d'en déduire le volume minimal d'un tel micro-domaine ($V_{Hydrophobe}$) ce qui amène à écrire $V_{ans} \approx V_{Hydrophobe} \cdot V_{Hydrophobe}$ peut être évalué en émettant une première hypothèse qui est la suivante; toutes les molécules d'ANS injectées dans la solution ou

mélange de polysaccharides sont contenues dans les micro-domaines hydrophobes et participent donc toutes à leur caractérisation.

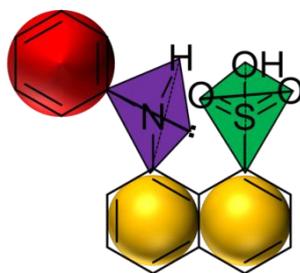


Figure V.69: Schéma du volume de la sonde ANS

Les travaux de Cox^[4] ont permis de calculer grâce des simulations numériques la longueur de liaison carbone-carbone (L_{C-C}) dans un noyau benzénique et L_{C-C} est égale à 137,8 pm. La longueur de la liaison soufre-oxygène (L_{S-O}) peut être estimée à 146,8 pm grâce aux travaux de Steudel et Steudel^[5] utilisant également des simulations numériques sur les ions sulfonates à différents degrés d'hydratation. En effectuant une synthèse des travaux de Higuchi^[6], de Petke et Whitten^[7], d'Allen et coéquipiers^[8] et de Creswell et Robiette^[9], les longueurs de liaison azote-carbone (L_{N-C}) et azote-hydrogène (L_{N-H}) sont respectivement égales à 129,4 pm et 100,6 pm. En partant de sa structure chimique initiale, l'ANS a été ramenée à une somme de formes géométriques simples et rigides (**Figure V.69**). Ainsi, le noyau benzénique peut être ramené à une sphère de rayon $r_{\text{Benzène}}$ de 137.8 pm ($V_{\text{Benzène}}$; rotation libre autour de l'axe de la liaison carbone-azote), le noyau naphthalène quant à lui est ramené à deux sphères de rayon $r_{\text{Naphthalène}}$ égale à 60 pm ($V_{\text{Naphthalène}}$; pas de rotation libre). Le groupement sulfonique peut être lui considéré comme un tétraèdre parfait (en incluant l'atome de carbone de rattachement) dont l'atome de soufre en est le centre et possédant un angle dièdre de $109,471^\circ$ ($V_{\text{TétraèdreS}}$; rotation libre autour de l'axe de la liaison carbone-soufre). L'atome d'azote peut être considéré comme au centre d'un tétraèdre irrégulier dont les quatre sommets sont deux atomes de carbone, un atome d'hydrogène et le doublet non-liant de l'azote et possédant un angle dièdre de $107,7^\circ$ ($V_{\text{TétraèdreN}}$). Le volume minimal d'un micro-domaine hydrophobe $V_{\text{HydrophobeMin}}$ peut être estimé par la formule suivante :

$$V_{\text{Hydrophobe}} \approx V_{\text{Benzène}} + V_{\text{Naphthalène}} + V_{\text{TétraèdreS}} + V_{\text{TétraèdreN}} \quad \text{Equation V.35}$$

En tenant compte de l'hypothèse qui a été formulée dans le paragraphe précédent explicitant la non interpénétration des nuages électroniques, il a été finalement calculé un $V_{\text{Hydrophobe}}$ dont la valeur est égale à $14,2 \mu\text{m}^3$ dans un volume de solution/mélange de polysaccharide de 3 mL environ. A noter que le volume calculé est une valeur maximale ; en effet, d'un point de vu statistique, des molécules d'ANS peuvent se retrouver dans le milieu aqueux hors du réseau formé par le(s) polysaccharide(s) et donc ne pas participer à la caractérisation des interactions hydrophobes. En rappelant ce point, il peut être conclu que la valeur de $V_{\text{Hydrophobe}}$ est donc surestimée et que le volume du réseau de micro-

domaines hydrophobes est probablement compris entre le micromètre cube et la dizaine de micromètres cube. Avec cette information et des analyses en titration calorimétrique isotherme (ITC) complémentaires, il serait alors possible d'estimer le coût énergétique de la création de microdomaines hydrophobes en termes d'énergie volumique.

Existe-t-il un lien fort entre les échelles microscopique et macroscopique ?

Au vu des éléments exposés ci-dessus, il serait logique de répondre non à la question soulevée. Toutefois, cette réponse doit être nuancée. Même si il est observé à ces deux échelles des synergies moléculaires au niveau microscopique et une synergie d'interaction entre les deux gommés au niveau macroscopique, celles-ci n'interviennent pas pour la même composition du mélange X/GdC1 comme il a été mentionné dans le paragraphe précédent. Ce décalage soulève un débat sur l'existence d'un lien « physique » direct entre les deux échelles d'observation. Aux deux stades différents : phase de structuration et état d'équilibre. Effectivement, pendant la phase de structuration, les phénomènes d'évolution aux deux échelles (mise en place du réseau de liaisons H et structuration du système X/GdC1) vont dans le même sens tandis qu'une fois la stabilisation atteinte (état d'équilibre), il est observé un décalage entre ces mêmes échelles d'observation concernant les synergies. Ce décalage est d'autant plus renforcé que les microdomaines hydrophobes et le réseau de liaisons hydrogène montrent des synergies moléculaires bien définies et à la même composition de mélange à savoir X/GdC1 50/50 alors que la synergie d'interaction a lieu elle pour la composition légèrement différente X/GdC1 40/60. Aussi faible soit-il, ce décalage des compositions auxquelles sont associés des synergies (macroscopique et moléculaire) reste non-négligeable. Mais qu'est-ce qui pourrait expliquer cet écart ? En regardant les **Figure V.68a** et **Figure V.68b**, il peut être observé au vu des écarts types que les mesures sont réalisables mais loin d'être triviales. En effet, afin d'être dans la mesure de faire les analyses aux échelles moléculaire et macroscopique, il a fallu imposer des limites et des contraintes : travailler à faible concentration en polymère (0,2 % m/m) pour limiter les effets de la viscosité du milieu, travailler en faible concentration de sonde pour s'assurer de pouvoir dissocier les interactions moléculaires des propriétés fonctionnelles globales (et donc se situer proche de la limite de détection du spectrophotomètre de fluorescence), échantillons légèrement perturbés avant analyse aux temps longs (Fraction B), etc. Toutes ces contraintes pourraient en théorie être responsables de la non coïncidence exacte des synergies macroscopique et moléculaire. Une autre piste d'explication évoquée précédemment serait la différence des durées de stabilisation des interactions moléculaires et celle du système dans sa globalité. Il y a un différentiel de temps équivalent à pratiquement 24 heures. Une fois que les interactions moléculaires analysées se sont stabilisées, que se passe-t-il ensuite ? Si les propriétés viscoélastiques continuent d'évoluer pendant plus de 24 heures c'est qu'il a bien un ou des phénomènes qui s'y déroulent. Mais le(s)quel(s) ? Le réseau de micro-domaines hydrophobes et le réseau de liaisons hydrogène ayant atteint un état d'équilibre suggèrent fortement une pseudo-immobilisation des chaînes des deux polysaccharides directement impliquées dans la formation de ces deux réseaux. Ceci exclue donc l'hypothèse d'une mobilité de ces dernières après la formation de ces deux réseaux. Il ne faut pas oublier le fait que malgré leurs faibles concentrations, X

et GdC1 forment un hydrogel ténu (gel faible) comme il a pu être montré dans le **Chapitre III**. Le terme hydrogel implique par définition la présence de molécules d'eau solvatant les polymères. Ces molécules d'eau, dans le cadre de ce travail représentent ~99% m/m de la masse totale des échantillons préparés. Grâce à des études de simulations numériques et à des analyses thermiques différentielles (ATD ou DSC en anglais), Tamai et coéquipiers^[10] et Müller-Plathe^[11] sont arrivés à la même conclusion : la mobilité des molécules d'eau dans un hydrogel est beaucoup plus importante lorsque celles-ci sont entourées d'autres molécules d'eau comparé au cas où elles sont à proximité d'un polymère. Leurs travaux pourraient être une piste d'explication concernant l'évolution des propriétés viscoélastiques du système X/GdC1 après stabilisation des interactions moléculaires. Dans le cadre de ce travail, seule des études de simulation numérique des macromolécules en solution restent envisageables pour l'instant pour étudier cette théorie car elles possèdent l'avantage de se contenter d'échantillon virtuel nécessitant aucune étape de préparation particulière. Reste un gros travail de programmation pour bien modéliser les solutions et mélanges de polysaccharides afin que les échantillons soient les plus fidèles et représentatifs de la réalité. Comme le réseau de liaisons H se stabilise avant la stabilisation globale du système à l'échelle macroscopique, ceci révèle que la sonde 3HQ-Bf utilisée dans notre méthodologie de caractérisation des interactions détecte bien les liaisons H ayant lieu uniquement entre polymère. En effet, avec une sonde de fluorescence en libre diffusion, la part de sonde restée dans le milieu aqueux et statistiquement sans contact avec les polymères ne présentera pas de variation de propriétés spectroscopiques. Il n'est pas possible d'analyser le mouvement des molécules d'eau avec l'outil de caractérisation mis en place dans le cadre de ce travail, et les méthodes de mesure de la dynamique des molécules d'eau en faibles interactions risquent d'être peu sensibles ici, devant la forte proportion d'eau libre.

Mécanismes d'interaction des systèmes X/GM

Dans le **Chapitre I**, il a été exposé les principaux modèles des mécanismes d'interaction ayant lieu entre X et les GM. L'idée principale qui ressort de tous les modèles exposés est que X et GM interagissent plus fortement à l'échelle macroscopique, quel que soit la conformation de X, lorsque GM expose des zones dépourvues de résidus galactose comme dans le cas des GdC. Il peut être fait l'analogie avec les mélanges xanthane/gomme de konjac (GdK ou glucomannane de konjac). X et GdK interagissent fortement lorsqu'ils sont en solution aqueuse^[12-15] ce qui se traduit notamment par une forte gélification du système comme dans le cas des mélanges X/GdC. GdK est un copolymère aléatoire naturel dont les chaînes se trouvent être la succession d'unités de mannose (1,4- β -D-mannopyranose) et d'unités de glucose (1,4- β -D-glucopyranose) dont le ratio molaire est de 1,6 :1; les unités de mannose peuvent être partiellement substituées en C3 par une autre unité de mannose ou une unité de glucose^[16]. GdK expose également des zones lisses dépourvues de résidus mannose ou glucose au même titre que les GdC ce qui explique la similarité dans leur interaction avec X en solution aqueuse.

En effectuant des analyses comparatives des interactions moléculaires entre les mélanges X/GdC et X/GG, il a été conclu par déduction que ces zones lisses étaient le siège des interactions moléculaires qui sont généralement plus intenses dans les systèmes X/GdC ; la seule différence de structure entre les deux types de gomme étant principalement le degré de substitution en galactose. Ainsi, une hypothèse formulée à l'échelle macroscopique par plusieurs auteurs dans la littérature^[17-19] qui stipule que plus un GM possède de zones lisses meilleure est l'interaction avec X, a pu être confirmée grâce à une investigation réalisée à l'échelle microscopique. Pendant ces travaux de thèse, seule l'influence de la microstructure des GM a été étudiée au niveau moléculaire et pas l'influence de la conformation de X. En effet, X a été étudié tout au long de ce projet dans sa forme dite dénaturée^[20] (ordonnée II) qui se traduit par une hélice semi-rigide. De même dans le **Chapitre I**, il a été exposé le fait que X et GdC interagissaient beaucoup plus fortement, interaction se traduisant par une très forte gélification du système X/GdC, lorsque que X est sous sa forme désordonnée qui équivaut à une chaîne semi-flexible ($X_{\text{désordonné}}$). Lors de ces travaux de thèse, il a été montré que la nature du GM considéré modulait l'intensité des interactions moléculaires lorsque celui-ci est mélangé avec un X sous forme renaturée. Par conséquent, il n'est pas illogique de penser que les phénomènes interactionnels moléculaires, principalement, la formation de microdomaines hydrophobes et les liaisons hydrogène, soient plus intenses et nombreuses dans les mélanges $X_{\text{désordonné}}$ /GdC. Cette affirmation peut être typiquement prouvée en appliquant la stratégie d'analyse à l'échelle moléculaire des interactions basée sur la spectroscopie de fluorescence et mise en place dans le cadre de cette thèse.

Cas particulier de la gomme de caroube 2 (GdC2)

Des mélanges X/GdC 50/50 (X/GdC1 et X/GdC2) et X/GG 50/50 (X/GG1 et X/GG2) ont été préparés tous au même ratio de 50/50 afin de détecter s'il y avait un impact ou non de la microstructure. Dans le **Chapitre III** il a été montré et confirmé qu'à l'échelle macroscopique, les mélanges X/GdC 50/50 (X/GdC1 et X/GdC2) possèdent de meilleures propriétés viscoélastiques que les mélanges X/GG 50/50 (X/GG1 et X/GG2) ce qui est classiquement le cas de ce qui est décrit dans la littérature^[17,19,21-23]. Dans le **Chapitre IV**, il a été montré que le mélange X/GdC150/50 possédait des propriétés à l'échelle moléculaires supérieures par rapport aux mélanges X/GG 50/50 (X/GG1 et X/GG2). En effet, X/GdC150/50 montre sans ambiguïté des interactions hydrophobes plus intenses et possède un réseau de liaison hydrogène plus dense. En se focalisant uniquement sur ces résultats, il serait légitime de penser que la supériorité en terme de propriétés des mélanges X/GdC soit vraie autant à l'échelle macroscopique qu'à l'échelle microscopique. Mais un échantillon de GdC, la GdC2, remet en cause cette conclusion peut paraître hâtive. En effet, bien que le mélange X/GdC2 50/50 expose des propriétés viscoélastiques une vingtaine de fois supérieures (valeur de G' du même ordre de grandeur que celui de X/GdC150/50) à celles des deux mélanges X/GG 50/50 (X/GG1 et X/GG2), le mélange X/GdC2 50/50 montre des propriétés à l'échelle moléculaire similaires aux mélanges X/GG 50/50. Après stabilisation à l'échelle microscopique, les mélanges X/GdC2 et X/GG1 ont des interactions hydrophobes de même intensité ; EI_{ANS} est respectivement égale à 277 ± 39 unités arbitraires (u.a.) et 280 ± 26 u.a. De plus, le réseau de liaison H est plus organisé dans le cas des mélanges X/GG 50/50

(X/GG1 et X/GG2) que dans le cas du mélange X/GG2 50/50 lorsqu'il est comparé les valeurs des ratios $\frac{EI_{1N^*}}{EI_{T^*}}$ qui sont respectivement égales à $0,79 \pm 0,06$, $0,67 \pm 0,07$ et $0,55 \pm 0,03$. Le mélange

X/GdC1 50/50 possède également un réseau de liaison H plus organisé ($\frac{EI_{1N^*}}{EI_{T^*}} = 2,25 \pm 0,38$) que

pour le mélange X/GdC2 50/50. Au vu de tous ces éléments, Il peut être conclu que GdC2 interagit mieux avec X à l'échelle macroscopique qu'à l'échelle microscopique. Pour rappel, GdC2 possède le ratio M/G le plus élevé ($M/G_{GdC2} = 3$) ce qui en théorie signifie qu'elle possède moins de résidus galactose, par conséquent moins de groupement hydroxyles disponibles que les autres échantillons de galactomannanes ; ceci pourrait expliquer en partie pourquoi il est observé un réseau de liaisons H moins organisé pour le mélange X/GdC2 50/50. Néanmoins, ce paramètre seul ne peut pas expliquer un tel comportement pour GdC2. GdC2 possède également un degré de block^[24] (DB) de 74%, plus faible que celui de GdC1 (95%) ce qui signifie qu'en théorie GdC2 possède moins de zones lisses que GdC1. A ce stade, il peut être conclu que le nombre de zones lisses n'est pas un paramètre déterminant pour expliquer le comportement des GM avec X par rapport aux interactions moléculaires (microdomaines hydrophobes et liaisons H). Un point qui n'a pas encore été abordé est que le mélange X/GdC1 possède des synergies à l'échelle moléculaire pour la composition 50/50 dans le cas de la formation des microdomaines hydrophobes et les liaisons H. Les mélanges X/GdC2, X/GG1 et X/GG2 pourraient aussi posséder des synergies moléculaires mais pas forcément au ratio 50/50. X/GdC2 pourrait exprimer un optimum de synergie moléculaire aux ratios 40/60, 60/40 ou encore 45/55, 55/45, etc. mais cela reste une possibilité, pas un fait. Il reste en dernier lieu à discuter de la conformation exacte des GM en solution aqueuse. En effet, il est postulé que les GM ont généralement des chaînes flexibles en solution aqueuse. D'après les travaux de Petkowicz et al.^[25] et de Wu et coéquipiers^[26] basés essentiellement sur la modélisation moléculaire, la longueur de persistance^[27] des GM diminue quand la valeur du ratio M/G diminue. Cela signifie que plus un GM est substitué et plus la chaîne est flexible et inversement, moins un GM est substitué en résidu galactose et plus la chaîne est rigide. Ces affirmations sont bien évidemment à ajuster avec la distribution des résidus galactose le long des chaînes de mannose (DB). Suite à tous ces éléments, une hypothèse peut être clairement formulée: GdC2 a une chaîne plutôt rigide en solution aqueuse, assez rigide pour développer de bonnes propriétés viscoélastiques à l'échelle macroscopique mais sûrement pas assez flexible pour développer autant d'interactions moléculaires dans le mélange X/GdC1 50/50. Afin de confirmer cette hypothèse, des analyses type diffraction de rayon X^[28] (DRX) pourraient éventuellement être réalisées afin de déterminer plus précisément la conformation en solution aqueuse de chaque échantillon de GM étudié dans le cadre de cette thèse.

Références bibliographiques

- [1] F. Di Lorenzo, J. Hellwig, R. von Klitzing, S. Seiffert, *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 698–703.
- [2] J.-M. Lehn, *Polym. Int.* **2002**, *51*, 825–839.
- [3] G. Armstrong, M. Buggy, *Journal of Materials Science* **2005**, *40*, 547–559.
- [4] E. G. Cox, *Rev. Mod. Phys.* **1958**, *30*, 159–162.
- [5] R. Steudel, Y. Steudel, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *2009*, 1393–1405.
- [6] J. Higuchi, *The Journal of Chemical Physics* **1956**, *24*, 535–545.
- [7] J. D. Petke, J. L. Whitten, *The Journal of Chemical Physics* **1973**, *59*, 4855–4866.
- [8] F. H. Allen, O. Kennard, D. G. Watson, L. Brammer, A. G. Orpen, R. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1987**, S1.
- [9] R. A. Creswell, A. G. Robiette, *Molecular Physics* **1978**, *36*, 869–876.
- [10] Y. Tamai, H. Tanaka, K. Nakanishi, *Macromolecules* **1996**, *29*, 6761–6769.
- [11] F. Müller-Plathe, *Macromolecules* **1998**, *31*, 6721–6723.
- [12] K. P. Shatwell, I. W. Sutherland, S. B. Ross-Murphy, I. C. M. Dea, *Carbohydrate Polymers* **1990**, *14*, 131–147.
- [13] P. A. Williams, D. H. Day, M. J. Langdon, G. O. Phillips, K. Nishinari, *Food Hydrocolloids* **1991**, *4*, 489–493.
- [14] M. Tako, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1992**, *56*, 1188–1192.
- [15] V. Davé, S. P. McCarthy, *J Environ Polym Degr* **1997**, *5*, 237.
- [16] M. Maeda, H. Shimahara, N. Sugiyama, *Agricultural and Biological Chemistry* **1980**, *44*, 245–252.
- [17] I. C. M. Dea, E. R. Morris, D. A. Rees, E. J. Welsh, H. A. Barnes, J. Price, *Carbohydrate Research* **1977**, *57*, 249–272.
- [18] E. R. Morris, in *Extracellular Microbial Polysaccharides* (Eds.: P.A. Sandford, A. Laskin), AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D. C., **1977**, pp. 81–89.
- [19] M. Grisel, Y. Aguni, F. Renou, C. Malhiac, *Food Hydrocolloids* **2015**, *51*, 449–458.
- [20] M. Milas, M. Rinaudo, *Carbohydrate Research* **1986**, *158*, 191–204.
- [21] E. R. Morris, D. A. Rees, G. Young, M. D. Walkinshaw, A. Darke, *Journal of Molecular Biology* **1977**, *110*, 1–16.
- [22] B. B. McCleary, *Carbohydrate Research* **1979**, *71*, 205–230.
- [23] F. Renou, O. Petibon, C. Malhiac, M. Grisel, *Food Hydrocolloids* **2013**, *32*, 331–340.
- [24] P. J. H. Daas, H. A. Schols, H. H. J. de Jongh, *Carbohydrate Research* **2000**, *329*, 609–619.
- [25] C. L. O. Petkowicz, F. Reicher, K. Mazeau, *Carbohydrate Polymers* **1998**, *37*, 25–39.
- [26] Y. Wu, W. Li, W. Cui, N. A. M. Eskin, H. D. Goff, *Food Hydrocolloids* **2012**, *26*, 359–364.
- [27] M. Barón, R. F. T. Stepto, *Pure and Applied Chemistry* **2002**, *74*, 493–509.
- [28] B. W. Mansel, T. M. Ryan, H.-L. Chen, L. Lundin, M. A. K. Williams, *Chemical Physics Letters* **2020**, *739*, 136951.
- [29] V. K. Srinivasan, *International Journal of Mathematical Education in Science and Technology* **2010**, *41*, 979–990.
- [30] E. C. Cho, *Applied Mathematics Letters* **1995**, *8*, 71–73.

Annexes : Index des formules utilisées pour la détermination de $V_{\text{Hydrophobe}}$

1. Détermination de la longueur d'un côté d'un triangle quelconque

Soit un triangle quelconque dont les côtés sont respectivement x , y et z et dont l'angle $\hat{C}AB$ est noté α (Figure V.70).

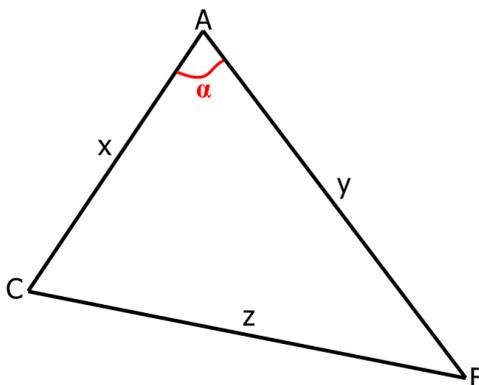


Figure V.70 : Triangle quelconque ABC

En connaissant les longueurs de deux côtés du triangle ABC (AC et AB) et l'angle formé par ces mêmes deux côtés (α), il est possible de calculer la longueur du troisième côté BC en appliquant la loi d'Al-Kashi connue également sous le nom loi des cosinus ou encore théorème de Pythagore généralisé tel que :

$$z^2 = x^2 + y^2 - 2xy \cos(\alpha) \quad \text{Equation V.36}$$

2. Volume d'un tétraèdre régulier :

Soit la longueur d'une arête d'un tétraèdre régulier égale à a ; le volume $V_{\text{TétraèdreRégulier}}$ est calculé en utilisant la formule suivante :

$$V_{\text{TétraèdreRégulier}} = \frac{\sqrt{2}}{12} a^3 \quad \text{Equation V.37}$$

3. Volume d'un tétraèdre quelconque :

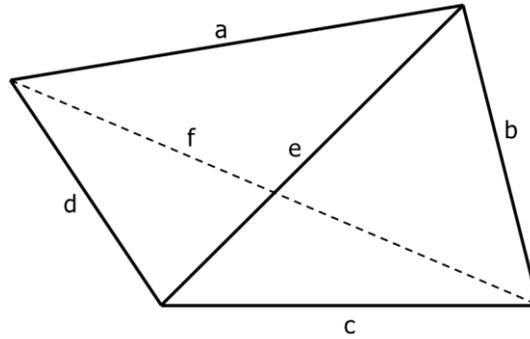


Figure V.71 : Tétrahédre irrégulier possédant 6 arêtes de longueur a, b, c, d, e et f

Soit un tétrahédre irrégulier ayant quatre faces constructibles dont les six arêtes ont respectivement les longueurs suivantes : a, b, c, d, e et f (**Figure V.71**). Le volume $V_{\text{Tétrahédre Irrégulier}}$ d'un tel tétrahédre peut être calculé en utilisant une variation de la formule de Héron d'Alexandrie^[157,158] probablement mis en place par Leonhard Euler tel que :

$$V_{\text{Tétrahédre irrégulier}} = \frac{1}{12} \sqrt{P - Q + R} \quad \text{Equation V.38}$$

Avec :

- $P = 4a^2 \cdot b^2 \cdot c^2$
- $Q = a^2 \cdot E^2 + b^2 \cdot F^2 + c^2 \cdot D^2$
- $R = D \cdot E \cdot F$
- $D = a^2 + b^2 - d^2$
- $E = b^2 + c^2 - e^2$
- $F = a^2 + c^2 - f^2$

Conclusion Générale et Perspectives

L'objectif premier de ces travaux de thèse était d'établir une méthode analytique pour analyser les interactions à l'échelle moléculaire sans engendrer de perturbations justement de ces interactions, si faibles soient-elles, et ce au sein même de solutions et mélanges aqueuse de polymères. Notre choix s'est porté sur la spectroscopie de fluorescence car cette technique respectait les critères suivants à savoir l'analyse à l'échelle moléculaire en milieu liquide, en particulier en solution aqueuse. *In fine*, la méthodologie mise en place pour déterminer les natures des interactions moléculaires au sein de systèmes polysaccharidiques en solution aqueuse diluée s'est montrée convaincante et cela à l'issue d'un travail préalable de mise au point très pointilleux.

La technique de **spectroscopie de fluorescence** est basée sur l'utilisation de **sondes moléculaires** spécifiques **sensibles** à leur **microenvironnement**. L'utilisation de sondes de fluorescence judicieusement sélectionnées permet donc la caractérisation des interactions spécifiques dans les trois dimensions de l'espace au sein de solutés, contrairement d'autres approches telles que la technique d'AFM qui ne permettent pas d'effectuer concrètement des analyses dans les trois dimensions qui caractérisent un volume. En outre, la grande majorité des méthodes couramment décrites dans la littérature pour appréhender les interactions à l'échelle moléculaire nécessitent une étape de préparation d'échantillon ^{et/ou} une mise en œuvre invasive qui sont susceptibles de perturber significativement les interactions elles-mêmes, ce qui limite considérablement leur intérêt.

Le côté innovant de la méthodologie développée dans le cadre de cette thèse est l'utilisation de **sondes moléculaires extrinsèques** et cela dans un **mélange aqueux de polymères**; notre travail se distingue notamment d'études basées sur la même technique de spectroscopie mais impliquant des sondes moléculaires intrinsèque, comme par exemple le greffage d'une sonde fluorescente sur un polymère ou encore en exploitant les propriétés de fluorescence du tryptophane si cet acide aminé est présent dans une protéine en mélange avec un ou des polymères. Une fois le choix de la technique d'analyse arrêté, nous avons dû sélectionner des sondes de fluorescence ayant des propriétés pour détecter et discriminer spécifiquement les interactions moléculaires qui se créent au sein de solutions et de mélanges de polymères lorsque ces derniers sont en solution aqueuse. A l'issue d'une étude bibliographique approfondie d'une part et également de nombreux tests préliminaires menés sur des sondes candidates, disponibles ou non sur le marché – certaines sondes ont dû être synthétisées, le cas échéant – deux sondes ont été retenues pour cette étude : l'acide 8-anilino-1-naphthalène sulfonique (ANS) et la 2-benzofuryl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (3HQ-Bf).

- L'**ANS** est une **vraie sonde d'hydrophobie** car son extinction de fluorescence est causée par la présence de molécules d'eau et peut détecter les **interactions dipôle-dipôle** conséquences des forces de van der Waals en analysant la longueur d'onde du maximum d'intensité d'émission ($\lambda_{E_{\text{max}}}$).
- Le réseau de liaisons hydrogène à lui été caractérisé grâce à la sonde ratiométrique **3HQ-Bf** en terme de **densité de liaisons hydrogène**.

Ainsi, à l'issue d'un travail minutieux de développement méthodologique nous avons établi sans ambiguïté des conditions de mise en œuvre à la fois des sondes moléculaires et des paramètres expérimentaux d'analyse de fluorescence permettant d'identifier les types d'interactions présentes dans un système polysaccharidique donné en solution aqueuse, et également d'envisager leur quantification.

En plus d'enrichir la littérature avec une nouvelle solution pour lever un verrou technique jusque-là inexploré, notre travail a également permis d'apporter des éclaircissements concernant les interactions entre le **xanthane (X)** et les **galactomannanes (GM)** très peu étudiés à l'échelle moléculaire. Après sélection des échantillons de gommes xanthane et de galactomannane, tous caractérisés au plan chimique, structural et de leurs propriétés en solution, un protocole de préparation des solutions des gommes a été développé. Cette étape était déterminante pour la suite du travail, puisqu'il était important de maîtriser parfaitement le protocole de préparation des solutions et mélanges de gommes, en l'absence ou en présence de sondes de fluorescence, pour en permettre une caractérisation parfaitement objective. Ce travail a notamment amené à développer une méthode originale de détermination de la **siccité de solutions salines de polymères hydrosolubles et notamment des polyélectrolytes**, ayant fait l'objet d'une publication et décrite dans ce manuscrit.

En s'appuyant sur un travail de mise au point des conditions d'analyses à l'échelle microscopique d'une part et la caractérisation à l'échelle macroscopique des solutions et mélanges de gommes par rhéologie d'autre part, le travail a pour l'essentiel consisté à caractériser finement les différents types d'interactions entre les gommes à l'échelle moléculaire. Nous avons ainsi pu démontrer la coexistence d'interactions dipôle-dipôle, de microdomaines hydrophobes et de liaisons hydrogène entre les gommes de xanthane et de galactomannane en solution aqueuse.

Dans le cas d'interactions synergiques entre les deux gommes, nous avons pu mettre en évidence une **hydrophobie intense** et de nombreuses **liaisons hydrogène** quasiment à l'optimum de synergie; ce résultat majeur de cette thèse indique qu'un nombre maximal de cavités hydrophobes sont créées et que le réseau de liaisons hydrogène est le plus dense à ce ratio spécifique. De même notre approche à l'échelle moléculaire a également révélé des différences significatives entre les deux types de galactomannane étudiés à savoir les gommes de caroube et les gommes guar. Exception faite des

interactions dipôle-dipôle, les autres **phénomènes interactionnels moléculaires** analysées (microdomaines hydrophobes et liaisons hydrogène) se sont révélées **plus intenses** dans le cas des systèmes xanthane/gomme de caroube (X/GdC) que dans le cas des mélanges xanthane/gomme guar (X/GG) suggérant fortement que ces dernières (interactions hydrophobes et liaisons H) s'établissent préférentiellement entre les macromolécules de X et les zones lisses des GdC. Ces résultats originaux ont fait l'objet d'une publication qui sera très prochainement soumise à un journal à comité de lecture (Biomacromolécules).

Les mélanges X/GM, initialement exempts de toute forme d'organisation à l'issue de leur préparation, subissent une phase de structuration progressive avant d'atteindre un état d'équilibre. Nous avons montré que cette structuration, très peu étudiée pour les mélanges X/GM dans la littérature, est d'autant plus longue qu'on est proche de l'optimum de synergie d'interaction. Cette structuration des systèmes X/GM a été également étudiée aux deux échelles ; macroscopique d'une part et moléculaire d'autre part, en particulier dans les premiers moments après mélanges (entre t_0 et 30 minutes). Nous avons ainsi pu établir que la **cinétique de gélification** des mélanges X/GM est d'autant plus **rapide** lorsqu'on se rapproche des proportions correspondant à l'optimum de synergie. Cette cinétique de structuration à l'optimum de synergie se révèle également **plus rapide** dans le cas des systèmes **X/GdC** que dans les systèmes X/GG.

Dans le même temps, à l'échelle moléculaire, la vitesse à laquelle se créent les **microdomaines hydrophobes** s'avère plus lentes que celle **de l'organisation** du **réseau de liaisons hydrogène** qui sont, elles, **maximales à la synergie moléculaire**. Cette observation est la même quels que soient les mélanges analysés dans le cadre de cette étude, X/GdC ou X/GG. Ceci prouve qu'il y a bien un **phénomène de compétition** au niveau moléculaire entre l'établissement du réseau de liaisons H et les microdomaines hydrophobes ; cette compétition a pour conséquence d'allonger d'autant plus le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre que le mélange est proche de l'optimum de synergie. Ces résultats ont également fait l'objet de la préparation d'une publication qui sera bientôt soumise au journal « Carbohydrate Polymers » afin d'être révisée également par un comité de lecture.

Au bilan, l'ensemble de ce travail apporte indiscutablement une contribution inédite pour quiconque est intéressé à élucider les interactions à l'échelle moléculaire entre polymères hydrophiles en solution aqueuse. La méthodologie développée au cours de ce travail est fiable et transposable à tout soluté, polymérique ou non, dont on cherche à déterminer la nature des interactions en solution.

Cependant, si l'approche qualitative s'avère particulièrement probante, la perspective de ce projet de quantifier les interactions moléculaires en termes d'énergie mériterait d'être davantage approfondie ; cela pourrait être envisagé en approfondissant la méthode développée au cours de cette thèse, mais pourrait également être appréhendée par d'autres approches analytiques.

A titre d'exemple, la titration calorimétrie isotherme (**ITC**), basée sur des mesures de dégagement de chaleur, permet de déterminer les fonctions d'état d'un système, et ainsi de savoir si une association est spontanée ou non en fonction du calcul de l'énergie de Gibbs (ΔG). Cette technique permettrait de quantifier dans un premier temps de manière relative la formation de microdomaines hydrophobes contenue dans le terme entropique (ΔS) d'une part, et les liaisons H et les interactions dipôle-dipôle contenues dans le terme enthalpique (ΔH) d'autre part. Elle permettrait dans un deuxième temps de vérifier le caractère spontané de l'association X/GM en solution aqueuse et de déterminer une éventuelle modulation de cette spontanéité en fonction du temps d'analyse et de la composition des mélanges X/GM et autres mélanges de polymères hydrosolubles. Un premier protocole expérimentale a été établi selon les travaux d'Aberkane et co-équipiers^[1] (25 injections de 10 μ L) auquel a été ajoutée une étape déterminante de dialyses sous agitation des deux solutions de polysaccharide, X et GM afin que celles-ci aient exactement les mêmes conductivités et pH afin d'éviter de futures biais d'analyse. Nous avons, suite à une étude préliminaire, déterminé que la période de dialyse doit être au minimum de 8 jours.

Une autre perspective majeure serait l'étude par RMN en solution de la **proximité spatiale des protons** afin d'obtenir des informations clés sur les mécanismes d'association entre X et GM; ces approches peu décrites dans la littérature pour les polysaccharides en solution^[2] utilisent des expériences de **RMN NOESY**. Le principal obstacle à cette méthode réside dans les masses molaires élevées des polysaccharides qui engendrent une viscosité relativement élevée du milieu. Des premières expériences de telles dégradations de chaînes polysaccharidiques par ultrasonication, menées au cours de la thèse mais non présentées dans le manuscrit, ont donné des résultats prometteurs qui mériteraient sans aucun doute d'être poursuivis. En effet, en contrôlant le temps et la puissance d'ultrasonication, nous sommes parvenus à diminuer d'un seul ordre de grandeur les masses moléculaires viscosimétriques ($M_v \sim 10^5$) de X et GdC1. Des analyses pour redéterminer les caractéristiques intrinsèques de X (DS_a , DS_p , T_m , etc.) et de GdC1 (ratio M/G) et les propriétés rhéologiques sont nécessaires avant d'effectuer une expérience de RMN NOESY des mélanges ultrasoniqués X/GdC1 dans un premier temps, puis des mélanges X/GM ultrasoniqués dans un deuxième temps.

[1] L. Aberkane, J. Jasniewski, C. Gaiani, J. Scher, C. Sanchez, *Langmuir* **2010**, *26*, 12523–12533.

[2] M. Takemasa, K. Nishinari, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 3027–3037.

Détermination des natures des interactions entre polymères en solution aqueuse à l'échelle moléculaire par spectroscopie de fluorescence

De nombreuses études dans le domaine de la chimie supramoléculaire ont été effectuées sur les interactions non-covalentes et de faible énergie dans les matériaux à l'état solide mais très peu furent menées afin de les caractériser en solution. Ce projet de recherche est né afin de mettre au point une méthodologie permettant de caractériser les interactions moléculaires au sein de solutions et mélanges de polymères hydrosolubles en laissant le système étudié imperturbé. Afin d'y parvenir, nous avons choisi la spectroscopie de fluorescence. Deux sondes moléculaires, utilisées en libre diffusion, ont été sélectionnées : ANS pour caractériser les interactions dipôle-dipôle et hydrophobes et 3HQ-Bf pour caractériser les liaisons hydrogène. Nous avons choisi d'analyser à l'échelle moléculaire les mélanges xanthane/galactomannane, largement étudiés à l'échelle macroscopique mais très peu à l'échelle microscopique et qui soulèvent encore quelques interrogations de nos jours concernant leur association en solution. Après avoir testé notre méthodologie avec un système simple, nous avons été capable de caractériser les interactions moléculaires au sein des solutions et mélanges xanthane/galactomannane. De plus, nous avons mis en évidence l'existence de synergies moléculaires dans le cas des interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène et le fait que les interactions dipôle-dipôle n'ont pas un rôle prépondérant mais agissent en arrière plan. Nous avons, surtout, mis en évidence les mécanismes de mise en place des interactions au cours de l'organisation de la gélification du système étudié.

Mots clefs : interactions, xanthane, galactomannane, polysaccharides, fluorescence, rhéologie

Determination of the natures of interactions between polymers in aqueous solutions at the molecular scale using fluorescence spectroscopy

Numerous studies in the field of supramolecular chemistry have been carried out on non-covalent and low energy interactions in solid state materials but very few have been carried out to characterize them in solution. The main purpose of this research project was to develop a methodology to characterize the molecular interactions within solutions and mixtures of water-soluble polymers while leaving the studied system non-disturbed. In order to achieve this, we chose to use fluorescence spectroscopy. Two molecular probes, used in free diffusion, have been selected: ANS to characterize dipole-dipole and hydrophobic interactions and 3HQ-Bf to characterize hydrogen bonds. We have chosen to analyze, at the molecular scale, xanthan/galactomannan mixtures, which have been widely studied at the macroscopic scale but very little at the microscopic scale and which still raise some questions today concerning their association mechanism in solution. After testing our methodology with a simple system, we were able to characterize the molecular interactions within xanthan/galactomannan solutions and mixtures. Moreover, we have highlighted the existence of molecular synergies in the case of hydrophobic interactions and hydrogen bonds and that dipole-dipole interactions do not play a predominant role but act in the background. We have, above all, highlighted the mechanisms arising during the setup of the gelling process of the studied system.

Key words: interactions, xanthan, galactomannan, polysaccharides, fluorescence, rheology