



Synthèse et caractérisation de tensioactifs à faible impact environnemental : formulation et évaluation d'émulsions en technique routière

Camille Chapelle

► To cite this version:

Camille Chapelle. Synthèse et caractérisation de tensioactifs à faible impact environnemental : formulation et évaluation d'émulsions en technique routière. Polymères. Montpellier, Ecole nationale supérieure de chimie, 2021. Français. ⟨NNT : 2021ENCM0007⟩. ⟨tel-03623437⟩

HAL Id: tel-03623437

<https://theses.hal.science/tel-03623437v1>

Submitted on 29 Mar 2022

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.



HAL Authorization

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE
L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE CHIMIE
DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-chimie des Matériaux

École doctorale Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche Institut Charles Gerhardt

**Synthèse et caractérisation de tensioactifs à
faible impact environnemental : formulation
et évaluation d'émulsions en technique
routière**

Présentée par **Camille CHAPELLE**

Le 18 juin 2021

Sous la direction de **Ghislain DAVID**

Sylvain CAILLOL et Claire NEGRELL

Devant le jury composé de

Mme. H. de Baynast, Maîtresse de conférence, Polytech Clermont-Ferrand
Mme. V. Nardello-Rataj, Professeure, UCCS, Université de Lille
M. S. Trombotto, Maître de conférence, IMP Université Lyon 1
M. E. Belamie, Directeur d'étude, EPHE, ICGM
M. G. David, Maître de conférences, ENSCM
M. S. Caillol, Directeur de recherche, CNRS, ICGM
Mme. M. Desroches Le Foll, Chef de projet, CST COLAS
Mme. Claire Negrell, Ingénieure de recherche, ICGM

Rapporteure
Rapporteure
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse
Invitée
Invitée



Remerciements

Ce projet a été réalisé au sein du département de Chimie Moléculaire et Macromoléculaire de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier, dans l'équipe de recherche Ingénierie et Architectures Macromoléculaires. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'une CIFRE financée par Colas et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT).

Je tiens d'abord à remercier le directeur du laboratoire, Patrick Lacroix-Desmazes de m'avoir accueillie dans son équipe durant ces trois années.

Je remercie l'ANRT pour le financement de ces travaux.

Je remercie la société Colas pour le financement de ces travaux et principalement le Centre Scientifique et Technique (CST) de Magny les Hameaux. Je remercie Philippe Raffin, directeur technique recherche et développement pour les activités routes, bâtiment, génie civil et spécialités du groupe Colas pour sa confiance et son accueil au sein de l'équipe. Je remercie également Jean Voirin ancien directeur du laboratoire du CST. Je remercie tout spécialement Graziella Durand et Myriam Desroches pour avoir dirigé le projet au sein de l'entreprise. Je les remercie particulièrement pour leur curiosité scientifique et leurs connaissances techniques m'ayant permis de mener cette thèse à bien dans une ambiance de travail stimulante. Je les remercie également pour leur disponibilité et leur gentillesse, leur accueil lors de mes visites au CST et leur bienveillance tout au long de ces trois années. Je remercie également Julien Morineau pour m'avoir accueillie au CST et m'avoir transmis son savoir et son expérience sur les techniques routières et particulièrement les émulsions de bitume. Merci aussi à Isabelle Couillet d'avoir encadré ce projet sur les 6 derniers mois. Enfin un merci groupé à tout le personnel du CST que j'ai pu croisé lors de mes courtes visites, pour leur accueil chaleureux et leur aide toujours généreusement offerte.

Je remercie Mme. Hélène de Baynast et Mme. Véronique Rataj pour avoir accepté d'évaluer et rapporter ce travail. Je remercie également M. Emmanuel Bellamie et M. Stéphane Trombotto d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie mon directeur de thèse, Ghislain David et mes co-directeurs Sylvain Caillol et Claire Negrell pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse. Je les remercie pour la confiance qu'ils m'ont accordée durant ces trois années. Merci pour votre soutien, votre bienveillance et vos encouragements. Merci pour les connaissances que vous m'avez transmises, tant techniques que professionnelles. Je vous remercie également de m'avoir laissé de l'autonomie dans mes recherches tout en m'aiguillant lorsque nécessaire. Merci sincèrement de m'avoir challengée au quotidien et aidée à

prendre confiance en moi, à améliorer mes points faibles et à me sentir prête pour la suite dans le milieu professionnel.

Ces remerciements n'auraient pas de sens sans quelques mots pour les étudiants du laboratoire avec qui j'ai pu partager une partie de ma thèse et de très bon moments en dehors. Il est clair que l'ambiance au sein de cette équipe de doctorants, post doctorants et stagiaires y est pour beaucoup dans la réussite de ma thèse. Plus que des collègues certains sont maintenant pour moi des amis sur lesquels je sais pouvoir compter. Merci tout d'abord aux chatonnes, Mélanie, Céline, Anne Sophie, ou devrais-je dire Cookie, Ron et Macha pour m'avoir tout de suite intégrée dans le clan si select des maîtresses félines malgré mon syndrome de « Gilles ». Merci également aux membres du meilleur bureau, Fabien, Vincent, Romain et Florian pour le soutien, l'entraide, les débats sur l'homéopathie et surtout la bonne ambiance. Les parties endiablées de mots fléchés, les blind test, bilbo et autres ne pourront que me manquer. Je remercie sportivement Baptiste pour m'avoir suivie dans le club des mangeurs de brocoli souleveurs de fonte. Mais merci également aux participants occasionnels sur le parking du labo, David, Flo, Guilhem, Yvan et Fabien, ah non pas Fabien. Merci aux autres membres de la team, Maxinne, toujours là pour trinquer avec moi et Léo pour avoir partagé la RC dans la bonne humeur. Je remercie également Thomas, Tobias, Nina, et Eline pour une super semaine passée au JEPO et toutes les personnes que j'ai pu croiser de près comme de loin à l'IAM, Maxime, Dimitri, Adélaïde, Aliénor, Roberto, Samantha, Jenn, Benjamin, Marca, Clément, Juliette, Soline, Lorelei, Caroline et j'en oublie sûrement.

Je remercie également ma stagiaire Camila Ottalora qui malgré une période de confinement a su fournir un travail méticuleux et proposer certains résultats intéressants figurants dans le dernier chapitre de cette thèse.

Je tiens également à remercier particulièrement les membres permanents du laboratoire avec lesquels j'ai pu travailler ou simplement échanger. Merci à Rémi Auvergne, Julien Pinaud, Vincent Ladmiraal, Abdou. Merci à Bruno Améduri pour son engouement pour le rock et le fromage. Merci à Christine Joly-Duhamel pour sa gentillesse et sa bienveillance. Merci aussi à Sylvain Catrouillet pour son aide précieuse avec la SLS et son accueil toujours chaleureux. Merci également à Pascale Guiffrey d'avoir toujours un mot pour rire pour « les fous d'IAM ».

Tous mes remerciements à Aurélien Lebrun, Agnès Crepet et Cédric Totée pour leurs aides précieuses dans différents projets collaboratifs.

Merci également à Nathalie Azema pour la collaboration scientifique que nous avons menée en fin de thèse. Merci à elle pour son accueil, sa pédagogie et son implication dans le projet. Merci également aux autres personnes qui m'ont apporté de l'aide lors de mes séjours à Alès notamment Kévin Roque et Mimoune Abadassi d'avoir bien voulu passer mes échantillons ainsi que Claire Longuet et Agnès Harlay pour le covoiturage.

Tout le monde sait que la thèse est faite de hauts et de bas et qu'un bon équilibre entre vie professionnelle et personnelle est nécessaire. C'est pourquoi je remercie sincèrement mes parents, Lélé, Chloé, mes grands-parents et plus généralement ma famille, Chapelle comme Joubert pour leur soutien et leurs encouragements. Merci également à tous mes amis, particulièrement Manon, Pierre, Flo, Matthieu, Clem, Thib, Marie, Ju, Anaïs, Manon, les meufs, Manoune, Mag, Claire, Margaux, Estelle, Anne-Ju, la team vélo, mais aussi à la mif, Alex, Joris, Juju, Antoine, Micky. Un petit merci de l'autre côté de la Manche à Julie et Marjo.

Pour terminer ces remerciements, je sais que pour toi ce n'était pas toujours facile de me suivre partout dans toutes mes aventures mais tu l'as fait et je ne te remercierais jamais assez. Trois ans c'est long et court à la fois, Montpellier ce n'est pas Lyon mais cela nous a quand même permis d'adopter Meïko que je remercie au passage pour la ronron thérapie bien méritée certains jours. Sans toi je ne pense pas que j'aurai pu réussir, merci de me supporter et de me faire rire au quotidien tout en me soutenant dans tout ce que j'entreprends. Merci du fond du cœur à toi, Mendes.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
STRUCTURES UTILISÉES.....	13
ABRÉVIATIONS	19
INTRODUCTION GÉNÉRALE	25
CHAPITRE 1	
CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	31
LES EMULSIONS DE BITUME	35
I. Généralités sur les émulsions	35
II. Les émulsions bitumineuses	36
II.1. Les émulsions anioniques.....	37
II.2. Les émulsions cationiques.....	37
II.3. Propriétés des émulsions de bitume.....	38
II.3. 1) Propriétés d'usage.....	38
a) Stabilité au stockage	38
b) Viscosité.....	39
c) Vitesse de rupture	40
d) Adhésivité	41
II.3. 2) Tests usuels	41
a.) Teneur en liant	41
a) La granulométrie laser	41
b) Viscosité par temps d'écoulement.....	41
c) Indice de rupture.....	42
d) Résidus sur tamis.....	42
II.4. Fabrication des émulsions.....	42
II.4. 1) Préparation de la phase aqueuse.....	42
II.4. 2) Préparation du liant bitumineux	43
II.4. 3) Mise en émulsion	43
II.5. Utilisation des émulsions de bitumes	43
II.5. 1) Dégradations géométriques.....	44
II.5. 2) Dégradation de surface	44
II.5. 3) Discontinuités physiques.....	44
II.6. Domaines d'application.....	45
II.6. 1) Les graves-émulsions	45
II.6. 2) Les enduits superficiels	46
II.6. 3) Les enrobés coulés à froid.....	46
II.6. 4) Béton bitumineux à l'émulsion	47
GENERALITES SUR LES TENSIOACTIFS DANS LES EMULSIONS DE BITUME	48
III. Structure générale des tensioactifs de COLAS.....	49
IV. Exemples de tensioactifs utilisés par COLAS	50
IV.1. Tensioactif A (TOFA- Diméthylaminopropylamine)	50
IV.2. Tensioactif B (mélange de A et de TOFA-imidazoline).....	51
LE CHITOSANE.....	53
I. Préparation.....	53
I.1. Extraction de la chitine.....	53
I.2. Déacétylation de la chitine	54

<i>II. Caractérisations du chitosane</i>	55
II.1. Calcul du degré d'acétylation	55
II.2. Mesure des masses molaires	56
<i>III. Propriétés</i>	57
III.1. Solubilité	57
III.2. Viscosité	58
III.3. Propriétés biologiques	58
III.4. Les chitooligosaccharides (COS)	58
<i>V. Emulsions utilisant le chitosane et ses dérivés</i>	59
CONCLUSIONS	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62
 CHAPITRE 2	
SYNTHÈSE DE LA PARTIE HYDROPHILE DU TENSIOACTIF, OBTENTION D'OLIGOMÈRES DE CHITOSANE PAR DÉSAMINATION NITREUSE	65
LA DEPOLYMERISATION DU CHITOSANE	69
<i>I. Voie Enzymatique</i>	69
I.1. Lysozyme	69
I.2. Chitinase	70
I.3. Chitosanase	71
I.4. Autres enzymes	72
<i>II. Voies physiques</i>	73
II.1. Plasma d'électrons	73
II.2. Irradiation gamma	74
II.3. Microondes	75
II.4. Ultrasons	76
II.5. Micro fluidique	76
<i>III. Voies chimiques</i>	77
III.1. Hydrolyse acide	78
III.2. Désamination nitreuse	80
III.3. Oxidative	Erreur ! Signet non défini.
CONCLUSIONS	87
WATER SOLUBLE 2, 5-ANHYDRO-D-MANNOFURANOSE END CHAIN CHITOSAN OLIGOMERS OF VERY LOW MOLECULAR WEIGHT: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION	89
<i>I. Abstract</i>	89
<i>II. Introduction</i>	89
<i>III. Materials and methods</i>	92
III.1. Materials	92
III.2. Depolymerization of chitosan	93
III.3. AMF synthesis	93
III.4. Characterization	94
<i>IV. Results and discussion</i>	95
<i>V. Conclusion</i>	104
CONCLUSIONS	105
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	106

CHAPITRE 3

SYNTHÈSE DE MACROMOLÉCULES AMPHIPHILES: FONCTIONNALISATION D'OLIGOMÈRES DE CHITOSANE.....113

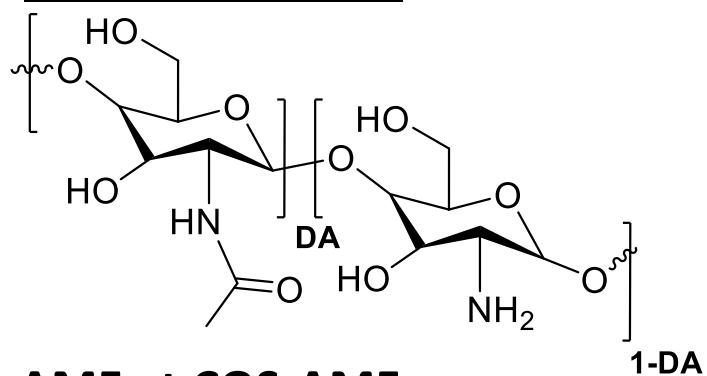
ADVANCES IN CHITOLIGOSACCHARIDES (COS) CHEMICAL MODIFICATIONS: A COMPREHENSIVE REVIEW	118
I. Abstract	118
I.1. Introduction.....	118
II. Grafting onto amine and hydroxyl	122
II.1. Carboxylic acids and its derivatives.....	122
I.1. Anhydrides.....	128
I.2. Epoxides	132
I.3. Ring opening polymerization	135
I.4. Schiff base	137
I.5. Michael addition.....	141
I.6. Isocyanate	142
I.7. Nucleophilic substitution	143
I.8. Guanidination.....	145
II. Grafting on aldehyde.....	145
III. Conclusion	147
ETUDE PRELIMINAIRE	149
I. Introduction.....	149
II. Méthodes de mesures des degrés de substitution (DS)	149
III. Matériel et méthodes.....	151
III.1. Matériel	151
III.2. Modes opératoires.....	152
III.2. 1) Addition de chlorure d'acyle sur les COS	152
a) Chlorures d'acyles variés.....	152
b) Chlorure de TOFA	152
III.2. 2) Activation d'acides carboxyliques par DCC NHS	152
III.2. 3) Couplage époxy-amine sur les COS.....	153
III.3. Caractérisations.....	154
IV. Résultats et discussions.....	154
IV.1. Addition de chlorures d'acyles.....	154
IV.1. 1) Etude modèle	154
IV.1. 2) Avec le TOFA.....	156
IV.2. Couplage époxy-amine.....	158
CONCLUSIONS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE	160
FUNCTIONALIZATION OF CHITOSAN OLIGOMERS: FROM ALIPHATIC EPOXIDE TO CARDANOL GRAFTED OLIGOMERS FOR OIL IN WATER EMULSIONS	162
I. Abstract	162
II. Introduction.....	162
III. Material and methods.....	164
III.1. Material	164
III.2. AMF and AMF oxime synthesis	164
III.3. COS and COS oxime synthesis	165
III.4. Functionalization of chitosan oligomers	167
III.5. Oil in water emulsions with modified COS.....	168

III.6. Characterizations.....	168
IV. <i>Result and discussion</i>	169
IV.1. Synthesis of chitosan oligomer-oximes	169
IV.2. Functionalization of COS-oximes with aliphatic epoxide.....	173
IV.3. Functionalization of COS-oximes with cardanol	176
IV.4. Oil in water emulsion	177
V. <i>Conclusion</i>	179
ADDITION DU TOFA.....	181
CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3	183
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185
CHAPITRE 4	
CARACTÉRISATION DES TENSIOACTIFS ET MISE EN ÉMULSION D'UNE HUILE MODÈLE	207
PHYSICO-CHIMIE DES TENSIOACTIFS : METHODES DE MESURE	207
I. <i>Evaluation des propriétés des tensioactifs</i>	207
I.1. Balance Hydrophile-Lipophile (HLB).....	207
I.2. Concentration micellaire critique CMC.....	208
I.3. Paramètre d'empilement	210
I.4. Tension interfaciale	212
I.5. Rhéologie interfaciale	214
I.6. Diffusion de la lumière	215
I.6. 1) Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	215
I.6. 2) Diffusion statique de la lumière (SLS)	216
II. <i>Evaluation de stabilité d'émulsions</i>	218
II.1. Mise en émulsion	218
II.2. Principe du Turbiscan	219
SURFACTANT PROPERTIES OF CHEMICALLY MODIFIED CHITOOLOGOSACCHARIDES AND THEIR POTENTIAL APPLICATION IN BITUMEN EMULSIONS.....	221
I. <i>Abstract</i>	221
II. <i>Introduction</i>	221
III. <i>Material and method</i>	223
III.1. Material	223
III.2. Functionalization of COS	223
III.2. 1) Synthesis of COS-epoxide.....	223
III.2. 2) Synthesis of COS-TOFA.....	223
III.2. 3) Characterizations.....	224
III.3. CMC and interfacial tension	225
III.4. Stacking parameter	225
III.5. Static and dynamic light scattering (SLS and DLS)	226
III.6. Microscopic analysis.....	226
III.7. Emulsion	227
III.7. 1) Preparation.....	227
III.7. 2) Stability.....	227
III.8. Surfactant toxicity	228
IV. <i>Result and discussion</i>	228
IV.1. CMC Measurement	229
II.1. Interfacial tension	231

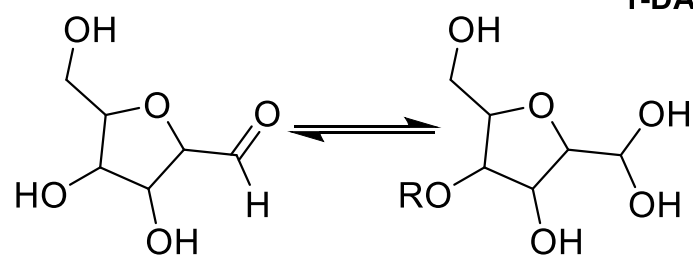
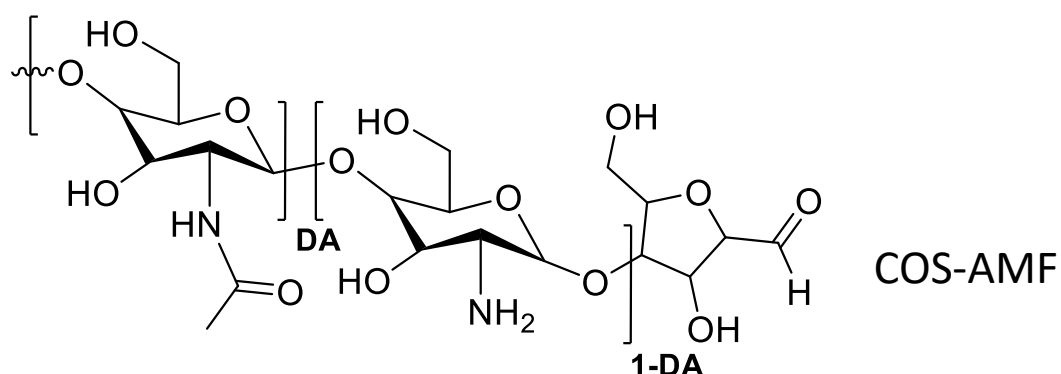
IV.2. Static and dynamic light scattering (SLS and DLS)	233
IV.3. Emulsion stability and rheological properties	234
IV.3. 1) Stability over 7 days	234
IV.3. 2) Interfacial and bulk rheology	238
IV.3. 3) Stability over 55 days	241
IV.4. Surfactant toxicity	242
V. Conclusion	243
CONCLUSIONS DU CHAPITRE 4 ET MISE EN RELATION AVEC LES TENSIOACTIFS DE COLAS	244
CHAPITRE 5	
VERS DES TENSIOACTIFS À BLOCS À BASE D'OLIGOMÈRES DE CHITOSANE: PERSPECTIVES	255
SYNTHÈSE DE TENSIOACTIFS A BLOCS A PARTIR D'AMF ET DE COS	259
VI. Matériel et méthodes	259
VI.1. Désamination nitreuse	259
VI.2. Addition de chaînes grasses	260
VI.2. 1) TOFA	260
a) Synthèse de l'hydrazide de TOFA	260
b) Synthèse de l'AMF-b-TOFA	260
c) Synthèse de DP10-b-TOFA	260
VI.2. 2) Le cardanol	261
a) Fonctionnalisation du cardanol	261
b) Synthèse de AMF-b-Cardanol	261
c) Synthèse de DP10-b-Cardanol	262
VII. Résultats et discussions	262
VII.1. Synthèse	262
VII.2. Propriétés physico-chimiques	266
VII.3. Mise en émulsion	267
CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5	269
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	271
ANNEXES	277
ANNEXES DU CHAPITRE 1	279
ANNEXES DU CHAPITRE 2	281
ANNEXE DU CHAPITRE 3	293
ANNEXES DU CHAPITRE 4	300
ANNEXES DU CHAPITRE 5	319

Structures utilisées

Chitosane et COS

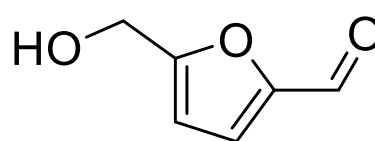


AMF et COS-AMF

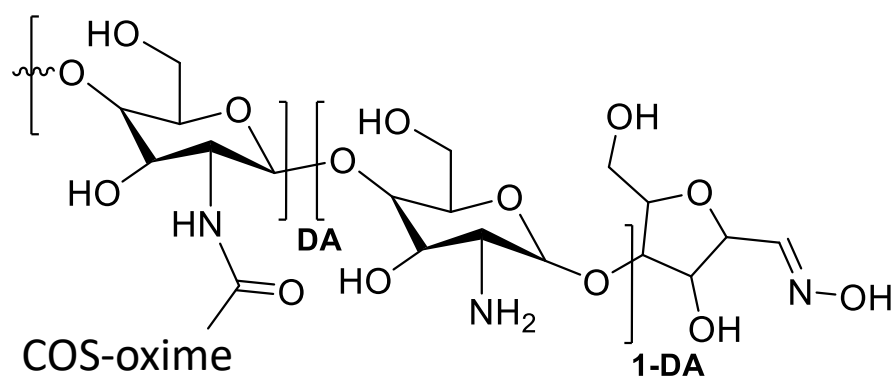


2,5-anhydro-d-mannofurannose (AMF)

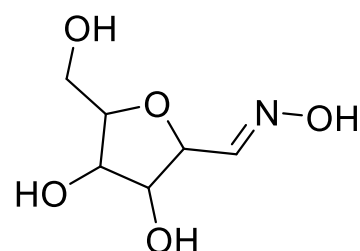
5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF)



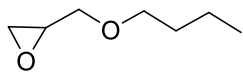
AMF-oximes et COS-oximes



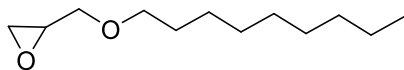
AMF-oxime



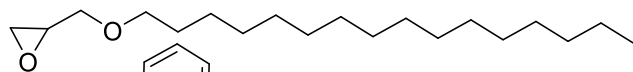
Epoxydes gras



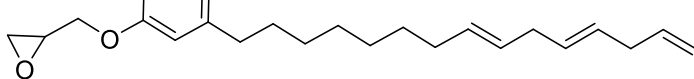
Butylglycidyl éther C4



Octyl/décyglycidyl éther C9

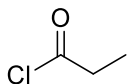


Hexaglycidyl éther C16

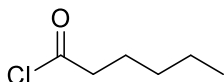


Cardanol glycidyl éther

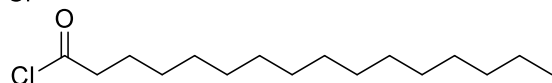
Chlorures d'acyles



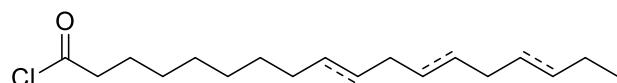
Chlorure de propanoyle



Chlorure d'hexanoyle

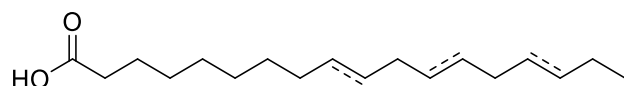


Chlorure de palmitoyle

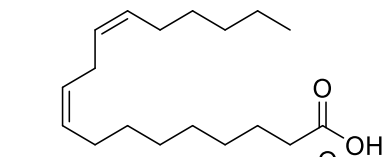


Chlorure de TOFA

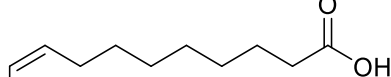
Acides gras



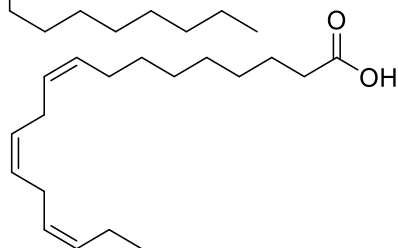
TOFA



Acide oléique (~50%)



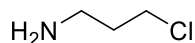
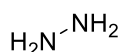
Acide linoléique (~35%)



Acide α -linolénique (~10%)

Autres

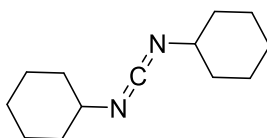
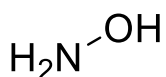
Hydrazine



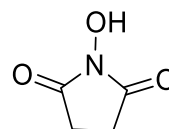
3-chloropropylamine

N-hydrosuccinimide (NHS)

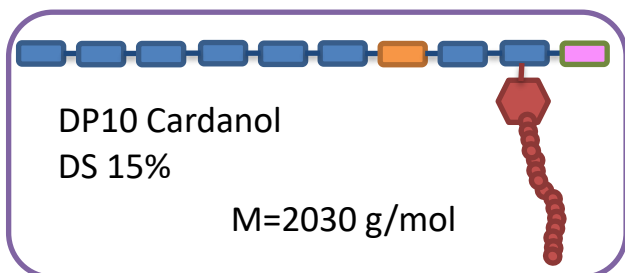
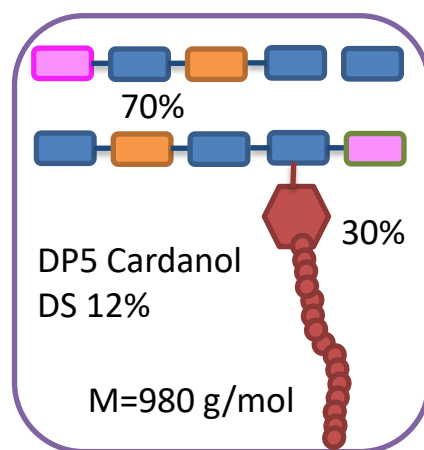
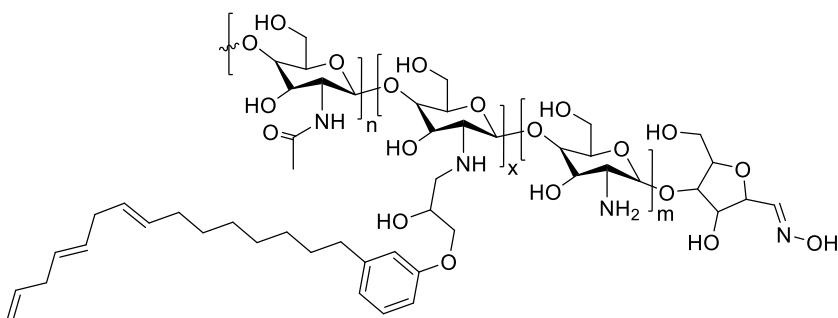
Hydroxylamine



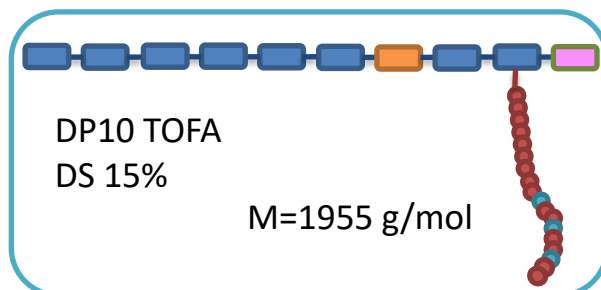
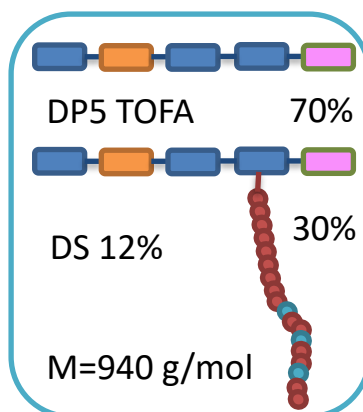
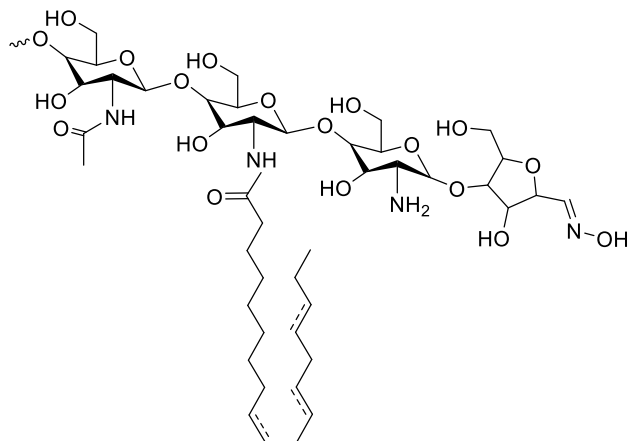
Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)



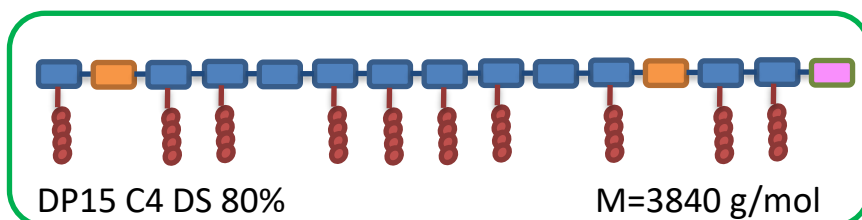
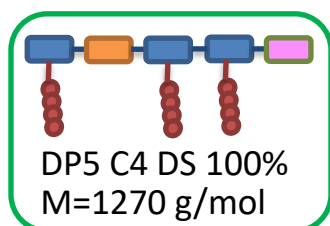
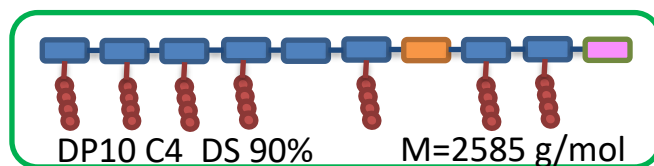
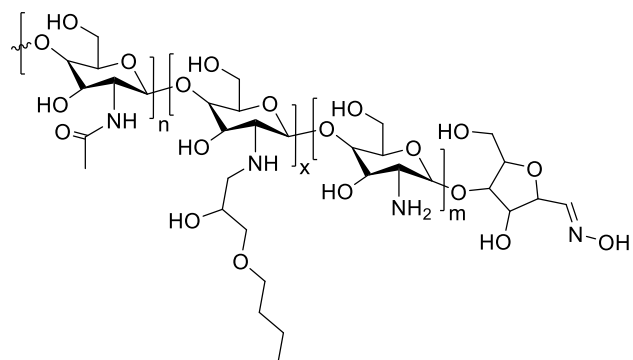
Tensioactifs base Cardanol



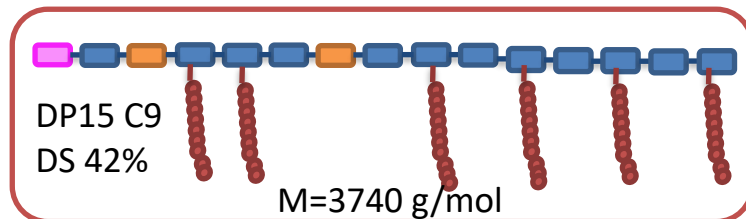
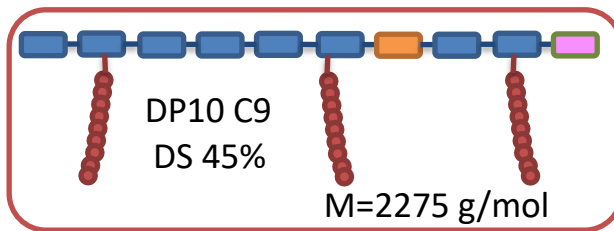
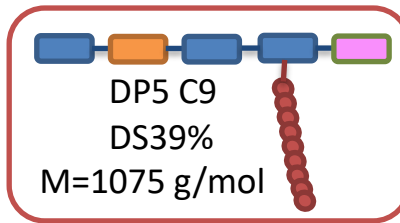
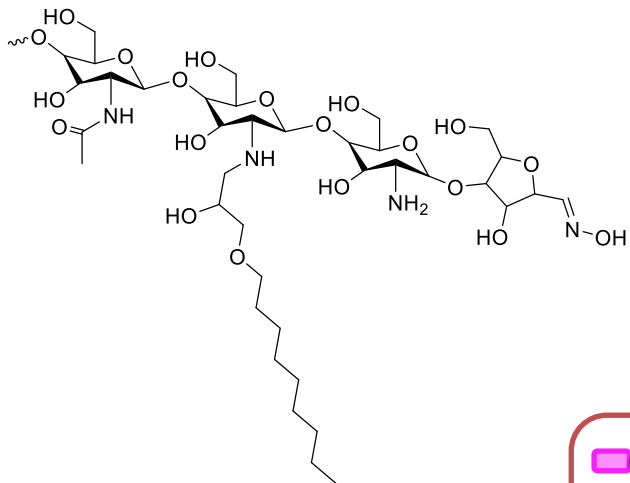
Tensioactifs base TOFA



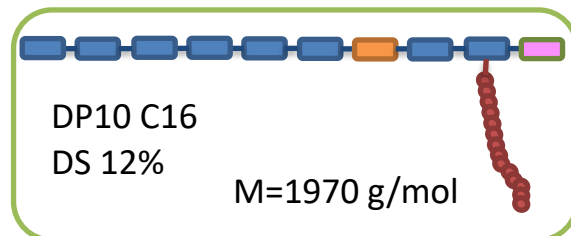
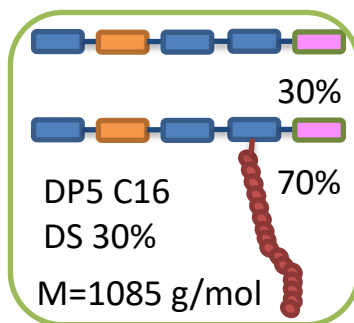
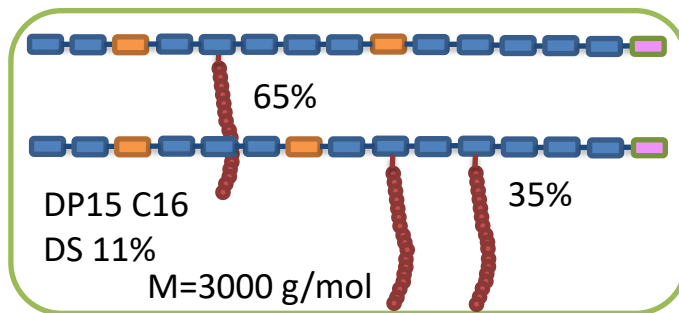
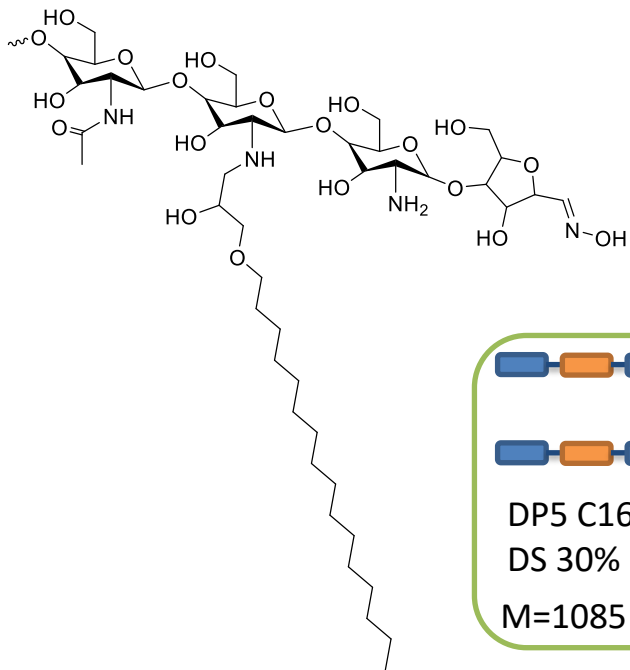
Tensioactifs base C4



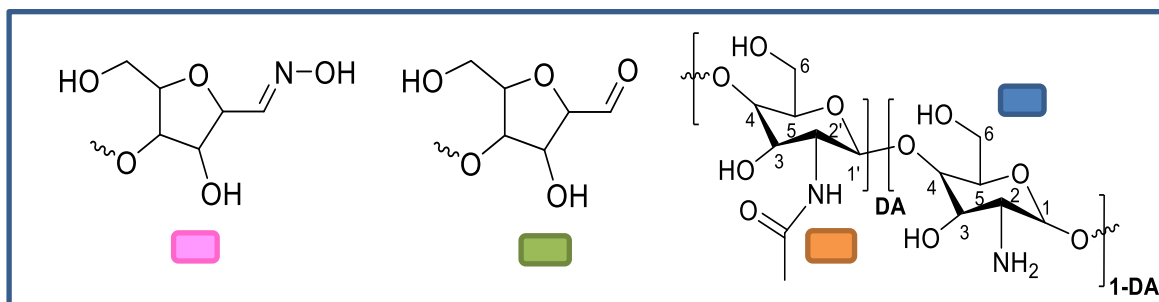
Tensioactifs base C9



Tensioactifs base C16



Code couleur



Abréviations

Abréviations

AMF	2,5 anhydro-d-mannofurannose
[BMIM]Ac	1-butyl-3-methylimidazolium acétate
AcOH	acide acétique
Ag ₂ O	oxide d'argent
AGE	allyl glycidyl éther
AlEt ₃	triéthylaluminium
ATG	analyse thermogravimétrique
ATP	adénosine triphosphate
BS	rétrodiffusion
BSA	Serum bovin albumine
BTDA	Anhydride de 3,3',4,4'-benzophenonetetracarboxylic
C16	hexadécylglycidyl éther
C4	butylglycidyl éther
C9	octyl/decyl glycidyl éther
CA	acide carboxylique
CAN	céric ammonium nitrate
CDCl ₃	chloroforme deutéré
CG	2-cyanoguanidine
CMC	concentration micellaire critique
CMCOS	carboxyméthyl oligochitosan
COS	chitooligosaccharides
D	dispersité
D ₂ O	eau deutérée
DA	degré d'acétylation (%)
DCC	dicyclohexylcarbodiimide (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide)
DLS	dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	diméthyle formamide
DMSO	diméthyle sulfoxyde
dn/dc	variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration
DP	degré de polymérisation
DS	degré de substitution (%)
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
G	gélatine
GlcN	β-D-glucosamine
GINAc	N-acétyl-β-D-glucosamine
GM	glycidyl méthacrylate
GPC	chromatographie à perméation de gel
GSH	glutathione
HCl	acide chlorhydrique
HLB	balance hydrophile/hydrophobe
HMDS	hexamethyldisilazane
HMF	5-hydroxyméthyl-2-furfural
IPDI	isophorone diisocyanates

Abréviations

IRTF	infra-rouge à transformée de Fourier
LiBr	bromure de lithium
MA	anhydride maléique
MDI	méthane-4,4'-diisocyanate
MeOH	méthanol
MET	microscopie électronique à transmission
Mn	masse molaire en nombre (g/mol)
MSC	cellules mésenchymal stem
Mw	masse molaire en poids (g/mol)
NaAc	acétate de sodium
NaBH ₃ CN	cyanoborohydrure de sodium
Nagg	nombre d'agrégation
NaHCO ₃	sodium bicarbonate
NaNO ₂	nitrite de sodium
NaOH	hydroxide de sodium
NCO	isocyanate
NHS	N-hydroxysuccinimide
NPC	4-nitrophényl chloroformate
p	paramètre d'empilement
PBS	tampon phosphate
PCL	polycaprolactone
PCl ₃	trichlorure de phosphore
PCl ₅	pentachlorure
PDOPA	polydopamine
PEG-PCL	copolymères de polyéthylène glycol-polycaprolactone
PET	polyéthylène téréphthalate
PHA	anhydride phthalique
PSF-g-PAA	acide polysulfone-polyacrylique
PTMG	polytétraméthylène éther glycol
PU	polyuréthane
Rg	rayon de giration (nm)
Rh	rayon hydrodynamique (nm)
rhEGF	facteur de croissance épidermique humain recombinant
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROP	polymérisation par ouverture de cycle
RT	température ambiante
SEC	chromatographie d'exclusion stérique
SLS	diffusion statique de la lumière
SOCI ₂	chlorure de thionyle
T	température (°C)
TEPA	tétraéthylènepentamine
THF	tétrahydrofurane
TI	tension interfaciale (mN.m ⁻¹)
TMS	chlorotriméthylsilane
TOFA	huile de tall

Abréviations

Tr	transmission
UV	ultra violet

Introduction générale

Le groupe Colas, une filiale du groupe Bouygues, est l'un des leaders mondiaux de la construction et de l'entretien des infrastructures de transport. Il est présent sur les cinq continents dans 55 pays. En 2020, 57.000 collaborateurs œuvrent au sein de pas moins de 72.000 chantiers par an à travers le monde. Cependant, 50% du chiffre d'affaire du groupe reste français. Le cœur de métier de Colas (72% de l'activité) est la construction routière ; d'autres activités de spécialités telles que les matériaux de construction, l'étanchéité et le ferroviaire viennent à le compléter. L'activité route comprend la construction, l'entretien et la maintenance de routes, autoroutes, pistes d'aéroport, voiries et aménagements urbains, voies de transport en commun (tramways, bus à haut niveau de service), plateformes portuaires, industrielles, logistiques et commerciales, aires de loisirs, pistes cyclables et aménagements environnementaux, ainsi qu'une activité de sécurité signalisation routière.

Il existe de nombreuses techniques pour construire ou entretenir une route, techniques qui sont adaptées à l'environnement et aux contraintes subies par la chaussée. Une route est composée de sables, de granulats et d'un liant. Ce liant peut être du bitume chaud (environ 150°C) ou bien une émulsion de bitume (30°C à 80°C selon l'utilisation qui en est faite). C'est sur les émulsions de bitume que porte ce sujet de recherche.

De nos jours, les émulsions de bitume sont grandement utilisées pour l'entretien et le façonnage de nos chaussées. Celles-ci sont des émulsions directes (huile dans eau O/W) principalement composées de bitume et d'une phase aqueuse contenant un tensioactif cationique. Celui-ci est alors à l'interface entre les phases huileuses et aqueuses. Les tensioactifs utilisés actuellement sont bien souvent des composés aminés étiquetés comme toxiques et/ou écotoxiques. Il est donc important de rechercher à remplacer ces composés par une gamme de produits moins dangereux et en meilleur accord avec l'environnement. En effet, dans le cadre du transport et du stockage, un accident pourrait être catastrophique pour les cours d'eau à proximité, les mers et océans mais aussi principalement les nappes phréatiques.

Le candidat retenu pour remplacer les émulsifiants actuels est le chitosane, un polysaccharide cationique d'origine naturelle principalement extrait des carapaces de crustacés. Le chitosane est en effet, l'une des seules ressources naturelles non toxiques qui apporte des amines. L'amine de ce polysaccharide, sur laquelle des chaînes hydrophobes peuvent être greffées pour générer de l'amphiphile, se protonne en milieu acide. Toutes ces caractéristiques en font une potentielle tête hydrophile cationique pour un tensioactif non dangereux et respectueux de l'environnement.

Cependant, le chitosane n'est que très peu soluble dans l'eau en milieu acide. Il devient donc difficile à fonctionnaliser et il est compliqué d'atteindre des degrés de substitution suffisants pour avoir des émulsifiants compétitifs. Et effectivement, au-delà de la solubilité, un tensioactif est rarement un polymère de DP élevée. Ainsi, la tête hydrophile du tensioactif doit être réduite pour pouvoir obtenir une balance hydrophile/lipophile permettant l'obtention d'une émulsion directe. C'est pourquoi il a été envisagé de dépolymériser ce polysaccharide pour obtenir des oligomères de faibles masses molaires solubles directement dans l'eau et dans certains solvants organiques et de ce fait, plus facilement fonctionnalisables. Ils sont définis par certaines propriétés uniques telles que la non toxicité et diverses activités biologiques encore meilleures que celles du chitosane de haute masse molaire d'où l'intérêt qui leur est porté dans cette étude.

Le premier chapitre est dédié à la présentation du contexte de cette étude. Dans un premier temps la fabrication, l'utilisation et les principales caractéristiques des émulsions de bitumes seront tout d'abord présentées. Ensuite, les tensioactifs utilisés par COLAS et leurs principales caractéristiques seront abordés. Dans un second temps le chitosane sera présenté en se focalisant sur les techniques d'extraction et de modification, ainsi que ses principales caractéristiques. Les oligomères de chitosane (COS) et leurs propriétés intéressantes seront également présentés. Enfin, l'utilisation du chitosane et de ses oligomères en tant qu'émulsifiant sera abordée.

Dans le chapitre 2, les différentes techniques de dépolymérisation du chitosane seront présentées. En effet, les méthodes de dégradation de ce polymère sont nombreuses et peuvent être effectuées par voies chimique, enzymatique ou physique. Suivant la technique utilisée, le clivage des liaisons peut être plus ou moins contrôlé. Certaines de ces techniques permettent la réduction des masses molaires alors que d'autres mènent à la formation d'oligosaccharides. Dans le cas de l'application, des oligomères de DP5 à DP20 sont visés. C'est pourquoi, après une étude bibliographique détaillée pour déterminer la méthode la plus adaptée à l'application présentée dans cette partie, l'obtention de COS par la désamination nitreuse sera exposée.

Par la suite, dans le chapitre 3, les différentes modifications chimiques réalisables sur le chitosane seront présentées dans le but de sélectionner la méthode la plus adéquate pour synthétiser des molécules amphiphiles. Des études modèles seront menées afin de déterminer les conditions idéales de réactions. Celles-ci seront reproduites sur les oligomères d'intérêt en utilisant différents types de chaînes grasses.

Dans le chapitre 4, les caractéristiques physicochimiques des tensioactifs synthétisés et sélectionnés seront déterminées. Pour cela, les concentrations micellaires critiques (CMC) seront mesurées par tensiométrie. Les comportements des tensioactifs en solution lors de la micellisation pourront être évalués par diffusion de la lumière, en mode

dynamique (DLS) pour la taille des micelles et statique (SLS) pour leurs formes. Toutes ces analyses permettront de mettre en relation la structure et les propriétés des tensioactifs. Enfin, ces tensioactifs seront utilisés pour mettre en émulsion une huile modèle afin d'en évaluer la stabilité et les propriétés rhéologiques.

Quelques perspectives de ce travail, notamment sur de nouvelles structures à bloc seront présentées dans le Chapitre 5.

Enfin, les conclusions et perspectives globales de cette étude seront exposées.

Chapitre 1

Contexte de l'étude

Table des matières du Chapitre 1

LES ÉMULSIONS DE BITUME.....	35
I. GENERALITES SUR LES EMULSIONS.....	35
II. LES EMULSIONS BITUMINEUSES	36
II.1. Les émulsions anioniques	37
II.2. Les émulsions cationiques.....	37
II.3. Propriétés des émulsions de bitume	38
II.3. 1) Propriétés d'usage.....	38
a) Stabilité au stockage.....	38
b) Viscosité.....	39
c) Vitesse de rupture	40
d) Adhésivité.....	41
II.3. 2) Tests usuels	41
a.) Teneur en liant.....	41
a) La granulométrie laser	41
b) Viscosité par temps d'écoulement	41
c) Indice de rupture	42
d) Résidus sur tamis	42
II.4. Fabrication des émulsions	42
II.4. 1) Préparation de la phase aqueuse	42
II.4. 2) Préparation du liant bitumineux	43
II.4. 3) Mise en émulsion	43
II.5. Utilisation des émulsions de bitumes	43
II.5. 1) Dégradations géométriques	44
II.5. 2) Dégradation de surface	44
II.5. 3) Discontinuités physiques.....	44
II.6. Domaines d'application	45
II.6. 1) Les graves-émulsions.....	45
II.6. 2) Les enduits superficiels.....	46
II.6. 3) Les enrobés coulés à froid	46
II.6. 4) Béton bitumineux à l'émulsion.....	47
GÉNÉRALITÉS SUR LES TENSIOACTIFS DANS LES ÉMULSIONS DE BITUME	48
III. STRUCTURE GENERALE DES TENSIOACTIFS DE COLAS	49
IV. EXEMPLES DE TENSIOACTIFS UTILISES PAR COLAS.....	50
IV.1. Tensioactif A (TOFA- Diméthylaminopropylamine)	50
IV.2. Tensioactif B (mélange de A et de TOFA-imidazoline).....	51
LE CHITOSANE.....	53
I. PREPARATION	53
I.1. Extraction de la chitine	53
I.2. Déacétylation de la chitine	54
II. CARACTERISATIONS DU CHITOSANE	55
II.1. Calcul du degré d'acétylation	55
II.2. Mesure des masses molaires	56
III. PROPRIETES	57
III.1. Solubilité	57
III.2. Viscosité	58
III.3. Propriétés biologiques	58
III.4. Les chitooligosaccharides (COS).....	58
V. EMULSIONS UTILISANT LE CHITOSANE ET SES DERIVES.....	59
CONCLUSIONS.....	61

Les émulsions de bitume

I. Généralités sur les émulsions

Une émulsion est par définition une dispersion sous forme de particules d'un liquide dans un autre liquide dans lequel il n'est pas soluble. Selon la norme NF EN ISO 862 (NF T73-000) d'octobre 1995, il s'agit d'un système hétérogène à deux ou plusieurs phases liquides, constitué d'une phase liquide continue et d'au moins une deuxième phase liquide dispersée dans la première sous forme de fines gouttelettes¹. Il s'agit d'une définition générale qui peut aussi bien s'appliquer à la sauce vinaigrette qu'au bitume.

Une émulsion est en fait un phénomène thermodynamiquement instable ou métastable puisqu'il s'agit d'un mélange forcé. En effet, les deux composants d'une émulsion ne sont pas miscibles et à l'état naturel, ils formeraient deux phases bien distinctes. Ainsi, la mise en émulsion nécessite une action extérieure (souvent mécanique) puis d'être stabilisée par la présence d'un émulsifiant, ou tensioactif, qui servira d'interface entre les deux liquides. La plupart des émulsions sont artificielles mais il existe tout de même des émulsions naturelles comme le lait ou les latex naturels (pavot, hévéa).

Les émulsions sont classées selon la nature de leur phase continue. Si celle-ci est aqueuse et que la phase dispersée est huileuse, l'émulsion est dite directe. On la note L/H pour huile dans eau (lipo/hydro). Inversement, lorsque la phase continue est huileuse et la phase dispersée aqueuse, l'émulsion est dite inverse ou H/L. De façon plus complexe, on retrouve des émulsions dont la phase dispersée est elle-même une émulsion. Celles-ci sont appelées émulsions doubles ou multiples (Figure 1).

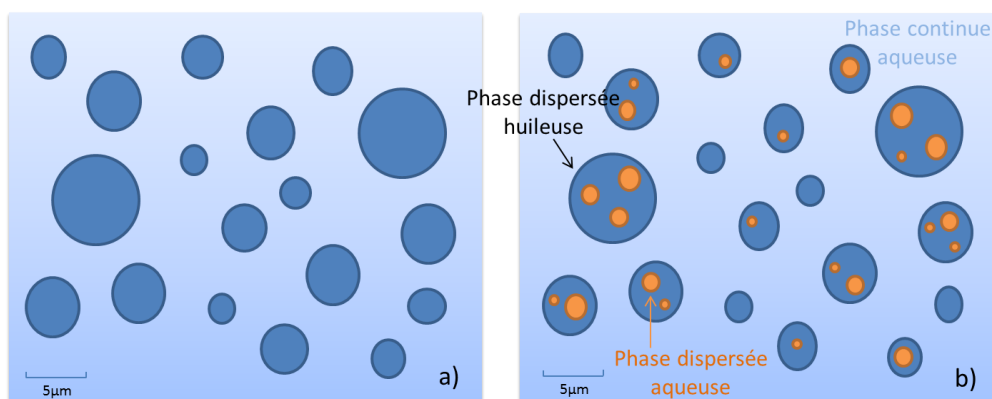


Figure 1. Schématisation a) d'une émulsion huile dans eau (L/H) ou eau dans huile (H/L) b) d'une émulsion multiple

On classe également les émulsions selon la taille de leurs particules. On peut donc parler de microémulsions, nano-émulsions ou mini émulsions pour des tailles inférieures à 500 nm ou encore de macro-émulsions pour des émulsions plus grossières. La dispersité des tailles de particules est une caractéristique importante d'une émulsion. On qualifie une émulsion de mono-disperse lorsque l'ensemble de ses particules possède un diamètre identique. A l'inverse lorsque la distribution des tailles est plus large on la qualifie de poly-disperse.

On la classe également selon la concentration en phase dispersée par rapport à la phase continue. On peut dire qu'une émulsion est diluée (10% m/v), semi-diluée (10-65% m/v) ou concentrée (au-delà de 65-70% m/v). A partir d'une certaine concentration, une déformation des gouttelettes est observée ce qui va modifier le comportement de l'émulsion et sa rhéologie. On parle alors d'émulsion gélifiée.

Enfin, les émulsions sont classées selon le type de tensioactif utilisé. On appelle émulsions de Pickering les émulsions à base d'émulsifiants solides (talc, argile...). Pour le reste, la nature du tensioactif (cationique, anionique, non ionique ou zwitterionique) donne son nom à l'émulsion.

II. Les émulsions bitumineuses

Une émulsion de bitume est constituée d'une phase aqueuse dans laquelle on retrouve le tensioactif ainsi que certains additifs et d'une phase contenant le bitume qui peut être modifié ou non par ajout de polymères spécifiques et/ou fluxant lui procurant de nouvelles propriétés (viscosité, étanchéité...). Le bitume est l'un des sous-produits du raffinage du pétrole. Il existe une infinité de bitumes différents, qui sont fonction des raffineries, de la matière première, des procédés de raffinage utilisés. Cette dispersité apporte un caractère d'autant plus complexe à la mise en émulsion des bitumes.

D'un point de vue historique, on retrouve des premières utilisations d'émulsions de bitumes dans le début du XX^{ème} siècle mais c'est le brevet n°202.021, déposé par les anglais Hugh Alan Mackay et George Samuel Hay le 9 mai 1922 sur les émulsions de bitume qui marque le point de départ de cette nouvelle génération de liant. En effet, avant cela seulement des enrobés à chaud ou goudrons étaient utilisés. C'est d'ailleurs ce type d'émulsion qui a donné son nom au groupe COLAS pour « **COLd ASphalt** »². Par la suite, la production augmente très vite en France comme à l'étranger pour atteindre 200 kt en 1935 et plus de 1 Mt en 1970¹. Aujourd'hui en France, environ un quart du bitume routier est consommé sous forme d'émulsion. En effet, les émulsions sont faciles à manipuler et permettent de diminuer les températures de travail (de 150°C pour le bitume chaud à 20-60°C pour une émulsion de bitume). Parmi les émulsions de bitume on retrouve

principalement les émulsions cationiques. Elles ont l'avantage de réagir avec les charges minérales des granulats et permettent ainsi une meilleure adhésion. Les émulsions bitumineuses routières anioniques, elles, ont disparu en France mais sont toujours présentes en Espagne et aux Etats-Unis par exemple. De plus, les émulsions de bitume sont des émulsions directes si bien que leur viscosité est faible puisque la phase dispersante est la phase aqueuse. Cela facilite donc le stockage et la manipulation.

II.1. Les émulsions anioniques

Une émulsion est dite anionique lorsque le tensioactif utilisé est anionique. Elles furent les premières émulsions mises en place sur le marché. Les agents de surface les plus utilisés sont les savons dont la partie hydrophile est l'ion carboxylate ($-\text{COO}^-$) et la partie lipophile une longue chaîne carbonée linéaire. Certains bitumes contiennent des acides gras pouvant se saponifier en milieu basique, on parle de bitumes auto émulsifiables.

II.2. Les émulsions cationiques

Les émulsions de bitume sont la plupart du temps des émulsions cationiques, c'est-à-dire utilisant un tensioactif cationique. La phase aqueuse est alors composée d'eau, de tensioactif activé par un acide, généralement l'acide chlorhydrique (0,15 à 1,50% de l'émulsion totale), et selon les spécificités requises d'autres additifs tels que des sels ou des agents épaississants. Lors de la mise en émulsion, la partie lipophile du tensioactif va s'adsorber sur le bitume alors que le groupement hydrophile sera à l'interface entre l'eau et le bitume (Figure 2).

L'avantage de cette méthode est que la particule de bitume chargée positivement va interagir avec les charges minérales du granulat à la rupture de l'émulsion et provoquer une bonne adhésion.

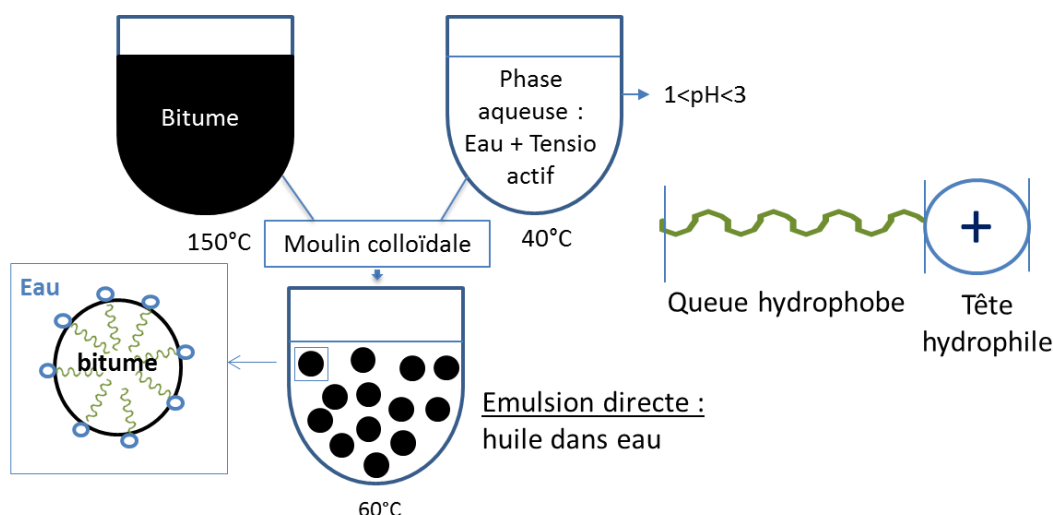


Figure 2. Schéma simplifié d'une émulsion directe de bitume avec un tensioactif cationique

II.3. Propriétés des émulsions de bitume

La norme NF EN 13808 ³ d'août 2013 définit les caractéristiques de performance que les différentes classes d'émulsions cationiques doivent satisfaire. Leur utilisation dans la construction et l'entretien de chaussées routières, des pistes d'aéroport ou des autres chaussées doit répondre aux exigences de cette norme. Celle-ci s'applique aux émulsions de bitumes purs, de bitumes fluxés ou fluidifiés et aux émulsions de bitumes modifiés par des polymères comprenant également l'ajout de latex. Des essais sur les caractéristiques de performance doivent être faits avant la mise sur le marché. Les propriétés d'usage ainsi que les tests les plus communs définis par cette norme sont présentés dans les paragraphes suivants.

II.3. 1) Propriétés d'usage

a) Stabilité au stockage

Une émulsion est tout d'abord définie par sa stabilité au stockage. En effet, il faut que l'émulsion puisse être stockée suffisamment longtemps à des températures entre 20 et 70°C pour répondre aux exigences commerciales et de réalisation des chantiers. Ce concept recouvre en fait trois phénomènes observables pour les émulsions de bitume (Figure 3):

- La décantation qui est un phénomène dû à la gravité. Les particules se déplacent de manière verticale sous l'action de la pesanteur et de la poussée d'Archimède. Le bitume étant plus lourd que l'eau, on observe sa sédimentation.
- Lorsque les particules se rapprochent les unes des autres jusqu'à atteindre une distance minimale, on parle de floculation qui est un phénomène réversible par action mécanique ou thermique.

- Un phénomène irréversible appelé coalescence au cours duquel les particules fusionnent et l'émulsion disparaît.

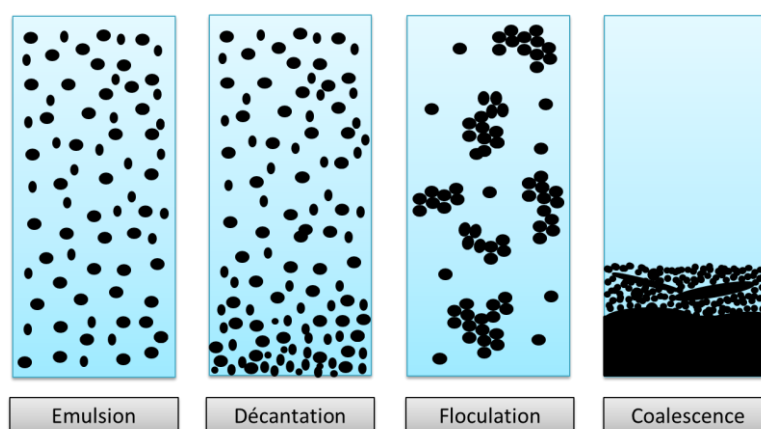


Figure 3. Représentation schématique des trois étapes d'une séparation au stockage

Elle peut être ralentie en diminuant la taille des particules, en augmentant la viscosité de la phase aqueuse ou en limitant les différences de densité entre les phases (loi de Stokes). La stabilité au stockage est également favorisée par un faible pH, la meilleure adhésivité étant obtenue entre pH 3 et 5. L'émulsion est généralement d'autant plus stable que la concentration en tensioactif est grande, même s'il existe une concentration optimum pour chaque formulation de bitume. Il faut également prendre en compte la stabilité au transport afin que celle-ci ne soit pas altérée sur les quelques centaines de kilomètres qu'elle parcourt.

b) Viscosité

La viscosité de l'émulsion est également un paramètre très important. En effet, elle doit pouvoir être manipulée facilement tout en étant conforme aux spécifications en vigueur. Elle doit être à la fois fluide pour permettre les pompages et épandages et suffisamment visqueuse pour ne pas s'écouler dans les pentes ou les bas-côtés. La viscosité dépend de plusieurs paramètres tels que les viscosités respectives des phases aqueuses et dispersées, la nature du tensioactif et sa concentration ou encore la granulométrie et la teneur en bitume (Figure 4).

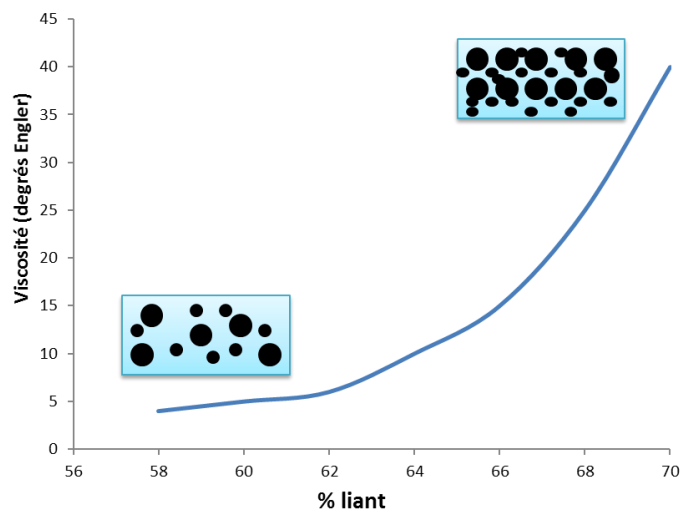


Figure 4. Courbe représentant la viscosité de l'émulsion en fonction de la teneur en bitume

La viscosité de l'émulsion dépend aussi fortement de la granulométrie et plus particulièrement de la dispersité de la distribution. Plus il y a des gouttelettes de tailles différentes au sein de l'émulsion, plus la viscosité sera faible. En effet, les espaces entre les grosses gouttelettes sont occupés par les petites gouttelettes ce qui facilite l'écoulement. A contrario, l'empilement est plus compact lorsque la dispersité est plus faible et donc la viscosité est plus élevée.

c) Vitesse de rupture

La rupture est définie par l'ensemble des phénomènes qui conduisent soit au processus irréversible de coalescence soit à la formation d'une phase bitumineuse continue (Figure 5). La vitesse de rupture de l'émulsion est adaptée aux types d'applications visées puisque l'émulsion doit rompre au contact des granulats pour servir de liant. Ainsi l'émulsion est adaptée aux types de granulats utilisés, leur composition chimique mais aussi leur forme, taille et porosité.

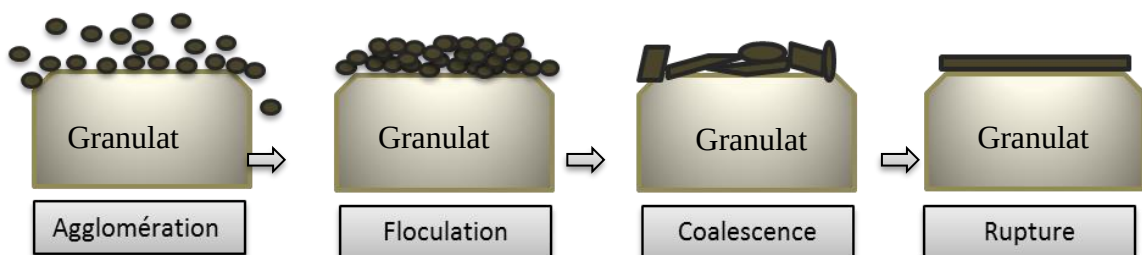


Figure 5. Schéma des étapes de la rupture d'une émulsion

d) Adhésivité

Enfin, l'émulsion ne doit pas altérer l'adhésivité du bitume sur les granulats. Généralement, les émulsions cationiques apportent une bonne adhésivité du liant sur les granulats puisque le tensioactif cationique a des affinités avec leurs charges minérales.

II.3. 2) Tests usuels

a.) Teneur en liant

La procédure EN 1428 prescrit une méthode pour la détermination de la teneur en eau dans les émulsions de bitume. Dans la pratique, l'eau de l'émulsion va être distillée après avoir fait le choix d'un bon solvant afin d'obtenir un mélange hétéro-azéotrope entre l'eau et l'émulsion. Le volume de distillat d'eau est ensuite mesuré afin de déterminer la teneur en liant ³.

a) La granulométrie laser

La granulométrie laser se base sur la théorie de Fraunhofer pour les grandes tailles et la théorie de Mie pour les particules inférieures à 10 µm. La théorie de Fraunhofer décrit l'intensité de lumière diffractée d'une particule par un faisceau placé à l'infini. Le rayonnement et l'angle de diffraction dépendent de la taille de la particule. Après avoir préparé l'échantillon (le diluer, le disperser en phase aqueuse ou dans un solvant approprié), celui-ci est exposé à un rayonnement laser. Les détecteurs, des photodiodes en silicium, vont numériser les intensités de lumière aux différents angles. Un traitement numérique prenant en compte les indices de réfraction et d'absorption des particules ainsi que l'indice de réfraction du milieu dispersant permet de déterminer leurs diamètres moyens, la médiane, la dispersion et leurs surfaces spécifiques.

La granulométrie conditionne les propriétés d'usage de l'émulsion. À formule constante on note d'importants changements au niveau des propriétés en fonction de la taille des gouttelettes. La granulométrie dépend de plusieurs paramètres comme la nature et la concentration en tensioactif mais encore de la température des différentes phases et de la vitesse de cisaillement lors de la mise en émulsion. Les propriétés de l'émulsion dépendent également du pH de la phase aqueuse. En effet, il conditionne l'équilibre à l'interface entre la phase aqueuse et la phase bitume et a également un effet sur l'interaction entre l'émulsion et les granulats.

b) Viscosité par temps d'écoulement

La viscosité par temps d'écoulement permet de caractériser le comportement de l'émulsion après répandage ou pendant le mélange avec les granulats. Selon les procédures EN 12846 et EN 16345, le temps d'écoulement d'une certaine masse

d'émulsion est déterminé dans un récipient normalisé, à 40°C et 85°C respectivement, à travers un orifice de 2 ou 4 mm ³.

c) Indice de rupture

Cette méthode de caractérisation permet de caractériser la stabilité d'une émulsion par l'étude de son comportement au contact de fines siliceuses de référence. Le comportement de l'émulsion vis-à-vis des granulats et du sable est ainsi évalué et l'émulsion peut être classifiée (rupture lente, moyenne ou rapide).

En pratique, des fines particules de référence sont ajoutées à une vitesse constante (entre 0,25 à 0,45 g/s) à une masse connue d'émulsion sous agitation manuelle ou mécanique. Après avoir ajouté une certaine masse de particules fines, l'émulsion rompt. Cette masse permet d'obtenir directement l'indice de rupture. Les ECL ou émulsions à rupture lente, plus stable, ont tendance à avoir une masse de particules fines importante, alors que les ECR ou émulsions à rupture rapide ont des masses plus faibles car l'émulsion rompt plus rapidement.

d) Résidus sur tamis

Le tamisage des émulsions est réalisé selon la procédure EN 1429 par la mesure de la quantité d'émulsion retenue sur des tamis de tailles de maille normalisées (0,50 et 0,16 mm) ³. L'analyse après n jours est également effectuée pour évaluer la stabilité au stockage.

Les méthodes décrites ci-dessus sont utilisées couramment dans la caractérisation d'émulsions de bitumes mais il en existe d'autres, telles que le pouvoir de percolation, la mesure de la teneur en distillat d'huile, le temps d'écoulement à 85°C ou encore la tendance à la décantation ³.

II.4. Fabrication des émulsions

II.4. 1) Préparation de la phase aqueuse

La phase aqueuse peut être fabriquée de manière continue ou discontinue soit sous forme diluée soit sous forme concentrée. La fabrication en mode discontinu consiste à préparer la phase aqueuse dans des cuves de préparation en y ajoutant l'eau et la totalité des additifs. La phase aqueuse est ensuite introduite dans le dispositif émulsionneur. En mode continu, la phase aqueuse est préparée et introduite dans le dispositif en continu. Dans le cas d'une émulsion concentrée, tous les composants sont dosés en continu et l'eau sera ajoutée à la fin. La température de la phase aqueuse est comprise entre 40 et 50°C.

II.4. 2) Préparation du liant bitumineux

La phase bitumineuse peut être constituée soit de bitume pur, soit d'un mélange de bitume modifié par des polymères (poly(styrène/butadiène) (SB), poly(styrène/butadiène/styrène) (SBS)) éventuellement sous forme de latex, en présence ou non d'additifs supplémentaires de l'ordre de quelques pour cent de l'émulsion. La température de la phase bitumineuse doit être telle que la viscosité de cette phase anhydre soit de l'ordre de 200 mPa.s (selon la dureté des bitumes, à une température entre 140°C et 170°C).

II.4. 3) Mise en émulsion

Il existe plusieurs techniques pour la mise en émulsion de bitume en continu. L'émulsion peut être créée par enrichissement progressif de la phase aqueuse émulsionnante, par action de moulins colloïdaux ou encore à l'aide de dispositifs statiques utilisant la vitesse et la pression des constituants. Il existe différents moulins colloïdaux caractérisés par exemple par la présence d'un entrefer réglable entre le stator et le rotor et leur vitesse de rotation. Ces paramètres influent directement sur la granulométrie de l'émulsion. Les moulins permettent de travailler en continu. L'émulsion est obtenue à des températures comprises entre 70 et 80°C (Figure 6).

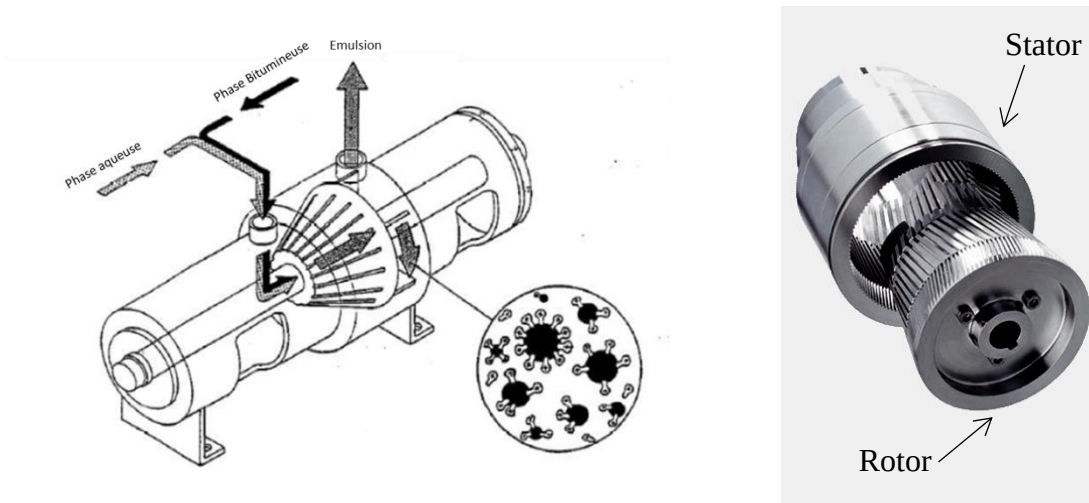


Figure 6. Schéma d'un moulin colloïdal et photographie d'un rotor stator

II.5. Utilisation des émulsions de bitumes

Les émulsions de bitume sont principalement utilisées pour l'entretien des routes. En effet, sous l'action du trafic et des intempéries, les chaussées subissent des dégradations plus ou moins importantes pouvant engendrer des dangers pour les utilisateurs. Il faut savoir que lorsqu'on parle de l'effet du trafic, on ne s'intéresse qu'au

nombre de poids lourds circulant sur la route, les voitures n'ayant pas ou peu d'effet sur les dégradations. Les dégradations peuvent être classées en trois catégories (Annexe 1).

II.5. 1) Dégradations géométriques

Parmi les dégradations géométriques, on retrouve les flaches qui sont des dépressions de forme arrondie dues à un défaut localisé de portance du sol, de qualité ou d'épaisseur des matériaux. Les affaissements de rives sont facilement reconnaissables, on observe des déformations très prononcées et très étendues sur le côté de la chaussée. Ils sont causés par un sous-dimensionnement, à une construction localement défectueuse ou à une pollution du corps de chaussée. L'orniérage correspond aux déformations permanentes longitudinales sous l'effet d'un trafic trop important pour le matériau choisi. Enfin, les nids de poules, bien connus des utilisateurs, sont des trous irréguliers causés par le départ de matériaux. Ils sont dus à une faiblesse localisée causée par un défaut de fabrication ou d'application de l'enrobé.

II.5. 2) Dégradation de surface

On parle de pelade lorsqu'on observe l'arrachement de la couche de roulement par plaques sur la totalité de son épaisseur. Cette déformation est causée par un problème au niveau du collage. Le plumage correspond au départ des gravillons d'un revêtement. Il apparaît dans le cas d'une mauvaise adhésivité du liant avec le granulat dû soit à une incompatibilité soit à de mauvaises conditions d'application (température, quantité de liant utilisée). Le ressuage se traduit par une remontée du liant en surface et s'observe par des différences de couleurs sur la route. Cela peut venir soit de l'utilisation de trop petits granulats ou de l'utilisation en excès de liant lors de l'exécution. Le glaçage qui se traduit par une faible adhérence est causé par l'usure du revêtement due à une trop faible dureté des granulats ou à l'excès de liant. Il se traduit par une présence excessive de liant en surface.

II.5. 3) Discontinuités physiques

Les fissures longitudinales apparaissent, comme leur nom l'indique, dans le sens de circulation des véhicules et sont causées par la fatigue de la chaussée. Cette fatigue est souvent due à une épaisseur insuffisante de l'enrobé ou le vieillissement du liant. Les fissures transversales sont perpendiculaires à la route et sont la conséquence de fissures situées dans les couches inférieures. Lorsque des ramifications sous forme de mailles sont observées, on parle plutôt de faïençage. Enfin, on peut observer des joints défectueux qui sont la traduction d'une mauvaise jonction entre deux bandes d'enrobés.

II.6. Domaines d'application

Il existe quatre domaines principaux d'application des émulsions en technique routière : les graves-émulsions, les couches de bases ou fondations recyclées en place à l'émulsion, les couches de roulement en béton bitumineux à l'émulsion et les couches de roulement de très faible épaisseur comme les enduits superficiels ou les enrobés coulés à froid et couches d'accrochages. La couche de roulement ne représente qu'une petite partie de la route mais elle doit assurer l'étanchéité, le confort à l'usager, l'adhésion vis-à-vis des véhicules, la résistance aux déformations et dégradations de surface (Figure 7). Une émulsion de bitume est généralement composée de 60, 65 ou 69% de bitume. La composition de l'émulsion dépendra de l'application et du type de bitume utilisé.

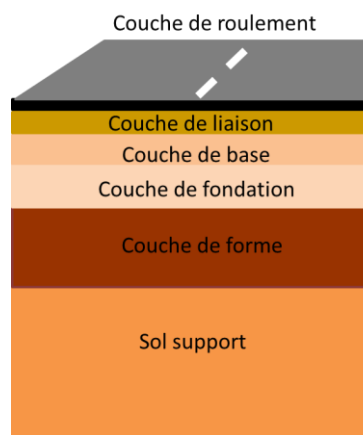


Figure 7. Schéma de la composition d'une route

II.6. 1) Les graves-émulsions

Il s'agit d'un mélange de gravillons de tailles maximales 10, 14 ou 20 mm, de sable et d'émulsion de bitume. Elle est obtenue par dispersion d'une émulsion de bitume à rupture lente contrôlée au sein d'une grave puis par malaxage à froid du mélange. Au contact des granulats, l'émulsion se rompt et le bitume se fixe sur la fraction possédant la plus grande surface spécifique, c'est-à-dire les fines et le sable. Cela forme alors un mastic plastique très riche en liant après malaxage ce qui va permettre l'enchâssement des plus gros gravillons. Cette technique prodigue au produit fini une bonne maniabilité jusqu'au compactage et permet également un stockage en tas pendant plusieurs jours voire semaines. Les graves-émulsions peuvent être utilisées pour tous les travaux routiers existants allant de la construction neuve aux travaux d'entretien (Figure 8).

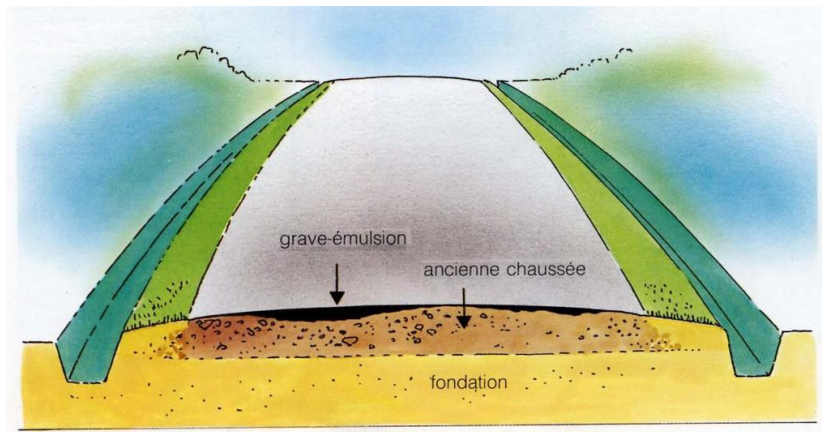


Figure 8. Schéma d'une route entretenue par grave-émulsion

II.6. 2) Les enduits superficiels

Un enduit superficiel est une couche de roulement de faible épaisseur constituée de couches superposées d'une émulsion de bitume et de gravillons. Ses principales applications sont l'imperméabilisation de la chaussée, l'entretien de surface d'une chaussée ou le traitement d'une chaussée neuve pour créer une couche de roulement. Un enduit superficiel dépend donc des granulats, ils doivent posséder une granularité peu étalée, une angularité contrôlée et leur propreté est également très importante puisque la présence d'argile est à proscrire. Il dépend également de l'émulsion de bitume dont la formulation sera choisie de manière appropriée en fonction du profil de la chaussée et la nature du support, de l'environnement, du climat, du trafic ou encore de la période d'exécution des travaux. Généralement, pour les enduits superficiels, la teneur en bitume au sein de l'émulsion est de 69% afin de lui assurer une viscosité suffisante lors de l'épandage sur des pentes par exemple. Il s'agit d'émulsion à rupture rapide puisque la circulation doit être rétablie le plus vite possible après application. Pour appliquer un enduit superficiel, la chaussée est d'abord nettoyée avant d'y répandre l'émulsion. Par la suite, les gravillons sont répandus de manière régulière avant de terminer par le compactage de l'enduit à l'aide d'un compacteur.

II.6. 3) Les enrobés coulés à froid

Un enrobé coulé à froid (ECF) est caractérisé par l'utilisation de granulats de roche massive identiques à ceux utilisés pour les enrobés à chaud ayant une granularité supérieure à 6 mm. Souvent, les émulsions pour ces enrobés sont enrichies par ajout de polymères ou d'émulsions de latex. De la même façon que pour les enduits superficiels, les émulsions sont formulées pour être à rupture rapide pour une réouverture rapide de la circulation. 85 à 90% d'un ECF est constitué de granulats qui sont préalablement mouillés

afin de faciliter leur enrobage. Du ciment ou de la chaux (1%) sont souvent ajoutés pour régler la vitesse de rupture. En ce qui concerne la mise en œuvre, il s'agit d'une machine unique qui va fabriquer l'ECF en mélangeant tous ses constituants et le répandre sur la chaussée. Ce type de technique est préconisé pour l'entretien préventif et curatif de chaussées routières et autoroutières mais aussi de pistes d'aviation ou les parkings. Les ECF possèdent de nombreux avantages puisqu'il s'agit de la technique d'enrobé la plus mince, que le bruit de roulement est modéré et qu'il n'y a presque pas de rejet de gravillons ce qui diminue la gêne pour les usagers. Il s'agit donc d'un bon compromis technico-économique.

II.6. 4) Béton bitumineux à l'émulsion

Il s'agit d'un enrobé à l'émulsion non ou très peu stockable qui est destiné à la réalisation de couches de roulement dans lequel tous les granulats sont recouverts d'une couche de liant. Le béton bitumineux à l'émulsion (BBE) est fabriqué en continu au sein d'un malaxeur selon un procédé spécial. Pour des épandages de fines couches, il est nécessaire d'utiliser au préalable une couche d'accrochage. Les BBE sont principalement utilisés en entretien particulièrement pour le renforcement de chaussées déformées. Ils sont intéressants pour les routes dans les tunnels puisqu'ils sont assez clairs ce qui améliore la visibilité des usagers. De plus ils ne génèrent pas de fumée, ils sont donc sans gêne pour les applicateurs.

Comme précisé dans les paragraphes précédents, les émulsions de bitume actuelles font usuellement état de l'utilisation de tensioactifs cationiques. Dans le paragraphe suivant, des généralités sur les tensioactifs cationiques seront énoncées et accompagnées d'exemples de tensioactifs utilisés par COLAS.

Généralités sur les tensioactifs dans les émulsions de bitume

Les tensioactifs ou agents de surface, sont des molécules amphiphiles d'origine naturelle ou synthétique constituées de deux parties ayant des propriétés différentes et opposées. On retrouve dans les tensioactifs une partie hydrophile (tête polaire) et une partie hydrophobe (queue apolaire). Ceux-ci possèdent de nombreuses propriétés intéressantes comme un pouvoir suspensif, détergent, moussant, émulsionnant, mouillant ou encore dispersant. D'autres propriétés spécifiques peuvent leur être ajoutées en fonction de l'application demandée. Les tensioactifs sont généralement classés selon quatre grandes familles:

- Les tensioactifs anioniques
- Les tensioactifs cationiques
- Les tensioactifs zwitterioniques (amphotères)
- Les tensioactifs non ioniques.

Pour qu'une émulsion soit stable dans le temps, il est nécessaire d'utiliser un tensioactif. Dans la plupart des cas pour les émulsions de bitume, des tensioactifs cationiques sont utilisés. Il s'agit, selon la norme NF EN ISO 862, de « tensioactifs s'ionisant en solution aqueuse pour fournir des ions organiques chargés positivement et responsables de l'activité de surface ». La « queue » de l'émulsifiant, constituée d'une chaîne carbonée plus ou moins grande, est lipophile alors que la « tête » plus polaire, composée du groupe réactif, est à caractère hydrophile. Pour des raisons de confidentialité, il est très difficile de connaître les structures des tensioactifs utilisés dans les formulations d'émulsions de bitume. Selon la section des fabricants d'émulsions routière de bitume (SFERB)², les agents de surface cationiques sont principalement des composés aminés, amines primaire, secondaire ou tertiaire, diamines, polyamines, ammonium, amido-amines etc.

Depuis quelques années, de nombreuses entreprises se sont attelées au développement de tensioactifs plus ou moins issus de la biomasse. Parmi ceux-ci, on retrouve les tensioactifs à base de glycine bêtaïne ⁴, de lignine, de protéines, de sophorolipides⁵, de sucres etc⁶. Ces tensioactifs peuvent être classés d'après la norme EN 16640 qui définit la teneur en élément biosourcé (Tableau 1). Dans cette norme, la biomasse est quantifiée par la mesure du carbone 14 biosourcé par rapport au nombre

total de carbone, et ainsi 4 grandes familles de tensioactifs peuvent être définies selon le tableau suivant.

Classe de tensioactif	X% ^{14}C biosourcé (m/m)
Totalement biosourcé	$X \geq 95$
Majoritairement biosourcé	$95 \geq X \geq 50$
Minoritairement biosourcé	$50 \geq X \geq 5$
Non biosourcé	$X \leq 5$

Tableau 1. Classe des tensioactifs en fonction du pourcentage de ^{14}C biosourcé

Le seuil des 50% est important car il définit le pourcentage minimum acceptable par le consommateur pour parler de biosourcé. La norme prend également en compte la fonctionnalité et l'efficacité du produit par rapport aux tensioactifs petrosourcés. En effet, s'il faut mettre cinq fois plus de matière pour avoir des propriétés émulsifiantes suffisantes, cela ne sert à rien d'utiliser des tensioactifs biosourcés.

III. Structure générale des tensioactifs de COLAS

Tout d'abord, il est connu que la partie lipophile de ces tensioactifs est composée de TOFA (Tall Oil Fatty Acids) qui constitue, en général, le squelette hydrocarboné des tensioactifs développés par COLAS. Il se présente sous la forme d'un liquide visqueux jaune-noir et odorant obtenu en tant que sous-produit du procédé kraft dans l'industrie papetière. Généralement extrait de la pulpe de pin, il est constitué d'un mélange d'acides gras principalement à chaînes C18 avec des insaturations : environ 40% d'acide oléique (1 insaturation), 30% de linoléique (2 insaturations) et 10% d' α -linoléique (3 insaturations) (Figure 9). Sa composition, i.e. la proportion de chacune des espèces est variable puisqu'elle dépend de la ressource et reste difficile à connaître étant données les structures très proches de chacun des acides. Le TOFA peut également contenir une proportion faible (< 10%) d'autres composés comme de l'acide abiétique ou des alcools gras.

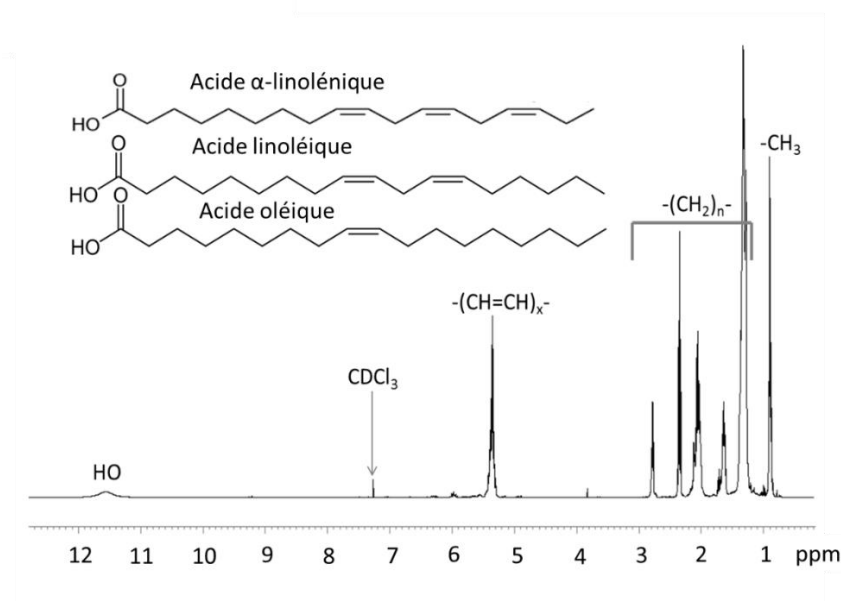


Figure 9. Spectre RMN ^1H du TOFA dans CDCl_3

Comme cela a été précédemment expliqué, les structures des tensioactifs utilisés par COLAS sont confidentielles. Ils sont généralement composés d'une queue lipophile constituée de TOFA et d'une tête hydrophile aminée pouvant être des amines primaires, secondaires ou tertiaires, diamines, polyamines, ammonium, amido-amines, imidazole, etc. Les tensioactifs usuels aminés se caractérisent par leur viscosité d'une part, leur taux de matière active et surtout par leur indice d'alcalinité obtenu par titration acide (exprimé en $\text{g}_{\text{HCl}}/\text{g}_{\text{émulsifiant}}$). Afin d'approcher leurs structures, deux des tensioactifs communément utilisés chez COLAS ont été parallèlement caractérisés.

IV. Exemples de tensioactifs utilisés par COLAS

IV.1. Tensioactif A (TOFA- Diméthylaminopropylamine)

En comparant le spectre RMN ^1H du tensioactif A à celui du TOFA (Figure 10), on observe l'apparition de pics à 2,20 ppm (protons H9) correspondant à des protons méthyliques (CH_3) d'une amine tertiaire et un pic à 7,05 ppm correspondant à une fonction amide. Ce qui permet de conclure que la tête polaire du tensioactif est constituée d'une amido-amine. La combinaison des analyses spectroscopiques à une analyse de spectrométrie de masse a permis de remonter à la structure de l'émulsifiant A qui est donnée ci-dessous.

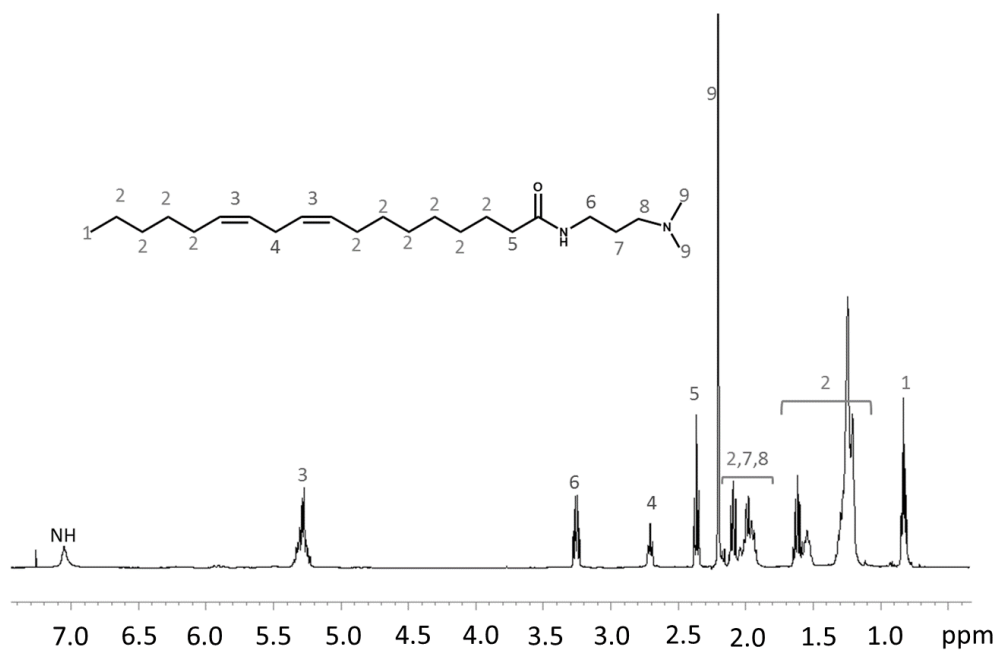


Figure 10. Spectre RMN ^1H du tensioactif A dans CDCl_3

IV.2. Tensioactif B (mélange du composé A et de TOFA-imidazoline)

Le tensioactif B est un mélange du composé A et d'une forme imidazole d'après le fournisseur. Cette structure a pu être confirmée par RMN ^1H et spectrométrie de masse (Figure 11).

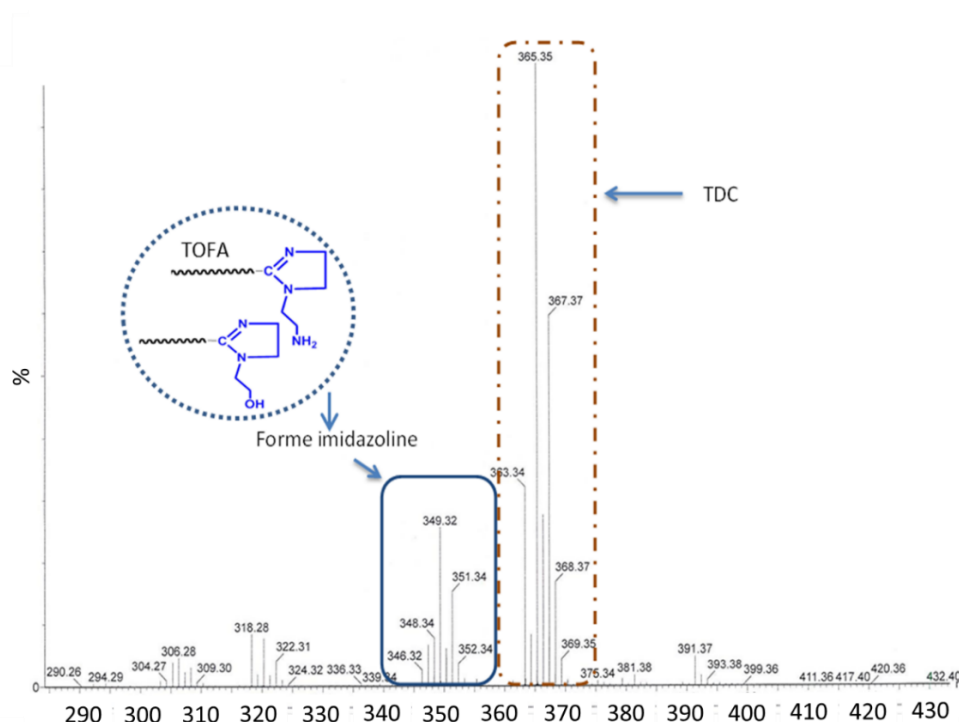


Figure 11. Spectre de masse du tensioactif B

Dans les deux structures présentées ci-dessus, A et B, on retrouve dans la tête hydrophile plusieurs amines capables de se protonner en milieu acide. Lors de la mise en émulsion du bitume, les molécules tensioactives ainsi chargées positivement s'adsorbent à l'interface bitume/eau avec la tête polaire dans l'eau et la chaîne lipophile (TOFA) orientée vers le bitume. Il se forme ainsi des gouttelettes de bitume dont l'interface est chargée positivement, ce qui stabilise l'émulsion par répulsion électrostatique. La rupture des émulsions se fait soit par une réaction de neutralisation sur les matériaux électropositifs (basalte, calcaire...) soit par une attraction sur les matériaux électronégatifs (silex, granit...). Ces réactions d'attraction ou de neutralisation entraînent la formation de carbonates ou de silicates d'ammonium qui apportent de l'adhésivité pendant l'épandage. En conséquence, plus il y a d'amines dans le tensioactif, plus les propriétés adhésives seront importantes.

Les amines qui constituent la tête polaire des tensioactifs utilisés à présent sont généralement corrosives, toxiques et dangereuses pour l'environnement. Une manière de s'affranchir de ces dangers est de les substituer avec des amines non toxiques telles que celles portées par le chitosane, définit ci-dessous. Le TOFA pourra être utilisé en tant que partie hydrophobe pour substituer une partie des amines du chitosane tout en conservant des amines libres pour les propriétés d'adhésivité.

Le chitosane

I. Préparation

I.1. Extraction de la chitine

Le chitosane est un polysaccharide constitué d'unités β -D-glucosamine et N-acétyl- β -D-glucosamine reliées par une liaison glycosidique (1 $\rightarrow$ 4) (Figure 12). Il est principalement obtenu à partir de la modification chimique de la chitine qui est avec la cellulose, le polymère naturel le plus abondant sur Terre. La chitine comme produit commercial représente cependant une production encore faible comparée à la cellulose : 2 000 à 3 000 tonnes par an, dont 60-70 % sert à produire le chitosane contre 100 à 200 millions de tonnes pour la cellulose. Le prix de vente du chitosane varie entre 20 et 10 000 euros le kilogramme en fonction de ses caractéristiques (masse molaire et degré d'acétylation et pureté notamment liée à son origine)⁷.

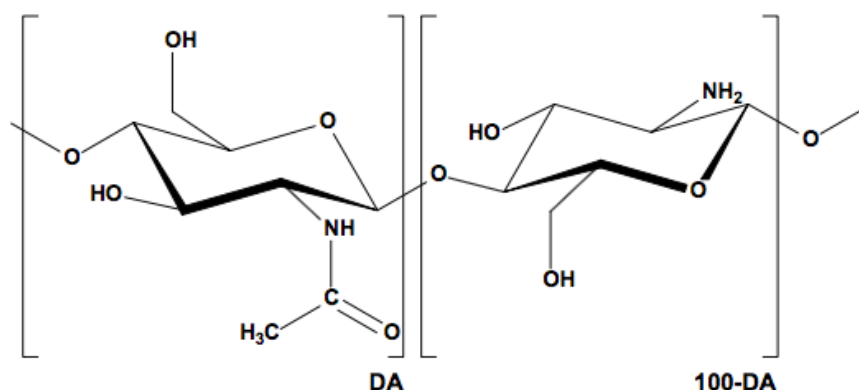


Figure 12. Structure du chitosane ou de la chitine

La chitine est principalement extraite des cuticules de crabes ou de crevettes et de l'endosquelette des céphalopodes tels que les seiches ou les calamars mais peut également provenir d'algues, de levures, de larves d'insectes ou de champignons⁸. Le chitosane est un dérivé proche de la chitine puisqu'il s'agit de sa version N-désacétylée, même si la désacétylation est rarement complète. La principale source de chitosane vendue sur le marché résulte de la désacétylation de la chitine présente dans les crustacés. Plus récemment, l'extraction de chitine à partir d'élevage d'insectes s'est développée.

L'extraction de la chitine est réalisée en plusieurs étapes successives puisque la matière première provenant des arthropodes ou céphalopodes contient également des sels minéraux (carbonate de calcium principalement), des lipides, des protéines et des

pigments ^{7,9}. Dans une première étape, l'ajout d'acide chlorhydrique permet une déminéralisation. Ensuite, un traitement basique par l'ajout de soude ou de potasse permet l'élimination des protéines. Enfin, la chitine est décolorée en présence d'agents oxydants tels que le permanganate de potassium ou peroxyde d'hydrogène et ce afin d'éliminer les pigments résiduels tels que les caroténoïdes ⁷. Toutes ces modifications sont susceptibles de dégrader la chitine. C'est pourquoi on estime que pour un kilogramme de carapaces fraîches environ 25 grammes de chitine sèche sont obtenus.

I.2. Déacétylation de la chitine

Le chitosane est obtenu par déacétylation de la chitine ainsi extraite. Le degré d'acétylation (DA) qui représente la proportion d'unité acétylée par rapport au nombre de motifs total constitue la principale différence entre la chitine et le chitosane. Parmi les diverses méthodes de déacétylation utilisées industriellement, la plus courante met en jeu l'hydroxyde de sodium. Le DA obtenu dépend de la concentration de soude, de la température et du temps de réaction. La dégradation des chaînes du polymère est observée quand la concentration en NaOH augmente. Aux basses concentrations en NaOH, la déacétylation procède lentement. Le degré de déacétylation peut être augmenté avec le temps de réaction. Celui-ci entraîne une croissance des rendements de déacétylation, mais également l'hydrolyse de la chaîne polysaccharide. Selon le nombre de fois où ce traitement est répété des degrés d'acétylation compris entre 5 et 30 % sont atteints^{7,10}. La déacétylation peut s'effectuer en milieu acide ou basique puisqu'il s'agit d'hydrolyser la liaison amide. Cependant, la réaction en milieu basique est préférée afin d'éviter au maximum l'hydrolyse de la chaîne polymère. La chitine est donc traitée pendant 0,5 à 10 h par des solutions de soude très concentrées (30-50 w%) à des températures comprises entre 80 °C et 140 °C. Le degré d'acétylation obtenu dépend du nombre de fois que le traitement est effectué. Généralement, les DA sont compris entre 5 et 30 %. Une dépolymérisation limitée se produit lors du traitement alcalin. Celle-ci dépend, de la température, du temps de réaction et de la quantité de soude utilisée pour la déacétylation. On estime que la production de 1 kg de chitosane de DA=30 % obtenu à partir de cuticules de crevettes requiert 6,3 kg de HCl, 1,8 kg de NaOH et 1,4 m³ d'eau¹¹.

La réacétylation contrôlée du chitosane est également envisageable pour des applications particulières. Celle-ci se réalise en milieu eau/alcool et met en jeu le chitosane et l'anhydride acétique.

II. Caractérisations du chitosane

II.1. Calcul du degré d'acétylation

La présence des motifs N-acétyl-glucosamine dans le chitosane entraîne un grand effet sur de nombreuses propriétés du polymère comme la solubilité, le gonflement dans l'eau et la biodégradabilité du chitosane. Déterminer le degré de déacétylation est par conséquent essentiel. La RMN du proton est actuellement la méthode la plus utilisée^{12, 13}. Elle ne nécessite aucun étalonnage et permet d'utiliser des faibles quantités de chitosane. Généralement, les échantillons de chitosane sont dissouts dans de l'eau deutérée par ajout d'une goutte d'acide concentrée tel que l'acide chlorhydrique. Le spectre est ensuite obtenu entre 70 et 80°C dans le but d'observer les signaux caractéristiques qui sont masqués par le D₂O à température ambiante (Figure 13). Par la suite, il existe plusieurs méthodes de calcul. La première méthode consiste à comparer la résonance des protons des groupes méthyle (H7) avec celle des protons du cycle (H2-H6), située entre 3 et 4 ppm (Figure 13). Les intégrales de ces signaux sont alors reliées au DA de la façon suivante :

$$(1) \quad DA(\%) = \frac{\frac{1}{3}I_{CH3}}{\frac{1}{6}I_{(H2-H6)}}$$

Il est également possible de calculer le DA en utilisant les aires des protons anomères des unités acétylées et non acétylées entre 4,7 et 5 ppm.

$$(2) \quad DA(\%) = \frac{I_1}{I_1 + I_{1'}}$$

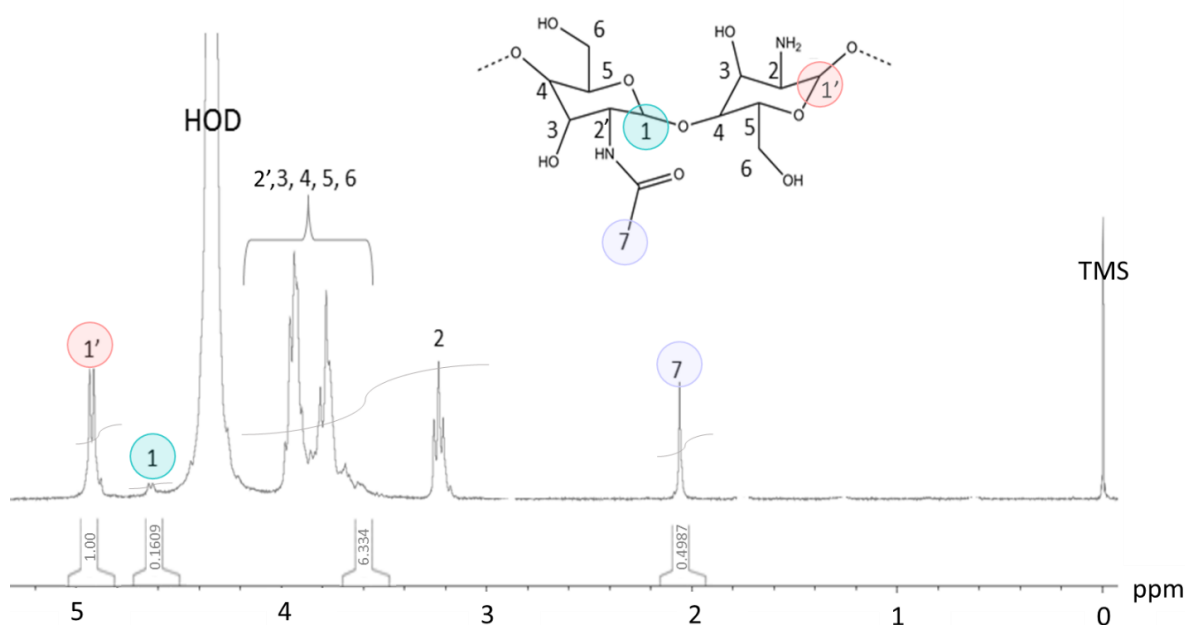


Figure 13. Spectre RMN ¹H d'un chitosane natif de 30 kg/mol (D₂O, 80°C, 128 scan)

Enfin, il est envisageable de mesurer le DA en spectroscopie infrarouge en calculant des rapports d'aires de signaux caractéristiques ¹¹ (Annexe 2). L'inconvénient de cette méthode est que pour être précis l'échantillon doit être complètement sec ce qui est rarement le cas avec le chitosane.

II.2. Mesure des masses molaires

La seconde caractéristique importante est la masse molaire, en masse ou en nombre ainsi que sa dispersité. La masse molaire dépend du procédé de fabrication, celui-ci pouvant conduire à des dépolymérisations. Les masses molaires dépendent du type d'application désirée puisque la masse molaire affecte la solubilité ainsi que les propriétés rhéologiques du chitosane.

La chromatographie par perméation de gel (GPC), également appelée chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ou chromatographie par filtration sur gel (GFC), est une technique chromatographique liquide spécialement dédiée aux polymères et macromolécules. Les polymères contenus dans l'échantillon injecté seront séparés selon leurs tailles, autrement dit selon leurs masses molaires après passage à travers une ou plusieurs colonnes dont la phase stationnaire est constituée d'un gel poreux. Dans le cas d'une GPC en phase aqueuse, dédiée à la caractérisation de polymères hydrosolubles comme le chitosane, la phase stationnaire de ce type de colonnes est une matrice de polymères, un mélange de polyéthylène glycol et de polyéthylène oxyde (PEG/PEO). Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature avec des colonnes de différents fournisseurs étalonnées avec des standards de pullulan de différentes masses molaires. Vasilieva et al.¹⁴ décrivent l'analyse de chitosane en utilisant une solution tampon de NaCl à 0,1 mol/L avec 0,01 % d'acide trifluoroacétique alors que R.Akhil Krishnan et al.¹⁵ décrivent l'utilisation d'un tampon acétate et acide acétique. Dans le cas d'analyse d'oligomères de chitosane, il est nécessaire de travailler avec des colonnes spécifiques pour de faibles masses molaires afin d'avoir de bonnes résolutions lors de la séparation.

Les masses molaires du chitosane sont également souvent déterminées par viscosimétrie capillaire. Lorsqu'un polymère est mis en solution, il est possible de mesurer sa viscosité intrinsèque à l'aide de viscosimètre adapté. La masse molaire viscosimétrique, qui dépend du solvant et de la température, est reliée à cette viscosité par l'équation de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) ¹⁶ :

$$(3) \quad [\eta] = K \times M^a$$

Il s'agit d'une relation semi-empirique. Les coefficients K et a varient avec le couple (solvant/polymère) considéré et la température de la solution. Dans la littérature, on retrouve des tables répertoriant les valeurs des coefficients pour chaque couple. Les

nombreuses valeurs de K et a fournies par la littérature ^{17,9} témoignent de la difficulté à établir une relation universelle pour le chitosane. En effet, les sources de chitosane sont très variables (marine, insecte, champignon) et les traitements qu'il subit à l'extraction et pendant la déacétylation sont souvent différents ce qui fait que des chitosanes de même DA et masses molaires n'auront pas forcément le même comportement en solution. Ainsi les coefficients disponibles dans la littérature ne sont pas toujours applicables. Il faudrait donc se placer dans les mêmes conditions que celles décrites dans la littérature pour avoir quelque chose de comparable, ce qui revient à utiliser les mêmes échantillons de chitosane. On peut donc estimer que les masses molaires obtenues par viscosimétrie sont très approximatives.

III. Propriétés

III.1. Solubilité

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels et cationiques. En milieu acide, il se comporte comme un polycation à forte densité de charges. Son comportement est décrit par l'équilibre suivant :

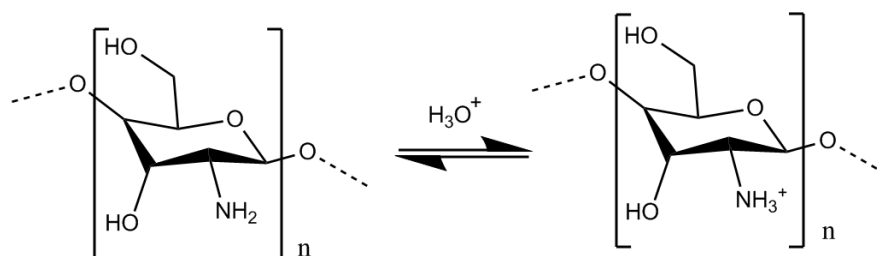


Schéma 1. Comportement du chitosane en milieu acide

Le chitosane est une base faible de pKa compris entre 6,3 et 6,7 ¹¹. Les nombreuses liaisons hydrogènes entre ses différentes fonctions sous sa forme amine sont responsables de son insolubilité dans l'eau. La protonation, par l'ajout d'un acide, des fonctions amine présentes sur la macromolécule, implique la destruction de ce réseau et la solvation de la chaîne.

La solubilité du chitosane varie en fonction de sa masse molaire mais également en fonction de son DA. En effet, plus le chitosane est acétylé, plus la gamme de pH dans lequel il reste soluble est grande; afin d'atteindre une solubilité à tout pH, il est nécessaire d'avoir un DA supérieur à 50%. Cependant, la solubilisation directe à pH>4,5 est impossible du fait des liaisons hydrogène. Il est nécessaire de solubiliser le chitosane en milieu acide et d'augmenter le pH petit à petit jusqu'à atteindre un pH plus élevé (jusqu'à 6,5).

III.2. Viscosité

Un autre paramètre qui concerne le comportement du chitosane en solution est sa viscosité. Celle-ci est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. Elle dépend principalement du DA et du pH qui déterminent la densité de charges sur le polymère. Une forte densité de charge implique une conformation des macromolécules très étendue et donc une viscosité plus importante. Au contraire, un polymère peu chargé sera sous forme de pelote statistique et est caractérisé par une faible viscosité. La viscosité est également fonction des masses molaires du chitosane et de la concentration de la solution ¹⁰. De manière générale, il est difficile de concentrer des chitosanes de hautes masses molaires (>150.000 g/mol) à plus de 1% (w/v) en solution acide sans obtenir un gel.

III.3. Propriétés biologiques

Le chitosane est biodégradable. Sa dégradation est liée à son degré d'acétylation et se fait essentiellement par une enzyme non spécifique, la lysozyme ¹⁸. Les produits de dégradation sont des oligomères acétylés ou non qui sont reconnus par l'organisme et utilisés dans divers processus biochimiques ¹⁹.

Les tensioactifs utilisés dans les émulsions de bitume ne sont que très rarement d'origine naturelle. Le chitosane, lui, est un polymère naturel, biorésorbable, biodégradable et renouvelable. Sa non toxicité est illustrée par une dose limite administrable de 17 g/kg par jour ⁷. Ces caractéristiques en font un matériau répondant à la demande croissante de matières premières issues de la biomasse et non du pétrole. Il a un grand potentiel dans le domaine biomédical notamment en médecine régénératrice ou pour la vectorisation de médicaments ²⁰. Son hémocompatibilité permet des applications en tant que revêtement d'objets mis en contact avec le sang. Il trouve également des applications dans les cosmétiques, l'agriculture et le traitement des eaux. Toutefois sa consommation reste plus importante en tant que complément alimentaire pour ses vertus amincissantes ou coupe-faim.

III.4. Les chitooligosaccharides (COS)

Les chitooligosaccharides (COS) reçoivent un intérêt grandissant depuis plusieurs années avec des applications diverses principalement dans le domaine biomédical. Les COS sont souvent définis comme des chitosanes avec un degré de polymérisation (DP) inférieur à 20 ²¹, c'est-à-dire avec des masses molaires moyennes inférieures à 4 000 g.mol⁻¹. Cependant, dans la littérature de nombreuses équipes parlent de COS pour des chitosanes de masses molaires inférieures à 20 000 g.mol⁻¹ ^{22, 23}. Les COS sont soit constitués d'unités de β -D-glucosamine, soit d'un mélange de β -D-glucosamine et d'acétyl-

β -D-glucosamine organisé de manière aléatoire. Les COS sont définis par certaines propriétés uniques telles que la solubilité dans l'eau, la pénétrabilité de la membrane cellulaire, l'absorption facile et diverses activités biologiques ^{24, 25}. Il convient également de noter que les COS sont plus faciles à traiter, en raison de moins d'enchevêtrement des chaînes et d'encombrement stérique qui leur confèrent une solubilité directe dans l'eau pour des DP <20. Les COS sont insolubles dans l'acétone, le butanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, propanol et pyridine mais contrairement au chitosane, partiellement soluble dans le méthanol et dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF) lorsqu'ils sont chauffés ²⁶. De plus pour ces oligomères, plus les masses molaires sont petites, meilleure est la solubilité. L'utilisation de COS permet de réduire la viscosité et de travailler à une concentration plus élevée. Les COS sont reportés pour le traitement de l'asthme, le paludisme, la prévention de tumeurs, le contrôle de la tension artérielle et sont connus pour avoir également des effets neuroprotecteurs pour le traitement de la maladie d'Alzheimer ²⁷. En effet, leurs activités biologiques, qui incluent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, anti-tumorales et antioxydantes ont été rapportées pour être meilleures que celles du chitosane ^{28, 29, 30}.

V. Emulsions utilisant le chitosane et ses dérivés

Le caractère épaississant du chitosane de haute masse molaire (540 kg.mol⁻¹) est confirmé par De Souza Soares et al.³¹ lors d'ajout de chitosane dans une émulsion d'huile de tournesol. Il en résulte que le chitosane possède un caractère épaississant à moindre concentration par rapport aux autres polysaccharides utilisés industriellement (0,1 g/100g).

Mallawarachchi et al.³² décrivent l'utilisation d'oligomères de chitosane (1.500 g/mol) dans une émulsion de bitume. Dans ce cas, deux types d'émulsions sont étudiées, une émulsion à rupture rapide, c'est-à-dire utilisant peu de tensioactif et une émulsion à rupture lente. Les travaux consistent à remplacer le tensioactif d'usage en partie par du chitosane (jusqu'à 60% pour l'émulsion à rupture rapide et seulement 20% pour l'émulsion à rupture lente). La viscosité étant un paramètre fondamental dans une émulsion de bitume, c'est elle qui régit la quantité de chitosane que l'on peut introduire dans la phase aqueuse. Il découle de cette expérience que les oligomères de chitosane possèdent un caractère épaississant. Cependant, son caractère émulsifiant n'est pas mis en valeur puisque plus il y a de chitosane qui remplace le tensioactif dans l'émulsion, moins celle-ci est stable dans le temps. De plus, le temps de rupture est réduit ce qui confirme que le chitosane doit être modifié pour apporter de meilleures propriétés émulsifiantes. Par exemple, Oh et al.³³ montrent l'utilisation de chitosane modifié avec des oligomères de N-isopropylacrylamide et de lysine (CSNLYS) permettant l'obtention d'émulsions huile dans

eau concentrées (75% (m/m)). Himani et al.³⁴ proposent un nouveau tensioactif cationique à base de chitosane modifié permettant de réduire la viscosité du pétrole brut tandis que Al-Sabagh et al.³⁵ modifient des oligomères de chitosane (2.000 g.mol^{-1}) pour les utiliser comme agents de dispersion pour le pétrole dans l'eau de mer. Dans les deux cas, le chitosane est d'abord modifié en *O*-carboxyméthyl chitosane permettant une seconde modification avec le bromure de 4-N,N-diméthyl-N-dodecyl-amino-benzaldéhyde (DDABB) et l'octanal respectivement. Les résultats de ces deux études confirment l'interaction entre les oligomères de chitosane modifiés et le pétrole brut.

Les oligomères de chitosane ont également été utilisés dans des émulsions de Pickering comme reporté par Alison et al.³⁶. Il s'agit d'une émulsion stabilisée par des particules solides. Dans le cas de cette étude, des nanoparticules d'oligochitosane et de silice ont été formées puis utilisées pour émulsifier et stabiliser de l'huile de maïs. Cependant, il s'agissait d'une émulsion très peu concentrée en huile (10 % w/w) ce qui est très faible en comparaison des émulsions de bitume.

Concernant le greffage de chaînes grasses sur le chitosane ou les oligochitosanes, les domaines d'application sont centrés autour de l'encapsulation médicamenteuse. Généralement, des acides gras tels que l'acide palmitique³⁷, ou stéarique^{22, 38, 39} sont greffés sur des oligomères de chitosane et auto assemblés sous forme de micelles pour encapsuler un principe actif. Cependant, aucune mise en émulsion d'huile quelconque par ce type de structure n'est décrite dans la littérature. De plus, bien souvent les degrés de substitutions obtenus sont assez faibles. Les conditions de réaction utilisées lors de ces synthèses sont décrites plus en détails dans le chapitre 3.

D'un point de vue général, le chitosane en tant que tel est principalement utilisé comme épaississant dans des émulsions huile dans eau ou dans des émulsions de Pickering qui ne sont pas envisageables pour l'application. De plus, il ne peut être substitué que partiellement aux tensioactifs actuels dans le cas des émulsions de bitume. Les modifications chimiques des COS en plusieurs étapes décrites dans la littérature pour l'utiliser en tant qu'émulsifiant sont assez fastidieuses. Le greffage d'acides gras sur des oligosaccharides pour les rendre amphiphiles est lui fortement utilisé principalement dans des applications médicales. Il y a donc un fort intérêt à utiliser ces oligomères modifiés dans un nouveau domaine d'application: les émulsions bitumineuses. Ces modifications chimiques semblent prometteuses afin de définir et d'étudier de nouvelles propriétés tensioactives. De plus le potentiel caractère épaississant du chitosane représente un atout majeur puisque ce sont des propriétés qui sont souvent recherchées dans le domaine routier.

Conclusions

Pour garantir une émulsion stable, il est nécessaire d'utiliser un tensioactif cationique, qui doit permettre la mise en émulsion directe du bitume concentrée (60 à 70%) à une concentration donnée (entre 0,15 et 1,50% de l'émulsion (m/m)). Deux des tensioactifs principaux utilisés par COLAS ont été présentés. Leurs propriétés constitueront un élément de comparaison essentiel lors des caractérisations des tensioactifs synthétisés dans cette étude.

De nos jours, les tensioactifs utilisés par COLAS sont principalement des produits toxiques pour l'utilisateur mais aussi pour l'environnement. De plus, en cas de fuite durant le transport ou lors du stockage, les conséquences sur l'écosystème pourraient être très graves. C'est pourquoi COLAS s'intéresse fortement à la fabrication d'un tensioactif cationique à base de produit biosourcé et non toxique pour remplacer une partie voire la totalité de sa gamme de tensioactifs. Le chitosane est un polysaccharide dont l'extraction est industrialisée, il s'agit d'une ressource grandissante constituant une valorisation de la biomasse puisqu'il est principalement fabriqué à partir des déchets de la pêche et constitue également un sous-produit de la culture d'insectes. Ce polymère, brut ou modifié chimiquement, est déjà utilisé dans de nombreux domaines, principalement autour du biomédical. Il est donc intéressant de lui donner un nouveau domaine d'application en tant que tensioactif pour des émulsions de bitume. En effet, en plus d'être non toxique, il s'agit d'un polymère naturellement cationique source d'amines non toxiques fonctionnalisables. Du fait de sa faible solubilité il est intéressant d'envisager une technique de dépolymérisation afin de pouvoir greffer des chaînes grasses sur le chitosane avec plus de facilité et un meilleur rendement. De plus, une dépolymérisation permettra de réduire la taille de la chaîne hydrophile du tensioactif et d'obtenir des oligomères de chitosane dont les propriétés sont d'autant plus intéressantes. C'est pourquoi, pour remplacer la partie hydrophile des émulsifiants actuels, des oligomères de chitosane ont été choisis. Ceux-ci pourront par la suite être modifiés par exemple à l'aide du TOFA. Ce mélange d'acides gras déjà utilisé dans la fabrication des tensioactifs actuels de COLAS est également issu de la biomasse. Différentes réactions seront mises en place et optimisées afin de modifier les oligomères pour obtenir des structures amphiphiles tout en conservant des amines libres pour optimiser les propriétés d'adhésivité. D'autres greffons biosourcés pourront également être envisagés.

Références bibliographiques

- (1) USIRF Routes de France SFERB. *Les Émulsions de Bitume*; 2006.
- (2) Hugh Alan Mackay. US1542626 (A) - Bituminous Emulsion. US19230631471 19230411, 1925.
- (3) Web, S. *Bitumes et Liants Bitumineux Cadre de Spécifications Pour Les Émulsions Cationiques de Liants Bitumineux_ICSNF EN 13808*; 2013.
- (4) Goursaud, F.; Berchel, M.; Guilbot, J.; Legros, N.; Lemiègre, L.; Marcilloux, J.; Plusquellec, D.; Benvegnu, T. Glycine Betaine as a Renewable Raw Material to “Greener” New Cationic Surfactants. *Green Chem.* **2008**, 10 (3), 310–332. <https://doi.org/10.1039/b713429k>.
- (5) Delbeke, E. I. P.; Bogaert, I. N. A. Van. Sophorolipid Modification : The Power of Yeasts and Enzymes Prospects of Practical Application of Sophorolipids , Cellobiose Lipids , and MELs. **2018**, 18.
- (6) Hayes, D. G.; Smith, G. A. *Biobased Surfactants: Overview and Industrial State of the Art*, Second Edi.; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812705-6.00001-0>.
- (7) Gregorio Crini , Pierre-Marie Badot, E. G. *Chitine et Chitosane Du Biopolymère à l'application*. **2009**
- (8) Zargar, V.; Asghari, M.; Dashti, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Rev.* **2015**, 2 (3), 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>.
- (9) Onsosyen, E.; Skaugrud, O. Metal Recovery Using Chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1990**, 49 (4), 395–404. <https://doi.org/10.1002/jctb.280490410>.
- (10) Jacques Desbrières. Chitine et Chitosane. **2002**
- (11) Christophe shatz. Chitosane : Comportement En Solution et Formation de Particules. **2003**. p34-48
- (12) Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A. N.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M. D.; Gupta, A. A Validated 1H NMR Method for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 32 (6), 1149–1158. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00155-9).
- (13) Thevarajah, J. J.; Van Leeuwen, M. P.; Cottet, H.; Castignolles, P.; Gaborieau, M. Determination of the Distributions of Degrees of Acetylation of Chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 95, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.056>.
- (14) Vasilieva, T.; Sigarev, A.; Kosyakov, D.; Ul'yanovskii, N.; Anikeenko, E.; Chuhchin, D.; Ladesov, A.; Hein, A. M.; Miasnikov, V. Formation of Low Molecular Weight Oligomers from Chitin and Chitosan Stimulated by Plasma-Assisted Processes. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 163, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.026>.
- (15) Krishnan, R. A.; Deshmukh, P.; Agarwal, S.; Purohit, P.; Dhoble, D.; Waske, P.; Khandekar, D.; Jain, R.; Dandekar, P. Proton Play in the Formation of Low Molecular

- Weight Chitosan (LWCS) by Hydrolyzing Chitosan with a Carbon Based Solid Acid. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.082>.
- (16) Halabalová, V.; Šimek, L.; Dostál, J.; Bohdanecký, M. Note on the Relation between the Parameters of the Mark-Houwink-Kuhn- Sakurada Equation. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2004**, *9* (1–3), 65–75. <https://doi.org/10.1080/10236660490890484>.
 - (17) Kasaai, M. R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) Equation Viscometric Constants for Chitosan in Any Solvent-Temperature System Using Experimental Reported Viscometric Constants Data. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68* (3), 477–488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>.
 - (18) Kaczmarek, M. B.; Struszczyk-Swita, K.; Li, X.; Szczesna-Antczak, M.; Daroch, M. Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7* (SEP). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00243>.
 - (19) Kean, T.; Thanou, M. Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>.
 - (20) Moutinho¹, I.; , Inês da Costa Oliveira , Mariana Cristina Santos¹ , Mário Vasconcelos², A. I. P. Different Chitosan-Based Biomaterials and Their Biomedical Applications. *Ejmrc* **2019**, *1*, 101. <https://doi.org/10.17303/ejmrc.2019.1.101>.
 - (21) Naveed, M.; Phil, L.; Sohail, M.; Hasnat, M.; Baig, M. M. F. A.; Ihsan, A. U.; Shumzaid, M.; Kakar, M. U.; Mehmood Khan, T.; Akabar, M. D.; Hussain, M. I.; Zhou, Q. G. Chitosan Oligosaccharide (COS): An Overview. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *129*, 827–843. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192>.
 - (22) Hu, F. Q.; Liu, L. N.; Du, Y. Z.; Yuan, H. Synthesis and Antitumor Activity of Doxorubicin Conjugated Stearic Acid-g-Chitosan Oligosaccharide Polymeric Micelles. *Biomaterials* **2009**, *30* (36), 6955–6963. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.008>.
 - (23) Li, Q.; Du, Y. Z.; Yuan, H.; Zhang, X. G.; Miao, J.; Cui, F. De; Hu, F. Q. Synthesis of Lamivudine Stearate and Antiviral Activity of Stearic Acid-g-Chitosan Oligosaccharide Polymeric Micelles Delivery System. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41* (3–4), 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.004>.
 - (24) Ali, A.; Ahmed, S. A Review on Chitosan and Its Nanocomposites in Drug Delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>.
 - (25) Liang, S.; Sun, Y.; Dai, X. A Review of the Preparation, Analysis and Biological Functions of Chitooligosaccharide. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (8), 2197. <https://doi.org/10.3390/ijms19082197>.
 - (26) Mourya, V. K.; Inamdar, N. N.; Choudhari, Y. M. Chitooligosaccharides: Synthesis, Characterization and Applications. *Polym. Sci. - Ser. A* **2011**, *53* (7), 583–612. <https://doi.org/10.1134/S0965545X11070066>.
 - (27) Ouyang, Q.; Zhao, S.; Li, S.; Song, C. Application of Chitosan, Chitooligosaccharide, and Their Derivatives in the Treatment of Alzheimer ' s Disease. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 322. <https://doi.org/10.3390/md15110322>.
 - (28) Sahariah, P. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives : A Review of the Structure – Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3846–3868. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01058>.

- (29) Yang, Y.; Xing, R.; Liu, S.; Qin, Y.; Li, K.; Yu, H. Immunostimulatory Effects of Chitooligosaccharides on RAW 264 . 7 Mouse Macrophages via Regulation of the MAPK and PI3K / Akt Signaling Pathways. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 36. <https://doi.org/10.3390/md17010036>.
- (30) Liaqat, F.; Eltem, R. Chitooligosaccharides and Their Biological Activities: A Comprehensive Review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *184* (November 2017), 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>.
- (31) de Souza Soares, L.; de Faria, J. T.; Amorim, M. L.; de Araújo, J. M.; Minim, L. A.; dos Reis Coimbra, J. S.; de Carvalho Teixeira, A. V. N.; de Oliveira, E. B. Rheological and Physicochemical Studies on Emulsions Formulated with Chitosan Previously Dispersed in Aqueous Solutions of Lactic Acid. *Food Biophysics*. 2017, pp 109–118. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9469-4>.
- (32) D.R. Mallawarachchi, A.D.U.S Amarasinghe, M. A. . P. Suitability of Chitosan as an Emulsifier for Cationic Bitument Emulsions and Its Behavior as an Additive to Bitumen Emulsion. *Constr. Build. Mater.* **2016**, *102*, 1–6.
- (33) Oh, B. H. L.; Bismarck, A.; Chan-Park, M. B. Modified Chitosan Emulsifiers: Small Compositional Changes Produce Vastly Different High Internal Phase Emulsion Types. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (20), 4118–4122. <https://doi.org/10.1039/c5tb00303b>.
- (34) Negi, H.; Faujdar, E.; Saleheen, R.; Singh, R. K. Viscosity Modification of Heavy Crude Oil by Using a Chitosan-Based Cationic Surfactant. *Energy and Fuels* **2020**, *34* (4), 4474–4483. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.0c00296>.
- (35) Al-Sabagh, A. M.; Morsi, R. E.; Elsabee, M. Z.; Naguib, H. F.; Moustafa, Y. M. Petroleum Oil Dispersion Efficiency and Stability Using Eco-Friendly Chitosan-Based Surfactant and Nanoparticles. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2012**, *33* (11), 1661–1666. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.620855>.
- (36) Lauriane Alison,† Ahmet F. Demirörs,† Elena Tervoort,† Alexandra Teleki,§,|| Jan Vermant, ‡ and. Emulsions Stabilized by Chitosan-Modified Silica Nanoparticles PH. 2018, pp 6147–6160. <http://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00622>
- (37) Ramalingam, P.; Ko, Y. T. Improved Oral Delivery of Resveratrol from N-Trimethyl Chitosan-g-Palmitic Acid Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *139*, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.050>.
- (38) Meng, T.; Wu, J.; Yi, H.; Liu, J.; Lu, B.; Yuan, M.; Huang, X.; Yuan, H.; Hu, F. A Spermine Conjugated Stearic Acid-g-Chitosan Oligosaccharide Polymer with Different Types of Amino Groups for Efficient P53 Gene Therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *145*, 695–705. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.071>.
- (39) Du, Y. Z.; Lu, P.; Zhou, J. P.; Yuan, H.; Hu, F. Q. Stearic Acid Grafted Chitosan Oligosaccharide Micelle as a Promising Vector for Gene Delivery System: Factors Affecting the Complexation. *Int. J. Pharm.* **2010**, *391* (1–2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.017>.

Chapitre 2

Synthèse de la partie hydrophile du tensioactif, obtention d'oligomères de chitosane par désamination nitreuse

Table des matières du Chapitre 2

LA DÉPOLYMÉRISATION DU CHITOSANE.....	69
I. VOIE ENZYMATIQUE	69
I.1. Lysozyme.....	69
I.2. Chitinase	70
I.3. Chitosanase	71
I.4. Autres enzymes.....	72
II. VOIES PHYSIQUES	73
II.1. Plasma d'électrons.....	73
II.2. Irradiation gamma.....	74
II.3. Microondes	75
II.4. Ultrasons.....	76
II.5. Micro fluidique.....	76
III. VOIES CHIMIQUES	77
III.1. Hydrolyse acide.....	78
III.2. Désamination nitreuse.....	80
III.3. Oxidative.....	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
CONCLUSIONS.....	87
WATER SOLUBLE 2, 5-ANHYDRO-D-MANNOFURANOSE END CHAIN CHITOSAN OLIGOMERS OF VERY LOW MOLECULAR WEIGHT: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION	89
I. ABSTRACT	89
II. INTRODUCTION	89
III. MATERIALS AND METHODS	92
III.1. Materials.....	92
III.2. Depolymerization of chitosan	93
III.3. AMF synthesis	93
III.4. Characterization	94
IV. RESULTS AND DISCUSSION	95
V. CONCLUSION.....	104
CONCLUSIONS.....	105
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	106

Une étude bibliographique a été menée afin de recenser les différentes techniques de dépolymérisation du chitosane déjà existantes et de choisir la plus adaptée à l'application. L'objectif est donc de trouver une méthode permettant l'obtention d'oligomères composés jusqu'à 20 unités à partir de n'importe quelle ressource de chitosane de manière reproductible. Cette méthode doit également être industrialisable, la plus simple à mettre en œuvre et la moins coûteuse. Enfin, les produits utilisés doivent être les moins dangereux possibles pour les utilisateurs. Dans la littérature on trouve un grand nombre de méthodes de dépolymérisation du chitosane ^{1, 2}. Afin de déterminer la technique la plus adaptée à cette étude, chacune de ces méthodes est détaillée et leurs avantages et inconvénients sont listés ci-dessous. Dans la suite, la dépolymérisation du chitosane par désamination nitreuse a été étudiée. L'objectif de ce travail était principalement de s'affranchir de la ressource, c'est pourquoi l'étude a été menée sur des chitosanes d'origine, de masses molaires et de degrés d'acétylation différents. La désamination nitreuse de ces chitosane a permis l'obtention d'oligomères de tailles contrôlées de 5 à 20 unités qui ont été finement caractérisés.

La dépolymérisation du chitosane

I. Voie Enzymatique

La dépolymérisation du chitosane par voie enzymatique consiste à cliver par l'action d'enzymes les liaisons glycosidiques du chitosane. Or celui-ci possède trois types de liaisons : les liaisons entre deux unités acétylées (GlcNAc-GlcNAc), entre deux unités désacétylées (GlcN-GlcN) et entre une unité acétylée et une unité non acétylée (GlcNAc-GlcN). La dépolymérisation par voie enzymatique a la particularité d'être sélective c'est-à-dire que certaines enzymes vont cliver seulement un type de liaison. Les trois principales enzymes utilisées sont la lysozyme et les chitinases qui clivent les liaisons entre deux unités acétylées ou une unité acétylée et une non acétylée et les chitosanases qui elles, clivent les liaisons entre deux unités non acétylées.

I.1. Lysozyme

Il s'agit d'une enzyme présente chez l'homme dans certaines sécrétions (larmes, salive) mais aussi plus particulièrement dans le blanc d'œuf chez la poule. Cette enzyme permet de cliver les liaisons GlcNAc-GlcNAc et GlcNAc-GlcN (Schéma 2). Selon la provenance (humaine ou animale), l'efficacité sera différente.

Par exemple, Mawad et al.³ ont décrit la fabrication de films de chitosane chargés avec de la lysozyme et incubés dans un tampon phosphate (PBS). Cette étude a permis de montrer que la dépolymérisation dépend du temps d'incubation qui est souvent très long (plusieurs semaines).

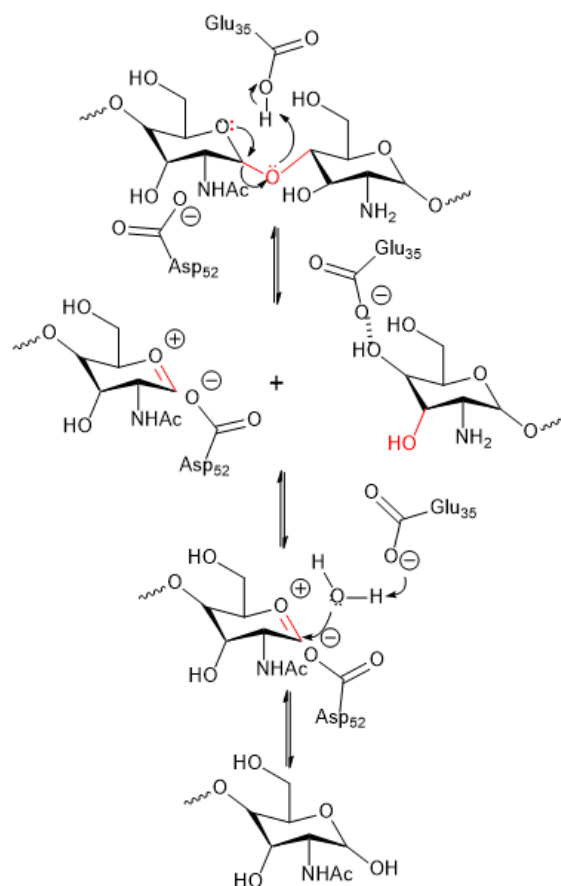


Schéma 2. Mécanisme d'action de la lysozyme

I.2. Chitinase

Les chitinases sont des enzymes présentes chez des mammifères comme la vache, la chèvre ou le mouton mais également dans les bactéries, les insectes et les champignons. La plupart des chitinases utilisées en dépolymérisation enzymatique sont isolées de bactéries.

Ces enzymes ont été utilisées au cours de plusieurs travaux afin d'obtenir des chitooligosaccharides (COS)^{4, 5, 6, 7}. De la même façon que la lysozyme, il a été montré que la chitinase favorisait à la fois la rupture des liaisons entre GlcNAc-GlcNAc et GlcNAc-GlcN. La chitinase n'est pas capable de rompre les liaisons GlcN-GlcN (Schéma 3).

Le chitosane avec un plus haut degré d'acétylation (DA) a été dégradé de manière plus efficace ce qui montre que le nombre d'unités acétylées joue un rôle important sur la capacité de la chitinase à dépolymériser le chitosane. La présence de moins de fonctions acétylées implique moins de sites de fixation de la chitinase et donc une dépolymérisation moins efficace. Elle est ainsi plus propice à dépolymériser la chitine ou les chitosanes de fort DA. De plus, la dépolymérisation est moins efficace sur les chitosanes de fortes masses molaires pour un DA équivalent du principalement à l'augmentation de la viscosité.

Enfin, les rendements des réactions sont assez faibles puisque des mélanges sont obtenus. Par exemple, Muzzareli et al.¹ ont montré qu'à partir de 200 mg de chitosane, ils obtenaient un mélange hexamère, pentamère, tétramère, trimère, dimère, 0,95%, 25,5%, 25,5%, 19,6% et 12,3% respectivement.

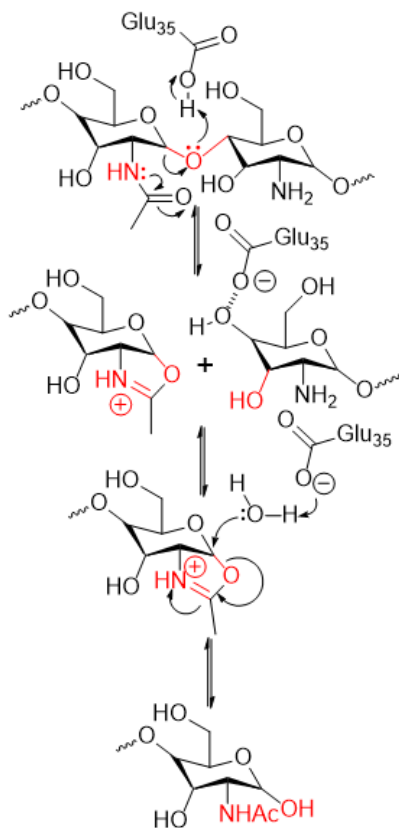


Schéma 3. Mécanisme d'action de la chitinase

I.3. Chitosanase

Les chitosanases se retrouvent chez plusieurs espèces de plantes, même chez les plantes primitives, et elles semblent particulièrement abondantes dans les fruits et dans les graines⁸. Cette enzyme permet de cliver spécifiquement les liaisons GlcN-GlcN. Ainsi, la chitosanase sera plus efficace sur les chitosanes avec un faible DA à l'inverse de la chitinase ou la lysozyme qui clivent les liaisons entre les unités acétylées. Les chitooligosaccharides ont souvent été préparés par hydrolyse enzymatique de chitosane à l'aide de chitosanases^{9,10,11}. Cependant, l'utilité de ces chitosanases spécifiques dans l'hydrolyse est limitée en raison de leur coût et de leur indisponibilité en grande quantité. D'un autre côté, de nombreux chercheurs se consacrent à l'exploration de nouvelles sources de chitosanases^{12,13}.

I.4. Autres enzymes

Récemment, de nombreuses équipes ont travaillé sur l'extraction et l'utilisation de nouvelles enzymes pour dépolymériser le chitosane. La cellulase est l'une des deux enzymes non spécifiques dont les propriétés de chitosanolyse sont comparables à celles des chitosanases. Il existe différents rapports sur l'hydrolyse du chitosane par les cellulases. Par exemple, Qin et al.¹⁴ ont utilisé de l'hémicellulase sur du chitosane de haute masse molaire ($1\,240\,000\text{ g.mol}^{-1}$) pour obtenir du chitosane soluble dans l'eau de $5\,000\text{ g.mol}^{-1}$ en travaillant à 50°C et pH 5,5. L'hydrolyse du chitosane de DA 20% en utilisant de la cellulase a également été décrite par Xie et al.¹⁵ pour donner des chitooligosaccharides avec des degrés de polymérisation (DP) de 3 à 11 et en particulier avec des DP de 6 à 8. L'hydrolyse du chitosane par la lipase extraite du blé a été étudiée par Muzzarelli et al.¹⁶. Ils se sont concentrés sur la diminution de la viscosité d'une solution de chitosane de masse molaire élevée au contact de la préparation de lipase, et cela en fonction du pH. Pantaleone et al.^{17,18} ont démontré la sensibilité hydrolytique du chitosane à une large gamme de préparations enzymatiques, notamment des glycanases, des lipases, des protéases et une tannase dérivée de sources bactériennes, fongiques, mammifères et végétales. Parmi les glycanases, plusieurs cellulases, ainsi qu'une amylase, une dextranase, une hémicellulase et une pectinase se sont avérées effectuer l'hydrolyse du chitosane. Ils ont montré que certaines enzymes ont une activité spécifique plus élevée que les chitosanases (cellulase TV et hemicellulase, lipase AIE et papaïne, une protéase de la papaye). L'enzymolyse du chitosane par la papaïne pour obtenir du chitosane de faible masse molaire a également été décrite par Dan Pan et al.¹⁹ avec des conditions optimisées comme suit: une concentration en substrat de $7,98\text{ g.L}^{-1}$, pH 4,55, à 44°C et le rapport molaire de l'enzyme au substrat 0,1037. La même équipe a étudié l'enzymolyse du chitosane à l'aide de pepsine de muqueuse gastrique porcine²⁰. Ils ont décrit la formation d'oligosaccharides de chitosane (COS) et de chitosane de faibles masses molaires (LMWC) en fonction du temps d'hydrolyse et ont prouvé leur formation par UV-visible, spectroscopie infrarouge (IR), spectroscopie RMN, microscope électronique à balayage (MEB) et chromatographie à perméation de gel (GPC). Yao et al.²¹ ont isolé une préparation enzymatique complexe avec des enzymes telles que la protéase, la lipase, l'estérase, la glycosidase (amylase, cellulose, disaccharidases, invertase et chitinase) et la phosphatase du tube digestif du concombre de mer *Stichopus japonicus*. Ils ont optimisé les conditions hydrolytiques pour la production d'oligomères de chitosane (de $410\,000\text{ g.mol}^{-1}$ à $1\,260\text{ g.mol}^{-1}$) à l'aide de ce mélange d'enzymes et caractérisé le produit par IR. Pan et al.²² ont rapporté la préparation d'un produit riche en glucosamine en hydrolysant du chitosane avec de l' α -amylase et de la glucoamylase.

Premièrement, l' α -amylase hydrolyse les liaisons β -1,4 dans le chitosane de façon aléatoire pendant 4 h à pH 5,0 et à 50 °C pour donner des COS et de la glucosamine. De la glucoamylase est ensuite ajoutée à la solution et mélangée pendant 8 h à 55 °C pour obtenir principalement de la glucosamine.

En général, la voie enzymatique a l'avantage d'être sélective et contrôlée et de se faire dans des conditions douces avec des températures assez basses, maximum 50 °C. De plus, les enzymes utilisées sont issues de la biomasse et sont non toxiques. Le problème avec cette méthode concerne tout d'abord les temps de réaction. En effet les périodes d'incubation peuvent être comptées en jours ou semaines. De plus, les enzymes sont très chères, ne sont pas disponibles en grande quantité et les rendements de réaction sont souvent faibles. La dépolymérisation enzymatique conduit à des mélanges d'oligomères de tailles différentes qui doivent ensuite être séparés ². Il s'agit donc d'une technique intéressante à l'échelle du laboratoire mais difficile à appliquer à l'échelle industrielle. Cette méthode sera donc écartée et d'autres voies seront abordées.

II. Voies physiques

La dépolymérisation du chitosane est également possible en utilisant des méthodes physiques impliquant l'utilisation d'une source d'énergie externe créée par un appareil spécifique. Les différentes méthodes décrites dans la littérature sont résumées ci-après.

II.1. Plasma d'électrons

Le principe de cette méthode est de bombarder un échantillon de poudre de chitosane par un faisceau plasma. Le faisceau est généré en injectant un faisceau d'électrons à travers un milieu gazeux. Vasilieva et al.²³ décrivent l'utilisation d'un plasma d'oxygène et de vapeur d'eau généré à une pression de 133-670 Pa où les échantillons sont bombardés à 40°C pour éviter toute dégradation. La dépolymérisation est réalisée en moins de 2 min et des masses molaires très faibles sont obtenues. Il a également été montré que la variation de pression imposée au générateur de plasma et le temps d'exposition de l'échantillon sont des paramètres sur lesquels on peut jouer pour optimiser les rendements et viser des masses molaires précises. Gryczka et al.²⁴ ont décrit la dégradation du chitosane de 690 000 g.mol⁻¹ à 20 900 g.mol⁻¹ en utilisant un faisceau d'électrons dans l'air. Ils ont utilisé la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (EPR) pour expliquer le mécanisme de formation de radicaux et la scission de la chaîne polymère (Figure 14).

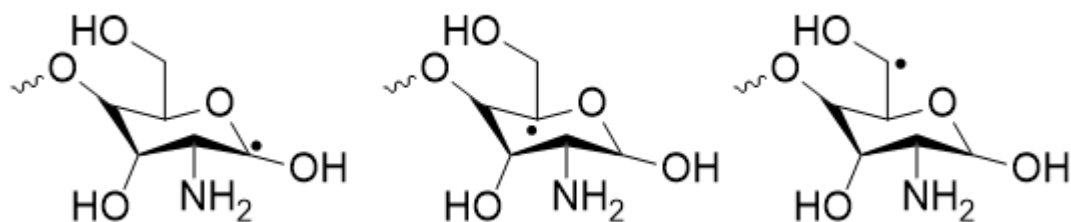


Figure 14. Positions possibles des radicaux libres sur le chitosane

Cette méthode est intéressante puisque l'on peut travailler directement sur les poudres. De plus de faibles masses molaires peuvent être obtenues de manière contrôlée en variant les paramètres d'exposition. Néanmoins, une très faible quantité de chitosane peut être dépolymérisée à la fois (500 mg) et l'appareil de génération de faisceau plasma est très coûteux. Ainsi, l'utilisation d'un plasma d'électrons ne semble pas adaptée à l'application.

II.2. Irradiation gamma

De la même façon que l'utilisation du plasma d'électrons, l'échantillon de chitosane sous forme de poudre ou de solution, est exposé à des rayons gamma Co^{60} variant de 50 à 500 kGy. Le rayon gamma est mesuré en gray, unité qui représente l'énergie d'un rayonnement ionisant apportant une énergie d'un joule à un milieu homogène d'une masse d'un kilogramme.

Mozalewska²⁵ décrivent la dégradation de chitosane de 132 kg.mol^{-1} à l'état solide par faisceau d'électrons gamma, dans l'air. La poudre de chitosane est irradiée à température ambiante, avec des doses de 5, 10, 25 et 50 kGy et de manière intéressante, la scission des chaînes a pu être quantifiée et reliée à la dose d'irradiation. Dans ce cas de figure, du chitosane de 39 kg.mol^{-1} est obtenu. Choi et al.²⁶ exposent eux, une solution aqueuse de chitosane avec 2% d'acide acétique à des rayons gamma Co^{60} avec des doses de 2 à 200 kGy. Des chitosanes de degrés de polymérisation variant de 2 à 6 peuvent être obtenus avec une dose d'irradiation de 100 kGy à partir de chitosane d'environ $150.000 \text{ g.mol}^{-1}$. Les résultats de cette étude sont prometteurs puisque de faibles masses molaires ont été obtenues. Cependant les rendements de réaction sont très faibles, 3,6% de dimère, 3,0% de trimère et 1,8% de tétramère sont obtenus, et il y a une large formation de glucosamine.

De manière générale, l'inconvénient de cette méthode est que les rendements sont faibles et que l'appareillage est onéreux. De plus, dans le cas du travail sur la poudre de chitosane, la masse molaire est seulement réduite ce qui permet de diminuer la viscosité du chitosane en solution mais ne conduit pas à l'obtention d'oligomères. De plus

l'exposition aux rayons gamma est dangereuse pour l'utilisateur. Ainsi, de la même façon que pour le plasma d'électrons, cette méthode sera écartée.

II.3. Microondes

De nombreuses études ont été menées sur la dépolymérisation de chitosane par voie oxydative sous irradiation microonde^{27, 28, 29}. En effet, l'utilisation de microondes en plus d'un oxydant classique permet de réduire considérablement le temps de réaction (quelques minutes contre quelques heures par activation thermique). Le principe de la chimie microonde repose sur la migration ou rotation des particules lors de l'irradiation. Celles-ci sont alors polarisées et les différences de polarisation créent des frictions entre les molécules ce qui génèrent de la chaleur. L'irradiation microonde est alors décrite comme un chauffage interne. L'énergie produite par les microondes peut être rapidement absorbée par les liaisons polaires. Ainsi, cette énergie va permettre d'augmenter la réactivité au sein des liaisons glycosidiques pour faciliter leur rupture.

Jaroslav et al.³⁰ montrent que l'utilisation simple des microondes suffit pour dépolymériser le chitosane et que les masses obtenues dépendent du temps d'exposition. Xing et al.³¹, décrivent l'irradiation d'une solution de chitosane à laquelle une solution de sel inorganique est ajoutée. Il a été montré que l'ajout d'un sel inorganique permet l'obtention de plus faibles masses molaires qu'avec les microondes seuls (de 560 000 g.mol⁻¹ à 100 000 g.mol⁻¹ avec le générateur microonde et à 30 000 g.mol⁻¹ avec ajout de sel). D'autres équipes comme Shao et al.²⁹ dépolymérisent le chitosane par ajout de solutions de peroxyde et action des microondes. De manière générale, il est possible de dépolymériser le chitosane par irradiation microonde en ajoutant ou non un agent oxydant pour améliorer d'autant plus la vitesse de réaction et diminuer les masses molaires obtenues.

Il s'agit d'une méthode intéressante puisqu'elle est facile à mettre en place au laboratoire et plutôt rapide. Le problème de cette méthode est la reproductibilité. En effet, de nombreux paramètres influent sur le rendement et la cinétique de la réaction. La concentration de la solution de chitosane, le temps de réaction, la température, la verrerie utilisée, ont des impacts importants sur les masses molaires finales obtenues. De plus, la réaction conduit à la formation de glucosamine et donc à une dispersité importante et son utilisation seule n'a pas été décrite pour l'obtention d'oligomères. Sa combinaison avec l'utilisation de peroxyde d'hydrogène sera vue plus en détails dans le paragraphe suivant.

II.4. Ultrasons

L'utilisation d'ultrasons est une autre méthode physique permettant d'obtenir des oligomères de chitosane. Cette technique dépolymérise le chitosane en apportant l'énergie nécessaire pour rompre les liaisons glycosidiques.

Le principe de la méthode décrite par Kasaai et al.³², est d'exposer une solution de chitosane à une source d'ultrasons d'une certaine puissance et pendant un temps donné. Un taux de dépolymérisation irrégulier a été constaté au cours du traitement ultrasonique. Il a été montré que plus la puissance est importante, plus les masses molaires obtenues sont faibles. Cependant, cette augmentation n'est pas linéaire. Cette méthode permet de passer de masses molaires avoisinant $2.000.0000 \text{ g.mol}^{-1}$ à des masses molaires de $400.000 \text{ g.mol}^{-1}$. L'obtention d'oligomère n'est pas précisée dans ce cas.

Taghizadeh et Abdollah³³ ont également mené cette étude en présence de dioxyde de titane comme catalyseur et par l'utilisation d'UV en plus des ultrasons. Ces deux méthodes permettent l'amélioration du procédé de sonication. Le système à ultrasons transforme une puissance électrique en énergie vibratoire qui est ensuite transmise au milieu. Or dans cette énergie, une partie sera perdue en dégagement thermique, une partie de cette énergie est réfléchiée, une autre partie appliquée à la désagrégation des chaînes et enfin le reste de l'énergie est appliquée à la dégradation du polymère. Ainsi, le procédé de dégradation dépend fortement de la concentration.

Ces travaux montrent que l'efficacité de cette technique dépend de nombreux paramètres tels que la température, la composition de la solution, le pH et la masse molaire du chitosane de départ. L'utilisation d'ultrasons est donc une technique intéressante car facile à mettre en œuvre, mais elle présente l'inconvénient d'être peu reproductible. De plus cette technique ne permet pas d'obtenir des COS mais seulement de réduire les hautes masses molaires, pour des questions de viscosité par exemple, donc elle ne sera pas intéressante dans le cas de cette étude.

II.5. Micro-fluidique

Une autre voie de dépolymérisation mécanique du chitosane en solution est la micro fluidisation. Cette technique se définit par un transfert d'énergie mécanique aux particules du fluide dans des conditions de haute pression. En fait, la solution est pompée puis séparée en deux flux qui sont projetés l'un contre l'autre au sein de la chambre d'interaction pour créer des forces de cisaillement, de turbulence et de cavitation. La pression au sein de la chambre est modifiable et va jouer sur la dépolymérisation du polymère en question. Quand une solution de polymère est agitée, une contrainte

mécanique est créée au sein des macromolécules. Si le niveau de contrainte est élevé, cela peut entraîner la scission de la chaîne et donc une dépolymérisation.

L'équipe de Kasai³² a testé la dépolymérisation du chitosane par cette méthode en faisant varier plusieurs paramètres. En effet, la pression au sein de la chambre d'interaction, le nombre de cycles, c'est-à-dire de passage de la solution à travers l'appareil, ainsi que la concentration de la solution en chitosane sont des variables importantes quant à l'efficacité de la dépolymérisation. Il a ainsi été montré qu'une pression ainsi qu'un nombre de cycles plus importants permettaient une meilleure dépolymérisation du chitosane. A contrario, l'augmentation de la concentration de la solution de chitosane diminue la capacité de celui-ci à fragmenter. La température quant à elle n'a pas d'impact sur la réaction. Dans cette étude, ils décrivent la micro-fluidique comme une méthode physique qui peut être utilisée pour dépolymériser partiellement le chitosane afin de réduire la viscosité des solutions (de 1.965.000 g.mol⁻¹ à 924 000 g.mol⁻¹ par exemple) ne permettant pas d'obtenir des oligomères de faibles masses molaires.

De manière générale, les méthodes physiques sont assez efficaces pour dépolymériser le chitosane. L'exposition aux rayons gamma et électronique permet de travailler directement sur la poudre de chitosane. Le problème, qui est le même avec la dépolymérisation par micro-fluidique, est qu'il n'est possible de travailler que sur des quantités infimes inférieures au gramme. Les appareils sont également très chers. Pour les UV, la sonication et les microondes, les méthodes sont assez simples à appliquer à une solution de chitosane. Ces trois méthodes sont souvent utilisées en combinaison avec une méthode chimique pour améliorer les rendements et la cinétique et obtenir des masses molaires plus faibles (COS). Les méthodes physiques seules ne seront donc pas utilisées dans cette étude.

III. Voies chimiques

De manière générale, les voies chimiques sont les plus utilisées dans l'industrie du fait de leur faible coût. Le principe consiste à l'ajout d'une molécule ou d'un mélange de substances actives qui vont réagir avec le chitosane et conduire à la rupture de la liaison glycosidique. Ces réactions peuvent être éventuellement activées par la température ou utilisées en combinaison avec une méthode physique telles que décrite précédemment. On retrouve trois principales voies chimiques qui sont l'hydrolyse acide, la désamination nitreuse et la méthode oxydative qui sont présentées ci-dessous.

III.1. Hydrolyse acide

La dépolymérisation du chitosane par hydrolyse acide a été décrite de nombreuses fois dans la littérature ^{34,35,36}. En effet, la liaison glycosidique que possèdent la chitine et le chitosane est relativement instable en milieu acide concentré. Dans une première étape, l'atome d'oxygène de la liaison glycosidique est protoné et la liaison avec le carbone anomère est rompue pour donner un ion oxocarénium cyclique. Enfin l'eau présente dans le milieu réagit avec cet intermédiaire pour former l'unité glucosamine. Ainsi, l'action de l'acide va cliver les liaisons glycosidiques spécifiques aux polysaccharides et conduire à la diminution des masses molaires. Le chitosane étant soluble dans les acides dilués, à l'exception de l'acide sulfurique, cette réaction a lieu en milieu homogène. Le schéma réactionnel de l'hydrolyse est présenté ci-dessous (Schéma 4).

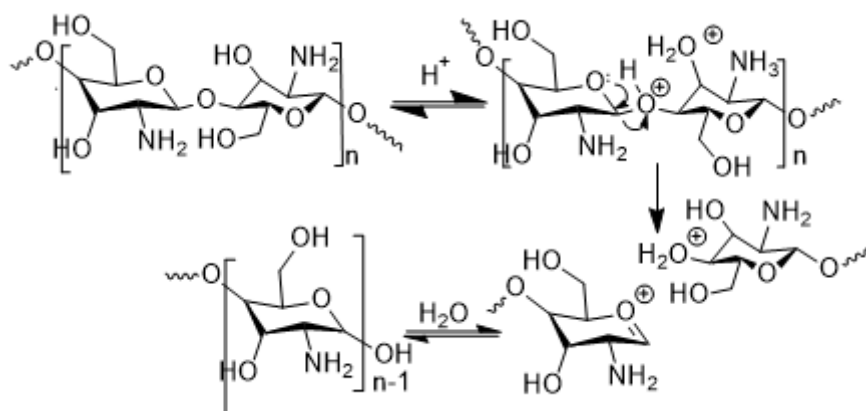


Schéma 4. Hydrolyse acide du chitosane

Al-Sou'od et al.³⁷ décrivent par exemple l'ajout d'une même solution d'acide chlorhydrique concentrée à une solution de chitosane puis un chauffage à reflux pendant une à vingt-quatre heures, de ce mélange. Cette étude montre que plus le temps de réaction est important, plus les masses molaires obtenues sont faibles i.e. de 250 000 g.mol⁻¹ à 30 000 g.mol⁻¹ en une heure et à 6 000 g.mol⁻¹ en 24 h. De la même façon, Ibrahim et al.³⁸ décrivent l'utilisation de zéolite de différentes porosités en présence d'acide chlorhydrique concentré pour la dépolymérisation du chitosane. Ils ont montré que l'action d'acide concentré mène à la formation d'oligomères de DP9 maximum mais qu'il subsiste du chitosane de haute masse molaire qui peut être éliminé par addition d'une base. Au vu des rendements obtenus, il a été conclu que les zéolites jouaient dans ce cas-là le rôle d'adsorbant permettant d'augmenter les rendements en oligomères, de 12% sans à 80% en présence de zéolite.

Une méthode de dépolymérisation acide par voie catalytique a été mise en évidence par Krishnan et al.³⁹. Un catalyseur à base de charbon actif et d'acide sulfurique

est tout d'abord synthétisé puis celui-ci va réagir avec une solution de chitosane à une certaine température pendant un temps donné. En fait, il y a fixation de groupes $-SO_3H$ sur le charbon actif, on parle alors d'acides solides. Ceux-ci contiennent des sites donneurs de protons dans leurs interstices et peuvent les donner ou les échanger en solution. Ces protons sont capables d'interagir avec les liaisons glycosidiques et de les casser. Cette méthode permet bien l'obtention d'oligomères puisqu'à partir d'un chitosane de $100.000 \text{ g.mol}^{-1}$ est obtenu des oligomères de 9.000 g.mol^{-1} . De plus, la dépolymérisation conduit à une diminution de la dispersité, de 2,12 pour le chitosane brut à 1,24 pour les oligomères. L'avantage de cette méthode est qu'après réaction, il est possible de récupérer le catalyseur par centrifugation et lavages successifs puis de le réutiliser dans des futures dépolymérisations. Les principaux inconvénients semblent être les températures de travail qui sont très élevées (jusqu'à 160°C) et ce pendant des temps de réactions assez importants (entre 8 et 24 h) mais également le manque de contrôle sur la taille des oligomères formés puisqu'une seule gamme de taille est obtenue quelle que soit la concentration en catalyseur. De plus, une variation du DA est observée lors de la réaction ce qui s'explique par la formation de glucosamine lors de la dépolymérisation qui n'est pas récupérée lors de la précipitation des oligomères ce qui induit une augmentation globale du DA.

L'utilisation d'acide acétique pour l'hydrolyse des liaisons glycosidiques est décrite par Tsao et al.⁴⁰. Dans ce cas-là, l'impact du temps de réaction, de la quantité d'acide ainsi que de la température sont étudiés. Il a été montré que plus la concentration en acide est grande plus les masses obtenues sont faibles pour un temps donné. De plus, une augmentation de la température permet également d'améliorer la cinétique de la dépolymérisation à plus faibles concentrations. Cette réaction mène à la formation d'oligomères ($2 \text{ à } 9 \text{ kg.mol}^{-1}$) dont les masses molaires sont régies principalement par les temps de réactions, plutôt longs (au minimum 16 h) et la concentration en acide (entre 6 et 12% m/m).

L'hydrolyse acide du chitosane est une méthode simple à mettre en œuvre pour obtenir des COS même si cette méthode est plutôt utilisée dans l'industrie pour passer de fortes masses molaires (autour de $3\,000\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) à de plus faibles masses (autour de $50\,000 \text{ g.mol}^{-1}$). L'avantage de cette technique est qu'il s'agit d'un procédé peu coûteux. Cependant, elle nécessite souvent de travailler à haute température avec de l'acide concentré et des durées élevées sont nécessaires pour atteindre de faibles masses molaires. Malgré des temps de réactions élevés, les rendements en COS sont généralement faibles, il ne s'agit que d'une fraction du produit de la dépolymérisation. L'hydrolyse acide est également dépendante de la masse molaire du chitosane utilisé

puisque la viscosité de la solution joue sur la dégradation. De plus, l'utilisation d'acide concentré peut aussi engendrer la dégradation du sucre et les conditions de réactions sont dangereuses pour l'utilisateur. Elle ne paraît donc pas adaptée puisque dans cette étude, le chitosane brut ne doit pas avoir d'impact sur la méthode utilisée pour le dépolymériser.

III.2. Désamination nitreuse

La désamination nitreuse est une technique de dépolymérisation plusieurs fois décrite dans la littérature ^{41, 42, 43, 44, 45}. Le principe repose sur l'action de l'acide nitreux (NaNO_2) qui clive de façon stœchiométrique les liaisons glycosidiques du chitosane. La réaction consiste en la formation d'un ion diazonium sur une unité D-glucosamine par réaction entre l'amine libre et l'acide nitreux. La libération d'azote permet l'obtention d'un carbocation. L'addition nucléophile de l'oxygène endocyclique conduit alors à une structure 2,5-anhydro-D-mannose comme nouvelle extrémité de chaîne. Le schéma réactionnel est présenté ci-dessous (Schéma 5).

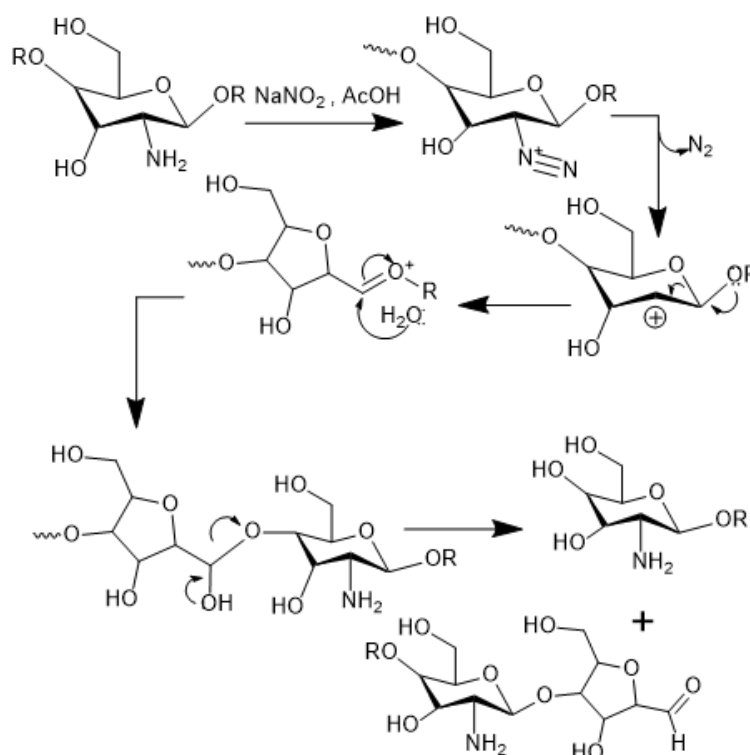


Schéma 5. Mécanisme de la désamination nitreuse

Cette réaction présente plusieurs intérêts. Premièrement, elle peut être réalisée à température ambiante ou même à froid ⁴¹ mais l'obtention d'oligomères peut être accélérée en augmentant la température. De plus, la réaction avec l'acide nitreux est homogène puisqu'on travaille avec une solution de chitosane. Le second intérêt est que la réaction est stœchiométrique, un équivalent de NaNO_2 va réagir avec un équivalent de fonction

amine. Allan et al.⁴³ ont montré que la masse molaire du chitosane de départ pouvait être directement reliée à celle des oligomères visés. Il est donc possible d'obtenir une taille précise en jouant sur la quantité d'acide nitreux. La relation reliant les degrés de polymérisations des chitosanes bruts (DP1) et des oligomères (DP2) est la suivante (1).

$$(4) \quad \frac{1}{dp2} - \frac{1}{dp1} = \frac{ncM_0}{m_1}$$

Avec
 M_0 la masse molaire d'une unité
 M_1 la masse molaire du chitosane brut
 M_2 la masse molaire des oligomères
 m_1 la masse de chitosane pesée

$$\frac{1}{M_2} - \frac{1}{M_1} = \frac{nc}{m_1}$$

n_c correspond à la quantité de matière de NaNO_2 qui réagit réellement avec le chitosane. Dans la quantité réelle, on prend en compte n_d qui correspond à la quantité de matière de NaNO_2 qui se dégrade et n_{eg} correspondant à la quantité de matière qui réagit avec les amines en fin de chaînes.

Avec cette méthode, on peut s'affranchir de la masse molaire de départ. Le DA aura une influence puisque la formation de diazonium ne peut se faire que sur les unités non acétylées du chitosane. Cette méthode est très intéressante mais il faut noter qu'une des extrémités de chaîne ainsi produite est modifiée chimiquement, ce qui est à prendre en compte lors d'applications diverses. En effet, comme on a pu le voir ci-dessus, la coupure d'une liaison glycosidique par l'action de l'acide nitrique crée une fin de chaîne 2,5-anhydro-D-mannose, un aldéhyde cyclique, ainsi qu'une fin de chaîne correspondant à une unité glucosamine. Ainsi lors de cette réaction on peut obtenir cinq types de chaînes présentées ci-dessous (Figure 15).

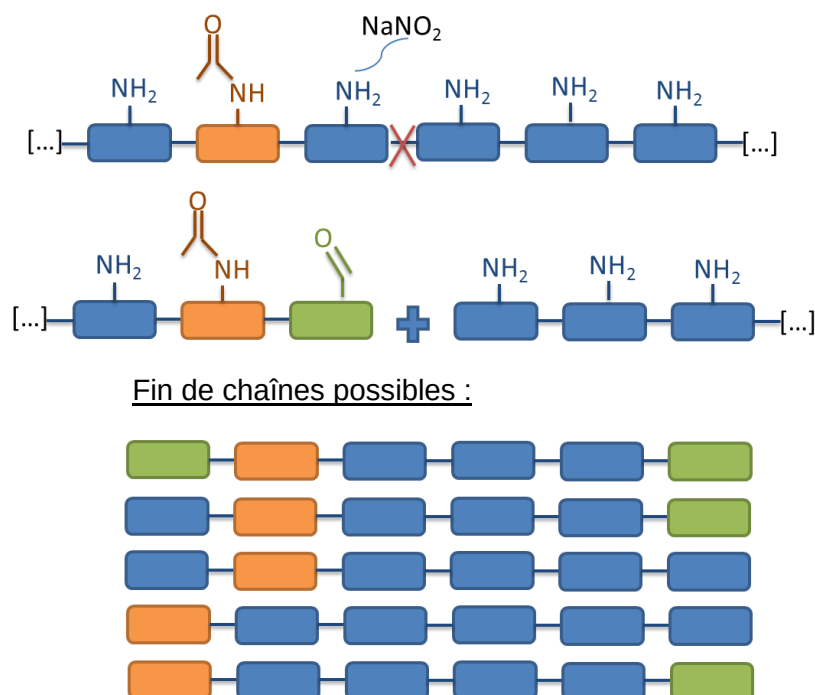


Figure 15. Schéma simplifié de la désamination nitreuse.

Ce type de dépolymérisation peut donc être intéressant puisque l'aldéhyde présent en fin de chaîne peut également être fonctionnalisé ^{46, 47}.

III.3. Oxydative

La méthode de dépolymérisation oxydative, décrite souvent dans la littérature^{48, 49, 50, 51}, consiste en l'ajout d'une solution d'agent oxydant à une solution de chitosane. Le mélange réactionnel peut alors être chauffé ou non, Tian et al.⁵², ont décrit l'action de peroxyde d'hydrogène à différentes températures, pendant un temps donné. Leur étude a montré que la température a un effet sur la réaction, plus elle est haute et plus la réaction est rapide. De plus, le degré d'acétylation joue un rôle important dans l'efficacité de la dépolymérisation : plus le DA est faible plus la dépolymérisation est efficace. Enfin, plus la concentration en H_2O_2 est grande, meilleure en est la dépolymérisation. Le mécanisme de cette réaction est un mécanisme radicalaire dont l'équation est présentée ci-dessous (Figure 16). L'anion hydroperoxyde est très instable et se décompose facilement en radical hydroxyle hautement réactif ($HO^\bullet$). Ce radical est un oxydant très puissant. Celui-ci réagit avec le polysaccharide en lui arrachant un atome d'hydrogène pour former de l'eau. Pendant le traitement, le chitosane représenté par $R-NH_2$ réagit préférentiellement avec un proton pour produire du $R-NH_3^+$. Ainsi, la concentration en ions hydronium dans la solution diminue et donc le pH augmente.

En outre, H_2O_2 est continuellement décomposé et continue de réagir avec le chitosane pour former des oligosaccharides.

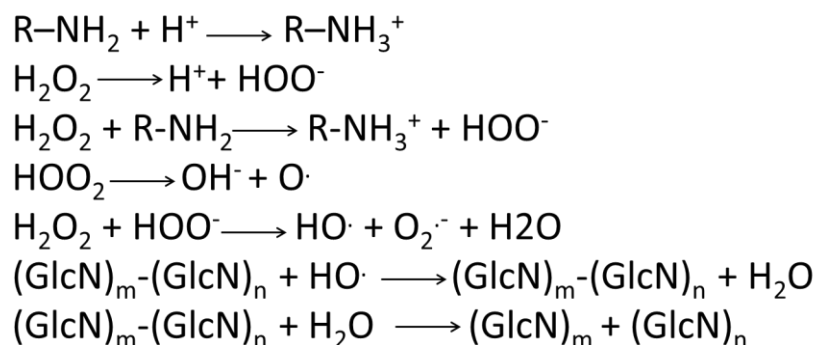


Figure 16. Equations de réaction de l'oxydation du chitosane par le peroxyde d'hydrogène

L'équipe de Huang et al.²⁷, a travaillé sur l'ajout de peroxyde d'hydrogène en présence de catalyseur d'acide phosphotungstique. Des solutions d'acide phosphotungstique sont préparées (de 3 à 7%) et une solution de chitosane leur est ajoutée. Cette étape permet de synthétiser les catalyseurs phosphotungstate. Par la suite, du peroxyde d'hydrogène est utilisé sur des solutions de chitosane auquel le catalyseur synthétisé précédemment est ajouté. Il résulte de cette étude que l'utilisation d'un catalyseur phosphotungstate permet d'améliorer le rendement de la réaction de dépolymérisation du chitosane. En outre, plus le ratio catalyseur/chitosane est grand, plus la vitesse de dépolymérisation est importante. L'utilisation de peroxyde est également très souvent combinée à une méthode physique de dépolymérisation. Autre que les microondes²⁹, on retrouve par exemple l'utilisation des rayons gamma^{53, 54}. Wakefield et al.⁵⁵ ont également décrit l'exposition aux UV d'une solution de chitosane à laquelle une solution de peroxyde d'hydrogène est ajoutée. Plus l'exposition aux UV est grande plus les masses molaires obtenues sont faibles. Cependant, une diminution de la masse molaire de l'ordre de 60% au maximum a été observée. Avec cette méthode, il est important de garder un ratio volume/surface d'exposition constant pour avoir une bonne reproductibilité. De même, la concentration ainsi que le temps d'exposition et la température sont des paramètres influençant la dépolymérisation. L'utilisation des UV semble une méthode intéressante car facile à mettre en place, mais dans les conditions précédentes l'obtention d'oligomère n'est pas décrite.

D'autres oxydants ont également été utilisés, par exemple, l'équipe de Zheng et al.⁵⁶ ont remplacé le peroxyde d'hydrogène par de l'hypochlorite de sodium NaClO . Le mécanisme de dégradation est similaire à celui du peroxyde d'hydrogène. Ils ont montré que les conditions optimales de température et de quantité de NaClO sont les suivantes:

90°C pendant 3 h avec 22% de NaClO dans la solution pour obtenir des oligomères de 10 kg.mol⁻¹ à partir de chitosane brut de 200 kg.mol⁻¹.

Quelques résultats préliminaires ont également été obtenus au laboratoire afin de comparer un mélange de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique (PA) et le peroxyde d'hydrogène seul combinée à l'utilisation des microondes. Les oligomères sont obtenus après précipitation en milieu basique du chitosane de haute masse molaire n'ayant pas été dépolymérisé, par centrifugation. Les rendements en oligomères sont plus faibles dans le cas du mélange PA et H₂O₂ que pour H₂O₂ seul. Dans cette étude, différents paramètres ont été variés (Tableau 2); la concentration en acide peracétique et en peroxyde d'hydrogène, la puissance du microonde et le temps d'exposition, tout ceci sur un volume fixe (18 mL). Le chitosane (chitosane de crevette 150 kg.mol⁻¹) est introduit à une concentration identique dans chacune des expériences (2 % m/v)). Les masses molaires ont été mesurées par GPC en équivalent pullulan.

N°exp	Temps (s)	Puissance (w)	Concentration (w%)	H ₂ O ₂	Mn (g/mol)	
					5% PA 23% H ₂ O ₂	15% PA 23% H ₂ O ₂
1	300	100	5	9700	1 000	600
2	350	100	5	7000	600	600
3	325	125	5	10 000	800	600
4	275	125	5	10 400	800	600
5	250	100	5	11 600	800	600
6	275	75	5	11 500	800	600
7	325	75	5	10 300	800	600
8	325	100	10	6 800	600	700
9	275	100	10	8 900	600	700
10	300	75	10	6 400	600	700
11	325	100	1	25 600	8 000	2 100
12	275	100	1	27 700	10 200	2 000
13	300	125	1	26 600	10 400	2 900
14	300	100	5	11 600	800	700

Tableau 2. Masses molaires obtenues en fonction des différents paramètres et oxydants utilisés

Ce qui a pu être remarqué dans un premier temps est que l'utilisation d'acide peracétique en plus du peroxyde d'hydrogène implique une diminution bien plus importante de la masse molaire que lors de l'utilisation de H₂O₂ seul. De plus, pour des conditions identiques, de manière générale, les masses molaires obtenues sont plus faibles lorsque la concentration en acide peracétique est plus importante (de 5 à 15 %). On remarque que

plus la concentration en espèce oxydante est importante, plus les masses molaires obtenues sont faibles. On remarque également que le temps d'exposition est un facteur important. En effet, à puissance et concentration égales, les masses molaires obtenues sont plus faibles lors d'un temps d'exposition plus long. Enfin, la puissance ne semble pas avoir d'effet très important sur la dépolymérisation du moment qu'elle est comprise entre 75 et 125 W. Afin de tester la reproductibilité, l'expérience 1 a été reconduite (exp 14). On peut noter un écart de 10 % sur les valeurs ce qui n'est pas négligeable. De plus, les dispersités des oligomères restent assez élevées, comprises entre 2 et 3 à partir d'un chitosane de dispersité de 4. Les deux méthodes ont été reproduites sur des chitosanes bruts (crevette) de masses molaires différentes (30 kg.mol⁻¹ et 250 kg.mol⁻¹) et un chitosane issu d'insectes (150 kg.mol⁻¹). Il a été montré que dans le cas de l'utilisation de peroxyde d'hydrogène seul à des concentrations et conditions identiques, les masses molaires obtenues étaient significativement différentes (Tableau 3) ce qui n'est pas compatible avec l'application recherchée. Dans le cas des mélanges PA/H₂O₂, les masses molaires obtenues sont globalement identiques quelles que soient la masse molaire et l'origine du chitosane.

Mn chitosane natif	Mn (g/mol)		
	H ₂ O ₂	5:23 (PA/H ₂ O ₂)	15:23 (PA/H ₂ O ₂)
30 000 g/mol	8 600	800	700
150 000 g/mol	11 600	800	700
250 000 g/mol	15 800	900	700
(Y) 150 000 g/mol	1 300	700	600

Tableau 3. Masses molaires des oligomères obtenus à partir de différents chitosanes par l'action des différents agents oxydants (5 %, 300 s, 100 W comme expérience 1-Tableau 1)

La structure et le mécanisme de fragmentation des oligomères obtenus par le mélange acide peracétique et peroxyde d'hydrogène ont pu être déterminés par spectroscopie de masse (Annexe 3), le peroxyde d'hydrogène seul ayant été écarté par l'expérience précédente. Les résultats ont pu être comparés à une fragmentation classique d'oligomères de chitosane⁵⁷. En effet, les fragmentations privilégiées ne sont plus respectées et une absence des fragments internes du chitosane de 119 g.mol⁻¹ et 59 g.mol⁻¹ est observée (Annexe 3). On retrouve cependant les coupures correspondantes aux unités acétylées et déacétylées. De plus, le pic correspondant à l'oligomère le plus petit se situe à un m/z à 374 g.mol⁻¹, ce qui diffère avec les résultats obtenus à partir des expériences menées avec du peroxyde d'hydrogène seul (Annexe 4), 363 g.mol⁻¹. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce mélange engendre une rupture différente de la liaison

glycosidique $\beta,1-4$. Ainsi, la présence d'un oxygène créant un groupe peroxyde sur la coupure glycosidique a pu être identifiée (Figure 17). Ce phénomène pourrait expliquer la meilleure dépolymérisation, en effet chaque groupement peroxyde créé pourrait aider à amorcer de nouveau la réaction et ainsi obtenir des oligomères de masses molaires plus faibles. Cependant, cette structure est également à l'origine de la non stabilité des oligomères dans le temps. En effet, Il a été montré qu'après trois mois de stockage, les masses molaires des oligomères obtenus continuaient de diminuer. La formation d'hydroperoxyde en fin de chaîne des oligomères permet donc de perpétuer l'amorçage de la dépolymérisation et ce même à température ambiante. De plus, les analyses de masses ont également montré la présence de glucosamine dans l'échantillon en quantité importante ce qui n'est pas recherché dans l'application.

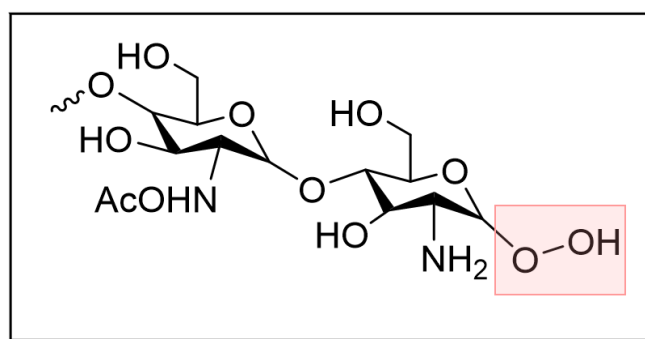


Figure 17. Structure des fins de chaînes des oligomères obtenus par dépolymérisation par action de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique

De manière générale, la technique de dépolymérisation oxydative est intéressante car facile à mettre en place. De plus, elle peut être combinée à l'utilisation de microondes, ou d'une simple activation thermique pour en améliorer les rendements. Les nombreuses études sur cette méthode montrent cependant que les rendements en oligosaccharides sont faibles, il est nécessaire de les séparer puisqu'il s'agit d'un mélange. D'après les résultats obtenus au laboratoire, le mélange d'acide peracétique et de peroxyde d'hydrogène semble prometteur pour obtenir des oligomères de faibles masses molaires. Cependant, les oligomères obtenus ne sont pas stables dans le temps ce qui est indispensable pour l'application recherchée. De plus, il a été montré à la suite de cette étude que le changement de volume et de verrerie, nécessaire à l'extrapolation, a une influence non négligeable sur les résultats obtenus ce qui remet en doute la reproductibilité de la méthode et son industrialisation. De manière générale, on retrouve donc une difficulté à contrôler la taille des oligomères obtenus, une reproductibilité tangente et un problème de stabilité.

Conclusions

Dans la littérature, on retrouve un grand nombre de techniques d'oligomérisation de chitosane. La première consiste en la dégradation de ce dernier par voie chimique, enzymatique ou physique. La dépolymérisation enzymatique fait intervenir des enzymes telles que la chitinase, le lysozyme ou la chitosanase pour cliver les liaisons glycosidiques de manière sélective. Ces enzymes sont très coûteuses et les rendements de dépolymérisation sont très faibles ce qui rend ce procédé difficilement adaptable au niveau industriel. Dans les méthodes de dépolymérisation impliquant un phénomène physique, on retrouve par exemple, l'utilisation d'un plasma d'électrons, l'irradiation gamma, l'utilisation de microondes, l'exposition aux UV ou la sonication. Ces techniques peuvent également être combinées avec d'autres comme par exemple l'utilisation de peroxydes tout en exposant à un rayonnement microonde. Les paramètres expérimentaux tels que le temps d'exposition, la puissance des rayons ou la quantité de chitosane mis en jeu peuvent être variés afin de viser une gamme de masses molaires. L'inconvénient de ces techniques est pour certaines le coût de l'appareillage et pour d'autres la trop faible reproductibilité de la méthode. De plus le degré d'acétylation ne peut pas être contrôlé. L'hydrolyse acide, la désamination nitreuse, la méthode oxydative, sont des méthodes chimiques permettant de dépolymériser la chitine et/ou le chitosane en entraînant un clivage aléatoire de la liaison glycosidique jusqu'à obtenir des oligomères de degré de polymérisation (DP) visé. Avec l'hydrolyse acide ou l'utilisation de peroxydes, il est très difficile de viser un DP précis, et des mélanges de chitoooligosaccharides dont la dispersité est importante sont obtenus. De plus, le degré d'acétylation des oligomères obtenus est difficile à contrôler et ne sera pas forcément le même que celui du chitosane de départ, le clivage étant aléatoire. Pour la désamination nitreuse au contraire, la masse molaire finale peut être prévue en faisant varier la quantité de nitrite de sodium dans la solution. Finalement, parmi toutes ces méthodes, celles qui semblent les plus réalisables et les plus propices à la formation d'oligomères de degré de polymérisation égal à 10 sont la désamination nitreuse et l'oxydation utilisant un mélange de peroxyde et d'acide peracétique. La non reproductibilité de l'utilisation du mélange oxydant et l'instabilité des oligomères obtenus étant un frein, cette étude sera consacrée au développement de la désamination nitreuse dans le but de mettre en place une méthode robuste de dépolymérisation de chitosane de toutes origines, masses molaires et degrés d'acétylation. Pour cela, cinq chitosanes de DA, masses molaires et origines différentes ont été dépolymérisés par le traitement d'acide nitreux en milieu acide pour former des oligomères hydrosolubles (COS) de degré de polymérisation inférieurs à 20 unités et terminés par une unité 2,5 anhydro-D-mannose (AMF). Dans un

premier temps, la réaction a été suivie pendant 24h à différentes températures afin de déterminer les meilleures conditions conduisant à une méthode robuste de dépolymérisation du chitosane. Les oligomères ainsi formés ont ensuite été caractérisés tout d'abord par chromatographie d'exclusion stérique (CES) pour calculer les degrés de polymérisation (DP) à partir des masses molaires mesurées, puis structurellement par spectroscopies RMN et infrarouge. Cette étude a donné lieu à une publication dans le journal **Biomacromolecules** présentée dans la partie suivante. (Biomacromolecules, 2019, 20 (12), 4353-4360)

Water soluble 2, 5-anhydro-D-mannofuranose end chain chitosan oligomers of very low molecular weight: synthesis and characterization

Camille Chapelle¹, Ghislain David^{1*}, Sylvain Caillol¹, Claire Negrell¹, Graziella

Durand², Myriam Desroches le Foll², Stéphane Trombotto³

¹Ingénierie et Architecture Macromoléculaire (IAM) 8 rue de l'école Normale, 34296 Montpellier CEDEX 5, France

²CST COLAS 4, Rue Jean Mermoz CS 30504 – 78771 Magny-les-Hameaux Cedex

³Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP), CNRS UMR 5223, Université Claude Bernard Lyon 1, Univ Lyon, 69622 Villeurbanne, France

KEYWORDS: Chitosan, depolymerization, variable resources, water soluble oligomers

I. Abstract

Five chitosan with different acetylation degree (DA), molar masses and origin were depolymerized by nitrous acid treatment in acidic media leading to water soluble 2,5 anhydro-D-mannose end chain oligomers with DP_n<20. The kinetics of the reaction were studied and the best work conditions were found to be 3 h reaction at 50 °C. It was shown that the DP_n of oligomers only depends on the quantity of NaNO₂ involved. Molar masses or DA do not have an impact on the depolymerization process when targeting oligomers with less than 20 units. This depolymerization process also leads to free AMF that might react with the free amines of obtained oligomers to form imines. This reaction is pH dependant and in acidic condition, leads to the formation of 5-hydromethyl-2-furfural (HMF). At the end, the oligomers were purified with dialysis to get rid of most free AMF (<5 %) and other residual salts, and appeared to have no acute toxicity.

II. Introduction

Chitosan is a polysaccharide constituted of β-D-glucosamine and N-acetyl-β-D-glucosamine units linked by a glycosidic bond (1→4). It is the N-deacetylation of chitin, a polymer extracted from shrimp shells, squids, insects or mushrooms, poorly processable

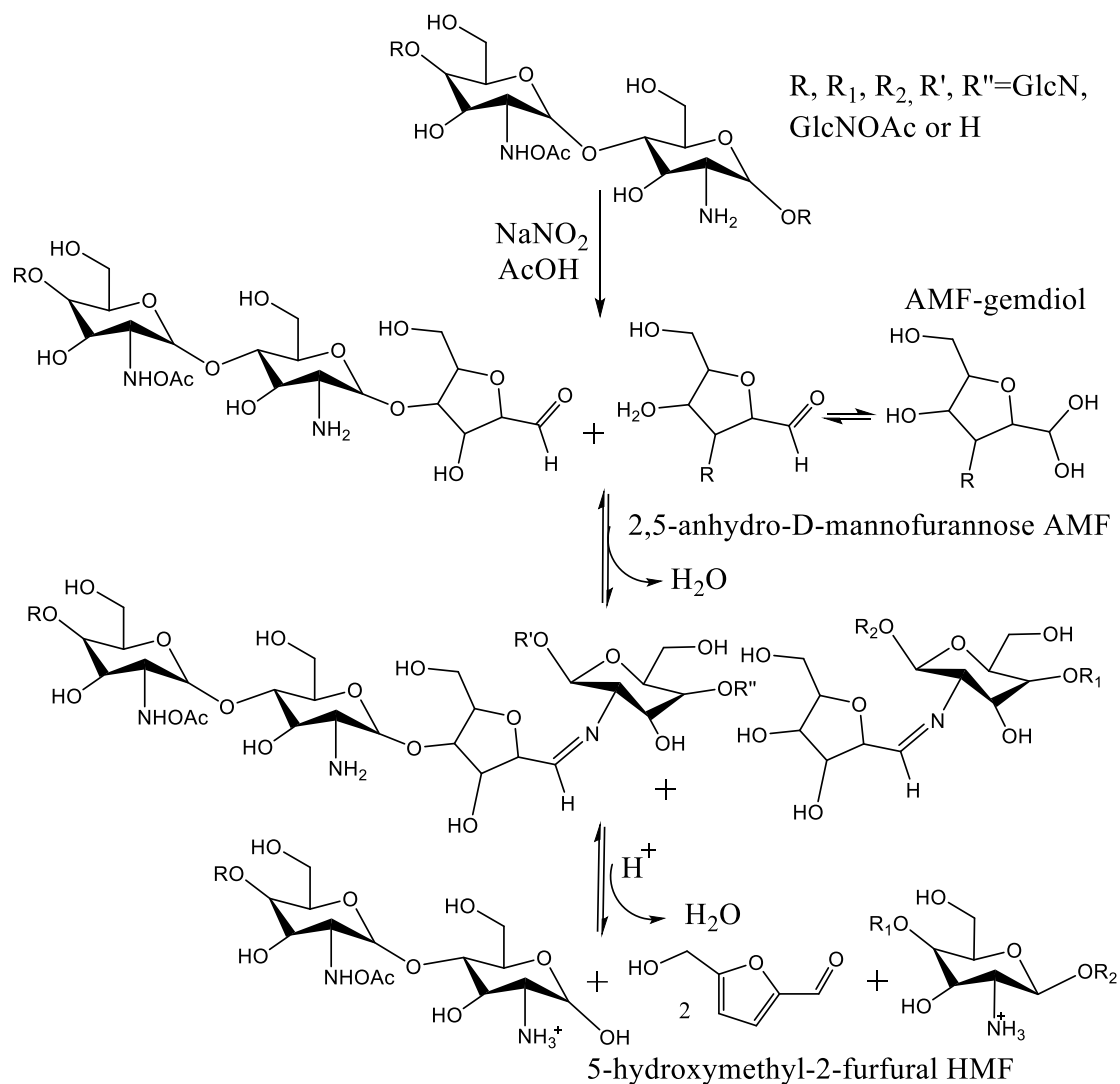
due to its insolubility in most solvent including water that leads to chitosan. Chitin and chitosan have the same chemical structure and differ only by the proportion of N-acetylated units along the chain, >60 % for chitin and <60 % for chitosan. In fine, chitosan is characterized by its source (crustacean, insects, fungi...), its N-acetylation degree (DA) and its molar mass. A wide range of chitosan exists with various molar masses from 100.000 g/mol up to 500.000 g/mol with acetylation degree between 0 and 30 %⁵⁸. Many interesting applications result from use of chitosan^{59, 60, 61, 62}. Nevertheless, chitosan use is limited due to its high viscosity, its insolubility in organic solutions and poor solubility in aqueous solution owing to the pH⁶³. Hence, a flourishing interest for lowering the molar masses to obtain chitosan oligomers appeared during the last decade^{23, 64, 65}.

ChitoOligoSaccharides (COS) have indeed recently received considerable attention as functional biomolecules with a wide range of applications in food, agriculture, medicine, pharmaceuticals and cosmetics. COS are often defined as chitosans with degree of polymerization DP less than 20⁶⁶, i.e. with average molar masses lower than 4.000 g/mol. COS are either composed of β -D-glucosamine units or, can be a mixture of β -D-glucosamine and acetyl- β -D-glucosamine randomly organized. COS are defined by some unique properties such as water solubility, cell membrane penetrability, easy absorption and various biological activities. It is also worth to note that COS are easier to process, due to less chain entanglement and steric hindrance which confer them a direct solubility in water for DP<20^{62, 64}. COS are insoluble in acetone, butanol, ethanol, ethyl acetate, propanol and pyridine but as opposed to chitosan, partially soluble in methanol and in dimethyl sulfoxide and dimethyl formamide when heated⁶⁷. Furthermore for these oligomers, the smaller are the molar masses, the better is the solubility. In addition, the utilization of COS allows to reduce the viscosity and to work with higher concentration. COS are reported to treat asthma, prevent tumor growth, malaria, control blood pressure and also have neuroprotective effects for Alzheimer disease treatment thanks to their biological activities, that include antibacterial, antifungal, antiviral, anti-tumor and antioxidant properties, which have been reported to overcome those of chitosan^{65, 68, 69, 70, 71}.

Several ways to reduce chitosan molar masses including enzymatic, physical or chemical depolymerization have been studied over the last decades^{64, 15, 38, 35, 72}. Enzymatic methods are really precise but very expensive and hardly applicable on large scale. Physical depolymerizations with microwave or sonication do not lead to oligomers and are mostly used to reduce molar masses and viscosity of chitosan solutions. They are often combined with chemicals like peroxide or concentrated acid to boost the depolymerization. Those methods are hardly controllable and reproducible. Allan and al.⁴³

developed a depolymerization method, based on the use of sodium nitrite (NaNO_2). The principle is based on the action of nitrous acid, which cleaves the glycosidic linkages of chitosan. The reaction consists in the formation of a diazonium ion on a D-glucosamine unit by reaction between the free amine and the nitrous acid. A carbocation is obtained by nitrogen release. The nucleophilic addition of endocyclic oxygen then leads to a 2,5-anhydro-D-mannofuranose (AMF) structure as the new chain end (

Scheme 6).



Scheme 6. Reaction of NaNO_2 onto chitosan and side reaction leading to HMF

Interestingly, they established an equation linking the obtained oligomer molar mass to the quantity of NaNO_2 . Later on, Tømmerraas et al.⁴¹ investigated on the reaction mechanism with detailed NMR analyses of fully N-acetylated and N-deacetylated oligomers. They especially underlined the formation of AMF chain end. They also showed the presence of secondary reactions: the resulting aldehyde of AMF chain end could react

with the free amines of chitosan oligomers, leading to the formation of a Schiff base during lyophilisation. In acidic conditions, this Schiff base would then facilitate the elimination reactions leading to the formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF), another byproduct. Shirui Mao and al.⁷³, studied some factors affecting the depolymerization process like chitosan concentration, reaction time and reproducibility. They studied high molecular weight (600 kg/mol and 400 kg/mol) and low molar masses (150 kg/mol) chitosans as well as cytotoxicity of the resulting COS with molar masses ranging from 2.800 to 49.000 g/mol but did not get further on the depolymerization process to reach lower molar mass oligomers. Although nitrous deamination has been studied and used many times to depolymerize chitosan^{74, 44}, this reaction was not investigated so far for reaching even smaller DPs, i.e. $5 < DP < 20$. Only Moussa et al. synthesized oligomers of DP10 using this method but started from one single type of chitosan (DA 0 %, $M_n = 115.000$ g/mol)⁴⁶. Those oligomers could be of interest as they happen to be directly water soluble depending on the pH and even soluble in DMSO and exhibit better biological activities⁷¹. Besides, effect of both sourcing and DA for initial chitosan onto depolymerization process was also not highlighted.

The purpose of this paper is to obtain chitosan oligomers of different DP (average from 5 to 60) by nitrous deamination from different chitosans by varying the DA, the Mw and the origin (marine and insect). The kinetics of the reaction were studied as well as the ideal reaction parameters to lead to a robust method of chitosan depolymerization. The formation of free AMF and HMF was underlined and correlated to the different reaction parameters. The molar masses of the resulting oligomers were calculated using size exclusion chromatography (SEC). Structure identification was performed using infrared spectroscopy (IR), ^1H and 2D DOSY NMR spectroscopy, and headspace chromatography.

III. Materials and methods

III.1. Materials

Three different shrimp chitosan DA around 10-15 % CH30 (M_w 30 kg.mol⁻¹), CH150 (M_w 150 kg.mol⁻¹), CH250 (M_w 250 kg.mol⁻¹) were purchased from Glentham Science, chitosan with DA equal to 1% CHDA1 (150 kg.mol⁻¹) was purchased from Mathani chitosan, insect chitosan with DA equal to 20% CHY (M_w 180 kg.mol⁻¹) was purchased from Ynsect and used as received. Acetic acid (AcOH), sodium acetate (NaAc), sodium nitrite (NaNO₂), lithium bromide (LiBr), sodium azide (NaN₃), sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), acetone (>98 %) were purchased from Sigma and used without purification, HPLC water (>99 %) was purchased from VWR.

III.2. Depolymerization of chitosan

The depolymerization of high molecular weight chitosans was performed by nitrous deamination involving NaNO_2 as previously described ⁴¹. Briefly, 1 g (w/w) of chitosan was dissolved in 80 mL of AcOH (350 μL in 90 mL of deionized water) solution overnight (pH 4.5). Once solubilized, a freshly prepared solution (10 mL) containing the desired equivalent ratio of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 eq) was added to the solution. The solution was stirred at definite temperature for a definite time. Oligomers of $\text{DP} > 20$ (made with 0.1 eq of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$) were precipitated by addition of 1M solution of NaOH and washed several times with deionized water until neutral pH. Oligomers with $\text{DP} < 20$ did not precipitate with the addition of NaOH. The solutions were then freeze dried for 24 h and the lyophilisates were dried under vacuum for 24 h. The kinetics of the reaction were investigated for the five different chitosans. For that, chitosans were dissolved in deionized water with 1 eq AcOH/ NH_2 , 0.2 eq of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ were added and the reaction was led at room temperature (30°C). Samples were taken after 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h and 24 h, freeze dried and analyzed using SEC with a PEO calibration. The same experiment was reproduced for CH150 at 10°C, 30°C, 50°C and 70°C in order to investigate influence of temperature on the reaction. Dialysis was performed using Spectra/Por dialysis membrane Biotech CE tubing MWCO: 100-500 D. ¹H NMR of 1600 g/mol oligomer, D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5.5: δ 8.2-8.5 (s, H aldehydes), 8-7.1 (H imines), 5.0 (d, 5 Hz, 1H H1 gemdiol), 4.5 (m, 1H H2-AMF), 4.3 (m, 1H, H3-AMF), 4.1 (m, 1H, H5-AMF), 3.2-4.0 (m, 1H H2 acetyl, 1H H3, 1H H4, 1H H5, 2H H6, 1H, H4-AMF 2H, H6-AMF), 2.5 (m, 1H, H2), 2.0 (s, 3H, HCH_3), 4.8 (s, HOD). 23 % of the amines are in imines form. 51% of the aldehydes (free or chain end) have reacted with an amine to form imines, 21% are in gem diol form and 28% are in aldehyde form (Annexe 8).

III.3. AMF synthesis

AMF was synthesized by action of nitrous acid on d-glucosamine. Briefly, 1 g (4.6 mmol, 1 eq) of D-(+)-Glucosamine hydrochloride was dissolved in 20 mL of deionized water during 3h. Sodium nitrite (1 g, 14.5 mmol, 3.2 eq) was added and the reaction was led at room temperature for 6h. The final product was lyophilized for at least 24h. ¹H NMR for D-glucosamine (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ 5.42 (d 4 Hz, 1H, H1 α), 4.9 (d 8 Hz, 1H, H1 β), 3.4-3.9 (m, 1H H3, 1H H4, 1H H5, 2H H6), 3.3 (dd 10Hz, 1H, H2 α), 2.9 (dd 10 Hz, 1H, H2 β), 4.8 (HOD). ¹H NMR for AMF (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ 8.5 (s, 1H, H1), 5.1 (d, 5 Hz, 1H, H1 gemdiol), 4.2 (t 6 Hz, 1H, H2), 4.1 (t 6 Hz, 1H, H3), 4.0 (m, 1H, H5), 3.8 (m, 1H, H4 2H, H6) as expected ⁷⁵. In deuterated water, AMF is 70% in gem-diol and 30% of aldehyde form (Annexe 7).

III.4. Characterization

^1H NMR, analyses were performed using a Bruker Avance 400 MHz NMR spectrometer at 298 K. 2D DOSY NMR was performed on a 600MHz Bruker Avance spectrometer. NMR samples were prepared by dissolving 15 mg of product in 0.5 mL of D_2O . The chemical shifts were reported in part per million relative to tetra methylsilane. Spin multiplicity is shown by s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quadrat and m=multiple. DA of native chitosan and oligomers were determined using ^1H NMR. FTIR spectra were recorded on Nicolet 6700 FTIR spectrometer. GC-MS analysis were performed on GC 7890B AGILENT equipped with a capillary column Agilent 122-1364UI DB-624UI (60 m x 0.25 mm, 1.4 μm), with FID detector and mass spectrometer 5977B AGILENT. GC is directly linked to the headspace sampler 7697A Agilent, with and injection loop (1000 μL) and a transfer line. dn/dc were calculated using the differential refractive index (RI) detector Wyatt Optilab T-rEX. Molar masses were recorded using triple detection size exclusion chromatography (Tosoh TSK PW 2500, TSK PW 6000, TSK gel G Oligo PW) coupled with the same RI detector Wyatt Optilab T-rEX, multiangle light scattering Wyatt DAWN HELEOS II, and a Fused Silica cell, laser $\lambda=664$ nm. They were also recorded using size exclusion chromatography with RI detection (PL aquagel-OH 30 8 μm 100-60.000 g/mol, PL aquagel-OH 40 8 μm 10.000-200.000 g.mol $^{-1}$, TSK gel G Oligo PW 7 μm 7.8 mm IDx30 cm 0-6000 g.mol $^{-1}$) calibrated using PEO/PEG standards. 10 mg/mL solutions of oligochitosans were prepared in acetate buffer (1.5 % AcOH, 0.8% NaAc, 1 ppm NaN_3 , 5 ppm LiBr). Error bars were calculated by doing standard deviation on three different integration on each chromatogram and data plotted are the average value of those measurement. The pH (correction for isotopic effect: $\text{pD}=\text{pH}+0.4$) were measured by use of a Mettler Toledo pH electrode.

In order to validate the PEO equivalent method for molar masses measurement, triple detection SEC was performed. To do that, variation of refractive index according to concentration, dn/dc , were measured using a differential refractometer Wyatt Optilab T-rEX. 1 mg.mL $^{-1}$ chitosan/oligochitosan solutions were prepared in degassed acetate buffer (AcOH 0.2 M/0.15 M ammonium acetate; pH=4.5) and diluted at 80%, 60%, 40%, 20%, 10% (w/w). Refractive indexes were measured according to solution concentration (658 nm, 0.5 mL.min $^{-1}$). After that, 3 mg.mL $^{-1}$ chitosan/oligochitosan solutions were prepared in the acetate buffer from above. 100 μL of solution were filtrated on 0.45 μm membrane CME filter and injected in the apparatus made of Tosoh TSK PW 2500 TSK PW 6000 coupled with a differential refractometer Wyatt Optilab T-rEX, multi angular light scattering Wyatt DAWN HELEOS II, and UV cellule Fused Silica, laser $\lambda=664$ nm. Molar masses (M_w , M_n and $\bar{M}$) of chitosans and oligochitosans were determined taking in

account the dn/dc determined above. DP_n were calculated according to the formula (2) and are presented in supporting information (Annexe 5):

$$(5) \quad DP_n = \frac{M_n}{DA \times 203 + (1 - DA) \times 162}$$

Toxicity and ecotoxicity of oligomers post dialysis (DP_5 and DP_{10}) were evaluated according to acute tests on *Daphnia magna* (NF EN ISO 6341, 2012) performed by Eurofins. This test aims at finding the concentration immobilizing 50% of the daphnia population after 24 h and 48 h (CE_{50}). A solution of $K_2Cr_2O_7$ CE_{50} -24h = 0,94 $mg.L^{-1}$ (this value corresponds to standard between 0.60 $mg.L^{-1}$ and 2.1 $mg.L^{-1}$ according to NF EN ISO 6341 : 2012) is used as a reference substance. Samples were prepared by dissolving oligomers in an ultra-pure water solution of anhydrous sodium hydrogen carbonate $NaHCO_3$ (0.200 $g.L^{-1}$), calcium chloride $CaCl_2$ (0.260 $g.L^{-1}$), magnesium chloride $MgCl_2$, 6 H_2O (0.148 $g.L^{-1}$), anhydrous potassium sulfate K_2SO_4 (0.026 $g.L^{-1}$). 100 $g.L^{-1}$ solutions were prepared and diluted as followed: 35%, 10%, 3.5%, and 1% (w/w). Tests were performed at 20 °C.

IV. Results and discussion

Depolymerization using $NaNO_2$ was investigated from 5 different chitosans. 3 of them, obtained from crustaceous, have the same DA (i.e. 16 %) and only differ by their M_w : 30, 150 and 250 kg/mol. They will be labeled as CH30, CH150 and CH250. The fourth chitosan, also obtained from crustaceous and labeled CHDA1, has a M_w of 150 kg/mol with DA of 1%. The last studied chitosan, labeled CHY, has a M_w of 240 kg/mol, DA of 20% and was provided from insects.

During the course of depolymerization reaction, molecular weight evolution was followed by means of SEC using PEO/PEG standards. We have first decided to validate this method by also assessing M_w values by triple detection SEC. It was shown that dn/dc values are smaller than those of respective crude chitosans (Annexe 3). Moreover, even if the dn/dc values are very close for any oligomers of similar molar masses, this study shows that dn/dc values are different for all samples. Therefore, it is very important to determine dn/dc before doing further analyses. Indeed, a small variation of the dn/dc value has a significant impact on the molar masses obtained, specifically with small objects.

M_w and M_n values for each chitosan oligomer, as well as the corresponding crude ones, are given in Table 1 (Annexe 5). It was especially shown that both methods afford rather close values when targeted DP below 20. Above this value and also for crude chitosans, SEC using PEO/PEG standards seems to underestimate the M_n values (25% lower than triple detection values). Nevertheless, this works aims at synthesizing COS

oligomers with DP lower than 20. Thus we have decided to use SEC with PEO/PEG standards to monitor the Mn evolution for all chitosans.

At first, each chitosan was reacted with 0.2 eq of NaNO_2 at room temperature (30°C) and molar masses decrease was followed over time (Figure 18 a)). Mn of CH30, CH150, CH250 and CHY showed a similar trend, i.e. a very fast decrease during the first 30 min until approximately reaching $6,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, then Mn slightly decreased until stabilization. It was shown that the reaction is immediate, the most important drop of molar masses occurs during the first minutes (Figure 18 b)). The plateau was reached when either NaNO_2 was fully consumed or did not react anymore. CHDA1 behaves slightly differently since molar masses decrease faster to reach $2,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ after 30 min. According to the mechanism (

Scheme 6), this faster decrease can be easily explained by the fact that CHDA1 has more free amines available for reaction with NaNO_2 , thus leading to more glycosidic bond cleavages. Consequently, CHDA1 reaches a plateau after only 6 h, whereas 24 h are needed for the four other chitosans. The kinetics of the reaction also depend on crude chitosan Mn: CH30 molar masses decreases faster than that of CH150 and CH250. This is probably due to the higher viscosity for higher Mn chitosans in solution. It was also shown that dispersity of the different chitosans decreases during the depolymerization process to reach interesting values ranging between 1.3 and 1.6 (Figure 19).

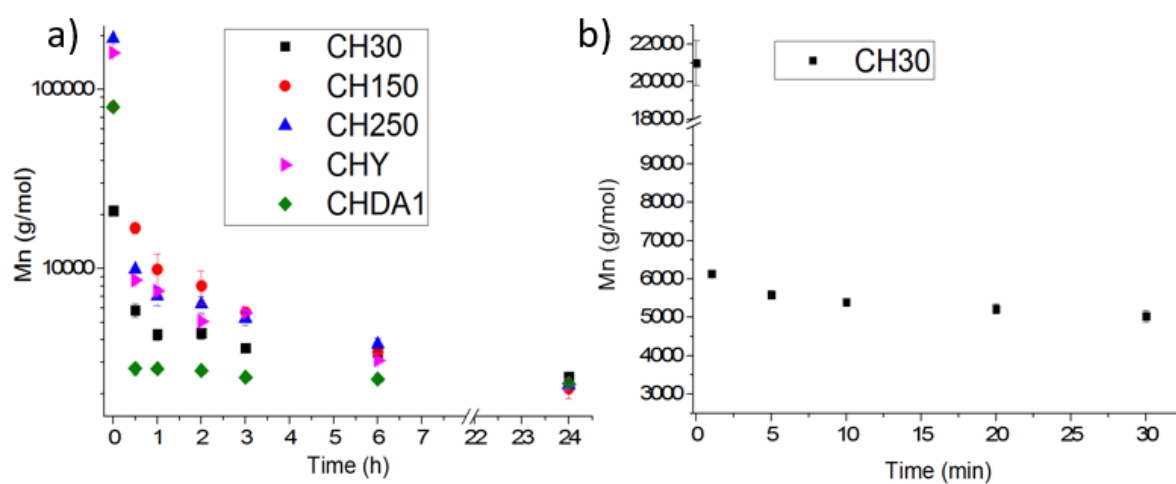


Figure 18. a) Evolution of molar masses log (Mn) as a function of time for five different chitosans (1% w/w) with 0.2eq of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ b) Evolution of molar masses as a function of time for CH30 with 0.2 eq of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ during the first 30 min

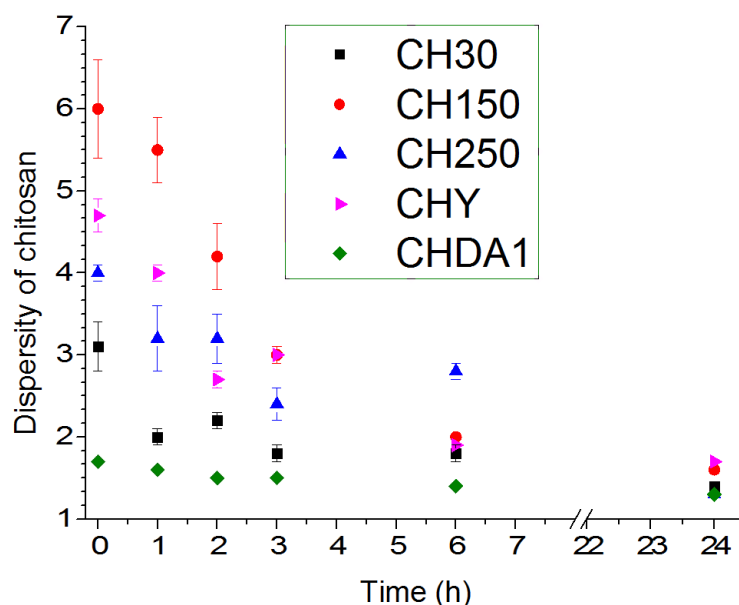


Figure 19. Evolution of the dispersity as a function of time for five different chitosans (1% w/w) with 0.2eq of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$

This reaction was carried out at room temperature, as already described in the literature ⁴¹. Nevertheless, an increase of the temperature should impact the reaction kinetics but also may lead to reaction completion, until reaching lower molar masses COS, i.e. $\text{DP} < 20$.

The reaction was carried out with CH150, with 0.2 eq of NaNO_2 at 4 different temperatures, i.e. 10, 30, 50 and 70 °C (Figure 20). At 10 °C, the reaction was not completed even after 24h. Indeed, at low temperature, viscosity of crude chitosan solution is high, which therefore decreases the reaction kinetics. Furthermore, NaNO_2 could be consequently decomposed in nitrogen oxide by acetic acid instead ⁷⁶. With a similar $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ ratio, a temperature increase leads to faster depolymerization reaction. As expected, the reaction kinetics proceeded very fast at 70°C, and lower M_n COS were obtained. This could be explained by additional acidic depolymerization, due to the presence of acetic acid (pH 4.5) ⁴⁰. When heated at 50°C, the plateau was reached after only 3 h. The reaction was still carried out for 24 h to ensure that no further degradation occurred. Consequently, the following experiments were carried out at 50 °C during 3 h.

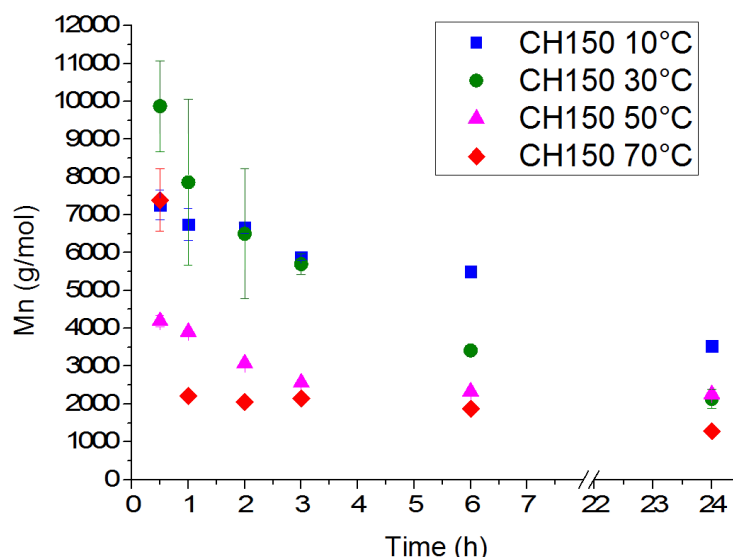


Figure 20. Evolution of Mn vs time at different temperatures for the reaction of CH150 with 0.2 eq of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$

Allan et al.⁴³ already showed that the resulting Mw of COS was directly related to the content of NaNO_2 . Then CH30, CH150, CH250, CHDA1 and CHY were reacted at 50°C for 3 h with different $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ equivalents, and their Mn were assessed (Figure 21). First, we can note that the five chitosans behave similarly, i.e. the evolution of Mn changed at 0.2 eq. below this value, a strong Mn decrease was observed from crude chitosans to reach values above 2,500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, i.e. $\text{DP} > 20$. These COS can be purified by precipitation into a strong base to obtain COS with DP ranging between 30 to 45 at 0.1 eq of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$. Above 0.2 eq $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$, Mw COS slowly decreased by increasing NaNO_2 content. Interestingly, the resulting COS showed DP ranging from 15 to 5 and were water soluble (pH 5.5). Thus, as already demonstrated by Allan et al.⁴³, a defined number of equivalents of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ allows obtaining COS with DP values from 5 to 20. Furthermore, this reaction is clearly not affected neither by molar masses (between 30 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ and 250 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$), nor DA (between 1 and 20%) or origin of crude chitosans.

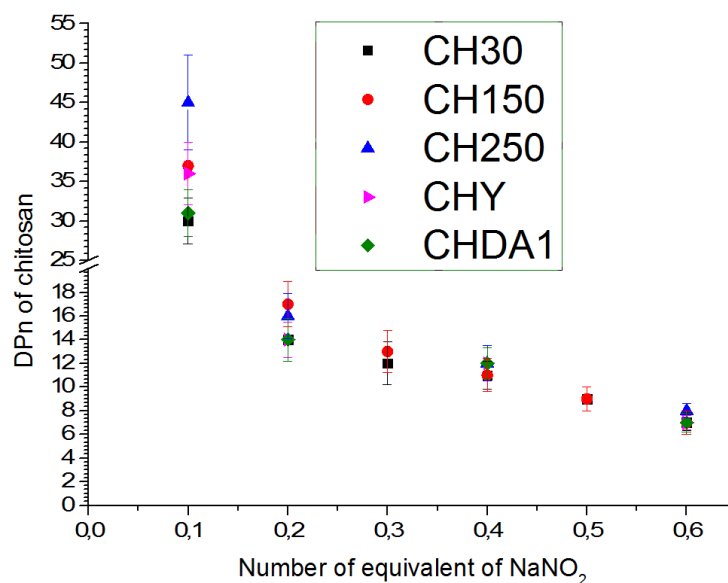


Figure 21. Evolution of M_n vs $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ equivalents for the depolymerization of CH30, CH150, CH250, CHDA1 and CHY at 50 °C for 3 h.

To check their stability over time, the resulting COS with DP ranging from 5 to 20 were analyzed by SEC after 6 months (Figure 22). No decrease was observed even after 6 months, which proved that no further degradation occurred. The 10 % difference between the two molar masses was explained by the change of calibration curve and evolution of the column. Finally, COS obtained with 0.2 eq. of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ were analyzed by FTIR and compared to the corresponding crude chitosans (Annexe 11). The carbonyl band at 1650 cm^{-1} is still visible in the oligomer spectra meaning that the acetylated units are still present. The similarity of both crude chitosan and oligomers by ^1H NMR analysis proves that no sugar units degradation occurred, as expected (Annexe 9; Annexe 10). As a matter of fact, the DA is conserved during depolymerization.

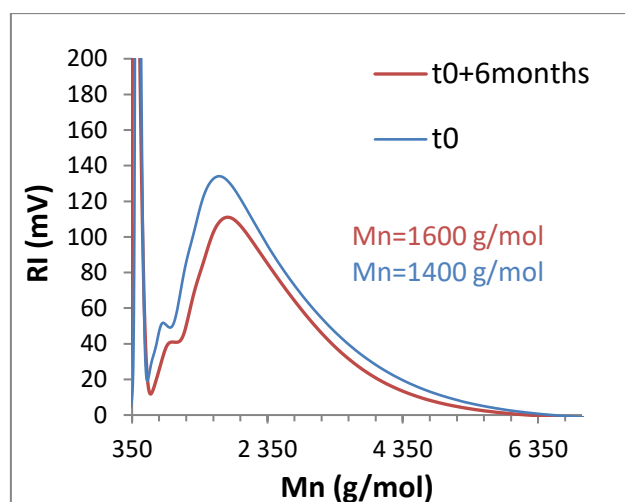


Figure 22. Evolution of M_n of oligochitosan CH30 with 0.4 eq of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ from t_0 to $t_0+6\text{months}$

Tømmeraas et al.⁴¹ showed that nitrous deamination leads to the formation of AMF chain end of COS (reductive end), but also to the formation of free AMF (2,5-anhydro-D-mannose) when glycosidic bond breakage occurs at the non-reductive polymer chain-end. Furthermore, AMF is in equilibrium with the corresponding gem diol. Both AMF chain-end and free AMF may unlikely react with amine groups of chitosan and the obtained Schiff base will undergo formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) when changing to acidic pH (Figure 24 b)). The presence of both AMF and HMF was first confirmed by headspace analysis. The analysis was performed by gas chromatography with static headspace coupled to a detection mass spectrometer (GC-MS). Once lyophilized, AMF, glucosamine and oligomers were characterized. AMF emissions are mainly composed of nitrogen and oxygenated compounds. The main signals from AMF are 18 and 19 (Annexe 12) which are identified as furfural and furanmethanol, respectively and for other signals in general as furan derivatives. Those compounds are close to the real structure of AMF. In the other way, COS mainly showed both nitrogen and oxygenated compound corresponding to alcohol and amine functions of the sugar units and shows signals correlating with those from AMF, i.e. mainly furan derivatives (peak 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27) (Annexe 13). However, no correlation between glucosamine and COS emissions were noticed, meaning no D- glucosamine was left at the end of the depolymerization process (Annexe 14).

Then, to assess the presence of those small molecules, 2D DOSY was performed (Figure 23). This experiment allows differentiating the NMR signals of different species according to their diffusion coefficient. In ideal case of non-overlapping component lines and no chemical exchange, the 2D peaks align themselves along horizontal lines, each corresponding to one sample component. This means that on the spectrum every signal

belonging to the same molecule will appear on the same line. Figure 23 a) shows 2D DOSY NMR spectrum of a 1600 g.mol⁻¹ COS obtained by nitrous deamination of CH30 at 50 °C (0.4 eq of NaNO₂). Aldehyde signals are clearly highlighted, evidencing the presence of both COS AMF chain-end and free AMF in equilibrium with the gem-diol form of both products (4.5-5 ppm). These signals were then analyzed by ¹H-¹³C 2D HSQC NMR (Figure 23 b)). The carbon signals near 180 ppm were specifically attributed to aldehydes function. Carbon signals between 140 and 180 ppm correlating to proton signals between 7 and 8 ppm are characteristic of imine groups. These imines resulted from the reaction between AMF (free or chain end) and amine functions of CH30. Then, if the pH drops, free HMF can be obtained, as already proved by Tømmerraas et al ⁴¹.

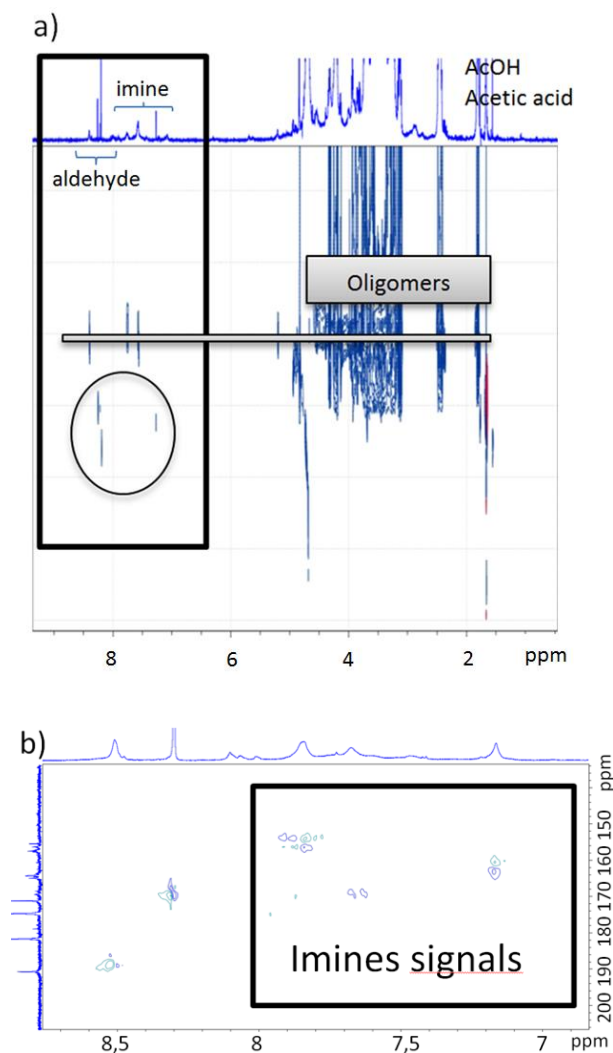


Figure 23. a) 2D DOSY NMR spectrum of a 1600 g.mol⁻¹ oligomer obtained from COS from CH30 + 0.4 eq NaNO₂/NH₂ (3 h at 50 °C) b) ¹H-¹³C 2D HSQC NMR spectrum of the aldehyde zone

Consequently, the effect of pH on COS structure was investigated. COS was solubilized in deuterated water at pH 5.5. Then, pH of the solution was either dropped to 2 with HCl or raised to 12 with NaOH. ^1H NMR spectra were then recorded straight away at pH 2, 5.5 and 12 (Figure 24). At pH 5.5 both aldehyde and imine functions are clearly visible at 8.3 and 7.9 ppm, respectively. At pH 2, the peak corresponding to imine group totally disappeared, whereas the presence of HMF was characterized by the furanic protons peaks (7.4 and 6.5 ppm) as well as by the aldehyde proton peak (9.3 ppm), in agreement with Tømmeraas et al.⁴¹ work. The aldehyde peaks characteristic of both AMF and COS AMF chain-end were still visible (8.2 ppm). Intensity of both aldehyde peaks allows determining that 50 % of aldehydes were converted into free HMF. Finally, when increasing pH to 12, the aldehyde signal (8.1 ppm) only remained and no imines were formed.

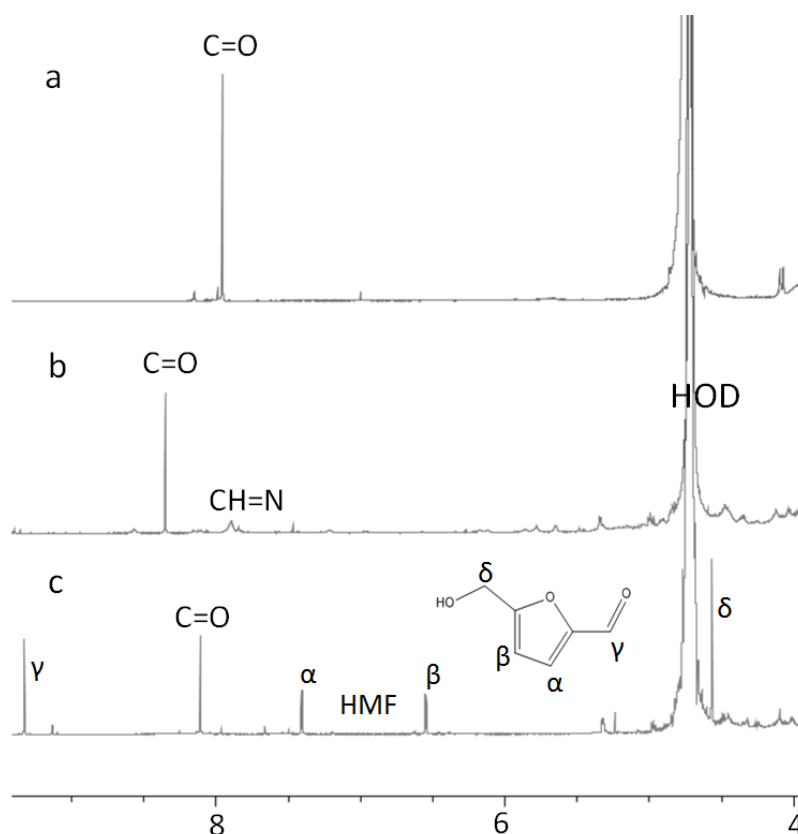


Figure 24. a) ^1H NMR spectra of COS from $\text{CH30} + 0.4 \text{ eq NaNO}_2/\text{NH}_2$ (1600 g.mol^{-1}) recorded in D_2O at pH 12 (a), at pH 5.5 (b) and at pH 2 (c)

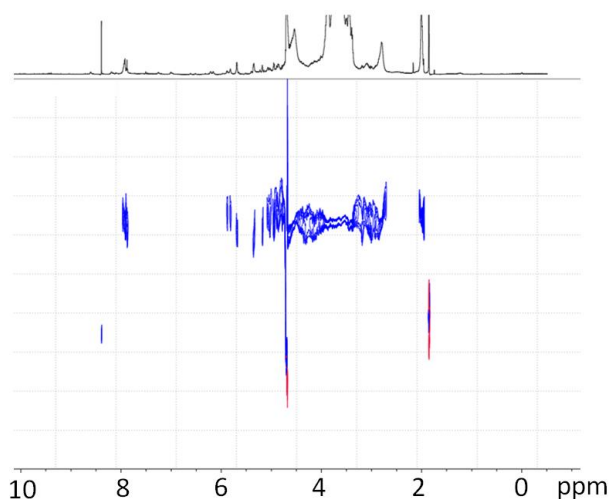


Figure 25. 2D DOSY NMR of COS from CH30 + 0.4 eq $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ ($1,600 \text{ g.mol}^{-1}$) and purified by 24 h dialysis

Finally, COS were purified by dialysis during 24 h against deionized water. COS were found to have the same chemical structure (Annexe 15) and a small increase (10%) in molar masses is visible due to elimination of smaller oligomers. Dialysis allows to extract not only unreacted NaNO_2 and $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ but also free AMF and HMF. Furthermore, during COS dialysis, acetic acid was extracted, and then the pH increased. 2D DOSY NMR spectrum of COS was performed after dialysis (Figure 25) and almost no free aldehyde was observed, i.e. from AMF (<5 %) (Annexe 13).

After dialysis, ecotoxicity of two COS, i.e. DP 5 and 10, was evaluated. The experiment was reproduced 4 times on a population of 5 daphnia. It was shown that after 48 h, the daphnia used for the test are still mobiles for DP5 and DP10 at concentration of 100 mg.L^{-1} and below (Figure 26 & Annexe 16). Those results assess that DP5 and DP10 are not acute toxic/ecotoxic and their $\text{CE}_{50-24\text{h}}$ and $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ are above 100 mg.L^{-1} .

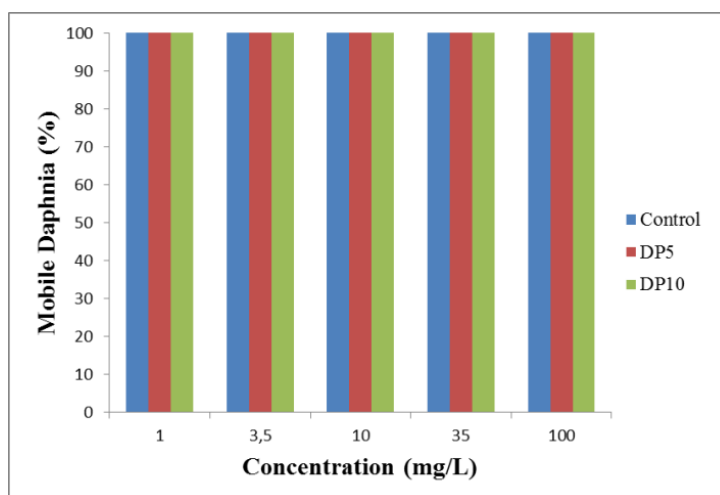


Figure 26. Mobility of daphnia after 48 h against sample concentration

V. Conclusion

In this study, water soluble chitosan oligomers of different size (DP5 to DP20) were obtained by nitrous deamination. The impact of the DA, the MW and the origin (marines and insects) of crude chitosan was studied. The kinetics of the reaction were also studied. The ideal reaction parameters were determined to be a 3 h reaction at 50 °C. It was shown that the method is reproducible and does not depend on the chitosan nature. The relationship between the quantity of NaNO_2 and the DP of oligomers was optimized for low DP of COS. It was shown that not only AMF end chains but also free AMF was formed during the reaction. Those aldehydes react with the free amines of COS to form imines. The pH dependency of the imine formation was underlined. It is feasible to reduce imine concentration or avoid its formation by changing the pH. As well, dialysis allows decreasing the content of free AMF that might react with the free amines of COS and reduces imine formation. At the end, the purified oligomers show no acute toxicity or ecotoxicity, and their CE50-24h and CE50-48h remained above 100 mg.L⁻¹.

SUPPORTING INFORMATION (Annexe chapitre 2)

- DA, dn/dc, molar masses and dispersity of crude chitosan and chitosan oligomers obtained with action of NaNO_2 during 3h at 50°C.
- ^1H NMR spectrum of D-(+)-Glucosamine hydrochloride
- ^1H NMR spectrum of AMF
- ^1H NMR spectrum of oligomer 1600 g/mol from CH30 + 0.4 eq $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$
- ^1H NMR spectrum of crude chitosan CH30
- ^1H NMR spectrum of chitosan oligomer from CH30 + 0.2 eq $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$
- IR spectra of both chitosan CH30 and chitosan oligomers of 1,600 g/mol
- Chromatograms from headspace chromatography of AMF, glucosamine and chitosan oligomers and their respective attribution data.
- ^1H NMR spectrum of oligomer 1600 g/mol from CH30 + 0.4 eq $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ post dialysis
- Number of daphnia mobiles for DP5 and DP10 at 100 mg/L after 48h and inhibition percentage against control sample

Conclusions

Il est connu que le chitosane est une ressource variable, d'un fournisseur à un autre, même parfois d'un lot sur l'autre. Ceci peut constituer un frein pour l'industrialisation de procédés impliquant cette biomacromolécule. Dans ce deuxième chapitre, il a été montré que la désamination nitreuse permet d'obtenir des oligomères de tailles contrôlées à partir de n'importe quel type de chitosane (origine, masse molaire, DA variables) simplement en faisant varier le ratio $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$. Ceci est très intéressant pour Colas puisque cela leur permettra plus tard de s'affranchir de la provenance de la matière première, tant d'un point de vue économique que structurel. Une simple analyse RMN de la matière première pour en déterminer le degré d'acétylation suffira pour adapter le protocole. Il s'agit d'une méthode robuste et facile à mettre en place. Cependant, il a été montré que cette voie de dépolymérisation mène à la formation d'imines intramoléculaires pouvant créer de la gêne stérique supplémentaire par la formation de branchements.

Dans la suite de l'étude, le chitosane sera donc dépolymérisé par l'action de NaNO_2 pour obtenir des oligomères de DP5 à DP20 prêts à être fonctionnalisés pour les rendre amphiphiles.

Références bibliographiques

- (1) Riccardo A. A. Muzzarelli, Vesna Stanic, and V. R. Enzymatic Dépolymérisation of Chitin and Chitosan. *methods Biotechnol.* **1998**, 10, 197–211.
- (2) Kaczmarek, M. B.; Struszczyk-Swita, K.; Li, X.; Szczesna-Antczak, M.; Daroch, M. Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, 7 (SEP). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00243>.
- (3) Mawad, D.; Warren, C.; Barton, M.; Mahns, D.; Morley, J.; Pham, B. T. T.; Pham, N. T. H.; Kueh, S.; Lauto, A. Lysozyme Depolymerization of Photo-Activated Chitosan Adhesive Films. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 121, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.008>.
- (4) Ohtakara, A.; Izume, M.; Mitsutomi, M. Action of Microbial Chitinases on Chitosan with Different Degrees of Deacetylation. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, 52 (12), 3181–3182. <https://doi.org/10.1080/00021369.1988.10869204>.
- (5) Zhang, D.; Bland, J. M.; Xu, D.; Chung, S. Degradation of Chitin and Chitosan by a Recombinant Chitinase Derived from a Virulent *Aeromonas Hydrophila* Isolated from Diseased Channel Catfish. *Sci. Res. Publ.* **2015**, 611–619. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.59064>.
- (6) Y. Takiguchi, K. S. N,N -Diacetylchitobiose Production from Chitin by *Vibrio Anguillarum* Strain E-383a. *Appl. Microbiol.* **1988**, 6, 129–131.
- (7) Oyeleye, A.; Normi, Y. M. Chitinase: Diversity, Limitations, and Trends in Engineering for Suitable Applications. *Biosci. Rep.* **2018**, 38 (4), 1–21. <https://doi.org/10.1042/BSR20180323>.
- (8) Somashekar, D.; Joseph, R. Chitosanases - Properties and Applications: A Review. *Bioresour. Technol.* **1996**, 55 (1), 35–45. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00144-1](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00144-1).
- (9) Choi, Y. J.; Kim, E. J.; Piao, Z.; Yun, Y. C.; Shin, Y. C. Purification and Characterization of Chitosanase From. *Society* **2004**, 70 (8), 4522–4531. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4522>.
- (10) Li, Y.; Chen, L.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Liang, Y.; Mei, Y. Anti-Inflammatory Effects in a Mouse Osteoarthritis Model of a Mixture of Glucosamine and Chitooligosaccharides Produced by Bi-Enzyme Single-Step Hydrolysis. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 2–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24050-6>.
- (11) Weikert, T.; Niehues, A.; Cord-Landwehr, S.; Hellmann, M. J.; Moerschbacher, B. M. Reassessment of Chitosanase Substrate Specificities and Classification. *Nat. Commun.* **2017**, 8 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01667-1>.
- (12) Cheng, C. Y.; Li, Y.-K. An *Aspergillus* Chitosanase with Potential for Large-Scale Preparation of Chitosan Oligosaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, 32 (3), 197. <https://doi.org/10.1042/ba20000063>.

- (13) Pagnoncelli, M. G. B.; de Araújo, N. K.; da Silva, N. M. P.; de Assis, C. F.; Rodrigues, S.; de Macedo, G. R. Chitosanase Production by *Paenibacillus Ehimensis* and Its Application for Chitosan Hydrolysis. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2010**, *53* (6), 1461–1468. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000600023>.
- (14) Qin, C.; Du, Y.; Xiao, L.; Li, Z.; Gao, X. Enzymic Preparation of Water-Soluble Chitosan and Their Antitumor Activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *31* (1–3), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00064-8).
- (15) Xie, Y.; Hu, J.; Wei, Y.; Hong, X. Preparation of Chitooligosaccharides by the Enzymatic Hydrolysis of Chitosan. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94* (10), 1895–1899. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.06.021>.
- (16) Muzzarelli, R. A. A.; Xia, W.; Tomasetti, M.; Ilari, P. Depolymerization of Chitosan and Substituted Chitosans with the Aid of a Wheat Germ Lipase Preparation. *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17* (6), 541–545. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00015-J](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00015-J).
- (17) Yalpani, M.; Pantaleone, D. An Examination of the Unusual Susceptibilities of Aminoglycans to Enzymatic Hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **1994**, *256* (1), 159–175. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84235-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84235-3).
- (18) Pantaleone, D.; Yalpani, M.; Scollar, M. Unusual Susceptibility of Chitosan to Enzymic Hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **1992**, *237* (C), 325–332. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(92\)84256-R](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(92)84256-R).
- (19) Pan, A. D.; Zeng, H. Y.; Foua, G. B.; Alain, C.; Li, Y. Q. Enzymolysis of Chitosan by Papain and Its Kinetics. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *135*, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.052>.
- (20) Alain Gohi, B. F. C.; Zeng, H. Y.; Pan, A. D. Optimization and Characterization of Chitosan Enzymolysis by Pepsin. *Bioengineering* **2016**, *3* (3), 17. <https://doi.org/10.3390/bioengineering3030017>.
- (21) Dong-Rui Yao. Depolymerization of Chitosan by Enzymes from the Digestive Tract of Sea Cucumber *Stichopus Japonicus*. *African J. Biotechnol.* **2011**, *11* (2), 423–428. <https://doi.org/10.5897/ajb11.2803>.
- (22) Pan, S. K.; Wu, S. J.; Kim, J. M. Preparation of Glucosamine by Hydrolysis of Chitosan with Commercial α -Amylase and Glucoamylase. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2011**, *12* (11), 931–934. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100065>.
- (23) Vasilieva, T.; Sigarev, A.; Kosyakov, D.; Ul'yanovskii, N.; Anikeenko, E.; Chuhchin, D.; Ladesov, A.; Hein, A. M.; Miasnikov, V. Formation of Low Molecular Weight Oligomers from Chitin and Chitosan Stimulated by Plasma-Assisted Processes. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *163*, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.026>.
- (24) Gryczka, U.; Dondi, D.; Chmielewski, A. G.; Migdal, W.; Buttafava, A.; Faucitano, A. The Mechanism of Chitosan Degradation by Gamma and E-Beam Irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **2009**, *78* (7–8), 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.03.081>.

- (25) Mozalewska, W.; Czechowska-Biskup, R.; Olejnik, A. K.; Wach, R. A.; Ulański, P.; Rosiak, J. M. Chitosan-Containing Hydrogel Wound Dressings Prepared by Radiation Technique. *Radiat. Phys. Chem.* **2017**, *134* (January), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.01.003>.
- (26) Won-Seok Choia, Kil-Jin Ahnb, Dong-Wook Leeb, Myung-Woo Byunc, H.-J. P. Preparation of Chitosan Beads. *Polym. Degrad. Stab.* **2002**, *78*, 533–538.
- (27) Huang, Q. Z.; Zhuo, L. H.; Guo, Y. C. Heterogeneous Degradation of Chitosan with H₂O₂ Catalysed by Phosphotungstate. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72* (3), 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.022>.
- (28) Chen, Q.; Xiao, W.; Zhou, L.; Wu, T.; Wu, Y. Hydrolysis of Chitosan under Microwave Irradiation in Ionic Liquids Promoted by Sulfonic Acid-Functionalized Ionic Liquids. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, *97* (1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.10.014>.
- (29) Shao, J.; Yang, Y.; Zhong, Q. Studies on Preparation of Oligoglucosamine by Oxidative Degradation under Microwave Irradiation. *Polym. Degrad. Stab.* **2003**, *82* (3), 395–398. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00177-0).
- (30) Wasikiewicz, J. M.; Yeates, S. G. “Green” Molecular Weight Degradation of Chitosan Using Microwave Irradiation. *Polym. Degrad. Stab.* **2013**, *98* (4), 863–867. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.028>.
- (31) RongXing SongLiu, HuahuaYu, ZhanyongGuo, PiboWang, CuipingLi, Z. L. and P. L. Salt-Assisted Acid Hydrolysis of Chitosan to Oligomers under Microwave Irradiation. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2150–2153. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.06.028>.
- (32) Kasaai, M. R.; Arul, J.; Charlet, G. Fragmentation of Chitosan by Ultrasonic Irradiation. *Ultrason. Sonochem.* **2008**, *15* (6), 1001–1008. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.04.005>.
- (33) Mohammad Taghi Taghizadeh *, R. A. Sonolytic-Sonocatalytic-and-Sonophotocatalytic-Degradation-of-Chitosan-in-the-Presence-of-TiO₂-Nanoparticles. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18*, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.04.004>.
- (34) Kasaai, M. R.; Arul, J.; Charlet, G. Fragmentation of Chitosan by Acids. *Sci. World J.* **2013**, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/508540>.
- (35) Varum, K. M.; Ottoy, M. H.; Smidsrod, O. Acid Hydrolysis of Chitosans. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *46* (1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00288-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00288-5).
- (36) Berezin, B. B.; Bezrodnykh, E. A.; Blagodatskikh, I. V.; Yamskov, I. A.; Tikhonov, V. E. Extraction of Residual Heavy Metals from Commercial Chitosan and Approach to Preparation of Oligochitosan Hydrochloride. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *215* (January), 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.072>.
- (37) 1, K. A. A.; * M. M. S. 1 and M. M. A. l-Remawi. Préparation and Characterization of Surface Active N-Butyrate Low Molecular Weight Chitosan.Pdf. *Eur. J. Chem.* **2016**, *7* (1), 91–96. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.7.1.91-96> 6.1353.

- (38) Ibrahim, K. A.; El-Eswed, B. I.; Abu-Sbeih, K. A.; Arafat, T. A.; Al Omari, M. M. H.; Darras, F. H.; Badwan, A. A. Preparation of Chito-Oligomers by Hydrolysis of Chitosan in the Presence of Zeolite as Adsorbent. *Mar. Drugs* **2016**, *14* (8), 43. <https://doi.org/10.3390/md14080043>.
- (39) Krishnan, R. A.; Deshmukh, P.; Agarwal, S.; Purohit, P.; Dhoble, D.; Waske, P.; Khandekar, D.; Jain, R.; Dandekar, P. Proton Play in the Formation of Low Molecular Weight Chitosan (LWCS) by Hydrolyzing Chitosan with a Carbon Based Solid Acid. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.082>.
- (40) Tsao, C. T.; Chang, C. H.; Lin, Y. Y.; Wu, M. F.; Han, J. L.; Hsieh, K. H. Kinetic Study of Acid Depolymerization of Chitosan and Effects of Low Molecular Weight Chitosan on Erythrocyte Rouleaux Formation. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346* (1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.010>.
- (41) Tømmeraas, K.; Vårum, K. M.; Christensen, B. E.; Smidsrød, O. Preparation and Characterisation of Oligosaccharides Produced by Nitrous Acid Depolymerisation of Chitosans. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333* (2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00130-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00130-6).
- (42) Domard, A. Chemical Preparation and Structural Characterization of a Homogeneous Series of Chitin / Chitosan Oligomers. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1731–1738.
- (43) Allan, G. G.; Peyron, M. Molecular Weight Manipulation of Chitosan II: Prediction and Control of Extent of Depolymerization by Nitrous Acid. *Carbohydr. Res.* **1995**, *277* (2), 273–282. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00208-B](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00208-B).
- (44) Charuwan Suitcharit, Farisan Awa, Wae-a-risa Sengmama, K. S. Preparation of Depolymerized Chitosan and Its Effect on Dyeability of Mangosteen. *Chiang Mai J. Sci.* **2011**, *38* (3), 473–484.
- (45) Kootala, S.; Filho, L.; Srivastava, V.; Linderberg, V.; Moussa, A.; David, L.; Trombotto, S.; Crouzier, T. Reinforcing Mucus Barrier Properties with Low Molar Mass Chitosans. Reinforcing Mucus Barrier Properties with Low Molar Mass Chitosans. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 872–882. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01670>.
- (46) Moussa, A.; Crépet, A.; Ladavière, C.; Trombotto, S. Reducing-End “Clickable” Functionalizations of Chitosan Oligomers for the Synthesis of Chitosan-Based Diblock Copolymers. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *219* (May), 387–394. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.078>.
- (47) Coudurier, M.; Faivre, J.; Crépet, A.; Ladavière, C.; Delair, T.; Schatz, C.; Trombotto, S. Reducing-End Functionalization of 2,5-Anhydro-d-Mannofuranose-Linked Chitooligosaccharides by Dioxamine: Synthesis and Characterization. *Molecules* **2020**, *25* (5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051143>.
- (48) Ke Liang B. Chang, Ming-Chih Tai, and F.-H. C. Kinetics and Products of the Degradation of Chitosan by Hydrogen Peroxide. *J. Agric. Food. Chem* **2001**, *49*, 4845–4851. <https://doi.org/10.1021/jf001469g>.
- (49) Huang, K. S.; Wu, W. J.; Chen, J. B.; Lian, H. S. Application of Low-Molecular-

- Weight Chitosan in Durable Press Finishing. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 73 (2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.023>.
- (50) Qin, C. Q.; Du, Y. M.; Xiao, L. Effect of Hydrogen Peroxide Treatment on the Molecular Weight and Structure of Chitosan. *Polym. Degrad. Stab.* **2002**, 76 (2), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00016-2).
- (51) Sun, T.; Zhou, D.; Mao, F.; Zhu, Y. Preparation of Low-Molecular-Weight Carboxymethyl Chitosan and Their Superoxide Anion Scavenging Activity. *Eur. Polym. J.* **2007**, 43 (2), 652–656. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.11.014>.
- (52) Feng Tian*, Yu Liu, Keao Hu, B. Z. Study of the Depolymerization Behavior of Chitosan by Hydrogen Peroxide. *Carbohydr. Polym.* **2004**, 57, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.016>.
- (53) Hien, N. Q.; Phu, D. Van; Duy, N. N.; Lan, N. T. K. Degradation of Chitosan in Solution by Gamma Irradiation in the Presence of Hydrogen Peroxide. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87 (1), 935–938. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.018>.
- (54) Duy, N. N.; Phu, D. Van; Anh, N. T.; Hien, N. Q. Synergistic Degradation to Prepare Oligochitosan by γ -Irradiation of Chitosan Solution in the Presence of Hydrogen Peroxide. *Radiat. Phys. Chem.* **2011**, 80 (7), 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.03.012>.
- (55) Jennifer M.K. Wakefield, Richard B. Gillis, Gary G. Adams, Caitlin M.A. McQueen, S. E. H. Controlled Depolymerization Assessed by Analytical Ultracentrifugation of Low Molecular Weight Chitosan for Use in Archaeological Conservation. *Eur. Biophys. J.* **2018**, 47, 769–775. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1290-6>.
- (56) Zheng, X.; Yin, Y.; Jiang, W.; Xing, L.; Pu, J. Synthesis and Characterization of Low Molecular Weight Chitosan. *Bioresources.Com* **2015**, 10 (2), 2338–2349.
- (57) Trombotto, S.; Ladavière, C.; Delolme, F.; Domard, A. Chemical Preparation and Structural Characterization of a Homogeneous Series of Chitin/Chitosan Oligomers. *Biomacromolecules* **2008**, 9 (7), 1731–1738. <https://doi.org/10.1021/bm800157x>.
- (58) Zargar, V.; Asghari, M.; Dashti, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Rev.* **2015**, 2 (3), 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>.
- (59) Gregorio Crini, Pierre-Marie Badot, E. G. *Chitine et Chitosane Du Biopolymère à l'application.* **2009**
- (60) Jiraporn Choomchit, Jantip Suesat, and P. S. Chitosan as a Thickener for Direct Printing of Natural Dye on Cotton Fabric. *Adv. Mater. Res.* **2012**, 610–613, 3394–3397.
- (61) Zhang, J.; Xia, W.; Liu, P.; Cheng, Q.; Tahirou, T.; Gu, W.; Li, B. Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2010**, 8 (7), 1962–1987. <https://doi.org/10.3390/md8071962>.
- (62) Akbar Ali, S. A. A Review on Chitosan and Its Nanocomposites in Drug Delivery. *Int.*

- J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 273–286.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>.
- (63) Kumar, M. N. V. R. A Review of Chitin and Chitosan Applications Q. **2000**, *46*, 1–27.
- (64) Liang, S.; Sun, Y.; Dai, X. A Review of the Preparation, Analysis and Biological Functions of Chitooligosaccharide. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (8), 2197.
<https://doi.org/10.3390/ijms19082197>.
- (65) Barreteau, H.; Delattre, C.; Michaud, P. Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, *44* (3), 323–333.
- (66) Naveed, M.; Phil, L.; Sohail, M.; Hasnat, M.; Baig, M. M. F. A.; Ihsan, A. U.; Shumzaid, M.; Kakar, M. U.; Mehmood Khan, T.; Akabar, M. D.; Hussain, M. I.; Zhou, Q. G. Chitosan Oligosaccharide (COS): An Overview. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *129*, 827–843. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192>.
- (67) Inamdar, N.; Researcher, I.; Choudhari, Y. M. Chitooligosaccharides : Synthesis , Characterization and Applications Chitooligosaccharides : *Polym. Sci. Ser. A* **2011**, *53* (February 2014), 583–612. <https://doi.org/10.1134/S0965545X11070066>.
- (68) Ouyang, Q.; Zhao, S.; Li, S.; Song, C. Application of Chitosan, Chitooligosaccharide, and Their Derivatives in the Treatment of Alzheimer ' s Disease. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 322. <https://doi.org/10.3390/md15110322>.
- (69) Sahariah, P. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives : A Review of the Structure – Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3846–3868.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01058>.
- (70) Yang, Y.; Xing, R.; Liu, S.; Qin, Y.; Li, K.; Yu, H. Immunostimulatory Effects of Chitooligosaccharides on RAW 264 . 7 Mouse Macrophages via Regulation of the MAPK and PI3K / Akt Signaling Pathways. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 36.
<https://doi.org/10.3390/md17010036>.
- (71) Liaqat, F.; Eltem, R. Chitooligosaccharides and Their Biological Activities: A Comprehensive Review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *184* (November 2017), 243–259.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>.
- (72) Mecwan, M. M.; Rapalo, G. E.; Mishra, S. R.; Haggard, W. O.; Bumgardner, J. D. Effect of Molecular Weight of Chitosan Degraded by Microwave Irradiation on Lyophilized Scaffold for Bone Tissue Engineering Applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2011**, *97 A* (1), 66–73. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33029>.
- (73) Mao, S.; Shuai, X.; Unger, F.; Simon, M.; Bi, D.; Kissel, T. The Depolymerization of Chitosan: Effects on Physicochemical and Biological Properties. *Int. J. Pharm.* **2004**, *281* (1–2), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.019>.
- (74) Bezrodnykh, E. A.; Blagodatskikh, I. V.; Kulikov, S. N.; Zelenikhin, P. V.; Yamskov, I. A.; Tikhonov, V. E. Consequences of Chitosan Decomposition by Nitrous Acid : Approach to Non- Branched Oligochitosan Oxime. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *195* (April), 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.007>.

- (75) Claustre, S.; Pe, J. An Easy Stereospecific Synthesis of 1-Amino-2,5-Anhydro-1-Deoxy-D-Mannitol and Arylamino Derivatives. *Carbohydr. Res.* **1999**, *315*, 339–344.
- (76) D.L.H. Williams. *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*; **2004**.
- (77) Bezrodnykh, E. A.; Blagodatskikh, I. V.; Kulikov, S. N.; Zelenikhin, P. V.; Yamskov, I. A.; Tikhonov, V. E. Consequences of Chitosan Decomposition by Nitrous Acid: Approach to Non-Branched Oligochitosan Oxime. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *195* (April), 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.007>.
- (78) Baudendistel, O. R.; Wieland, D. E.; Schmidt, M. S.; Wittmann, V. Real-Time NMR Studies of Oxyamine Ligations of Reducing Carbohydrates under Equilibrium Conditions. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (48), 17359–17365. <https://doi.org/10.1002/chem.201603369>.
- (79) Chan, A. S. C.; Chen, C. C.; Lin, C. W.; Lin, Y. C.; Cheng, M. C.; Peng, S. M. The Remarkable Effect of E/Z Isomers on the Catalytic Asymmetric Hydrogenation of Oximes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, No. 17, 1767–1768. <https://doi.org/10.1039/C39950001767>.
- (80) Bohle, D. S.; Chua, Z.; Perepichka, I.; Rosadiuk, K. E/Z Oxime Isomerism in PhC(NO₂)CN. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (13), 4223–4229. <https://doi.org/10.1002/chem.201203357>.
- (81) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. *Structure Determination of Organic Compounds*; **2000**. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04201-4>.
- (82) Jencks, W. P.; Carriuolo, J. Reactivity of Nucleophilic Reagents toward Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (7), 1778–1786. <https://doi.org/10.1021/ja01492a058>.

Chapitre 3

Synthèse de macromolécules amphiphiles: fonctionnalisation d'oligomères de chitosane

Table des matières du Chapitre 3

ADVANCES IN CHITOLIGOSACCHARIDES (COS) CHEMICAL MODIFICATIONS: A COMPREHENSIVE REVIEW	118
I. ABSTRACT	118
I.1. Introduction	118
II. GRAFTING ONTO AMINE AND HYDROXYL	122
II.1. Carboxylic acids and its derivatives	122
I.1. Anhydrides	128
I.2. Epoxides	132
I.3. Ring opening polymerization	135
I.4. Schiff base	137
I.5. Michael addition	141
I.6. Isocyanate	142
I.7. Nucleophilic substitution	143
I.8. Guanidination	145
II. GRAFTING ON ALDEHYDE	145
III. CONCLUSION	147
ETUDE PRÉLIMINAIRE.....	149
I. INTRODUCTION	149
II. METHODES DE MESURES DES DEGRES DE SUBSTITUTION (DS)	149
III. MATERIEL ET METHODES	151
III.1. Matériel	151
III.2. Modes opératoires	152
III.2. 1) Addition de chlorure d'acyle sur les COS	152
a) Chlorures d'acyles variés	152
b) Chlorure de TOFA	152
III.2. 2) Activation d'acides carboxyliques par DCC NHS	152
III.2. 3) Couplage époxy-amine sur les COS	153
III.3. Caractérisations	154
IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS	154
IV.1. Addition de chlorures d'acyles	154
IV.1. 1) Etude modèle	154
IV.1. 2) Avec le TOFA	156
IV.2. Couplage époxy-amine	158
CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE PRÉLIMINAIRE.....	160
FUNCTIONALIZATION OF CHITOSAN OLIGOMERS: FROM ALIPHATIC EPOXIDE TO CARDANOL GRAFTED OLIGOMERS FOR OIL IN WATER EMULSIONS	162
I. ABSTRACT	162
II. INTRODUCTION	162
III. MATERIAL AND METHODS	164
III.1. Material	164
III.2. AMF and AMF oxime synthesis	164
III.3. COS and COS oxime synthesis	165
III.4. Functionalization of chitosan oligomers	167
III.5. Oil in water emulsions with modified COS	168
III.6. Characterizations	168
IV. RESULT AND DISCUSSION	169
IV.1. Synthesis of chitosan oligomer-oximes	169
IV.2. Functionalization of COS-oximes with aliphatic epoxide	173
IV.3. Functionalization of COS-oximes with cardanol	176
IV.4. Oil in water emulsion	177

V. CONCLUSION.....	179
ADDITION DU TOFA	181
CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3.....	183
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185

Dans le chapitre précédent, une méthode robuste de dépolymérisation du chitosane par désamination nitreuse a été mise en évidence. La suite de l'étude consiste donc en la fonctionnalisation de ces oligomères pour les rendre amphiphiles et améliorer leurs propriétés tensioactives. Afin d'évaluer les différentes réactions de greffage possibles, une revue intitulée « Advances in chitooligosaccharides (COS) chemical modifications: a comprehensive review » et soumise dans le journal **Biopolymers** regroupant l'ensemble des réactions chimiques réalisables sur les COS a été rédigée. Dans cette revue, différentes voies de fonctionnalisation d'oligomères (de 1 à 20 kg.mol⁻¹) ont été introduites et discutées, notamment en fonction de l'efficacité du greffage. Selon la méthode de dépolymérisation utilisée, les oligomères peuvent présenter trois groupes fonctionnels: amine, hydroxyle et aldéhyde. Cela ouvre donc la voie à diverses réactions de greffage, de réticulation et de polymérisation selon différents types de réactions chimiques. Les méthodes utilisées pour calculer les degrés de substitution (DS) ont également été étudiées et présentées à la suite de cette revue.

Advances in chitooligosaccharides (COS) chemical modifications: a comprehensive review

Camille Chapelle¹, Ghislain David^{1*}, Sylvain Caillol¹, Graziella Durand², Myriam Desroches le Foll²

¹Ingénierie et Architecture Macromoléculaire (IAM) 8 rue de l'école Normale, 34296 Montpellier CEDEX 5, France

²CST COLAS 4, Rue Jean Mermoz CS 30504 – 78771 Magny-les-Hameaux Cedex

KEYWORDS Chitooligosaccharides, functionalization, amphiphilic structures, crosslinking

I. Abstract

Compared to chitin and chitosan, chitooligosaccharides (COS) are defined by some unique properties such as water solubility, cell membrane penetrability, easy absorption and various biological activities that found applications in various fields such as pharmaceutical, food industry and cosmetics. Their functionalization is widely described in the literature and leads to the introduction of new properties that broaden their application fields. COS modification sites are mainly the primary amine and hydroxyl groups. Among chemical modification, one can find amidation or esterification, epoxy-amine/hydroxyl coupling, Schiff base formation and Michael addition. When depolymerized through nitrous deamination, COS bear an aldehyde at the chain end that can open the way to other chemical reactions and lead to the synthesis of new interesting amphiphilic structures. This paper narrates on the recent developments in COS functionalization on both amine or hydroxyls groups and aldehyde-chain end reactions while paying considerable attention to other types of modification. The author also described and compared the different protocols found in the literature while highlighting potential mistakes made in the chemical structures accompanied with suggestions. The interest of such modification are also briefly discussed.

I.1. Introduction

Chitosan is a polysaccharide made of β -D-glucosamine (GlcN) and N-acetyl- β -D-glucosamine (GlnAc) units linked by a glycosidic bond (1 $\rightarrow$ 4) (Figure 27). It is the chemical modification of chitin, a polymer extracted from shrimp shells, squids, insects or mushrooms that leads to chitosan. Chitin is the second most abundant natural polymer on

earth after cellulose. Chitosan results from N-deacetylation of chitin, which is only partial in most of the cases. This polysaccharide is characterized by its acetylation degree (DA) and its molecular weight. There is a large variety of chitosans, with a wide range of molecular weights from 10,000 g.mol⁻¹ up to 2,000,000 g.mol⁻¹ and acetylation degree between 0 and 30%. Nowadays, chitosan is used in various applications ¹ like water treatment ^{2 3}, cosmetics ⁴, food industry or drug delivery ^{5 6} due to its many interesting properties such as biodegradability, biocompatibility, hemostaticity, and antibacterial activity ^{7 8}.

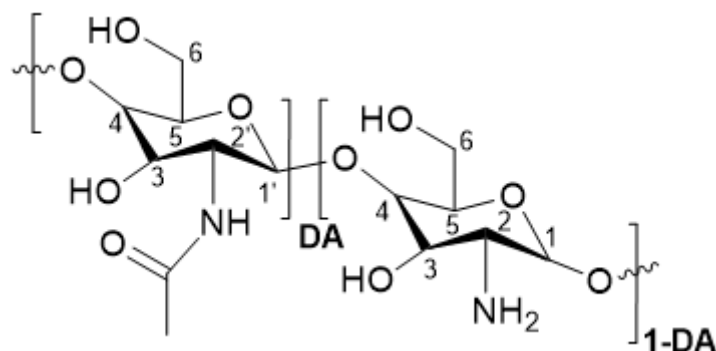


Figure 27. Chitosan and COS chemical structure

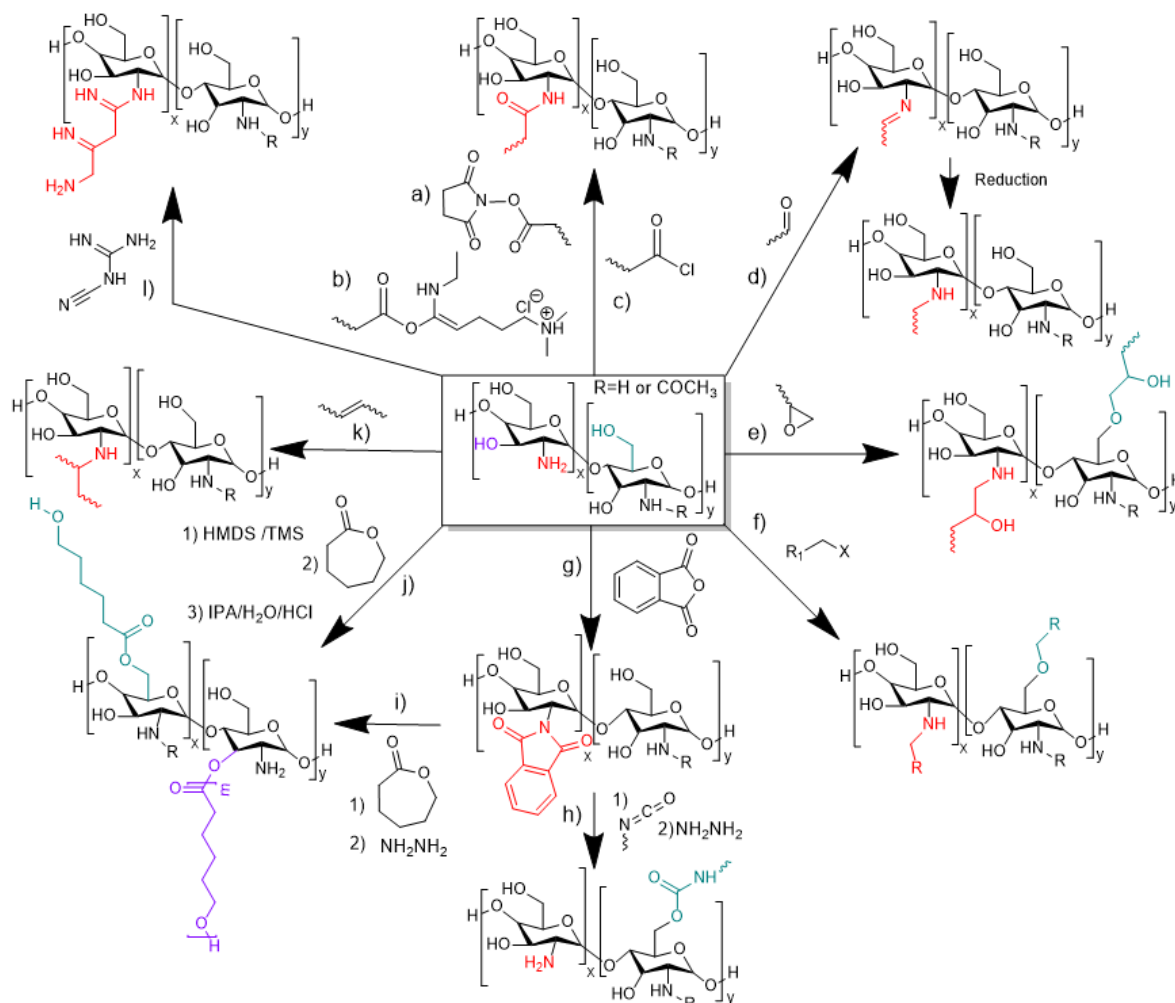
Numerous chemical reactions have been carried out on chitosan for introducing functional groups that could modify its properties ^{9 10}. Nevertheless, according to its molecular weight, chitosan is only soluble in water and in dilute acidic media. Thus the grafting efficiency of non-hydrophilic compounds remains quite low ^{11 12}. Furthermore, the concentration of high molecular weight chitosan in water hardly reaches 3% (w/w) and in such conditions, the resulting viscosity becomes high enough to lower the chitosan functional groups reactivity ^{13 14}. In order to overcome this drawback, reducing the molecular weight of native chitosans would be effective.

Chitoooligosaccharides or chitosan oligomers are often defined as chitosans with a degree of polymerization (DP) and average molecular weight respectively lower than 20 and 5,000 g.mol⁻¹ ¹⁵. Nevertheless, low molecular weight chitosan (Mn < 20 kg.mol⁻¹) are often called COS in the literature. It was shown that COS are more easily workable, due to less chain entanglement and steric hindrance which confer them a direct solubility in water for DP < 10 and pH dependent solubility for 10 < DP < 20 while maintaining a low viscosity in solution. COS are insoluble in acetone, butanol, ethanol, ethyl acetate, propanol and pyridine but as opposed to chitosan, partially soluble in methanol and partially soluble in dimethyl sulfoxide (DMSO) and dimethyl formamide (DMF) when heated. Hence the smaller are the oligomers, the better is the solubility ¹⁵. COS have recently received considerable attention as functional biomolecules with a wide range of applications in food,

agriculture, medicine, pharmaceuticals and cosmetics^{16 17 18 19}. Compared to chitin and chitosan, COS are defined by some unique properties such as water solubility, cell membrane penetrability, easy absorption and various biological activities. The molecular weight limit for COS to be soluble in water is reported to be 3.82 to 4.67 kg.mol⁻¹ but those values are dependent on the DA and the molecular weight dispersity of COS²⁰. They are reported to treat asthma, prevent tumor growth, malaria, control blood pressure and also have neuroprotective effects for Alzheimer disease treatment²¹ thanks to their biological activities that include antibacterial, antifungal, antiviral, anti-tumor and antioxidant properties^{22 23}, which have been reported to be better than chitosan's²⁴. Several ways to obtain chitosan oligomers were reviewed in literature^{25 26 27}. Those methods are divided in three main categories: enzymatic, physical, and chemical depolymerization. The enzymatic depolymerization of chitosan involves cleavage of the chitosan glycosidic bonds by the action of enzymes that have the particularity of being selective. Indeed, certain enzymes cleave only one type of bonds (i.e. GlcNAc-GINAc, GlcN-GlcN and GINAc-GlcN). Most commonly used enzymes are chitinase, chitosanase and lysozyme but other teams developed depolymerization of COS with other enzymes such as lipase and papain (etc.)^{28 29}. Commercially available COS are generally obtained by enzymatic pathway, which explains their cost. Depolymerization of chitosan is also possible using physical methods that need an external source of energy from specific apparatus such as electron beam plasma³⁰, gamma irradiation³¹, sonication³², microfluidization³³, UV light³⁴ or microwaves³⁵. In a general manner, physical methods are efficient enough to depolymerize chitosan. Methods based on electron beam plasma or gamma irradiation are described directly on chitosan powder but the apparatus allows to work only on hundreds of milligrams. Interestingly, the methods based on UV, sonication, irradiations and microwaves are often used on chitosan solution, in combination with chemical methods to improve yields and kinetic^{36 37 38}. Microwaves-based depolymerization allows to easily obtain oligomers but the reaction is hardly reproducible due to its dependence on many parameters (volume, glassware, time, temperature etc.)³⁹. The chemical depolymerizations consist in acid hydrolysis^{40 41}, the use of oxidative agent such as hydrogen peroxide^{42 43} or even the action of nitrous acid^{44 45}. This last method was shown to be applicable and reproducible on any kind of crude chitosan leading to low molecular weights oligomers⁴⁶. Though, it leads to formation of 2,5-anhydro-D-mannose (AMF) end chain which is electrophilic and reactive for further reactions.

Whatever the depolymerization technique, COS present very interesting biological properties and show better solubility in a larger range of pH at relatively higher concentration than the corresponding chitosan. Moreover, depending on their size, they

are soluble in other solvents like DMSO, DMF and water/alcohol solutions. This is why there has been a growing interest on modification of those oligomers to widen their applications. Thus, COS are easily functionalizable due to the presence of free primary amines and alcohol on the sugar units. Moreover, when COS are obtained by nitrous acid depolymerization, a reactive aldehyde is present at the end of the oligomer chain. Thanks to their shorter hydrophilic chain, their functionalization can lead to amphiphilic structures with better properties than those from chitosan-based structures. Oligochitosan also allowed to prepare nano and microgel ^{47 48}. As far as we know, there is no review in the literature on such a rich chemistry that can be done on COS. In this review, different routes of functionalization of the obtained oligomers (from 1 to 20 kg.mol⁻¹) will be introduced and discussed, especially based on the grafting efficiency. Depending on the depolymerization method, oligomers might present three functional groups: amine, hydroxyl and aldehyde. This opens the way to various grafting, crosslinking, and polymerization pathways with several functional groups.



Scheme 7. a) Grafting of carboxylic acid by EDC/DCC NHS coupling b) Grafting of carboxylic acid by EDC coupling c) Grafting of carboxylic acid by acyl chloride coupling d) Schiff base reaction e) Epoxy-amine and epoxy-hydroxyl coupling f) Nucleophilic substitution g) N-phthaloylation h) Isocyanate reaction i) j) Ring opening polymerization k) Michael addition l) Guanidination

II. Grafting onto amine and hydroxyl

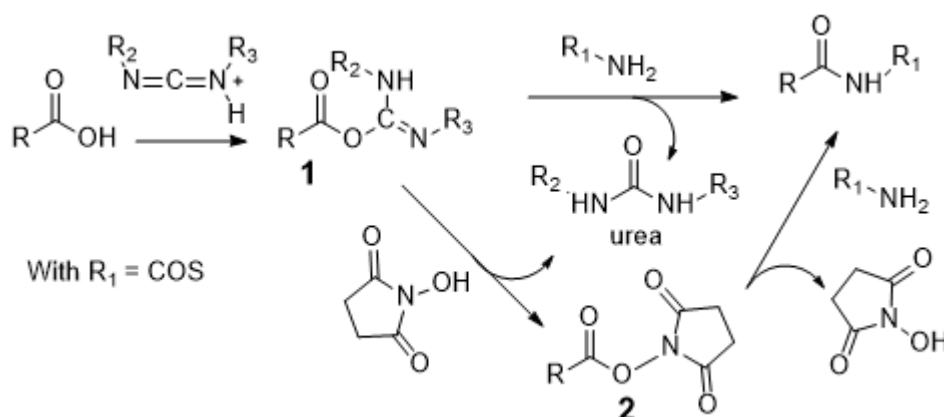
The amino and hydroxyl graftings of chitosan are widely used even on high molecular weight polysaccharides ⁴⁹. COS allows nevertheless larger choice of solvent, and higher substitution degree are usually reached.

II.1. Carboxylic acids and its derivatives

One of the most common reactions that can be done on the free amine of COS is amidation with a carboxylic acid. In order to react with the amine, the carboxylic acid must be activated. In general organic chemistry, carboxylic acid (CA) activated by thionyl

chloride (SOCl_2), phosphorus trichloride (PCl_3) or pentachloride (PCl_5) to form acyl chloride are the most reactive species.

Carboxylic acid might also be activated by formation of anhydrides or esters. In order to convert carboxylic acids into amides or esters, carbodiimides such as 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) or *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) can be used. Additives, such as *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS)⁵⁰ or 4-dimethylaminopyridine (DMAP), are often used to increase yields and avoid side reactions. In COS functionalization, the formation of an amide using a carbodiimide is straightforward, but side reactions may occur (Scheme 8). Indeed, the acid will react with the carbodiimide to produce an *O*-acylisourea, which can be viewed as a carboxylic ester with an activated leaving group. The *O*-acylisourea will react with the amine to give the desired amide and a urea. The activated carboxylic acid is very reactive and unstable which could lead to side reaction. When using NHS or DMAP, the additive will react with the activated acid to form another more stable intermediate, less suitable to side reactions. The additive is usually regenerated at the end of the reaction.



Scheme 8. Amidation with carboxylic acid activated by carbodiimide with or without NHS as activator

In COS functionalization, two ways for grafting carboxylic acid can be found (Table 4). In literature, the amidation of COS is mainly done with EDC because of its water solubility. Generally, the carboxylic acid is previously activated by an excess of EDC in ethanol and the mixture is added to a COS water solution from 4 h to 24 h at temperature between 60 and 80 °C (Table 4). Some studies also revealed the use of both EDC and NHS^{51 52 53 54 55}. As said previously, COS with very low molecular weight ($M_n < 5 \text{ kg.mol}^{-1}$) exhibit better solubility in water with a larger pH range but also solubility in solvent such as DMSO. Thus COS amidation was performed in DMSO^{53 56} or in a mixture of water and DMSO⁵⁷. In this case other carbodiimides can be used such as DCC⁵⁷ which is cheaper

than EDC and gives a non-water soluble by-product. We also found other additive such as DMAP⁵⁸. This wider solubility also opens the way for new solvents such as ionic liquids like 1-butyl-3-methylimidazolium acetate ([BMIM]Ac)⁵⁸. At similar molecular weight, the amidation of COS with 0.5 eq of linoleic acid (C18)/NH₂ showed higher DS in ionic liquids (37.9%) than DMSO (26.3%)⁵⁸ and water/acetone (10.3%)⁵⁹. In addition, the reactions in ionic liquids and DMSO were performed in mild conditions at 30 °C as opposed to 60 °C in water/acetone mixture. Moreover, lower coupling agent concentration was required due to the possibility of using DMAP. In addition for being a better solvent, the [BMIM]Ac is recyclable and reusable for further grafting reaction. Other reactions made in DMSO showed acceptable substitution degree (DS) with high molecular weight carboxylic acid such as arachidic acid (C₂₀) (10.3%)⁵¹, modified polycaprolactone (PCL) (18%)⁵⁶ and polyethylene glycol-polycaprolactone copolymers (PEG-PCL) (30.2%)⁶⁰. The use of this type of solvent then opens up the way to other kind of grafting. Reactions made only in water showed the lower DS.

In a general manner, this kind of reaction is performed on fatty acids, which are difficult to graft onto COS due to low reactivity and the longer is the chain, the lower is the obtained DS. The grafting efficiency is also correlated to the molecular weight. COS with molecular weight over 12 kg/mol do not exceed 10% DS^{61 62 63 64}. This can be ascribed to a lower solubility of the COS in water and more chain entanglement. Noteworthy, the higher is the molecular weight, the lower is the reactivity with fatty acid, resulting in a very low amount of reactant that can be introduced. Indeed, the molar ratio never exceeded 0.5 eq CA/NH₂ with higher molecular weights COS, whereas it can reach 2 or 3 with low molecular weight (< 4 kg.mol⁻¹)⁶⁵. The DS is also related to the carboxylic acid length. Indeed, the longer is the chain, the lower is the affinity with chitosan and the lower is the DS. The ratio of carbodiimide to carboxylic acid is also an important factor. Indeed, EDC or DCC might be used in excess because the intermediate **1** (Scheme 8) is unstable. For instance, Su et al.⁵² only used 0.7 eq of EDC/CA and got very low DS (3.6%) working with 1 eq of acrylic acid, i.e. corresponding to a C3 fatty acid. Fernandes et al.⁶⁶ also obtained poor substitution degree when working at low concentration of EDC. In both cases, the low DS might also be explained by working only in water but also by the acid conditions, where the free amines of chitosan are partially protonated hence less reactive.

Broadly speaking, the products of those reactions are then precipitated either in basic conditions for the higher masses or in organic solvent. Regardless of the carbodiimide used, there is always production of urea as a side-product (Scheme 8). This urea is supposed to be toxic, hence the functionalized oligomers are generally purified by dialysis to extract both unreactive species and side products. Self-assembly of COS

modified with fatty acid in micelles is one of the most sought application. Indeed, several drugs such as doxorubicin^{59 51 67}, ibuprofen⁵⁸, lamivudine stearate⁶¹, amphotericin⁶⁵ or insulin⁶⁸ can be encapsulated in those micelles which show efficient drug delivery ability. Although this reaction is mainly described for grafting fatty acids, it can also be used with other carboxylic acids. For example, Wang et al.⁶⁹ grafted salicylic acid onto COS to encapsulate paclitaxel for ovarian cancer treatment. COS have also proven to be excellent drug carriers for doxorubicin⁵⁴, methotrexate⁵⁷, folic acid⁷⁰ or tocopherol⁵⁰, anticancer drugs that bear carboxylic acids. Zhao et al.^{60 71} synthesized a carboxyl terminated PEG-PCL copolymer by ring opening polymerization of ϵ -caprolactone initiated by hydroxyl terminated PEG with stannous 2-ethyl hexanoate catalyst and addition of succinic anhydride in presence of DMAP. A large excess of carboxylic acid chain-end (40 eq) was then activated by NHS and DCC to react with free amines of COS in DMSO and amphiphilic triblock copolymers (Figure 28) were obtained with a maximum substitution degree of 31%. Those structures were able to self-assemble into micelles from 20 to 45 nm in aqueous solution or to form supramolecular hydrogels when combined with cyclodextrin. With the same method, Xu et al.⁵⁶ used hexanol instead of PEG to initiate the polymerization of ϵ -caprolactone and grafted dithiodipropionic acid at the PCL chain end. The activation of the carboxylic acid (12.5 eq) was performed by coupling EDC and NHS in order to obtain COS grafted with 18% PCL moieties. Those carriers revealed dual responses of pH and glutathione (GSH), a molecule present in cancer cell, when releasing doxorubicin which is mainly due to the disulfide linkage. Those properties made them a great candidate for targeted drug delivery and reduction of side effects on healthy cells. Other descriptions of this type of amidation can be found in the literature. When Yin et al.⁵⁵ grafted COS onto liposome with EDC and NHS, Chandika et al.⁷² used it to form a scaffold between COS and a mixture of fish collagen and alginate. Yang et al.⁷³ immersed polysulfone-poly(acrylic acid) (PSF-g-PAA) membranes in a COS/EDC solution to improve their antimicrobial activity.

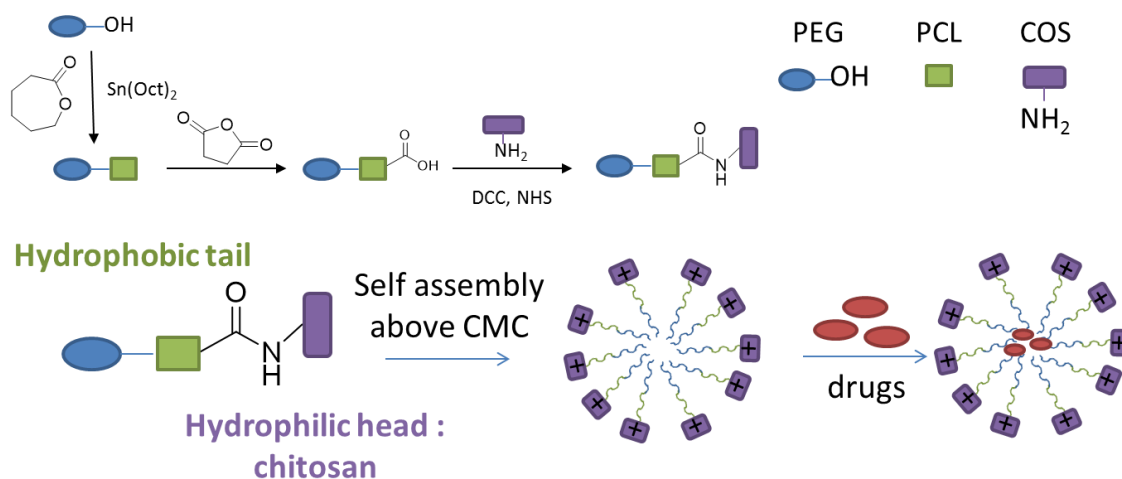


Figure 28. Synthesis of COS-PCL-PEG triblock copolymer and their self-assembly

In comparison, only few studies were led on coupling acyl chloride to COS. To activate palmitic acid, Choudhari et al.⁷⁴ used thionyl chloride (SOCl₂). The coupling reaction was carried out in water, which is quite incompatible with the use of palmitoyl chloride. Indeed, acyl chloride in water was immediately deactivated and turned back into acid by nucleophilic addition of H₂O. The amine of chitosan is not nucleophilic enough to react in an excess of water. In this condition, it is like reacting palmitic acid and the free amine of chitosan in acidic media meaning that the reaction is very unlikely to occur. Although the authors reported a grafted oligosaccharide, they could not provide any DS and the NMR data are doubtful. In comparison to the use of carbodiimide, this method is not water adaptable and should be led in aprotic solvent such as DMSO. In addition, thionyl chloride is toxic and corrosive.

Another team reported crosslinking of oligochitosan with malic acid without activating the carboxylic acid 75. The resulting polymer was then prior grafted onto polyethylene terephthalate (PET) film. They observed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) the appearance of the amide band confirming the grafting of both malic acid and PET. Nevertheless, the band is not very well defined and is more likely to show the free amines of chitosan. They did not confirm the grafting by ¹H NMR but it seems unlikely that the carboxylic acid reacted without previous activation because the amines of COS are not nucleophilic enough. Hydrogen and/or ionic bonding probably occurred between the amine and hydroxyl groups of COS and the two carboxylic acids. Nonetheless, hydrophilic and anti-static properties of the PET film were highly improved by the COS treatment.

Chapitre 3 : Synthèse de macromolécules amphiphiles : fonctionnalisation d'oligomères de chitosane

Mn of COS (kg/mol)	DA (%)	Carboxylic acid (CA)	Equivalent /NH ₂	Activation /CA	Solvent	Conditions (h; °C)	DS Measurement	DS (%)	Ref
18	5	Stearic acid (C18)	0.2	EDC (8.5 eq)	Water/ethanol (50/50 v/v)	5 h; 80 °C	TNBS method	3.8	61
15	5		1	EDC (10 eq)	Water/ethanol (50/50 v/v)	4 h; 80 °C	TNBS method	6.5	62
5	5		N/A	EDC NHS	DMSO	6 h; 55 °C	N/A	N/A	53
18	5		0.25	EDC (10 eq)	Water/ethanol (70/30 v/v)	24 h ; 60 °C	TNBS method	9.8	76
11			0.5					49.5	
8			0.5					47.6	
3			0.25					13.9	
3			0.5					45	
3			0.8					63	
18	5		0.2	EDC (3.2 eq)	Water/ethanol (60/40 v/v)	12 h; 60 °C	TNBS method	3.8	77
3	2		0.3	EDC (5 eq)		6 h; 60 °C	Ninhydrin	6	78
20	10	Linoleic acid (C18)	0.1	EDC (1 eq)	Water/ethanol (95/5 v/v)	12 h; rt	¹ H NMR	2.6	63
			0.2					4.4	
			0.3					8.5	
3.7	5		0.5	EDC DMAP (2.5 eq)	([BMIM]Ac,	6 h; 30 °C	¹ H NMR Molecular weight	37.9	58
			0.5	DMSO	26.3				
5	5		0.5	EDC (10 eq)	Water/acetone (65/35 v/v)	6 h; 60 °C	¹ H NMR	10.3	59
1	N/A	Linolenic acid (C18)	2	EDC NHS (1.2 eq)	DMSO	24 h; rt	¹ H NMR	90	65
5	10	Decanoic acid (C10)	1	EDC (2 eq)	Water/methanol (60/40 v/v)	5 h; 80°C	TNBS method	24	68
5	10	Arachidic acid (C20)	3	EDC NHS (1.5 eq)	DMSO	12 h; 50 °C	Linear Regression	9.8	51
5	5	NAC (C5)	1	EDC (2 eq)	Water	8 h; rt	N/A	N/A	53
2.5	25	Palmitic acid	2.2	SOCl ₂	Water	24 h; rt	N/A	N/A	74
15	0.3		4	EDC	Water/ethanol (90/10)	6 h ; 80 °C	TNBS	3.4	64
>10	15	Acrylic acid (C3)	1	EDC NHS (0.7 eq)	Water (HCl)	72 h; rt	Double bond titration	3.5	52
15	13	N-acetyl-L-cysteine	10	EDC (0.1 eq)	Water (AcOH)	3 h; rt	Ellman's reagent ⁷⁹	1-5	66
3	8	PCL	12.5	EDC NHS (3 eq)	DMSO	24 h; rt	Elemental analysis	18	56

10	5	PCL-PEG	20 40	DCC NHS (2 and 4 eq)	DMSO	48 h; rt	¹ H NMR	13.8 30.2	60
1	8	PET film Malic acid	N/A 2	Sodium acetate	1% Acetic acid	rt	N/A	N/A	75
8.6	10	Methotrexate	0.625 1.25 2.5	DCC NHS (1.5 eq)	Water/ DMSO (10/90 v/v)	72 h; rt	¹ H NMR	4.5 8.9 13.5	57
1.2	25	PSF-g-PAA membranes	N/A	EDC	1% acetic acid solution (v/v)	N/A	Acid orange 7 dye complex	16.5 μg/c m ²	73
1-10	N/A	Fish collagen/ alginate	N/A	EDC NHS	2- morpholino ethane sulfonic acid buffer	20 h; rt	N/A	N/A	72
4	10	Tocopheryl	1	EDC sulfo- NHS (8 eq)	Water/DMF	24 h; rt	Mass spectroscopy	4	50
1.5	N/A	Salicylic acid	0.5	EDC (5 eq)	Water/ ethanol (50/50)	53 h; rt	N/A	N/A	69
1-3	N/A	Doxorubicin	4	EDC NHS (4 eq)	Water	12 h; 20 °C	UV (480 nm)	18	54
3	N/A	Folic acid	N/A	EDC NHS (2.8 eq)	PBS	16 h; rt	N/A	N/A	70
2-5	25	Liposome	N/A	EDC NHS	PBS	N/A	N/A	N/A	55

Table 4. Substitution degrees according to different carboxylic acid, coupling agent, reaction conditions in the amidation of COS (N/A, non-available; rt=room temperature, DMSO=dimethyl sulfoxide)

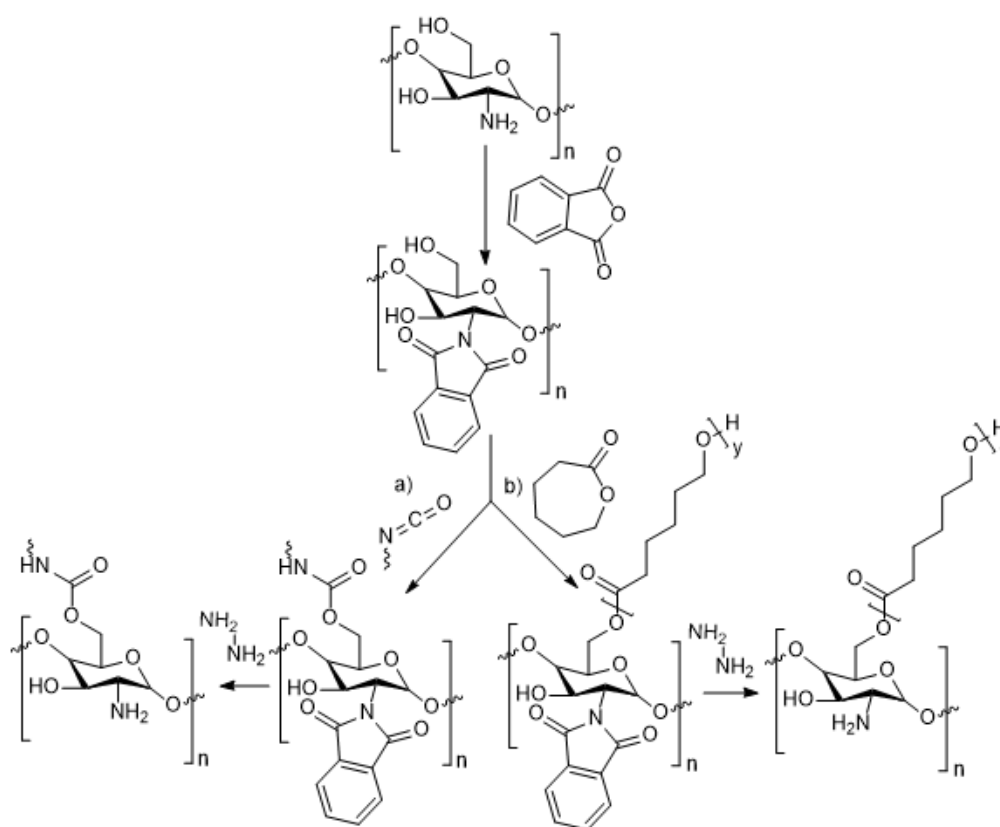
In conclusion of this part, for amidation reaction, a lot of working conditions were described in the literature. Parameters such as temperature, time, solvent, and coupling agent play a crucial role for reaching high DS. In addition, the initial molecular weights of COS, the length or size of the carboxylic acid are also important factors. Furthermore, very low molecular weight COS ($M_n < 5 \text{ kg.mol}^{-1}$) are soluble in other solvents such as DMSO and hydroalcoholic solutions, which allows using other coupling agents and led to higher DS.

1.1. Anhydrides

Acid anhydrides are compounds that bear two acyl groups bonded to the same oxygen atom. They are a source of reactive acyl groups which tend to be less electrophilic than acyl chlorides. Only one acyl group is transferred per molecule of acid anhydride,

which leads to a lower atom efficiency. However cyclic anhydrides can act dually as acylating agents and find a large range of applications ⁸⁰.

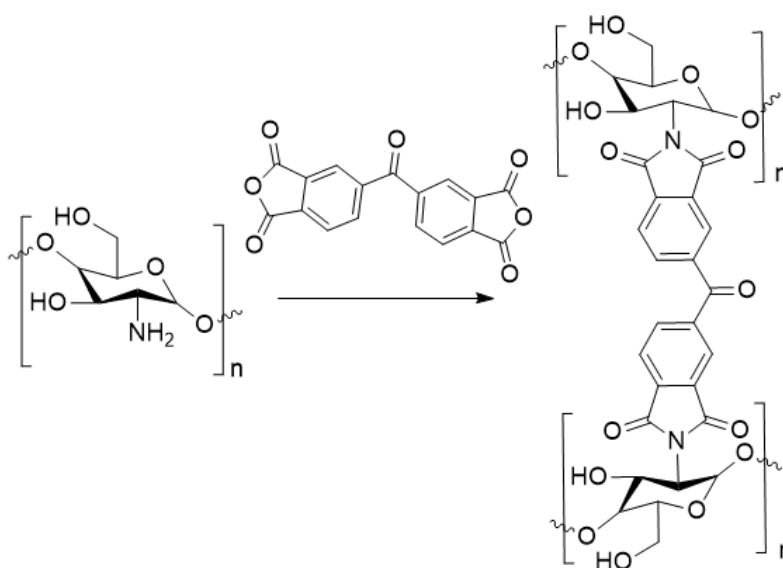
One of the most common reactions of anhydride and chitosan is the N-phthaloylation with phthalic anhydride. This reaction was also widely described on high molecular weight chitosan because it led to an interesting change of solubility, i.e. chitosan becoming soluble in organic solvents such as DMF ⁸¹. This reaction is thus one of the most common techniques for solubilization as well as protection of multifunctional chitosan to prepare various derivatives. Since treatment of chitosan with phthalic anhydride results in partial O-phthaloylation in addition to the N-substitution, a controlled procedure should be followed in order to selectively protect the amine. In the case of COS, the main research aspect is the selective amino protection for further functionalization of the primary alcohol ^{82 83 84} (Scheme 9). The deprotection of the amino group is generally done with hydrazine hydrate.



Scheme 9. N-phthaloylation of COS followed by a) Urethane formation b) ROP both followed by deprotection by hydrazine hydrate

Following the same idea, Fu et al. ⁸⁵ grafted 3,3',4,4'-benzophenonetetracarboxylic anhydride (BTDA) onto 1.5 kg.mol⁻¹ COS (Scheme 10). They proved the formation of the imide group by IR with the characteristic signal at 1380 cm⁻¹ assigned to the C-N stretching

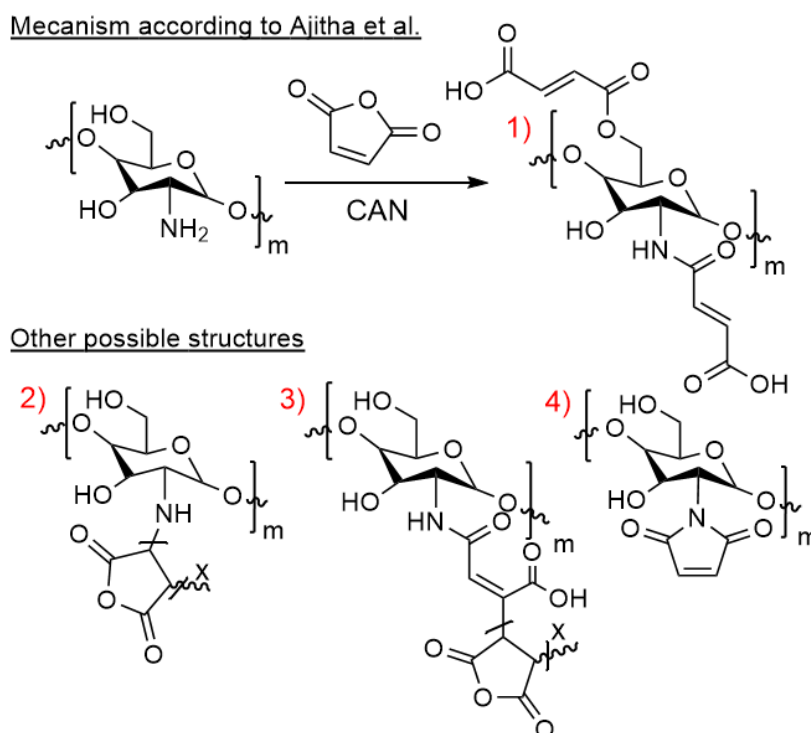
vibration. They used several BTDA/COS ratios and showed an increase of the molecular weight when this ratio was raised; i.e. 2.5 kg.mol⁻¹ for 1:20, 3.5 kg.mol⁻¹ for 1:10 and 4.5 kg.mol⁻¹ for 1:5. This represents a maximum DS of 93% if no crosslinking occurred. Nevertheless, a higher amount of BTDA participating in the grafting reaction may increase the chance of crosslinking between COS and BTDA, which explains the higher molecular weights. Though, due to the low molecular weight of COS, the crosslinking was not sufficient because the product remained soluble in water. This is why they used diphenyl methane-4,4'-diisocyanate (MDI) for further emulsion polymerization leading to microcapsules formation.



Scheme 10. Crosslinking of COS with BTDA

Ajitha et al.⁸⁶ used ceric ammonium nitrate (CAN) to graft maleic anhydride (MA) onto COS. They claimed that the amine and the primary alcohol both opened the anhydride to obtain a grafted COS (Scheme 11 1)). MA was used in low molar ratio (0.8/1 MA/COS). As specified before, the primary amine is much more reactive than the primary alcohol and with this ratio conditions, the amide formation is more likely to occur. Nevertheless, CAN was described as an esterification as well as amidation catalyst⁸⁷ which gave confidence that both reactions may occur. However, CAN was also used as catalyst for radical polymerization of methyl acrylate⁸⁸ and acrylic acid⁸⁹. Besides, the acrylonitrile polymerization from chitosan was described and CAN led to a radical formation by degradation of the sugar units with quite different structures than the one described here⁹⁰. In addition, MA may polymerize in presence of a radical initiator⁹¹ and the radical polymerization of MA from starch and cellulose, two polysaccharides with structures similar to chitosan, was described before^{92 93}. It means that the radical polymerization of maleic anhydride could occur in the used conditions (Scheme 11 2)). Indeed, CAN was added

within a mixture of MA and COS, meaning that radical can be formed on both entities. The reaction could happen as described in the case of cellulose, with a radical formed on the amine or alcohol of COS and propagation on the double bond of MA. One can also imagine that the maleic anhydride can homopolymerize and be grafted onto chitosan by ring opening, or in the other way around, at first the ring opening followed by MA polymerization (Scheme 11 3)). The addition of MA onto the primary amine can also be followed by a ring-closing process, i.e. a traditional route for maleimide synthesis (Scheme 11 4)). In addition, CAN was reported to be a catalyst for aza-Michael reaction⁹⁴. In this work, as well as lot of work on this subject, only FTIR spectra are provided. This analysis can only prove that maleic anhydride was grafted onto COS but not the nature of the grafting. NMR spectroscopy combined with mass spectroscopy and molecular weights measurement could lead to the identification of the formed structure.



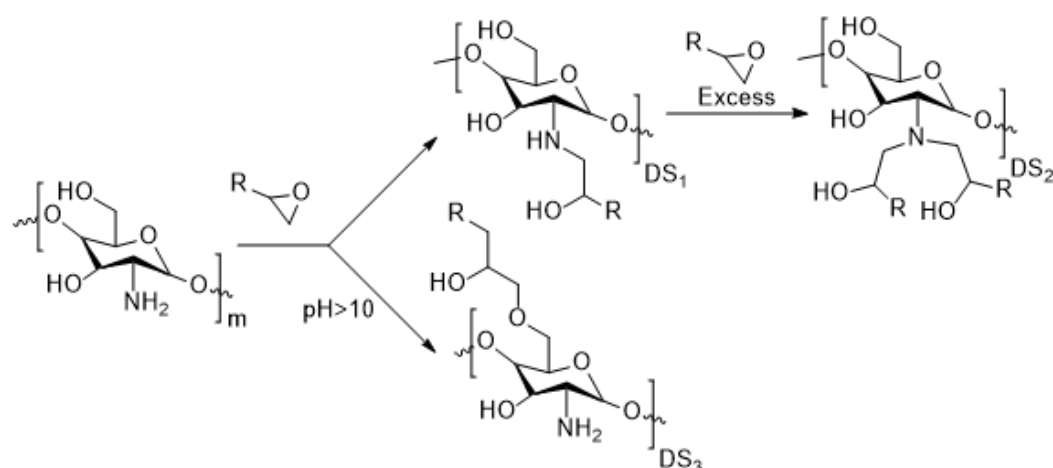
Scheme 11.. Possible structures for maleic acid grafting on COS

Other anhydride can be grafted on COS. For example, Huang et al.⁹⁵ grafted succinic anhydride on 6-7 kg.mol⁻¹ COS with 36 to 90% DS, measured by elemental analysis. Boesel et al.⁹⁶ added methacrylic anhydride in phosphate buffer saline (PBS) solution on COS of DP 4 to 8. They showed that high substitution degree led to insoluble material and concluded that DS range of 16-21% were ideal. Afterwards, the methacrylated COS were cross-linked by free radical polymerization of the pendant methacrylic groups

by redox initiation. The created gel was degradable and nontoxic, and could be potentially used in the biomedical field for tissue engineering or drug delivery.

In conclusion of this part, the reaction between anhydride and chitosan is quantitative. It also leads to the selective protection of amine for O-functionalization and the use of dianhydride can also lead to branched structures as well as cross-linked networks.

1.2. Epoxides



Scheme 12. Possible reactions between an epoxide and chitosan

Another common reaction that can occur onto COS is the epoxy-amine or epoxy-alcohol reaction. The carbons in an epoxide group are very reactive electrophiles, due in large part to the fact that substantial ring strain is relieved when the ring opens upon nucleophilic attack. There are two electrophilic carbons in the epoxide, but the best target for the nucleophile especially with chitosan which already produced steric hindrance, is the least hindered carbon. COS has two nucleophiles; the primary amine in position 2 and the primary alcohol in position 6 of the sugar unit (Scheme 12). The reaction between an epoxide and a primary amine leads to the formation of a secondary alcohol and a secondary amine (DS₁). The secondary amine might in turn react with another epoxide and form another alcohol and a tertiary amine (DS₂). In chitosan and COS, this second addition is not likely to occur due to steric hindrance and poor nucleophilic strength of the secondary amine. The epoxy will therefore react with another amine of the polymeric chain, though, it could occur when working in epoxide excess. The second nucleophilic group from chitosan is the primary alcohol. It can be activated when working at pH > 10⁹⁷ (DS₃). Nevertheless, the electronegativity of the oxygen implies a lower nucleophilic strength than the primary amine. Both additions are described in the literature and discussed below.

One example of epoxide addition often reported in the literature is the reaction between oligosaccharides and glycidyl methacrylate (GM) leading to the formation of a methacrylated COS by ring opening addition. The reaction conditions were similar in several studies, and involved mixing different ratios of oligomers and glycidyl methacrylate and heating them at 40 °C up to 12 h under nitrogen atmosphere - or not, depending on the team, and ending with precipitation of the methacrylated COS in cold acetone. Most of the works for this kind of reaction described *O*-methacrylation resulting from a reaction between the primary alcohol of chitosan and glycidyl methacrylate. In reality, *N*-methacrylation is more likely to occur than *O*-methacrylation because amine of the oligomers is more nucleophilic than primary alcohol. In the works presented here, none of them were performed at pH>10 in order to obtain the alkoxide ion. Nevertheless, Cho et al.⁵⁴ claimed to observe *O*-methacrylation on 1-3 kg.mol⁻¹ COS. They showed DS of 60% with a 3/1 GM/COS ratio, which is a quite high value. In their case, they then fixed succinyl doxorubicin on chitosan free amine by amidation in presence of EDC and NHS with 18% DS. It is then possible that both *O* and *N*-methacrylation occurred. The methacrylated COS are then cross-linked by photo irradiation using a di-acrylated Pluronic block (Figure 29) which makes it suitable for free doxorubicin additional loading. In the same way, Choi et al.⁹⁸ claimed the *O*-methacrylation of 1-3 kg.mol⁻¹ oligomers with 8/1 GM/COS but did not indicate the substitution degree. The methacrylated COS was then crosslinked with di-acrylated pluronic by photo irradiation in presence of Irgacure 2959 to encapsulate a recombinant human epidermal growth factor (rhEGF). The provided ¹H NMR data could not confirm that the *O*-methacrylation occurred. On the contrary, the signal of the proton in position 2, characteristic of the free amine, has changed compared to crude COS. In a second publication⁹⁹, they made 30% acrylated chitosan with 1/2 GM/COS ratio to photo-crosslink with diacrylated pluronic. Radha et al.¹⁰⁰ also claimed *O*-methacrylation in presence of ceric ammonium nitrate in water at 80 °C. Once again, only IR spectra were provided. In addition, CAN is known to be a radical polymerization initiator, which can lead to the methacrylate polymerization, not described here. To summarize, the grafting of GM onto COS by epoxy ring opening has been done. Nevertheless, the lack of information and poor analysis data on some studies presented above did not allow confirming that the grafting occurred on either the primary amine or the primary alcohol or both. Although some teams claimed that *O*-methacrylation occurred, this was not the more conceivable reaction due to the higher nucleophilic strength of the primary amine and the conditions of pH used. In conclusion, further analysis would have to be conducted on those types of grafting. For example, the alcohol substitution might be checked out by tandem mass spectrometry, amine titration or even ¹H NMR with the anomeric and position 2 proton signal. ¹³C NMR and 2D analysis could complete those studies.

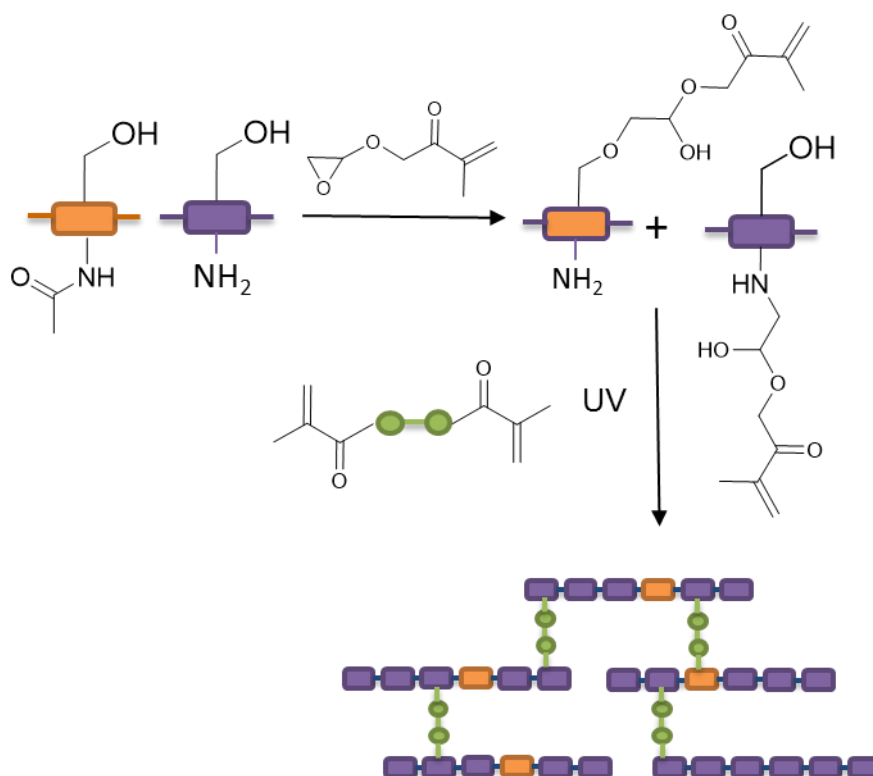
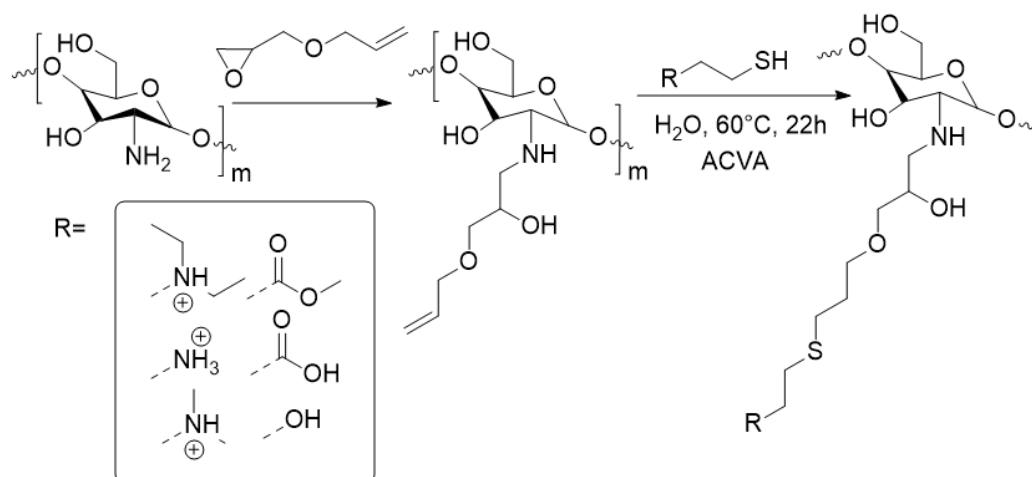


Figure 29. *O* and *N*-methacrylation of COS followed by photo crosslinking by diacrylated cross linker

As seen previously, the reaction of chitosan with an epoxide is most likely to occur on the primary amines. For example, Illy et al.¹⁰¹ grafted allyl glycidyl ether (AGE) on COS ($>2,000 \text{ g.mol}^{-1}$) for further thiol-ene reaction on the allyl double bond (Scheme 13). The reaction was carried out in water at pH 8 as AGE is water soluble and a DS of 33% was obtained with 2.2 eq of AGE. ^1H NMR spectrum confirmed the addition with new signals corresponding to the introduction of the allyl substituents as well as new peaks for the proton in position 2 of the grafted units. FTIR spectrum also evidenced grafting onto amine by the secondary amine band appearance (1540 cm^{-1}) as well as a reduction in intensity for the primary amine band (1590 cm^{-1}).



Scheme 13. Allyl-functionalization of COS and its modification by thiol-ene addition according to Illy et al.¹⁰¹

Mei et al.¹⁰² described the grafting of epichlorohydrin on very low molecular weight COS i.e. 550 g/mol, by epoxy amine reaction with 55% DS. Then, the pendant chlorides were cross-linked with tetraethylenepentamine (TEPA) to get hydrogel with promising adsorbent properties. Another classical epoxy-amine reaction is the grafting of the glycidyltrimethylammonium chloride. This reaction is generally described on high molecular weight chitosan as it leads to full solubility of modified chitosan in water¹⁰³, but was also described on COS. Huang et al.⁹⁵ showed maximum DS of 76% on 6.5 kg.mol⁻¹ COS and used the resulting product to establish the structural factors affecting radical scavenging activity of COS. Chen et al.¹⁰⁴ showed that the antibacterial activity and cytocompatibility of COS functionalized polyurethane membrane were better when COS were quaternized. Both teams performed the reaction in water at neutral pH and showed the *N*-substitution of glucosamine units by NMR and FTIR analysis.

I.3. Ring opening polymerization

Polycaprolactone is a biodegradable polyester obtained by ring opening polymerization of ϵ -caprolactone in presence of a catalyst. Due to its biocompatibility, and being FDA (food and drug administration) approved, it is often used in biomedical devices such as tissue engineering, implants or drug release applications.

Number of teams have worked on modification of chitosan oligomers by PCL. Wang et al.¹⁰⁵ described the synthesis of COS-PCL in two steps. First, hydroxyl and amino groups of COS (1,800 kg.mol⁻¹) were selectively protected with chlorotrimethylsilane (TMS) and hexamethyldisilazane (HMDS). At the end, the hydroxyl and amino groups of COS were either trisilylated or disilylated with a majority of unprotected hydroxyl groups in the third position, which they claimed to be due to the relative weak reactivity of this primary alcohol

towards silylation. They evaluated by ^1H NMR that the TMS substitution degree was 76%, meaning that 7 free hydroxyl groups on position 3 per 10 glucosamine/acetyl-glucosamine units remained for initiating the ring opening polymerization (ROP). Those protections also conferred good solubility to the silylated COS in organic solvent such as pyridine, chloroform, tetrahydrofuran (THF) and xylene. Therefore, ϵ -caprolactone was polymerized onto chitosan oligomers in presence of stannous octoate by ROP in a chloroform and xylene mixture. ϵ -caprolactone was polymerized from the hydroxyl function of COS with different molar ratios, with a maximum DS of 47.3% determined from ^1H NMR. This step was followed by deprotection in an isopropyl alcohol/ H_2O /HCl mixture to lead to amphiphilic COS-PCL structures. Authors showed that COS-PCL are able to self-assemble in aqueous solution and that the shape of the micelles was dependent on the size of the PCL chain (Figure 30). This synthesis was reproduced several times by other teams. For example, Gao et al.¹⁰⁶ prepared COS-PCL based hollow spheres from a series of metals with water soluble COS ($1,800 \text{ g.mol}^{-1}$). In order to do that, COS-PCL was synthesized as previously except only HMDS was used as protecting group and triethylaluminium (AlEt_3) was used for ROP. Besides the reaction solvent was a mixture of chloroform and toluene. They showed different DS of PCL with variation of the number of protecting groups on COS and reached a maximum of one PCL chain by COS. In another work, they also tuned the size of giant COS-PCL vesicles synthesized according to the same protocol, by variation the DS and the length of the PCL chain and showed that only the COS-PCL with both the higher chain length ($\gamma=178$) and the higher DS (10%) can self-assemble into giant vesicles with a diameter higher than 0.5 μm ¹⁰⁷. They showed that the formation of the vesicles was temperature dependent, dissolved above 50 °C but self-assembled in vesicles again when cooled down. In those previous works, no analysis proved that only the secondary alcohol was not protected and that the ROP occurred on the secondary alcohol. Nevertheless, the quantitative silylation of chitosan was reported before ¹⁰⁸ and the assumption that the secondary alcohol is the less nucleophilic one is true. Li et al.^{82 83} also used N-phthaloylation of COS to protect the primary amine. Thus, the stann-catalyzed polymerization of ϵ -caprolactone was performed directly onto the primary alcohol of COS in pyridine with no need of deprotection. Neither NMR nor DS data were provided. Only FTIR spectra confirmed the grafting of first phthalic anhydride (PHA) and then PCL. The N-phthaloylation, as previously mentioned (I.1 p129), is known to be a quantitative reaction when working in appropriate ratio of PHA and conditions (water/DMF) ⁸¹. That is why in those conditions (1.7 eq of PHA), the amine group should be completely protected and the O-functionalization on the primary alcohol is the most probable. Indeed, it is a better nucleophile than the secondary alcohol.

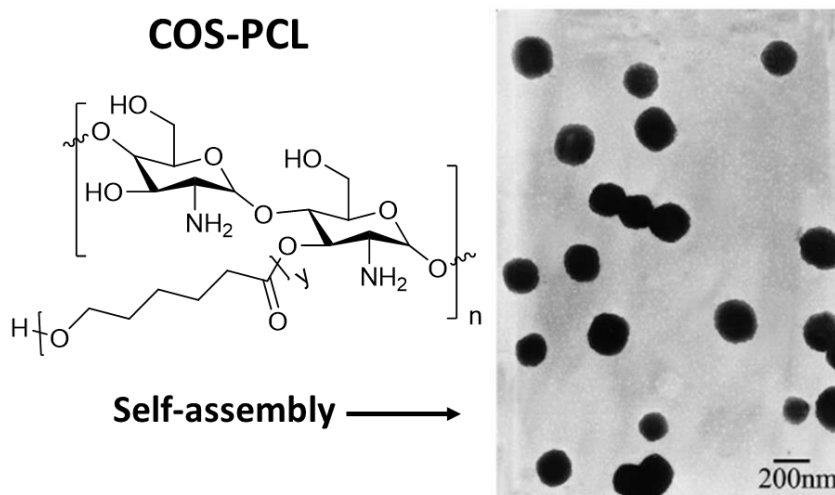


Figure 30. Structure of COS-PCL and TEM images of the resulting nanoparticles ($n=11$, $y=152$; 0.8% (w/v) copolymer)¹⁰⁵

In conclusion, the selective protection of COS led to different amphiphilic moieties by grafting either onto amine or alcohol of the sugar units. Nevertheless, we can highlight the lack of structural characterization. Thus, to be more specific on which functional group was grafted, more spectroscopic data such as ¹³C or 2D NMR and FTIR analyses could be suggested. In addition, amine titration could be done before and after reaction to check that no change occurred when O-functionalization is claimed.

I.4. Schiff base

Glutaraldehyde is the most frequently used crosslinker in chitosan network. Both aldehydes of this molecule will react with free amines of chitosan to form imines. Kildeeva et al.¹⁰⁹ showed that the crosslinking mechanism between glutaraldehyde and chitosan is a complex pH dependent process. They highlighted that chitosan catalyzed glutaraldehyde homopolymerization to form irregular products depending on the pH and glutaraldehyde concentration (Figure 31). This phenomenon has to be taken into account when designing new material as it could impact its properties.

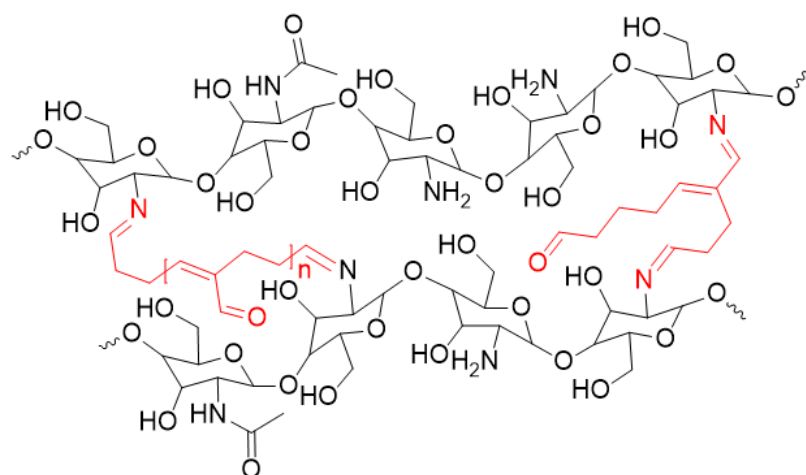
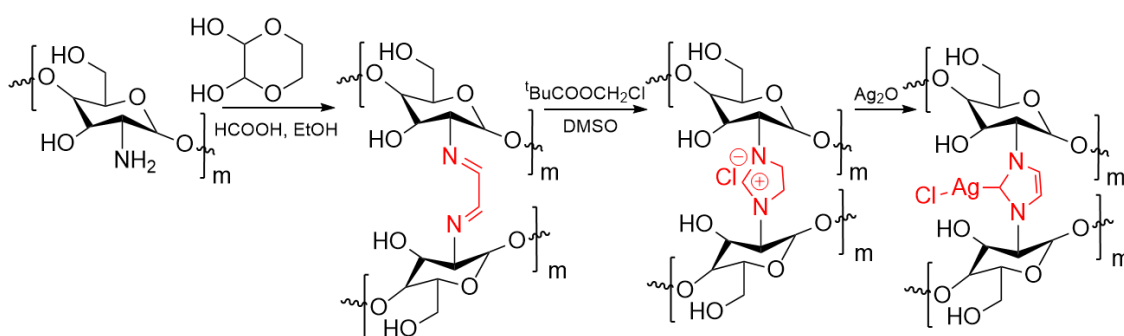


Figure 31. Possible side chemical structure of chitosan cross-linked with glutaraldehyde

Many teams used glutaraldehyde and in some cases, COS are mixed with other amino-components and crosslinked to form a new material with additional properties. For example, Ratanavaraporn et al.¹¹⁰ used different ratios of COS and gelatin (G) with glutaraldehyde as a cross linker to make scaffolds for the osteogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC). Though, they showed that the crosslinking occurs mostly between gelatin units as they flushed away some COS by washing the gel with water. Nevertheless, they managed to reach 70:30 G/COS ratio and obtained promising scaffolds for osteogenic differentiation culture of MSC with better properties than gelatin only scaffolds. Kumari et al.^{111 112}, used glutaraldehyde to fix COS onto a natural protein, bovine serum albumin (BSA) to obtain a promising biopolymer for gene delivery. They used an excess of COS compared to BSA to ensure that COS are cross-linked to BSA and not only BSA to itself. In other cases, components of interest are trapped in the network during the crosslinking of chitosan. For example, oligosaccharide and carboxymethyl oligosaccharide cross-linked with glutaraldehyde can be imprinted with copper (Cu^{2+}). This system showed good chelation capacity for depleted uranium¹¹³. The glutaraldehyde cross-linked chitosan can also have different design such as nanoparticles formed by water in oil micro emulsion. This shape might be a vehicle of interest for different substances, for example to load and carry adenosine triphosphate (ATP)¹¹⁴. In some cases, glutaraldehyde is used as a second cross linker as shown by Radha et al.¹¹⁵ who grafted glycidyl methacrylate onto oligosaccharides and combined the copolymerization of polypropylene glycol initiated by ceric ammonium nitrate and glutaraldehyde to crosslink COS. They established the grafting parameters and showed that this material was suitable for the removal of heavy metals from waste water.

Glutaraldehyde is a good cross linker in general as the imine formation between its two aldehyde functions and the free amines of chitosan is favorable. Nevertheless, the imine formation is reversible in certain conditions (pH and temperature) and the mechanism is both pH and concentration dependent. Nevertheless, glutaraldehyde is toxic, ecotoxic and corrosive.

Necol et al.¹¹⁶ proposed another way to crosslink oligochitosan through Schiff base formation leading to heterocyclic carbenes (Scheme 14). The synthesis of the diimine involved the addition of 2,3-dihydroxy-1,4-dioxane in acidulated ethanol activated by sonication. This was followed by the addition of chloromethyl pivalate, which led to the formation of the imidazolium ring. The final step consisted in the addition of silver oxide (Ag_2O). In this reaction, the Ag-C bond is formed by introduction of silver between the chloride anion and the imidazolium ring. They showed that the reaction was more efficient on 2 kg/mol COS than on glucosamine with higher yields and silver bonding. They explained this observation with the better solubility of COS in alcohol and the hydrogen bonding which are in favor of the imidazolium ring formation.



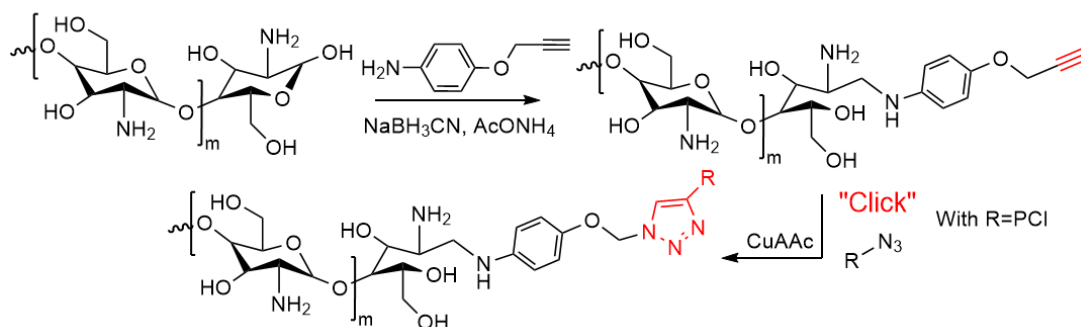
Scheme 14. Synthesis of chitooligosaccharide silver complex through imidazolium ring formation¹¹⁶

Other aldehydes were described in the literature. For exemple, Ma et al.¹¹⁷ grafted vanillin through Schiff base formation onto carboxymethyl oligochitosan (CMCOS) with DP from 3 to 8. The reaction was carried out in ethanol and acetic acid solution for 10 h. They obtained a whole range of DS from 24 to 41% with 1:1 and 1:3 vanillin/CMCOS ratios respectively. Wang et al.¹¹⁸ also grafted vanillin on COS from 3 to 5 kg.mol⁻¹ with different molar ratios in a water/ethanol mixture. They showed that when the DS is too high, about 47%, the vanillin grafted COS is no longer soluble in water. They also highlighted the pH dependency of the imine formation when no reducing agent was used. Indeed, the benzoic imine was proved to be stable when pH>7.4. At lower pH, the reversibility occurred and COS were no longer grafted with vanillin. This showed great potential for drug delivery. Indeed, the vanillin grafted COS can self-assemble and encapsulate cancer drug and then

be disrupted and dissolved at the contact of cancer cells due to pH changes. Among Schiff base formation on COS, Ren et al.¹¹⁹ grafted phenolic acid by enzymatic modification. Phenolic acid was first oxidized in presence of laccase and then reacted on free amines of COS. Elshaarawy et al.¹²⁰ functionalized COS with previously synthesized vanillyl-imidazolium ionic liquids with 1:1 molar ratio in a 2% acetic acid ethanol solution and obtained a DS of 45% calculated by mass difference between the original COS and the product. They claimed that the reaction was favored as those optimized condition can led to almost total conversion of COS, indeed, with 27% DA only 18% of free amines remained. This synthesis led to the preparation of oligochitosan-based silver nanoparticles, following a green in-situ protocol, which may find applications in biomedical textiles articles. With the same idea, Sofy et al.¹²¹ grafted 3-(4-acetyl-3-hydroxyphenoxy)propyl triphenyl-phosphonium salts with 28% DS.

Meng et al.⁷⁷ used a different pathway to graft spermine onto stearic acid grafted 18 kg/mol COS. They first oxidized the COS backbone using sodium periodate (NaIO_4) leading to the formation of two aldehyde groups among the polymer chain. The oxidization degree was 12.4%. This oxidation was followed by the addition of spermine and sodium borohydride (NaBH_4) to reduce the previously formed imine. Finally, 7.6% of the aldehyde were linked with spermine. The choice of NaBH_4 as a reducing agent allowed not only to reduce the imine but also the resulting aldehyde to avoid any further side reaction. Nonetheless, the action of NaIO_4 led to the breakage of the polymer backbone as reduction of the molecular weights was observed.

Among other types of chemistry, Guerry et al.¹²² developed an aniline mediated reductive amination. In this reaction, aniline can react with the chitosan reductive end to form an imine. They first performed a model reaction on tetra-N-acetyl-chitopentaose and propargylamine dissolved in ammonium acetate buffer in presence of sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN). They showed that the addition of aniline and the in situ generation of the aniline iminium enhanced the formation of the propargylamine iminium through transamination. When transposed to 2 kg.mol⁻¹ COS, the aniline-catalyzed reductive amination showed some limitations and poor yields. Nonetheless, the direct use of a propargyl-aniline derivative led to significant yield (70%). The alkyne terminated COS were then clicked to azide terminated PCL structure for synthesis of amphiphilic structures¹²³ (Scheme 15). This chemistry may open the way to the synthesis of various structures and copolymers through click chemistry on the COS reducing end.



Scheme 15. Reductive amination of COS followed by « click » reaction by CuAAC coupling

Generally, aldehydes are very reactive toward the free amine of COS. This can easily lead to network formation but also to the introduction of new functionalities on COS. The Schiff base reversibility can undergo different applications such as drug delivery or selective protection for further reactions as described below (I.7) ^{124 125 126 127}.

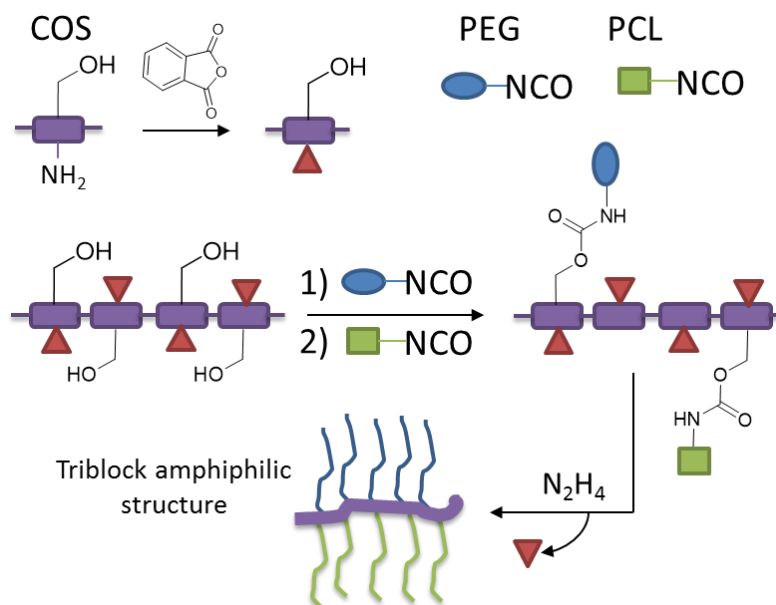
I.5. Michael addition

The Michael addition is the nucleophilic addition of a carbanion or another nucleophile to an α,β -unsaturated carbonyl compound containing an electron withdrawing group. Michael addition with chitosan is rather an aza-Michael reaction involving the primary amine of chitosan as a Michael donor, and an electron deficient alkene molecule as a Michael acceptor. For example, Chen et al. ¹⁰⁴ managed to graft COS onto polydopamine (PDOPA) polyurethane (PU) membranes simply by immersing the PU-PDOPA membranes in COS solutions with various concentrations. The aza-Michael reactions occurred between the aromatic ring of PDOPA and the primary amine of COS at room temperature. Ren et al. ¹¹⁹ also described the aza-Michael addition of phenolic acid on 1 kg/mol COS in enzymatic conditions followed by its in situ polymerization. Nevertheless, they did not provided substitution degrees. Chapelle et al. ¹²⁸ grafted furfuryl glycidyl ether on 1.6 kg.mol⁻¹ COS with 25% DS to do Diels-Alder chemistry with monomaleimide moiety. They evidenced that aza-Michael reaction could occur between the maleimide double bond and the free amine of COS. This reaction was shown to be solvent and pH dependent. Indeed, when working in DMSO, the double bond of the maleimide reacted with the primary amine through Michael addition. On the contrary, when working in 1 or 2% acetic acid aqueous solutions, the primary amines were protonated and not nucleophilic enough to react with the double bond and the Diels-Alder reaction occurred. Similarly, when acetic acid was added in DMSO, the reaction did not occur anymore. Finally, the use of COS allows working at neutral/basic pH but also in other solvents such as DMSO. This previous experiment showed that it can open the way to reactions that were not possible with chitosan when working in acidic conditions.

I.6. Isocyanate

The functional group with the formula $R-N=C=O$ defining isocyanates can undergo a broad range of chemical reactions. In the case of chitosan, they are most likely to react with the primary amine but can also react with the primary alcohol in certain conditions.

For example, Xu et al.¹²⁹ achieved biodegradable chitoooligosaccharide-based polyurethane with COS and PCL/diurethane isocyanate as cross linker. The prepolymer isocyanate reacted with the primary amine of COS to form ureido bond as NH_2 groups showed higher reactivity towards isocyanate than primary alcohol. The use of COS as a chain extender afforded better thermostability, hemocompatibility and surface hydrophilicity to the PU film than PU on its own. The remaining free amino groups might still be available for further modification and to extend the application field. Ren et al.¹¹⁹ also used a diisocyanate cross linker, previously synthesized from isophorone diisocyanates (IPDI) and polytetramethylene ether glycol (PTMG), to form waterborne polyurethanes. In another approach, Liu et al.⁸⁴ synthesized new tri-block copolymers from COS, PCL and PEG that can self-assemble to encapsulate anti-cancer drug, doxorubicin. They used a different pathway than the previous teams^{82 60}. The first step consisted in the N-phthaloylation of COS using phthalic anhydride as described before (I.1 p 129). This resulted not only in the protection of the primary amine but also changed the solubility of the oligomers that were no more soluble in water but still soluble in organic solvents such as DMF or DMSO. Previously synthesized PCL and PEG both terminated with isocyanate function (NCO) were grafted onto free hydroxyl groups of COS in DMSO. COS were deprotected by hydrazine hydrate and the products were purified by dialysis to obtain triblock copolymers (PCP) (Scheme 16).



Scheme 16. Synthesis of PCP copolymers through N-phthaloylation of COS followed by urethane formation

The low efficiency of this reaction was evidenced by size exclusion chromatography (SEC) with only two PEG-NCO and PCL-NCO chains respectively grafted on 2 kg/mol COS, probably due to steric hindrance and hydrogen bonding from COS but also the length of PEG and PCL chains (~ 2 kg/mol) that were introduced at only 1 eq NCO/OH. The resulted copolymers were self-assembled in PBS and loaded with doxorubicin. The remaining free amine of the triblock might also be cross-linked by genipin to increase the drug release period.

In summary, isocyanates are able to react with both primary amine and alcohol of COS. They can be used as efficient cross-linkers as the $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ function is very reactive. Nevertheless, a lot of isocyanates are toxic and the desire to replace them in any kind of applications is recently gaining an increasing interest in both industrial and academic communities.

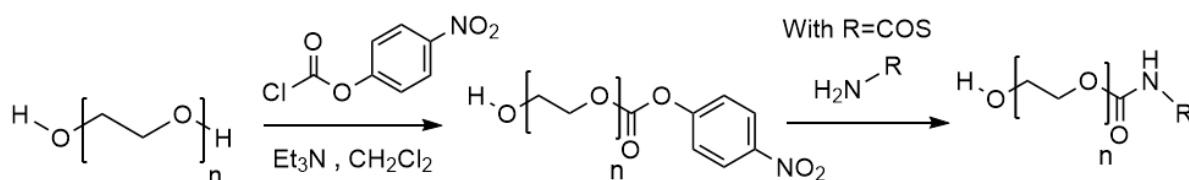
1.7. Nucleophilic substitution

As with many reactions, nucleophilic substitution on COS can occur on both amine and alcohol although the primary amine is more reactive.

To favor the O-substitution, some teams protected the amine before the addition of the electrophile substrate. Yue et al.^{124 125} for example, used benzaldehyde protection by Schiff base formation to graft cinnamyl alcohol and geraniol on the primary alcohol of COS. The protection was performed in basic conditions, which is in accordance with the imine stability described before (I.4 p137), it also led to a solubility change. At first, they

transformed both cinnamyl alcohol and geraniol into cinnamyl bromide and geraniol bromide, respectively. The protected N-benzylidene COS dissolved in DMF was then added dropwisely to both modified alcohols dissolved in DMF. The primary alcohol can react on the electrophilic site of both products resulting in nucleophilic substitution of the bromide. At the end, amine deprotection was performed by dissolution of the resulting product in an hydrochloric acid (HCl)/ethanol solution for 24h followed by precipitation of the O-grafted COS by addition of sodium bicarbonate (NaHCO_3). They obtained 24 to 37% DS for geraniol and 6 to 18% DS for cinnamyl alcohol. Following the same pathway, Liu et al.¹²⁷ grafted kojic acid chloride onto 1 kg.mol⁻¹ COS. After protecting the amine, they performed the reaction in DMSO and precipitated the O-substituted COS in acetone. DS for benzaldehyde substitution was not provided. Indeed, if residual amines are available, they might react with the electrophile and N-substitution might occur. As a matter of fact, Liu et al. also described the N-substitution of piperazine modified chlorokojic acid when no amine protection is used¹³⁰ and in the previous work presented above, they claimed to obtain DS>100%¹²⁷. The spectroscopic data can only prove the grafting but are not precise enough to confirm if only O, N or both substitutions occurred.

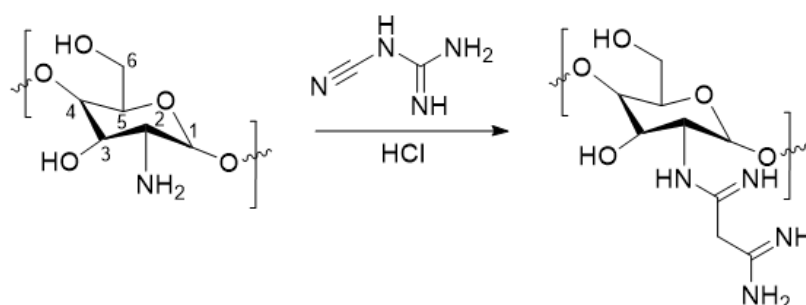
As another example of nucleophilic substitution, Zhang et al.¹³¹ first grafted methylchloroformate on free amine of COS with a DS of 88% followed by chloroacetyl chloride grafting onto the primary alcohol to form 2-urea-COS. Both reactions were carried out in excess of reactant to ensure high DS. The product was then reacted with N-phenyl-N'-pyridylurea that can be efficiently added by nucleophilic substitution of the chloride beard by the chloroacetylchloride. Ramalingam et al.⁶⁴ described the synthesis of 15 kg.mol⁻¹ N-trimethyl-chitosan with 22.5% DS by nucleophilic substitution of iodomethane. This reaction is well known for the formation of quaternary amine that improves the solubility range of chitosan in water. Song et al.⁶⁵ used 4-nitrophenyl chloroformate (NPC) (Scheme 17), one of the most common reagents for the activation of alcohols, thiols and amines¹³², to modify PEG. The addition of COS on this reactant led to nucleophilic substitution of nitrophenol and amide formation with 90% DS.



Scheme 17. Activation of PEG with NPC and addition on COS

I.8. Guanidination

Wang ¹³³ grafted dicyandiamide also called 2-cyanoguanidine (CG), which is a nitrile derived from guanidine, on COS. They studied the microwave assisted reaction between the primary amine of COS and the nitrile function carried out by CG and established the best conditions to be a microwave power 400 W for 15 min at pH 1 with a 1:2 COS/CG ratio (Scheme 18).



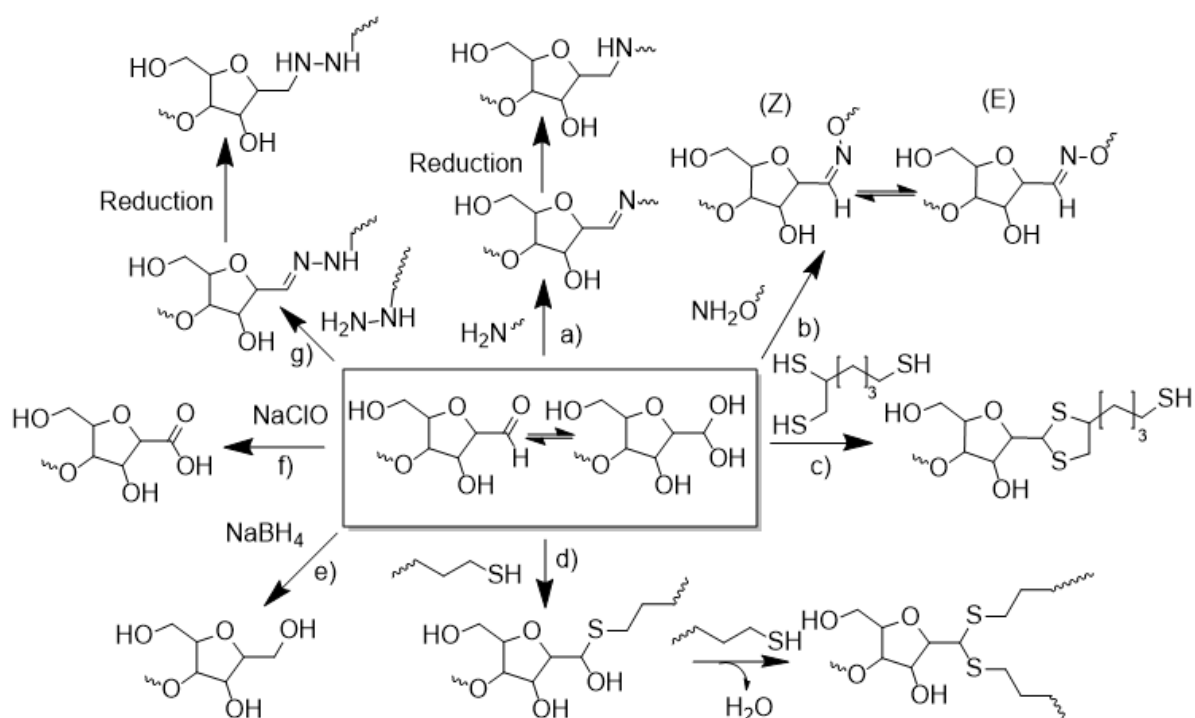
Scheme 18.. Guanidination of COS

In the following study ¹³⁴, they used the previously determined conditions to graft CG with 18% DS calculated from elemental analysis comparison. The pendant amine thus introduced was then used in combination with the primary amines of COS, to graft the product on a previously activated membrane bearing acyl chloride groups. Microwave action seemed to be a nice way for improving grafting degree while working in acidic water.

II. Grafting on aldehyde

The depolymerization of chitosan leads to the formation of a chain end aldehyde, 2,5-Anhydro-D-mannofuranose (AMF), when using sodium nitrite. This method has been widely described for being efficient and reproducible to obtain COS. Yet, this reaction leads to the formation of side reaction when the aldehyde reacts with the free amines of chitosan to form imines, thus leading to branched structures and in acidic condition, to the liberation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) with additional breakage of the glycosidic bond ⁴⁶. This is why some teams tried to block the aldehyde moieties. For example, Salim et al.¹³⁵ used sodium chlorite to oxidize the aldehyde into an acid (Scheme 19 f)). While avoiding the side reactions, the chain end function remained reactive and further reaction on the carboxylic acid could be undergone. They reproduced this reaction on oligomers of DP 10, 20 and 30 with high yield (80%). Bezrodnykh ¹³⁶ et al compared the action of sodium borohydride and hydroxylamine on AMF chain end COS. NaBH₄ allowed reducing aldehyde in alcohol but also led to the reduction of the formed imines, which entailed an increase in the molecular weight as branched oligomers are formed (Scheme 19 e)). Hydroxylamine led to the formation of chitosan oximes, an irreversible structure that

allowed quenching the aldehyde chain end (Scheme 19 b)). In another approach, some teams used the formed aldehyde to functionalize the oligomers. For example Salim et al.¹³⁷ also made 4-(hexyloxy)aniline-linked COS with excellent mass yield (92%) through Schiff base formation (Scheme 19 a)) followed by reduction of the formed imine by NaBH_3CN . This mild reducing agent is far less reducing than NaBH_4 and is therefore especially used to convert imines into amines. Moussa et al.¹³⁸ synthesized octanoichydrazide linked oligomers via reductive amination (Scheme 19 g)). Following the same method, they also functionalized oligomers of different molecular weight with various amino compounds to obtain high potential COS-based conjugates¹³⁹. Aniline, O-hydroxylamine and hydrazide derivatives were chosen for their lower pKa values (3-6) compared to free amine of COS (6.5-7). In that case, intramolecular imine formation were avoided and only amination and oximation occurred. Those reactions showed quantitative functionalization of COS with no degradation of the starting oligomer chain and introduction of various clickable functional groups. These promising results opened the way for the preparation of new diblock copolymers, as illustrated in their work by the synthesis of COS-b-polyethylene glycol. Coudurier et al.¹⁴⁰ recently described the grafting of dioxamine on the resulting aldehyde. They managed to avoid crosslinking between units by using an excess of amines and a dropwise addition of the oligomer solution. They highlighted the formation of (E) and (Z) isomer during oximation by ^1H NMR ((E)-oxime 7.6 ppm and (Z)-oxime 7.0 ppm). Pickenhahn et al.¹⁴¹ showed thioacetylation using mercaptoethanol and mercaptopropionic acid on a model study, first on AMF molecule and then on 2 kg.mol^{-1} COS-AMF. For this reaction, they played on the equilibrium between the aldehyde and gem-diol form of AMF in solution (Scheme 19 d). This can lead to the formation of hemithioacetal and thioacetal when working in thiol excess. They estimated the excess needed was at least 10 eq of thiol by AMF units and showed that freeze drying is in favor of thioacetal formation. Thioacetal was shown to be the most stable form compared to hemiacetal. As a direct application, they reacted a 2 kg.mol^{-1} thiol bearing PEG on the aldehyde of a 10 kg.mol^{-1} COS and resulted in 61% of thioacetylation. They also developed a novel approach allowing a more efficient one-step activation of the aldehyde by thioacetylation (Scheme 19 c))¹⁴². This process relies on the use of a trivalent linker bearing a thiol-hook and a thiol-tail. At first the thiol-hook reacted with the aldehyde through hemithioacetal intermediate followed by water elimination to result in thioacetal formation. They showed that time and trivalent thiol amount increment could displaced the equilibrium toward the thioacetal moiety. At the end, the oligochitosan was bearing a thiol-tail that is then able to react with any thiol-reactive entities.



Scheme 19. Scheme summing up the possible reaction on 2,5 anhydro-D-mannose end chain oligomers : a) Schiff base formation followed by reduction (NaBH_3CN , NaBH_4) b) Oximation with formation of isomer (E) and (Z)¹³⁶ c) Thioacetylation with trivalent linker¹⁴² d) Thioacetylation¹⁴¹ e) Reduction¹³⁶ f) Oxidation in carboxylic acid¹⁴³ g) Addition of hydrazine followed by reduction^{138 139}

The use of aldehyde chain end is new and not yet widely used. Nevertheless, it is a promising way for synthesizing diblock copolymers. It was shown before that low molecular weight oligomers are soluble in DMSO. This solvent can lead to the use of hydrophobic moieties thus leading to amphiphilic structures. In addition, the NMR characterizations are easier due to new signals of the aldehyde around 8 ppm that are not overlapping the one from the rest of the oligomer chain.

III. Conclusion

In this review, we demonstrated that many reactions are possible on chitosan oligomers. In fact, like chitosan, COS bears two reactive functions, amine and hydroxyl, that can undergo any kind of reaction. Nevertheless, the low molecular weight of COS lead to lower viscosity in aqueous solutions, larger pH range solubility and open the way to work in other organic solvents. All those parameters can lead to the introduction of new functions on those biomolecules in high yields. In addition, certain depolymerization routes lead to the formation of aldehyde chain end COS that are suitable for block copolymer synthesis and amphiphilic structures. Those structures can find applications in a lot of fields

especially in pharmaceutical and biomedical devices area. In this study, we also demonstrated that there is an obvious lack on structural information when functionalizing COS. Indeed, DS are not always provided and sometimes miscalculated. This is why, even if the chemistry on chitosan and its derivatives is well developed, further research on yield improvement and structural characterization is most welcomed.

Etude préliminaire

I. Introduction

Cette étude approfondie sur les différentes voies de fonctionnalisation des COS a permis de retenir deux types de réactions correspondant le mieux à la problématique de ce sujet. En effet, le but est de pouvoir greffer des chaînes grasses plus ou moins longues sur des oligomères de DP5 à DP20 avec une méthode simple et reproductible, tout en obtenant des taux de greffage suffisamment intéressants pour l'application. C'est pourquoi, la première réaction retenue est celle entre un acide gras et les amines du chitosane pouvant être réalisée de différentes façons, par l'utilisation d'agents de couplage, ou la formation de chlorure d'acyle notamment. Cette réaction est intéressante car elle peut être transposée au TOFA, mélange d'acides gras constituant la chaîne hydrophobe des tensioactifs actuels de COLAS. De plus, en fonction des conditions opératoires utilisées, des taux de greffage intéressants ont déjà été atteints. Les réactions de couplage époxy-amine semblent également intéressantes puisqu'elles ne nécessitent pas de réactifs intermédiaires et donnent des taux de greffage assez élevés sur les quelques molécules testées dans la littérature. Cependant, aucune littérature ne reporte le greffage d'époxydes gras sur les COS.

Ainsi, dans la suite de ce chapitre ces deux réactions seront étudiées afin de déterminer les meilleures conditions réactionnelles permettant d'obtenir, pour chacune d'entre elles les DS optimaux, i.e. le maximum de fonctionnalisation possible tout en obtenant des tensioactifs hydrosolubles.

II. Méthodes de mesures des degrés de substitution (DS)

La mesure du degré de substitution des COS et en général du chitosane est toujours une donnée controversée dans la littérature. Le moyen le plus courant de déterminer le DS est d'utiliser la RMN ^1H ¹⁴⁴. Souvent, lorsqu'il est calculé par RMN, le DS revendiqué est en fait le pourcentage d'amines libres qui sont substituées et ne prend pas en compte le DA. Habituellement, le greffage est confirmé par l'apparition de nouveaux signaux correspondant à la nouvelle molécule (H_{NM}) introduite. Le DS est alors calculé par intégration de ce nouveau signal et en prenant en référence le CH_3 des motifs acétyle (environ 2 ppm) des COS (6) ^{63, 101} ou le signal correspondant au proton en alpha de l'amine primaire (environ 2,4 ppm) (7) ⁹⁶. Dans la deuxième équation, le DS représente le taux de

greffage des amines libres réellement fonctionnalisables par rapport à (1) qui inclut également les unités acétylées dans le calcul et peut être évalué comme un DS «total» .

$$(6) \quad DS(\%) = \frac{\frac{1}{a} I_{NM} \times DA}{\frac{1}{3} I_{CH_3}} \quad \text{Avec } a \text{ le nombre de protons correspondant à } I_{NM}$$

$$(7) \quad DS(\%) = \frac{\frac{1}{a} I_{NM}}{\frac{1}{a} I_{NM} + I_{NH_2}}$$

Il arrive souvent que le DS soit mal calculé en utilisant comme référence uniquement le proton en alpha de l'amine libre. En effet, les signaux de l'amine greffée et de l'amine libre sont différents, ce qui signifie que l'intensité du signal de l'amine libre a changé lors de la fonctionnalisation. Il ne peut donc pas être utilisé comme référence interne, sauf si le greffage s'effectue uniquement sur l'hydroxyle, contrairement au CH₃ des motifs acétyle qui n'est pas supposé évoluer. Il est également possible de calculer le DS avec les signaux anomériques qui se cachent généralement derrière le signal HOD (8). Ces signaux peuvent apparaître lors de l'analyse à une température plus élevée telle que 60-80°C. Le signal anomérique sera différent si l'unité sucre est greffée (H_{1'}) ou non (H₁). L'apparition du signal anomérique peut également confirmer la fonctionnalisation N ou O.

$$(8) \quad DS(\%) = \frac{\frac{1}{a} I_{1'}}{I_1 + \frac{1}{a} I_{1'} + \frac{1}{3} I_{CH_3}}$$

Parfois, le calcul du DS est impossible par RMN ¹H en raison du chevauchement des signaux d'intérêt. Dans ce cas, d'autres méthodes telles que la SEC peuvent être utilisées ⁵⁸. En effet, les masses molaires des oligomères greffés seront différentes de celles du chitosane brut. Sur les COS, les changements sont plus visibles que sur le chitosane de haut poids moléculaire, en particulier lors du greffage de petites molécules. Connaissant le poids moléculaire du greffon, le DS peut être obtenu par un calcul facile.

L'analyse élémentaire est également un moyen de calculer le DS en particulier lors de l'introduction de nouveaux hétéroatomes dans la chaîne du sucre. Par exemple, Xu et al. ⁵⁶ ont déterminé le DS des COS en fonction de la teneur en soufre et en azote lors du greffage de chaînes de polycaprolactone portant deux atomes de soufre en fin de chaîne. Le DS moyen des amines libres a donc été calculé par l'équation ci-dessous (9) où %S est la teneur en soufre dans le polymère, % N est la teneur en azote, 32 est la masse molaire du soufre et 14 est la masse molaire de l'azote (en g.mol⁻¹).

$$(9) \quad DS(\%) = \frac{\frac{\%S}{2 \times 32}}{\frac{\%N}{14} \times (1 - DA)}$$

Dans ce cas, c'est le DS des amines et non le DS de la chaîne entière qui est calculé. On peut imaginer que cette méthode soit reproduite pour tout type d'hétéroatomes X pour calculer le DS total comme suit:

$$(10) \quad DS(\%) = \frac{\frac{\%X}{2 \times MX}}{\frac{\%N}{14}}$$

D'autres essais tels que celui utilisant de l'acide trinitrobenzènesulfonique, TNBS^{61, 76} peuvent être utiles pour la titration d'amines libres. L'essai TNBS conduit au DS par titration en retour des amines libres résiduelles. En général, une solution de TNBS est ajoutée à la solution de COS greffée et incubée pendant un certain temps à 37°C. Le TNBS forme un complexe avec l'amine libre qui est visible en UV autour de 344 nm. Le DS est ensuite calculé à partir d'une courbe d'étalonnage, préalablement obtenue avec différentes concentrations de solutions de COS. Selon le même principe, des tests avec la ninhydrine peuvent être effectués⁷⁸. La ninhydrine forme un complexe avec à la fois une amine primaire et une amine secondaire qui peut être observé à 570 nm. Parmi les réactions de titrage pour obtenir le DS, on retrouve également l'acide orange7 pour l'amine⁷³, le réactif d'Ellman⁶⁶ pour le soufre, un mélange bromure de potassium-bromate de potassium pour le titrage de doubles liaisons⁵², mais ces dernières méthodes sont spécifiques au greffon et ne sont pas applicables dans tous les cas. Il en va de même avec Cho et al.⁵⁴ qui ont utilisé l'étalonnage UV pour mesurer le DS de COS modifiés avec de la doxorubicine. Néanmoins, la mesure DS par UV reste moins précise que la détermination par RMN ou par SEC. Finalement, aucune détermination de DS n'est universelle, et il est nécessaire de s'adapter au type et à la nature chimique du greffage effectué.

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel

Les produits tels que le chlorure de propanoyle (C3-Cl), le chlorure d'hexanoyle (C6-Cl), le chlorure de décanoyle (C10-Cl), le chlorure d'hexadécanoyle (C16-Cl), le chlorure de stéaroyle (C18-Cl), le chlorure de thionyle (SOCl₂), le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le *N*-hydrosuccinimide (NHS), le glycidyl éther de butyle (C4), le glycidyl éther d'octyl-décyle (C9), le glycidyl éther d'hexadécyle (C16), la triéthylamine (Et₃N), l'acide acétique (AcOH) ont été fournis par Sigma Aldrich et utilisés sans purification. Le cardanol glycidylé (NC513) fourni par Cardolite, le TOFA fourni par

COLAS, et le chitosane (crevette, 30 kg.mol⁻¹, DA 16%) fourni par Glentham science, n'ont pas subi de purification. Le DMSO, l'acétone, et l'eau HPLC ont été fournis par VWR.

III.2. Modes opératoires

Sauf indications contraires, les oligomères de DP5, DP10, DP15 et DP20 ont été synthétisés suivant les modes opératoires présentés dans le chapitre précédent (p 92).

III.2. 1) Addition de chlorure d'acyle sur les COS

a) Chlorures d'acyles variés

100 mg d'oligomères de DP10 (terminés AMF) sont dissous dans 5 mL de DMSO. 0,2 à 12 eq de chlorure d'acyle sont ajoutés à la solution. Le mélange est agité pendant 48 h à 80 °C. Les produits sont précipités dans 100 mL d'acétone froide puis récupérés par centrifugation. Les gels ainsi obtenus sont lavés plusieurs fois à l'acétone pour éliminer les chlorures d'acyles et le DMSO résiduels. Les produits sont ensuite séchés sous vide pendant 6h.

¹H NMR de DP10 + C_n-Cl (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5,5): δ (ppm) 8,00-8,45 (s, H_{aldéhydes}), 7,10 (m, 1H, H_{β-HMF}), 7,10 (m, 1H, H_{α-HMF}), 5,00 (m, 1H, H_{δ-HMF}); 4,00-4,55 (m, 1H Ho2; 1H, Ho3; 1H, Ho4; 1H, Ho5), 3,85-4,50 (m, 1H H2'; 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6 and 2H, Ho6), 3,51 (m, 1H, H2), 2,41 (s, 3H, H_{GlcNAc}), 1,80 (m, 2H, H_{α amide}), 1,48 (s, (2n-2)H, H_R), 1,11 (s, 3H, H1) et 4,80 (s, HOD)

b) Chlorure de TOFA

1 g de TOFA est dissout dans 10 mL de THF anhydre. Le mélange est placé sous vide puis sous gaz inerte (azote). 1.2 eq de SOCl₂ (290 µL) sont ajoutés goutte à goutte au mélange, plongé dans un bain de glace, toujours sous azote. Au bout d'une heure, le THF et le reste de SOCl₂ sont évaporés et le chlorure de TOFA est séché à la pompe à vide. 1 g d'oligomères est dissout dans 10 mL de DMSO. Le chlorure de TOFA est ajouté goutte à goutte puis le mélange est chauffé à 80 °C pendant 48 h. Le produit est ensuite précipité dans 200 mL d'acétone froide, centrifugé et lavé puis séché sous vide pendant 6h.

¹H NMR de DP10 + TOFA-Cl (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5,5): δ (ppm) 8,00-8,45 (s, H aldéhydes), 5,10-5,45 (m, 6H, Hi, Hh), 4,00-4,55 (m, 1H Ho2; 1H, Ho3; 1H, Ho4; 1H, Ho5), 3,25-4,00 (m, 1H H2'; 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6 and 2H, Ho6), 2,85 (m, 1H, H2), 2,10 (m, 4H, Ha, He), 2,0 (s, 3H, H_{GlcNAc}), 1,50 (m, 2H, Hb), 1,20 (s, 8H, Hc), 0,69 (s, 3H, Hd), et 4,80 (s, HOD)

III.2. 2) Activation d'acides carboxyliques par DCC NHS

Dans un premier temps, le TOFA est solubilisé dans 10 mL de DMSO en présence de 1,5 eq de DCC et 1,5 eq de NHS pendant 1h à 30°C. Le mélange est ensuite ajouté

goutte à goutte à 1g d'oligomère (terminé oxime) dissout dans 10 à 20 mL de DMSO. La solution est agitée pendant 24h à 80°C. Le produit est ensuite précipité dans 200 mL d'acétone froide, centrifugé et lavé pour éliminer les impuretés, le DCC et NHS résiduels, puis séché sous vide pendant 6h.

^1H NMR de DP10 + TOFA (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5,5): δ (ppm) 8,2-8,5 (s, H aldehydes), 7,5 (d, 8Hz, 1H, H1 (E)-oxime) 6,8 (d, 7Hz, 1H, H1 (Z)-oxime), 5,1-5,5 (m, 6H, Hi, Hh), 4,0-4,5 (m, 1H Ho2; 1H, Ho3; 1H, Ho4; 1H, Ho5), 3,2-4,0 (m, 1H H2'; 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6 and 2H, Ho6), 3,2 (m, 1H, H2), 2,4-2,6 (m, 4H, Ha, He), 2,05 (s, 3H, H_{GlcNAc}), 1,50 (m, 2H, Hb), 1,25 (m, 8H, Hc), 0,89 (s, 3H, Hd) et 4,8 (s, HOD)

III.2. 3) Couplage époxy-amine sur les COS

1 g d'oligomères de DP10 sont solubilisés dans 20 mL de DMSO. A cette solution d'oligomère, du butyle (C4), du nonanoyl (C9), de l'hexadécyle glycidyl éther (C16) ou du cardanol époxydé dans 10 ml de DMSO est ajouté avec différents ratios par rapport à NH_2 . La solution est agitée pendant 24 h à 80 °C. Les produits sont ensuite précipités dans 200 ml d'acétone froide, lavés avec de l'acétone et centrifugés pour être collectés. Enfin, le produit est séché sous vide pendant 6h pour se débarrasser du solvant résiduel.

^1H NMR de DP10 + C4 (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5,5): δ (ppm) 8,20-8,50 (s, $\text{H}_{\text{aldéhydes}}$), 4,65 (m, 1H, Hb), 4,60 (m, 1H, Ho5), 4,48 (t, 4,0 Hz, 1H, Ho2 (E)), 4,39 (m, 1H, H2-AMF), 4,22 (m, 1H, Ho3), 3,20- 4,00 (m, 1H H2' acétyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 2H Hg; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 2,95 (m, 2H, Hc), 2,75 (m, 2H, Ha), 2,55 (m, 1H, H2), 2,00 (s, 3H, HCH_3), 1,40 (t, 2H, Hf), 1,18 (m, 2H, He), 0,74 (t, 3H, Hd) et 4,80 (s, HOD)

^1H NMR de DP10 + C9 (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5,5): δ (ppm) 8,20-8,50 (s, $\text{H}_{\text{aldéhydes}}$), 4,65 (m, 1H, Hb), 4,60 (m, 1H, Ho5), 4,48 (t, 4,0 Hz, 1H, Ho2 (E)), 4,39 (m, 1H, H2-AMF), 4,22 (m, 1H, Ho3), 3,20- 4,00 (m, 1H H2' acétyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 2H Hg; 2H, Ha; 2H, Hc; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 2,55 (m, 1H, H2), 2,00 (s, 3H, HCH_3), 1,57 (m, 2H, Hf), 1,28 (m, 14H, He), 0,85 (m, 3H, Hd) et 4,80 (s, HOD)

^1H NMR de DP10 + C16 (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5,5): 8,20-8,50 (s, $\text{H}_{\text{aldéhydes}}$), 4,65 (m, 1H, Hb), 4,60 (m, 1H, Ho5), 4,48 (t, 4,0 Hz, 1H, Ho2 (E)), 4,39 (m, 1H, H2-AMF), 4,22 (m, 1H, Ho3), 3,20- 4,00 (m, 1H H2' acétyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 2H Hg; 2H, Ha; 2H, Hc; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 2,55 (m, 1H, H2), 2,00 (s, 3H, HCH_3), 1,57 (m, 4H, Hf), 1,27 (m, 14H, He), 0,87 (m, 3H, Hd) et 4,80 (s, HOD)

III.3. Caractérisations

Les caractérisations RMN, IR et SEC ont été réalisées sur les mêmes appareils que dans le chapitre précédent en utilisant la calibration PEO notamment pour la mesure de masses moléculaires.

IV. Résultats et discussions

Cette étude consiste en la détermination des voies de synthèses idéales ainsi que l'établissement des conditions opératoires afin d'obtenir des COS amphiphiles avec des DS maximaux. En effet, la tête hydrophile du tensioactif étant composée d'un oligomère de chitosane, plusieurs queues hydrophobes peuvent être greffées sur ce dernier. L'objectif est donc de greffer le maximum de chaînes pour obtenir les meilleures propriétés tensioactives possibles, tout en conservant au minimum une amine libre cationique et la solubilité dans l'eau. Les degrés de substitutions présentés par la suite représentent la proportion d'amines substituées et sont calculés selon l'équation (7) p150.

IV.1. Addition de chlorures d'acyles

IV.1. 1) Etude modèle

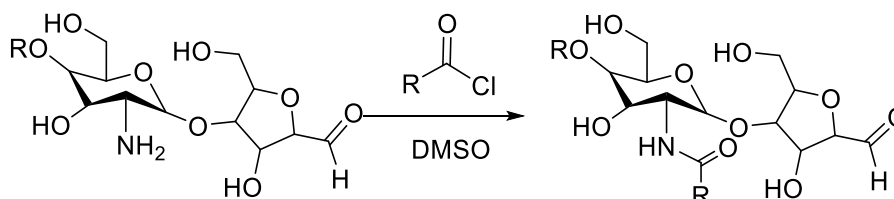


Schéma 20. Addition de chlorure d'acyle sur des COS-AMF

Dans un premier temps, des oligomères de DP10 ont été fonctionnalisés avec trois chlorures d'acyle de tailles différentes, C3, C6, C16 dans le DMSO. En effet, comme évoqué précédemment, les oligomères de chitosane sont uniquement solubles dans le DMSO et l'eau. La réaction a été menée pendant 24h à 80°C. Le nombre d'équivalents de chlorures par rapport aux amines a varié dans le but d'atteindre des DS maximaux. Le greffage de chacun des chlorures a été confirmé par RMN ^1H avec l'apparition du signal « 1 » à 1,2 ppm correspondant au CH_3 terminal du chlorure d'acyle (Figure 32. RMN ^1H d'oligochitosanes de DP10 modifiés avec 1 eq RCI/NH_2 a) $\text{R}=\text{C}_3$ b) $\text{R}=\text{C}_6$ c) $\text{R}=\text{C}_{16}$ Figure 32). Il a également été noté la formation d'HMF, décrite dans le chapitre précédent, du fait de la présence d'acide chlorhydrique libéré lors de la réaction entre l'eau présente dans le DMSO et les chlorures d'acyle.

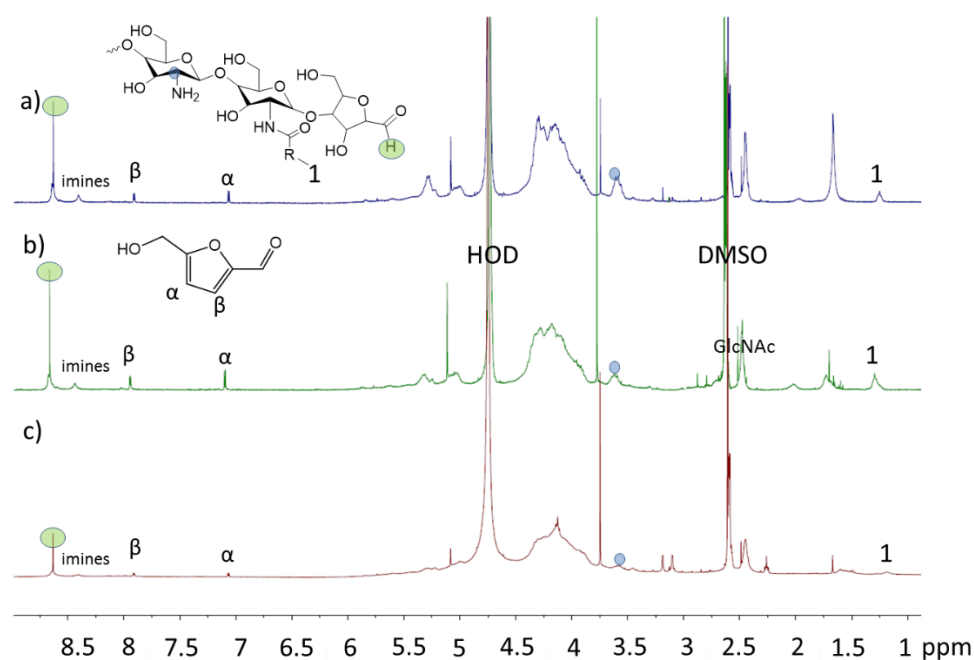


Figure 32. RMN ^1H d'oligochitosanes de DP10 modifiés avec 1 eq RCl/NH_2 a) $\text{R}=15$ b) $\text{R}=5$ c) $\text{R}=2$

Le nombre d'équivalents de chlorure a varié jusqu'à 12 équivalents. Il a été montré que, quelle que soit la taille de la chaîne grasse, un maximum de fonctionnalisation est atteint à partir de 1,2 eq RCl/NH_2 avec des DS maximaux entre 20 et 30% pour chacun des chlorures d'acyle (Figure 33). De plus, les rendements obtenus pour chacun des produits sont très faibles (<30%).

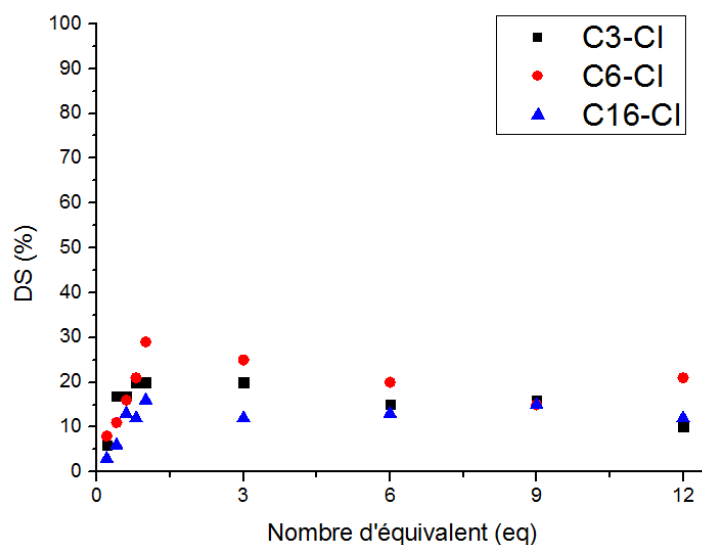


Figure 33. Evolution du degré de substitution en fonction du nombre d'équivalents en chlorure d'acyle et de la taille de la chaîne grasse lors du greffage de COS DP10

Lors de la réaction d'acétylation, la formation d'un produit blanc est observée. Ce produit secondaire est très odorant et insoluble dans les solvants organiques usuels. Nous avons supposé que le DMSO pouvait réagir avec le chlorure d'acyle selon la réaction d'oxydation de Swern (Schéma 21). De plus, plus le nombre d'équivalents en chlorure est important, plus la quantité de ce sous-produit est grande, ce qui confirme l'hypothèse de la réaction secondaire avec le solvant. En effet, les amines du chitosane sont peu accessibles, ainsi la réaction avec celles-ci n'est pas favorisée. Le chlorure d'acyle est donc désactivé en acide et n'est plus réactif face aux amines.

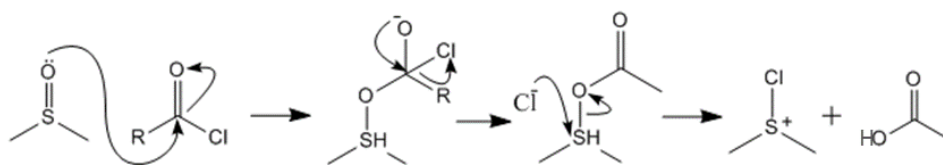


Schéma 21. Réaction secondaire possible entre un chlorure d'acyle et le DMSO

Cette étude utilisant les chlorures d'acyle a ainsi montré qu'un DS maximal, 20 à 30%, était atteint quel que soit le nombre d'équivalents ou la longueur de chaîne des chlorures utilisés. De plus, la formation d'un sous-produit a été observée. La réaction est donc peu favorable. D'autres solvants comme le dioxolane ont également été testés. Les oligomères ne sont pas solubles dans ce solvant et sont en suspension dans un mélange de dioxolane et de chlorure d'acyle. Après une extraction liquide/liquide (eau/acétate d'éthyle), l'acide carboxylique correspondant est récupéré dans la phase organique et les oligomères dans la phase aqueuse : la réaction en suspension n'a pas fonctionné.

IV.1. 2) Avec le TOFA

Dans un premier temps, le TOFA seul a été mélangé avec les oligomères mais aucune réaction ne s'est produite. En effet, l'acide carboxylique est très peu réactif vis-à-vis des amines libres encombrées et nécessite d'être activé. L'ester de TOFA, obtenu par reflux de ce dernier dans le méthanol, a ensuite été testé comme réactif. De la même façon, aucune réaction ne s'est produite malgré la plus haute réactivité de l'ester par rapport à l'acide. De ce fait, le chlorure de TOFA a été synthétisé par réaction du SOCl_2 sur le TOFA sous conditions inertes. En effet, comme vu précédemment, les chlorures d'acyle sont suffisamment réactifs pour réagir avec les amines des oligomères de chitosane. La formation du réactif a été confirmée par RMN ^1H avec l'apparition du signal α' en alpha du carbonyl, plus déblindé dans le cas d'un chlorure d'acyle. Une conversion de 62% a été atteinte en utilisant 1,2 eq de SOCl_2 .

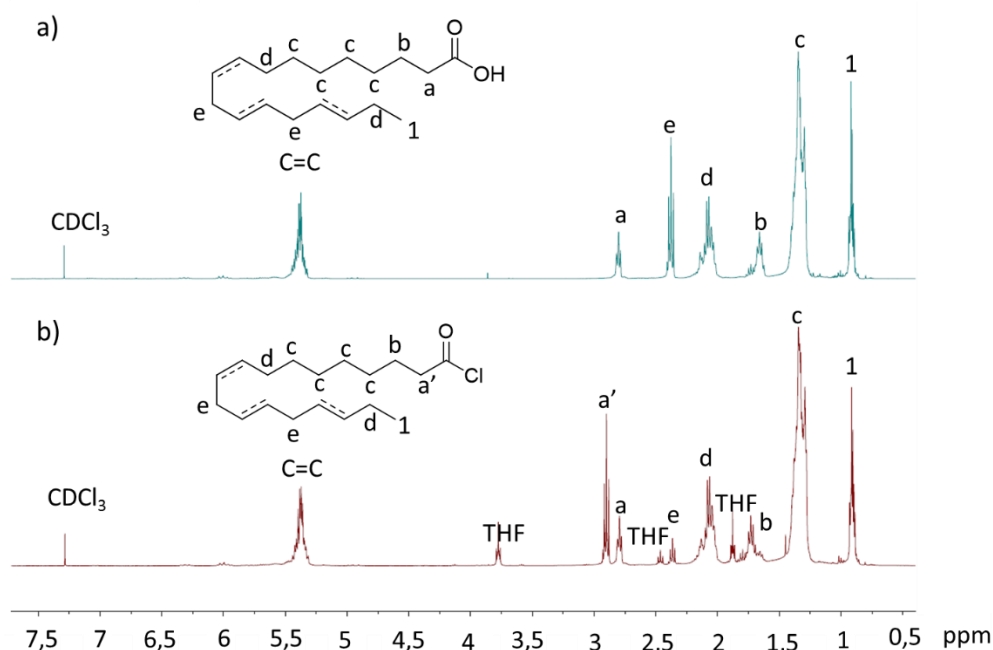


Figure 34. RMN ^1H dans CDCl_3 du a) TOFA b) TOFA-Cl

Le chlorure de TOFA a ensuite été ajouté à des oligomères de DP10 dans du DMSO. Des oligomères greffés ont ainsi été obtenus (Figure 34) avec des DS faibles, au maximum 5%. Ceci s'explique par la faible affinité entre le chitosane et le mélange d'acides gras mais également par la gêne stérique occasionnée par les imines intramoléculaires. De plus, le chlorure de TOFA est sensible à l'eau, qui est inévitablement présente dans les oligomères et dans le DMSO. Ceci peut donc expliquer pourquoi les DS obtenus sont assez faibles.

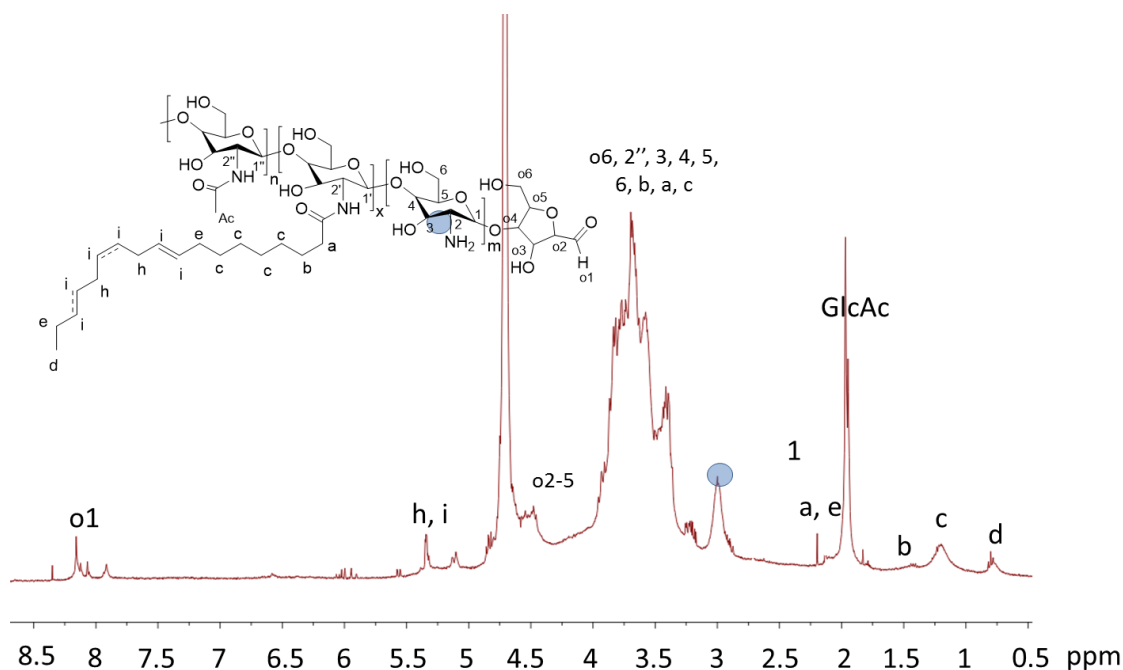


Figure 35. RMN ^1H d'oligomères de DP10 greffés avec le TOFA

L'activation du TOFA par SOCl_2 a permis de le greffer sur des oligomères de chitosane. La conversion complète du TOFA en chlorure d'acyle pourrait être envisagée en utilisant un excès de réactif (62% de conversion avec 1.2 eq de SOCl_2). Cependant, cette méthode met en jeu l'utilisation de SOCl_2 qui est toxique et dangereux. De plus, le chlorure d'acyle est sensible à l'eau présente dans le solvant ainsi que les oligomères. Cette méthode ne sera donc pas retenue pour la suite du projet.

IV.2. Couplage époxy-amine

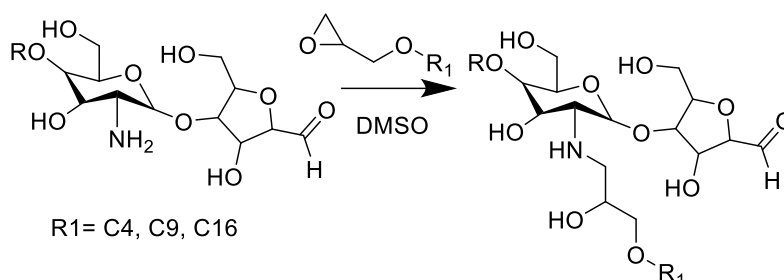


Schéma 22. Addition d'époxydes gras (C4, C9 ou C16) sur des COS-AMF

Dans un premier temps, des oligomères de DP10 ont été fonctionnalisés par trois époxydes différents, C4, C9, C16 dans du DMSO (Schéma 22). En effet, à la fois les oligomères et les époxydes utilisés sont solubles dans ce solvant. Les produits, obtenus par précipitation dans l'acétone, ont été caractérisés par spectroscopie RMN ^1H dans le D_2O pour confirmer la fonctionnalisation et calculer les DS. Le greffage a été confirmé pour les trois époxydes avec l'apparition des signaux correspondant à la chaîne alkyle. Les époxydes gras seuls ne sont pas solubles dans l'eau, donc les signaux correspondent bien à un oligomère greffé. De plus, les signaux correspondant au proton en alpha de l'amine libre diminuent, ce qui signifie que les amines libres sont consommées par la réaction d'ouverture de cycle. Pour calculer le DS des amines libres, les signaux à 0,92 ppm correspondant au CH_3 terminal des chaînes alkyles sont comparés au total de l'amine:

$$(11) \quad \text{DS} = \frac{\frac{1}{3}A1}{\frac{1}{3}A1 + \text{ANH2}}$$

Il a été montré que le DS croît avec le nombre d'équivalents utilisés, ce phénomène étant plus marquant pour l'époxyde C4 (Tableau 5). De plus, le fait de réaliser deux ajouts espacés d'une heure (2x3 contre 6) permet d'augmenter le DS. Cependant, malgré un nombre d'équivalents important, de faibles DS ont été obtenus. En effet, un maximum de 29% a été atteint en utilisant 6 équivalents de C4. Or dans la littérature, des époxydes

semblables ont été greffés avec des DS bien plus importants comme par exemple Illy et al.¹⁰¹ qui ont greffé l'allyl glycidyl éther (AGE) à 33% avec seulement 2,2 eq d'AGE.

Longueur de la chaîne grasse	Nombre d'équivalents	DS (%)
C ₄	1	15
	3	19
	6	21
	2x3	29
C ₉	1	11
	2	12
C ₁₆	1	7
	3	10

Tableau 5. DS obtenus lors du greffage d'époxydes C₄, C₉, C₁₆ sur des oligomères de DP10 dans le DMSO

L'utilisation du DMSO comme solvant pose ici le problème de l'analyse des résidus. En effet, les produits sont précipités dans l'acétone et il est impossible d'analyser le filtrat dans lequel se retrouve le DMSO. Il n'est donc pas possible de savoir si dans ce même filtrat il y a des oligomères de haut DS ou un mélange de chaînes grasses résiduelles et d'oligomères bruts. C'est pourquoi, un test rapide a été effectué en réalisant la réaction dans un mélange eau/méthanol (50/50). Il a ainsi été montré par RMN ¹H que le greffage était possible dans ce mélange de solvant. Par la suite, une optimisation des conditions de réaction a été effectuée (pH) afin d'obtenir des DS maximaux (p 162).

Conclusions de l'étude préliminaire

Cette étude préliminaire a permis de montrer que des chlorures d'acides gras, notamment à base de TOFA, ainsi que des époxydes plus ou moins gras peuvent être greffés sur les oligomères obtenus par désamination nitreuse. Cependant, dans le cas des chlorures d'acyles, de faibles DS sont obtenus et les réactifs sont instables. Cette réaction sera donc abandonnée par la suite.

Les réactions impliquant les époxydes ont quant à elles montré des limites de fonctionnalisation plus faibles comparativement à la littérature. Ces résultats ont induit plusieurs questions:

- ❖ Les conditions réactionnelles sont-elles optimales, notamment sur le choix du solvant ?
- ❖ La formation d'imine intramoléculaire lors de la dépolymérisation est-elle un frein à la fonctionnalisation ?

En effet, comme évoqué précédemment, il a été montré que la désamination nitreuse mène à la formation d'imines intramoléculaires pouvant créer de la gêne stérique supplémentaire par la formation de branchements générant de l'HMF en milieu acide. Ces branchements impliquent également le blocage de fonctions amines de l'oligochitosane. Afin de répondre à cette question, une étude a été menée en s'appuyant sur de précédents travaux trouvés dans la littérature. Bezrodnykh et al.¹³⁶ ont en effet étudié la réduction des extrémités de chaînes AMF en utilisant un agent réducteur comme NaBH_4 ou NaBH_3CN . Ils ont également fait réagir l'hydroxylamine NH_2OH sur l'aldéhyde de fin de chaîne pour former des oximes. En conclusion de leurs travaux, ils ont montré que NaBH_4 permet de réduire les aldéhydes libres et de fin de chaîne en alcool. Cependant, ce réducteur fort implique également la réduction des imines intramoléculaires, générant une augmentation de la masse molaire. Le NaBH_3CN quant à lui, ne fait que réduire les imines. Enfin, le NH_2OH réagit avec les aldéhydes pour former une oxime tout en jouant sur la réversibilité des d'imines. En effet, les imines intramoléculaires sont réversibles, comme cela a été montré dans le chapitre précédent, leur formation peut par exemple être influencée par le pH. L'hydroxylamine étant plus réactive que les amines des oligomères, la réaction est donc favorisée. Néanmoins, ils n'ont pas étudié ces réactions sur la molécule AMF ni fourni de données spectrales RMN. De plus, aucune quantification de l'aldéhyde résiduel n'a été proposée. En outre, ils ont travaillé sur des oligomères de chitosane de $\text{DP} > 20$ obtenus par précipitation en milieu basique. C'est pourquoi dans la suite de notre travail, une étude modèle a été menée sur l'AMF, et les réactions de réduction et de formation d'oximes ont

été reproduites sur des oligomères de DP10 et DP5 qui sont d'autant plus susceptibles de former des imines lors de la lyophilisation, procédé utilisé dans ces travaux. En effet, cette réaction est favorisée par l'élimination d'eau. La réduction des aldéhydes et la formation d'oxime ont été suivies par spectroscopie UV-visible et RMN ^1H . NaBH_3CN n'a pas été utilisé car il permet uniquement de réduire les imines, ce que nous essayons d'éviter.

Par la suite, les oligomères obtenus ont été fonctionnalisés avec les mêmes époxydes gras que dans l'étude préliminaire ainsi qu'avec le cardanol époxydé. Cette étude approfondie a donné lieu à une publication dans le journal **Biomacromolecules** **2021, 22, 846–854**, présentée dans la partie suivante.

Functionalization of chitosan oligomers: from aliphatic epoxide to cardanol grafted oligomers for oil in water emulsions

Camille Chapelle¹, Ghislain David^{1*}, Sylvain Caillol¹, Claire Negrell¹, Graziella Durand², Myriam Desroches le Foll²

¹ICGM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

²CST COLAS 4, Rue Jean Mermoz CS 30504 – 78771 Magny-les-Hameaux Cedex

KEYWORDS: Oligochitosan, amphiphilic structures, oil in water emulsions

I. Abstract

Hydrophobically modified chitooligosaccharides (COS) were tested for suitability as an emulsifier in cationic bituminous emulsions. COS of polymerization degree (DP) 5, 10, 15 and 20 were obtained by nitrous acid deamination. A complete study on depolymerization and precise product and side product characterization was led upstream. Chemical modification of COS was performed to reach amphiphilic structures using three fatty epoxide with growing chain length (Butyl (C4), octadecyl (C9) and hexadecyl glycidyl ether (C16)). The grafting efficiency according to reaction conditions were established. Different substitution degrees (DS) were obtained by modulating the ratio of fatty epoxy/NH₂. It was shown that after a certain DS, the oligomers thus formed were not water-soluble anymore. At the end, cardanol glycidyl ether was grafted on DP 5, 10 and 15 COS, cardanol being a biobased compound extracted from cashew nut shell, this reaction led to a potentially fully biobased structure. Water-soluble candidates with higher DS were used as surfactant to emulsify motor oil as a simulation of bitumen. Cardanol-chitosan based surfactant led to direct oil in water emulsion (60/40 w/w) formed of particles of 15 µm average that were stable at least for 24 h.

II. Introduction

Bitumen emulsions are composed of an oily phase composed of bitumen (40 to 80% (w/w)) and an aqueous phase (20 to 60% (w/w)) that contains a surfactant (between 0.1 and 2.5% (w/w))^{145 146}. The bitumen is sheared through a colloid mill and bitumen

droplets of 1 to 20 μm are dispersed in the aqueous phase. Nowadays, bitumen emulsions are mainly cationic, meaning that they are stabilized by a cationic surfactant like fatty amines, fatty amidoamines, fatty imidazolines and fatty quaternary ammonium salts which are often toxic ¹⁴⁷.

Chitosan is a positively charged polysaccharide with a potential use in several areas, including applications in cosmetics, biotechnology and medicine ^{4 148}. It is a natural nontoxic source of potentially cationic free amines for which emulsifying properties have already been investigated ¹⁴⁹. In some cases, chitosan can be used for Pickering emulsions ^{150 151 152}. Interestingly, it was shown that crude chitosan might be used to partially substitute industrial surfactants (up to 60% replacement) for bitumen emulsions ¹⁵³. Those chitosan surfactant are high molecular weight polysaccharides that induce high viscosity when concentrated which make them difficult to modify chemically to reach efficient amphiphilic structures. When reducing the molecular weight of this hydrophilic polymer, chitooligosaccharides (COS) can be obtained. COS are easier to functionalized ¹⁵ to reach amphiphilic structure able to self-assemble. Generally, COS are modified with fatty acids and used to form micelles for drug delivery ^{65 59} but they could find application in other area such as direct oil in water emulsion.

Several ways to obtain chitosan oligomers are reported in literature ^{25 26 27}. Among them, the action of nitrous acid ^{44 45} was shown to be applicable and reproducible on any kind of crude chitosan leading to low molecular weights oligomers ⁴⁶. Though, it leads to formation of 2,5-anhydromannose (AMF) chain ends which are electrophilic and undergo intramolecular imines formation. This side reaction was underlined in a previous paper ⁴⁶. In this work, it was shown that imines represent 23% of the amines for DP10 COS. As described before ¹³⁶, it is possible either to reduce or to react the aldehyde chain-end to avoid this side reaction. Nevertheless, this reaction was never investigated directly on AMF and no quantification or deep characterization were provided. In this work, we first focus on the oligomer synthesis and try to deeper describe both reactions that can avoid imine formation. The previous work was completed providing a model study on AMF, NMR characterizations and quantifying the remaining aldehyde groups.

There is a growing interest in functionalization of COS in order to broaden their applications ^{59 101 82}. Thus, COS are easily functionalizable due to the presence of free primary amines on the sugar units. Thanks to their shorter hydrophilic chain, their functionalization with fatty moieties, one of the most common reaction described, can lead to amphiphilic structures ^{53 154}. Nevertheless, the grafting of fatty epoxide with different chain length studied in this work was never described before. Cardanol is a natural fatty oil

coming from cashew nutshell. COS modified with epoxidized cardanol seems to be a novel opportunity to synthesize fully biobased amphiphilic moieties from waste recovery.

Hydrophobically modified COS appear to be a potential new biobased emulsifier for bitumen emulsions. The objective of the present study was to reach amphiphilic COS and evaluate their potential use in bitumen emulsion stabilization through a model study involving motor oil.

III. Material and methods

III.1. Material

Chitosan DA around 15% CH30 (Mw 30 kg/mol) was purchased from Glentham Science and used as received; butyl glycidyl ether (C4), octyl/decyl glycidyl ether (C9), hexadecyl glycidyl ether (C16), triethylamine (Et3N), hydroxylamine hydrochloride (NH2OH), sodium borohydride (NaBH4), acetic acid (AcOH), sodium acetate (NaAc), sodium nitrite (NaNO2), lithium bromide (LiBr), sodium azide (NaN3), trimethylsilyl-3-propionic-2,2,3,3-D4 acid sodium salt, sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), and acetone (>98%) were purchased from Sigma and used without purification; Methanol (MeOH) and HPLC water (>99%) was purchased from VWR, engine oil Cirkan C was purchased from Total.

III.2. AMF and AMF oxime synthesis

The AMF molecule was synthesized according to the previous protocol ⁴⁶. Briefly, 1 g of glucosamine was dissolved in deionized water (20 mL) for 4h. One eq of NaNO2 were added in 10 mL of distilled water to the solution. The reaction was carried out for 3 h. AMF was then reduced to alcohol by adding NaBH4 (1 eq) or transformed into an oxime by adding NH2OH (1 eq). Samples were taken after 30 min, 1 h, 2 h, 3 h and analyzed by UV. At the end of the reaction, the products were freeze-dried and characterized by 1H NMR and SEC.

¹H NMR of AMF (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.50 (s, 1H, H1), 5.10 (d, 5.0 Hz, 1H, H1' gemdiol), 4.20 (t, 6.0 Hz, 1H, H2), 4.10 (t, 6.0 Hz, 1H, H5), 4.00 (m, 1H, H5), 3.90 (m, 1H, H3), 3.80 (m, 1H, H4 and 2H, H6);

¹H NMR of AMF + NaBH₄ (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.50 (s, 1H, H1), 4.20 (t 6.0 Hz, 1H, H2), 4.00 (m, 1H, H5), 3.85 (m, 1H, H3), 3.80 (m, 1H, H5), 3.70-3.80 (m, 2H, H1' (after reduction), 1H H4 and 2H, H6)

¹H NMR of AMF-oxime (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.20 (s, 1H, H1), 7.60 (d, 8Hz, 1H H1 (E)-oxime), 7.00 (d, 7.0 Hz, 1H H1 (Z)-oxime), 5.10 (d, 5Hz, 1H,

H1' gemdiol), 4.35 (t 4.0 Hz, 1H, H2''), 4.25 (m, 1H, H2), 4.10 (m, 1H, H5), 4.00 (m, 1H, H3), 3.70 (m, 1H, H4 and 2H, H6)

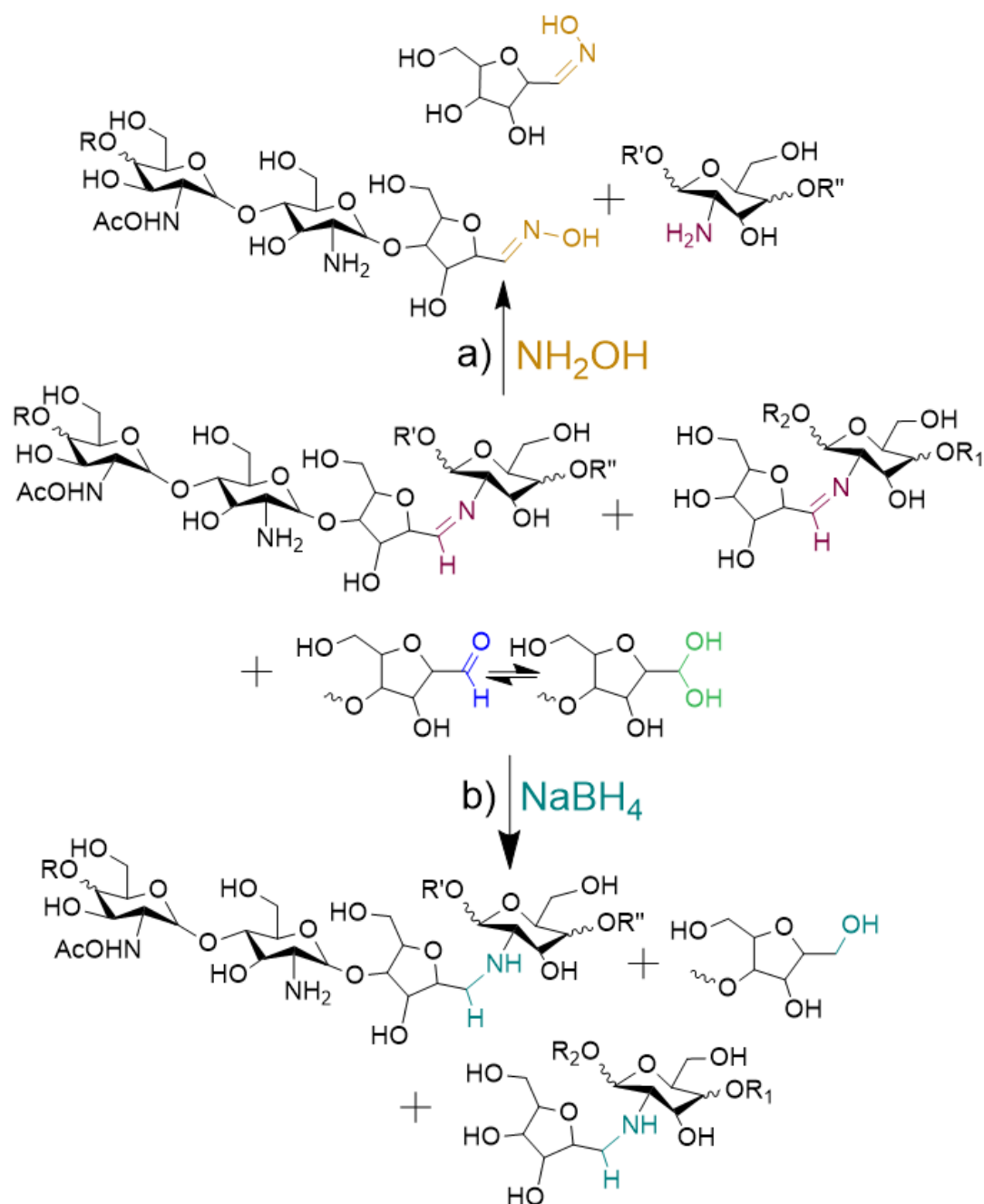
III.3. COS and COS oxime synthesis

The method was adapted to chitosan as described before ¹⁵⁵. Briefly, 1 g of chitosan was dissolved in a solution of acetic acid (350 μ L in 90 mL of distilled water) overnight. The next day, 0.4 eq (to obtain a DP10) and 0.8 eq (to obtain a DP5) of NaNO₂ were added in 10 mL of distilled water to the solution. The reaction was carried out for 3 h at 50 ° C. At the end of the reaction, the pH was raised to 8 by adding a concentrated solution of NaOH and 0.4 eq (0.8 eq respectively) of NaBH₄ in the case of reduction or of NH₂OH in the case of formation of oximes were added to the solution. Samples were taken after 30 min, 1 h, 2 h, 3 h and analyzed by UV. At the end of the reaction, the oligomers were obtained by freeze-drying and characterized by ¹H NMR, 2D COSY NMR, FTIR and SEC.

¹H NMR of DP10 (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.20-8.50 (s, H aldehydes), 8.00- 7.10 (m, H imines), 5.01 (d, 5 Hz, 1H, H1' gemdiol), 4.50 (m, 1H, H2-AMF), 4.32 (m, 1H, H3-AMF), 4.10 (m, 1H, H5-AMF), 3.20-4.00 (m, 1H H2 acetyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 1H, H4-AMF and 2H, H6-AMF), 2.50 (m, 1H, H2), 2.00 (s, 3H, HCH₃), 4.80 (s, HOD)

¹H NMR of DP10+NaBH₄ (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.20-8.50 (s, H aldehydes), 4.50 (m, 1H H2-AMF), 4.30 (m, 1H, H3-AMF), 4.11 (m, 1H, H5-AMF), 4.00 (m, 1H, H4 2H, H6) 3.20-4.00 (m, 1H H2 acetyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 1H, H4-AMF and 2H, H6-AMF), 2.50 (m, 1H, H2), 2.00 (s, 3H, HCH₃), 4.80 (s, HOD)

¹H NMR of DP10-oxime (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.20-8.50 (s, H aldehydes), 7.56 (d, 8Hz, 1H, Ho1 (E)), 7.00 (d, 7.0 Hz, 1H, Ho1 (Z)), 5.00 (d, 5.0 Hz, 1H Ho2 (Z)), 4.60 (m, 1H, Ho5), 4.48 (t, 4.0 Hz, 1H, Ho2 (E)), 4.39 (m, 1H, H2-AMF), 4.22 (m, 1H, Ho3), 3.20- 4.00 (m, 1H H2 acetyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 3.00 (m, 1H, H2), 2.00 (s, 3H, HCH₃), 4.80 (s, HOD)



Scheme 23. Reaction of a) NH_2OH to obtain COS-oxime b) NaBH_4 for reduction of the aldehyde chain end of COS

III.4. Functionalization of chitosan oligomers

The depolymerization of high molecular weight chitosans was performed by nitrous deamination involving NaNO_2 as previously described ⁴⁴. Briefly, 1 g (w/w) of chitosan was dissolved in 80 mL of AcOH (350 μL in 90 mL of deionized water) solution overnight (pH 4.5). Once solubilized, a freshly prepared solution (10 mL) containing the desired equivalent ratio of $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ (0.1, 0.2, 0.4, 0.8) was added to the solution. The solution was stirred at 50°C for 3 h. After cooling down, NH_2OH (respectively with the amount of NaNO_2) was added and the solution was stirred for another 24h. The final product was freeze-dried for 24h and oligomers of DP 20, 15, 10, 5 were collected.

1g of DP20 oligomers were solubilized in 20 mL deionized water with 1 eq AcOH/ NH_2 . 1 g of DP15 oligomers were solubilized in 20mL deionized water. 1 g of DP10 and DP5 were solubilized in 10 mL deionized water and Et_3N was added to reach pH 7. 20 mL of MeOH were added to each solution. To this oligomer solution, butylglycidyl ether (C4), octyl/decyl glycidyl ether (C9) or hexadecyl glycidyl ether (C16) in 10 mL MeOH was added with various amounts. The solution was stirred for 24 h at 80°C. The products were precipitated in 400 mL of cold acetone, washed with acetone and centrifuged to be collected. Finally, the product was dried under vacuum for 6 h to get rid of residual solvent. The integrals provided are those expected for 100% functionalization.

^1H NMR of DP10 + C4 (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.20-8.50 (s, H aldehydes), 7.56 (d, 8Hz, 1H, Ho1 (E)), 7.00 (d, 7.0 Hz, 1H, Ho1 (Z)), 5.00 (d, 5.0 Hz, 1H Ho2 (Z)), 4.65 (m, 1H, Hb), 4.60 (m, 1H, Ho5), 4.48 (t, 4.0 Hz, 1H, Ho2 (E)), 4.39 (m, 1H, H2-AMF), 4.22 (m, 1H, Ho3), 3.20- 4.00 (m, 1H H2' acetyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 2H Hg; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 2.95 (m, 2H, Hc), 2.75 (m, 2H, Ha), 2.55 (m, 1H, H2), 2.00 (s, 3H, HCH_3), 1.40 (t, 2H, Hf), 1.18 (m, 2H, He), 0.74 (t, 3H, Hd), 4.80 (s, HOD)

^1H NMR of DP10 + C9 (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.20-8.50 (s, H aldehydes), 7.56 (d, 8Hz, 1H, Ho1 (E)), 7.00 (d, 7.0 Hz, 1H, Ho1 (Z)), 5.00 (d, 5.0 Hz, 1H Ho2 (Z)), 4.65 (m, 1H, Hb), 4.60 (m, 1H, Ho5), 4.48 (t, 4.0 Hz, 1H, Ho2 (E)), 4.39 (m, 1H, H2-AMF), 4.22 (m, 1H, Ho3), 3.20- 4.00 (m, 1H H2' acetyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 2H Hg; 2H, Ha; 2H, Hc; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 2.55 (m, 1H, H2), 2.00 (s, 3H, HCH_3), 1.57 (m, 2H, Hf), 1.28 (m, 14H, He), 0.85 (m, 3H, Hd), 4.80 (s, HOD)

^1H NMR of DP10 + C16 (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH 5.5): 8.20-8.50 (s, H aldehydes), 7.56 (d, 8Hz, 1H, Ho1 (E)), 7.00 (d, 7.0 Hz, 1H, Ho1 (Z)), 5.00 (d, 5.0 Hz, 1H Ho2 (Z)), 4.65 (m, 1H, Hb), 4.60 (m, 1H, Ho5), 4.48 (t, 4.0 Hz, 1H, Ho2 (E)), 4.39 (m, 1H, H2-AMF), 4.22 (m, 1H, Ho3), 3.20- 4.00 (m, 1H H2' acetyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 2H Hg; 2H,

Ha; 2H, Hc; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 2.55 (m, 1H, H2), 2.00 (s, 3H, HCH₃), 1.57 (m, 4H, Hf), 1.27 (m, 14H, He), 0.87 (m, 3H, Hd), 4.80 (s, HOD)

1 g of oligomer DP5, DP10 or DP15 were solubilized in 20 mL of DMSO at 80°C. Cardanol glycidyl ether in 10 mL of DMSO was added in different amount. The solution was stirred for 24 h at 80°C. The products were precipitated in 400 mL of cold acetone, washed with acetone and centrifuged to be collected. Finally, the product was dried under vacuum for 6 h to get rid of residual solvent.

¹H NMR of DP10 + Cardanol glycidyl ether (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5): 8.20-8.50 (s, H aldehydes), 7.56 (d, 8Hz, 1H, Ho1 (E)), 7.00 (d, 7.0 Hz, 1H, Ho1 (Z)), 6.35-6.95 (m, 4H, H_{aromatic}) 5.1 (m, 6H, Hh), 5.00 (d, 5.0 Hz, 1H Ho2 (Z)), 4.60 (m, 1H, Ho5), 4.48 (t, 4.0 Hz, 1H, Ho2 (E)), 4.39 (m, 1H, H2-AMF), 4.22 (m, 1H, Ho3), 3.20-4.00 (m, 1H H2' acetyl, 1H, H3; 1H, H4; 1H, H5; 2H, H6; 2H Hg; 2H, Ha; 2H, Hc; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 2.55 (m, 1H, H2), 2.00 (s, 3H, HCH₃), 1.87 (m, 6H Hi; 2H, Hg), 1.34 (m, 2H, Hf), 1.15 (s, 10H, He), 0.69 (s, 3H, Hd), 4.80 (s, HOD)

III.5. Oil in water emulsions with modified COS

Motor oil was used to simulate bitumen. Motor oil having the same viscosity at 40°C than bitumen at 150°C. Oil in water emulsions were produced as followed: COS cardanol (0.2% (w/w) of the total emulsion) was dissolved in 0.2% HCl (w/w of the total emulsion)) aqueous solution (40% (w/w) of the total emulsion). Both oil and water were heated at 40°C. Oil was added to the aqueous phase (60/40 (w/w)) and blended for 5 min with an ultraturax at 9000 rpm.

III.6. Characterizations

¹H NMR analyses were performed using a Bruker Avance 400 MHz NMR spectrometer at 298 K. NMR samples were prepared by dissolving 15 mg of product in 0.5 mL of D₂O with trimethylsilyl-3-propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt as internal reference (δ 0.00 ppm). The chemical shifts were reported in part per million relative to tetramethylsilane. Spin multiplicity is shown by s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quadruplet and m=multiple. Substitution degrees (DS) of oligo chitosans were determined by ¹H NMR. IR spectra were recorded on Nicolet 6700 Fourier Transform Infra-Red spectrometer. Molar masses were recorded using size exclusion chromatography (SEC) with RI detection (PL aquagel-OH 30 8 μ m 100-60.000 g/mol, PL aquagel-OH 40 8 μ m 10.000-200.000 g/mol, TSK gel G Oligo PW 7 μ m 7.8 mm ID $\times$ 30 cm 0-6000 g/mol) calibrated using PEO/PEG standards. 10 mg/mL solutions of oligochitosans were prepared in acetate buffer (1.5% AcOH, 0.8% NaAc, 1 ppm NaN₃, 5 ppm LiBr). The pH (correction for isotopic effect: pD=pH+0.4) were measured by use of a Mettler Toledo pH electrode. UV analyses were

carried out using a Beckman DU 640 spectrophotometer. For this, 100 μL of reaction medium were taken and diluted in 900 μL of distilled water and analyzed under UV between 200 and 400 nm. Size distribution of emulsions were measured by optical microscope on a Leica microsystem equipped with a 50x objective. 200 droplets were measured using the Leica software.

IV. Result and discussion

IV.1. Synthesis of chitosan oligomer-oximes

Regarding the reduction of the aldehyde chain end, reduction and reaction with hydroxylamine was already described beforehand on 5 and 10 kg.mol^{-1} COS¹³⁶. Nonetheless, no information whereas provided on lower molecular weight COS (DP5 to DP20). In addition, we thought it was important to complete this work by first doing a model study on AMF in order to better understand both reactions (Scheme 23) and quantify all the species involved. Products were therefore characterized by ^1H NMR (Figure 37), UV and size exclusion chromatography. When reduced with NaBH_4 , the percentage of residual aldehyde was quantified by ^1H NMR by using the ratio between the aldehyde signal and the signals corresponding to the five other protons present on AMF. It was also noted that the signal corresponding to the gem-diol form no longer appears in the reduced version of AMF (Figure 37 1) b)). Thus, 18% of aldehyde was not reduced using one equivalent of NaBH_4 . The shift between aldehyde peaks is due to the pH differences, in particular due to the presence of residual salts. Regarding the use of hydroxylamine, ^1H NMR spectroscopy confirmed the formation of oximes with the appearance of signals at 7.5 and 7 ppm (Figure 37 1) c)). The two signals correspond to the (E) and (Z) form of the oxime, respectively (Figure 36). Signals of each isomer in water were attributed by analogy with other oximes and oxime ethers described in the literature.^{156 157 158 140}

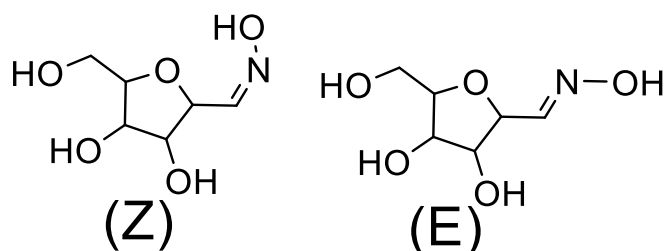


Figure 36. *Z* and *E* isomers of AMF-oxime

The proton of the (E) isomer is the most de-shielded as described several times in the literature^{156, 159} (Figure 37 1.c)). Form (E) is therefore the most abundant (75%). Moreover, the coupling constants measured are in agreement with the literature since $J_{\text{trans}} (8 \text{ Hz}) > J_{\text{cis}} (7 \text{ Hz})$.

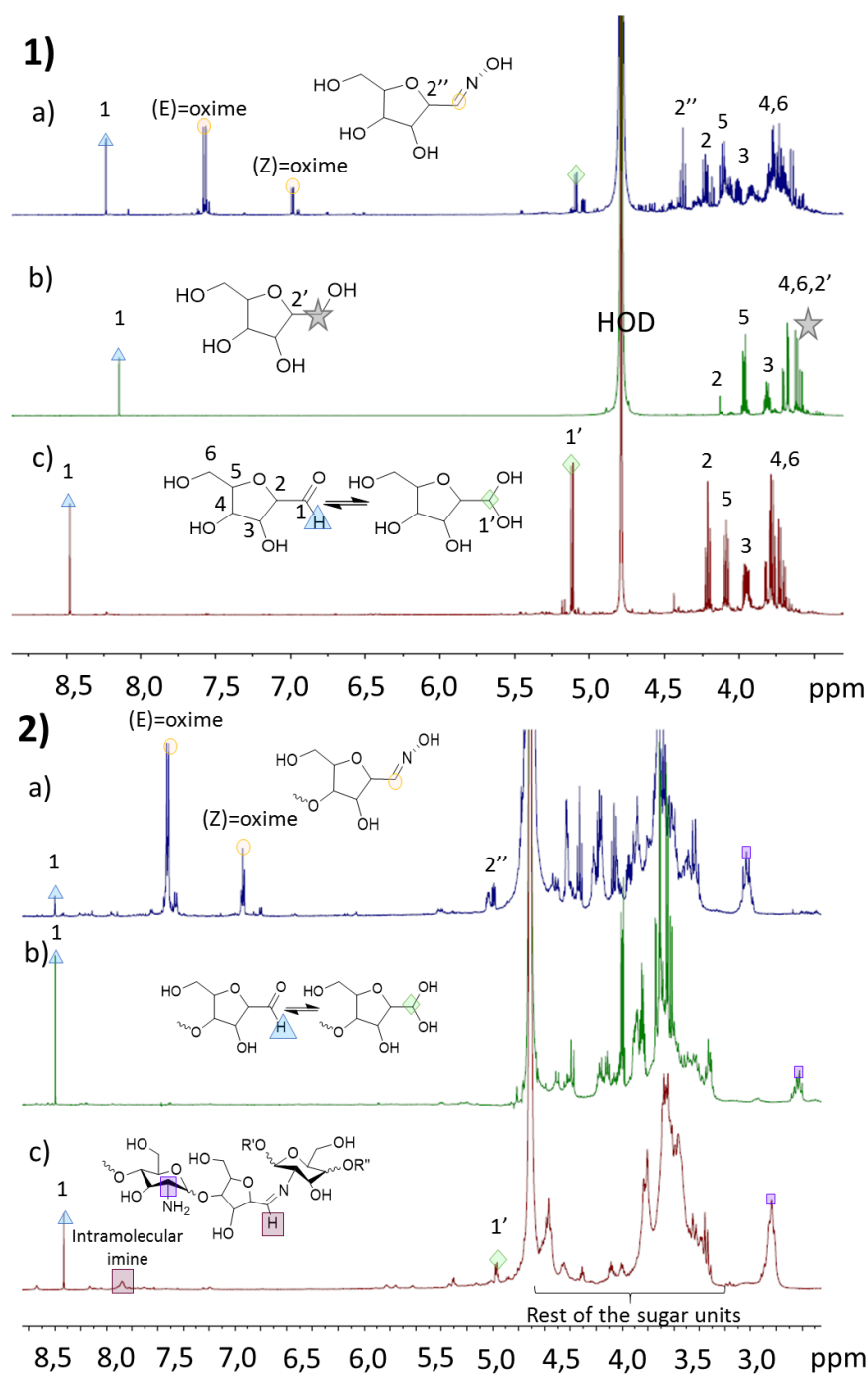


Figure 37. ^1H NMR spectra in D_2O of 1) AMF a) oxime formation b) NaBH_4 reduction c) crude oligomer and 2) COS DP5 with a) oxime formation b) NaBH_4 reduction c) crude oligomer

These two reactions were then transposed to DP5 and DP10 oligomers. First, the reactions were monitored by UV by observing the signal at 270 nm corresponding to both imines and aldehydes formed during the depolymerization. It was shown that the signal intensity decreased over time when NaBH_4 and NH_2OH were respectively added. The UV spectra in Figure 38 represent the difference between the signals of the oligomers of DP5

and DP10 before and after 3 h reactions with NaBH_4 or NH_2OH respectively. In both cases, a large decrease in absorbance is visible after 3 hours and no further evolution was observed after this time. Nevertheless, there is still a signal corresponding to the residual aldehydes. We noticed a more important decrease when using hydroxylamine.

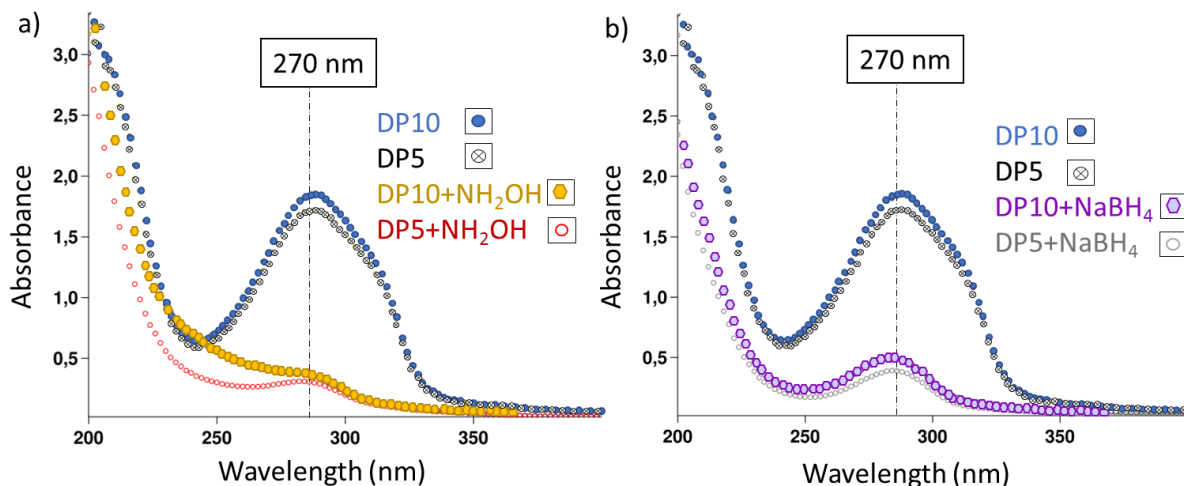


Figure 38. UV spectra of a) DP5 and DP10 before and after action of NH_2OH b) DP5 and DP10 before and after action of NaBH_4

Both reactions were confirmed by ^1H NMR (Figure 37 2)). When reduced with NaBH_4 , a disappearance of the signal corresponding to the gem-diol form (5 ppm) and a decrease in the aldehyde signal is visible from COSY. At the end, 80% of the aldehydes/gem-diol were reduced to alcohol. There are no more intramolecular imines in the medium since they were modified by the action of the reducing agent. The use of NH_2OH also avoided intramolecular imines formation. In general, heteroatoms directly linked to another heteroatom exhibit increased nucleophilicity compared to systems in which the heteroatom is replaced by a carbon. This observation can be explained by examining the most occupied molecular orbital (HOMO) of the nucleophile. Overall, the higher is the energy of a nucleophile's HOMO orbital, the higher is the reactivity. The presence of heteroatom raises the energy of the HOMO orbital and therefore makes it more nucleophilic. This phenomenon is known as the α effect¹⁶⁰. Therefore, hydroxylamine, with a nitrogen atom directly bonded to an oxygen atom, is much more nucleophilic than the amines of COSY. Thus, the reaction between AMF and NH_2OH is favored over the formation of intramolecular imines. The reaction is indeed based on the imines reversibility. Therefore, the addition of hydroxylamine resulted in the formation of oligomers with oximes at their chain end (Scheme 23). Similarly to AMF alone, the signals corresponding to the two isomers (Z) and (E) of the oxime (7.0 and 7.5 ppm respectively) are present. However, closely to AMF, the reaction was not complete and 10% of aldehyde and gem-diol

remained unreacted. Finally, the imine signal between 7.1 and 8 ppm has completely disappeared, which implied the regeneration of 20% additional free amines and less steric hindrance in the oligomer chain. This phenomena implies better potential for further functionalization of COS. In both cases, the presence of residual aldehyde / gem-diol was proven, for the first time in the literature.

The molar masses of the oligomers were measured before and after the action of NaBH_4 or NH_2OH respectively (Table 6). As in the work of Bezrodnykh et al,¹³⁶ it has been proven that NaBH_4 reduced imines thus creating irreversible branched structures and increasing molar masses, by 30% for DP5 and 10% for DP10. On the contrary, the use of NH_2OH prevented the formation of imines. Besides, hydroxylamine being a small molecule, its addition to oligomers did not imply any variation in molar mass.

Oligomer	MN CRUDE (G/MOL)	MN WITH NaBH_4 (G/MOL)	MN OXIME (G/MOL)
DP5	1,000 ± 35	1,300 ± 30	1,000 ± 40
DP10	1,600 ± 55	1,750 ± 50	1,600 ± 60

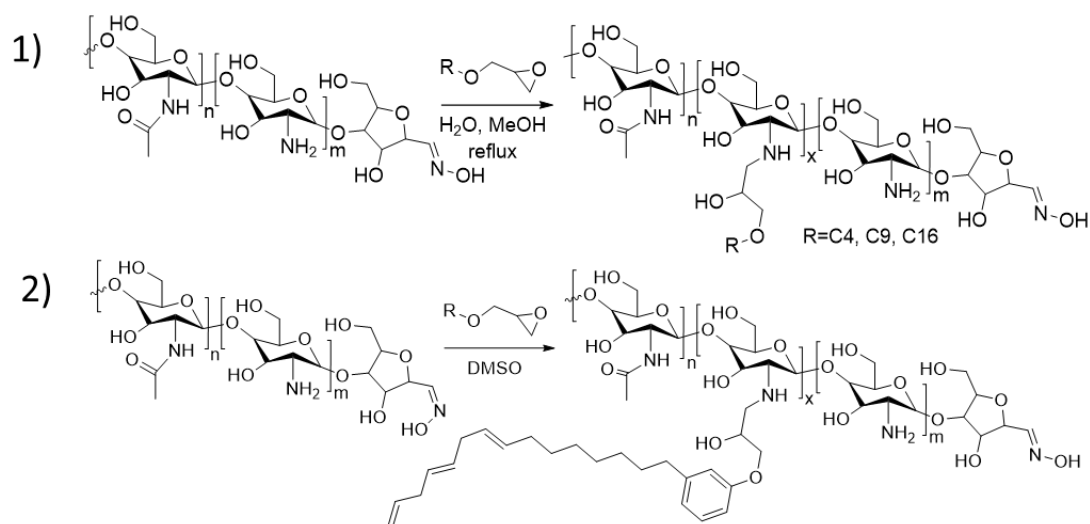
Table 6. Molar masses in PEO equivalent according to the type of reaction and DP of the oligomer.

Two methods for preventing the formation of intramolecular imines were deeply investigated in this section. The first one was the reduction of aldehydes chain end by the action of NaBH_4 . This method was effective since 80% of the aldehydes were reduced. However, in this case, the intramolecular imines were also reduced, thus forming irreversible branched structures confirmed by an increase in molar masses. The second method involved the use of NH_2OH , which reacted with the aldehydes to form oximes. The formation of two isomers (Z) and (E) was confirmed and shown by ^1H NMR, the (E) isomer being the most abundant. Thanks to 2D COSY NMR, signals were fully identified and attributed (Annexe 18). This second method allowed the regeneration of 20% of the amines previously involved in the formation of imines without increasing molar mass. Therefore it seemed that the method involving hydroxylamine is more suitable for the functionalization of oligomers.

For the rest of the study, chitosan was depolymerized by the action of NaNO_2 and then hydroxylamine was added in order to obtain oxime-terminated oligomers that do not contain intramolecular imines and are therefore ready to be functionalized.

IV.2. Functionalization of COS-oximes with aliphatic epoxide

Oxime ended DP5, DP10, DP15 and DP20 COS were functionalized with three different fatty epoxies (C4, C9 and C16) according to the reaction given in Scheme 24. At first, reactions were carried out at pH 5.5 which was the pH recorded when solubilizing oligomers in deionized water. For DP5 and DP10 reaction can be performed at higher pH as the pH range solubility is wider for smaller oligomers. This is why the reaction was led at pH 7 and it was shown that the DS obtained were higher than that at pH 5.5 (around 20% higher). Indeed, at pH 5.5 primary amines are partially cationic whereas at pH 7, they are more nucleophilic which makes them more suitable to epoxide ring opening. For DP15, the reaction was led at pH 5.5 and for DP20 acetic acid was added in order to solubilize the oligomers resulting in a pH 4.5.



Scheme 24. Reaction of 1) fatty epoxides and 2) cardanol onto chitosan oligomers

The obtained products were characterized by ^1H NMR spectroscopy to confirm functionalization and calculate the DS (Figure 39). Signals were attributed thanks to 2D COSY NMR (Annexe 19Annexe 20Annexe 21Annexe 22). The grafting efficiency was confirmed for the three epoxy with the appearance of the signals corresponding to the alkyl chain. Fatty epoxy are not water soluble so the signals correspond to a graft oligomer. In addition, signals intensity corresponding to the proton in alpha of the free amine decreased meaning that free amines were consumed for ring opening. To calculate the DS of free amines, the signals d between 0.80 and 0.95 ppm corresponding to the terminal CH_3 of alkyl chains were compared to total intensity of the amine:

$$(12) \quad \text{DS} = \frac{\frac{1}{3}Ad}{\frac{1}{3}Ad + \text{ANH}_2}$$

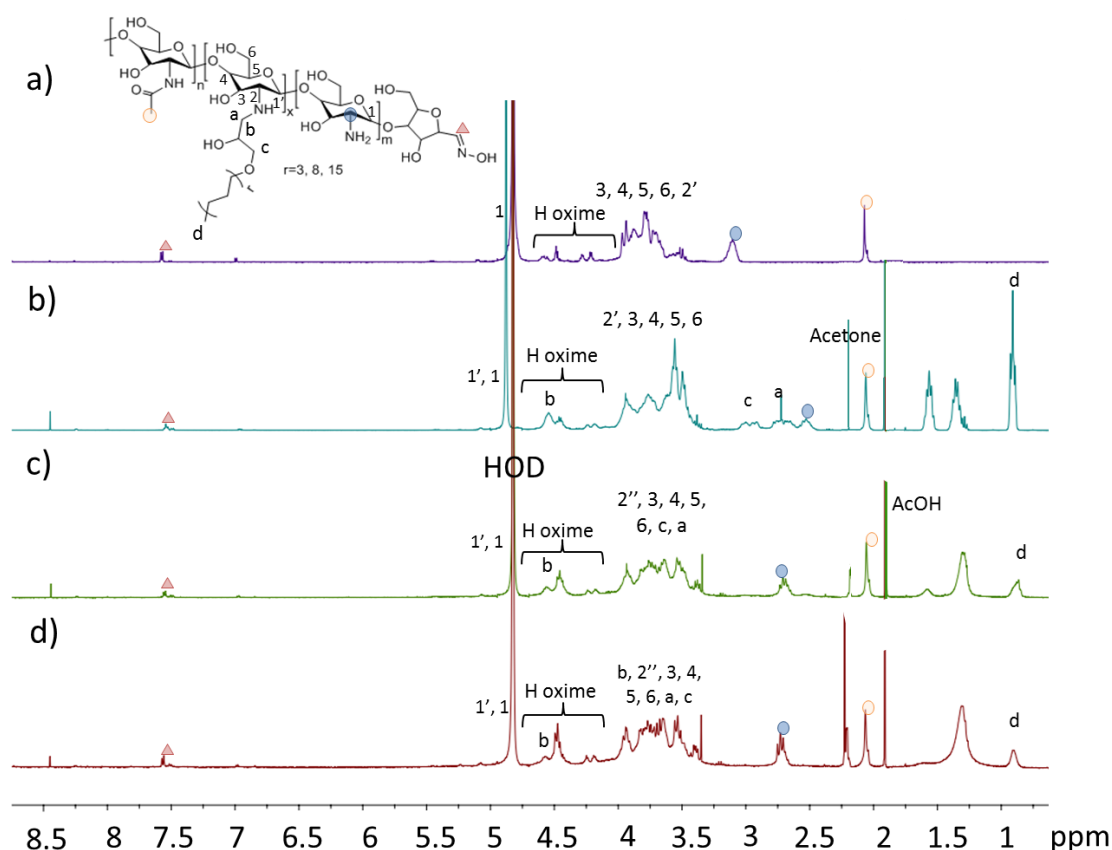


Figure 39. a) ^1H NMR spectrum of DP10 oligochitosan in D_2O b) ^1H NMR spectrum of DP10 oligochitosan modified with C4, DS 90% in D_2O c) ^1H NMR spectrum of DP10 oligochitosan modified with C9, DS 20% in D_2O d) ^1H NMR spectrum of DP10 oligochitosan modified with C16, DS 15% in D_2O

The epoxy/amine ratio was varied in order to reach the maximum DS. A wide DS range was thus obtained according to DPs and epoxides, by varying the equivalent number of fatty chains (Figure 40). Up to 100% DS were reached for C4 epoxy for DP5, 90% for DP10 and 80% for DP15. Those results were quite interesting and higher DS were obtained compared to similar grafting found in the literature. For example Illy et al.¹⁰¹ grafted allyl glycidyl ether (AGE, C3) on COS ($>2,000 \text{ g.mol}^{-1}$) for further thiol-ene reaction on the allyl double bond. The reaction was carried out in water at pH 8 as AGE is water-soluble and a DS of 33% was obtained with 2.2 eq of AGE. Mei et al.¹⁰² described the grafting of epichlorohydrin on very low molecular weight COS i.e. 550 g.mol^{-1} , by epoxy amine reaction with 55% DS. Another classical reaction on chitosan is the grafting of the glycidyltrimethylammonium chloride¹⁰³.

Nevertheless, the previous work described the grafting of short epoxide and no example of longer chain such as C9 and C16 were found in the literature. It was shown that the longer are the fatty chains, the lower is the DS obtained, whatever the molar

masses of the oligomers. For example, for a DP5, the maximum DS obtained with epoxy C4 is 100% while it is 25% for epoxy C16. Nevertheless, C16 epoxides were successfully grafted on the four different oligomers with relatively correct DS for fatty moieties. In comparison, grafting of fatty acids with such chain length can be found in the literature with a lot of working conditions such as temperature, time and solvent described ^{61 58 68}. DS obtained in this work are therefore included in the value range of DS obtained with fatty acids of C10 to C18. Similarly to fatty acid grafting ^{61 58 68}, it was shown that the higher is the DP, the lower is the DS. In addition, in some cases a limit of water solubility was reached. Indeed, the oligomers were functionalized and no longer soluble in water regardless of the pH, but only in DMSO, so it was impossible to determine their DS. For example, for a DP10 with 0.8 eq of C16, the products were no longer completely water-soluble. Thus, the maximum DS obtained is 15% with 0.5 eq of C16. In the case of DP15, the results were quite satisfactory for the C4 and C9 epoxides with maximum DS of 85 and 37% respectively. For C16 epoxide, the DS were lower which can be explained by lack of solubility for both oligomers and epoxy in the hydro-alcoholic mixture. In addition, the working pH being 5.5 due to the non-solubility of DP15 at higher pH, the amines of the oligomers were less reactive as some were under NH_3^+ form. Nevertheless, oligomers with 11% DS which represent more than one grafting per oligomer chain were obtained. Finally, with DP20, lower DS were obtained regardless to the size of the epoxide due to its greater steric hindrance and lower affinity with fatty chains. In addition, the amine were less nucleophilic due to the acidic environment.

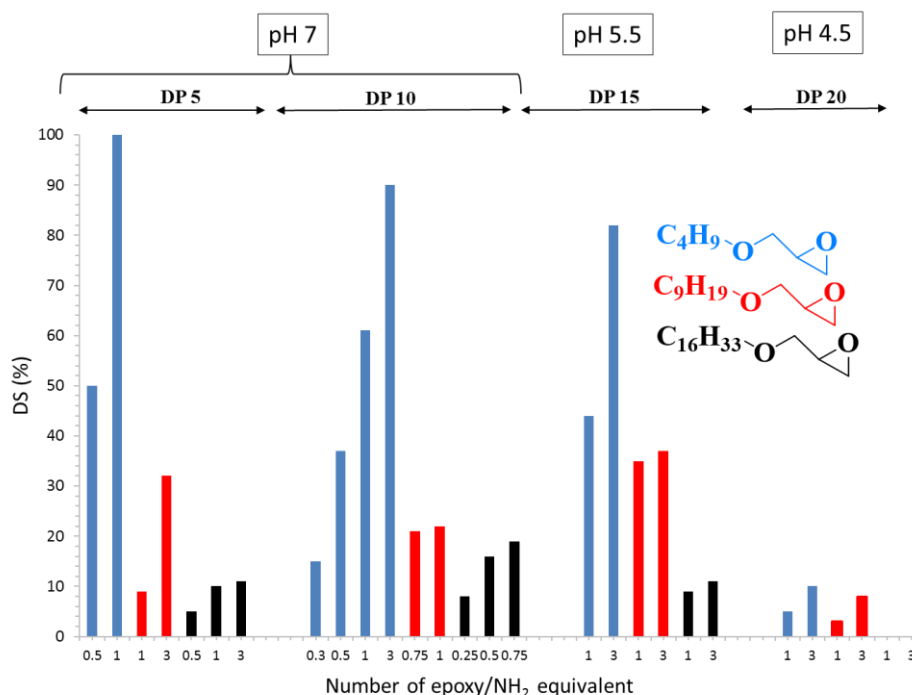


Figure 40. Evolution of DS according to number of equivalents of C4, C9 and C16/NH₂ for DP5, DP10, DP15 and DP20

At the end of the reaction, the filtrate (mixture of acetone, water and methanol) was evaporated in order to analyze the non-precipitated residues. A soluble viscous mixture was obtained. The ¹H NMR analysis in D₂O shows the presence of unfunctionalized oligomers and residual free AMF. However, the product is not completely soluble in water. The ¹H NMR analysis in DMSO, in which the product is completely soluble, shows a mixture of oligomers and epoxides but it is not possible to differentiate functionalized oligomers from unreacted epoxides. Based on the previous results, it was assumed that both unreacted epoxides and oligomers with a DS above the water solubility limit are present in this fraction.

Through this study, it was shown that several parameters govern the chemical modification of COS with fatty epoxide, which are comparable to fatty acid addition previously described. Indeed, the longer is the fatty chain, the lower is the grafting efficiency. In addition, solubility limits were reached at relatively low DS with longer chains. Going further, DP20 will be abandoned due to poor DS.

IV.3. Functionalization of COS-oximes with cardanol

Subsequently, the epoxide amine reaction was transposed to epoxidized cardanol (Scheme 24 2)). Cardanol is a natural phenol, a commercial co-product of the non-edible oil obtained from the cashew nut shell. Cardanol is interestingly composed of an aromatic ring and an attached fatty carbon chain which can be saturated (2%), monounsaturated

(34%), bi-unsaturated (22%) and tri-unsaturated (41%). Epoxidized cardanol can be directly obtained by epoxidation reaction of cardanol and is commercially available.

Initially, the reaction onto oligomers of DP10 was carried out in an H₂O / MeOH mixture in the presence of Et₃N (similar conditions to the aliphatic study). Epoxidized cardanol is viscous and sparingly soluble in this mixture. Thus, after precipitation in acetone, only crude oligomers were obtained. Unreacted cardanol which was not grafted onto the COS was recovered in the filtrate. The reaction was therefore carried out in DMSO where both cardanol and COS were soluble. COS grafting efficiency onto DP5, DP10 and DP15 was confirmed by ¹H NMR (Annexe 23). The DS were calculated using the CH₃ 1 signal which represents 59% of the cardanol chain (Annexe 24).

COS of DP5, DP10 and DP15 were grafted with cardanol with maximum DS of 12, 8 and 2% respectively. Literally, this represent 40%, 60% and 20% respectively of COS oligomer chain bearing one cardanol chain, the rest of the polymer representing unmodified COS. As for aliphatic epoxides, it was shown that the larger is the DP, the lower is the DS (see SI 7). In addition, a plateau was reached very quickly even when increasing the number of equivalents. Although cardanol is a much longer epoxy compound compared to epoxides C4, C9 and C16, and the aromatic ring generates both hydrophobicity and steric hindrance, maximum DS were comparable with C16 DS for DP5 and DP10, which were 12 and 21% respectively. Nonetheless the higher is the DP, the lower are the solubility and sweliability in DMSO. Thus, DP15 showed poor solubility in DMSO, which explains DS maximum of 2%. Besides, the longer is the oligomeric chain, the higher is the steric hindrance. Finally, as shown beforehand, the maximum DS was limited by the solubility of the final product.

IV.4. Oil in water emulsion

To evaluate the suitability of the newly synthesized surfactant in bitumen emulsion, a model engine oil was used. DP15, DP10 and DP5 grafted with C4, C9, C16 and cardanol with maximum DS were used to emulsify the motor oil. 60/40 (w/w) oil in water emulsions were made using 0.2% (w/w) of total emulsion of amphiphilic COS, pH was adjusted to 2 by addition of HCl (0.2% (w/w) of total emulsion) to obtain cationic surfactants.

	C4			C9			C16			Cardanol		
	Emulsion type	Size (μm)	Stability (h)	Emulsion type	Size (μm)	Stability (h)	Emulsion type	Size (μm)	Stability (h)	Emulsion type	Size (μm)	Stability (h)
DP5	No	N/A	N/A	Direct	5-20	<1	Direct	N/A	<0.1	Direct	N/A	<0.1
DP10	No	N/A	N/A	Direct	5-20	24	Direct	5-20	12	Direct	5-20	24-48
DP15	No	N/A	N/A	Direct	N/A	<0.01	No	N/A	N/A	No	N/A	N/A

Table 7. Type, size of the droplets and stability of emulsions made with DP5 DP10 and DP15 functionalized with C4, C9, C16 and cardanol with maximum DS

At the end, direct emulsions were obtained for both DP10 and DP5 functionalized with C9, C16 and cardanol and DP15 functionalized with C9 (Table 7). Indeed, the obtained emulsions were able to disperse in water. Oligomer functionalized with C4 epoxide could not emulsify oil. This confirmed that the C4 chain was too short to provide sufficient amphiphilic properties to COS despite maximum DS of 90 and 100% reached for DP5 and DP10 respectively. DP15 surfactant were not able to give stable emulsions. Indeed, direct emulsion was only obtained with COS modified with C9 but destabilized immediately. In the same way, emulsions obtained with DP5 were not stable, less than 5 min for Cardanol and C16. This might be explained by the number of active species in the mixture. Indeed, DP5 cardanol were grafted with 12% DS which represent only 40% of oligomers bearing one cardanol chain. It means that 60% of the product is not suitable for stabilization of oil droplets in water. DP5 modified with C9 gave direct emulsions but they were only stable 1 h, which is not enough for the application.

In the case of DP10, direct oil in water emulsions were obtained for C9, C16 and cardanol. In addition, emulsions were diluted and observed under a microscope to determine the size of the droplets (example in Figure 41 b) with DP10 cardanol). At the end, the size distribution was quite narrow for the three samples and droplets averages of 15 μm were obtained in accordance to expectation¹⁴⁶. DP10 C16 was stable less than 5 min despite 15% DS and DP10 C9 was stable for 1 h. The most stable emulsions appeared to be those stabilized with DP10-cardanol presented in Figure 41 with destabilization starting between 24 h and 48 h. In this case, a DS 8% represent 60% of oligomers grafted with one cardanol chain ((Figure 41 a)) and Annexe 25 for color code). Those results

showed that the efficiency of the surfactant depends on several factors: the size of the hydrophilic chain, the size of the hydrophobic chain and the DS.

Those were quite promising preliminary results. Indeed, it was the first time that COS modified with fatty epoxide and particularly with cardanol, potentially 100% biobased and biodegradable ¹⁶¹, was successfully synthesized and used as a surfactant for concentrated oil in water emulsion.

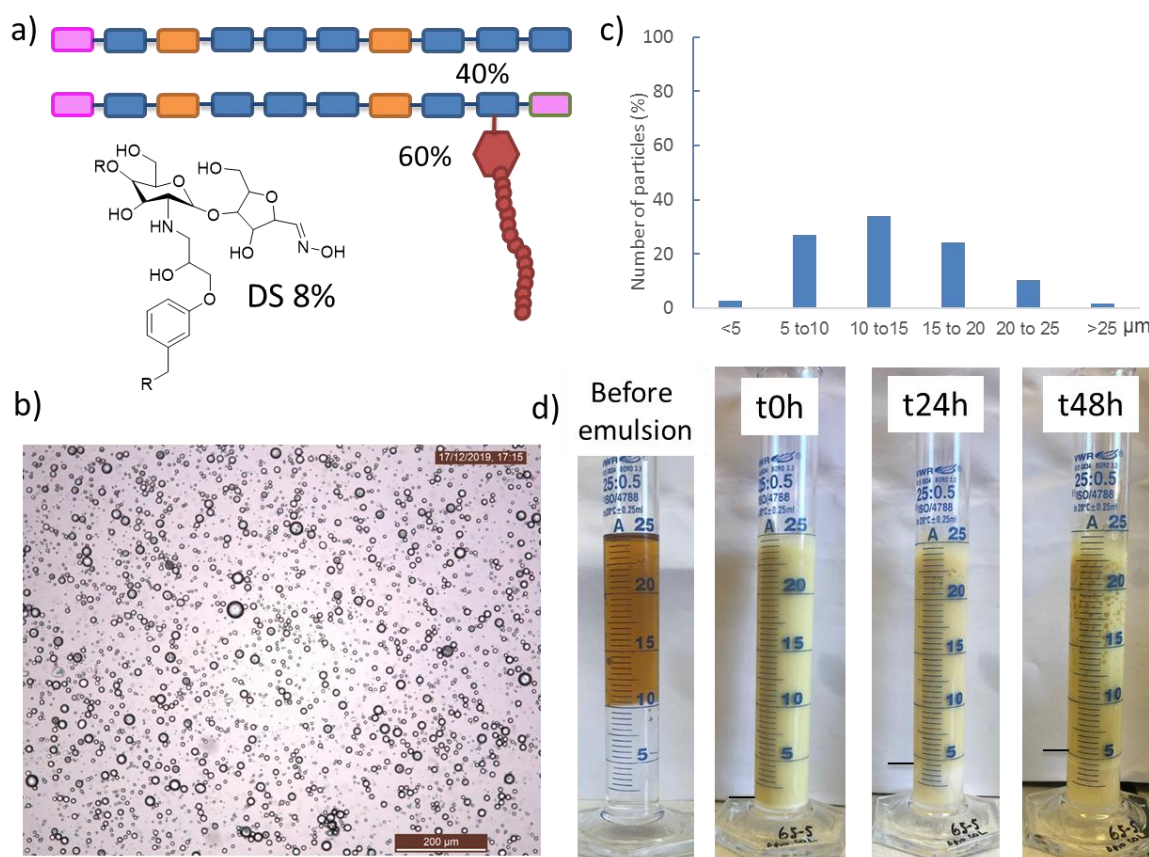


Figure 41. a) Simplified depiction of DP10-cardanol b) DP10-cardanol oil in water (60/40 (w/w)) emulsion under microscope at t=0.5 h c) Size distribution of droplets obtained by microscopic measurement from DP10-cardanol oil in water (60/40 (w/w)) emulsion d) Pictures of DP10-cardanol emulsion after 0, 24 and 48 h

V. Conclusion

In this study, new potential chitosan based surfactant for bitumen emulsions were introduced. At first, the controlled depolymerization of chitosan was investigated to reach the cationic head of the future surfactant suitable for further functionalization. Thus, the functionalization of COS-oxime by different fatty epoxide including epoxidized cardanol, a

reaction that as far as we know was never described in the literature before was investigated. Oligomer of DP5, DP10 and DP15 grafted with cardanol were obtained with maximum DS of 12, 8 and 2% respectively. It was shown that direct oil in water (60/40) emulsions stable for 24-48 h, with 15 μm medium size droplets can be obtained with DP10-Cardanol acting as a surfactant. In order to improve the stability of emulsions, the amount of surfactant could be increased to reach higher quantity of active species. Studies on pH influence might also be led.

This work showed a way to obtain potentially biobased and biodegradable COS amphiphilic structures that have been of great interest these last decades. Those products have proved their potential for cationic surfactant substitution in bitumen emulsions applications.

Supporting Information (voir Annexes chapitre 3)

^1H NMR spectrum of COS-cardanol, table of DS for COS cardanol and color-code for figure 7 were provided in supporting information.

Addition du TOFA

Comme expliqué dans le chapitre 1 (page 49), le TOFA est déjà utilisé par Colas en tant que partie lipophile de leurs tensioactifs. Il a pour avantage d'être biosourcé et peu coûteux. C'est pourquoi d'autres voies de synthèses incluant ce mélange d'acides carboxyliques ont été envisagées une fois le problème des imines intramoléculaires résolu.

Le couplage d'acide carboxylique sur le chitosane en utilisant des carbodiimides ou un mélange de carbodiimide et de succinimide (NHS) a déjà été décrit plusieurs fois dans la littérature (Table 4 p128). Bien souvent, l'EDC est utilisé car il est soluble dans l'eau. Dans notre cas, la réaction peut se faire dans le DMSO, ainsi le DCC, bien moins coûteux, peut être utilisé. Comme expliqué précédemment, l'utilisation de NHS permet de stabiliser le réactif et de donner de meilleurs taux de greffage. C'est pourquoi la réaction a été menée dans le DMSO, en activant au préalable le TOFA avec un mélange de DCC/NHS (Schéma 25 a)), puis en additionnant le réactif formé sur des oligomères de DP5, DP10 et DP15 terminés oximes (Schéma 25 b)).

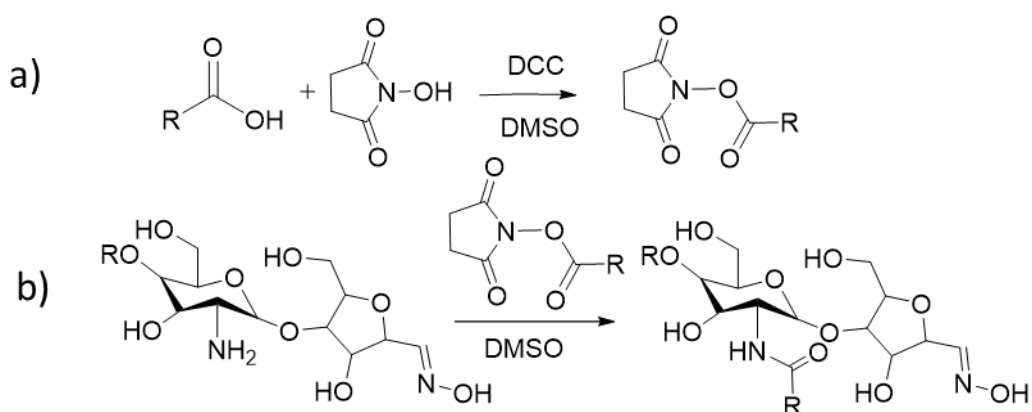


Schéma 25. a) Activation d'acide carboxylique par DCC/NHS b) Addition d'acide carboxylique activé sur des COS-oximes

Le greffage a été confirmé par RMN ^1H , de la même façon qu'avec le chlorure de TOFA, avec l'apparition du signal à 0,78 ppm correspondant au CH_3 terminal de l'acide carboxylique.

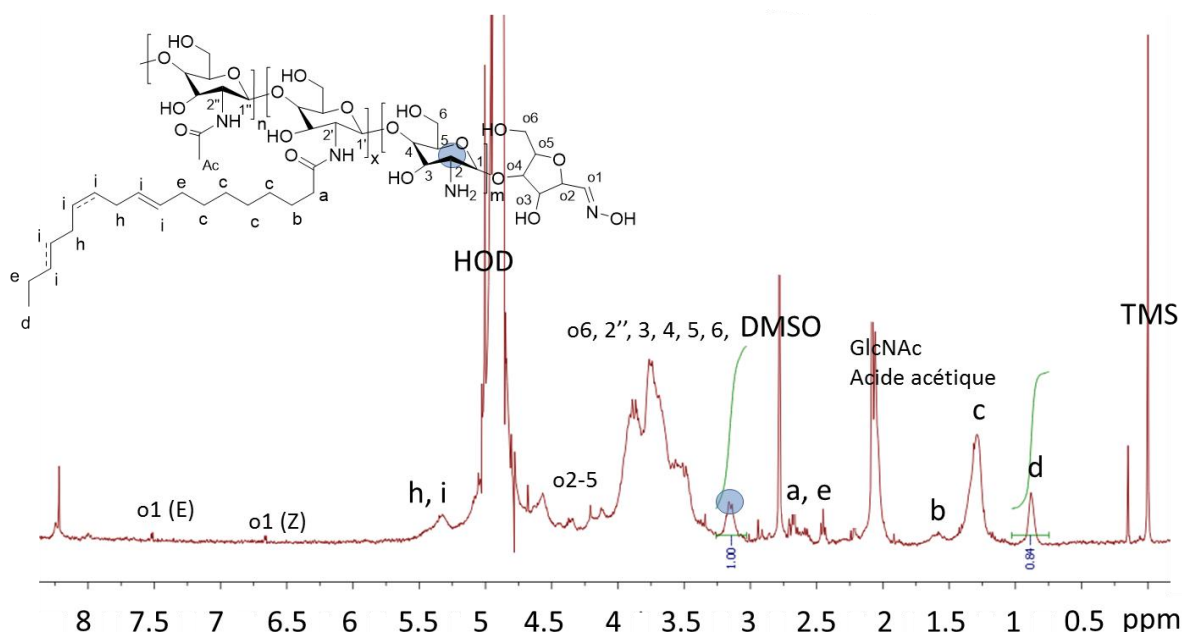


Figure 42. RMN ^1H d'oligomères de DP10 greffés avec du TOFA (DS 11%)

Lors de cette réaction, une limite de solubilité du COS greffé est vite atteinte à des DS inférieurs à 20%. Par exemple, pour les DP5 et DP10, entre 0,5 et 0,8 eq maximum de TOFA/ NH_2 peuvent être utilisés pour obtenir un produit 100% soluble dans l'eau. Dans le cas de DP15, un maximum de fonctionnalisation est atteint en utilisant 1 eq de TOFA/ NH_2 . En effet, de la même façon qu'avec le C16, l'augmentation du nombre d'équivalents n'a plus d'influence sur le DS final à partir d'un certain DP. Ainsi, les DS maximaux obtenus pour les DP5, DP10 et DP15 sont de 12, 15 et 4% respectivement.

La réaction impliquant l'utilisation des agents de couplage DCC/NHS a quant à elle permis d'obtenir des COS greffés avec du TOFA avec des rendements et des DS intéressants. Cette voie sera donc retenue dans la suite de l'étude.

Conclusions du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons étudié différentes voies de fonctionnalisation des oligomères de chitosane. Il a été montré que la voie utilisant des chlorures d'acyle n'est pas idéale. Les DS obtenus et les rendements sont faibles. De plus, elle met en jeu l'utilisation de SOCl_2 qui est un réactif dangereux. L'utilisation d'agent de couplage a donc été privilégiée pour éviter l'étape de transformation d'acide en chlorure notamment pour le TOFA. L'étude a été poursuivie sur des réactions époxy amine. L'influence des réactions intramoléculaires entre les aldéhydes de fins de chaînes et les amines libres des oligomères sur la fonctionnalisation de ces derniers a ainsi pu être démontrée. Une fois ces réactions secondaires mises en évidence, les conditions de réaction ont été étudiées afin d'obtenir les DS les plus importants. Il a ainsi été montré qu'une limite de solubilité des oligomères fonctionnalisés était atteinte à partir d'un certain DS. Des oligomères de DP5, DP10 et DP15 ont donc pu être fonctionnalisés par amidification avec le TOFA et couplage époxy-amine en utilisant différents époxydes. Pour la première fois dans la littérature, du cardanol époxydé a ainsi été greffé sur des COS.

Le tableau ci-dessous résume les DS maximaux obtenus pour chacune des chaînes grasses utilisées dans cette étude sur les DP les plus intéressants, i.e. DP5, DP10 et DP15, le DP20 ayant été abandonné du fait des trop faibles DS obtenus. Le tableau présente également le nombre de greffons par chaîne ainsi que le nombre d'amines libres ce qui permet de se rendre compte de la structure et du pourcentage d'espèces actives dans l'échantillon (voire structures utilisées p 13). Le nombre d'amines libres est également important puisqu'il est nécessaire d'en avoir au moins une pour les propriétés d'adhésivité recherchées dans l'application. Le nombre de chaînes grasses par oligomères (Ncg) est calculé en considérant le DA (16%) et une fin de chaîne oxime par oligomère.

$$(13) \quad \text{Ncg} = (\text{DP} - (\text{DP} \times \text{DA} + 1)) \times \text{DS}$$

Tensioactif	DS (%)	Nombre de chaînes grasses par oligomère	Nombre d'amines libres par oligomère
DP5C4	100	3	0
DP5C9	39	1	2
DP5C16	25	0.7	2.3
DP5Cardanol	12	0.3	2.7
DP5TOFA	12	0.3	2.7
DP10C4	90	6.8	0.7
DP10C9	45	3.3	4.2
DP10C16	12	0.9	6.6
DP10Cardanol	15	1.1	6.4
DP10TOFA	15	1.1	6.4
DP15C4	80	1	2
DP15C9	47	6	6
DP15C16	11	2.5	10

Tableau 8. Récapitulatif des DS maximum et du nombre de chaînes grasses et d'amines par oligomères en fonction de la nature des chaînes grasses et du DP des COS

D'après le tableau, on remarque que plus la chaîne grasse est longue et moins le nombre de greffons par oligomère est important. Par exemple, pour le DP15 C9, 6 chaînes grasses sont greffées contre seulement 2,5 pour le DP15 C16. De la même façon sur le DP5, seulement 1 chaîne C9 a pu être greffée contre moins d'une pour les C16, cardanol et TOFA. Ainsi, dans le cas des DP5 C16, DP5 cardanol et DP5 TOFA, un mélange entre des oligomères fonctionnalisés et des oligomères bruts est obtenu. Dans le cas des DP10, on remarque que le nombre de chaînes grasses greffées est d'au moins un et va jusqu'à 3,3 pour le C9 et 6,8 pour le C4.

Ce tableau met donc une fois encore en évidence la relation entre le DS maximum, la longueur de la chaîne hydrophobe et la taille de la tête hydrophile de nos tensioactifs. Par la suite il sera donc important de caractériser ces produits pour pouvoir établir des relations structures/propriétés et déterminer les meilleurs candidats pour l'application. Il faut noter que ce type de structure est « original » en comparaison des tensioactifs classiquement utilisés dans les émulsions de bitume. En effet, la tête hydrophile est importante et plusieurs chaînes hydrophobes peuvent y être greffées. Ainsi, pour bien comprendre nos systèmes et évaluer leurs capacités à émulsionner le bitume, les tensioactifs seront caractérisés de manière approfondie et « comparés » aux tensioactifs classiques de COLAS présentés au chapitre 1 (p 50).

Références bibliographiques

- (1) Ravi Kumar, M. N. V. A Review of Chitin and Chitosan Applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, 46 (1), 1–27. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9).
- (2) Hahn, T.; Zibek, S. Sewage Polluted Water Treatment via Chitosan: A Review. *Chitin-Chitosan - Myriad Funct. Sci. Technol.* **2018**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75395>.
- (3) C. Escudero-onate E. Martinez-Francés. A Review of Chitosan-Based Materials for the Removal of Organic Pollution from Water and Bioaugmentation. *Intech* **2012**, i (tourism), 13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>.
- (4) Aranaz, I.; Acosta, N.; Civera, C.; Elorza, B.; Mingo, J.; Castro, C.; Gandía, M. de los L.; Caballero, A. H. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *Polymers (Basel)*. **2018**, 10 (2), 213. <https://doi.org/10.3390/polym10020213>.
- (5) Moutinho¹, I.; , Inês da Costa Oliveira , Mariana Cristina Santos¹ , Mário Vasconcelos², A. I. P. Different Chitosan-Based Biomaterials and Their Biomedical Applications. *Ejmrct* **2019**, 1, 101. <https://doi.org/10.17303/ejmrc.2019.1.101>.
- (6) Akbar Ali, S. A. A Review on Chitosan and Its Nanocomposites in Drug Delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 109, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>.
- (7) Sahariah, P. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives : A Review of the Structure – Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, 18, 3846–3868. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01058>.
- (8) Kean, T.; Thanou, M. Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, 62 (1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>.
- (9) Brasselet, C.; Pierre, G.; Dubessay, P.; Dols-Lafargue, M.; Coulon, J.; Maupeu, J.; Vallet-Courbin, A.; de Baynast, H.; Doco, T.; Michaud, P.; Delattre, C. Modification of Chitosan for the Generation of Functional Derivatives. *Appl. Sci.* **2019**, 9 (7), 0–33. <https://doi.org/10.3390/app9071321>.
- (10) Argüelles-Monal, W. M.; Lizardi-Mendoza, J.; Fernández-Quiroz, D.; Recillas-Mota, M. T.; Montiel-Herrera, M. Chitosan Derivatives: Introducing New Functionalities with a Controlled Molecular Architecture for Innovative Materials. *Polymers (Basel)*. **2018**, 10 (3). <https://doi.org/10.3390/POLYM10030342>.
- (11) Bani-Jaber, A.; Hamdan, I.; Alkawareek, M. The Synthesis and Characterization of

- Fatty Acid Salts of Chitosan as Novel Matrices for Prolonged Intra-gastric Drug Delivery. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, 35 (7), 1159–1168. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0706-6>.
- (12) Li, H.; Zhang, Z.; Bao, X.; Xu, G.; Yao, P. Fatty Acid and Quaternary Ammonium Modified Chitosan Nanoparticles for Insulin Delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, 170 (May), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.063>.
 - (13) Shipovskaya, A. B.; Abramov, A. Y.; Pyshnograï, G. V.; Aziz, A. J. H. N. Rheological Properties of Aqueous Acid Solutions of Chitosan: Experiment and Calculations of the Viscometric Functions on the Basis of a Mesoscopic Model. *J. Eng. Phys. Thermophys.* **2016**, 89 (3), 642–651. <https://doi.org/10.1007/s10891-016-1422-8>.
 - (14) Chattopadhyay, D. P.; Inamdar, M. S. Aqueous Behaviour of Chitosan. *Int. J. Polym. Sci.* **2010**, <https://doi.org/10.1155/2010/939536>.
 - (15) Naveed, M.; Phil, L.; Sohail, M.; Hasnat, M.; Baig, M. M. F. A.; Ihsan, A. U.; Shumzaid, M.; Kakar, M. U.; Mehmood Khan, T.; Akabar, M. D.; Hussain, M. I.; Zhou, Q. G. Chitosan Oligosaccharide (COS): An Overview. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 129, 827–843. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192>.
 - (16) Yuan, X.; Zheng, J.; Jiao, S.; Cheng, G.; Feng, C.; Du, Y.; Liu, H. A Review on the Preparation of Chitosan Oligosaccharides and Application to Human Health, Animal Husbandry and Agricultural Production. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 220 (February), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.050>.
 - (17) Hamed, I.; Özogul, F.; Regenstein, J. M. Industrial Applications of Crustacean By-Products (Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides): A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, 48, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>.
 - (18) Qaroush, A. K.; Assaf, K. I.; Bardaweel, S. K.; Al-Khateeb, A.; Alsoubani, F.; Al-Ramahi, E.; Masri, M.; Brück, T.; Troll, C.; Rieger, B.; Eftaiha, A. F. Chemisorption of CO₂ by Chitosan Oligosaccharide/DMSO: Organic Carbamate-Carbonate Bond Formation. *Green Chem.* **2017**, 19 (18), 4305–4314. <https://doi.org/10.1039/c7gc01830d>.
 - (19) Marmouzi, I.; Ezzat, S. M.; Salama, M. M.; Merghany, R. M.; Attar, A. M.; El-Desoky, A. M.; Mohamed, S. O. Recent Updates in Pharmacological Properties of Chitooligosaccharides. *Biomed Res. Int.* **2019**, (19) <https://doi.org/10.1155/2019/4568039>.
 - (20) Tian, M.; Tan, H.; Li, H.; You, C. Molecular Weight Dependence of Structure and Properties of Chitosan Oligomers. *RSC Adv.* **2015**, 5 (85), 69445–69452.

<https://doi.org/10.1039/c5ra08358c>.

- (21) Ouyang, Q.; Zhao, S.; Li, S.; Song, C. Application of Chitosan, Chitooligosaccharide, and Their Derivatives in the Treatment of Alzheimer ' s Disease. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 322. <https://doi.org/10.3390/md15110322>.
- (22) Muanprasat, C.; Chatsudhipong, V. Chitosan Oligosaccharide: Biological Activities and Potential Therapeutic Applications. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *170*, 80–97. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.013>.
- (23) Phil, L.; Naveed, M.; Mohammad, I. S.; Bo, L.; Bin, D. Chitooligosaccharide: An Evaluation of Physicochemical and Biological Properties with the Proposition for Determination of Thermal Degradation Products. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *102* (November 2017), 438–451. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.108>.
- (24) Yang, Y.; Xing, R.; Liu, S.; Qin, Y.; Li, K.; Yu, H. Immunostimulatory Effects of Chitooligosaccharides on RAW 264 . 7 Mouse Macrophages via Regulation of the MAPK and PI3K / Akt Signaling Pathways. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 36. <https://doi.org/10.3390/md17010036>.
- (25) Jeon, Y. J.; Shahidi, F.; Kim, S. K. Preparation of Chitin and Chitosan Oligomers and Their Applications in Physiological Functional Foods. *Food Rev. Int.* **2000**, *16* (2), 159–176. <https://doi.org/10.1081/FRI-100100286>.
- (26) Lodhi, G.; Kim, Y. S.; Hwang, J. W.; Kim, S. K.; Jeon, Y. J.; Je, J. Y.; Ahn, C. B.; Moon, S. H.; Jeon, B. T.; Park, P. J. Chitooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/654913>.
- (27) Liang, S.; Sun, Y.; Dai, X. A Review of the Preparation, Analysis and Biological Functions of Chitooligosaccharide. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (8), 2197. <https://doi.org/10.3390/ijms19082197>.
- (28) Jung, W. J.; Park, R. D. Bioproduction of Chitooligosaccharides: Present and Perspectives. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (11), 5328–5356. <https://doi.org/10.3390/md12115328>.
- (29) Poshina, D. N.; Raik, S. V.; Poshin, A. N.; Skorik, Y. A. Accessibility of Chitin and Chitosan in Enzymatic Hydrolysis: A Review. *Polym. Degrad. Stab.* **2018**, *156*, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.09.005>.
- (30) Vasilieva, T.; Sigarev, A.; Kosyakov, D.; Ul'yanovskii, N.; Anikeenko, E.; Chuhchin, D.; Ladesov, A.; Hein, A. M.; Miasnikov, V. Formation of Low Molecular Weight Oligomers from Chitin and Chitosan Stimulated by Plasma-Assisted Processes. *Carbohydr.*

- Polym.* **2017**, 163, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.026>.
- (31) García, M. A.; Pérez, L.; De La Paz, N.; González, J.; Rapado, M.; Casariego, A. Effect of Molecular Weight Reduction by Gamma Irradiation on Chitosan Film Properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, 55, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.009>.
- (32) Yuliana, A.; Pradeckta, L. S.; Savitri, E.; Handaratri, A. R. The Effect of Sonication on The Characteristic of Chitosan. *Proc. Int. Conf. Chem. Mater. Eng.* **2012**, MSD.14, 1–5. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy067>.
- (33) Mohammad R. Kasaai , Gerard Charlet , Paul Paquin, J. A. *. Fragmentation of Chitosan by Microfluidization Process. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2003**, 4, 403–413.
- (34) Jennifer M.K. Wakefield, Richard B. Gillis, Gary G. Adams, Caitlin M.A. McQueen, S. E. H. Controlled Depolymerization Assessed by Analytical Ultracentrifugation of Low Molecular Weight Chitosan for Use in Archaeological Conservation. *Eur. Biophys. J.* **2018**, 47, 769–775. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1290-6>.
- (35) Wasikiewicz, J. M.; Yeates, S. G. “Green” Molecular Weight Degradation of Chitosan Using Microwave Irradiation. *Polym. Degrad. Stab.* **2013**, 98 (4), 863–867. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.028>.
- (36) Ajavakom, A.; Supsvetson, S.; Somboot, A.; Sukwattanasinitt, M. Products from Microwave and Ultrasonic Wave Assisted Acid Hydrolysis of Chitin. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 90 (1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.064>.
- (37) RongXing SongLiu, HuahuaYu, ZhanyongGuo, PiboWang, CuipingLi, Z. L. and P. L. Salt-Assisted Acid Hydrolysis of Chitosan to Oligomers under Microwave Irradiation. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2150–2153. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.06.028>.
- (38) Hien, N. Q.; Phu, D. Van; Duy, N. N.; Lan, N. T. K. Degradation of Chitosan in Solution by Gamma Irradiation in the Presence of Hydrogen Peroxide. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87 (1), 935–938. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.018>.
- (39) Makuuchi, K. Critical Review of Radiation Processing of Hydrogel and Polysaccharide. *Radiat. Phys. Chem.* **2010**, 79 (3), 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.10.011>.
- (40) Berezin, B. B.; Bezrodnykh, E. A.; Blagodatskikh, I. V.; Yamskov, I. A.; Tikhonov, V. E. Extraction of Residual Heavy Metals from Commercial Chitosan and Approach to Preparation of Oligochitosan Hydrochloride. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 215 (January), 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.072>.

- (41) de Farias, B. S.; Grundmann, D. D. R.; Rizzi, F. Z.; Martins, N. S. S.; Sant'Anna Cadaval Junior, T. R.; de Almeida Pinto, L. A. Production of Low Molecular Weight Chitosan by Acid and Oxidative Pathways: Effect on Physicochemical Properties. *Food Res. Int.* **2019**, *123* (January), 88–94.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.051>.
- (42) Komarov, B. A.; Malkov, G. V.; Vasil'ev, S. G.; Baskakov, S. A.; Estrina, G. A.; Gur'eva, L. L.; Volkov, V. I.; Frolova, M. A.; Albulov, A. I. Oxidative Destruction of Chitosan and Its Stability. *Polym. Sci. - Ser. B* **2019**, *61* (2), 189–199.
<https://doi.org/10.1134/S1560090419020039>.
- (43) Feng Tian*, Yu Liu, Keao Hu, B. Z. Study of the Depolymerization Behavior of Chitosan by Hydrogen Peroxide. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *57*, 31–37.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.016>.
- (44) Tømmerraas, K.; Vårum, K. M.; Christensen, B. E.; Smidsrød, O. Preparation and Characterisation of Oligosaccharides Produced by Nitrous Acid Depolymerisation of Chitosans. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333* (2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00130-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00130-6).
- (45) Mao, S.; Shuai, X.; Unger, F.; Simon, M.; Bi, D.; Kissel, T. The Depolymerization of Chitosan: Effects on Physicochemical and Biological Properties. *Int. J. Pharm.* **2004**, *281* (1–2), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.019>.
- (46) Chapelle, C.; David, G.; Caillol, S.; Negrell, C.; Durand, G.; Desroches Le Foll, M.; Trombotto, S. Water-Soluble 2,5-Anhydro- d -Mannofuranose Chain End Chitosan Oligomers of a Very Low Molecular Weight: Synthesis and Characterization. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (12), 4353–4360.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01003>.
- (47) Nguyen, T. N.; Huynh, T. N. M.; Hoang, D. Q.; Nguyen, D. H.; Nguyen, Q. H.; Tran, T. H. Functional Nanostructured Oligochitosan-Silica/ Carboxymethyl Cellulose Hybrid Materials: Synthesis and Investigation of Their Antifungal Abilities. *Polymers (Basel)*. **2019**, *11* (4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym11040628>.
- (48) Yabo Fub, Haowei Heb, Ran Liuc, Lei Zhud, Yining Xiaa, J. Q. Preparation and Performance of a BTDA-Modified Polyurea Microcapsule for Encapsulating Avermectin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *183*, 110400.
- (49) Farion, I. A.; Burdukovskii, V. F.; Kholkhoev, B. C.; Timashev, P. S.; Chailakhyan, R. K. Functionalization of Chitosan with Carboxylic Acids and Derivatives of Them: Synthesis Issues and Prospects of Practical Use: A Review. *Express Polym. Lett.*

- 2018**, 12 (12), 1081–1105. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2018.95>.
- (50) Noh, S. M.; Han, S. E.; Shim, G.; Lee, K. E.; Kim, C. W.; Han, S. S.; Choi, Y.; Kim, Y. K.; Kim, W. K.; Oh, Y. K. Tocopheryl Oligochitosan-Based Self Assembling Oligomersomes for SiRNA Delivery. *Biomaterials* **2011**, 32 (3), 849–857. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.027>.
- (51) Termsarasab, U.; Cho, H. J.; Kim, D. H.; Chong, S.; Chung, S. J.; Shim, C. K.; Moon, H. T.; Kim, D. D. Chitosan Oligosaccharide-Arachidic Acid-Based Nanoparticles for Anti-Cancer Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2013**, 441 (1–2), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.018>.
- (52) Su, Y.; Zhao, Q.; Sun, J.; Wu, J. Synthesis and Characterization of Biodegradable Macroporous Cryogels Crosslinked by Chitosan Oligosaccharide-Graft-Acrylic Acid. *Soft Matter* **2012**, 8 (16), 4382–4389. <https://doi.org/10.1039/c2sm06821d>.
- (53) Xin, C.; Yao, X.; Du, B.; Yang, W.; Wang, L.; Ma, L.; Weng, W. Stearic Acid-Grafted Chitooligosaccharide Nanomicelle System with Biocleavable Gadolinium Chelates as a Multifunctional Agent for Tumor Imaging and Drug Delivery. *Pharm. Res.* **2019**, 36 (1), 10. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2530-2>.
- (54) Cho, Y. Il; Park, S.; Jeong, S. Y.; Yoo, H. S. In Vivo and in Vitro Anti-Cancer Activity of Thermo-Sensitive and Photo-Crosslinkable Doxorubicin Hydrogels Composed of Chitosan-Doxorubicin Conjugates. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, 73 (1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.04.010>.
- (55) Yin, X.; Feng, S.; Chi, Y.; Liu, J.; Sun, K.; Guo, C.; Wu, Z. Estrogen-Functionalized Liposomes Grafted with Glutathione-Responsive Sheddable Chitooligosaccharides for the Therapy of Osteosarcoma. *Drug Deliv.* **2018**, 25 (1), 900–908. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1458920>.
- (56) Xu, Y.; Wang, L.; Li, Y. K.; Wang, C. Q. Reduction and PH Dual-Responsive Nanoparticles Based Chitooligosaccharide-Based Graft Copolymer for Doxorubicin Delivery. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, 497, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.01.049>.
- (57) Fattahi, A.; Asgarshamsi, M.; Hasanzadeh, F.; Varshosaz, J.; Rostami, M.; Mirian, M.; Sadeghi-aliabadi, H. Methotrexate-Grafted-Oligochitosan Micelles as Drug Carriers: Synthesis and Biological Evaluations. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, 26 (2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5407-5>.
- (58) Liu, Y.; Huang, Y.; Boamah, P. O.; Cao, L.; Zhang, Q.; Lu, Z.; Li, H. Homogeneous Synthesis of Linoleic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide in Ionic Liquid and Its

- Self-Assembly Performance in Aqueous Solution. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132* (13), 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.41727>.
- (59) Du, Y. Z.; Wang, L.; Yuan, H.; Hu, F. Q. Linoleic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide Micelles for Intracellular Drug Delivery and Reverse Drug Resistance of Tumor Cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48* (1), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.11.005>.
- (60) Zhao, S.; Lee, J.; Xu, W. Supramolecular Hydrogels Formed from Biodegradable Ternary COS-g-PCL-b-MPEG Copolymer with α -Cyclodextrin and Their Drug Release. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (16), 2201–2208. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.017>.
- (61) Li, Q.; Du, Y. Z.; Yuan, H.; Zhang, X. G.; Miao, J.; Cui, F. De; Hu, F. Q. Synthesis of Lamivudine Stearate and Antiviral Activity of Stearic Acid-g-Chitosan Oligosaccharide Polymeric Micelles Delivery System. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41* (3–4), 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.004>.
- (62) Hu, F. Q.; Liu, L. N.; Du, Y. Z.; Yuan, H. Synthesis and Antitumor Activity of Doxorubicin Conjugated Stearic Acid-g-Chitosan Oligosaccharide Polymeric Micelles. *Biomaterials* **2009**, *30* (36), 6955–6963. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.008>.
- (63) Ha, H. K.; Kim, J. W.; Lee, M. R.; Lee, W. J. Formation and Characterization of Quercetin-Loaded Chitosan Oligosaccharide/ β -Lactoglobulin Nanoparticle. *Food Research International*. **2013**, pp 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.021>.
- (64) Ramalingam, P.; Ko, Y. T. Improved Oral Delivery of Resveratrol from N-Trimethyl Chitosan-g-Palmitic Acid Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *139*, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.050>.
- (65) Song, Z.; Wen, Y.; Deng, P.; Teng, F.; Zhou, F.; Xu, H.; Feng, S.; Zhu, L.; Feng, R. Linolenic Acid-Modified Methoxy Poly (Ethylene Glycol)-Oligochitosan Conjugate Micelles for Encapsulation of Amphotericin B. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *205* (July 2018), 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.086>.
- (66) Fernandes, M. M.; Francesko, A.; Torrent-Burgués, J.; Tzanov, T. Effect of Thiol-Functionalisation on Chitosan Antibacterial Activity: Interaction with a Bacterial Membrane Model. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73* (10), 1384–1390. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.01.004>.
- (67) Hu, F. Q.; Wu, X. ling; Du, Y. Z.; You, J.; Yuan, H. Cellular Uptake and Cytotoxicity of

- Shell Crosslinked Stearic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide Micelles Encapsulating Doxorubicin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 69 (1), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.09.018>.
- (68) Du, X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Li, S.; Lin, X.; Tang, X.; Zhang, Y.; Wang, Y. Decanoic Acid Grafted Oligochitosan Nanoparticles as a Carrier for Insulin Transport in the Gastrointestinal Tract. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 111, 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.048>.
- (69) Wang, X. Y.; Zhang, L.; Wei, X. H.; Wang, Q. Molecular Dynamics of Paclitaxel Encapsulated by Salicylic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide Aggregates. *Biomaterials* **2013**, 34 (7), 1843–1851. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.024>.
- (70) Dramou, P.; Fizir, M.; Taleb, A.; Itatahine, A.; Dahiru, N. S.; Mehdi, Y. A.; Wei, L.; Zhang, J.; He, H. Folic Acid-Conjugated Chitosan Oligosaccharide-Magnetic Halloysite Nanotubes as a Delivery System for Camptothecin. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 197 (April), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.071>.
- (71) Zhao, S.; Lee, M. K.; Lee, J. Chitooligosaccharide Copolymers: Synthesis and Aqueous Self-Assembly. *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* **2010**, 47 (6), 580–587. <https://doi.org/10.1080/10601321003741982>.
- (72) Chandika, P.; Ko, S. C.; Oh, G. W.; Heo, S. Y.; Nguyen, V. T.; Jeon, Y. J.; Lee, B.; Jang, C. H.; Kim, G. H.; Park, W. S.; Chang, W.; Choi, I. W.; Jung, W. K. Fish Collagen/Alginate/Chitooligosaccharides Integrated Scaffold for Skin Tissue Regeneration Application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, 81, 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.038>.
- (73) Yang, M. C.; Lin, W. C. The Grafting of Chitosan Oligomer to Polysulfone Membrane via Ozone-Treatment and Its Effect on Anti-Bacterial Activity. *J. Polym. Res.* **2002**, 9 (2), 135–140. <https://doi.org/10.1023/A:1021150120408>.
- (74) Choudhari, Y. M.; Detane, S. V.; Kulthe, S. S.; Godhani, C. C.; Inamdar, N. N.; Shirolkar, S. M.; Borde, L. C.; Mourya, V. K. Low Molecular Weight Palmitoyl Chitosan: Synthesis, Characterization and Nanoparticle Preparation. *Adv. Mater. Lett.* **2012**, 3 (6), 487–492. <https://doi.org/10.5185/amlett.2012.icnano.203>.
- (75) Kim, J. H.; Lee, S. Y. Surface Modification of PET Film and Fabric by Oligo-Chitosan Treatment. *Fibers Polym.* **2014**, 15 (12), 2489–2494. <https://doi.org/10.1007/s12221-014-2489-5>.
- (76) Du, Y. Z.; Lu, P.; Zhou, J. P.; Yuan, H.; Hu, F. Q. Stearic Acid Grafted Chitosan

- Oligosaccharide Micelle as a Promising Vector for Gene Delivery System: Factors Affecting the Complexation. *Int. J. Pharm.* **2010**, 391 (1–2), 260–266.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.017>.
- (77) Meng, T.; Wu, J.; Yi, H.; Liu, J.; Lu, B.; Yuan, M.; Huang, X.; Yuan, H.; Hu, F. A Spermine Conjugated Stearic Acid-g-Chitosan Oligosaccharide Polymer with Different Types of Amino Groups for Efficient P53 Gene Therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, 145, 695–705. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.071>.
- (78) Noor, N. M.; Sheikh, K.; Somavarapu, S.; Taylor, K. M. G. Preparation and Characterization of Dutasteride-Loaded Nanostructured Lipid Carriers Coated with Stearic Acid-Chitosan Oligomer for Topical Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, 117, 372–384. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.04.012>.
- (79) Walker, J. M.; Aitken, A.; Learmonth, M. Estimation of Disulfide Bonds Using Ellmans Reagent. *Protein Protoc. Handbook*, **2003**, 0, 595–596. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:595>.
- (80) González-López, M.; Shaw, J. T. Cyclic Anhydrides in Formal Cycloadditions and Multicomponent Reactions. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (1), 164–189.
<https://doi.org/10.1021/cr8002714>.
- (81) Kurita, K.; Ikeda, H.; Shimojoh, M.; Yang, J. N-Phthaloylated Chitosan as an Essential Precursor for Controlled Chemical Modifications of Chitosan: Synthesis and Evaluation. *Polym. J.* **2007**, 39 (9), 945–952.
<https://doi.org/10.1295/polymj.PJ2007032>.
- (82) Li, F.; Li, S.; Jiang, T.; Sun, Y. Syntheses and Characterization of Chitosan Oligosaccharide-Graft- Polycaprolactone Copolymer I Thermal and Spherulite Morphology Studies. *Adv. Mater. Res.* **2011**, 183–185, 155–160.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.183-185.155>.
- (83) Li, F.; Zhang, X.; Li, H.; Xiang, L.; Chen, Y. Preparation of Self-Assembled Nanoparticles of Chitosan Oligosaccharide-Graftpolycaprolactone as a Carrier of Bovine Serum Albumin Drug. *Biomed. Mater. Eng.* **2014**, 24 (6), 2041–2048.
<https://doi.org/10.3233/BME-141013>.
- (84) Liu, D. Z.; Hsieh, J. H.; Fan, X. C.; Yang, J. D.; Chung, T. W. Synthesis, Characterization and Drug Delivery Behaviors of New PCP Polymeric Micelles. *Carbohydr. Polym.* **2007**, 68 (3), 544–554.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.10.019>.
- (85) Fu, Y.; He, H.; Liu, R.; Zhu, L.; Xia, Y.; Qiu, J. Preparation and Performance of a

- BTDA-Modified Polyurea Microcapsule for Encapsulating Avermectin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, 183 (March), 110400. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110400>.
- (86) P., A.; K., V.; M., S.; T., G.; K., R.; P.N., S.; Sukumaran, A. Removal of Toxic Heavy Metal Lead (II) Using Chitosan Oligosaccharide-Graft-Maleic Anhydride/Polyvinyl Alcohol/Silk Fibroin Composite. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 104, 1469–1482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.111>.
- (87) Sridharan, V.; Menéndez, J. C. Cerium(IV) Ammonium Nitrate as a Catalyst in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **2010**, 110 (6), 3805–3849. <https://doi.org/10.1021/cr100004p>.
- (88) Wang, P.; Liu, L.; Wei, Z. Y.; Qi, M. Facile Graft Copolymerization of Chitosan Powder with Methyl Acrylate Using Ceric Ammonium Nitrate. *Adv. Mater. Res.* **2011**, 197–198 (February), 563–566. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.197-198.563>.
- (89) Sheela, B.; Kalaiarasi, K.; Vijayalakshmi, K.; Sudha, P. N. Optimization of Grafting Parameters of Nylon6- Graft-Acrylic Acid Copolymer Using Ceric Ammonium Nitrate As an Initiator. **2016**, 1 (2), 9–16.
- (90) Pourjavadi, A.; Mahdavinia, G. R.; Zohuriaan-Mehr, M. J.; Omidian, H. Modified Chitosan. I. Optimized Cerium Ammonium Nitrate-Induced Synthesis of Chitosan-Graft-Polyacrylonitrile. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 88 (8), 2048–2054. <https://doi.org/10.1002/app.11820>.
- (91) Joshi, R. M. The Free Radical Polymerization of Maleic Anhydride. *Die Makromol. Chemie* **1962**, 53 (1), 33–45. <https://doi.org/10.1002/macp.1962.020530105>.
- (92) Farhan, M. A.; Dheyab, H. B.; Hasan, A. A. Synthesis and Characterization of Cellulose Grafted Maleic Anhydride and Substituted It With Amoxicillin Synthesis and Characterization of Cellulose Grafted Maleic. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* **2017**, 4 (September), 84–90.
- (93) Ali, F. M.; Farhan, M. A. Synthesis and Characterization of Substituted Starch Grafted Methyl Nadic Anhydride and Substituted with 4-Aminoantipyrine. *Earthline J. Chem. Sci.* **2019**, 10 (3), 103–113. <https://doi.org/10.34198/ejcs.1219.103113>.
- (94) Varala, R.; Sreelatha, N.; Adapa, S. R. Ceric Ammonium Nitrate Catalyzed Aza-Michael Addition of Aliphatic Amines to α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds and Nitriles in Water. *Synlett* **2006**, No. 10, 1549–1553. <https://doi.org/10.1055/s-2006-941588>.
- (95) Huang, R.; Rajapakse, N.; Kim, S. K. Structural Factors Affecting Radical Scavenging Activity of Chitooligosaccharides (COS) and Its Derivatives. *Carbohydr. Polym.* **2006**,

- 63 (1), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.022>.
- (96) Boesel, L. F.; Reis, R. L.; Román, J. S. Innovative Approach for Producing Injectable, Biodegradable Materials Using Chitooligosaccharides and Green Chemistry. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (3), 465–470. <https://doi.org/10.1021/bm801332u>.
- (97) Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (12), 6017–6084. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>.
- (98) Choi, J. S.; Yoo, H. S. Pluronic/Chitosan Hydrogels Containing Epidermal Growth Factor with Wound-Adhesive and Photo-Crosslinkable Properties. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2010**, *95 A* (2), 564–573. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32848>.
- (99) Choi, J. S.; Yoo, H. S. Journal of Biomaterials Science , Chitosan / Pluronic Hydrogel Containing BFGF / Heparin for Encapsulation of Human Dermal Fibroblasts. No. September 2013, 37–41.
- (100) E. Radha¹ and P. N. Sudha. Modification and Characterization of Chitosan Oligosaccharide. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **1995**, *8* (4), 90–95.
- (101) Illy, N.; Robitzer, M.; Auvergne, R.; Caillol, S.; David, G.; Boutevin, B. Synthesis of Water-Soluble Allyl-Functionalized Oligochitosan and Its Modification by Thiol-Ene Addition in Water. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2014**, *52* (1), 39–48. <https://doi.org/10.1002/pola.26967>.
- (102) Mei, J.; Zhang, H.; Li, Z.; Ou, H. A Novel Tetraethylenepentamine Crosslinked Chitosan Oligosaccharide Hydrogel for Total Adsorption of Cr(VI). *Carbohydr. Polym.* **2019**, *224* (February), 115154. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115154>.
- (103) Rwei, S. P.; Chen, Y. M.; Lin, W. Y.; Chiang, W. Y. Synthesis and Rheological Characterization of Water-Soluble Glycidyltrimethylammonium-Chitosan. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (11), 5547–5562. <https://doi.org/10.3390/md12115547>.
- (104) Chen, S.; Luo, C.; Wen, W.; Tian, J.; Zhou, C.; Luo, B. Fabrication, Antibacterial Activity and Cytocompatibility of Quaternary Ammonium Chitooligosaccharide Functionalized Polyurethane Membrane via Polydopamine Adhesive Layer. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *93* (August), 319–331. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.006>.
- (105) Wang, C.; Li, G.; Tao, S.; Guo, R.; Yan, Z. Crystalline and Micellar Properties of Amphiphilic Biodegradable Chitooligosaccharide-Graft-Poly(E{unate}-Caprolactone) Copolymers. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64* (3), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.017>.

- (106) Gao, K. J.; Liu, X. Z.; Li, G.; Xu, B. Q.; Yi, J. Spontaneous Formation of Giant Vesicles with Tunable Sizes Based on Jellyfish-like Graft Copolymers. *RSC Adv.* **2014**, 4 (103), 59323–59330. <https://doi.org/10.1039/c4ra12978d>.
- (107) Gao, K. J.; Yi, J.; Mao, J.; Li, G.; Xu, B. Q. A General Template for Synthesis of Hollow Microsphere with Well-Defined Structure. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, 128 (3), 1687–1696. <https://doi.org/10.1002/app.38278>.
- (108) Kurita, K.; Hirakawa, M.; Kikuchi, S.; Yamanaka, H.; Yang, J. Trimethylsilylation of Chitosan and Some Properties of the Product. *Carbohydr. Polym.* **2004**, 56 (3), 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.02.008>.
- (109) Kildeeva, N. R.; Perminov, P. A.; Vladimirov, L. V.; Novikov, V. V.; Mikhailov, S. N. About Mechanism of Chitosan Cross-Linking with Glutaraldehyde. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2009**, 35 (3), 360–369. <https://doi.org/10.1134/S106816200903011X>.
- (110) Ratanavaraporn, J.; Damrongsakkul, S. Journal of Biomaterials Science , Osteogenic Differentiation of Bone-Marrow-Derived Stem Cells Cultured with Mixed Gelatin and Chitooligosaccharide Scaffolds. **2012**, No. November 2014, 1083–1098. <https://doi.org/10.1163/092050610X499050>.
- (111) Kumari, M.; Liu, C.; Wu, W. Efficient Gene Delivery by Oligochitosan Conjugated Serum Albumin : Facile Synthesis , Polyplex Stability , and Transfection. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 183 (August 2017), 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.013>.
- (112) Kumari, M.; Liu, C.; Wu, W. Protein Moiety in Oligochitosan Modified Vector Regulates Internalization Mechanism and Gene Delivery : Polyplex Characterization , Intracellular Trafficking and Transfection. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 202 (August), 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.131>.
- (113) Zhang, X. fei; Ding, C. lei; Liu, H.; Liu, L. hong; Zhao, C. qi. Protective Effects of Ion-Imprinted Chitooligosaccharides as Uranium-Specific Chelating Agents against the Cytotoxicity of Depleted Uranium in Human Kidney Cells. *Toxicology*. 2011, pp 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.05.011>.
- (114) Du, Y.; Ying, X.; Wang, L.; Zhai, Y.; Yuan, H.; Yu, R.; Hu, F. Sustained Release of ATP Encapsulated in Chitosan Oligosaccharide Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2010**, 392 (1–2), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.050>.
- (115) Sudha, E. R. and P. N.; P.G. Synthesis and Characterization of Glutaraldehyde Crosslinked Chitosan Oligosaccharide-Graft-Glycidylmethacrylate Poly Propylene Glycol Blend.1.Pdf. *World J. Pharm. Res.* **2018**, 7 (4), 1310–1324.

- (116) Necol, M. R.; Vela Gurovic, M. S.; Ruiz Díaz, S.; Silbestri, G. F. Binding Silver to Chitooligosaccharides through N-Heterocyclic Carbenes: Synthesis and Antimicrobial Activity. *Carbohydr. Res.* **2019**, 471 (September 2018), 6–12.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.10.008>.
- (117) Ma, F.; Zhang, Y.; Wang, H.; Li, W.; Hou, B. Inhibition Behavior of Chitooligosaccharide Derivatives for Carbon Steel in 3.5% NaCl Solution. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, 13 (1), 235–249. <https://doi.org/10.20964/2018.01.17>.
- (118) Wang, Y.; Khan, A.; Liu, Y.; Feng, J.; Dai, L.; Wang, G.; Alam, N.; Tong, L.; Ni, Y. Chitosan Oligosaccharide-Based Dual PH Responsive Nano-Micelles for Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 223 (July), 115061.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115061>.
- (119) Ren, L.; Guo, X.; Zhao, Y.; Qiang, T. Synthesis and Properties of Waterborne Polyurethane Incorporated with Phenolic Acid Grafted Oligochitosan. *Prog. Org. Coatings* **2019**, 135 (September 2018), 410–416.
<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.06.030>.
- (120) Elshaarawy, R. F. M.; Seif, G. A.; El-Naggar, M. E.; Mostafa, T. B.; El-Sawi, E. A. In-Situ and Ex-Situ Synthesis of Poly-(Imidazolium Vanillyl)-Grafted Chitosan/Silver Nanobiocomposites for Safe Antibacterial Finishing of Cotton Fabrics. *Eur. Polym. J.* **2019**, 116 (January), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.04.013>.
- (121) Sofy, A. R.; Hmed, A. A.; Abd El Haliem, N. F.; Zein, M. A. E.; Elshaarawy, R. F. M. Polyphosphonium-Oligochitosans Decorated with Nanosilver as New Prospective Inhibitors for Common Human Enteric Viruses. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 226 (July), 115261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115261>.
- (122) Guerry, A.; Bernard, J.; Samain, E.; Fleury, E.; Cottaz, S.; Halila, S. Aniline-Catalyzed Reductive Amination as a Powerful Method for the Preparation of Reducing End-"clickable" Chitooligosaccharides. *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24 (4), 544–549.
<https://doi.org/10.1021/bc3003716>.
- (123) Guerry, A.; Cottaz, S.; Fleury, E.; Bernard, J.; Halila, S. Redox-Stimuli Responsive Micelles from DOX-Encapsulating Polycaprolactone-g-Chitosan Oligosaccharide. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 112, 746–752. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.052>.
- (124) Yue, L.; Li, J.; Chen, W.; Liu, X.; Jiang, Q.; Xia, W. Geraniol Grafted Chitosan Oligosaccharide as a Potential Antibacterial Agent. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 176, 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.043>.
- (125) Yue, L.; Sun, D.; Mahmood Khan, I.; Liu, X.; Jiang, Q.; Xia, W. Cinnamyl Alcohol

- Modified Chitosan Oligosaccharide for Enhancing Antimicrobial Activity. *Food Chem.* **2020**, 309 (May 2019), 125513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125513>.
- (126) Liu, X.; Xia, W.; Jiang, Q.; Xu, Y.; Yu, P. Effect of Kojic Acid-Grafted-Chitosan Oligosaccharides as a Novel Antibacterial Agent on Cell Membrane of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, 120 (3), 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.010>.
- (127) Liu, X.; Xia, W.; Jiang, Q.; Xu, Y.; Yu, P. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Kojic Acid Grafted Chitosan Oligosaccharide. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (1), 297–303. <https://doi.org/10.1021/jf404026f>.
- (128) Chapelle, C.; Quienne, B.; Bonneaud, C.; David, G.; Caillol, S. Diels-Alder-Chitosan Based Dissociative Covalent Adaptable Networks. *Carbohydr. Polym.* **2021**, 253 (July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117222>.
- (129) Xu, W.; Xiao, M.; Yuan, L.; Zhang, J.; Hou, Z. Preparation, Physicochemical Properties and Hemocompatibility of Biodegradable Chitooligosaccharide-Based Polyurethane. *Polymers (Basel)*. **2018**, 10 (6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/polym10060580>.
- (130) Liu, X.; Xia, W.; Jiang, Q.; Yu, P.; Yue, L. Chitosan Oligosaccharide-N-Chlorokojic Acid Mannich Base Polymer as a Potential Antibacterial Material. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 182 (April 2017), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.019>.
- (131) Zhang, J.; Sun, X.; Chen, Y.; Mi, Y.; Tan, W.; Miao, Q.; Li, Q.; Dong, F.; Guo, Z. Preparation of 2,6-Diurea-Chitosan Oligosaccharide Derivatives for Efficient Antifungal and Antioxidant Activities. *Carbohydr. Polym.* **2020**, 234 (October 2019), 115903. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115903>.
- (132) Sammet, B. 4-Nitrophenyl Chloroformate: A Versatile Coupling Reagent. *Synlett* **2009**, No. 18, 3050–3051. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1218291>.
- (133) Wang, L.; Liu, Z.; Liu, X.; Wu, Y. Microwave-Assisted Synthesis of Chitooligosaccharide Guanidine and Its Effect on GLUT4-Dependent Glucose Uptake through an Akt-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in L6 Skeletal Muscle Cells. *RSC Adv.* **2016**, 6 (93), 90777–90785. <https://doi.org/10.1039/c6ra17654b>.
- (134) Wang, H.; Zhou, Y.; Wang, Y.; Wang, Z.; Wang, J. Biguanidine Functional Chitooligosaccharide Modified Reverse Osmosis Membrane with Improved Anti-Biofouling Property. *RSC Adv.* **2018**, 8 (73), 41938–41949. <https://doi.org/10.1039/c8ra09291e>.
- (135) Salim, E.; Ailincai, D.; Trombotto, S. Chitooligosaccharide-2,5-Anhydro-D-Mannonic

- Acid. *Molbank* **2014**, 2014 (3), 4–7. <https://doi.org/10.3390/M832>.
- (136) Bezrodnykh, E. A.; Blagodatskikh, I. V.; Kulikov, S. N.; Zelenikhin, P. V.; Yamskov, I. A.; Tikhonov, V. E. Consequences of Chitosan Decomposition by Nitrous Acid: Approach to Non-Branched Oligochitosan Oxime. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 195 (April), 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.007>.
- (137) Emil Salim, A. G. and S. T. 4-(Hexyloxy)Aniline-Linked Chitooligosaccharide-2,5-Anhydro-D_ Mannofuranose.Pdf. *Molbank* **2014**, M815. <https://doi.org/10.3390/M815>.
- (138) Trombotto, A. M. and S. Octanoic Hydrazide Linked Chitooligosaccharides 2,5 AnhydroD Mannofuranose. *Molbank* **2016**, M904. <https://doi.org/10.3390/M904>.
- (139) Moussa, A.; Crépet, A.; Ladavière, C.; Trombotto, S. Reducing-End “Clickable” Functionalizations of Chitosan Oligomers for the Synthesis of Chitosan-Based Diblock Copolymers. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 219 (May), 387–394. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.078>.
- (140) Coudurier, M.; Faivre, J.; Crépet, A.; Ladavière, C.; Delair, T.; Schatz, C.; Trombotto, S. Reducing-End Functionalization of 2,5-Anhydro-d-Mannofuranose-Linked Chitooligosaccharides by Dioxyamine: Synthesis and Characterization. *Molecules* **2020**, 25 (5), 1143. <https://doi.org/10.3390/molecules25051143>.
- (141) Pickenhahn, V. D.; Darras, V.; Dziopa, F.; Biniecki, K.; De Crescenzo, G.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D. Regioselective Thioacetylation of Chitosan End-Groups for Nanoparticle Gene Delivery Systems. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (8), 4650–4664. <https://doi.org/10.1039/c5sc00038f>.
- (142) Pickenhahn, V. D.; Grange, M.; De Crescenzo, G.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D. Regioselective Chitosan End-Group Activation: The Triskelion Approach. *RSC Adv.* **2017**, 7 (30), 18628–18638. <https://doi.org/10.1039/c7ra01348e>.
- (143) Salim, E.; Ailincal, D.; Trombotto, S. Chitooligosaccharide-2,5-Anhydro-D-Mannonic Acid. *Molbank* **2014**, 2014 (3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/M832>.
- (144) Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A. N.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M. D.; Gupta, A. A Validated ¹H NMR Method for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 32 (6), 1149–1158. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00155-9).
- (145) Takamura, K.; James, A. *Paving with Asphalt Emulsions*; Elsevier Ltd., **2015**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100269-8.00013-1>.
- (146) Day, D.; Lancaster, I. M.; McKay, D. Emulsion Cold Mix Asphalt in the UK: A Decade

- of Site and Laboratory Experience. *J. Traffic Transp. Eng. (English Ed.)* **2019**, 6 (4), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.jtte.2019.05.002>.
- (147) Garcia, M. T.; Kaczerewska, O.; Ribosa, I.; Brycki, B.; Materna, P.; Drgas, M. Biodegradability and Aquatic Toxicity of Quaternary Ammonium-Based Gemini Surfactants: Effect of the Spacer on Their Ecological Properties. *Chemosphere* **2016**, 154, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.109>.
- (148) Zhang, J.; Xia, W.; Liu, P.; Cheng, Q.; Tahirou, T.; Gu, W.; Li, B. Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2010**, 8 (7), 1962–1987. <https://doi.org/10.3390/md8071962>.
- (149) Rodríguez, M. S.; Albertengo, L. A.; Agulló, E. Emulsification Capacity of Chitosan. *Carbohydr. Polym.* **2002**, 48 (3), 271–276. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00258-2).
- (150) Nan, F.; Wu, J.; Qi, F.; Liu, Y.; Ngai, T.; Ma, G. Uniform Chitosan-Coated Alginate Particles as Emulsifiers for Preparation of Stable Pickering Emulsions with Stimulus Dependence. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, 456 (1), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.017>.
- (151) Zhang, S.; Zhou, Y.; Yang, C. Pickering Emulsions Stabilized by the Complex of Polystyrene Particles and Chitosan. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, 482, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.029>.
- (152) Lauriane Alison, Ahmet F. Demirörs, Elena Tervoort, Alexandra Teleki, Jan Vermant, and. Emulsions Stabilized by Chitosan-Modified Silica Nanoparticles PH. **2018**, pp 6147–6160.
- (153) D.R. Mallawarachchi, A.D.U.S Amarasinghe, M. A. . P. Suitability of Chitosan as an Emulsifier for Cationic Bitument Emulsions and Its Behavior as an Additive to Bitumen Emulsion. *Constr. Build. Mater.* **2016**, 102, 1–6.
- (154) Du, Y.; Lu, P.; Zhou, J.; Yuan, H.; Hu, F. Stearic Acid Grafted Chitosan Oligosaccharide Micelle as a Promising Vector for Gene Delivery System : Factors Affecting the Complexation. *Int. J. Pharm.* **2010**, 391 (1–2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.017>.
- (155) Bezrodnykh, E. A.; Blagodatskikh, I. V.; Kulikov, S. N.; Zelenikhin, P. V.; Yamskov, I. A.; Tikhonov, V. E. Consequences of Chitosan Decomposition by Nitrous Acid : Approach to Non- Branched Oligochitosan Oxime. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 195 (April), 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.007>.
- (156) Baudendistel, O. R.; Wieland, D. E.; Schmidt, M. S.; Wittmann, V. Real-Time NMR

Studies of Oxyamine Ligations of Reducing Carbohydrates under Equilibrium Conditions.

Chem. - A Eur. J. **2016**, 22 (48), 17359–17365.

<https://doi.org/10.1002/chem.201603369>.

- (157) Chan, A. S. C.; Chen, C. C.; Lin, C. W.; Lin, Y. C.; Cheng, M. C.; Peng, S. M. The Remarkable Effect of E/Z Isomers on the Catalytic Asymmetric Hydrogenation of Oximes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, No. 17, 1767–1768.

<https://doi.org/10.1039/C39950001767>.

- (158) Bohle, D. S.; Chua, Z.; Perepichka, I.; Rosadiuk, K. E/Z Oxime Isomerism in PhC(NOH)CN. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, 19 (13), 4223–4229.

<https://doi.org/10.1002/chem.201203357>.

- (159) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. *Structure Determination of Organic Compounds*; **2000**. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04201-4>.

- (160) Jencks, W. P.; Carriuolo, J. Reactivity of Nucleophilic Reagents toward Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82 (7), 1778–1786. <https://doi.org/10.1021/ja01492a058>.

- (161) Yang, P.; Sun, H.; Fan, H.; Shi, B. Novel Environmentally Sustainable Cardanol-Based Plasticizers: Synthesis and Properties. *Polym. Int.* **2016**, 65 (4), 464–472.

<https://doi.org/10.1002/pi.5083>.

Chapitre 4

Caractérisation des tensioactifs et mise en émulsion d'une huile modèle

Table des matières du Chapitre 4

PHYSICO-CHIMIE DES TENSIOACTIFS : MÉTHODES DE MESURE	207
I. EVALUATION DES PROPRIETES DES TENSIOACTIFS	207
I.1. Balance Hydrophile-Lipophile (HLB).....	207
I.2. Concentration micellaire critique CMC	208
I.3. Paramètre d'empilement.....	210
I.4. Tension interfaciale	212
I.5. Rhéologie interfaciale	214
I.6. Diffusion de la lumière	215
I.6. 1) Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	215
I.6. 2) Diffusion statique de la lumière (SLS)	216
II. EVALUATION DE STABILITE D'EMULSIONS	218
II.1. Mise en émulsion	218
II.2. Principe du Turbiscan.....	219
SURFACTANT PROPERTIES OF CHEMICALLY MODIFIED CHITOLIGOSACCHARIDES AND THEIR POTENTIAL APPLICATION IN BITUMEN EMULSIONS	221
I. ABSTRACT	221
II. INTRODUCTION	221
III. MATERIAL AND METHOD	223
III.1. Material	223
III.2. Functionalization of COS.....	223
III.2. 1) Synthesis of COS-epoxide	223
III.2. 2) Synthesis of COS-TOFA	223
III.2. 3) Characterizations.....	224
III.3. CMC and interfacial tension	225
III.4. Stacking parameter	225
III.5. Static and dynamic light scattering (SLS and DLS).....	226
III.6. Microscopic analysis	226
III.7. Emulsion	227
III.7. 1) Preparation.....	227
III.7. 2) Stability.....	227
III.8. Surfactant toxicity.....	228
IV. RESULT AND DISCUSSION.....	228
IV.1. CMC Measurement.....	229
IV.2. Static and dynamic light scattering (SLS and DLS).....	233
IV.3. Emulsion stability and rheological properties	234
IV.3. 1) Stability over 7 days	234
IV.3. 2) Interfacial and bulk rheology.....	238
IV.3. 3) Stability over 55 days	241
IV.4. Surfactant toxicity	242
V. CONCLUSION.....	243
CONCLUSIONS DU CHAPITRE 4 ET MISE EN RELATION AVEC LES TENSIOACTIFS DE COLAS	244
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	250

Dans le chapitre précédent, différents tensioactifs à base de chitosane ont été synthétisés et leurs synthèses optimisées. Afin de déterminer leurs capacités à émulsionner le bitume, il est nécessaire d'évaluer leurs propriétés physico-chimiques. Dans un premier temps, une partie théorique sur ces propriétés et leurs méthodes de mesure respectives sera exposée. La caractérisation des tensioactifs base COS sera présentée dans une publication soumise dans le journal **Journal of colloid and interface science**, « Surfactant properties of chemically modified chitooligosaccharides and their potential application in bitumen emulsions ». Enfin les résultats obtenus sur ces tensioactifs seront comparés aux propriétés des tensioactifs de référence utilisés par Colas (A et B).

Physico-chimie des tensioactifs : méthodes de mesure

I. Evaluation des propriétés des tensioactifs

Les tensioactifs sont susceptibles de disperser un solide dans un liquide, d'améliorer la mouillabilité d'un liquide, de stabiliser une mousse ou une émulsion, etc. Leurs propriétés physico-chimiques déterminent l'application la plus adaptée à chacun. Il existe différentes méthodes permettant de décrire les propriétés des tensioactifs et permettant de choisir une structure plutôt qu'une autre pour une application donnée, ici les émulsions de bitume. Ces méthodes sont présentées dans les paragraphes suivants.

I.1. Balance Hydrophile-Lipophile (HLB)

La HLB est une grandeur caractéristique des tensioactifs définie par Griffin^{1 2} en 1949. Il s'agit d'une valeur empirique qui représente l'équilibre hydrophile/lipophile d'une molécule amphiphile, directement lié à sa solubilité dans l'eau. Elle s'étend sur une échelle de 0 à 20, avec une solubilité dans l'eau croissante. De manière générale, un tensioactif avec une HLB entre 1 et 6 donnera des émulsions inverses (eau dans huile) alors qu'un tensioactif avec une HLB supérieure à 10 donnera des émulsions directes (huile dans eau), l'équilibre hydrophile-lipophile étant fixé à 7 (Figure 43. Echelle de valeurs de HLB. La HLB peut se calculer de différentes façons, la méthode de calcul dépendant de la structure du tensioactif. Par exemple, la méthode empirique de Griffin permet de calculer les HLB des tensioactifs polyéthoxylés par le rapport entre la masses molaire de la partie hydrophile (H) et la masse molaire totale du tensioactif (avec L la masse molaire de la partie hydrophobe), multiplié par 20 (14). Cette méthode ne prend pas en compte la présence de contre ions ou encore d'insaturations ou de groupes fonctionnels sur la chaîne grasse.

$$(14) \quad HLB = \frac{H}{H+L} \times 20$$

Dans cette optique, Davies et Rideal^{3 4} ont développé une méthode de calcul de HLB par incréments, chaque incrément correspondant à la nature des parties hydrophiles (iH) et hydrophobes (iL) (15). Il existe une table des différents incréments utilisés classiquement dans la synthèse de tensioactifs (Annexe 27).

$$(15) \quad HLB = 7 + \sum i H - \sum i L$$

Dans le cas de mélange de tensioactifs A et B sans interactions l'un avec l'autre, la HLB est exprimée par la relation suivante avec f_A la fraction massique en A (16).

$$(16) \quad \text{HLB} = \text{HLB}_A \times f_A + \text{HLB}_B \times (1-f_A)$$

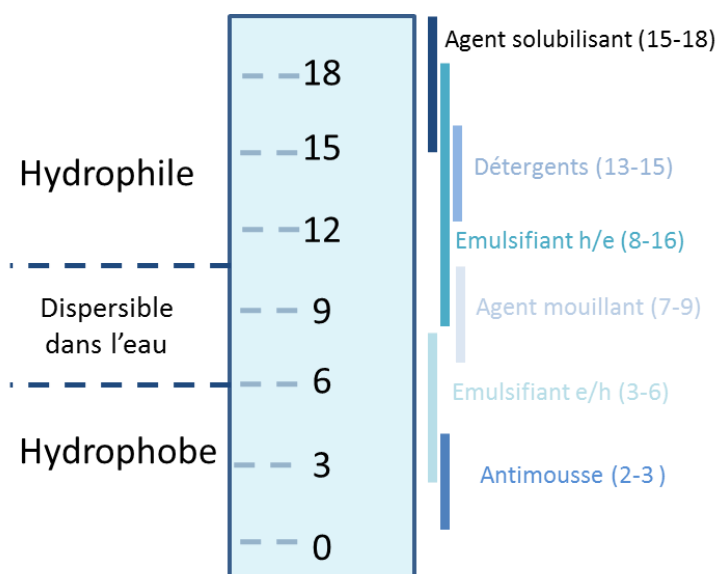


Figure 43. Echelle de valeurs de HLB

De manière générale, les valeurs de HLB permettent de comparer des tensioactifs à structures comparables du fait de la versatilité du calcul de cette valeur empirique.

1.2. Concentration micellaire critique CMC

La concentration micellaire critique est définie comme la concentration en tensioactif à une température donnée, à partir de laquelle celui-ci s'auto assemble spontanément pour former des micelles. Elle est directement liée à la tension de surface ou tension interfaciale qui représente la tension existante à l'interface entre un gaz et un liquide. La structure amphiphile des tensioactifs leur permet de s'adsorber et de s'accumuler sur tous types d'interface et donc d'en abaisser la tension de surface. Dans le cas d'un tensioactif soluble dans l'eau, en dessous de la CMC, et donc à faible concentration, le tensioactif forme une couche à la surface du liquide et le reste est dispersé dans l'eau (Figure 44 a)). Plus la concentration augmente et se rapproche de la CMC, plus le tensioactif a tendance à saturer l'interface et donc à abaisser la tension de surface. Lorsque l'interface est saturée, la tension interfaciale ne varie plus, l'excès de tensioactifs en solution s'auto-assemblent sous forme de micelles: c'est la CMC (Figure 44 b)).

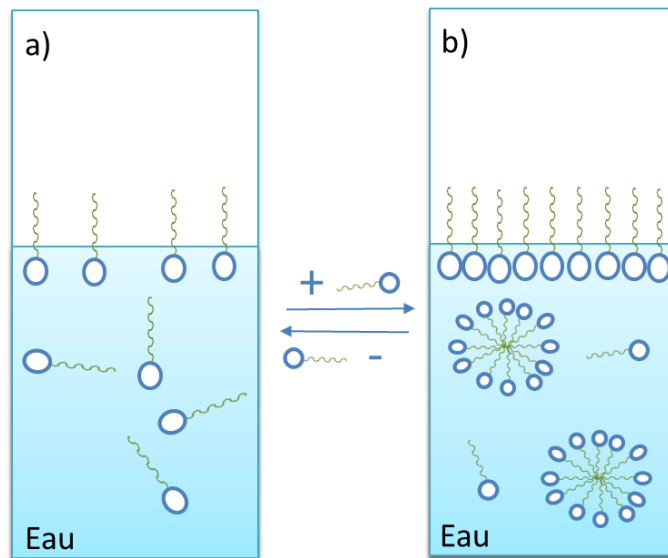


Figure 44. a) Schéma représentant un tensioactif dans l'eau à une concentration a) en dessous de la CMC b) au-dessus de la CMC

Expérimentalement, celle-ci peut être mesurée de nombreuses manières différentes^{5 6 7}. La plus courante des méthodes est de mesurer la tension interfaciale de solutions de différentes concentrations dans des conditions identiques (pH, température) à l'aide de la plaque de Wilhelmy ou l'anneau Du Noüy⁵. La CMC est la concentration en tensioactif au point de rupture de la pente de la courbe de la tension superficielle en fonction de la concentration en tensioactif en solution. Elle peut donc être calculée grâce à l'ordonnée de l'intersection des pentes des droites a) et b) (Figure 45).

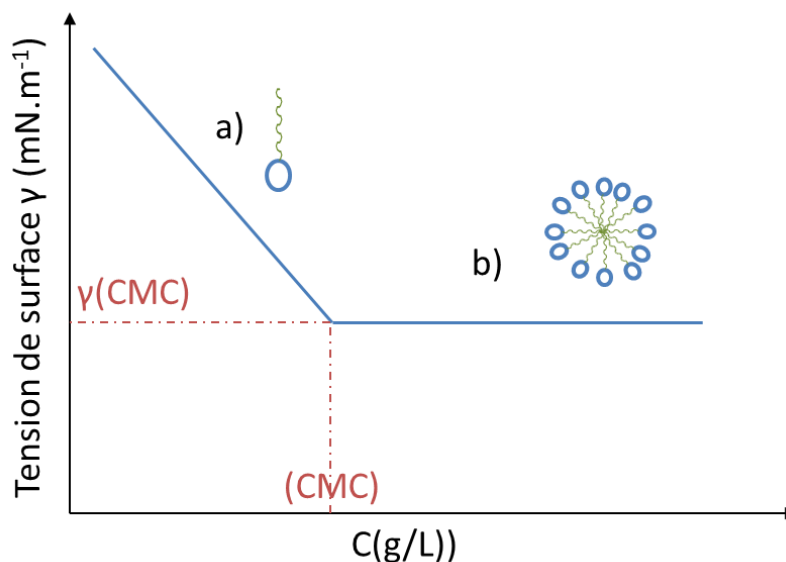


Figure 45. Schéma représentant la méthode de détermination de la CMC par tensiométrie

La valeur de la CMC à une température donnée est caractéristique de la structure d'un tensioactif ^{8 9}. Par exemple, à tête hydrophile identique, la valeur de la CMC tend à décroître lorsque la longueur de la chaîne hydrophobe augmente. L'influence de la longueur de chaîne devient moindre lorsque celle-ci dépasse 16 atomes de carbones et presque nulle au-delà de 18. En fait, Kleven¹⁰ a établi la relation suivante (17) entre le nombre d'atomes de carbone de la chaîne hydrophobe (n) et la CMC, avec A et B deux constantes à déterminer.

$$(17) \quad \log(CMC) = A - B \times n$$

La présence d'insaturations implique une diminution de la CMC tandis que la présence de groupes polaires implique une augmentation de cette dernière. De la même façon, plus les tensioactifs sont hydrophiles, plus les CMC sont élevées. La présence d'électrolytes ou de composés organiques, le pH et la température de mesure, sont des paramètres qui peuvent influencer la mesure.

La tension de surface entre l'eau et l'air à pH2 et 25°C est de 70 mN.m⁻¹. Comme expliqué précédemment, la présence de tensioactif implique l'abaissement de cette tension de surface. On parle de C₂₀ lorsque la tension de surface est abaissée de 20 mN.m⁻¹ par rapport à celle de l'eau.

Il est possible d'évaluer la performance et l'efficacité d'un tensioactif par rapport à un autre en regardant les valeurs de CMC et la tension de surface associée. La performance implique la capacité d'adsorption aux interfaces et est reliée à la tension de surface alors que l'efficacité définit la capacité d'auto agrégation des tensioactifs reliée à la CMC. Dans le cas où la tension superficielle après la CMC d'un tensioactif A est plus basse que celle d'un tensioactif B, c'est-à-dire que $\gamma_{CMC A} < \gamma_{CMC B}$, le tensioactif A sera décrit comme plus performant que le tensioactif B. Dans le cas où la CMC d'un tensioactif C est inférieur à celle d'un composés D, c'est-à-dire que $CMC C < CMC D$, le tensioactif C sera décrit comme plus efficace que le tensioactif D.

I.3. Paramètre d'empilement

En fonction de leur structure (taille et forme de la chaîne hydrophile/hydrophobe) et des conditions (pH, température, présence de sels) les tensioactifs peuvent s'agréger de façon différente. Isrealachvili et al.⁷ ont ainsi défini le paramètre d'empilement p par le rapport entre le volume V occupé par la partie hydrophobe au cœur de la micelle (19) et la surface a_0 occupée par la partie hydrophile à l'interface micelle-solution multipliée par la longueur critique l_c de la chaîne hydrophobe (20). Cette longueur représente la longueur maximale pour laquelle la chaîne alkyle peut être considérée comme fluide et non figée dans une structure cristalline.

$$(18) \quad p = \frac{V}{l_c \times a_0}$$

Dans le cas d'une chaîne alkyle, les paramètres V ($\text{\AA}^3$) et l_c ($\text{\AA}$) sont calculés en fonction du nombre d'atomes de carbone n_c de la chaîne (19) (20).

$$(19) \quad V = 27,4 + 26,9 (n_c - 1)$$

$$(20) \quad l_c = 1,5 + 1,265 (n_c - 1)$$

La valeur de a_0 ($\text{\AA}^2$) peut être déterminée par tensiométrie à partir de la valeur de la concentration superficielle ou excès de surface Γ , à température constante (21).

$$(21) \quad a_0 = \frac{10^{20}}{N_a \times \Gamma}$$

Avec N_a , le nombre d'Avogadro ($N_a = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) et Γ , la concentration superficielle, ou excès de surface (mol.m^{-2})

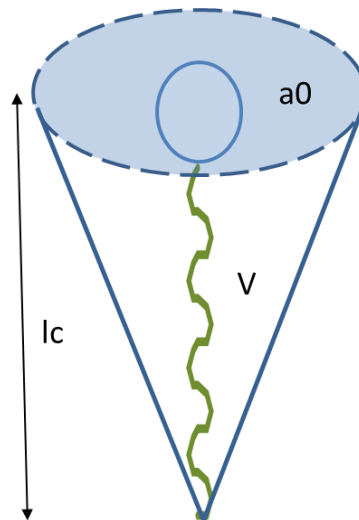


Figure 46. Schéma d'un tensioactif

La concentration superficielle est donnée par l'équation de Gibbs (22), reliant la décroissance de la tension de surface en fonction du logarithme népérien de la concentration en tensioactif. Elle peut ainsi être calculée expérimentalement à partir de la pente de la courbe $\gamma = f(C)$ (Figure 45 a)).

$$(22) \quad \Gamma = -\frac{1}{nRT} \times \frac{d\gamma}{d \ln C}$$

Avec n , la constante de dissociation, ($n=1$ pour les tensioactifs non ioniques, $n=2$ pour les tensioactifs ioniques), R , la constante des gaz parfaits ($R = 8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T , la température (K), C , la concentration en tensioactif (mol.L^{-1}), γ , la tension de surface (mN.m^{-1}).

I.4. Tension interfaciale

La tension interfaciale ou tension superficielle est une grandeur physique qui quantifie le défaut énergétique provoqué par la création d'une interface entre deux phases. Lorsque deux liquides sont non miscibles, deux phases distinctes sont formées. A l'interface entre les deux liquides, les molécules interagissent, induisant une diminution de l'énergie de cohésion. C'est pour minimiser ce défaut d'énergie de cohésion qu'un système tendra à minimiser ses interfaces avec les autres milieux. La tension interfaciale ou tension superficielle exprime alors la force par unité de surface avec laquelle les molécules sont attirées vers l'intérieur de l'un des liquides. L'unité de tension superficielle (N.m^{-1}) est équivalente à des joules par mètre carré (J.m^{-2}), qui correspondent bien à une unité d'énergie de surface.

Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature pour mesurer la tension interfaciale. Parmi elles, la méthode de la goutte pendante qui consiste à maintenir une goutte de liquide dans une autre phase moins dense (liquide ou gazeuse) au bout d'un capillaire^{6 11}, la méthode de pesée de goutte utilisant la loi de Tate¹² ou encore la méthode de la goutte tournante reliant la tension interfaciale à la vitesse de rotation d'une goutte. La mesure d'angle de contact reliée à la loi de Young-Dupré ou encore la remontée capillaire par la loi de Jurin sont d'autres méthodes connues¹³. Enfin, l'utilisation d'un tensiomètre à plaque de Wilhelmy¹⁴ (platine-iridium) permet d'obtenir la tension de surface par le biais d'une fine plaque verticale avec un périmètre connu reliée à une balance de précision et sera décrite plus en détail dans cette étude. La force due au mouillage est mesurée par la balance. L'anneau de Noüy est également décrit mais il est moins précis dans le cas de tensioactifs.

Brièvement, la méthode mettant en jeux la plaque de Wilhelmy implique dans un premier temps de mesurer la flottabilité de cette dernière dans le liquide avec la densité la plus basse, ici l'huile, à une température donnée. Ensuite, le tensiomètre détecte la surface du second liquide, ici une solution aqueuse de tensioactif. La troisième étape est alors la réelle mesure de la tension de surface entre les deux liquide après l'ajout délicat de la phase la moins dense (huile) sur la phase la plus dense (eau) (Figure 47). Avant chaque mesure, la plaque est brûlée au chalumeau afin de retirer toute trace d'impuretés à la surface.

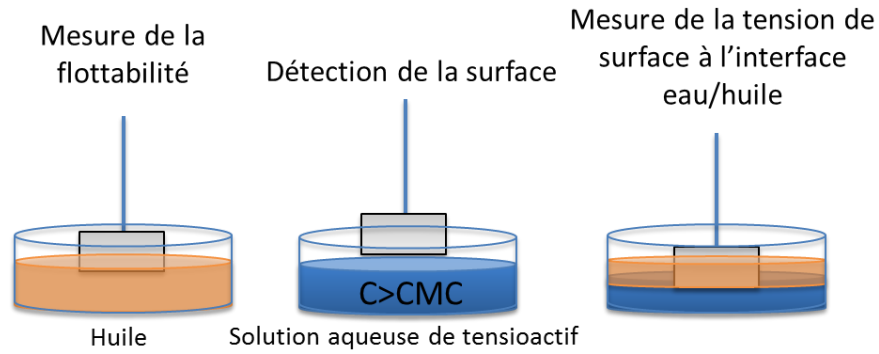


Figure 47. Schéma de la mesure de tension interfaciale entre une solution aqueuse de tensioactif et de l'huile

À ce stade, la force enregistrée par la balance (Figure 48) est utilisée pour déterminer la tension superficielle selon l'équation:

$$(23) \quad \gamma = \frac{F_0}{\cos(\theta) \times 2L \times e}$$

Avec F_0 , F quand $d=0$, L la largeur de la plaque et e son épaisseur.

Contrairement à la méthode de l'anneau de Du Nouÿ, la densité du liquide n'est pas nécessairement connue pour mesurer la tension superficielle.

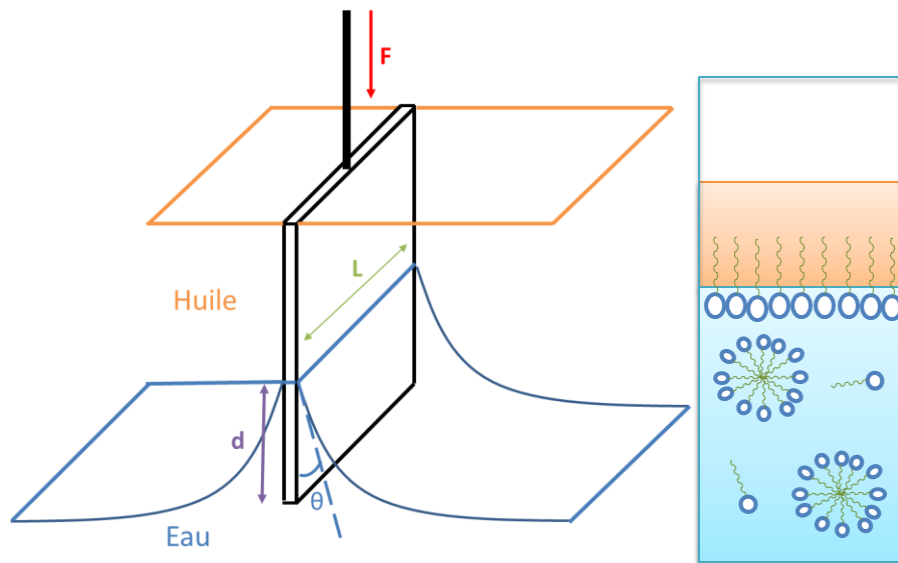


Figure 48. Schéma représentant la mesure de la tension interfaciale à l'interface eau/huile

D'un point de vue général, la tension superficielle entre l'eau et l'huile est dépendante de la température, du pH et de la nature du tensioactif. La tension à l'interface huile/eau à pH 2 à 25°C est de 44 mN.m⁻¹. La présence de tensioactif en solution permet d'abaisser cette tension. Ceci témoigne de l'absorption plus ou moins forte des tensioactifs

à l'interface et donne donc une idée sur leur capacité à stabiliser les gouttelettes d'huile dans l'eau lors de la mise en émulsion.

I.5. Rhéologie interfaciale

La rhéologie interfaciale étudie la réponse des interfaces mobiles à la déformation¹⁵. Les interfaces étudiées sont généralement de fines couches de molécules amphiphiles qui se forment entre deux phases. L'étude du comportement rhéologique à l'interface entre deux liquides non miscibles ou un liquide et un gaz peut ainsi être utilisée pour prédire la stabilité d'émulsions, de mousses et d'autres systèmes complexes. L'anneau Du Noüy est couramment utilisé pour tester les propriétés rhéologiques d'un film interfacial (Figure 49).

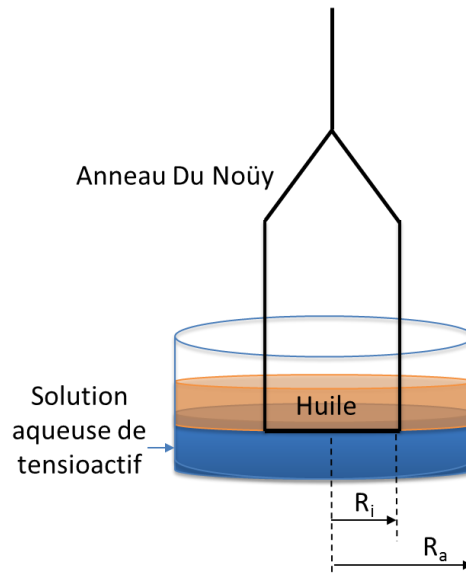


Figure 49. Schéma de l'anneau Du Noüy positionné à l'interface entre la solution de tensioactif et l'huile modèle pour des mesures de rhéologie interfaciale

Pour les mesures interfaciales, la contrainte de cisaillement interfacial (Pa.m) est proportionnelle au couple M_d .

$$(24) \quad \tau_i = A_i \times M_d$$

Avec A_i le facteur de géométrie en Pa/N.

$$(25) \quad A_i = \frac{1}{2\pi \times R_i^2}$$

Le taux de cisaillement est proportionnel à la vitesse angulaire:

$$(26) \quad \dot{\gamma} = M \times \Omega$$

Avec M le facteur de géométrie en s^{-1} .

$$(27) \quad M = \frac{2R_a^2}{R_a^2 \times R_i^2}$$

Ω (rad/s) la vitesse angulaire calculée en fonction de la vitesse de rotation n :

$$(28) \quad \Omega = (2\pi/60).n$$

Dans le cas de cette étude, l'anneau Du Noüy est placé à l'interface d'une solution de tensioactif et de l'huile modèle décrite précédemment. Au cours de l'expérience une contrainte interfaciale ou un taux de cisaillement est appliqué à une certaine fréquence à la couche interfaciale qui est formée entre le bord extérieur de l'anneau et la paroi intérieure du récipient contenant l'échantillon à tester. Les modules visqueux et élastiques interfaciaux, G_i' et G_i'' , sont alors mesurés en fonction du temps afin d'observer la formation d'un film interfacial. Le film peut éventuellement être déformé par la suite.

I.6. Diffusion de la lumière

I.6. 1) Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Le mouvement brownien représente le mouvement aléatoire des particules dans un fluide. Ainsi les plus « grosses » particules, entre deux chocs avec les « petites » particules vont être projetées à une vitesse constante en ligne droite. Ces chocs créent une énergie qui est transférée sous forme de mouvement. Cette énergie a une plus grande influence sur les « petites » particules qui auront donc une plus grande vitesse. La loi de Stokes-Einstein relie alors la vitesse de la particule et la taille de la particule par l'équation suivante:

$$(29) \quad D = \frac{k_B \times T}{6 \times \pi \times \eta \times R_h}$$

Avec:

D , la constante de diffusion ou vitesse des particules ($m.s^{-1}$)

k_B , la constante de Boltzmann ($m^2.kg.s^{-2}.K^{-1}$)

T , la température en K^{-1}

η , la viscosité du solvant ($Pa.s$)

R_h , le rayon hydrodynamique de la particule (nm)

Un appareil de mesure de la Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) est composé d'un rayon laser dirigé vers l'échantillon dilué. Le détecteur situé à 90° du rayon laser, va mesurer les fluctuations de la lumière diffusée pendant un certain temps. D'après la diffusion de Rayleigh, plus la particule est grande, plus elle diffuse de lumière, l'intensité de la lumière dépend donc de la taille de la particule. La mesure de vitesse des particules

permet de déduire le rayon hydrodynamique (R_h), la dispersité ($\mathfrak{D}$) et le profil de distribution des tailles. Cette méthode peut donc permettre dans notre cas de déterminer les tailles des micelles formées par les tensioactifs, en supposant que celles-ci soient sphériques.

1.6. 2) Diffusion statique de la lumière (SLS)

La diffusion statique de la lumière permet de déterminer la masse molaire moyenne d'un polymère en solution par mesure de la diffusion de la lumière à travers cette solution. Pour cela, un laser est envoyée à travers l'échantillon et un ou plusieurs détecteurs sont utilisés pour mesurer l'intensité de diffusion aux différents angles (Figure 50). L'appareil est calibré à une température donnée généralement avec du toluène comme c'est le cas dans cette étude. Cette normalisation par le toluène permet de s'affranchir de la mesure difficile du volume diffusant qui varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu. Pour effectuer une mesure, l'opérateur peut alors décider du balayage angulaire (entre 20 et 180°) ainsi que du pas entre chaque angle, par exemple une mesure tous les 10°. Le détecteur va alors se déplacer et les mesures seront effectuées pour chaque angle.

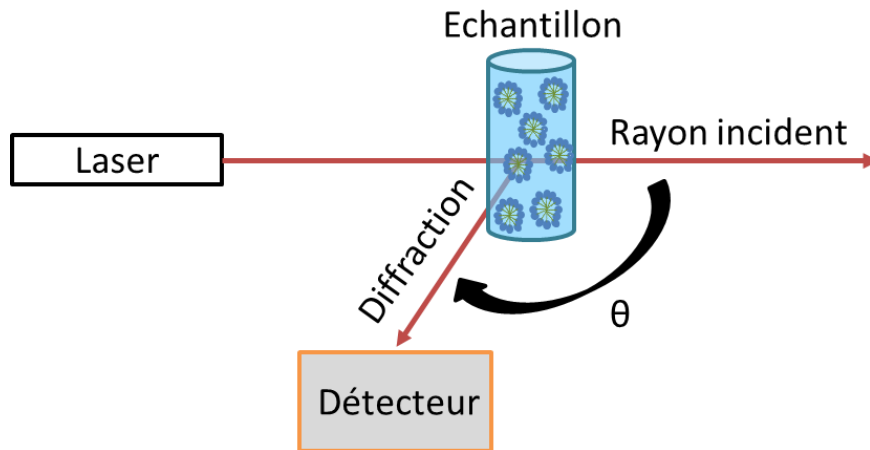


Figure 50. Schéma d'un appareil SLS avec un détecteur se déplaçant à différents angles

On définit alors q (m^{-1}) comme le vecteur de diffusion de la lumière polarisée verticalement en fonction du sinus de l'angle de mesure (θ), de l'indice de réfraction n du solvant et de la longueur d'onde λ du laser (633 nm).

$$(30) \quad q = \frac{1}{\lambda} \times 4\pi^2 n_{\text{solvant}} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Le quotient de Rayleigh $R(\theta)$ de la solution est défini selon l'équation suivante en fonction des paramètres du toluène ($n_{\text{toluène}} = 1.496$ et $R_{\text{toluène}} = 1.35 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$) et des intensités mesurées de l'échantillon ($I_{\text{échantillon}}$), du solvant (I_{solvant}) et du toluène ($I_{\text{toluène}}$) :

$$(31) \quad R(\theta) = \frac{I_{\text{échantillon}}(\theta) - I_{\text{solvant}}(\theta)}{I_{\text{toluène}}(\theta)} \left(\frac{n_{\text{solvant}}}{n_{\text{toluène}}} \right)^2 \times R_{\text{toluène}}$$

Généralement, pour un échantillon, on effectue des mesures sur une gamme de concentrations C de 0.1 à 10 g.L⁻¹. Lorsque les particules sont petites de sorte que leur rayon de giration R_g vérifie $q.R_g < 1$, l'intensité mesurée à chaque angle ($I_{\text{échantillon}}(\theta)$) est alors reliée à la concentration, à la masse molaire apparente M_a de l'échantillon et au rayon de giration R_g par l'approximation de Zimm:

$$(32) \quad \frac{KC}{R(\theta)} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) \times \left(1 + \frac{q^2 \times R_g^2}{3} \right) = \frac{1}{M_a} \times \left(1 + \frac{q^2 \times R_g^2}{3} \right)$$

La constante K est différente pour chaque échantillon puisqu'elle dépend du dn/dc représentant la variation de l'indice de réfraction (n) de la solution en fonction de la concentration. Celui-ci peut être mesuré à l'aide d'un réfractomètre différentiel:

$$(33) \quad K = \frac{4\pi^2 n_{\text{solvent}}^2}{\lambda^4 N_a} \times \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)^2$$

Avec N_a , le nombre d'Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

Le second coefficient du Viriel A_2 traduisant les interactions entre les particules est négligeable à faibles concentrations. Une double extrapolation à angle zéro et concentration nulle (échantillons dilués) permet d'obtenir la masse molaire vraie M_w et le rayon de giration R_g . Expérimentalement parlant, $M_a(C)$ est déterminée avec l'inverse de l'ordonnée à l'origine de la droite $\frac{KC}{R(\theta)} = f(q^2)$ pour chaque concentration. La masse vraie de l'échantillon à concentration nulle est alors déterminée avec l'ordonnée à l'origine de la droite $\frac{1}{M_a} = f(C)$. La valeur de la masse molaire vraie permet le calcul du nombre d'agrégation. Dans le cas de micelles de tensioactifs, ce nombre équivaut au nombre de tensioactifs par micelles:

$$(34) \quad N_{agg} = \frac{M_w}{M_{unimère}}$$

Le rayon de giration R_g est quant à lui déterminé à l'aide des coefficients directeurs des droites $\frac{KC}{R(\theta)} = f(q^2)$ avec une pente égale à $\frac{R_g^2}{3 M_a}$. Une valeur de R_g n'est considérée fiable que si elle est supérieure à 20 nm. Le rapport R_g/R_h donne alors des informations sur la forme des particules.

Dans le cas où $q.R_g > 1$ sur toute la gamme d'observation, l'approximation de Zimm n'est plus applicable. Ainsi, seules des informations sur la forme des particules peuvent être obtenues.

II. Evaluation de stabilité d'émulsions

II.1. Mise en émulsion

Afin de simuler le moulin colloïdal (émulbitume) utilisé classiquement pour la mise en émulsion du bitume, un moulin ULTRA-TURRAX est utilisé pour mettre en émulsion une huile modèle. En effet, la dispersion avec un ULTRA-TURRAX est basée sur le principe du rotor-stator. Le rotor est mis en mouvement avec une vitesse tangentielle élevée. Cette rotation produit une aspiration qui aspire le fluide vers le rotor et le presse vers l'extérieur à travers les dents du stator. Les gouttelettes d'huiles sont alors dispersées dans la phase dispersante, l'eau. Le moulin ULTRA TURRAX peut atteindre des vitesses jusqu'à 30 000 tr.min⁻¹. Cependant, contrairement à l'émulbitume où les deux phases entrent en contact à l'intérieur du moulin et en ressortent sous forme d'émulsion, avec l'ULTRA TURRAX il faut mélanger les deux phases et plonger le mobile à l'intérieur de la solution afin de créer l'émulsion. La vitesse de rotation, la concentration de chacune des phases, le temps de cisaillement ainsi que la température des deux phases sont donc des paramètres importants sur lesquels jouer pour obtenir une granulométrie fixée.

Une étude préliminaire a donc été menée avec le tensioactifs B de référence. Tout d'abord, les granulométries d'émulsions réalisées à l'émulbitume l'une avec l'huile modèle et l'autre avec le bitume, ont été comparées. On remarque que le bitume donne des granulométries plus faibles que l'huile mais avec des dispersités plus élevées. La suite de l'étude a donc consisté à chercher les conditions d'utilisation de l'ULTRA-TURRAX (vitesse, temps, températures) permettant d'obtenir des granulométries les plus proches de ces valeurs.

Composition de la phase organique	Température de la phase huile (°C)	Pourcentage de la phase huile	Granulométrie (µm)	Dispersité
CARTER 220	40	60	10	0.21
Bitume 160/220	150	69	6.3	0.31

Tableau 9. Résultats obtenus avec l'émulbitume à différentes compositions et températures de la phase organique

Entre 9 000 et 15 000 tr.min⁻¹ les émulsions obtenues (60/40 h/e, 0.2% de B) sont très grossières (entre 20 et 40 µm). Finalement, 21 000 tr.min⁻¹ semblent être le meilleur compromis pour imiter au mieux le moulin colloïdal.

On remarque également qu'un échauffement se produit lors du cisaillement. C'est pourquoi, l'influence de la température et donc du temps de mixage a été étudiée sur une émulsion 60/40 (huile/eau) avec le tensioactif B, (Tableau 10).

Température (°C)	Temps (s)	Granulométrie (μm)
35	30	14,7
35	60	11
35	90	10
40	120	9
50	300	7

Tableau 10. Evolution de la granulométrie en fonction du temps et de la température dans une émulsion 60/40 (h/e) avec 0.2% de tensioactif B

Il a ainsi été montré que pour obtenir des granulométries intéressantes et comparables aux résultats de l'émulbitume, 5 min de cisaillement à 21,000 tr.min⁻¹ sont nécessaires. Ces conditions sont donc fixées pour la suite de l'étude.

II.2. Principe du Turbiscan

Le Turbiscan est un appareil de mesure fondé sur la diffusion multiple de la lumière (MLS) permettant d'identifier et de suivre les phénomènes de déstabilisation (migration ou variation de taille) de systèmes complexes tels que les émulsions. La tête de lecture scanne pas à pas verticalement une cellule cylindrique (16 * 125 mm) tout en émettant un faisceau lumineux dans le proche infrarouge ($\lambda = 860 \text{ nm}$ tous les 40 μm) contenant l'échantillon. A chaque pas, la lumière rétrodiffusée et celle transmise par l'échantillon sont collectées par des détecteurs placés respectivement à 135° et 0° par rapport au faisceau incident (Figure 51). Les profils de rétrodiffusion et de transmission obtenus représentent alors l'évolution des phénomènes de déstabilisation tels que la clarification, le crémage, la coalescence ou la sédimentation sur toute la hauteur de l'échantillon. La rétrodiffusion (R) étant inversement proportionnelle au diamètre des particules (35), la coalescence peut facilement être identifiée. Les cinétiques de ces différents phénomènes de déstabilisation peuvent être déterminées en effectuant un suivi sur plusieurs minutes, heures ou jours. Une absence d'évolution témoigne alors de l'excellente stabilité du système.

$$(35) \quad R = \left[\frac{1}{\lambda^*} \right]^2$$

$$(36) \quad \lambda^* = \frac{2d}{3\phi(1-g)Q_s}$$

d: diamètre des particules (mm)

Qs: facteur d'efficacité d'extinction

ϕ : fraction volumique (huile)

g: facteur de symétrie

λ : libre parcours moyen des photons (mm)

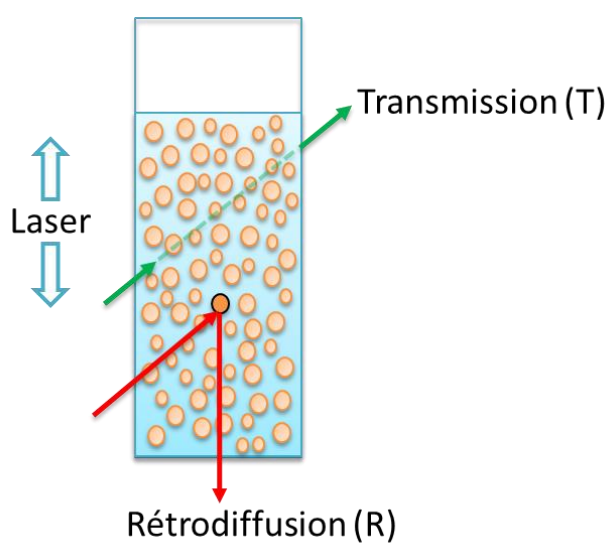


Figure 51. Schéma du principe du Turbiscan

Dans le cas de cette étude, les différents tensioactifs seront utilisés pour mettre en émulsion l'huile modèle. Par la suite, les efficacités de ces tensioactifs pourront être évaluées en comparant les cinétiques de déstabilisations de leurs émulsions respectives.

Surfactant properties of chemically modified chitooligosaccharides and their potential application in bitumen emulsions

Camille Chapelle¹, Ghislain David^{1*}, Sylvain Caillol¹, Claire Negrell¹, Sylvain Catrouillet¹, Myriam Desroches le Foll², Nathalie Azéma³

¹ICGM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

²CST COLAS 4, Rue Jean Mermoz CS 30504 – 78771 Magny-les-Hameaux Cedex

³LMGC, IMT Mines Ales, Univ Montpellier, CNRS, Alès, France

KEYWORDS: Oligochitosan surfactant, amphiphilic structures, interfacial measurement, micellar shape, oil in water emulsions, stability

I. Abstract

Chitooligosaccharides (COS) with degree of polymerization (DP) from DP5 to DP15 have been modified with different lipophilic chains, from fatty epoxide to fatty acids. Their interfacial properties such as critical micellar concentrations (CMC), interfacial rheology and interfacial tension were studied to establish structure-properties relationships. Their ability to self-assemble as well as their micellar shape were assessed by light scattering (dynamic DLS and static SLS) and transmission electron microscopic (TEM) analyses. Finally, their emulsion stabilities and rheological properties were evaluated with Turbiscan and allow the conclusion that 1% (w/w) DP10 oligomers modified with Tall oil fatty acid (TOFA) was able to stabilize oil in water emulsions (60/40 w/w) for at least 55 days.

II. Introduction

Surfactants, occurring as simple molecules or more complex polymers, are capable of reducing surface and interfacial tensions between two immiscible phases i.e., water-oil, liquid-gas, and solid-liquid. They find applications in many aspects of our everyday life such as food, medicine, cosmetics, detergents, paints, road engineering etc ¹⁶. In the last decades, efforts have been made to provide alternatives to surfactants derived from fossil

resources. Biosurfactants¹⁷ such as lipopeptides, sophorolipids¹⁸, fatty acids/neutral lipids, polymeric surfactants and seed oil compounds are already available on the market^{19 20}.

Cationic surfactants are defined by a positively charged hydrophilic head group²¹. They are often composed of quaternary ammonium that can be synthetic²², fully natural such as glycine betaine^{23 24} but can also result from chemical modification of biobased moieties²⁵. The toxicity of cationic amphiphilic units remains the main problem²⁶, hence there is a growing interest in developing ecologically friendly and biocompatible cationic surfactants using natural amino resources. Amino acids based surfactants showed great interest with reduced toxicity^{27 28} and high potential in various applications²⁹. Nevertheless, amino-acids are mainly produced for animal feeding, which is why it is interesting to look for other natural amines.

Chitosan is a positively charged polysaccharide with a potential use in several areas, including applications in cosmetics, biotechnology and medicine^{30 31}. It is a natural nontoxic resource of potentially cationic free amines for which emulsifying properties have already been investigated³². It was shown that crude chitosan might be used to partially substitute industrial surfactants (up to 60% replacement) for bitumen emulsions³³. Its suitability as Pickering emulsifier was also demonstrated several times^{34 35 36}. In those examples, chitosan surfactants are high molar mass polysaccharides that are naturally amphiphilic. Chemical modifications may be considered to achieve even more efficient amphiphilic structures^{37 38}. Nevertheless, high molar masses chitosan shows high viscosity in solution and low reactivity. When reducing the molar mass, chitooligosaccharides (COS) can be obtained³⁹. COS are easier to functionalize in order to obtain amphiphilic structures. Generally, COS are modified with fatty acids and used to form micelles for drug delivery^{40 41} or as described in our previous work, with fatty epoxide⁴² and could find applications in other areas such as bitumen emulsions.

Bitumen emulsions are composed of an oily phase composed of bitumen (40 to 80% (w/w)) and an aqueous phase (20 to 60% (w/w)) that contains a surfactant (liquid or powder, between 0.1 and 2.5% (w/w))^{43 44}. The bitumen is sheared through a colloid mill to disperse bitumen droplets of 1 to 20 μm in the aqueous phase. Nowadays, bitumen emulsions are mainly cationic. In our previous work⁴², we established the reaction conditions for the synthesis of chitosan-based surfactants from COS and fatty epoxide. We also showed their potential application in oil in water emulsion. In this study, the physicochemical properties of those sustainable chitosan-based surfactants were evaluated with surface and interfacial tension measurements combined with rheological study. Micellar shape was also investigated. Their suitability to emulsify oil has been further enhanced through deeper evaluation of destabilization processes. These potentially

biobased surfactants have never been investigated beforehand and will hopefully be able to replace surfactant from petroleum in concentrated "oil in water" emulsions.

III. Material and method

III.1. Material

Chitosan DA around 15% CH30 (Mw 30 kg.mol⁻¹) was purchased from Glentham Science and used as received; cardanol glycidyl ether was purchased from Cardolite; tall oil fatty acid (TOFA) was supplied by industrial partners (Colas); butyl glycidyl ether (C4), octyl/decyl glycidyl ether (C9), hexadecyl glycidyl ether (C16), triethylamine (Et₃N), hydroxylamine hydrochloride (NH₂OH), acetic acid (AcOH), sodium nitrite (NaNO₂), Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), N-hydroxysuccinimide (NHS), trimethylsilyl-3-propionic-2,2,3,3-D4 acid sodium salt, sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), and acetone (>98%) were purchased from Sigma and used without purification; DMSO and Methanol (MeOH) were purchased from VWR, engine oil Cirkan C 220 was purchased from Total.

III.2. Functionalization of COS

III.2. 1) *Synthesis of COS-epoxide*

COS of DP5 DP10 and DP15 were obtained according to precedent work ³⁹ and functionalized with butyl glycidyl ether (C4), octyl/decyl glycidyl ether (C9), hexadecyl glycidyl ether (C16), and epoxidized cardanol according to reaction conditions established in a previous work ⁴². As demonstrated beforehand, degrees of substitution (DS) were optimized to reach the higher hydrophilic lipophilic balance (HLB) while keeping water solubility (Table 11). A brown powder was obtained for each structure.

III.2. 2) *Synthesis of COS-TOFA*

0.33 g of TOFA was dissolved in 10 mL of DMSO in the presence of 0.29 g (1.2 eq) of DCC and 0.16 g (1.2 eq) of NHS for 1 hour at 40 °C. The mixture was then added dropwise to 1 g of COS (DP5 or DP10) dissolved in 10 to 20 mL of DMSO. The solution was stirred for 24 h at 80°C. The product was then precipitated in 200 mL of cold acetone, centrifuged and washed to remove impurities, residual DCC and NHS, then solubilized in a small volume of water and precipitated again in acetone. Finally, the product is dried under vacuum for 6 hours and a brown powder is obtained (Annexe 29).

¹H NMR of DP10 + TOFA (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5): δ (ppm) 8.2-8.5 (s, H aldehydes), 7.5 (d, 8Hz, 1H, Ho1 (E)-oxime) 6.8 (d, 7Hz, 1H, Ho1 (Z)-oxime), 5.3-5.5 (m, 6H, Hi Hh), 4.0-4.7 (m, 1H Ho2, 1H, Ho3, 1H, Ho5), 3.4-4.0 (m, 1H H2'', 1H, H3; 1H,

H4; 1H, H5; 2H, H6; 1H, Ho4 and 2H, Ho6), 3.1 (m, 1H, H2), 2.5 (m, 4H, He, Ha), 2.0 (s, 3H, HAc), 1.5 (m, 2H, Hb), 1.3 (m, 8H, Hc), 0.8 (m, 3H, Hd), 4.8 (s, HOD) (SI 2).

III.2. 3) Characterizations

The obtained products were characterized by ^1H NMR spectroscopy ⁴² to confirm functionalization and to calculate the substitution degree (DS) (Table 11). COS surfactants are named in function of sizes of the oligomer chain (DP5 to DP15) and of the hydrophobic chain (C4, C9, C16, Cardanol and TOFA). For example, DP15C4 is a surfactant made with an oligomer of 15 units functionalized with butylglycidyl ether C4.

HLB were calculated as follows with M_H and M_L the molar mass of hydrophilic and lipophilic part respectively (37). M_H is actually dependent on the DP as it represents COS molar masses and M_L represents the fatty moieties (C4, C9, C16, Cardanol and TOFA) grafted onto COS. Maximum DS and HLB are presented in Table 11.

$$(37) \quad HLB = \frac{M_H}{M_H + DS \times M_L} \times 20$$

Atom economy (AE) was calculated by dividing the molar mass of the product by the sum of the molar masses of all substances produced in the stoichiometric equation ⁴⁵. For example, in the case of reactions of DP10 and DP5 with C4, C9 and C16, Et_3N was used. At the end it generates additional waste with unreacted products. Likewise, TOFA based surfactant were synthesized using DCC and NHS coupling agent, which also generates waste. AE are presented in Table 11.

$$(38) \quad AE = \frac{M_t}{M_t + M_{FC} + M_{add}} \times 100$$

With M_t , M_{FC} , M_{add} the molar mass of the surfactant, molar mass of the unreacted fatty chains, molar masses of additives (Et_3N , DCC or NHS) respectively.

Surfactant	DS (%)	Number of equivalent of fatty chains/NH ₂ *	HLB	AE (%)
DP15C4	80	3	19.2	53
DP15C9	47	3	19.3	38
DP15C16	11	3	19.7	25
DP5C4	100	1	17.3	93
DP5C9	39	3	18.3	39
DP5C16	25	3	18.4	30
DP5Cardanol	12	3	19.0	24
DP5TOFA	12	1	19.2	45
DP10C4	90	3	18.7	53
DP10C9	45	0.75	18.9	76
DP10C16	12	1	19.6	47
DP10Cardanol	15	3	19.2	20
DP10TOFA	15	0.3	19.3	76

Table 11. Degree of substitution (DS), Hydrophilic/Lipophilic balance (HLB) and atom economy values (AE) of COS-based surfactants

*stoichiometry of fatty chain per NH₂ of COS ⁴²

III.3. CMC and interfacial tension

The CMC and interfacial tensions at the water–oil interface of COS and modified COS solutions were determined with a Dataphysics tensiometer by using the Wilhelmy plate method. A roughened platinum plate was used. Before each measurement, the plate was rinsed with distilled water, flamed and then left to cool down. Measurements were conducted in triplicate for CMC determination. The results were reported as averaged $\pm$ standard deviation (Annexe 30).

III.4. Stacking parameter

The slope of the surface tension curve as a function of the logarithm of the concentration allows calculating the surface concentration (Γ) and determining the volume occupied by the hydrophilic head of the surfactant (a_0), according to the following equation (with N_a the Avogadro number):

$$(39) \quad a_0 = \frac{10^{20}}{N_a \times \Gamma}$$

The stacking parameter (p), linked to the micelle shape in the solution, was calculated according to equation (40):

$$(40) \quad p = \frac{V}{l_c \times a_0}$$

With

$$(41) \quad V = 27,4 + 26,9 (nc - 1)$$

$$(42) \quad l_c = 1,5 + 1,265 (nc - 1)$$

with nc the number of carbon of the fatty moiety

III.5. Static and dynamic light scattering (SLS and DLS)

Dn/dc were determined using a differential refractometer. DLS was performed on a Malvern Nanosizer ZS-apparatus equipped with a He-Ne laser operating at a wavelength of 633 nm. The solutions were filtered on 0.45 µm nylon filters prior to use. SLS measurements were performed on a LS instrument working with concentrations C from 0.1 to and 10 g.L⁻¹. Measurements were taken from 20 to 150° each 20° during 30 s.

The Rayleigh ratio, R_θ, of the solution was determined as follows:

$$(43) \quad R(\theta) = \frac{I_{sample}(\theta) - I_{solvent}(\theta)}{I_{toluene}(\theta)} \left(\frac{n_{solvent}}{n_{toluene}} \right)^2 \times R_{toluene}$$

with I_{sample}, I_{solvent}, I_{toluene} the average intensities scattered respectively by the solution, the solvent and the reference (toluene), n_{solvent} (1.333 for water) and n_{toluene}(1.496) the respective refractive indexes of solvent and toluene and R_{toluene} (1.35×10⁻⁵ cm⁻¹) the Rayleigh ratio of toluene for a wavelength λ (632.8 nm).

The intensity measured at each angle (I_{sample}(θ)) is then related to the concentration, the apparent molar mass M_a of the sample and to the radius of gyration R_g by Zimm approximation:

$$(44) \quad \frac{KC}{R(\theta)} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) \times \left(1 + \frac{q^2 \times R_g^2}{3} \right) = \frac{1}{M_a} \times \left(1 + \frac{q^2 \times R_g^2}{3} \right)$$

With K a constant and q the vertically polarized light scattering vector (m⁻¹)

$$(45) \quad K = \frac{4\pi^2 n_{solvent}^2}{\lambda^4 N_a} \times \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)^2$$

where N_a is Avogadro's number

$$(46) \quad q = \frac{1}{\lambda} \times 4\pi^2 n_{solvent} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Aggregation number was determined as followed:

$$(47) \quad N_{agg} = \frac{M_w}{M_{unimer}}$$

III.6. Microscopic analysis

Samples were observed on Transmission electron microscopy (TEM) Jeol 1200EX2 at 100 Kv. Pictures were taken by a SIS Olympus Quemesa equipped with a digital

camera with a 11 Mpixel CCD sensor. The point-to-point resolution of TEM was 0.4 nm and its resolution on gratings was 0.2 nm.

III.7. Emulsion

III.7. 1) Preparation

Motor oil was used to simulate bitumen. Cirkan 220 motor oil shows indeed the same viscosity at 40°C than bitumen at 150°C. Oil-in-water emulsions were produced as follows: surfactant was dissolved in 0.2%w HCl aqueous solution (40% (w/w) of the total emulsion). Both oil and water phases were heated at 40°C. Oil (60% (w/w) of the total emulsion) was added to the aqueous phase and blended for 5 min with an Ultraturax at 21.000 rpm.

III.7. 2) Stability

Stability of motor oil emulsions was evaluated by Turbiscan Lab ⁴⁶ for a period of 55 days maximum. Backscattering (BS) and transmission (T) are directly linked to the mean particle diameter d and ϕ the oil volume fraction (v) of the sample with r_i the internal radius of the measurement cell (μm), λ^* the photon transport length (μm), g the scattering efficiency factor and Q_s the asymmetry factor:

$$(48) \quad BS = \left[\frac{1}{\lambda^*} \right]^2$$

$$(49) \quad T = e^{-\frac{r_i}{\lambda}}$$

$$(50) \quad \lambda^* = \frac{2d}{3\phi(1-g)Q_s}$$

$$(51) \quad \lambda = \lambda^*(1 - g)$$

Emulsions were directly analyzed and also diluted 1/3 in water to speed up the destabilization process. Clarification kinetics on the first 20 minutes, average diameter and relative height of each phases were quantified for each surfactant. A destabilization index at 7 days (D7days) was calculated according to the lower clarification and oil phase formation on the top of the emulsion as follows:

$$(52) \quad D7days (\%) = 100 \times \frac{h_D + h_{oil}}{h_{Em}}$$

With h_D , h_{oil} , h_{Em} the height of the dispersion phase, oily phase after 7 days and height of emulsion at t_0 respectively.

Measurements were conducted in triplicate for one sample to evaluate standard deviation on destabilization kinetics, 7 days destabilization (D7days) and average diameter.

III.8. Surfactant toxicity

Toxicity and ecotoxicity of surfactants of interest were evaluated according to acute immobilization tests on *Daphnia magna* (NF EN ISO 6341, 2012) performed by Eurofins. This test aims at finding the concentration immobilizing 50% of the daphnia population after 24 h and 48 h (CE50). A solution of $K_2Cr_2O_7$ CE50-24h = 0,94 mg.L⁻¹ (this value corresponds to standard between 0.60 mg.L⁻¹ and 2.1 mg.L⁻¹ according to NF EN ISO 6341: 2012) is used as a reference substance. Samples were prepared by dissolving surfactants in an ultra-pure water solution of anhydrous sodium hydrogen carbonate NaHCO₃ (0.200 g.L⁻¹), calcium chloride CaCl₂ (0.260 g.L⁻¹), magnesium chloride MgCl₂, 6 H₂O (0.148 g.L⁻¹), anhydrous potassium sulfate K₂SO₄ (0.026 g.L⁻¹). 100 mg.L⁻¹ solutions were prepared and diluted as followed: 35%, 10%, 3.5%, and 1% (w/w). Tests were performed at 20 °C.

IV. Result and discussion

COS based surfactants were obtained by grafting butylglycidyl (C4), octyl/decyl (C9), hexadecyl (C16) ethers, epoxidized cardanol and C18 fatty acid (TOFA) on DP5, DP10 and DP15 oligomers (Figure 52). In the following study, interfacial properties, micellar shape of each surfactant and emulsion stability were studied in order to establish structure property relationships and evaluate their efficacy in oil in water emulsion application.

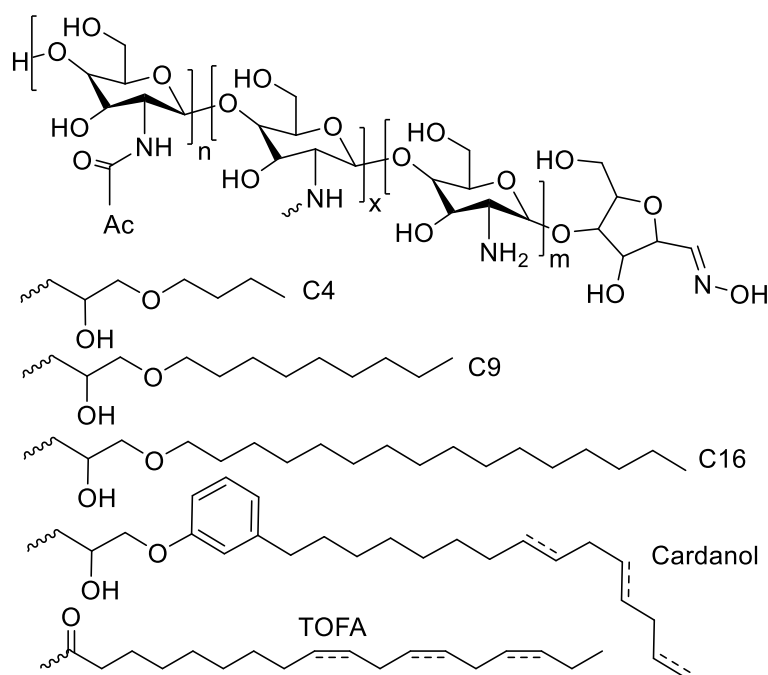


Figure 52. Possible structures of COS-based surfactants

IV.1. CMC Measurement

The critical micellar concentration (CMC) is defined at a given temperature as the concentration of surfactant from which it spontaneously self-assembles to form micelles. It is directly related to the surface tension (ST) that represents the tension existing at the interface between air and the surfactant. Cationic surfactants usually possess higher CMCs than nonionic ones. In fact, surfactants used in bitumen emulsions generally show CMCs between 0.1 and 1 g.L⁻¹. CMCs measurement of COS-based surfactant is therefore important in order to assess their suitability for the application.

First, it was observed that unmodified COSs lower the water surface tension from 71 mN.m⁻¹ to 47 to 55 mN.m⁻¹ depending on the DP. Their modification with C4 does not led to significant reduction of this tension, nonetheless, the grafting with fatty moieties (C9, C16, TOFA and Cardanol) allows reducing even further this tension between 41 and 32 mN.m⁻¹ (Table 12). As expected, COS functionalization provides a significant surfactant aspect to COS. CMC of each surfactant was measured at 25°C in aqueous solution at pH2 (Table 12). CMCs were lower than 1 g.L⁻¹ (Table 12). This was not the case for crude COS and COS modified with C4 fatty epoxide for which no CMC could be determined. C20, i.e. the concentration for which the surface tension is reduced by 20 mN.m⁻¹, was also calculated for each surfactant. It was shown that it is quite high for DP10 C16, indicating lower surfactant properties. In the same way than CMCs, C20 of both unmodified COS and C4-modified COS surfactants could not be determined, being higher than 2 g.L⁻¹.

Surfactant	CMC (g.L ⁻¹)	C20 (g.L ⁻¹)	Surface tension C= 2 g.L ⁻¹ (mN.m ⁻¹)	Stacking parameter p	Fatty chain per surfactant	Free amine per surfactant
DP15	>2	1.89±0.02	47.5±1.0	-	0	12.5
DP15C4	>2	1.27±0.02	49.1±1.2	-	10	2
DP15C9	0.576±0.008	0.21±0.02	41.4±0.3	0.14	6	6
DP15C16	0.587±0.005	0.08±0.03	41.8±0.6	0.13	2.5	10
DP5	>2	1.44±0.04	49.6±2.8	-	0	3
DP5C4	>2	>2	53.0±0.3	-	3	0
DP5C9	0.698±0.027	0.04±0.01	36.5±0.3	0.13	1	2
DP5C16	0.792±0.098	0.07±0.08	40.4±0.7	0.14	0.7	2.3
DP5Cardanol	0.754±0.002	0.41±0.01	40.2±0.3	0.19	0.3	2.7
DP5TOFA	0.712±0.008	<0,01	33.3±0.2	0.09	0.3	2.7
DP10	>2	>2	-	-	0	7.5
DP10C4	>2	>2	52.8±1.2	-	6.8	0.7
DP10C9	0.229±0.011	<0,01	31.8±0.6	0.22	3.3	4.2
DP10C16	0.775±0.009	1.03±0.04	54.4±0.4	0.19	0.9	6.6
DP10Cardanol	0.401±0.011	0.07±0.04	41.0±0.9	0.07	1.1	6.4
DP10TOFA	0.558±0.009	<0,01	33.4±0.3	0.20	1.1	6.4

Table 12. CMC, C20 and stacking parameters values of COS-based surfactants

It is possible to assess the performance and efficiency of one surfactant over another by looking at the CMC values and its associated surface tension⁴⁷. Performance involves the adsorption capacity at interfaces and is related to surface tension, while efficiency defines the self-aggregation capacity of surfactants related to CMC. For example, when the surface tension after the CMC of a surfactant A is lower than that of a surfactant B, i.e. $\gamma_{CMC A} < \gamma_{CMC B}$, the surfactant A will be described as more efficient than B. When CMC value of a surfactant C is lower than that of a compound D, i.e. $CMC_C < CMC_D$, the surfactant C will be described as more efficient than D. In this study, we were able to classify the surfactants as follows according to their efficiency: DP10C9 > DP10Cardanol > DP10TOFA > DP15C16 > DP15C9 > DP5C9; DP5Cardanol; DP5TOFA > DP5C16 > DP10C16 and for performance: DP5C9; DP5TOFA; DP10C9; DP10TOFA > DP5C16 > DP5Cardanol; DP10Cardanol >> DP10C16 >> DP15C9; DP15C16 >> DP5C4; DP10 C4; DP15C4 >> DP5; DP10; DP15 (Annexe 31, Annexe 32, Annexe 33).

First, we can observe a relationship between CMCs and the number of fatty carbons for the same hydrophilic chain length. For example, with DP10, the ranking is DP10C9>DP10Cardanol>DP10TOFA>DP10C16 which is in agreement with their respective fatty carbon numbers and grafting efficiency i.e. 30 (3.3 C9 chains), 23 (1.1 Cardanol), 20 (1.1 TOFA), 14 (0.9 C16). In addition, increment of CMCs was linked to insaturation number on the fatty chains, which explains the higher values for TOFA and

cardanol surfactants ⁴⁸. With DP5 surfactants, poor grafting efficiency is reached. Their CMC values are close to each other but are higher than that of DP10s due to a larger amount of unmodified COS in the mixture. DP5 to DP15 COS modified with C4 were out of ranking with higher DS but no CMC could be measured. This means that the chain length of one graft is more important than the total number of carbons at some point and 4 carbons are not effective enough to afford surfactant properties.

The performance can also be related to the general structure of surfactants. Indeed, the performance depends mostly upon the size of the COS. Oligomers are less efficient when the hydrophilic chain is longer, i.e; DP15<<DP10;DP5. With DP10 and DP5, other factors such as DS and hydrophobic chain length have to be taken into account. Indeed, higher surface tensions are obtained for COS functionalized with C4, i.e. values rather close to COS itself. DP10C16 shows quite high surface tension similar to that of C4 based surfactants. Finally, it was shown that it is necessary to graft fatty chains with at least 9 carbons onto COS or 5 or 10 units to obtain interesting properties. Indeed, oligomers of DP5 and DP10 functionalized with C9, TOFA and Cardanol showed both competitive C20 and surface tensions. Stacking parameters were calculated according to equations (1, 2, 3 and 4) regarding to the length of the hydrophobic part (Annexe 34). Stacking parameters of surfactants were less than 0.33, enhancing the formation of direct and spherical micelles.

II.1. Interfacial tension

Interfacial tensions between motor oil (model for bitumen) and surfactant solutions were determined according to the Wilhelmy method ⁴⁹. Interfacial tension expresses the force per unit area that pulls molecules at the interface inward the liquid. In general, the efficiency of an emulsifier can be evaluated by its capacity to reduce the interfacial tension between oil and water: the lower is the interfacial tension, the higher is the water-oil affinity and the better is the surfactant stabilization of the oil-in-water emulsion. All measurements were carried out at pH 2, which is the pH of the aqueous phases in bitumen emulsions. Figure 53 shows the interfacial tension values between oil and water, crude and modified COS solutions at the water/oil interface.

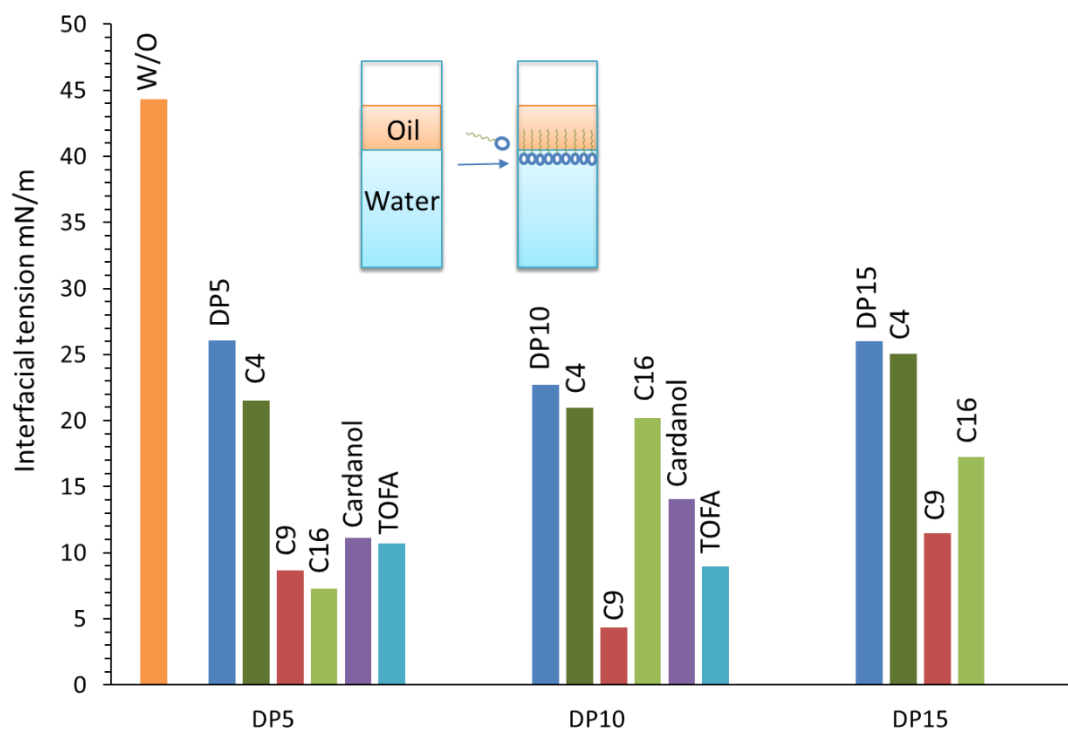


Figure 53. Interfacial tensions between oil and surfactant solutions for references (DP5, DP10 and DP15 COS) and COS-based surfactants according to DP and lipophilic part

Initially, it was shown that unmodified COS (i.e. DP5, DP10 and DP15) allow the interfacial tension (IT) to be reduced almost by half, i.e. from 44 mN.m^{-1} to 26, 24 and 26 mN/m , respectively (Figure 53 dark blue bars). It was noted that despite significant DS (Table 11), the addition of C4 had almost no impact on interfacial tension compared to unmodified COS. Thus, both ITs and CMCs values allowed concluding that C4 group is not hydrophobic enough to provide good surfactant properties to COS, whatever the DP value. Nevertheless, when increasing the hydrophobic chain (i.e. C9, C16, TOFA and Cardanol), IT values were strongly reduced. This decrease was due to the fatty chains addition that enhanced the amphiphilicity, thereby remarkably improving the surface activity of COS. It is however to be noted that this decrease was less pronounced with DP15, probably due to a higher number of free amines, leading to a stronger hydrophilic part (Table 12). High IT value for DP10C16 can be explained by a low rate of grafting, i.e. DS of 12% which reflects 0.9 C16 group per COS chain. In addition, it is a shorter chain length compared to DP10TOFA and DP10Cardanol that are made of 1.1 chains of 18 and 21 carbons respectively. However, some of the surfactants allowed decreasing TI value by almost 80%. According to TI values, COS-based surfactants showing the best performances can be ranked as follows: DP10C9 > DP5C16 > DP5C9 ≥ DP10TOFA > DP5TOFA > DP5Cardanol > DP10Cardanol.

In summary, the TI depends on different structural factors such as the DP, the size and structure of the fatty chain, the DS and the number of free amines (Table 12). Hydrophilic chain length is playing an important role in the surfactant properties. Despite high grafting efficiency, DP15 led to lower interfacial properties than DP10 and DP5. For example, DP15C9 led to higher IT, CMC and C20 values despite twice more fatty chains than DP10C9. In addition, the influence of the hydrophobic chain length was also crucial. Indeed, C4 based surfactants showed poor interfacial properties despite high grafting efficiency. For example, DP10C4 has the same content of fatty carbons, distributed differently, than DP10C9. Nevertheless, DP10C9's IT was more than twice lower than DP10C4'. In addition, with close DSs i.e. 0.9 and 1.1, and equal DPs (DP10C16, DP10Cardanol and DP10TOFA) ITs values were related to the hydrophobic chain length and structure. Indeed, C16 comes first with high IT value. It is followed by cardanol with an aromatic ring and a 15 carbons chain and finally TOFA with 18 carbons unsaturated chains. In fact, TOFA-based surfactant showed better properties than cardanol-based surfactant probably due to the steric hindrance and stiffness induced by the aromatic ring.

These results combined with previous ones led to a first selection for the rest of the study. C4 and DP15 based surfactants were not considered due to poor surface and interfacial properties. DP10C16 and DP5C16 were not used due to less interesting properties and low reaction yield.

IV.2. Static and dynamic light scattering (SLS and DLS)

When dispersed in water above CMCs, surfactants self-assemble into micelles. Their sizes and shapes can be checked by light scattering analysis. SLS allows to check the shape and calculate the molar masses of the aggregates leading to the number of surfactant per micelles. Results are presented in Table 13.

Surfactant	Rh (nm)	dn/dc	M _{unimer} (g/mol)	Mn (g/mol)	Nagg	Rg (nm)	Rg/Rh
DP5Cardanol	110	0.1528	982	25,500	27	85	0.8
DP5TOFA	130	0.1424	943	44,400	49	100	0.8
DP5C9	150	0.1795	1,077	23,000	22	170	1.1
DP10Cardanol	110	0.1920	2,028	57,000	28	77	0.8
DP10TOFA	45	0.1146	1,955	33,000	17	65	1.4
DP10C9	60	0.1652	2,275	51,300	22	75	1.3

Table 13. Molar masses, aggregation number and gyration radius of COS-based surfactants

At first, the hydrodynamic radius Rh was measured by DLS. It was shown that sizes were quite homogeneous between 110 and 150 nm except for DP10TOFA and DP10C9 with lower values, 45 and 60 nm respectively. The molar masses of the micelles were obtained thanks to Zimm approximation ((43) to (46) and (Annexe 35Annexe 36,Annexe

37, Annexe 38, Annexe 40). This led to the aggregation number N_{agg} , which represents the number of surfactant molecules inside a micelle. No significant difference was observed according to DP or lipophilic chain length with values between 17 and 28. Higher N_{agg} was obtained for DP5TOFA which demonstrated nice self-assembly properties. Both DP10TOFA and DP10 C9 with lower hydrodynamic diameters showed the same order of magnitude in molar masses and N_{agg} than the other surfactants. In addition, the radius of gyration R_g was determined by SLS analysis. R_g/R_h Ratios ≤ 0.8 mean that micelles are spherical. Micelles were observed under TEM to check their spherical shape (Figure 54). In our case, the higher R_g/R_h values of 1.1, 1.4 and 1.25 for DP5C9, DP10TOFA and DP10C9 respectively were attributed to higher dispersity in the size distribution and possible aggregation of the micelles which was illustrated by TEM analysis (Figure 54 b)). Additionally, no signal was obtained when depolarized dynamic light scattering was performed on the samples proving the absence of elongated micelles.

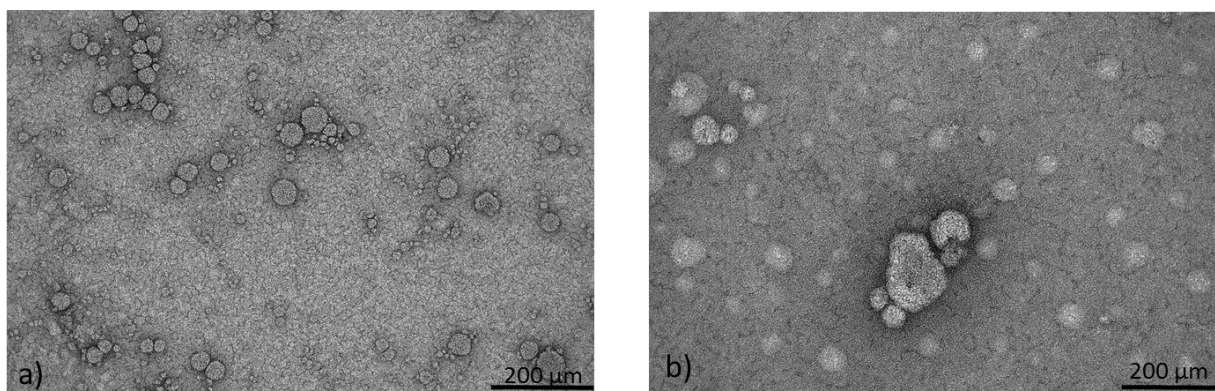


Figure 54. a) DP10-cardanol b) DP10-TOFA observed under TEM

IV.3. Emulsion stability and rheological properties

IV.3. 1) Stability over 7 days

Surfactants were used to emulsify a motor oil in water (60/40 w/w) as a model for bitumen emulsions. The stability of emulsions was evaluated with Turbiscan to highlight the destabilization processes and kinetics in order to discriminate the efficiency of COS-based surfactants. In bitumen emulsions, surfactant usually represent 0.2% (w/w of emulsions). Commercial surfactants are usually unimers constituted of one hydrophobic tail grafted onto one polar head. In our case, different grafting efficiencies, hydrophobic and hydrophilic chain lengths have to be compared. This is why COS-based surfactants were used in equimolar amount (5.48×10^{-4} mol) with their respective mass in the emulsion, calculated according to their molar masses (Table 13, Table 14).

Emulsions were at first threefold diluted to accelerate destabilization processes. Figure 5 shows the profile evolution of oil-in-water emulsion obtained with DP10 TOFA during 7 days (Figure 55 a)). Different phenomena could be identified from this evolution profile and linked to visual observation of the column (Figure 55 b)). At t_0 , emulsion represented most of the samples and foams was observed at the surface, due to the mixing process. No transmission was observed and high stable backscattering values (around 70%) were observed meaning that emulsion was homogeneous in concentration and size drops.

During the first 20 minutes, a lower clarification (LC) was underlined by backscattering profiles evolution (0 to 20 mm Figure 55 a)) but no transmission was observed. Only after several days transmission could be observed on the first millimeters (0-10 mm). Nevertheless, clear water or surfactant solution was not reached after 7 days as the maximum transmission was 70%, which is far from the transmission of the surfactant in solution, i.e. between 80 and 90% (Annexe 47).

The second phenomenon was the disappearance of the foam that can be followed at the top of the column by emulsion's front motion.

After 7 days, two distinct phases stood out (Figure 55 b)). The lower one was an emulsion with a vertical increasing concentration in oil particles (0-20 mm), called dispersion in the rest of the study, and a supernatant emulsion phase (20-32 mm). For higher destabilization, this supernatant can be divided into two parts: a first layer (20-26 mm) with a very high concentration of oil particles (BS increases as a consequence of oil transfer from dispersion phase to supernatant) and a second layer mainly made of oil (26-32 mm) due to a higher coalescence of oil particles.

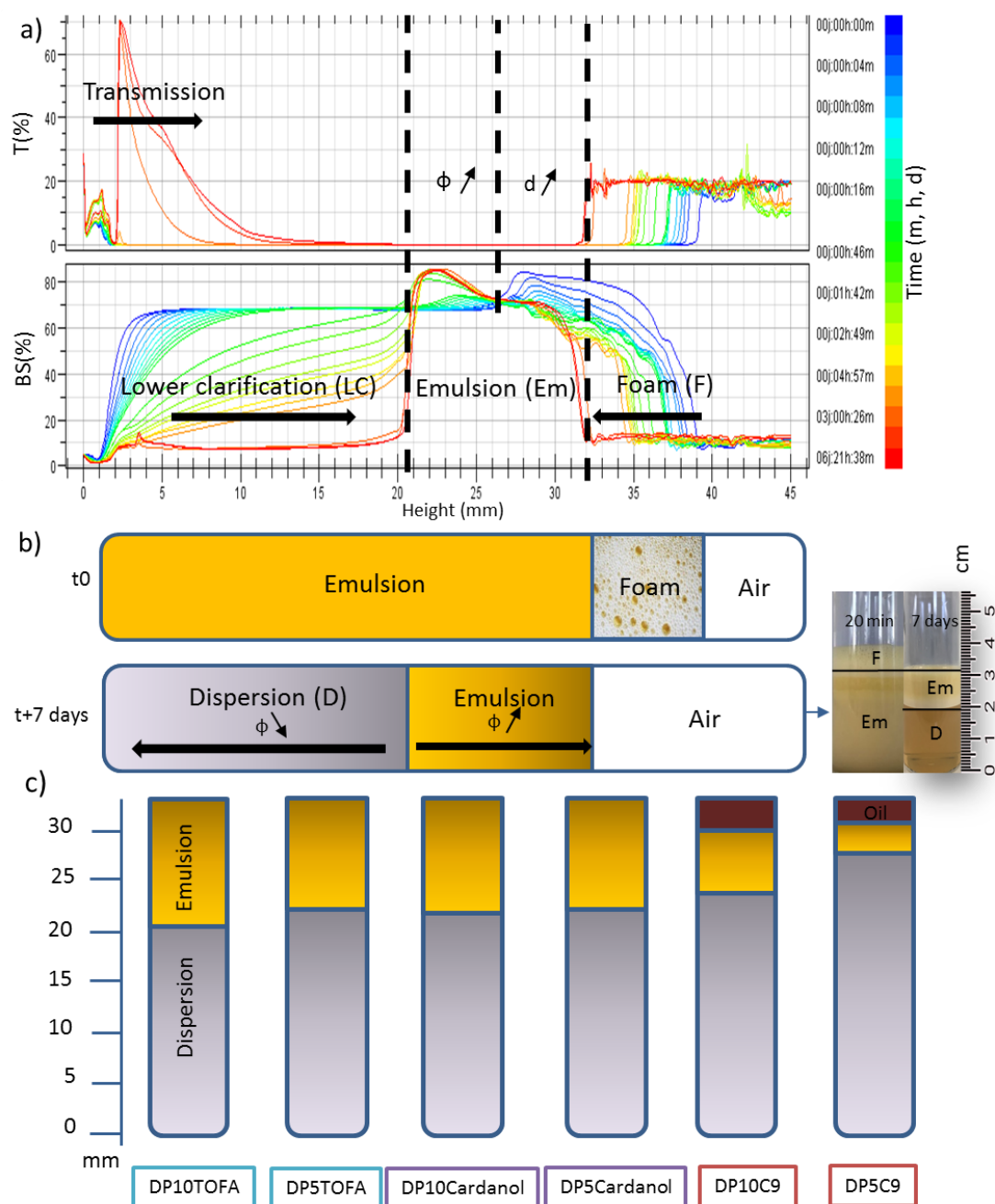


Figure 55. a) Example of Turbiscan profiles evolution as a function of time for DP10TOFA during 7 days (indicated by different colors, from blue to red) and destabilization phenomenon identification b) Pictures and horizontal representation of DP10TOFA emulsion column at t_0 and after 7 days c) Representation of COS-based surfactant emulsions column after 7 days.

Emulsions made with DP5TOFA, DP10Cardanol and DP5Cardanol showed the same profiles than that of DP10TOFA (Annexe 43Annexe 44Annexe 45) with more or less 20 millimeters of dispersion after 7 days (Figure 55 c)). However, DP5C9 and DP10C9 showed higher destabilization with an additional upper oily phase (Annexe 41 Annexe 42).

Surfactant	Mass of TA (% emulsion)	$d_{\text{initial}} (\pm 0.7 \mu\text{m})$	Clarification	
			kinetics (± 1.6 mm/h)	D7 days (%)
DP10 TOFA	1.08	9.8	20.9	64
DP10 Cardanol	1.13	13.1	35.3	66
DP5 Cardanol	2.47	11.5	50.4	68
DP5 TOFA	1.75	10.3	27.0	68
DP10 C9	1.26	11.8	30.6	80
DP5 C9	0.58	25.4	124.6	90

Table 14.. Mean diameters, clarification kinetics and destabilization index at 7 days of emulsions stabilized with COS-based surfactants (determined with Turbiscan Lab).

The destabilization index at 7 days (D7days) was calculated according to the lower clarification and oil phase formation on the top of the emulsion. As a result, DP10C9 and DP5C9 showed higher D7days than oligomers modified with TOFA or Cardanol, i.e. 80-90% as opposed to 64-68% respectively.

Clarification kinetics can be determined from the peak width evolution versus time (Annexe 46) curve (slope from the origin during the first 20 min). This peak width was measured in delta mode (Annexe 43) corresponding to the subtraction of the first profile from following profiles. Clarification kinetics for each surfactant are given in Table 4. Mean diameters can also be calculated from each of the profiles. It was shown that mean diameter of the particles of oil is directly linked to the destabilization kinetics. In fact, it is well known that the granulometric distribution plays an important role in emulsion stability. In the case of bitumen emulsions, particles sizes close to 10 μm are usually reached^{50 51}. This relationship was confirmed with COS-based surfactants with destabilization kinetics steadily increase with diameter. According to kinetics of destabilization, efficiency of COS-based surfactants followed this order: DP10TOFA> DP5TOFA> DP10C9> DP10Cardanol> DP5Cardanol >>DP5C9. DP5C9 destabilization was fast, i.e. six time faster than DP10TOFA. In addition as mentioned beforehand, an upper phase highly concentrated in oil appeared. DP10 C9 destabilization kinetics was correct but the upper oily phase formed, highlighting an additional destabilization process (80%). DP10TOFA and DP10 Cardanol showed the lower destabilization ratio with 64 and 66% respectively followed by DP5TOFA and DP5Cardanol with 68%. Finally, despite better interfacial properties, DP5C9 and DP10C9 did not seem to perform well as COS-based surfactant for oil-in-water emulsion stabilization. In fact, DP10C9 bears approximatively 27 fatty carbons

divided on three C9 grafts against one 18 carbons chain for DP10TOFA (Table 12). In other words, the chain length but not the number of fatty carbons seems to govern the emulsion stability. Higher surfactant concentration and/or lower oil concentration could be considered to increase the stability using C9 COS-based surfactants. Cardanol COS-based surfactant showed little less interesting properties than TOFA ones despite the aromatic cycle but are competitive. It might be explained by the fact that the C15 fatty chain governs the interfacial properties of cardanol COS-based surfactants. All this data were gathered on radar diagram for more clarity (Figure 56) with the best values on the edge of the web. This diagram confirmed that DP10 surfactants show better properties than their DP5 analogues and that C9 surfactants are not homogeneous in term of properties.

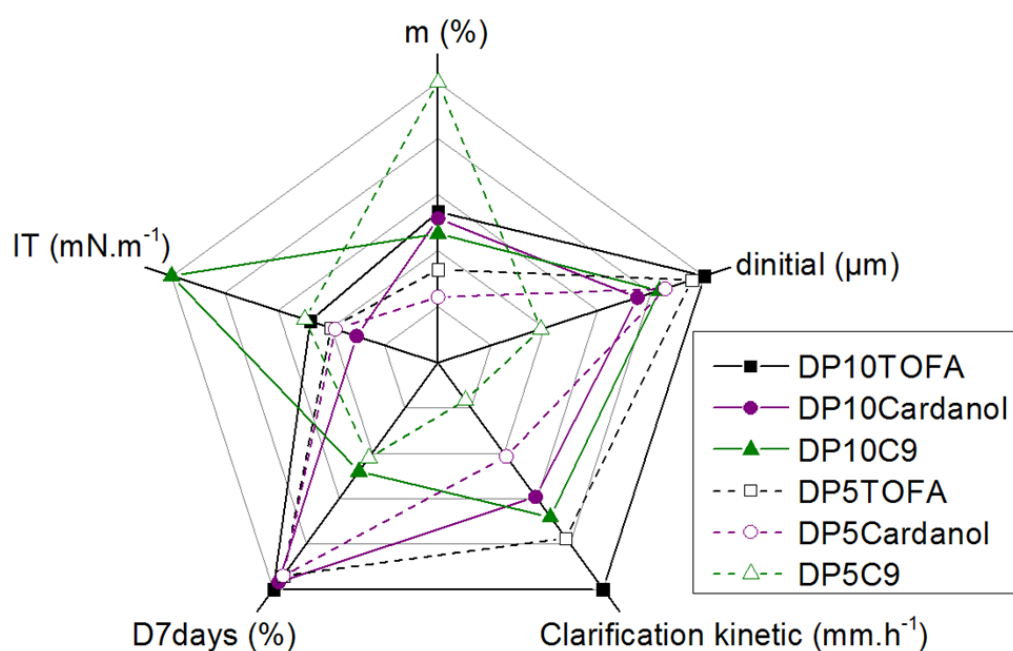


Figure 56. Radar diagram of DP10 and DP5 based surfactant

IV.3. 2) Interfacial and bulk rheology

It was shown beforehand that DP5 surfactant showed less interesting properties than their DP10 analogues. This is why, going further, the characterizations were focused on DP10 surfactants. It was shown previously that DP10 Cardanol and DP10TOFA showed the smaller destabilization (D7days) values. Despite high D7days, DP10C9 showed interesting interfacial and surface tensions properties. Consequently, characterizations of DP10 surfactants were complemented by interfacial rheology to get more insight on the results previously obtained. Indeed, interfacial rheology depends on interfacial adsorption and intermolecular interactions and can testify of the capacity of the surfactant to stabilize

the emulsion. Adsorption, aging and structural re-organization of the surfactants at the oil water interface was evaluated by interfacial rheology through the Du Noüy ring method ⁵².

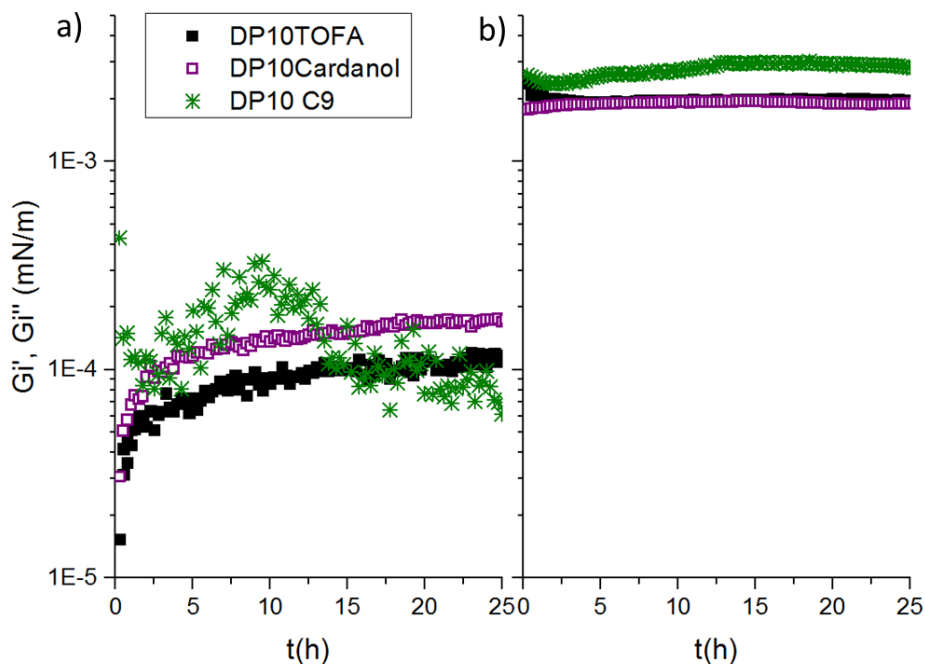


Figure 57. Evolution over time of a) interfacial elastic moduli G_i' and b) interfacial viscous moduli G_i''

At first, interfacial rheology measurements were performed at pH2 in water solutions and DP10 solutions to have a reference (Annexe 48). In both cases, the elastic moduli was not stable over time which demonstrates a liquid like behavior. On the contrary, it was showed that the interfacial storage moduli (G_i') of the interface formed between DP10TOFA or DP10Cardanol solutions (2 g.L^{-1}) and motor oil increases (from 10^{-5} to $10^{-4} \text{ mN.m}^{-1}$) over several hours to reach a plateau after 24 h (Figure 57). This phenomenon was already described before in the literature with chitosan-silica based Pickering emulsions ³⁶ and corn fiber gum emulsifier ⁵³. This indicates the formation of a strong interfacial layer between oil and surfactant solutions. Indeed, the adsorption of the surfactant at the oil-water interface leads to significant increase of the elastic modulus. With DP10C9, the interfacial elastic modulus was not stable over time. In fact, at first it shows promising properties with an increase of the G_i' . Over time, no plateau was reached and the modulus started to decrease instead. This means that the interfacial film is not strong enough and breaks over time. In addition, the viscous modulus was measured (Figure 57 b) for all surfactants. DP10Cardanol and DP10TOFA showed lower G_i'' compared to DP10C9 (Figure 57 b)) and DP10 solution and water itself (Annexe 49). This is in accordance with the previous observation. Indeed, the viscous modulus is higher because of the interfacial gel weakness testifying a liquid like behavior. At the end,

DP10Cardanol showed little higher interfacial storage modulus than that of DP10TOFA solutions, i.e. $1.5 \cdot 10^{-4}$ and $1.1 \cdot 10^{-4}$ mN.m⁻¹ respectively which can be translated as a stronger affinity between oil and water with DP10Cardanol.

In the end, DP10TOFA and DP10Cardanol were confirmed to be the best candidates for emulsion stabilization. Bulk rheology of emulsion, using 1 and 1.1% w/w of DP10TOFA and DP10Cardanol respectively, were therefore performed to gain more insights on the emulsion maturation in time through viscosity measurement.

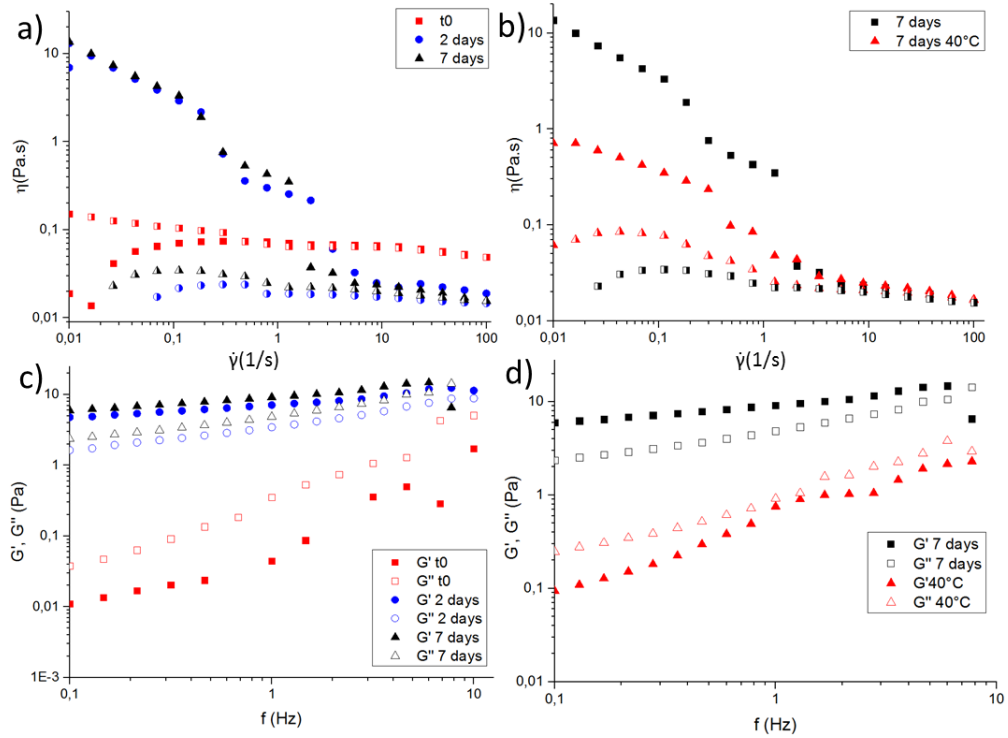


Figure 58. a) Viscosity according to shear rate after 0, 2 and 7 days b) Viscosity according to shear rate at 20°C and 40°C c) Elastic (G') and viscous (G'') modulus according to frequency after 0, 2 and 7 days d) G' and G'' according to frequency at 20°C and 40°C of DP10TOFA (1% w/w) 60/40 w/w emulsions with half-filled and filled buttons (a and b) representing decreasing and increasing share rate respectively

The aim of this study was to evaluate the evolution of the rheological properties of the emulsions over 7 days. First, it was shown that both surfactants led to emulsions with close viscosity at low shear rate, 0.1 and 0.4 Pa.s, respectively. Then, it was shown that viscosity of emulsions increased over time. Indeed, at low share rate, viscosity values after two days were 10.5 and 7.5 Pa.s respectively. No significant evolution was observed between 2 and 7 days as emulsions were quite stable. This increase of the viscosity over 2 days can be linked to the interfacial rheology measured beforehand. Indeed, it was shown above that the organization of surfactants at the oil-water interface is a long process aging

for at least 24 h. This can explain the viscosity changes over time during the first two days as particles may re-organize to reach a most stable state. This was also confirmed by frequency sweep measurement (Figure 58 c)). Indeed, at t_0 , the viscous modulus (G'') is higher than the elastic modulus (G') inducing a liquid like behavior. After 2 days, G' value increased quite importantly and gets higher than G'' , droplets surrounded by surfactant leading to emulsion thickening. An intersection point can be observed at high frequency witnessing gel breaking. The same behavior was observed for both surfactants but DP10TOFA emulsion showed higher G' and G'' values at the end. After 7 days, no further evolution of both elastic and viscous modulus was observed. In addition, it was shown that the aged emulsions were shear-thinning. Indeed, the viscosity is getting lower when increasing the shear rate. Interestingly, when decreasing the shear rate (half-filled buttons) afterwards, the viscosity of the non-aged emulsion (at t_0) was reached again (Figure 58 a)). This means that the thickening phenomenon of the emulsion is reversible upon shearing. This is an important property for emulsion dispersion and application. Nonetheless, after 5 days, the viscosity is back to higher values which means that after a certain time, particles tend to aggregate again and lead to emulsion thickening.

Increase of viscosity over time is a conventional phenomenon in bitumen emulsions. To make the emulsion fluid again, the emulsion can be heated. In our case, we heated both emulsions at 40°C. It was shown for DP10TOFA emulsions that the heating led to lower viscosity at low shear rate (Figure 58 b)). The fluidity was also confirmed by frequency sweep. Indeed, lower modulus was obtained and a liquid behavior was observed with $G'' > G'$ (Figure 58 d)). This means that an increase of the temperature allows reaching lower viscosity without mixing. When mixing, even lower viscosity can be obtained (increasing share rate Figure 58 b)). In the case of DP10Cardanol emulsion, the viscosity is higher with the temperature (Annexe 50 b)). In addition, the decreasing share rate showed the same behavior that increasing share rate which means that the interactions were formed again in a short period of time. The gel like behavior is stronger with higher G' values and intersection point at higher frequency. Those results assess the thickening effect of DP10Cardanol surfactant with temperature.

IV.3. 3) *Stability over 55 days*

At the end, both DP10TOFA and DP10Cardanol showed interesting properties in emulsion. DP10Cardanol show thickening properties that was not sought in this case and showed Atom Economy (AE) value more than twice lower than DP10TOFA one (Table 11). Consequently, DP10TOFA at 1% w/w was chosen for the last part of the study.

It was used to emulsify motor oil to evaluate the stability over time (Figure 59). It was shown that lower clarification happened during the first 48 hours to reach 22% of destabilization. In this case, 85% transmission was reached for the entire height of the clarification phase. This means that the lower phase is constituted of a DP10TOFA solution in water between 0.1 and 2 g.L⁻¹ (Annexe 47). After 2 days, no significant evolution was observed. This evolution is interesting as it can be correlated with interfacial rheology measurement. Indeed, it was shown above that the organization of surfactants at the oil-water interface is a long process aging for at least 24 h. At the same time, an increase of the mean diameter was shown, from 6.9 to 8.4 μm in the first two days. This increment can be linked with the previously measured viscosity increase over two days. Indeed, granulometry has a huge impact on emulsions viscosity and coalescence leads to higher viscosities. Measurements were stopped after 55 days and the emulsion was still stable. In addition, the emulsion was still direct and diameters were stable between 2 and 55 days.

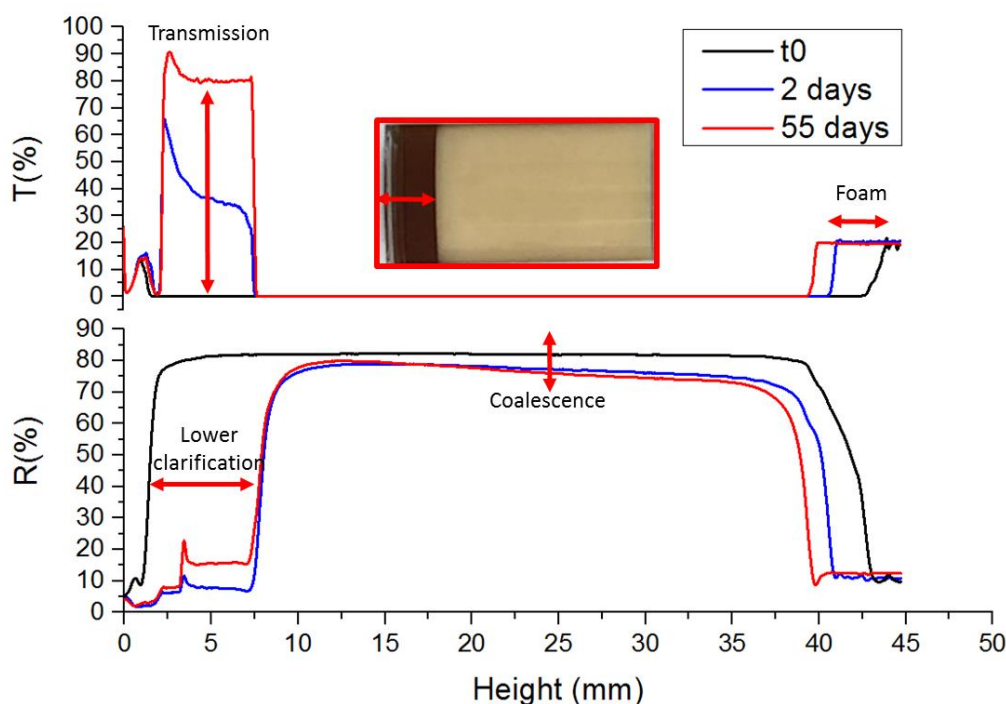


Figure 59. Transmission and backscattering according to height of the column for oil in water emulsion (60/40 w/w) made with 1% (w/w) DP10TOFA, after 2 and 55 days

IV.4. Surfactant toxicity

Ecotoxicity of surfactants i.e. DP5 and 10 functionalized with C9, TOFA and cardanol, was evaluated, according to acute immobilization tests on *Daphnia magna*. Each experiment was reproduced 4 times on a population of five daphnia. It was shown that after 48 h, the daphnia used for the test were still mobile for all the COS-based surfactants at concentration of 100 mg.L⁻¹ and below (Annexe 51). Those results assessed that COS-

based surfactants are not acute toxic/ecotoxic and their CE50-24h and CE50-48h are above 100 mg.L⁻¹.

V. Conclusion

In this work, the interfacial properties of chitosan-based surfactants were evaluated. COS of DP5 to DP15 modified with fatty epoxides (C4, C9, C16 and cardanol) or fatty acid (TOFA C18) were investigated as potential surfactants to emulsify bitumen. COS-based surfactants appeared to be nontoxic and potentially 100% biobased. It was shown that surfactants properties are dependent on both hydrophilic and hydrophobic chain lengths and grafting efficiency but mainly dependent on the fatty chain added. As a matter of fact, surfactants functionalized with C4 showed poor interfacial properties compared to longer chains. In addition, longer hydrophilic moieties such as DP15 gave lower values than its shorter analogs. Consequently, structure / property relationships were established for the entire range of synthetic surfactants. Finally, emulsifying properties were evaluated by measuring destabilization kinetics. It was proved that particles diameters were linked to the emulsion stability as follow: the smaller is the diameter, the better is the stability. The destabilization process was observed and studied for DP5 and DP10 surfactants grafted with C9, TOFA and Cardanol. At the end, DP10TOFA seemed to be the best candidate with interesting interfacial properties and ability to stabilize 60/40 oil in water emulsion for 55 days.

Conclusions du chapitre 4 et mise en relation avec les tensioactifs de Colas

Dans ce chapitre, les relations structures propriétés entre les différents tensioactifs ont pu être établies grâce à de nombreuses caractérisations. Parmi elles, les analyses de tensiométrie, surfaces et interfaciales, ont permis de confirmer les propriétés tensioactives des produits synthétisés. Ces valeurs se trouvent être compétitives avec les valeurs des tensioactifs commerciaux usuellement utilisés dans les émulsions de bitumes (voir chapitre 1 pour les structures). Par exemple, les CMC et tensions de surface ($C = 2 \text{ g.L}^{-1}$) respectives des tensioactifs A et B sont de 0.192 et 0.285 g.L^{-1} , 29.6 et 33.1 mN.m^{-1} ce qui confère à nos tensioactifs des efficacités et performances compétitives avec les références (Tableau 15). De même, les tensions interfaciales entre l'eau et l'huile obtenues sont comparables à celles de A et B. Ces résultats montrent bien que les tensioactifs que nous avons synthétisés dans cette étude sont compétitifs avec les tensioactifs commerciaux utilisés par Colas malgré des structures chimiques très éloignées.

Tensioactifs	CMC (g.L^{-1})	C20 (g.L^{-1})	Surface tension $C = 2 \text{ g.L}^{-1}$ (mN.m^{-1})	Tension interfaciale (h/e) $C = 2 \text{ g.L}^{-1}$ (mN.m^{-1})
A	0.192 ± 0.001	< 0.01	29.6 ± 0.1	3
B	0.285 ± 0.002	< 0.01	33.1 ± 0.1	6

Tableau 15. CMC, C20, tension de surface et tensions interfaciales des tensioactifs A et B utilisés par Colas

En complément de ces mesures, le tensioactif A a également été utilisé pour mettre en émulsion l'huile modèle et cette émulsion a été observée au Turbiscan, dans les mêmes conditions que les échantillons base chitosane. En fait, tous les tensioactifs analysés ont été utilisés dans des conditions équimolaires à celle de A. Lors de mise en émulsion du bitume, le tensioactif A est généralement utilisé à 0.2% en masse d'émulsion. Les tensioactifs base chitosane possédant des masses molaires supérieures, leur pourcentage massique dans l'émulsion est donc supérieur à celui de A (tableau).

Sur les échantillons dilués, le tensioactif A présente une cinétique de 14 mm.h^{-1} (Figure 60) et un pourcentage de déstabilisation de 63% . A l'exception des DP10C9 et DP5C9, qui présentent des déstabilisations plus importantes (Table 13 p233), les valeurs de D7jours obtenues pour les tensioactifs base chitosane sont également compétitives avec les résultats obtenus pour A. De plus, au niveau des cinétiques de clarification basse, on remarque que le comportement des émulsions réalisées avec les tensioactifs à base

COS sont semblables à celle réalisée avec A, excepté pour DP5C9 qui se déstabilise quasi immédiatement. Les tensioactifs d'intérêt DP10TOFA et DP10Cardanol présentent donc des valeurs compétitives avec A (Table 13 p233).

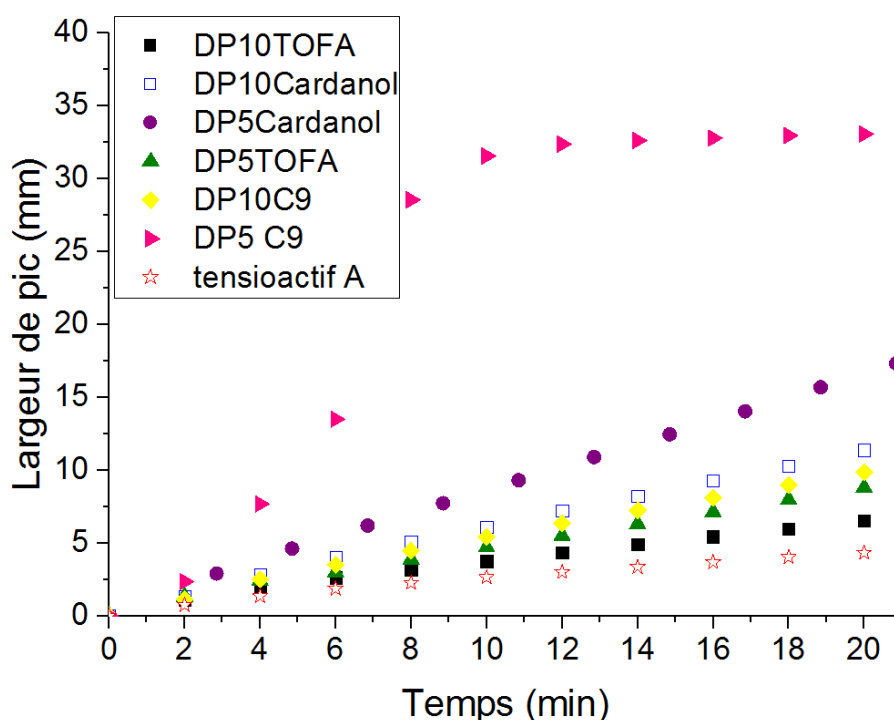


Figure 60. Evolution de la largeur de pic (Turbiscan) sur les 20 premières minutes pour chaque tensioactif

Les essais de rhéologie interfaciale ont été complétés par la mesure sur le tensioactif A qui présente le même comportement que les DP10TOFA et DP10Cardanol présentés dans la publication précédente (Figure 57). En effet, on remarque une augmentation sur 25 h du module viscoélastique G_i' jusqu'à atteindre un plateau. De plus les valeurs de ce G_i' sont très proches de celles obtenues sur les oligomères à base de COS (Figure 61). De la même façon, les module visqueux G_i'' présentent tous les trois les mêmes comportements.

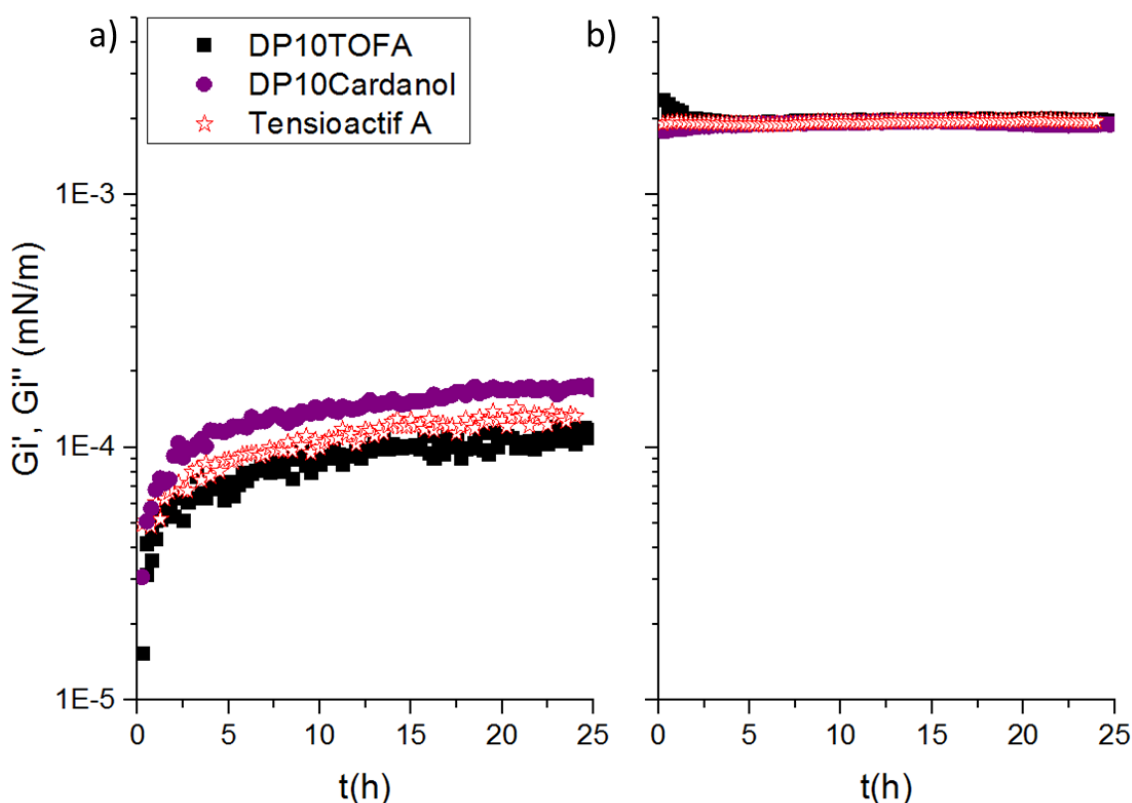


Figure 61. Evolution en fonction du temps a) du module viscoélastique interfacial G_i' et b) du module visqueux interfacial G_i''

La viscosité de l'émulsion réalisée avec 0.2% massique de tensioactif A a également été mesurée et comparée avec les valeurs obtenues précédemment pour DP10TOFA et DP10Cardanol (Figure 62). Il a ainsi été montré que les comportements rhéologiques des émulsions utilisant le tensioactif A sont similaires à ceux des émulsions utilisant le DP10Cardanol et DP10TOFA. En effet, on peut noter une viscosité à faible taux de cisaillement assez faible dans les premières minutes de l'émulsion, entre 0.1 et 1 Pa.s pour les trois tensioactifs. Après 7 jours, on remarque un épaississement de l'émulsion, quel que soit le tensioactif avec une viscosité à faible taux de cisaillement 10 à 100 fois plus élevée pour chacun (Figure 62 a)). Par exemple, on remarque que l'émulsion du DP10Cardanol possède la même viscosité que celle de A (4 Pa.s), alors que l'émulsion avec DP10TOFA donne des valeurs plus élevées (13 Pa.s). Dans tous les cas, on remarque que les émulsions sont rhéofluidifiantes et qu'il y a un temps nécessaire après la déformation pour retrouver la viscosité initiale. Ceci est intéressant lors de l'application puisque cela signifie que le mélange de l'émulsion permet de la rendre plus fluide sur un temps donné. Cet effet épaississant est également confirmé par la mesure des module viscoélastiques et visqueux à t_0 et après 7 jours. En effet, on remarque une forte augmentation du module G' , qui devient plus élevé que le module G'' , similaire au

comportement d'un gel. Cela traduit les fortes interactions entre les particules d'huiles stabilisées par les tensioactifs. On remarque que les modules G' de l'émulsion de A et de DP10TOFA sont très proches ce qui traduit bien la compétitivité de ces deux tensioactifs. En effet, le point de croisement entre G' et G'' n'est pas visible ici ce qui n'est pas le cas avec DP10Cardanol dont les 2 modules sont très proches et plus faibles. Le système impliquant DP10Cardanol est donc potentiellement un peu moins stable avec un effet gel moindre.

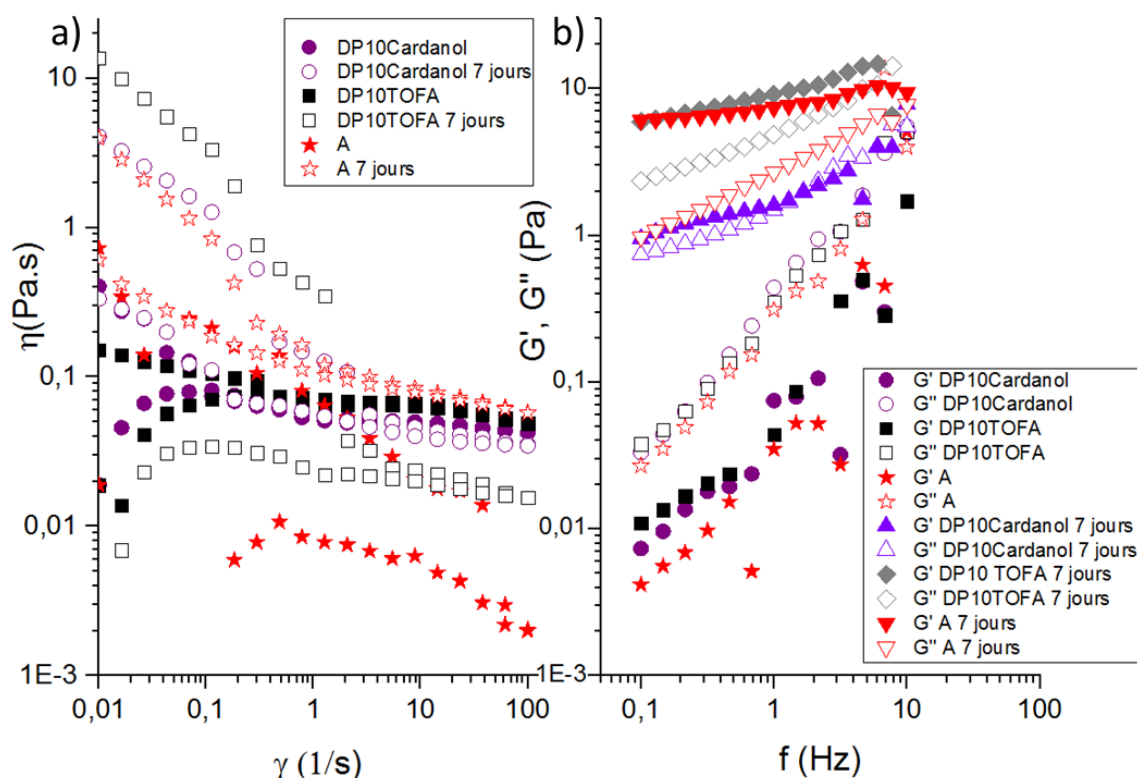


Figure 62. a) Viscosité en fonction du cisaillement et du temps b) Evolution de G' et G'' en fonction de la fréquence et du temps

Enfin, un test sur un échantillon non dilué de A a été effectué afin de le comparer au DP10TOFA ressortant comme l'un des meilleurs candidats pour l'application (Figure 63). Finalement, une déstabilisation de 20% est observée pour A contre 22% pour le DP10TOFA. Une transmission de 89% est atteinte sur le bas du tube ce qui correspond à une solution de A entre 0.1 et 2 g.L^{-1} . Ce même phénomène a pu être observé sur l'échantillon à base de chitosane (Figure 55 p236). Une légère coalescence à l'image de celle observée sur le DP10TOFA, a également été notée sur l'échantillon A (de 4.4 à $6.5 \mu\text{m}$). Enfin les cinétiques de déstabilisations sur les deux premiers jours, bien que plus rapides pour le tensioactif base chitosane, sont dans le même ordre de grandeur avec 5.5 et 10.7 mm.h^{-1} pour A et DP10TOFA respectivement. De plus, après deux jours, le système

est stable dans le cas des deux tensioactifs et aucune évolution notable ne se produit entre le 2^{ème} et le 55^{ème} jour.

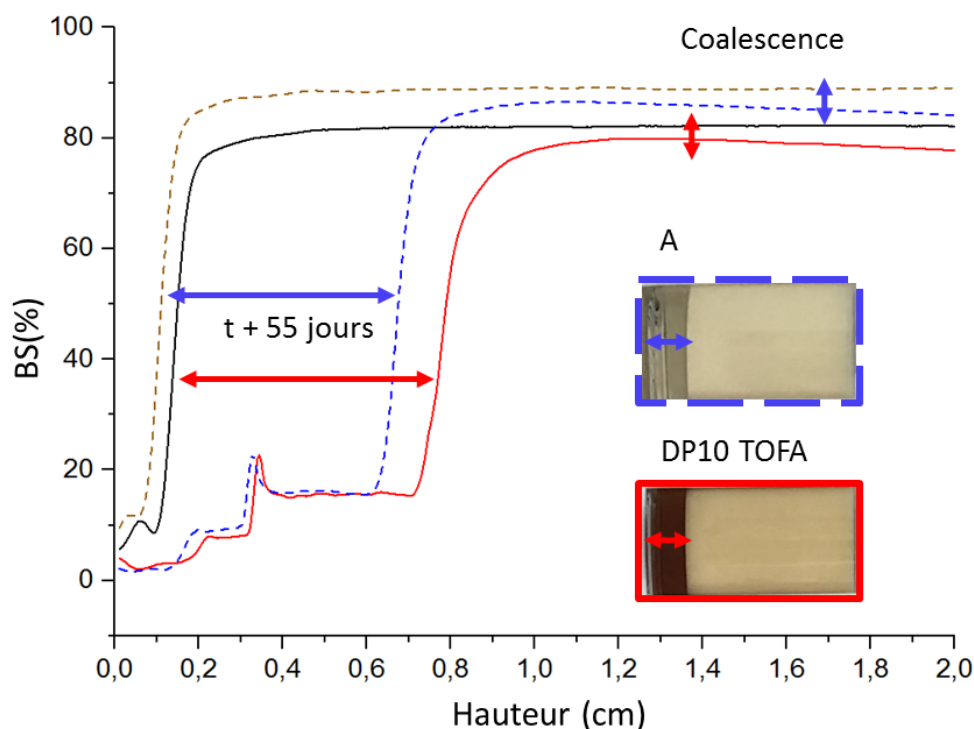


Figure 63.. Schéma des profils obtenus au Turbiscan du tensioactif A (---) et DP10TOFA (—) sur les 2 premiers centimètres entre 0 et 55 jours.

Toutes ces données ont été regroupées dans un diagramme radar pour plus de lisibilité (Figure 64). Ce diagramme met en évidence la compétitivité du DP10TOFA et du DP10Cardanol avec le tensioactif A utilisé par Colas pour son utilisation dans des émulsion huile dans eau (60/40) avec tout de même de meilleurs résultats pour le DP10TOFA. En plus de cela, si l'on reprend la norme EN 16640 définissant la teneur en élément biosourcé (chapitre 1- généralités sur les tensioactifs dans les émulsions de bitume), le DP10TOFA est 100% biosourcé avec une tête hydrophile et une queue hydrophobe issues toutes les deux de la biomasse. Cependant, ce qui ressort bien de ce diagramme est la masse de tensioactif nécessaire pour la mise en émulsion beaucoup plus importante pour les tensioactifs base COS que pour A. En effet, du fait de sa masse molaire importante, cinq fois plus élevée que celle de A (1955 contre 365 g.mol^{-1}), il est nécessaire d'en utiliser 1% en masse de l'émulsion contre 0.2% pour A. Néanmoins, des optimisations sont à prévoir pour tenter de réduire la quantité de ce tensioactif utilisée dans l'émulsion. Il a notamment été montré dans un travail préliminaire que l'ajout de chitosane de haute masse molaire dans l'émulsion (0.01 à 0.1% en masse d'émulsion) permettait d'en améliorer la stabilité, notamment grâce à une augmentation de la viscosité. Ainsi, des essais de formulation d'un

mélange tensioactif base chitosane et chitosane (moins couteux) peuvent être envisagée ce qui permettrait d'utiliser moins de tensioactifs tout en conservant les bonnes propriétés décrites dans ce chapitre.

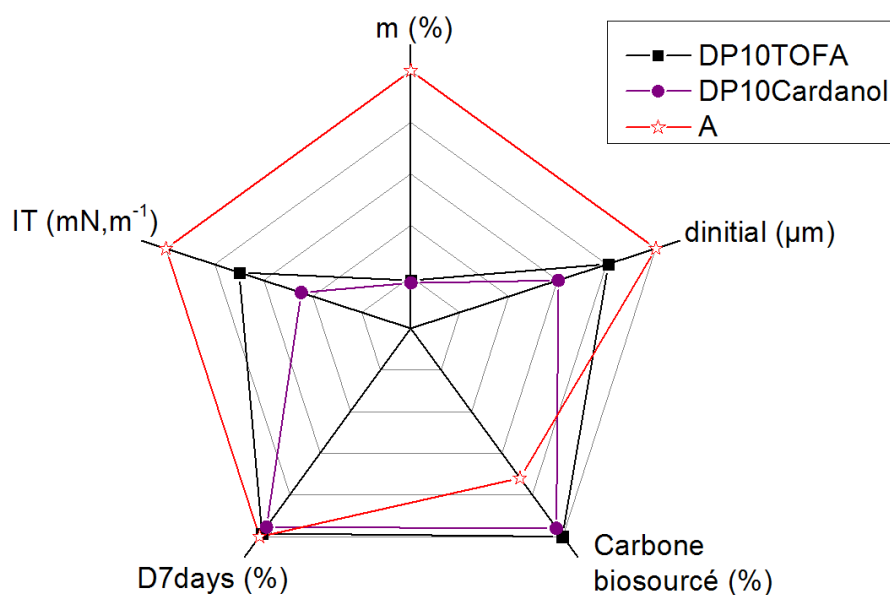


Figure 64. Diagramme radar comparant différentes propriétés du DP10TOFA et DP10Cardanol au tensioactif A

Références bibliographiques

- (1) Pasquali, R. C.; Sacco, N.; Bregni, C. The Studies on Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Sixty Years after William C. Griffin's Pioneer Work (1949-2009). *Lat. Am. J. Pharm.* **2009**, 28 (2), 313–317.
- (2) W.C. Griffin. Classification of Surface-Active Agents by "HLB." *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1 1949**, 311.
- (3) Physicochemical, S. A.; Bardavid, S. M.; Arancibia, E. L.; Schulz, P. C. Hydrophile – Lipophile Balance and Solubility Parameter of Cationic Surfactants Hydrophile Á Lipophile Balance and Solubility Parameter of Cationic Surfactants. **2003**, 7757 (March). [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00404-1).
- (4) Davies and Rideal. No Title. *J. Colloid Sci. Suppl.* **1 1954**.
- (5) Hutin, A. *La Tension Superficielle*; 2010; Vol. 54. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25817.36969>.
- (6) Gassin, P.-M. Mesure de La Tension Superficielle Par La Technique de La Goutte Pendante. *Union des professeurs Phys. Chim.* **2014**, 108, 1–8.
- (7) Israelachvili, J. N. *Soft and Biological Structures*; 2011. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375182-9.10020-x>.
- (8) Naous, M. Effet de La Longueur de La Chaîne Sur Les Propriétés Physico-Chimiques d'un Systeme Mixte de Tensioactifs. **2010**, 89 (July 2010). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3837.9601>.
- (9) Baumgartner, F. N. *Relation of Molecular Structure to Detergency of Some Alkylbenzene Sulfonates*; 1954; Vol. 46. <https://doi.org/10.1021/ie50534a061>.
- (10) H.B. Kleven. Structure and Aggregation in Dilute Solution of Surface Active Agents. *J. A.O. C. S.* **1953**, 30 (2).
- (11) Berry, J. D.; Neeson, M. J.; Dagastine, R. R.; Chan, D. Y. C.; Tabor, R. F. Measurement of Surface and Interfacial Tension Using Pendant Drop Tensiometry. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, 454, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.012>.
- (12) Georgescu, S. Loi de Tate: Analyse Critique et Restrictions. **2014**, No. September 2001.
- (13) Lidon, P. HAL Id : Cel-01332274. 2016.
- (14) CR. Technical Note. Rings Are for Fingers, Plates Are for Surface Tension. *Krüss*

- 2004**, 49 (40), 49–52.
- (15) Hutin, A. Rhéologie Interfaciale : Compression et Dilatation. **2019**, No. December. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27259.26409>.
 - (16) Kumar, N.; Tyagi, R. Industrial Applications of Dimeric Surfactants: A Review. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2014**, 35 (2), 205–214. <https://doi.org/10.1080/01932691.2013.780243>.
 - (17) Hayes, D. G.; Smith, G. A. *Biobased Surfactants: Overview and Industrial State of the Art*, Second Edi.; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812705-6.00001-0>.
 - (18) Delbeke, E. I. P.; Bogaert, I. N. A. Van. Sophorolipid Modification : The Power of Yeasts and Enzymes Prospects of Practical Application of Sophorolipids , Cellobiose Lipids , and MELs. **2018**, 18.
 - (19) Rebello, S.; Asok, A. K.; Mundayoor, S.; Jisha, M. S. Surfactants: Toxicity, Remediation and Green Surfactants. *Environ. Chem. Lett.* **2014**, 12 (2), 275–287. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0466-2>.
 - (20) Vandeputte, J. Agro-Based Surfactants. *OCL - Ol. Corps Gras Lipides* **2012**, 19 (2), 133–137. <https://doi.org/10.1051/ocl.2012.0431>.
 - (21) Zakharova, L. Y.; Pashirova, T. N.; Doktorovova, S.; Fernandes, A. R.; Sanchez-Lopez, E.; Silva, A. M.; Souto, S. B.; Souto, E. B. *Cationic Surfactants: Self-Assembly, Structure-Activity Correlation and Their Biological Applications*; 2019; Vol. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20225534>.
 - (22) Akhter, K.; Ullah, K.; Talat, R.; Haider, A.; Khalid, N.; Ullah, F.; Ali, S. Synthesis and Characterization of Cationic Surfactants and Their Interactions with Drug and Metal Complexes. *Heliyon* **2019**, 5 (6), e01885. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01885>.
 - (23) Goursaud, F.; Berchel, M.; Guilbot, J.; Legros, N.; Lemiègre, L.; Marcilloux, J.; Plusquellec, D.; Benvegna, T. Glycine Betaine as a Renewable Raw Material to “Greener” New Cationic Surfactants. *Green Chem.* **2008**, 10 (3), 310–332. <https://doi.org/10.1039/b713429k>.
 - (24) Nsimba, Z. F.; Paquot, M.; Mvumbi, L. G.; Deleu, M. Les Derivés Tensioactifs de La Glycine Bétaïne: Méthodes de Synthèse et Potentialités d'utilisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2010**, 14 (4), 737–748.
 - (25) Faye, I.; Besse, V.; David, G.; Caillol, S. Sustainable Cardanol-Based Ionic

- Surfactants. *Green Mater.* **2017**, 5 (3), 144–152.
<https://doi.org/10.1680/jgrma.17.00018>.
- (26) Garcia, M. T.; Kaczerewska, O.; Ribosa, I.; Brycki, B.; Materna, P.; Drgas, M. Biodegradability and Aquatic Toxicity of Quaternary Ammonium-Based Gemini Surfactants: Effect of the Spacer on Their Ecological Properties. *Chemosphere* **2016**, 154, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.109>.
- (27) Pérez, N.; Pérez, L.; Infante, M. R.; García, M. T. Biological Properties of Arginine-Based Glycerolipidic Cationic Surfactants. *Green Chem.* **2005**, 7 (7), 540–546.
<https://doi.org/10.1039/b419204d>.
- (28) Singh, A.; Tyagi, V. K. Arginine Based Novel Cationic Surfactants: A Review. *Tenside, Surfactants, Deterg.* **2014**, 51 (3), 202–213. <https://doi.org/10.3139/113.110299>.
- (29) Tripathy, D. B.; Mishra, A.; Clark, J.; Farmer, T. Synthesis, Chemistry, Physicochemical Properties and Industrial Applications of Amino Acid Surfactants: A Review. *Comptes Rendus Chim.* **2018**, 21 (2), 112–130.
<https://doi.org/10.1016/j.crci.2017.11.005>.
- (30) Aranaz, I.; Acosta, N.; Civera, C.; Elorza, B.; Mingo, J.; Castro, C.; Gandía, M. de los L.; Caballero, A. H. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *Polymers (Basel)*. **2018**, 10 (2), 213.
<https://doi.org/10.3390/polym10020213>.
- (31) Zhang, J.; Xia, W.; Liu, P.; Cheng, Q.; Tahirou, T.; Gu, W.; Li, B. Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2010**, 8 (7), 1962–1987.
<https://doi.org/10.3390/md8071962>.
- (32) Rodríguez, M. S.; Albertengo, L. A.; Agulló, E. Emulsification Capacity of Chitosan. *Carbohydr. Polym.* **2002**, 48 (3), 271–276. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00258-2).
- (33) D.R. Mallawarachchi, A.D.U.S Amarasinghe, M. A. . P. Suitability of Chitosan as an Emulsifier for Cationic Bitument Emulsions and Its Behavior as an Additive to Bitumen Emulsion. *Constr. Build. Mater.* **2016**, 102, 1–6.
- (34) Nan, F.; Wu, J.; Qi, F.; Liu, Y.; Ngai, T.; Ma, G. Uniform Chitosan-Coated Alginate Particles as Emulsifiers for Preparation of Stable Pickering Emulsions with Stimulus Dependence. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, 456 (1), 246–252.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.017>.
- (35) Zhang, S.; Zhou, Y.; Yang, C. Pickering Emulsions Stabilized by the Complex of Polystyrene Particles and Chitosan. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*

- 2015**, 482, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.029>.
- (36) Lauriane Alison,† Ahmet F. Demirörs,† Elena Tervoort,† Alexandra Teleki,§,|| Jan Vermant, ‡ and. Emulsions Stabilized by Chitosan-Modified Silica Nanoparticles PH. 2018, pp 6147–6160.
- (37) Li, H.; Zhang, Z.; Bao, X.; Xu, G.; Yao, P. Fatty Acid and Quaternary Ammonium Modified Chitosan Nanoparticles for Insulin Delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, 170 (May), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.063>.
- (38) Bani-Jaber, A.; Hamdan, I.; Alkawareek, M. The Synthesis and Characterization of Fatty Acid Salts of Chitosan as Novel Matrices for Prolonged Intragastric Drug Delivery. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, 35 (7), 1159–1168. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0706-6>.
- (39) Chapelle, C.; David, G.; Caillol, S.; Negrell, C.; Durand, G.; Desroches Le Foll, M.; Trombotto, S. Water-Soluble 2,5-Anhydro- d -Mannofuranose Chain End Chitosan Oligomers of a Very Low Molecular Weight: Synthesis and Characterization. *Biomacromolecules* **2019**, 20 (12), 4353–4360. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01003>.
- (40) Song, Z.; Wen, Y.; Deng, P.; Teng, F.; Zhou, F.; Xu, H.; Feng, S.; Zhu, L.; Feng, R. Linolenic Acid-Modified Methoxy Poly (Ethylene Glycol)-Oligochitosan Conjugate Micelles for Encapsulation of Amphotericin B. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 205 (July 2018), 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.086>.
- (41) Du, Y. Z.; Wang, L.; Yuan, H.; Hu, F. Q. Linoleic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide Micelles for Intracellular Drug Delivery and Reverse Drug Resistance of Tumor Cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, 48 (1), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.11.005>.
- (42) Chapelle, C.; David, G.; Caillol, S.; Negrell, C.; Durand, G.; le Foll, M. D. Functionalization of Chitosan Oligomers: From Aliphatic Epoxide to Cardanol-Grafted Oligomers for Oil-in-Water Emulsions. *Biomacromolecules* **2021**, 22, 846–854. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01576>.
- (43) Takamura, K.; James, A. *Paving with Asphalt Emulsions*; Elsevier Ltd., **2015**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100269-8.00013-1>.
- (44) Day, D.; Lancaster, I. M.; McKay, D. Emulsion Cold Mix Asphalt in the UK: A Decade of Site and Laboratory Experience. *J. Traffic Transp. Eng. (English Ed.)* **2019**, 6 (4), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.jtte.2019.05.002>.
- (45) Sheldon, R. A. Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and

- Future. **2018**. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03505>.
- (46) Mengual, O.; Meunier, G.; Cayre, I.; Puech, K.; Snabre, P. Characterisation of Instability of Concentrated Dispersions by a New Optical Analyser: The TURBISCAN MA 1000. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *152* (1–2), 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00680-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00680-3).
- (47) M. J. Rosen. *Surfactants and Interfacial Phenomena*; 1989; Vol. 11. <https://doi.org/10.1080/01932699008943278>.
- (48) Mukerjee, P. The Nature of the Association Equilibria and Hydrophobic Bonding in Aqueous Solutions of Association Colloids. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **1967**, *1*, 241–275.
- (49) Volpe, C. Della; Siboni, S. The Wilhelmy Method: A Critical and Practical Review. *Surf. Innov.* **2018**, *6* (3), 120–132. <https://doi.org/10.1680/jsuin.17.00059>.
- (50) Querol, N.; Barreneche, C.; Cabeza, L. F. Storage Stability of Bimodal Emulsions vs. Monomodal Emulsions. *Appl. Sci.* **2017**, *7* (12). <https://doi.org/10.3390/app7121267>.
- (51) Gutierrez, X.; Silva, F.; Chirinos, M.; Leiva, J.; Rivas, H. Bitumen-in-Water Emulsions: An Overview on Formation, Stability, and Rheological Properties. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2002**, *23* (1–3), 405–418. <https://doi.org/10.1080/01932690208984213>.
- (52) Burgess, D. J.; Sahin, N. O. Interfacial Rheological and Tension Properties of Protein Films. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *189* (1), 74–82. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.4803>.
- (53) Wei, Y.; Xie, Y.; Cai, Z.; Guo, Y.; Wu, M.; Wang, P.; Li, R.; Zhang, H. Interfacial and Emulsion Characterisation of Chemically Modified Polysaccharides through a Multiscale Approach. *J. Colloid Interface Sci.* **2020**, *580*, 480–492. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.048>.

Chapitre 5

Vers des tensioactifs à blocs à base d'oligomères de chitosane: perspectives

Table des matières du Chapitre 5

SYNTHÈSE DE TENSIOACTIFS À BLOCS À PARTIR D'AMF ET DE COS	259
VI. MATERIEL ET METHODES.....	259
VI.1. Désamination nitreuse	259
VI.2. Addition de chaînes grasses	260
VI.2. 1) TOFA	260
a) Synthèse de l'hydrazide de TOFA	260
b) Synthèse de l'AMF-b-TOFA	260
c) Synthèse de DP10-b-TOFA	260
VI.2. 2) Le cardanol	261
a) Fonctionnalisation du cardanol	261
b) Synthèse de AMF-b-Cardanol	261
c) Synthèse de DP10-b-Cardanol	262
VII. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	262
VII.1. Synthèse	262
VII.2. Propriétés physico-chimiques	266
VII.3. Mise en émulsion.....	267
CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5.....	269
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	271

Les tensioactifs généralement utilisés dans les émulsions de bitumes sont de structure linéaire possédant une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, la désamination nitreuse conduit à la formation d'oligomères terminés par un aldéhyde, 2,5 anhydro-D-mannose (AMF). Comme cela a été montré dans la revue (chapitre 3 p145), cet aldéhyde est réactif et il est possible de greffer toutes sortes de molécules, voire polymères sur celui-ci ^{1 2 3}. Dans les chapitres précédents, nous avons choisi de ne pas utiliser cet aldéhyde mais seulement les amines libres des oligomères pour rendre ces derniers amphiphiles. Nous avons donc utilisé de l'hydroxylamine pour empêcher toute réaction avec l'AMF. Dans ce chapitre, il a été envisagé d'utiliser cet aldéhyde pour greffer des chaînes grasses et obtenir des tensioactifs ayant une structure dibloc amphiphile se rapprochant plus des structures commerciales. Ce type de structure ressemble donc un peu plus aux tensioactifs usuels. Comme nous l'avons montré précédemment, il est possible d'obtenir la molécule d'AMF à partir de la glucosamine, qui nous servira de modèle pour les oligomères de chitosane terminés AMF. Ce type de réaction sur l'AMF n'a pour l'instant jamais été décrit dans la littérature. Dans les chapitres précédents, nous avons montré que les tensioactifs aux propriétés les plus intéressantes étaient obtenus à partir d'oligomères de DP10 greffés avec du TOFA ou du cardanol. Ainsi dans cette partie, quelques exemples de réactions possibles d'abord entre l'AMF puis entre des oligomères de DP10 terminés AMF et ces entités hydrophobes seront présentés ainsi que quelques-unes de leur propriétés physicochimiques.

Synthèse de tensioactifs à blocs à partir d'AMF et de COS

La synthèse de tensioactifs « blocs » formés d'un bloc hydrophile, l'oligomère et d'un bloc hydrophobe, une chaîne grasse, est envisageable en utilisant l'aldéhyde de fin de chaîne obtenu lors de la dépolymérisation. Dans ce travail, le but était de conserver le TOFA et le cardanol en tant que bloc hydrophobe du tensioactif. La modification chimique de ces deux entités et leur addition sur des oligomères de DP10 ainsi que sur de l'AMF sont décrites dans la suite.

VI. Matériel et méthodes

VI.1. Désamination nitreuse

Les COS-AMF et l'AMF utilisés dans cette partie ont été obtenus par désamination nitreuse comme décrit dans le chapitre 2 ⁵.

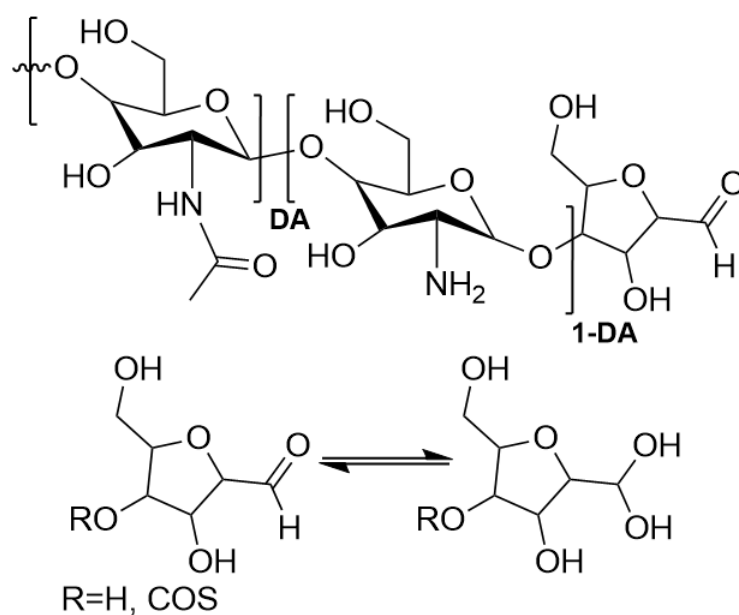


Figure 65. Structure de l'AMF et des COS-AMF sous forme d'aldéhyde ou gem-diol

VI.2. Addition de chaînes grasses

VI.2. 1) TOFA

a) Synthèse de l'hydrazide de TOFA

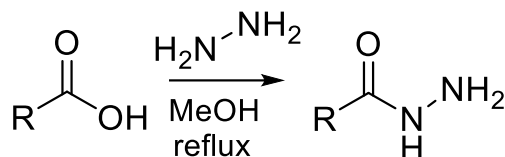


Schéma 26. Synthèse de l'hydrazide de TOFA où R=chaîne grasse en C18:1.5

2,5 g de TOFA (1 eq) sont mis sous agitation au reflux pendant 2 h dans 20 mL du méthanol. 1,2 eq d'hydrate d'hydrazine sont ajoutés au mélange puis la solution est mise au reflux pendant 2 h. Le méthanol est évaporé et le produit est séché sous vide pendant 3 h pour éliminer l'hydrazine résiduelle. Le produit est lyophilisé pour éliminer l'eau. ^{6 7 8}

RMN ¹H (400 MHz, Méthanol d4) : δ= 5,42-5,26 (m, 6H, H_i), 2,77 (t, 4H, H_h), 2,20 (t, 2H, H_{a'}), 2,05 (m, 4H, H_e), 1,59 (q, 2H, H_b), 1,38 (m, 8H, H_c), 0,93 (m, 3H, H_d), 5,00 (H₂O)

RMN ¹³C (101 MHz, Méthanol d4) : δ= 180,92 (-C=O), 130,90 (-C=C), 130,81 (-C=C), 129,05 (-C=C), 37,44 (-C-NH), 33,07 (-CH₂-C), 32,67 (-CH₂-C), 30,86 (-CH₂-C), 30,63 (-CH₂-C), 30,60 (-CH₂-C), 30,48 (-CH₂-C), 30,36 (-CH₂-C), 30,34 (-CH₂-C), 28,17 (-CH₂-C), 28,14 (-CH₂-C), 27,06 (-CH₂-C), 26,55 (-CH₂-C), 23,75 (-CH₂-C), 23,64 (-CH₂-C), 14,51 (CH₃-C), 14,48 ppm (CH₃-C).

b) Synthèse de l'AMF-b-TOFA

1 g de 2,5 anhydro-D-mannose (AMF) (1 eq) sont solubilisés dans 20 mL de méthanol. 1 eq d'hydrazide de TOFA (1.8 g) est solubilisé dans 10 mL de méthanol et ajoutés à la solution d'AMF. Le mélange est mis sous agitation pendant 24 h à température ambiante. 0,312 g (1 eq) de cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN) sont ajoutés au milieu réactionnel et le mélange est mis sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Le produit final est précipité dans le THF pour éliminer l'hydrazide de TOFA n'ayant pas réagi et récupéré par centrifugation puis séché sous vide pendant 6 h.

RMN ¹H (400 MHz, Méthanol d4), δ= 8,54 (s, 1H, H_{1'}), 5,37 (m, 6H, H_i), 4,89 (H₂O), 3,40-4,40 (m, 6H H₂-H₆), 2,18 (m, 2H, H_a), 2,06 (m, 4H, H_h), 1,87 (m, 4H, H_e), 1,61 (m, 2H, H_b), 1,10-1,32 (m, 8H, H_c), 0,90 (td, J = 6,7, 2,6 Hz, 3H, H_d), 3,34 (MeOH)

c) Synthèse de DP10-b-TOFA

1 g de COS DP10 (0,595 mmol d'aldéhyde fin de chaîne, 1 eq.) sont dissous dans 20 mL de DMSO. 0,176 g d'hydrazide de TOFA (1 eq.) dissous dans 20 mL de DMSO sont ajoutés goutte à goutte à la solution COS-DMSO, le mélange est agité pendant 2 h. 1 eq

de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) sont ajoutés au milieu réactionnel et le mélange est mis sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Le produit est précipité dans de l'acétone, centrifugé puis séché sous vide pendant 6 h.

RMN ^1H (400 MHz, Méthanol d_4), $\delta=8,54$ (s, 1H, H_1), 5,37 (m, 6H, H_i), 3,40-4,75 (m, 12H $\text{H}_1\text{-H}_6$, $\text{H}_1\text{-H}_6$), 2,75 (m, 1H, H_2), 2,06-2,25 (m, 16H, H_a , H_c , H_d , H_e , H_f), 1,61 (m, 2H, H_b), 1,25 (m, 8H, H_c), 0,90 (td, $J = 6.7, 2.6$ Hz, 3H, H_d), 4,79 (H_2O)

VI.2. 2) Le cardanol

a) Fonctionnalisation du cardanol

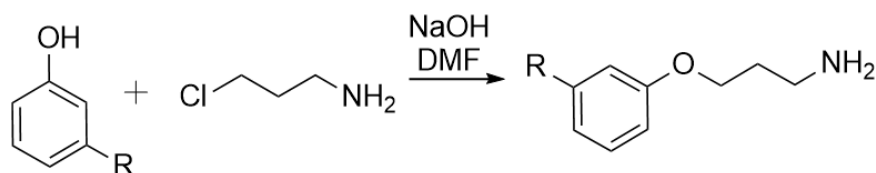


Schéma 27. Fonctionnalisation du cardanol avec la 3-chloropropylamine où $R=\text{C15}$:1.5

5 g de cardanol (1 eq), 2 g d'hydroxyde de sodium (3 eq.) et 100 mL de N,N-diméthylformamide (DMF) sont mélangés. Le mélange réactionnel est purgé pendant 10 min avec de l'azote, puis mis sous agitation pendant 1 h. 4,3 g de 3-chloropropylamine (2 eq.) sont ajoutés et le mélange a été mis sous agitation pendant 36 h. Le mélange est dilué avec 100 mL d'acétate d'éthyle et lavé trois fois avec 50 mL d'eau distillée et une fois avec une solution de soude concentrée (100 mL). La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium anhydre puis filtrée. L'acétate d'éthyle est évaporé et le produit est séché sous vide, une huile visqueuse jaune est ainsi obtenue.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta=6,60\text{-}7,15$ (m, 4H, Haromatiques), 5,45 (m, 6H, H_i , H_f), 4,10 (q, 2H, H_c), 2,90 (q, 2H, H_a), 2,80 (m, 2H, H_j), 2,55 (m, 4H, H_g), 2,0 (m, 2H, H_e), 1,85 (m, 2H, H_b), 1,55 (m, 2H, H_k), 1,25 (m, 8H, H_d), 0,93 (m, 3H, H_i'), 7.26 (CDCl_3)

b) Synthèse de AMF-b-Cardanol

Dans un ballon de 150 mL, 0,500 g de 2,5 anhydro-D-mannose (AMF) (1 eq.) sont solubilisés dans 20 mL de méthanol. 0,935 g de cardanol (1 eq.) sont solubilisés dans 10 mL de méthanol. La solution de cardanol est ajoutée à la solution d'AMF. Le mélange est mis sous agitation pendant 2 h à température ambiante. 1 eq de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) sont ajoutés au milieu réactionnel et le mélange est mis sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Le méthanol est évaporé et le produit séché sous vide.

RMN ^1H (400 MHz, Méthanol d_4), $\delta=8,54$ (s, 1H, $\text{H}_{1'}$), 6,60-7,15 (m, 4H, Haromatiques), 5,45 (m, 6H, H_i , H_f), 4,89 (H_2O), 3,40-4,40 (m, 10H $\text{H}_2\text{-H}_6$, H_c , H_a), 2,80 (m, 2H, H_j), 2,55 (m, 4H, H_g), 2,0 (m, 2H, H_e), 1,85 (m, 2H, H_b), 1,55 (m, 2H, H_k), 1,25 (m, 8H, H_d), 0,93 (m, 3H, $\text{H}_{i'}$), 3,34 (MeOH)

c) Synthèse de DP10-b-Cardanol

1 g de COS DP10 (0,595 mmol d'aldéhyde fin de chaîne, 1 eq.) sont dissous dans 20 mL de DMSO, 1,87 g de cardanol (1 eq.) dans 20 mL de DMSO sont ajoutés goutte à goutte et agité pendant 2 h. 1 eq de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) sont ajoutés au milieu réactionnel et le mélange est mis sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Le produit est précipité dans de l'acétone puis séché sous vide pendant 6 h.

RMN ^1H (400 MHz, Méthanol d_4), $\delta=8,54$ (s, 1H, $\text{H}_{1'}$), 6,60-7,15 (m, 4H, Haromatiques), 5,45 (m, 6H, H_i , H_f), 4,89 (H_2O), 3,40-4,60 (m, 18H $\text{H}_{1'}\text{-H}_6'$, $\text{H}_1\text{-H}_6$, H_c , H_a), 2,75 (m, 1H, H_2), 1,75-2,25 (m, 12H, H_g , H_e , H_b , H_{ac}), 1,55 (m, 2H, H_k), 1,25 (m, 8H, H_d), 0,93 (m, 3H, $\text{H}_{i'}$), 4,79 (HOD)

VII. Résultats et discussions

VII.1. Synthèse

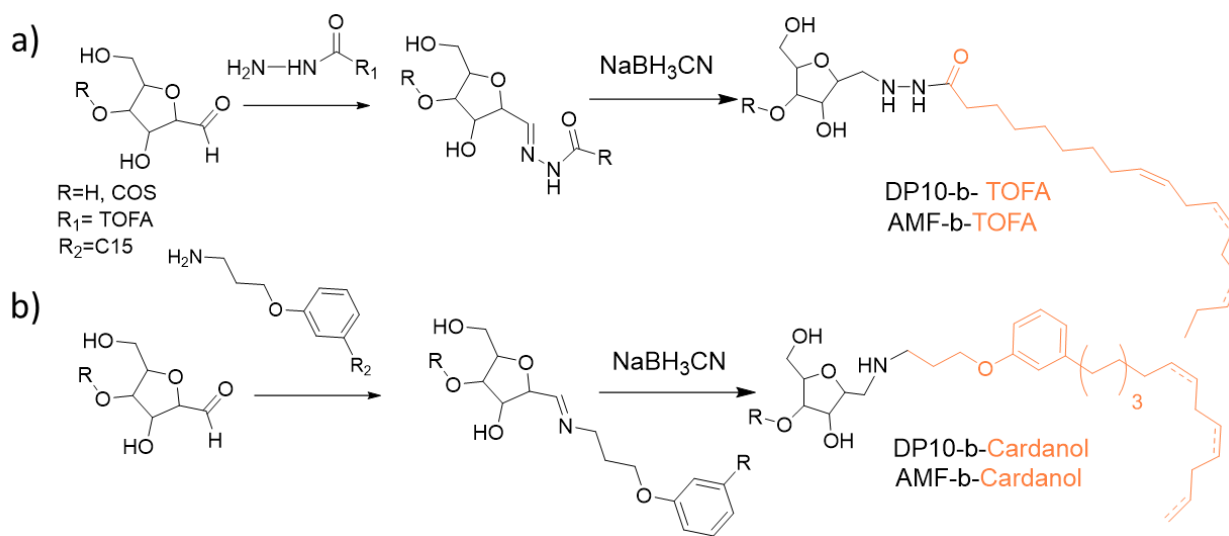


Figure 66. Addition a) de l'hydrazide de TOFA et b) du cardanol modifié sur de l'AMF ou des COS DP10 terminés AMF

Dans un premier temps, les réactions de greffage de TOFA ou de cardanol modifié amine (Figure 66a et 66b) ont été réalisées sur l'AMF afin de vérifier leur faisabilité. La modification chimique préliminaire du TOFA et du cardanol implique l'introduction d'amines qui sont potentiellement quaternisables en présence d'acide ce qui peut conférer à ce type de structure un intérêt potentiel en tant que tensioactif. Par la suite, ces réactions ont été

transposées à des oligomères de DP10. En effet, dans les chapitres précédents, il a été montré que les DP10 sous forme de peigne étaient les structures les plus prometteuses.

Pour commencer, le TOFA a été modifié avec de l'hydrazine dans le but d'obtenir une hydrazide de TOFA (Figure 65). Cette réaction s'inspire du travail de Moussa et al.³ avec l'hydrazide octanoïque. En effet, dans ces travaux, il a été montré que l'hydrazide octanoïque réagit avec les aldéhydes de fin de chaînes sur des oligomères de DP20. Ici, des oligomères de DP10 seront utilisés ce qui permet de les solubiliser dans l'eau à tous les pH et empêche l'utilisation d'une solution d'hydroxyde d'ammonium lors de l'étape de précipitation. C'est pourquoi, l'acétone a été utilisé comme dans les chapitres précédents lors de la synthèse des tensioactifs type peigne. Le spectre RMN ^1H du produit est présenté ci-dessous (Figure 67). On remarque le faible blindage des protons en alpha du carbonyle (a') du fait de l'ajout de l'hydrazine, i.e. de 2,22 à 2,20 ppm. Le spectre IR du produit permet également de confirmer la modification avec l'apparition des bandes correspondant à l'amine primaire et à l'amide formée, i.e. 1530 et 1630 cm^{-1} (Annexe 53).

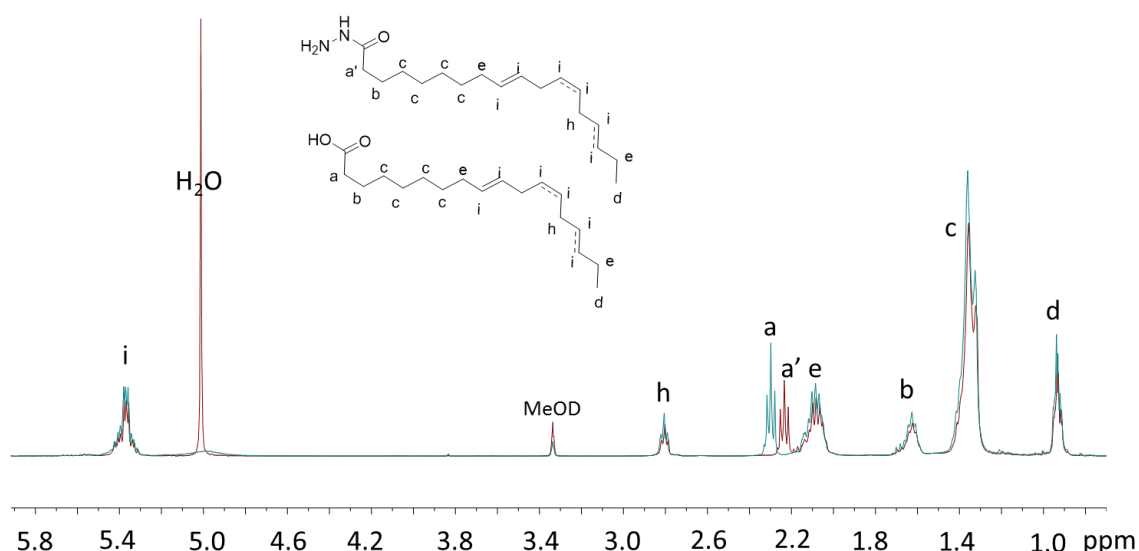


Figure 67. RMN ^1H du TOFA (vert) et de l'hydrazide de TOFA (rouge)

Le TOFA ainsi modifié a d'abord été ajouté à l'AMF qui représente la fin de chaîne des COS obtenus par désamination nitreuse. L'AMF a lui-même été obtenu par désamination nitreuse de la glucosamine comme décrit dans le chapitre 2. L'hydrazide de TOFA réagit avec l'aldéhyde pour former une imine (Figure 68 b)). Cette imine a été isolée et caractérisée par RMN ^1H . Elle se notifie par l'apparition du signal correspondant au proton 1 à 7.25 ppm et la disparition du signal 1'' correspondant à l'AMF sous forme gem-diol. On remarque que l'AMF sous forme aldéhyde est toujours présent (1'). Finalement, 74% de l'AMF est transformé en imine. La réaction n'est donc pas totale. Par la suite,

l'imine a été réduite par ajout de NaBH_3CN . Ceci se traduit par la disparition du signal 1 (Figure 68 a)). Le produit est précipité dans le THF et lavé avec ce même solvant ce qui permet l'élimination de l'hydrazide de TOFA n'ayant pas réagi. Ainsi, le produit final est constitué d'un mélange entre de l'AMF n'ayant pas réagi (80%) et d'AMF-b-TOFA. Cela signifie qu'une partie importante du produit AMF-b-TOFA n'a pas été précipité. En effet, le précipité est composé principalement d'AMF n'ayant pas réagi. Il serait donc nécessaire d'optimiser la réaction pour améliorer la conversion mais également le traitement pour éviter la perte du produit d'intérêt. Par manque de temps, nous n'avons pas tenté d'améliorer la synthèse. Néanmoins, la structure peut être intéressante en tant que tensioactif puisqu'elle possède une tête polaire quaternisable, cationique en milieu acide. De plus, on retrouve deux amines secondaires libres sur la partie hydrophile ce qui est recherché pour l'application bitume. C'est pourquoi malgré la faible abondance en AMF-b-TOFA dans le produit final, les propriétés physicochimiques de ces tensioactifs ont été déterminées sur le mélange obtenu (AMF+AMF-b-TOFA).

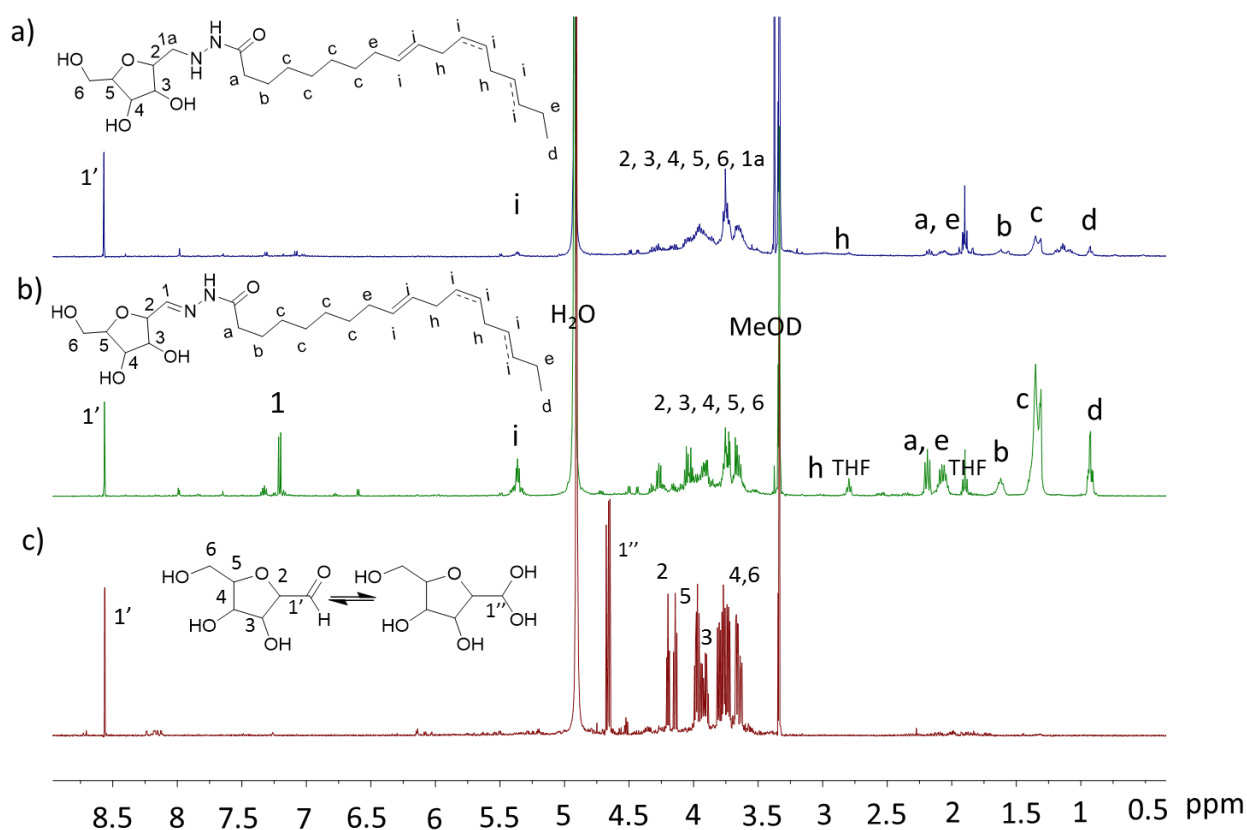


Figure 68. RMN ^1H de a) AMF-b-TOFA b) AMF-b-TOFA avant réduction c) AMF

Dans un second temps, le cardanol a été modifié avec un chlorure d'amine. Ceci permet de le rendre réactif vis-à-vis des aldéhydes de fin de chaîne tout en insérant une fonction amine qui lui donnera un potentiel effet de tensioactif. La fonctionnalisation

quantitative du cardanol a été montrée par RMN ^1H (Figure 69 b)) avec l'apparition des signaux a, b et c à 3,0, 1,98 et 4,0 ppm respectivement. Le cardanol ainsi modifié a été greffé sur l'AMF. De la même façon que précédemment, on observe la disparition du proton 1'' des gem-diol et la formation de l'imine avec l'apparition du signal du proton 1 (Figure 69 c)). Cependant, on remarque que la réaction n'est pas totale avec le signal 1' correspondant à l'AMF sous forme aldéhyde (20%) et 1'' résiduel (40%). La réduction par l'action de NaBH_3CN suivie de la précipitation mène à l'obtention d'un mélange d'AMF (5%) et d'AMF-cardanol (95%) (Figure 69 d)).

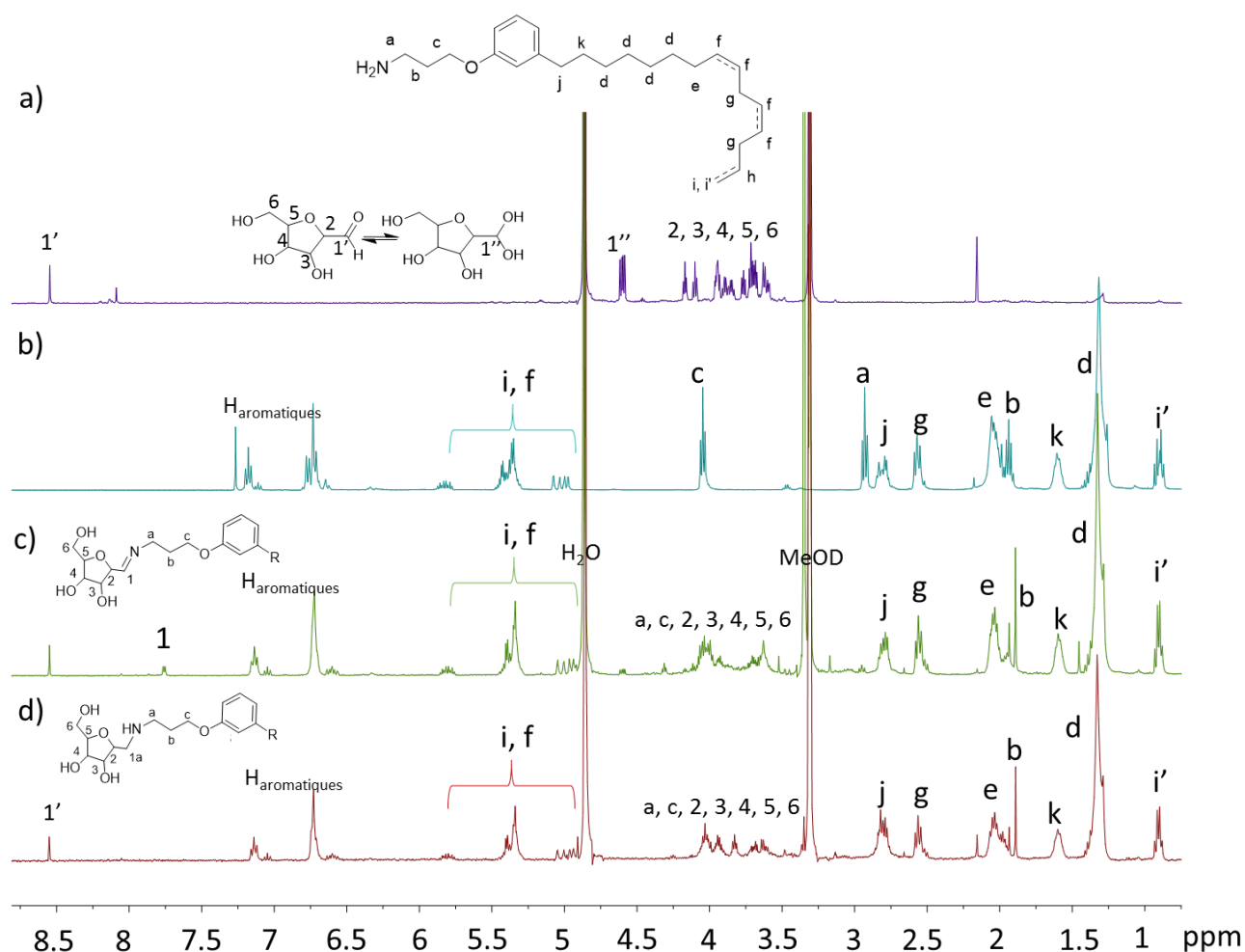


Figure 69. RMN ^1H de a) AMF b) Cardanol modifié c) AMF-b-Cardanol avant réduction d) AMF-b-Cardanol

Enfin, le TOFA et le cardanol ont été greffés sur des oligomères de chitosane de DP10 dans les mêmes conditions réactionnelles que pour l'AMF (Figure 70). Les produits sont précipités dans l'acétone puis lavés de nouveau avec ce solvant ce qui signifie que le TOFA et le cardanol aminés résiduels ont été éliminés lors de cette étape. L'apparition des

signaux significatifs de chacune des chaînes grasses confirme le greffage. Encore une fois, la réaction n'est pas totale puisque l'on retrouve le signal 1 correspondant aux fins de chaînes aldéhyde n'ayant pas réagi ou à de l'AMF libre. Les taux de DP10-b-TOFA et de DP10-b-cardanol sont de 43% et 25%, respectivement dans les produits de réaction précipités.

Dans la suite de cette étude, nous verrons donc les potentielles propriétés tensioactives des 4 structures suivantes : AMF-b-TOFA (80% AMF), AMF-b-cardanol (5% AMF), DP10-b-TOFA (57% DP10), DP10-b-cardanol (75% DP10).

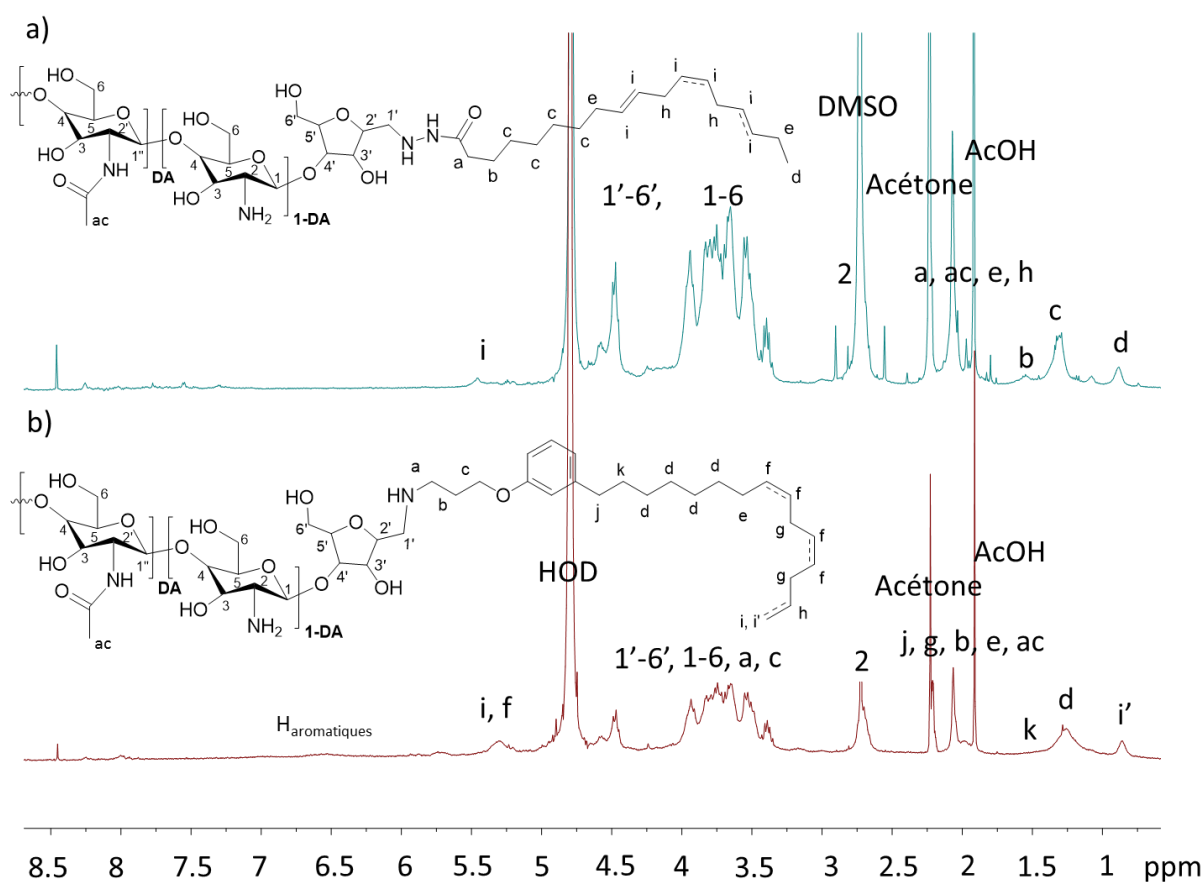


Figure 70. RMN ^1H de a) DP10-b-TOFA b) DP10-b-Cardanol

VII.2. Propriétés physico-chimiques

Comme nous l'avons décrit précédemment, les produits obtenus possèdent des structures amphiphiles intéressantes présentant potentiellement des propriétés tensioactives. Ainsi, de la même manière que dans le chapitre 4, les CMC, tensions de surfaces à 2 g.L⁻¹, C20 et tensions interfaciales de ces produits ont été mesurées et sont recensées dans le tableau suivant (Tableau 16).

Tensioactif	CMC (g.L ⁻¹)	Tension de surface à 2g.L ⁻¹ (mN.m ⁻¹)	C20 (g.L ⁻¹)	Tension interfaciale (mN.m ⁻¹)	HLB
AMF-b-TOFA	0.51	39	<0.01	12.5	18.6
DP10-b-TOFA	0.74	44	0.5	29.5	19.5
AMF-b-cardanol	0.11	35	<0.01	15.9	13.6
DP10-b-cardanol	0.41	36	<0.01	13.1	19.5

Tableau 16. CMC, tensions de surface, C20, tensions interfaciales des différents tensioactifs

Dans un premier temps il a été montré que les tensioactifs ainsi synthétisés possèdent des CMC compétitives avec les tensioactifs à base de chitosane greffé (valeurs inférieures à 1 g.L⁻¹), synthétisés dans les chapitres précédents (structure peigne). De plus, ils présentent des performances proches de celles de leurs homologues greffés DP10TOFA et DP10Cardanol respectivement (inférieurs à 50 mN.m⁻¹). En terme de tension interfaciale, les tensioactifs base cardanol présentent les mêmes valeurs sous forme greffée, 14, ou de bloc, 13,1 mN.m⁻¹. Cependant, le tensioactif bloc à base de TOFA présente de moins bonnes propriétés interfaciales que son homologue greffé, 29.5 contre 9.5 mN.m⁻¹. Les structures AMF possèdent également des propriétés intéressantes avec des valeurs proches pour les deux structures, 12.5 mN.m⁻¹ pour l'AMF-b-TOFA et 15.9 mN.m⁻¹ pour l'AMF-b-cardanol. Enfin, les HLB respectifs des COS DP10 blocs sont du même ordre de grandeur que les COS DP10 greffés. Les HLB de l'AMF-b-TOFA et l'AMF-b-cardanol sont eux plus faibles du fait de leurs têtes hydrophiles moins importantes. Il faut noter que ces HLB sont calculés en fonction des conversions, ici assez faibles, ils ne peuvent donc qu'être améliorés en optimisant la synthèse.

Cependant, nous avons montré précédemment que les tensions interfaciales sont un bon indicateur mais ne permettent pas de conclure sur la capacité du tensioactif à stabiliser l'émulsion. En effet, malgré de très bonnes propriétés interfaciales, les tensioactifs fonctionnalisés avec des C9 ne suffisaient pas à stabiliser une émulsion. Il est donc nécessaire de tester ces nouvelles structures en émulsion pour pouvoir conclure sur l'efficacité de ces tensio-actifs.

VII.3. Mise en émulsion

Par souci de temps et de rendement des produits synthétisés, seul les COS DP10-b-TOFA et DP10-b-cardanol ont été mis en émulsion dans un mélange Huile/Eau (60/40). Nous n'avons malheureusement pas eu le temps d'observer ces émulsions au Turbiscan. Cependant, des émulsions directes stables au moins 24h ont été obtenues en utilisant 1% en masse émulsion. Les émulsions ont pu être observées au microscope et des gouttelettes de tailles comprises entre 5 et 20 µm ont été obtenues (Figure 71). Ces

résultats sont prometteurs et il sera nécessaire de caractériser ces tensioactifs de façon plus poussée, de la même manière que pour les systèmes greffés.

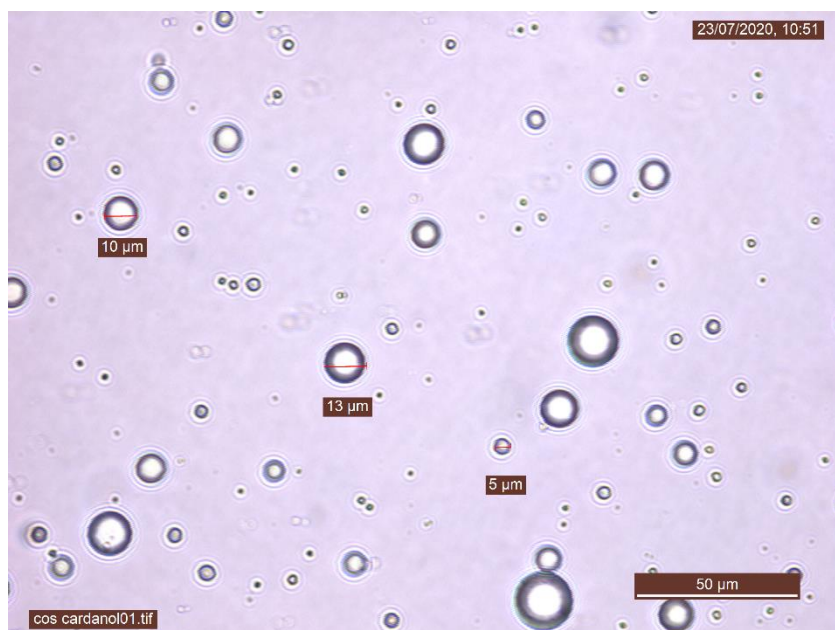


Figure 71. Observation au microscope d'émulsion 60/40 obtenue avec 1% massique d'émulsion faite avec DP10-b-cardanol

Conclusions du chapitre 5

Dans ce chapitre une nouvelle structure originale de tensioactif base oligochitosane a été synthétisée. En effet, l'aldéhyde de fin de chaîne obtenu lors de l'étape de dépolymérisation (chapitre 2, Schéma 5) a ici été mise à profit pour synthétiser des structures à blocs ayant l'oligochitosane pour bloc hydrophile et le cardanol ou le TOFA pour bloc hydrophobe. Dans un premier temps, le TOFA et le cardanol ont été modifiés afin de les rendre réactifs vis-à-vis de l'aldéhyde. L'AMF seul ainsi que des COS de DP10 ont ensuite été fonctionnalisés. Quelques propriétés tensioactives telles que la CMC et la tension interfaciale ont été déterminées sur ces tensioactifs. Finalement, il a été montré que des valeurs compétitives sont obtenues entre les deux types de structures, les versions greffées obtenues dans le chapitre 4 ou les versions à blocs décrites dans ce chapitre. Il a été montré que l'AMF fonctionnalisé TOFA ou cardanol présente également des propriétés intéressantes. De plus, leurs structures sont plus proches de celles des références A et B utilisées par Colas. En effet, la masse molaire de la tête polaire AMF est beaucoup plus faible que lors de l'utilisation de COS, ainsi, leur utilisation en émulsion pourrait être envisagée à des pourcentage massiques plus faibles que les tensioactifs base oligochitosane. Cette piste n'est donc pas à écarter mais plutôt à approfondir en visant à améliorer la conversion de la réaction de greffage du TOFA ou du cardanol aminés sur l'AMF mais également par le biais d'utilisation d'autres blocs hydrophobes.

Les tensioactifs DP10-b-TOFA et DP10-b-cardanol ont pu être utilisés pour mettre en émulsion l'huile modèle. Des émulsions directes stables pendant au moins 24h ont ainsi été obtenues. Malheureusement, des données sur l'utilisation de ces tensioactifs en émulsion restent manquantes telles que les cinétiques et mécanismes de déstabilisation, l'évolution des diamètres des particules et de l'épaisseur des différentes couches comme décrit dans le chapitre précédent. Il serait donc intéressant d'analyser ces émulsions au Turbiscan. De plus, il serait nécessaire de déterminer les quantités idéales à utiliser et de comparer leurs propriétés à celles de leurs homologues greffés DP10TOFA et DP10Cardanol.

Finalement, dans ce chapitre, nous ouvrons la voie à une nouvelle génération de tensioactifs à bloc à base de oligochitosanes et d'huiles grasses naturelles. En effet, d'autres types de structures pourraient être envisagés en jouant sur la taille de la chaîne hydrophile. Ceci pourrait permettre d'obtenir une gamme plus large de tensioactifs. Enfin, d'autres réactions pourraient éventuellement être envisagées comme l'addition de thiols gras^{9 4} ou d'autres amines grasses².

Références bibliographiques

- (1) Coudurier, M.; Faivre, J.; Crépet, A.; Ladavière, C.; Delair, T.; Schatz, C.; Trombotto, S. Reducing-End Functionalization of 2,5-Anhydro-d-Mannofuranose-Linked Chitooligosaccharides by Dioxyamine: Synthesis and Characterization. *Molecules* **2020**, 25 (5), 1143. <https://doi.org/10.3390/molecules25051143>.
- (2) Moussa, A.; Crépet, A.; Ladavière, C.; Trombotto, S. Reducing-End “Clickable” Functionalizations of Chitosan Oligomers for the Synthesis of Chitosan-Based Diblock Copolymers. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 219 (May), 387–394. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.078>.
- (3) Trombotto, A. M. and S. Octanoic Hydrazide Linked Chitooligosaccharides 2,5 AnhydroD Mannofuranose. *Molbank* **2016**, 2016, M904. <https://doi.org/10.3390/M904>.
- (4) Pickenhahn, V. D.; Grange, M.; De Crescenzo, G.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D. Regioselective Chitosan End-Group Activation: The Triskelion Approach. *RSC Adv.* **2017**, 7 (30), 18628–18638. <https://doi.org/10.1039/c7ra01348e>.
- (5) Chapelle, C.; David, G.; Caillol, S.; Negrell, C.; Durand, G.; Desroches Le Foll, M.; Trombotto, S. Water-Soluble 2,5-Anhydro- d -Mannofuranose Chain End Chitosan Oligomers of a Very Low Molecular Weight: Synthesis and Characterization. *Biomacromolecules* **2019**, 20 (12), 4353–4360. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01003>.
- (6) Palace-Berl, F.; Pasqualoto, K. F. M.; Jorge, S. D.; Zingales, B.; Zorzi, R. R.; Silva, M. N.; Ferreira, A. K.; De Azevedo, R. A.; Teixeira, S. F.; Tavares, L. C. Designing and Exploring Active N'-[(5-Nitrofuran-2-Yl) Methylene] Substituted Hydrazides against Three Trypanosoma Cruzi Strains More Prevalent in Chagas Disease Patients. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 96, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.066>.
- (7) Shaker N.O., N. A. Alian, M. M. E.-S. S. A. B. Synthesis, Coating and Biological Evaluation of Ecofriendly Fatty Acid Hydrazide Derivatives. *Life Sci. J.* **2015**, No. April, 12 (11).
- (8) Janardhan, B.; Ravibabu, V.; Rajitha, B. Synthesis , Characterization and Antimicrobial Activity of Indazolines. **2012**, 3 (2), 3–4.
- (9) Pickenhahn, V. D.; Darras, V.; Dziopa, F.; Biniecki, K.; De Crescenzo, G.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D. Regioselective Thioacetylation of Chitosan End-Groups for Nanoparticle Gene Delivery Systems. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (8), 4650–4664. <https://doi.org/10.1039/c5sc00038f>.

Conclusions et perspectives

De nos jours, les tensioactifs cationiques utilisés dans les émulsions de bitume sont généralement des composés aminés étiquetés comme toxiques et/ou écotoxiques. L'objectif de ce travail était donc d'obtenir des tensioactifs non toxiques potentiellement biosourcés dans le but de remplacer ces composés par une gamme de produits moins dangereux et en meilleur accord avec l'environnement. Dans cette optique-là, le chitosane, un polysaccharide naturellement cationique a été transformé afin de le rendre amphiphile. Ces travaux de thèses se sont donc articulés autour de trois grands axes de recherche.

Une première partie du travail a consisté à constituer la partie hydrophile du tensioactif. Pour cela, il était nécessaire de mettre au point une méthode robuste de dépolymérisation du chitosane. Après une étude bibliographique approfondie, une méthode chimique, la désamination nitreuse, impliquant la formation de fin de chaînes aldéhydes (AMF) a été choisie. En effet, cette dernière permet le contrôle des masses molaires des oligomères. Cette méthode a été optimisée et il a été prouvé qu'elle permettait de s'affranchir de l'origine (crustacé, insectes), de la masse molaire et du degré d'acétylation du chitosane, en d'autres mots de la ressource. Ceci était un point clé étant donné la variabilité de la ressource de chitosane (fournisseurs, méthode d'extraction) notamment pour envisager l'industrialisation du procédé. Finalement, des oligomères de DP5 à DP20 de chitosane, non toxiques, constituant la tête hydrophile du futur tensioactif ont été obtenus de manière contrôlée et finement caractérisés.

La deuxième partie de l'étude a consisté en la modification chimique des oligomères de chitosane afin de les rendre amphiphiles. Pour cela, les aldéhydes formés lors de la désamination nitreuse ont été bloqués par la formation d'oximes dans le but d'éviter les réactions intermoléculaires (imines) sur des oligomères de DP5 à DP15. Ces oligomères ont ensuite été modifiés par amidification avec un mélange d'acide gras, le TOFA, et par couplage époxy-amine avec différents époxides gras notamment du cardanol époxydé. Un travail d'optimisation des conditions de réaction ainsi que des structures obtenues a été effectué. En effet, le but était d'atteindre un taux de greffage de chaînons hydrophobes maximum tout en conservant la solubilité dans l'eau pour l'application en émulsion. Cette limite étant très fine, de nombreuses réactions ont été effectuées afin d'atteindre des structures optimales.

Une fois ces structures atteintes, la dernière partie de l'étude a consisté en la caractérisation physico chimiques de ces amphiphiles dans le but d'établir des relations structures propriétés. Toutes sortes de propriétés telles que la tension de surface, les concentrations micellaires critiques (CMC), la tension interfaciale, la rhéologie interfaciale, la diffusion de la lumière, la structure micellaire ont été mesurées pour chacune des structures synthétisées précédemment. Ceci a déjà permis d'éliminer un certain nombre

de structures, notamment celles à faible taux de greffage ou dont la chaîne grasse était trop courte ou la chaîne hydrophile trop longue. Les tensioactifs ainsi présélectionnés ont été utilisés pour mettre en émulsion une huile modèle. Les différents phénomènes et cinétiques de déstabilisation de ces émulsions ont été mis en évidence au Turbiscan. Ceci a permis de sélectionner deux émulsifiants potentiels de DP10 l'un greffé avec du TOFA l'autre avec du cardanol époxydé. L'évolution au cours du temps et en fonction de la température des viscosités des émulsions données par ces tensioactifs a été suivie. Ces deux tensioactifs ont montré des propriétés similaires et compétitives avec les tensioactifs commerciaux utilisés par Colas notamment en terme de stabilité. En plus de cela, leur non toxicité aigüe, un paramètre essentiel, a été prouvée. Cependant, les structures oligomère de ces émulsifiants induisent des masses molaires plus élevées et de ce fait, la nécessité d'en utiliser plus en terme de pourcentage massique d'émulsion que les émulsifiants standards. Une optimisation des formulations des émulsions serait donc à envisager notamment par l'ajout de chitosane natif qui avait déjà fait ses preuves pour remplacer en partie des émulsifiants de bitume.

Le dernier chapitre de cette thèse s'inscrit comme des perspectives de nouvelles structures amphiphiles à blocs. En effet, dans cette partie, l'aldéhyde de fin de chaîne formé lors de la dépolymérisation a été utilisé pour greffer par le biais d'une base de Schiff, des chaînes grasses (à base de TOFA et cardanol). Des propriétés prometteuses ont ainsi été obtenues pour ce type de structure bien que les proportions en espèces actives soient relativement faibles. Il serait donc intéressant d'approfondir les recherches notamment en terme d'optimisation des conditions de synthèse. Par la suite, il serait intéressant d'effectuer le même type d'étude sur les propriétés physicochimiques et les stabilités des émulsions afin de comparer ces structures à blocs avec les structures branchées obtenues précédemment. L'influence de la taille de la tête hydrophile pourra également être investiguée et les recherches pourraient également s'orienter vers d'autres greffons hydrophobes. En résumé, cette partie ouvre la voie vers d'autres types de structures amphiphiles pouvant trouver une application dans les émulsions de bitume.

Les tensioactifs à base de TOFA et de cardanol synthétisés dans le chapitre 3 et caractérisés dans le chapitre 4 semblent prometteurs quant à leurs capacités à émulsionner une huile modèle. De plus ils sont compétitifs avec les tensioactifs de référence. Cependant, afin de valider la preuve de concept, il est nécessaire d'effectuer un test sur le bitume. Ceci n'a malheureusement pas pu être effectué par manque de temps et de moyens pour synthétiser le tensioactif en grande échelle. En effet, pour réaliser une émulsion à l'échelle pilote, 50 g de tensioactifs sont nécessaires. Par la suite, il est donc nécessaire d'envisager une mise en échelle de la synthèse afin de pouvoir tester ces deux

potentiels candidats en émulsion. On pourra ensuite envisager de formuler des émulsions avec plus ou moins de bitume (de 60 à 70%), des additifs (polymères, latex, chitosane de hautes masses molaires), des sels éventuellement afin d'optimiser l'utilisation de ces tensioactifs. Les tests spécifiques au métier tels que la stabilité au stockage, la vitesse de rupture, la granulométrie, les résidus sur tamis etc. pourront être effectués. Enfin, un essai d'adhésivité avec des granulats et du sable pourrait être envisagé pour terminer par la mise en forme d'un enrobé et un suivi dans le temps de celui-ci avec des tests mécaniques adaptés.

D'un point de vue industrialisation de la synthèse, des optimisations sont également à prévoir. En effet, la synthèse impliquant le TOFA nécessite l'utilisation d'agent de couplage (DCC, NHS) qui sont assez coûteux. Le NHS est potentiellement régénéré lors de la synthèse. Dans notre cas nous n'avons pas tenté de le récupérer du fait de l'utilisation du DMSO difficile à éliminer. De la même façon, le greffage de cardanol met en jeu un nombre d'équivalents importants qui ne sont pas récupérés par la suite. L'adaptation d'un procédé industriel ou l'utilisation d'autres solvant pourrait permettre de recycler ces matières premières. Pour cela, il faudrait effectuer une étude de faisabilité de la réaction dans d'autres solvants. Nous pourrions également envisager des voies sans solvant, plus vertes, comme la mécanochimie.

Il est également envisageable de s'affranchir de l'étape de dépolymérisation en travaillant avec des sociétés qui proposent des oligomères de chitosane. De nos jours, la plupart de ces produits sont très onéreux et plutôt destinés à des applications médicales. En effet, les oligomères sont bien souvent obtenus par des voies enzymatiques avec des puretés très importantes ce qui n'est pas nécessaire dans le cadre d'une utilisation routière. Cependant, des entreprises émergentes tendent à développer des méthodes plus abordables, notamment à partir de chitosane d'insectes par mécanochimie, et ciblent des industries plus larges avec d'important tonnages et des coûts réduits. Dans la suite, il serait envisageable de fonctionnaliser ces oligomères et de comparer leurs propriétés à celles des tensioactifs obtenus dans cette étude pour, par la suite, les utiliser en émulsion.

Pour résumer, ce projet a permis d'apporter une preuve de concept quant à l'utilisation d'oligomères de chitosane modifiés en tant qu'émulsifiant potentiel en technique routière. Ces potentiels tensioactifs cationiques biosourcés et non toxiques représentent une avancée considérable pour l'industrie de la route. En effet, à partir du 1^{er} janvier 2028, l'usage des matériaux biosourcés devra intervenir dans au moins 25% des rénovations et constructions dans lesquelles intervient la commande publique. En complément du recyclage d'enrobé et du développement de liants verts déjà mis en place

par Colas, cette étude inscrite dans l'air du temps, permettra à la société de s'affranchir petit à petit des ressources pétrolières pour se tourner de plus en plus vers le biosourcé.

Annexes

Annexes du Chapitre 1

Nid de poule



Flache



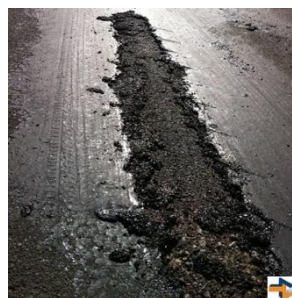
Affaissement de rive



Ornièrage



Pelade



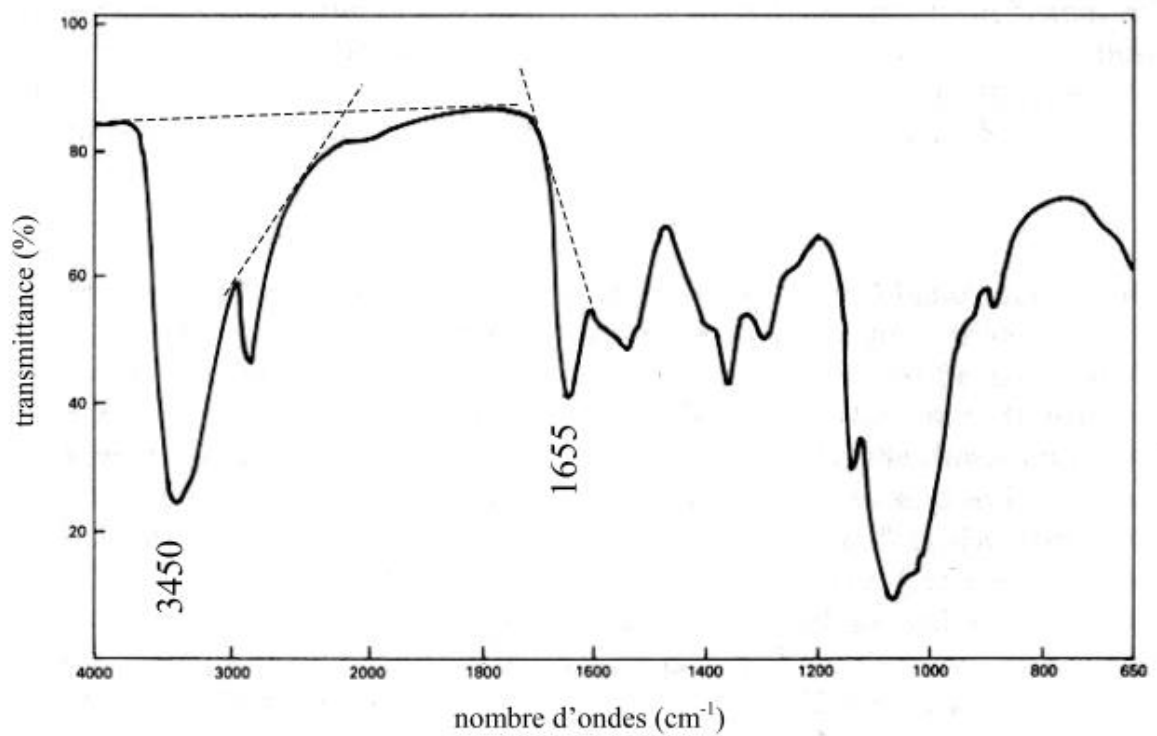
Faiençage



Fissures



Annexe 1. Photographies des différentes déformations possibles d'une route

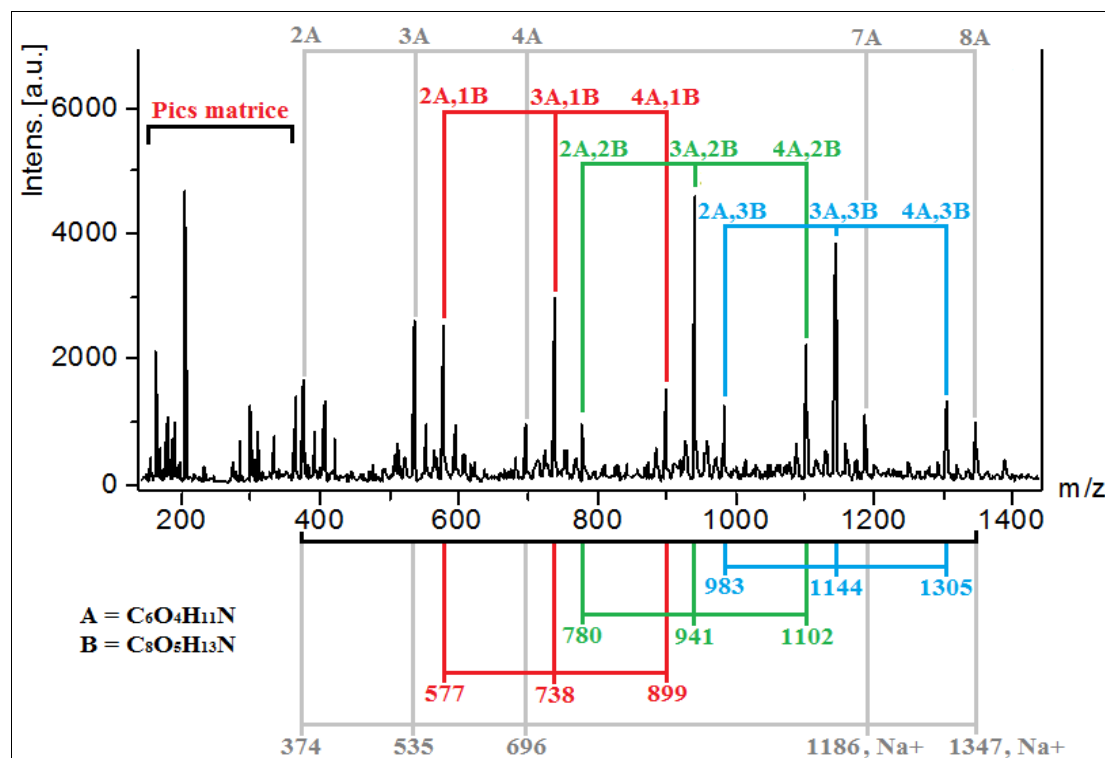


Le DA est alors calculé avec la formule suivante :

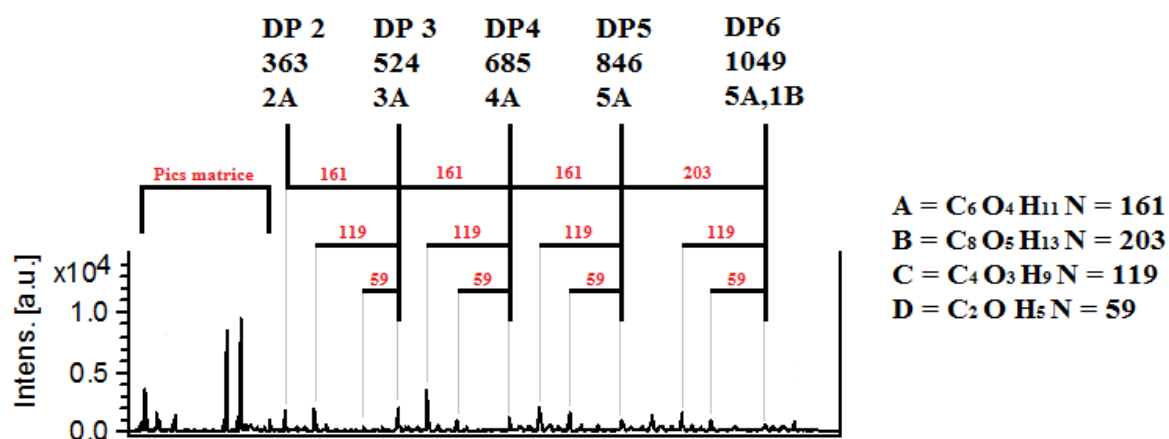
$$DA(\%) = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} * 115$$

Annexe 2. Calcul du DA du chitosane par infrarouge ¹⁰

Annexes du Chapitre 2



Annexe 3. Spectre de masse d'oligomères obtenus dans les conditions suivantes : 3 heures, 50°C, 5% de PA + H_2O_2 5:23®, 2% d'acide acétique, 2% de chitosane ($250\,000\text{ g.mol}^{-1}$)

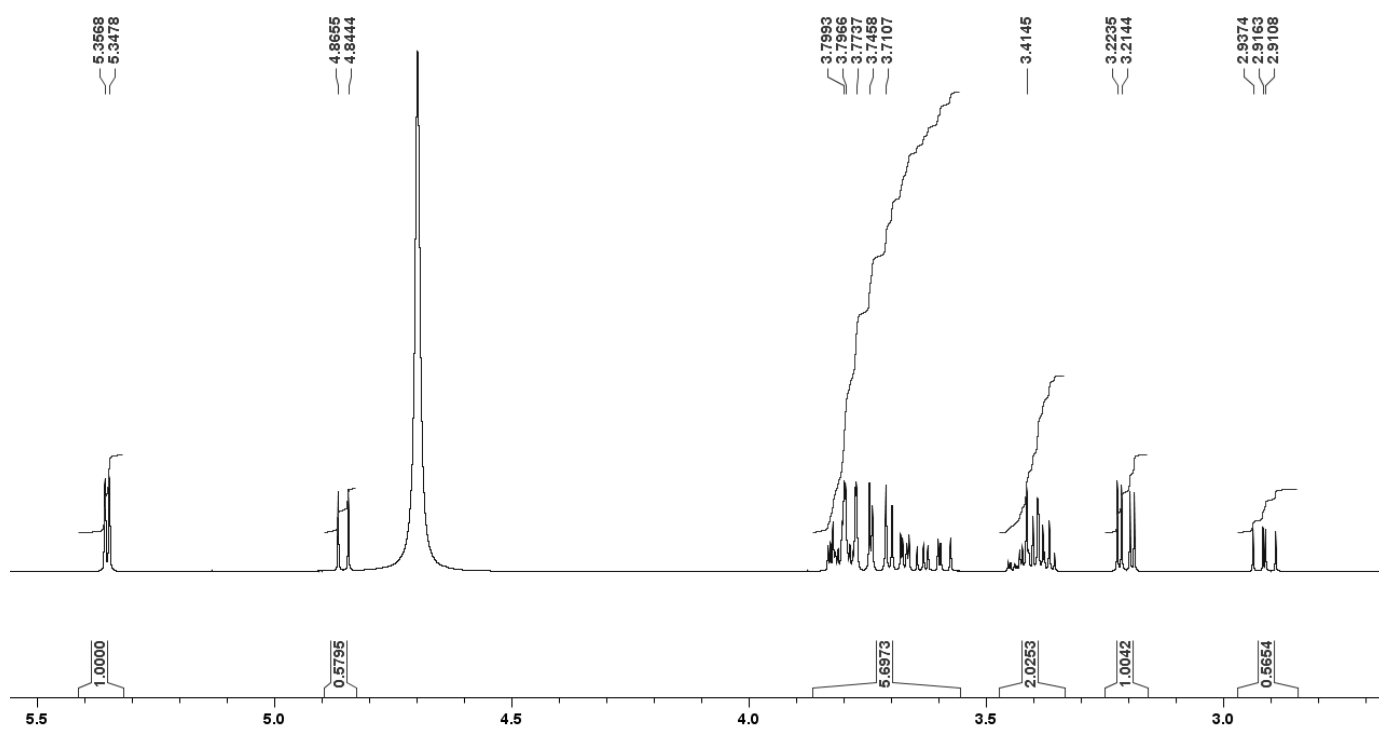


Annexe 4. Spectre de masse d'oligomères obtenus dans les conditions suivantes : 300 secondes d'ionisation microonde, 100 watts, 5% de peroxyde d'hydrogène, 2% d'acide acétique, 2% de chitosane ($250\,000\text{ g.mol}^{-1}$).

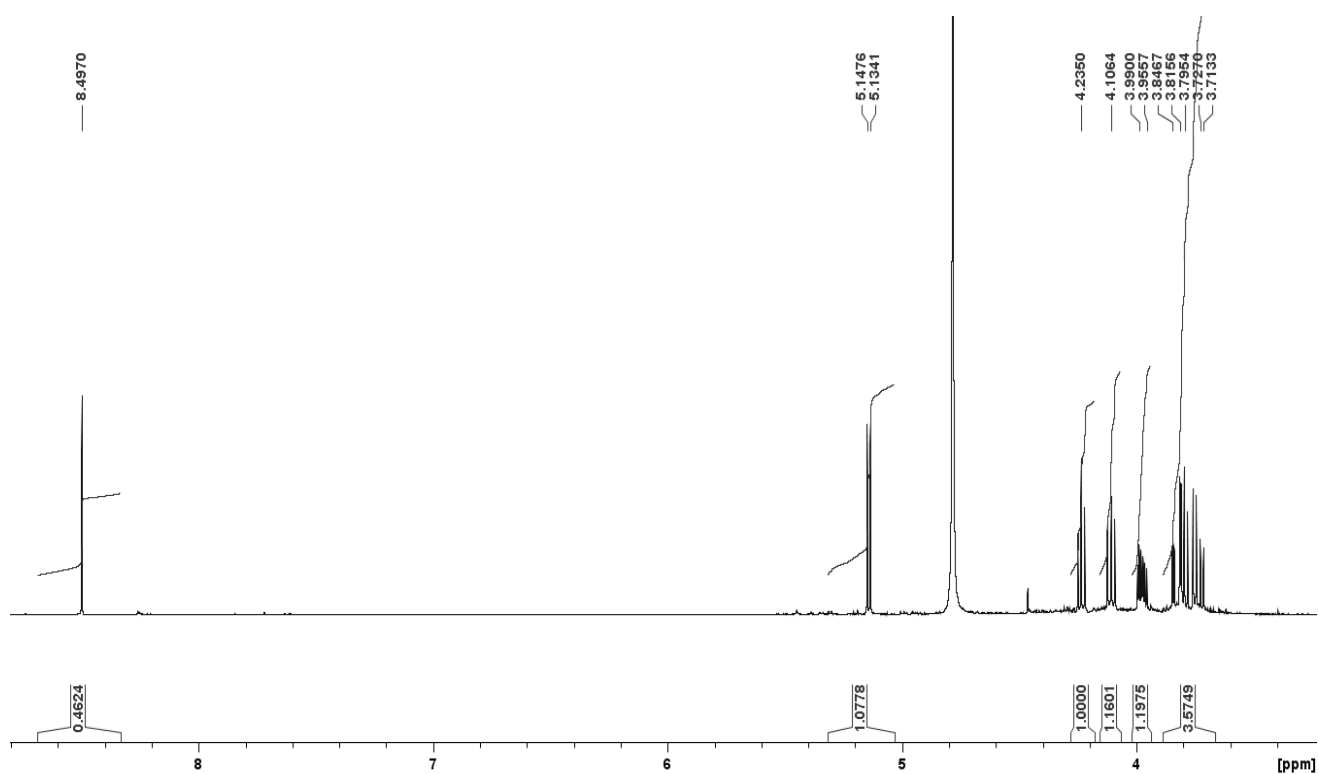
Annexes

Chitosan	DA (%)		dn/dc	Mw (kg/mol)		Mn (kg/mol)		Dispersity		DPn	
	Labelled	Measured		PEO/PEG equivalent	Triple detection	PEO equivalent	Triple detection	PEO/PEG equivalent	Triple detection	PEO/PEG equivalent	Triple detection
CH30	≥10	16 ± 2	0.1782 ± 0.0022	40 ± 4	44 ± 4,4	13 ± 1	21 ± 2	3 ± 0.3	2 ± 0.2	77 ± 6	125 ± 12
CH150	≥10	16 ± 2	0.1828 ± 0.0031	163 ± 16	150 ± 15	96 ± 10	80 ± 8	3 ± 0.3	2 ± 0.2	571 ± 60	476 ± 47
CH250	≥10	16 ± 2	0.1893 ± 0.0012	227 ± 23	370 ± 37	200 ± 20	192 ± 19	1.9 ± 0.2	2 ± 0.2	1190 ± 120	1143 ± 113
CHY	≥10	20 ± 2	0.1911 ± 0.0027	120 ± 12	240 ± 24	120 ± 12	170 ± 17	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2	706 ± 70	1000 ± 100
CHDA1	≥1	1 ± 1	0.1980 ± 0.0009	100 ± 10	150 ± 15	62 ± 6	80 ± 8	2.1 ± 0.2	2 ± 0.2	383 ± 36	493 ± 30
Oligomer											
	Equivalent of NaNO ₂ /GlcN unit			Mw(g/mol)		Mn (g/mol)		Dispersity		DPn	
CH30	0.4		0.1449 ± 0.0017	2,500 ± 250	2,750 ± 275	1,850 ± 185	2,500 ± 250	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	11 ± 1	15 ± 2
CH30	0.2		0.1510 ± 0.0045	3,900 ± 390	4,150 ± 415	2,350 ± 235	3,500 ± 350	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	14 ± 1	21 ± 3
CH30	0.1		0.1539 ± 0.0009	7,950 ± 795	7,900 ± 790	5,050 ± 505	8,100 ± 810	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	30 ± 3	48 ± 5
CH150	0.4		0.1439 ± 0.0038	2,600 ± 260	2,800 ± 280	1,850 ± 185	2,500 ± 250	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	11 ± 1	15 ± 1
CH150	0.2		0.1576 ± 0.0007	4,400 ± 440	3,450 ± 345	2,850 ± 285	3,000 ± 300	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	17 ± 2	18 ± 2
CH150	0.1		0.1512 ± 0.0015	10,200 ± 1020	11,800 ± 1180	6,200 ± 620	10,100 ± 1010	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	37 ± 3	60 ± 6
CH250	0.4		0.1366 ± 0.0034	2,600 ± 260	3,000 ± 300	1,850 ± 185	2,500 ± 250	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.1	11 ± 1	15 ± 1
CH250	0.2		0.1423 ± 0.0027	4,200 ± 420	3,800 ± 380	2,700 ± 270	3,500 ± 350	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	16 ± 2	21 ± 2
CH250	0.1		0.1399 ± 0.0023	13,600 ± 1360	17,400 ± 1740	7,600 ± 760	13,900 ± 1390	1.8 ± 0.2	1.2 ± 0.1	45 ± 5	83 ± 8
CHY240	0.4		0.1377 ± 0.0008	2,700 ± 270	3,100 ± 310	1,850 ± 185	2,500 ± 250	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	11 ± 1	15 ± 1
CHY240	0.2		0.1423 ± 0.0009	4,400 ± 440	5,300 ± 530	2,350 ± 235	4,350 ± 435	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1	14 ± 1	22 ± 2
CHY240	0.1		0.1363 ± 0.0019	10,100 ± 101	13,100 ± 131	6,050 ± 605	10,900 ± 1090	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1	36 ± 3	64 ± 6

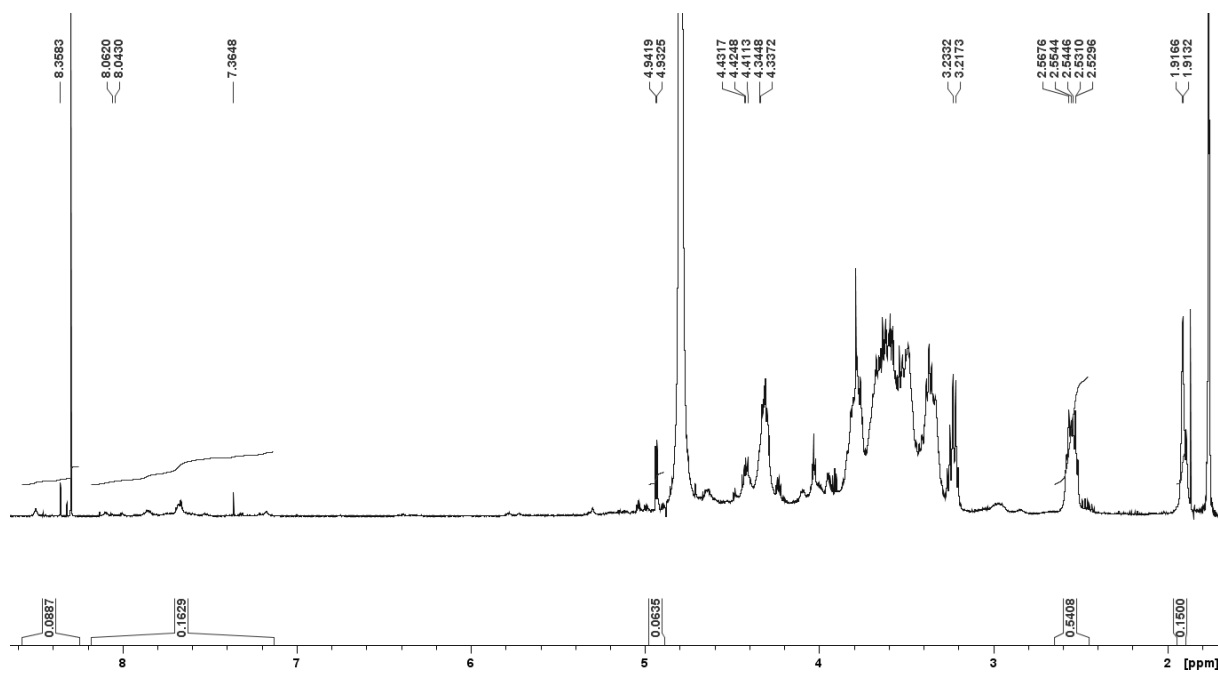
Annexe 5. DA, dn/dc, molar masses and dispersity of crude chitosan and chitosan oligomers obtained with action of NaNO₂ during 3h at 50°C.



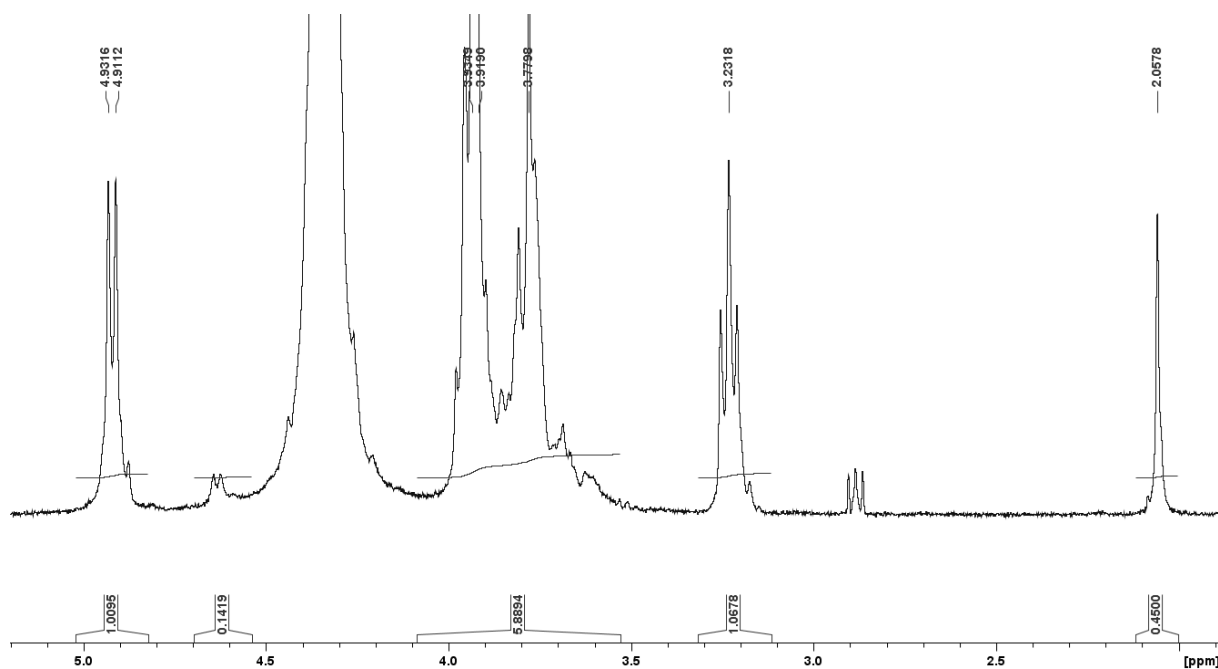
Annexe 6. ¹H NMR spectrum of D-(+)-Glucosamine hydrochloride (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5)



Annexe 7. ¹H NMR spectrum of AMF (D₂O, 400 MHz, 298 K, pH 5.5)

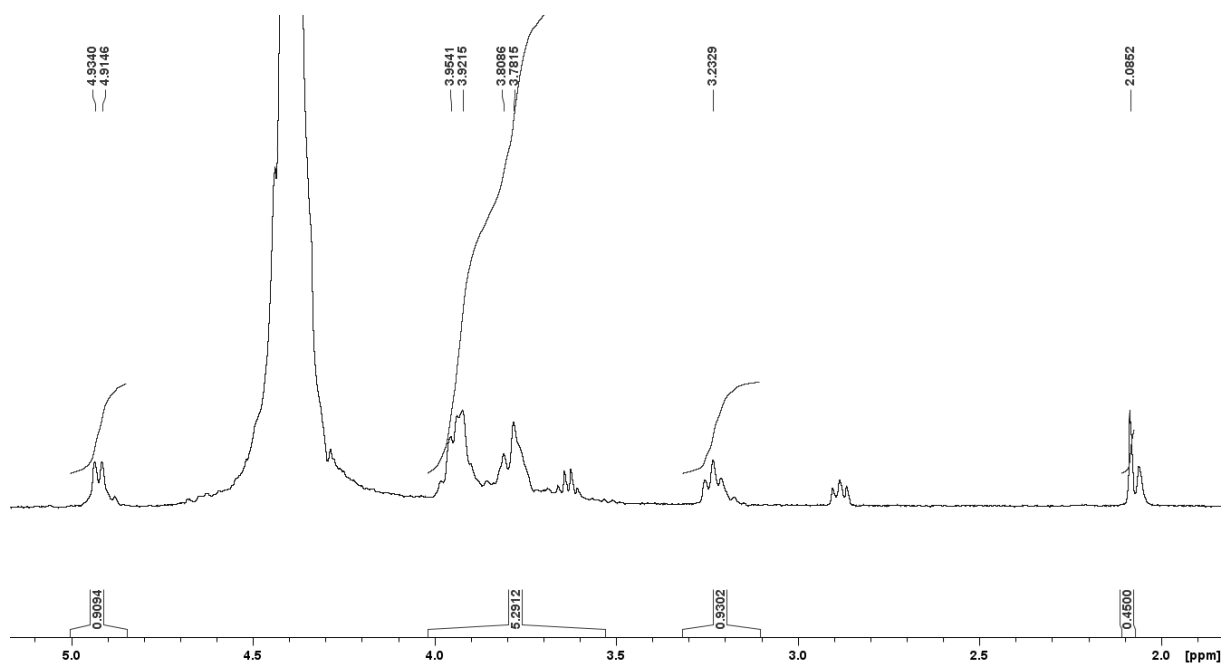


Annexe 8. ^1H NMR spectrum of oligomer 1600 g/mol from $\text{CH}_3\text{O} + 0.4 \text{ eq NaNO}_2/\text{NH}_2$ (D_2O , 400 MHz, 298 K)



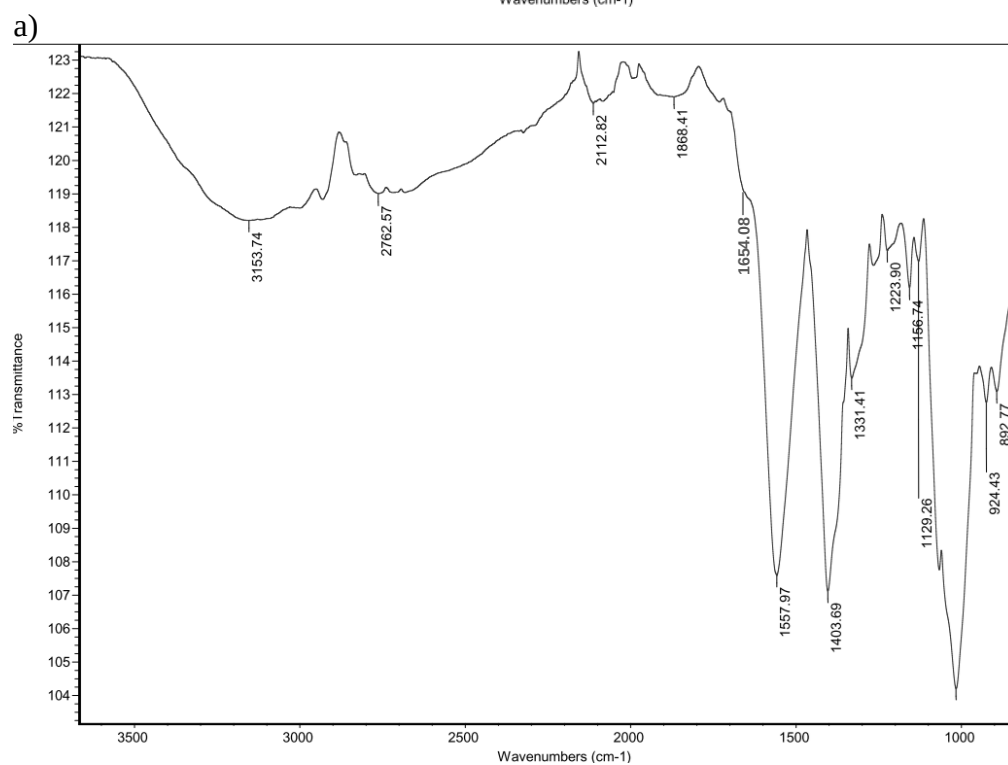
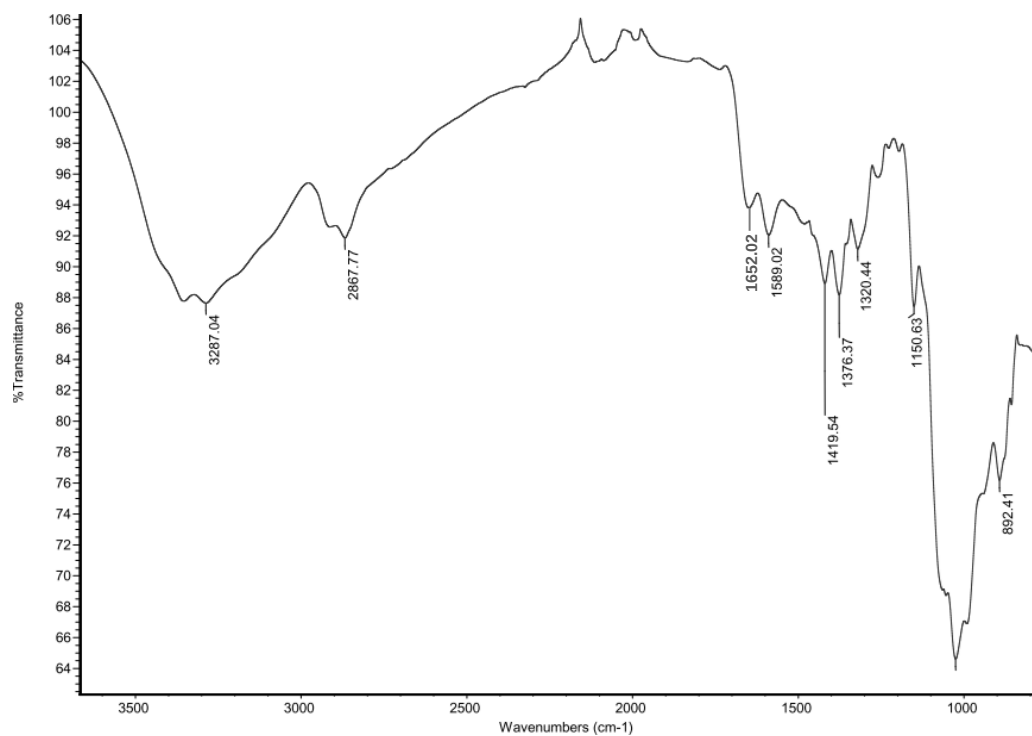
Annexe 9. ^1H NMR spectrum of crude chitosan CH_3O ($\text{D}_2\text{O} + \text{TFA}$, 400 MHz, 350 K)

δ 4.9 (d, 6Hz, H_1), 4.6 (d, 6Hz, $\text{H}_{1\text{GINac}}$), 3.6-4 (m, H_3 , 1H H_4 , 1H H_5 , 2H H_6), 3.2 (t, H_2), 2.1 (s, 3H, H_{CH_3}), 4.3 (s, HOD).



Annexe 10. ^1H NMR spectrum of chitosan oligomer from CH30 + 0.2 eq $\text{NaNO}_2/\text{NH}_2$ (D_2O , 400 MHz, 350 K)

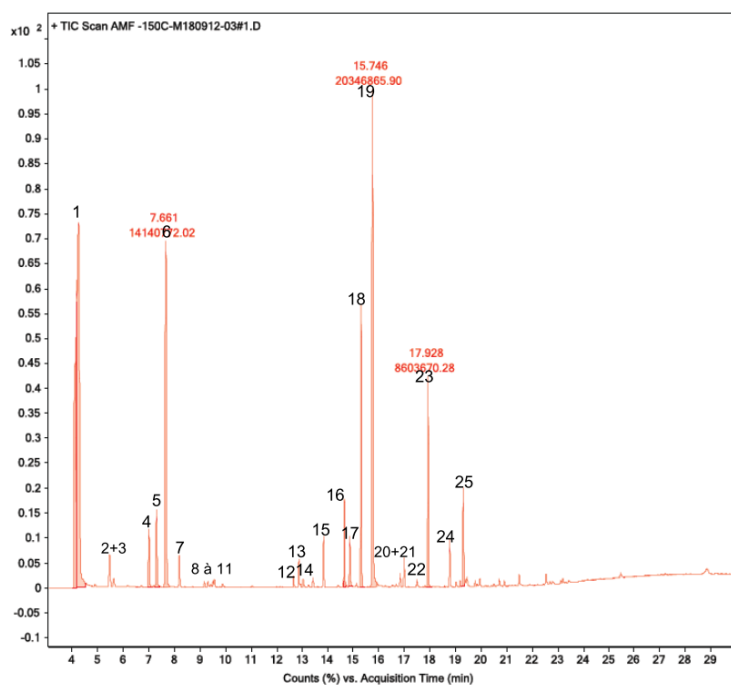
δ 4.9 (d, 6Hz, H_1), 4.6 (d, 6Hz, $\text{H}_{1\text{GlnAc}}$), 3.6-4 (m, H_3 , 1H H_4 , 1H H_5 , 2H H_6), 3.2 (t, H_2), 2.1 (s, 3H, H_{CH_3}), 2 (CH_3COOH), 4.3 (s, HOD).



b)

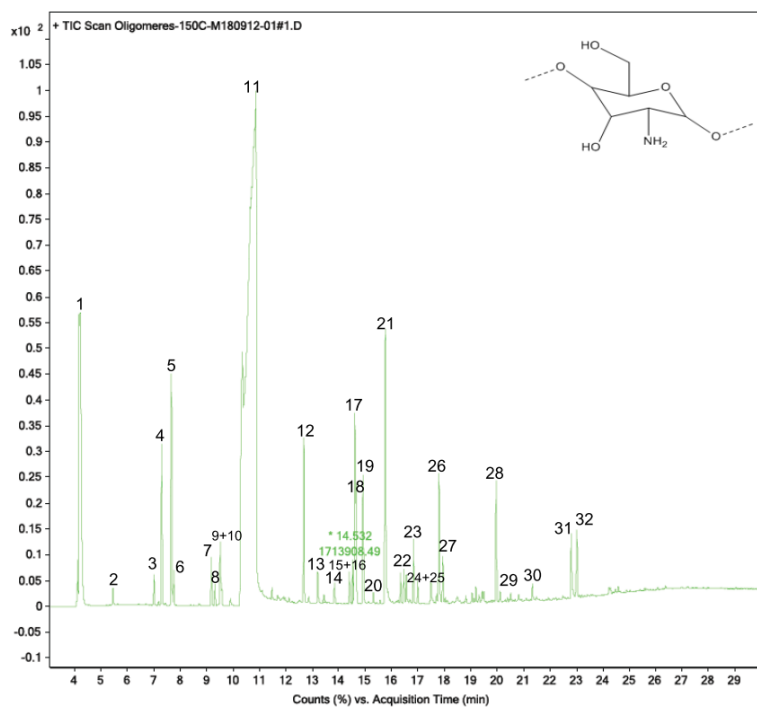
Annexe 11. FTIR spectrum of crude chitosan CH30 (a) and CH30 +0.2 eq of NaNO₂ (b)

Peak	Retention time (min)	Compound
1		air
2	5,48	Cyclobutanol
3	5,62	methanol
4	7	Furan
5	7,29	Acetone
6	7,66	Acetonitrile
7	8,2	2-propenitrile
		1-buten-3-yne
8	9,17	2-methylfuran
9	9,3	2,3-butanedione
		acetic acid
		3-methyl-2-butanone
10	9,51	2-butanone
11	9,57	Propanitrile
12	12,65	Pyrazine
		1,3-Diazine
13	12,86	1H-Pyrole-3-methyl
		bi-2-cyclohexen-1-yl
14	13,03	Pyridine
		2,4-Pentadienenitrile
15	13,83	Pyrole
		2-butenitrile
		3-butenitrile
16	14,65	2- Furancarbonitrile
		Aniline
17	14,85	Acetamide
18	15,31	Furfural
19	15,75	Furanmethanol
20	16,82	1-(2-furanyl)ethanone
		2-ethyl-5-methylfuran
21	16,99	2-ethylpyridine
		4-pyridinecarboxaldehyde
22	17,48	2-furanmethanol, 5-methyl
23	17,93	2-furancarboxaldehyde, 5 methyl
24	18,76	Pyrrole-2-carboxaldehyde, 1-methyl
25	19,3	pyrrole-2- carboxaldehyde



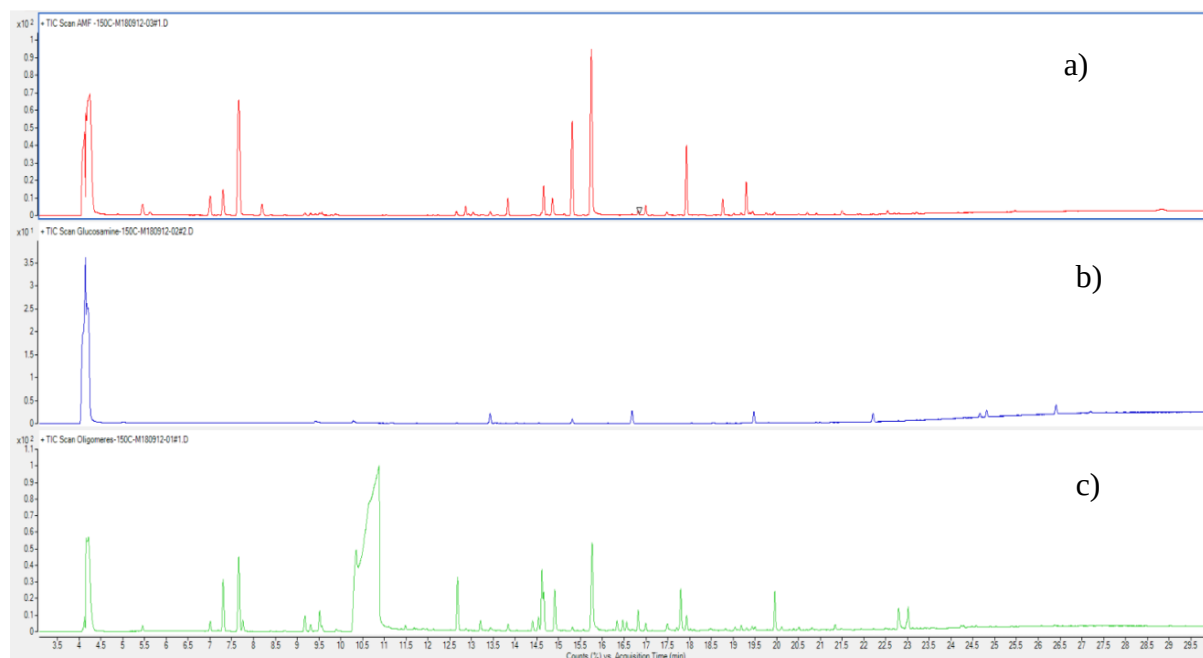
Annexe 12. Emission spectra and attribution datas of AMF by headspace chromatography

Peak	Retention time (min)	Compound
1		air
2	5,48	Cyclobutanol
3	7	Furan
4	7,29	Acetone
5	7,66	Acetonitrile
6	7,76	Methylacetate
7	9,17	2-methylfuran
8	9,3	Vinylacetate
9	9,51	2-butanone
10	9,57	Propanitrile
11	10,35	acetic acid
12	12,65	Pyrazine
		1,3-Diazine
13	13,2	Pyridine
		2,4-Pentadienenitrile
14	13,83	Pyrole
		2-butenitrile
		3-butenitrile
15	14,4	
16	14,54	2-methylpyridine
17	14,62	methylpyrazine
		Aminopyridine
		2-methylpyrimidine
18	14,65	2- Furancarbonitrile
		Aniline
19	14,85	Acetamide
20	15,31	Furfural
21	15,75	Furanmethanol
22	16,3	2,6-dimethylpyrazine
23	16,82	1-(2-furanyl)ethanone
		2-ethyl-5-methylfuran
24	16,99	2-ethylpyridine
		4-pyridinecarboxaldehyde
25	17,48	2-furanmethanol, 5-methyl
26	17,8	2-Furanmethanol, acetate
27	17,93	2-furancarboxaldehyde, 5 methyl
28	19,9	1-(1H-pyrrol-2-yl)ethanone
29	20,1	1H-indol-5-ol
30	21,3	1H-pyrrole-2-carboxaldehyde-1-methyl
31	22,8	Phenol-4-aminio-3-methyl
32	23	4-acetamidobenzyl alcool

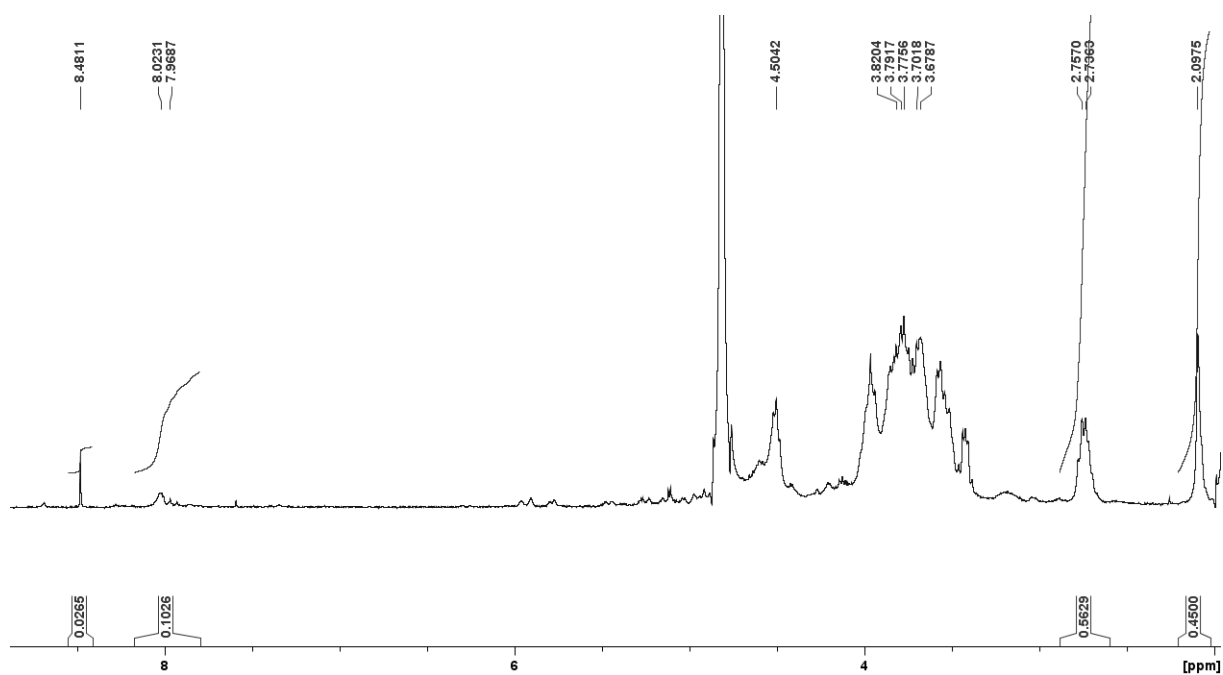


Annexe 13. Emission spectra and attribution datas of oligomer from CH30 + 0.2eq NaNO₂ by headspace chromatography

*Compounds in grey are present in AMF and oligomer emissions.



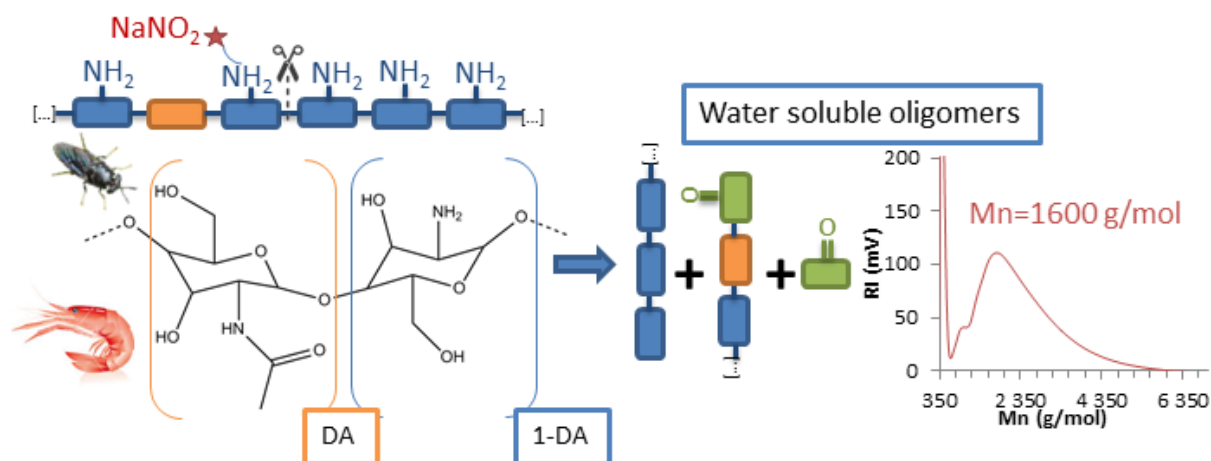
Annexe 14. Emission chromatograms of a) AMF, b) glucosamine, c) oligomer from CH30 + 0.2eq NaNO₂



Annexe 15. ^1H NMR spectrum of oligomer 1600 g/mol from $\text{CH}_3\text{O} + 0.4 \text{ eq NaNO}_2/\text{NH}_2$ post dialysis (D_2O , 400 MHz, 298 K)

Experiment number	Number of daphnia mobiles after 48h				Inhibition (%)
	1	2	3	4	
Control	5	5	5	5	0
DP5 100 mg/L	5	5	5	5	0
DP10 100 mg/L	5	5	5	5	0

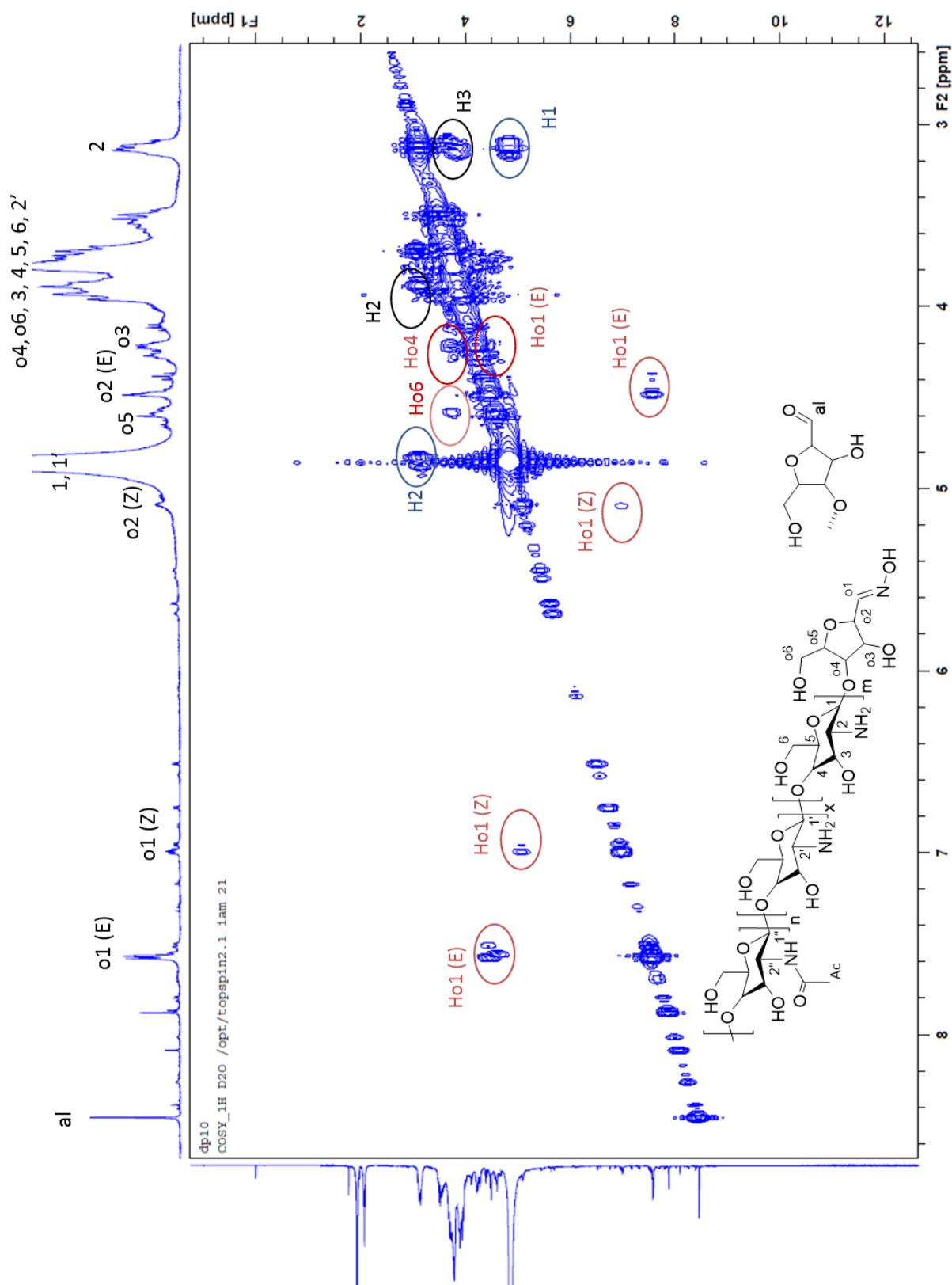
Annexe 16. Number of daphnia mobiles for DP5 and DP10 at 100 mg/L after 48h and inhibition percentage against control sample



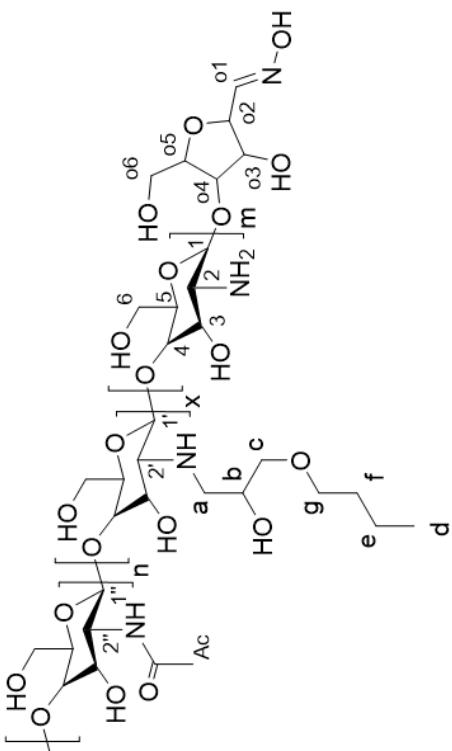
Annexe 17. Graphical abstract « Water soluble 2, 5-anhydro-D-mannofuranose end chain chitosan oligomers of very low molecular weight: synthesis and characterization »

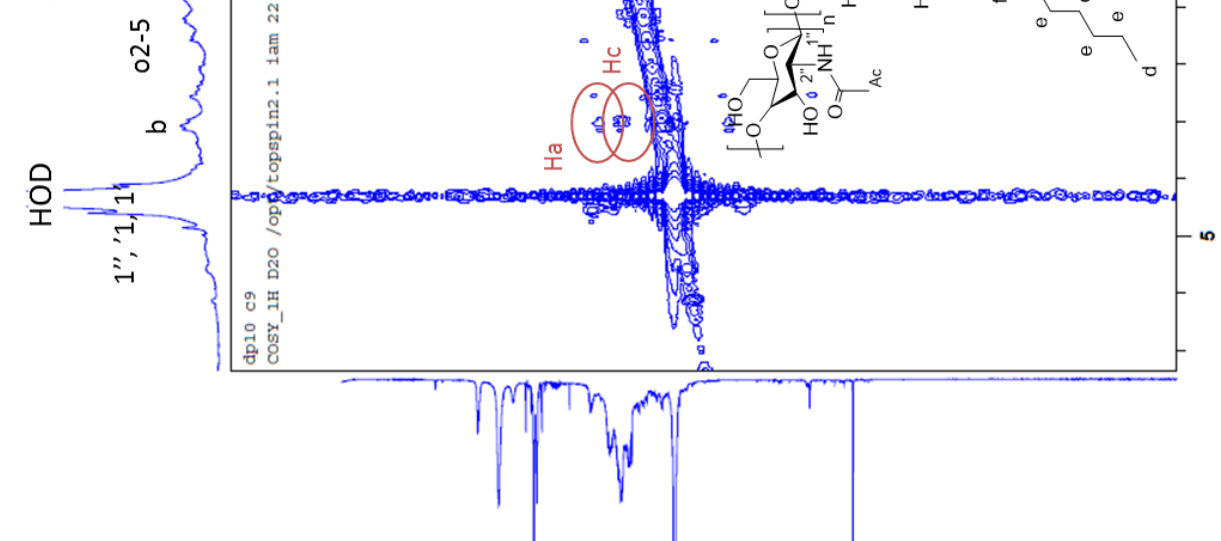
Biomacromolecules 2019, 20 (12), 4353-4360

Annexe du Chapitre 3

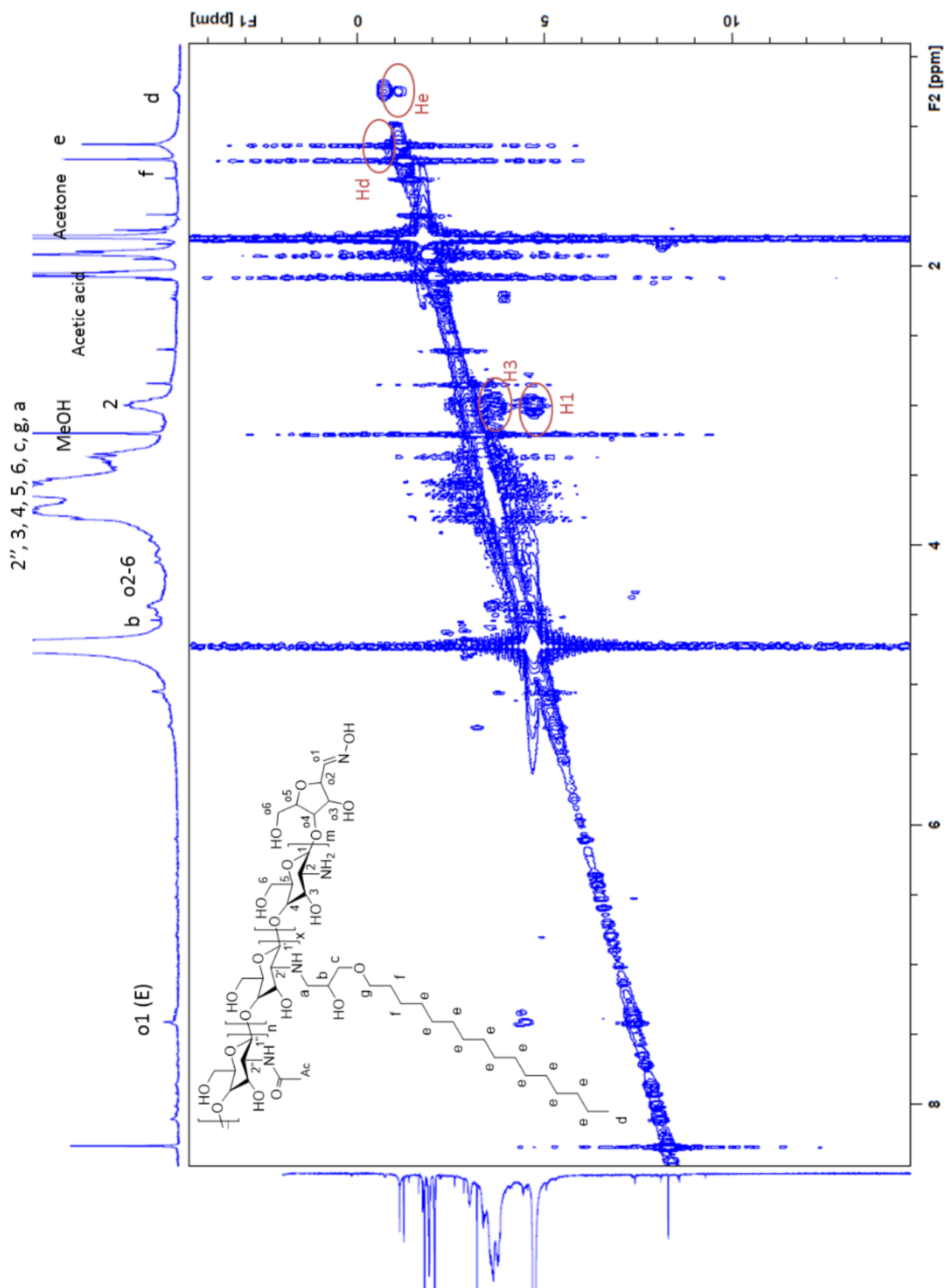


Annexe 18. 2D COSY NMR in D₂O+ TFA, (64 scans, 3h50) of DP10-oximes oligomers

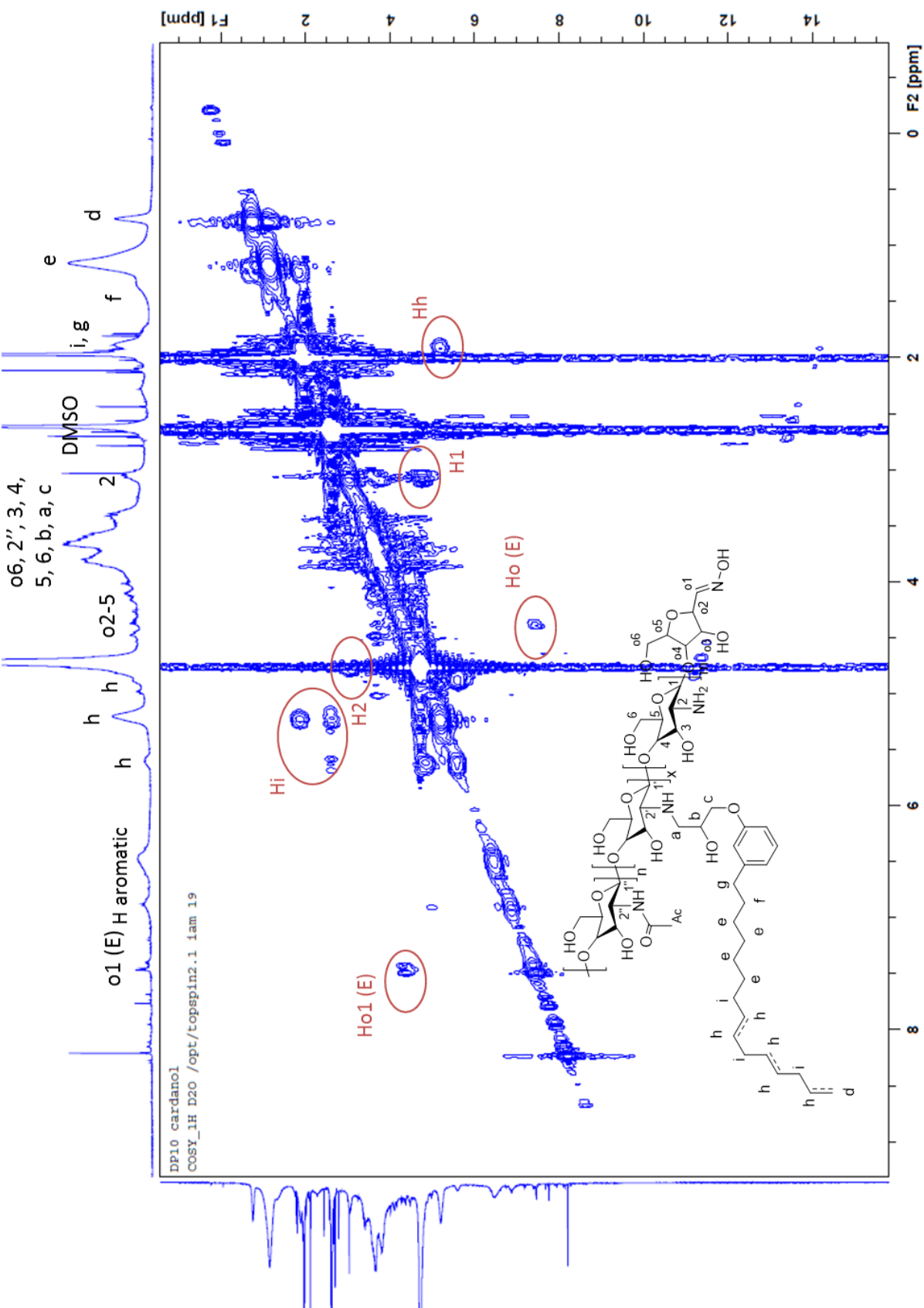




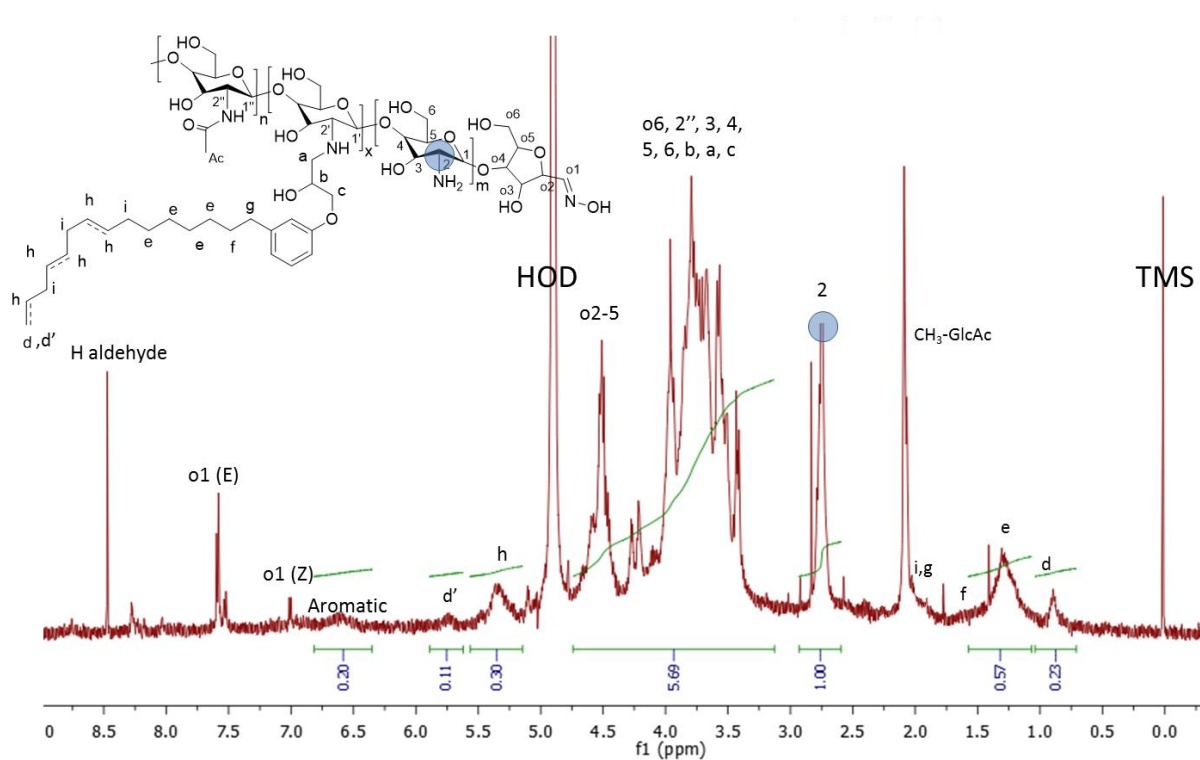
Annexe 20. 2D COSY NMR in D₂O, TFA, (64 scans, 3h50) of DP10-C9 oligomers



Annexe 21. 2D COSY NMR in D₂O, TFA, (64 scans, 3h50) of DP10-C16 oligomers



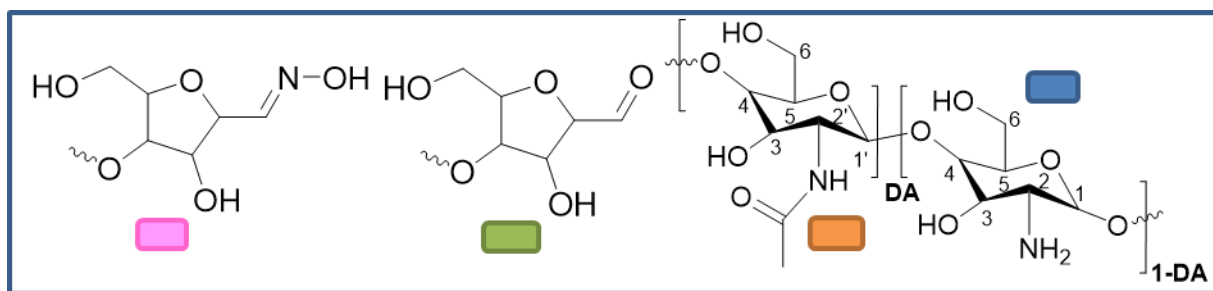
Annexe 22. 2D COSY NMR in D₂O, TFA, (64 scans, 3h50) of DP10-Cardanol oligomers



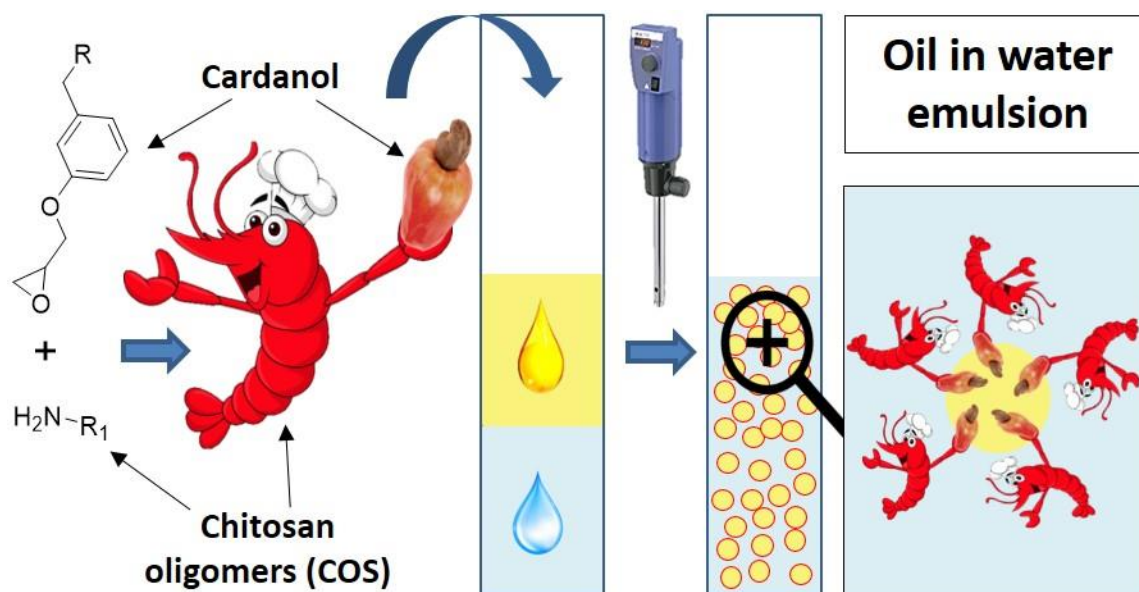
Annexe 23. ^1H NMR in D_2O of DP5 COS grafted with cardanol

DP of chitosan	DS (%) with 1 eq cardanol/ NH_2	DS (%) with 1,5 eq cardanol/ NH_2	DS (%) with 3 eq cardanol/ NH_2
DP5	7	9	12
DP10	4	8	8
DP15	0,5	2	2

Annexe 24. Table of substitution degree (DS) of oligomer grafted cardanol according to number of equivalent of cardanol/ NH_2



Annexe 25. Simplified depiction of sugar structures from COS

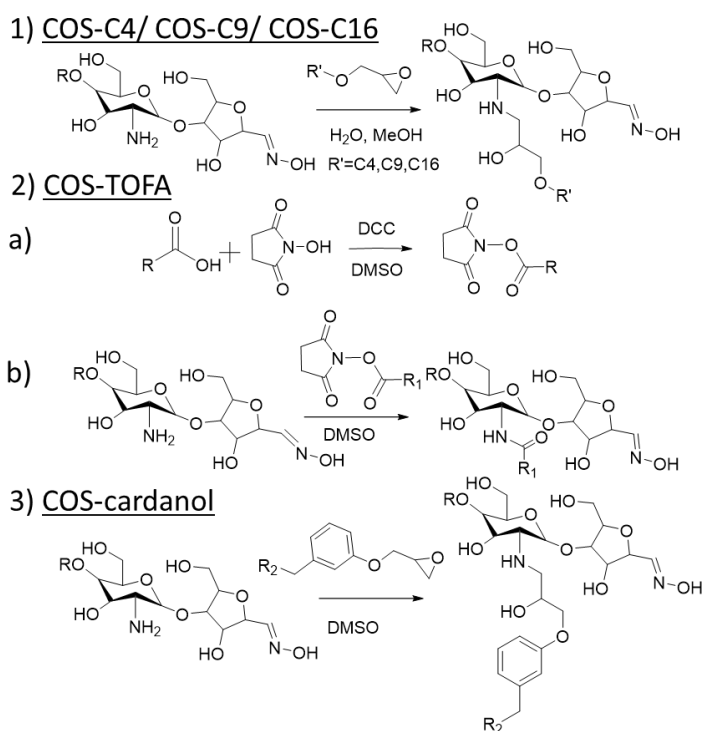


Annexe 26. Graphical abstract « Functionalization of chitosan oligomers: from aliphatic epoxide to cardanol grafted oligomers for oil in water emulsions » *Biomacromolecules* 2021, 22, 846–854.

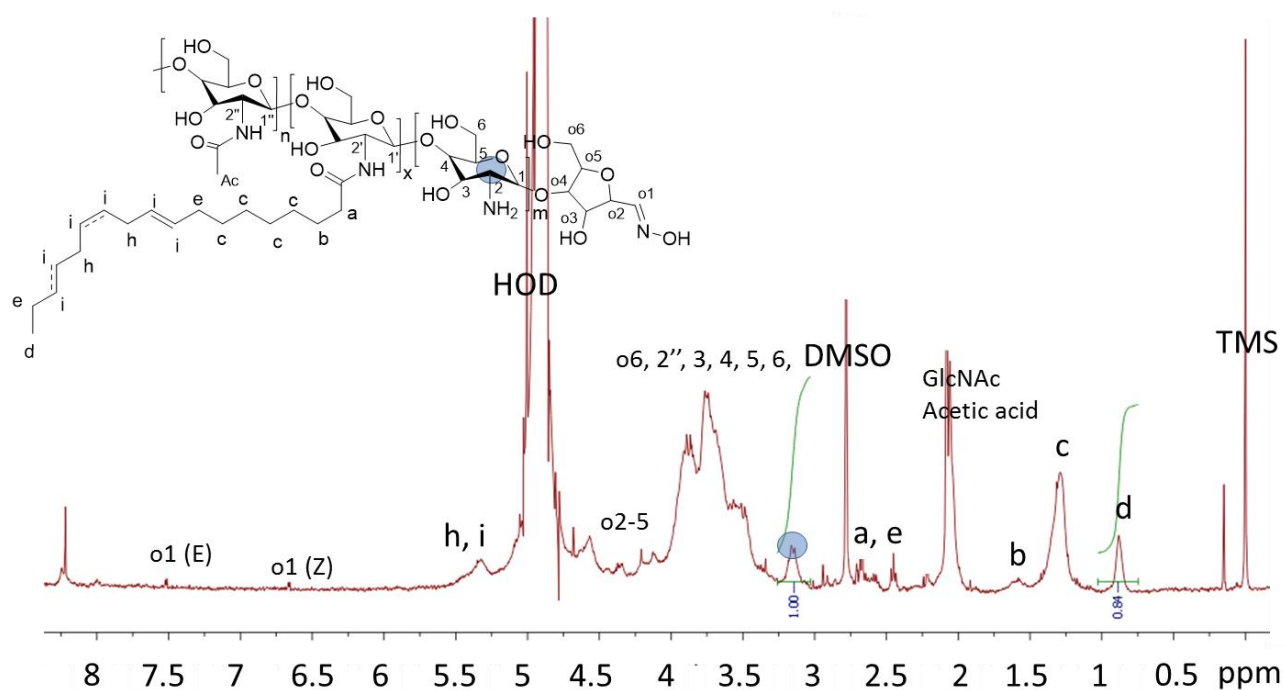
Annexes du Chapitre 4

Groupements fonctionnels hydrophile	Valeurs des groupements N_i	Groupements fonctionnels lipophile	Valeurs des groupements N_j
$-\text{SO}_4^-\text{Na}^+$	38,7	$-\text{CH}-$	-0,475
$-\text{COO}^-\text{K}^+$	21,1	$-\text{CH}_2-$	
$-\text{COO}^-\text{Na}^+$	19,1	CH_3-	
N (amine tertiaire)	9,4	$=\text{CH}-$	
Ester de sorbitane	6,8	Groupements dérivés	Valeurs des groupements
Ester (Libre)	2,4	$-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})-$	+0,33
$-\text{COOH}$	2,1	$-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})-$	-0,15
Hydroxyle (Libre)	1,9		
$-\text{O}-$	1,3		
Hydroxyle de sorbitane	0,5		

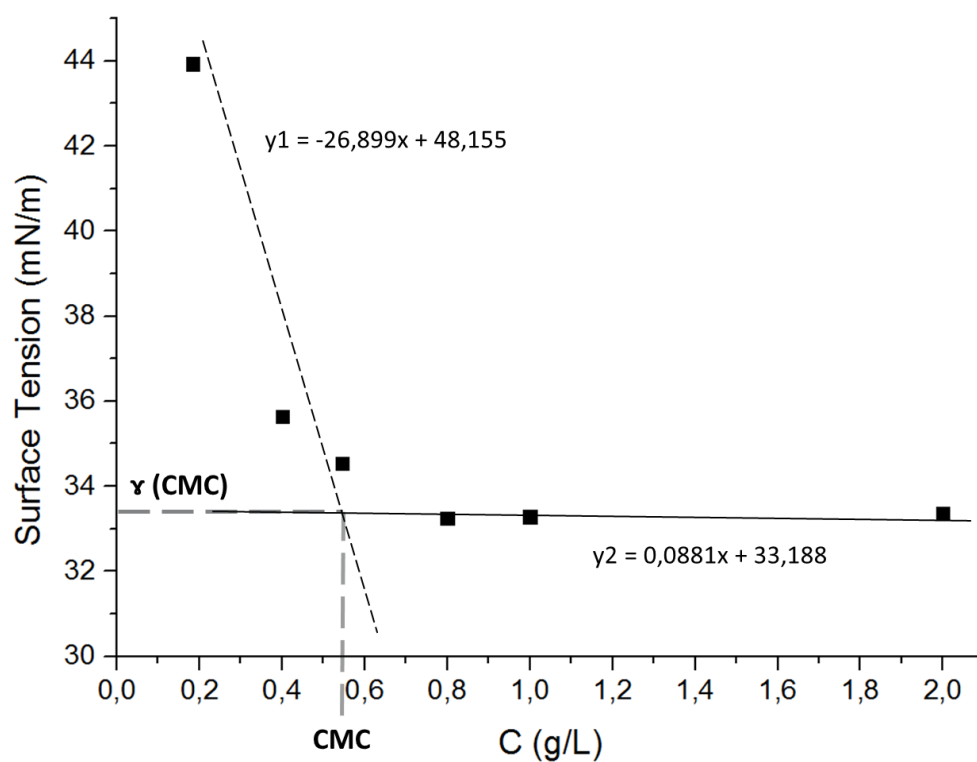
Annexe 27. Valeurs de HLB en fonction des groupements fonctionnels du tensioactif selon Davies et Rideal^{3 4}



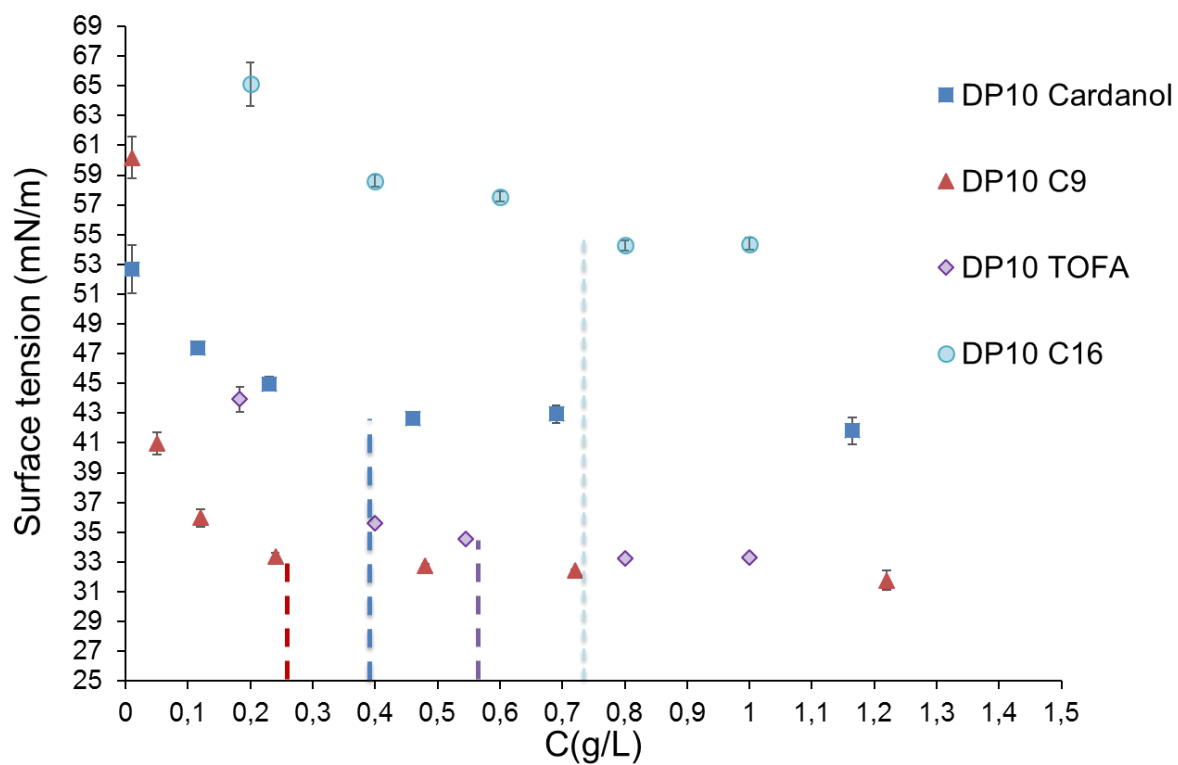
Annexe 28.. Functionalization of COS with 1) C4/C9/C16 2) Tall oil fatty acid (TOFA) and 3) cardanol



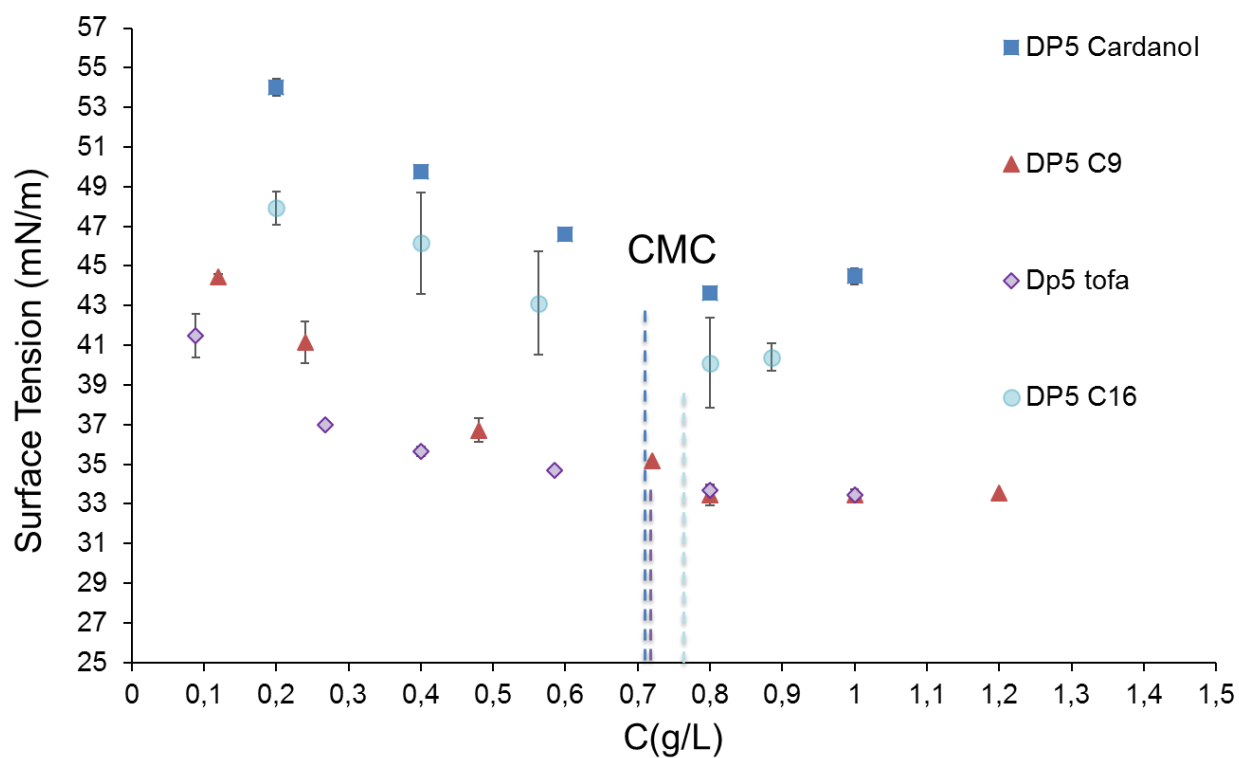
Annexe 29.. ¹H NMR of DP10 oligochitosan modified with TOFA



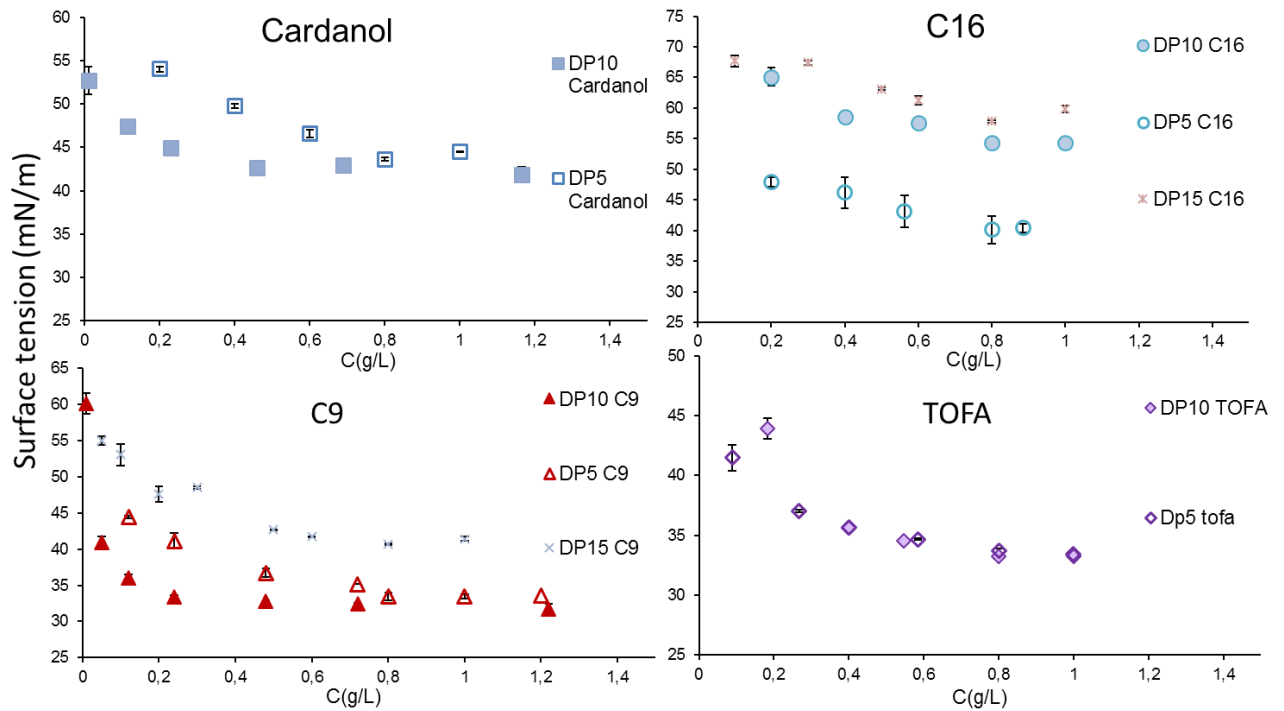
Annexe 30. Example of measurement of critical micellar concentration (CMC) of DP10 TOFA



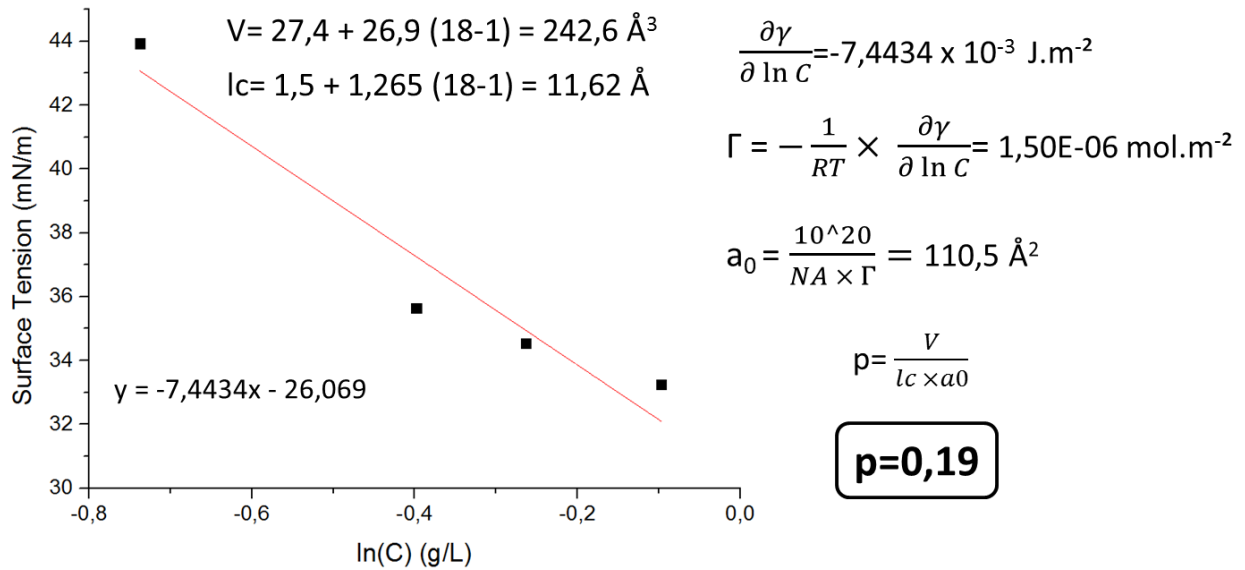
Annexe 31. Surface tension evolution according to surfactant concentration for DP10 surfactants



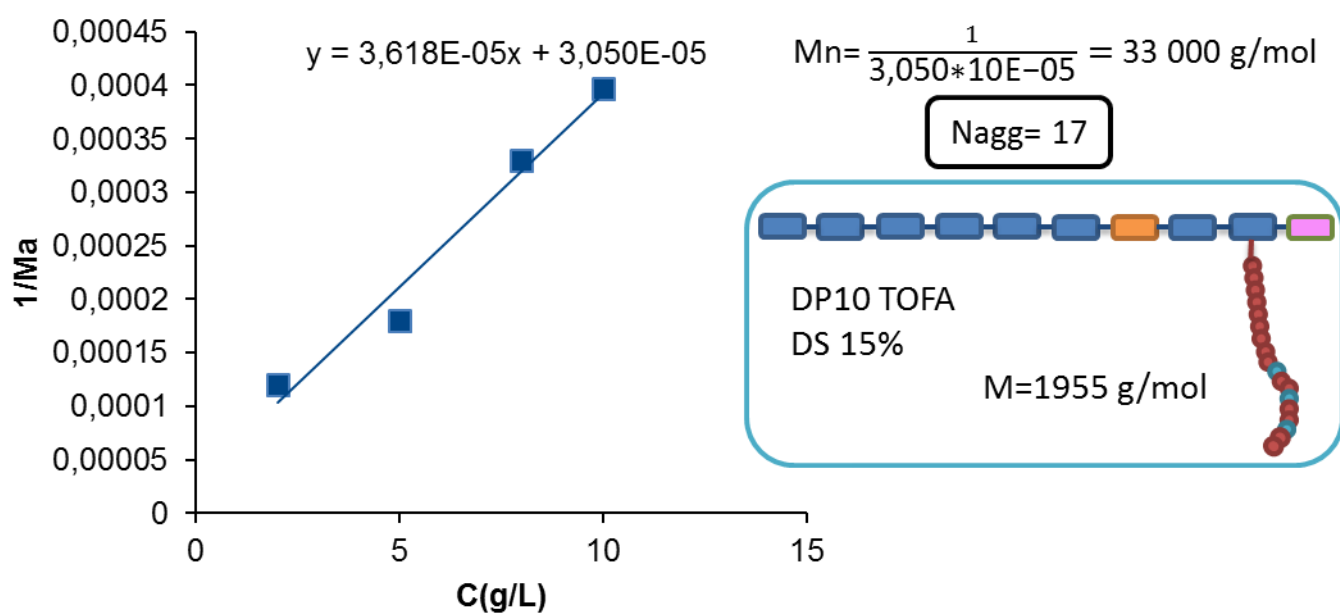
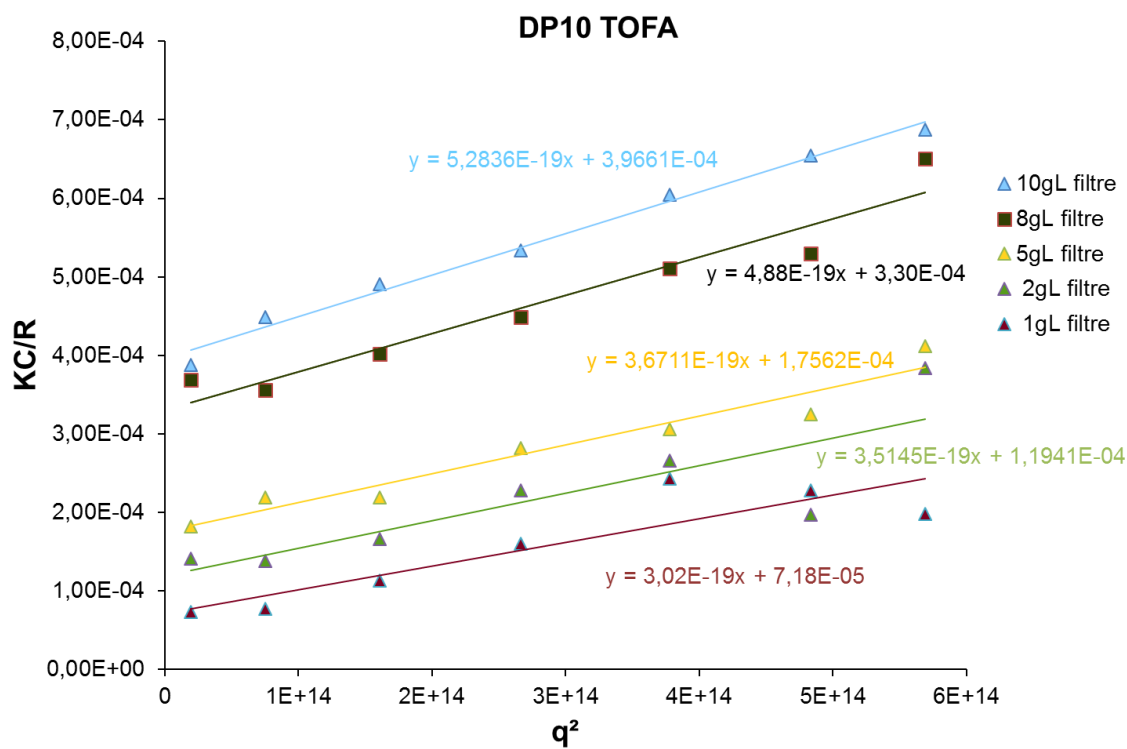
Annexe 32. Surface tension evolution according to surfactant concentration for DP5 surfactants



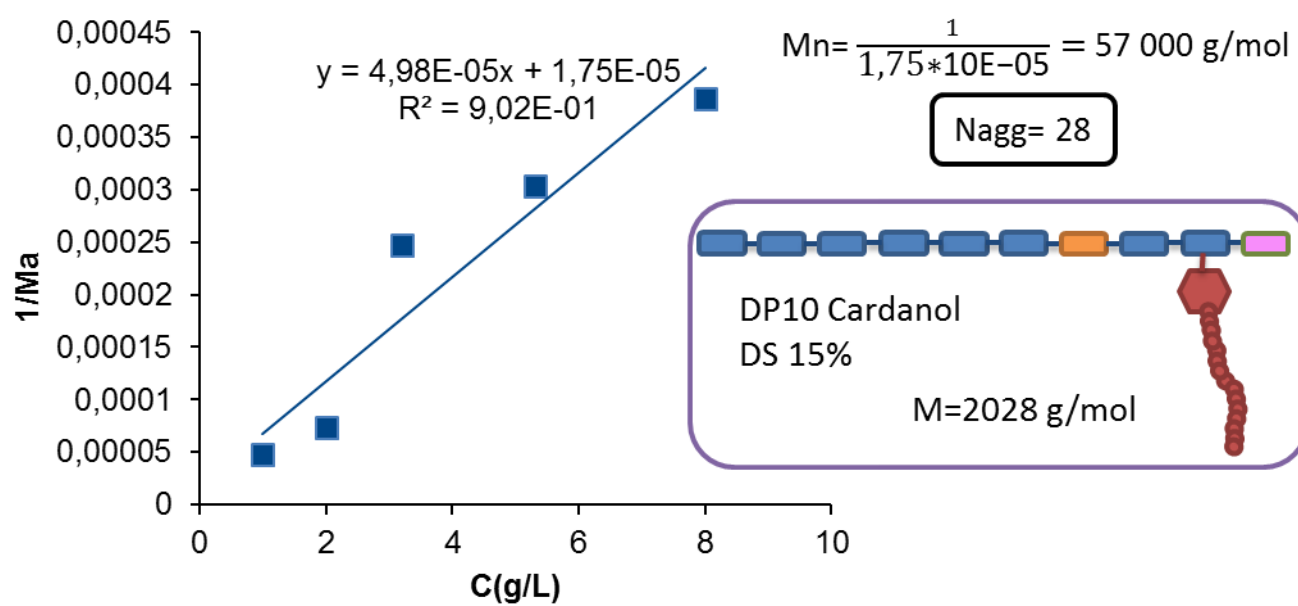
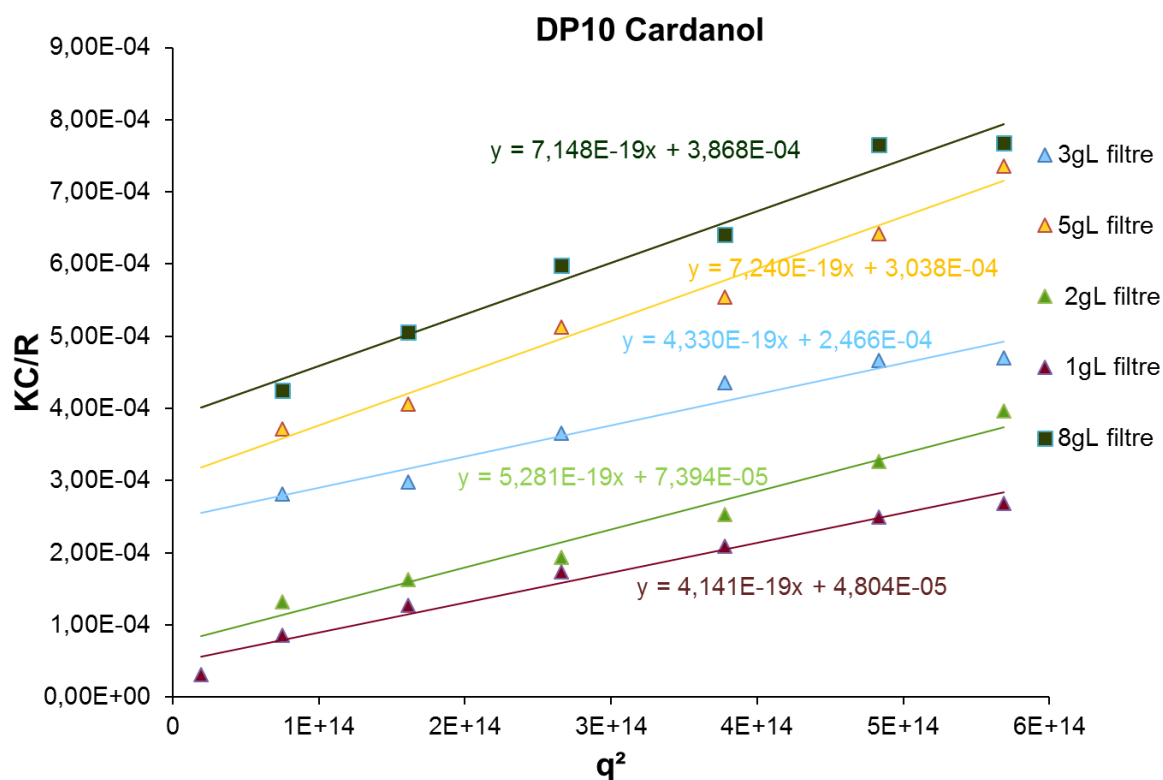
Annexe 33. Surface tension evolution according to surfactant concentration according to the hydrophilic chain length for different hydrophobic graft



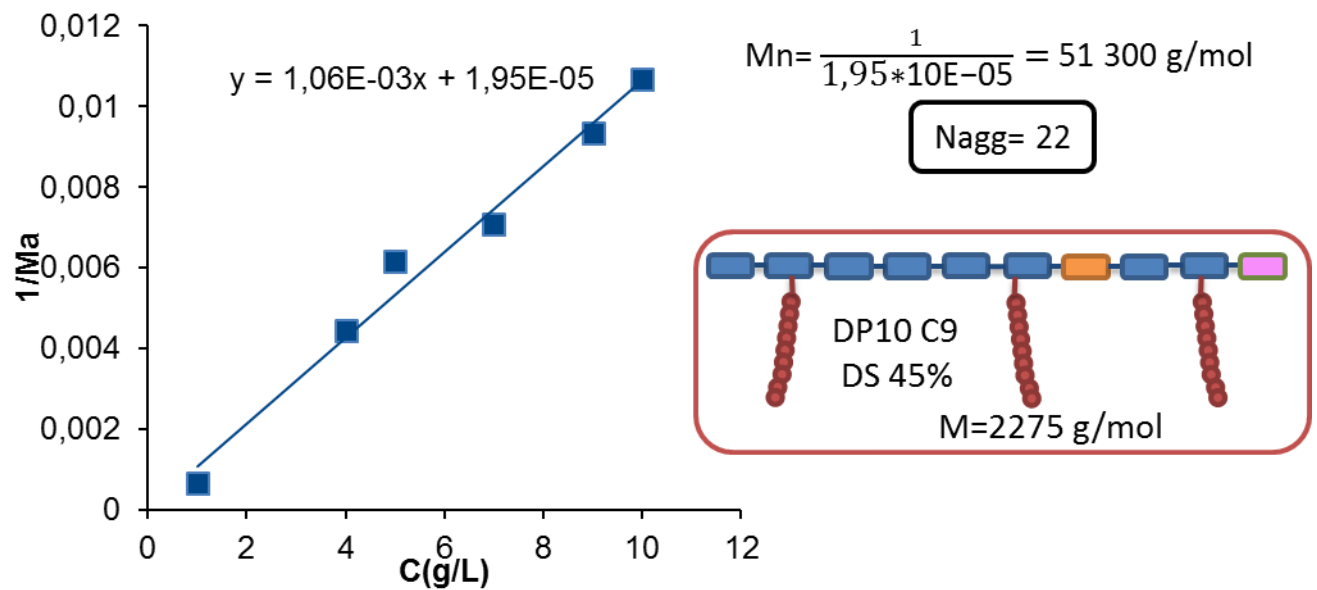
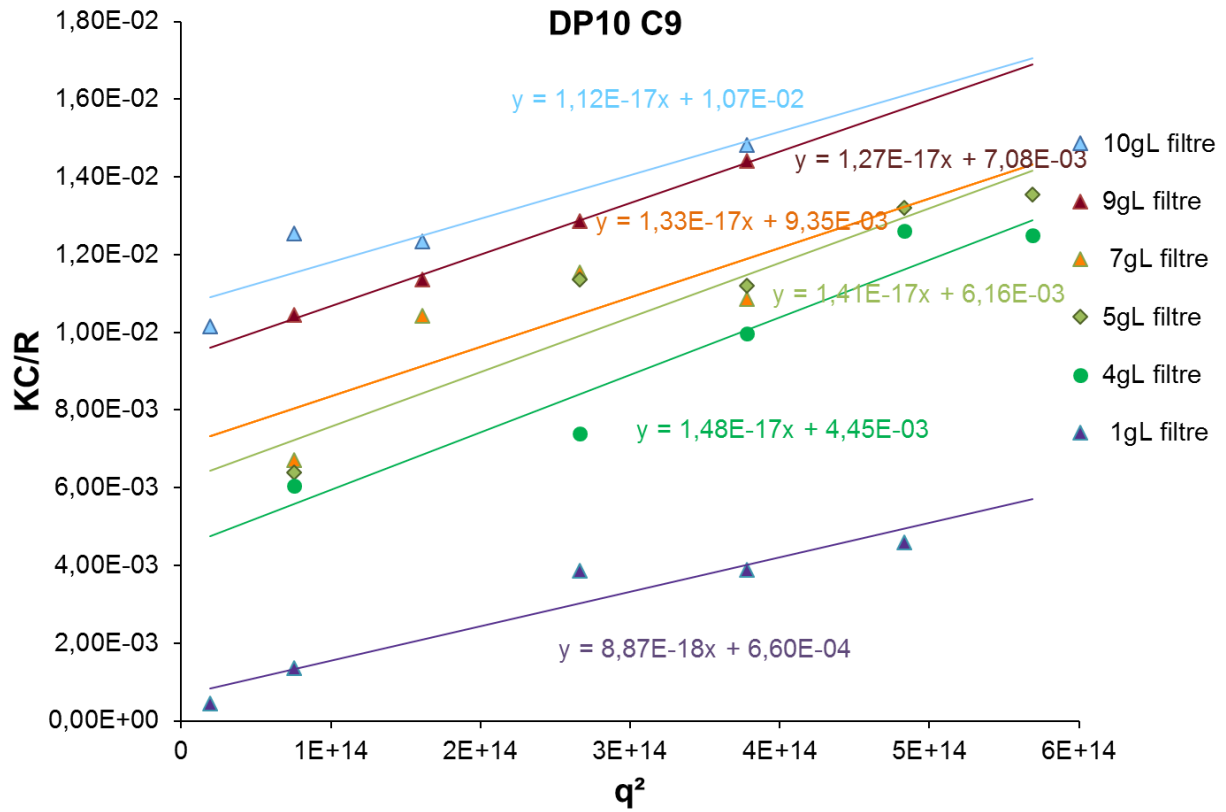
Annexe 34. Example of calculation of stacking parameter p of DP10 TOFA (C18)



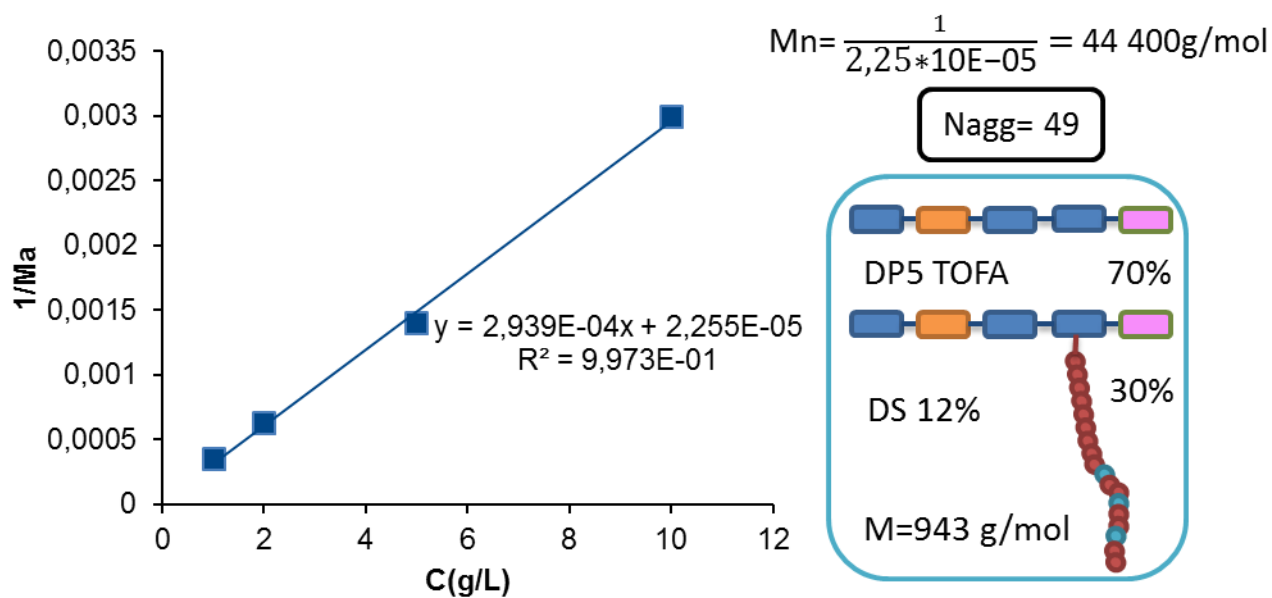
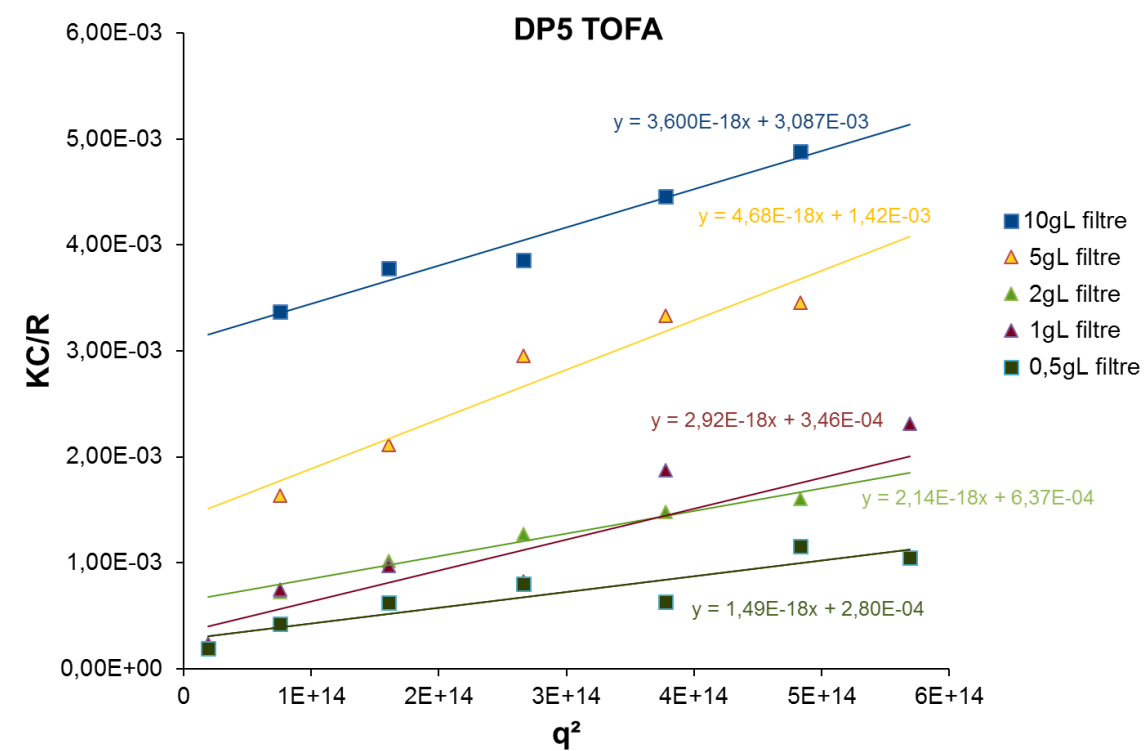
Annexe 35. Calculation of molar mass Mn and aggregation number $Nagg$ of DP10 TOFA



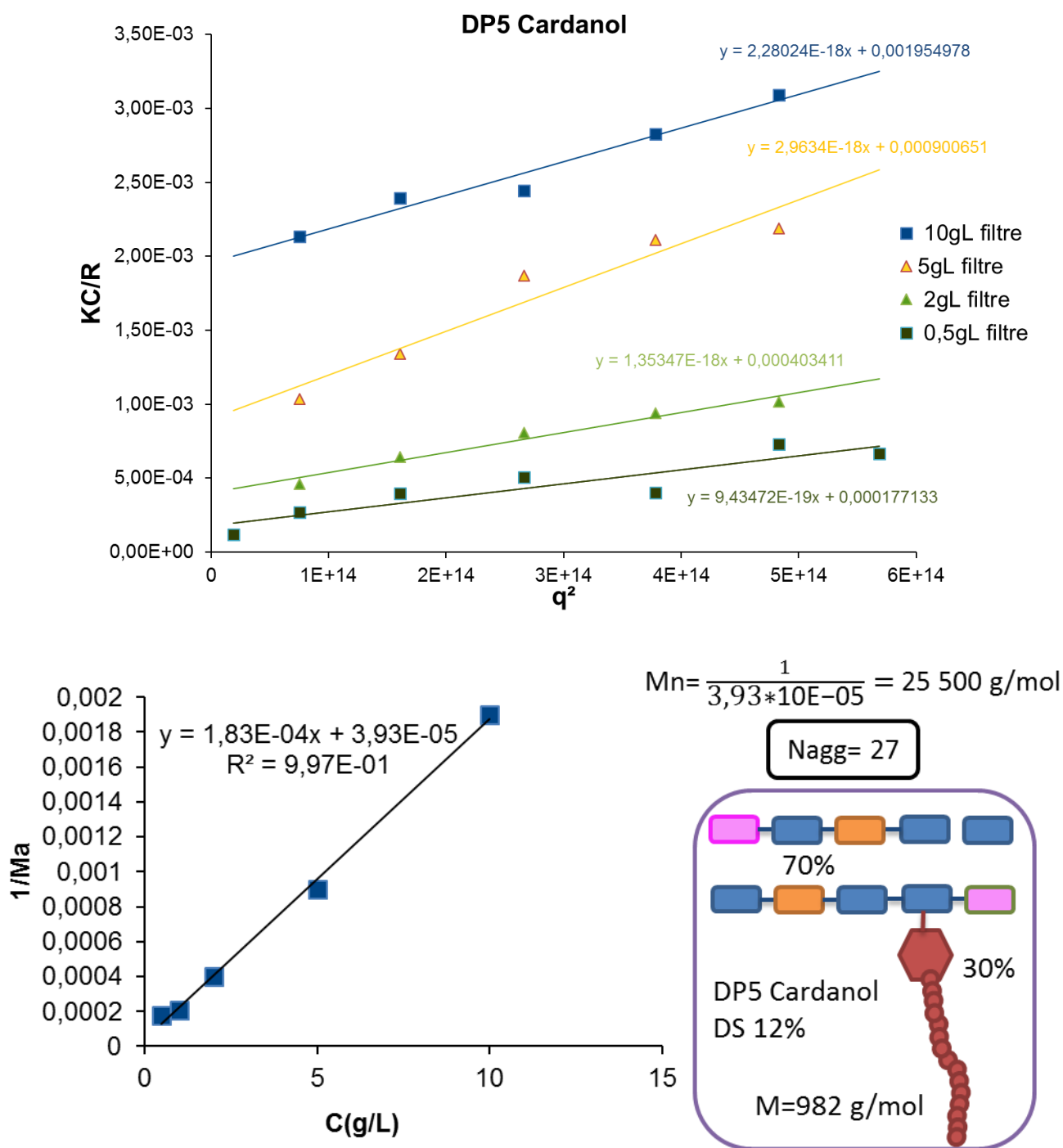
Annexe 36. Calculation of molar mass Mn and aggregation number $Nagg$ of DP10 Cardanol



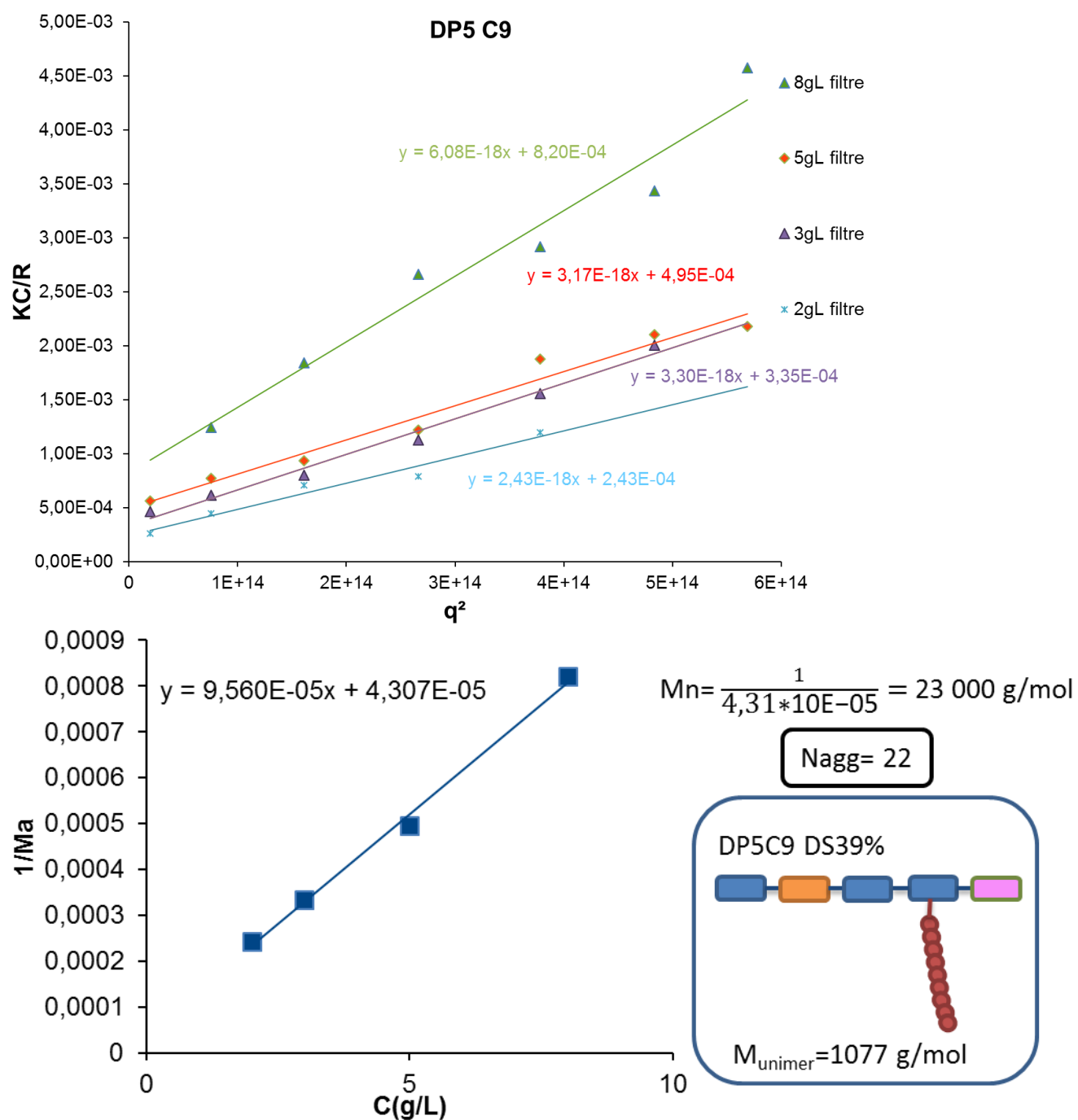
Annexe 37. Calculation of molar mass M_n and aggregation number N_{agg} of DP10 C9



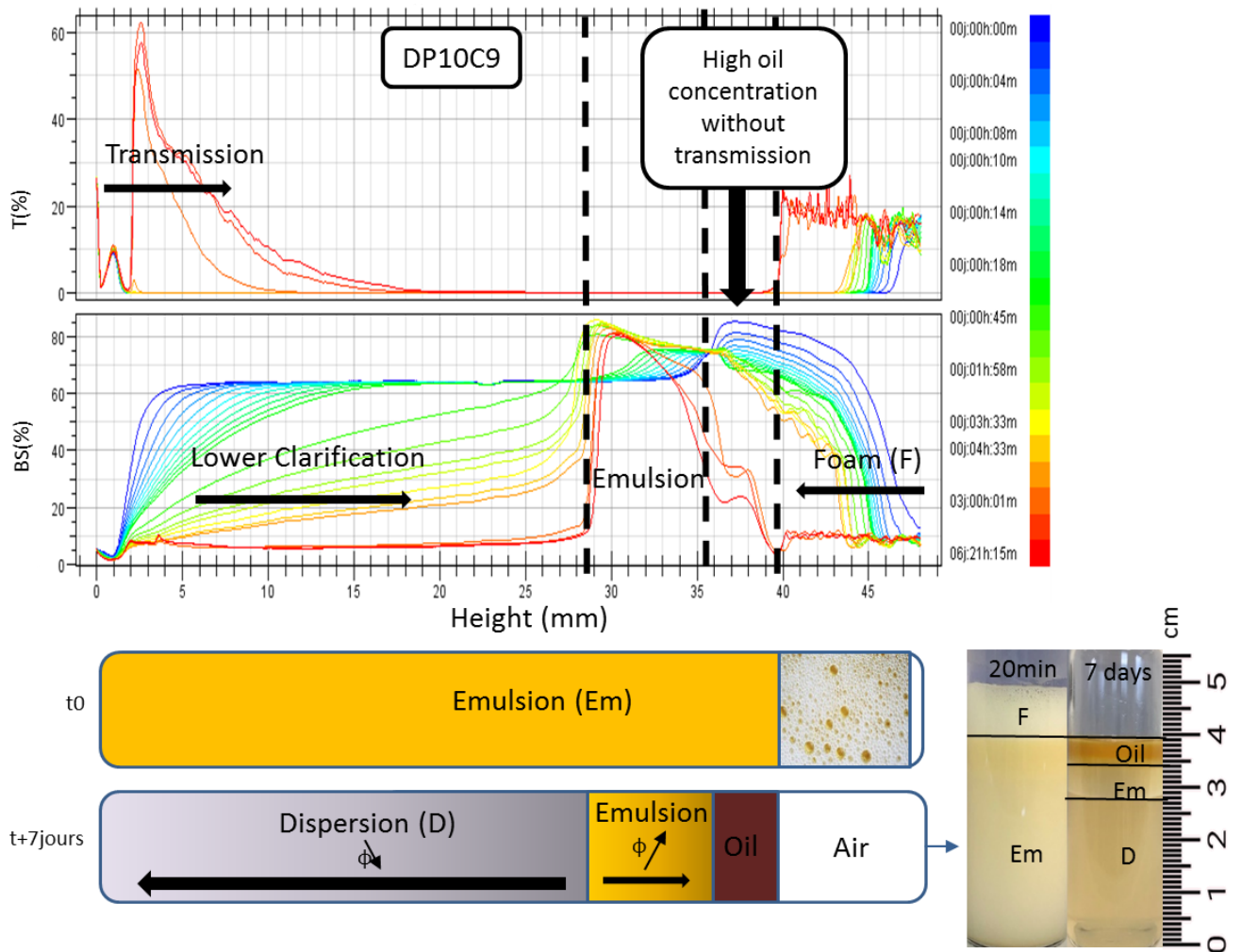
Annexe 38. Calculation of molar mass Mn and aggregation number $Nagg$ of DP5 TOFA



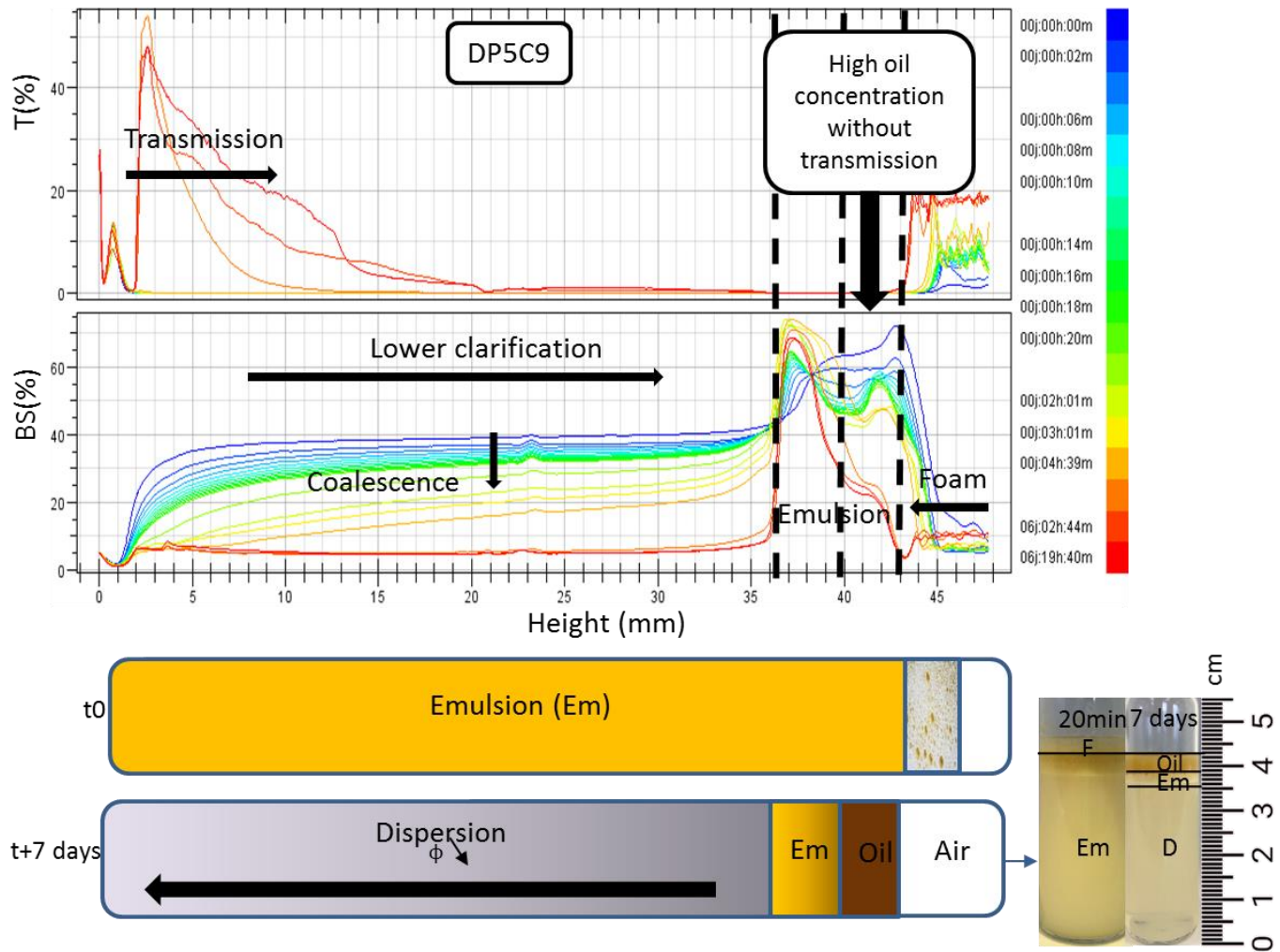
Annexe 39. Calculation of molar mass Mn and aggregation number $Nagg$ of DP5 Cardanol



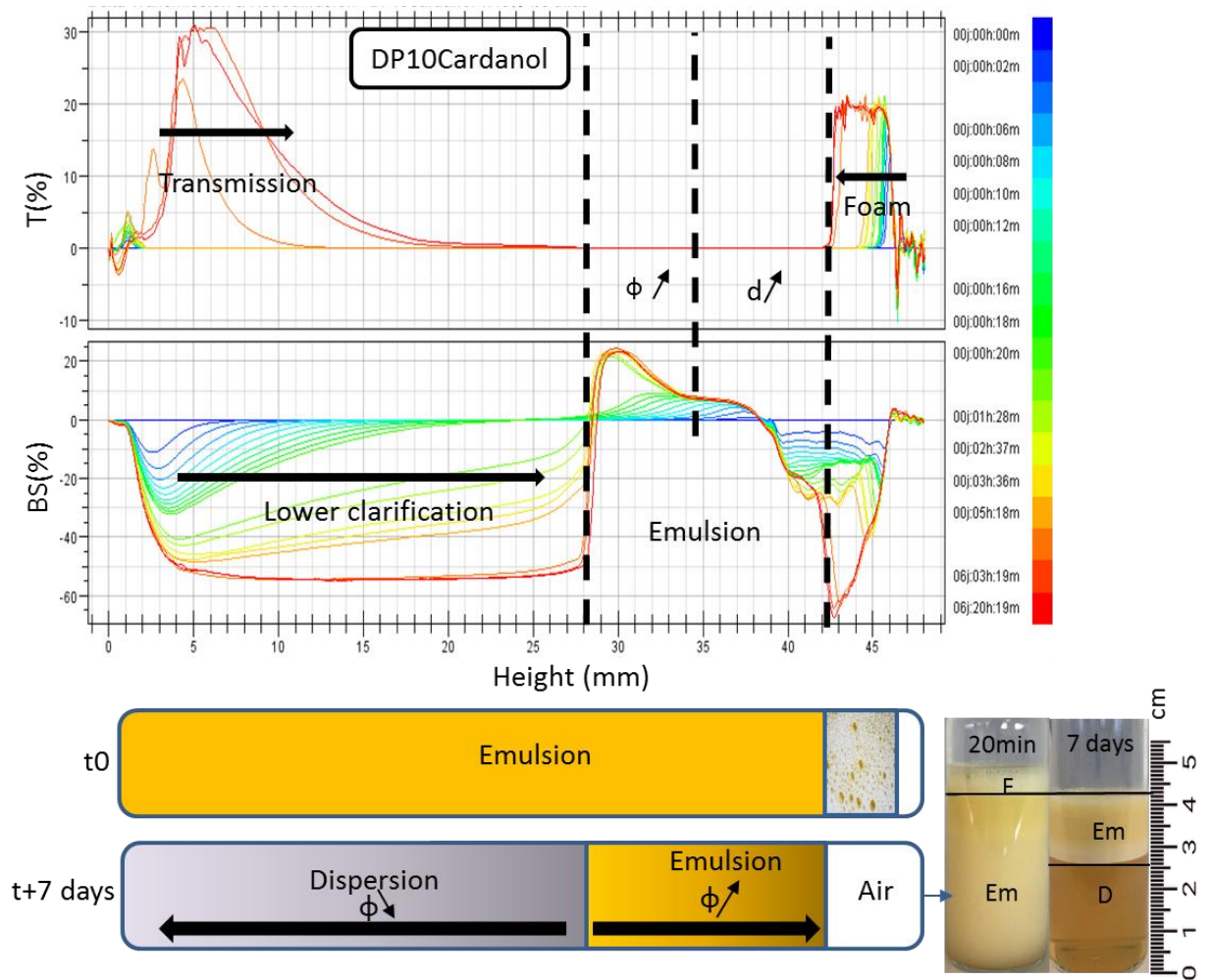
Annexe 40. Calculation of molar mass M_n and aggregation number N_{agg} of DP5 C9



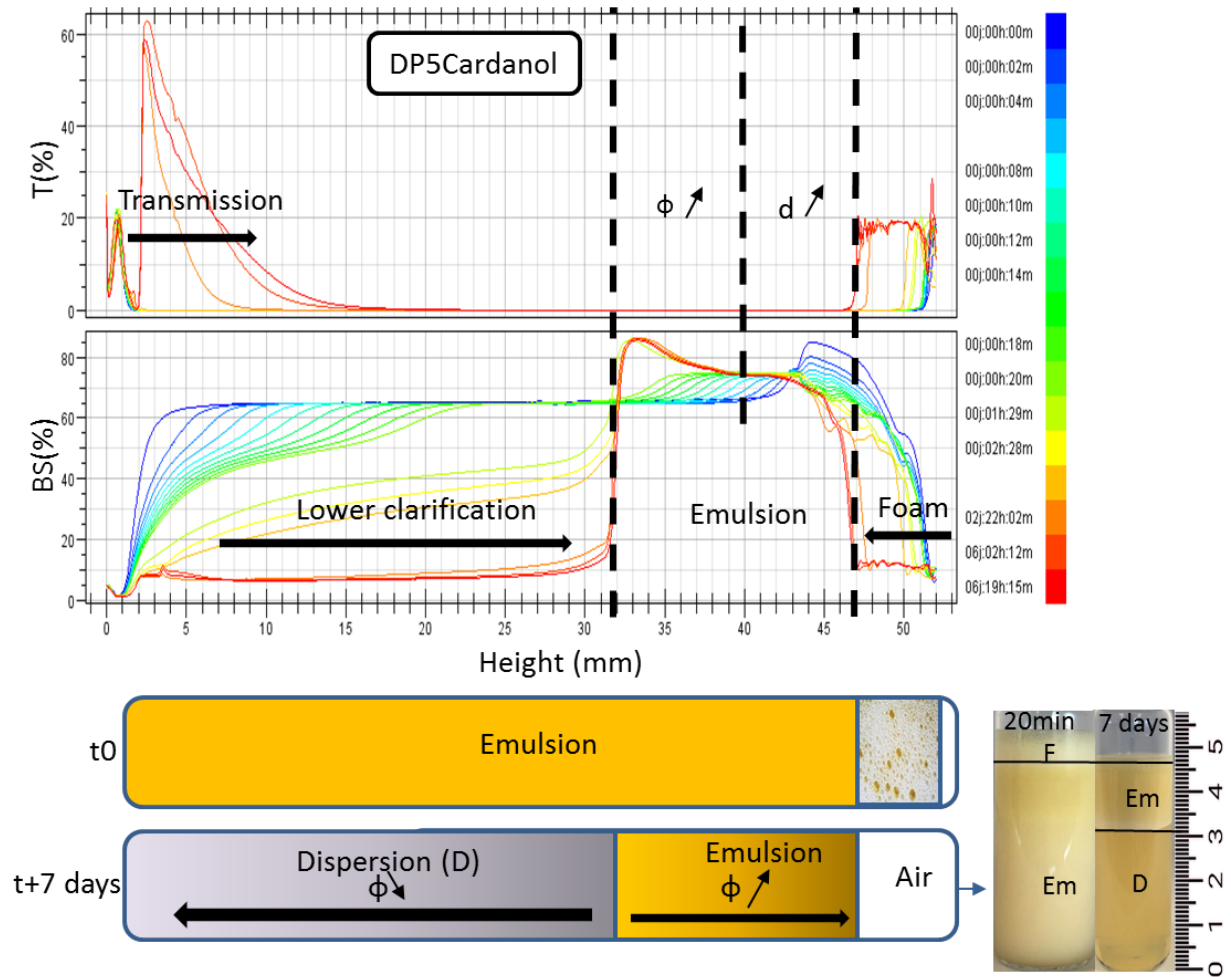
Annexe 41. Turbiscan profiles evolution as a function of times for DP10C9 during 7 days, destabilization phenomenon identification, pictures and horizontal representation of emulsion column at t_0 and after 7 days



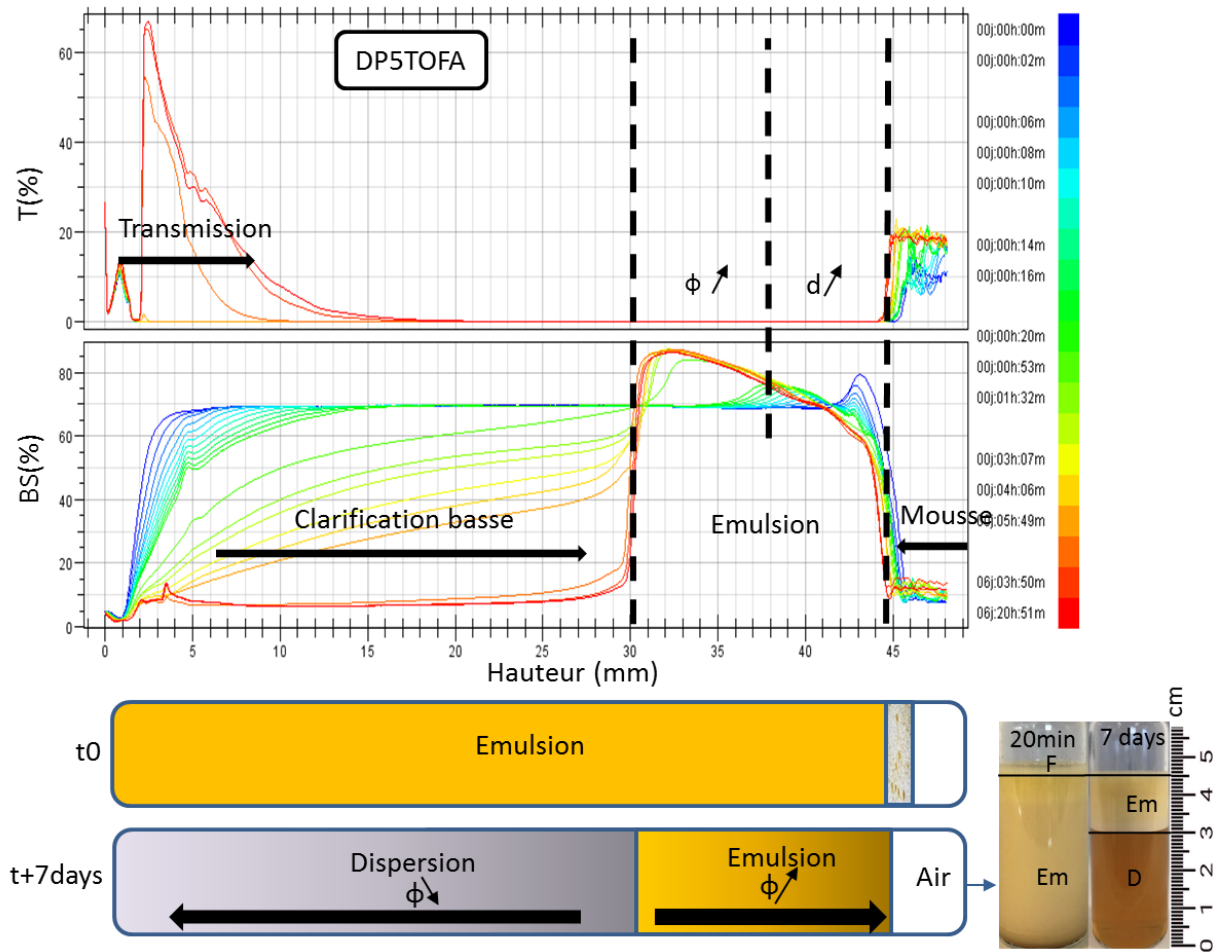
Annexe 42. Turbiscan profiles evolution as a function of times for DP5C9 during 7 days, destabilization phenomenon identification, pictures and horizontal representation of emulsion column at t_0 and after 7 days



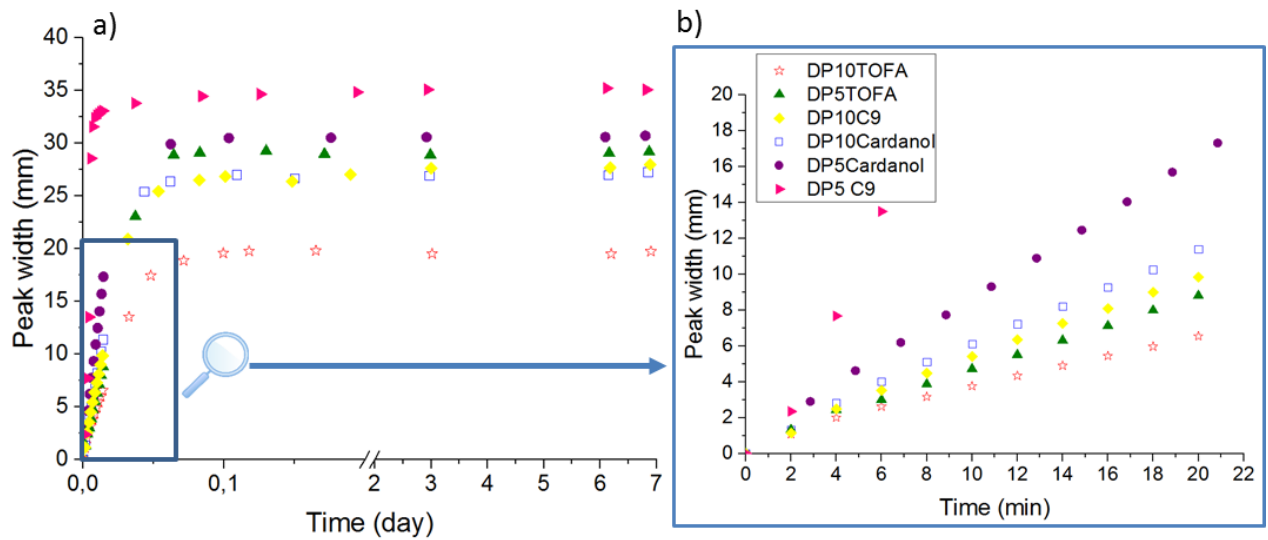
Annexe 43. Turbiscan profiles evolution as a function of times in delta mode for DP10Cardanol during 7 days, destabilization phenomenon identification, picture and horizontal representation of emulsion column at t0 and after 7 days



Annexe 44. Turbiscan profiles evolution as a function of times for DP5Cardanol during 7 days, destabilization phenomenon identification, pictures and horizontal representation of emulsion column at t0 and after 7 days



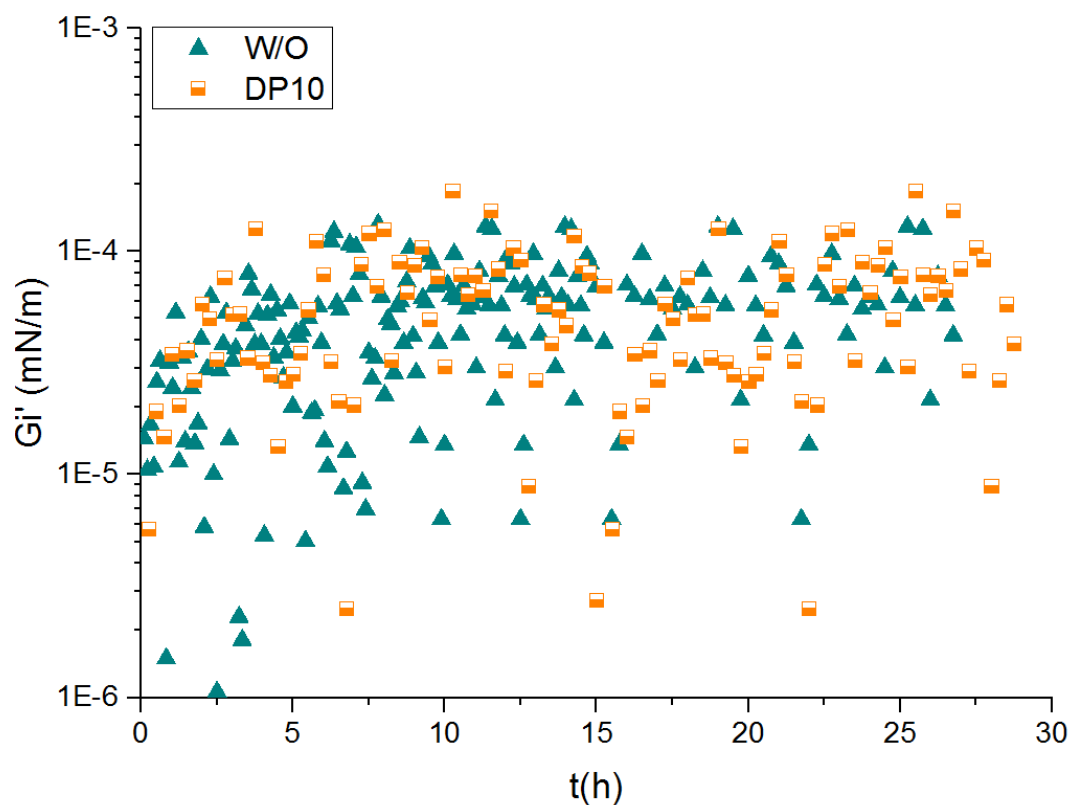
Annexe 45. Turbiscan profiles evolution as a function of times for DP5TOFA during 7 days, destabilization phenomenon identification, pictures and horizontal representation of emulsion column at t0 and after 7 days



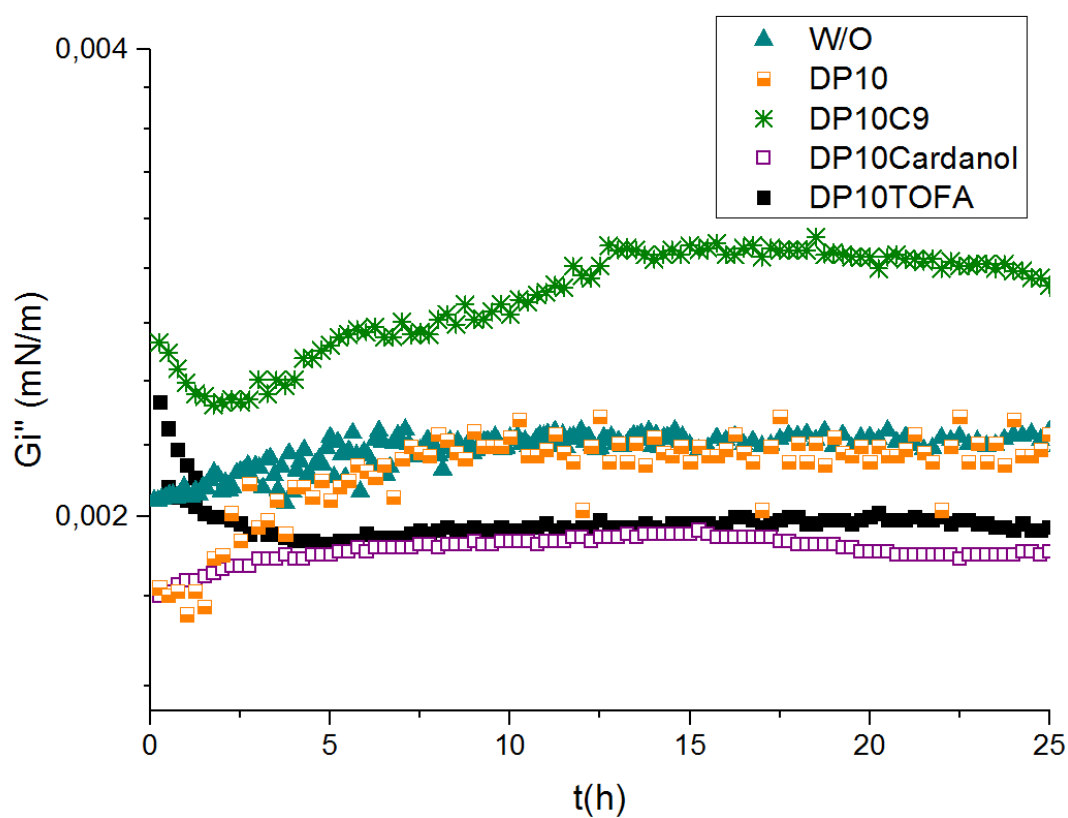
Annexe 46. Evolution of Peak width in function of time for DP10 and DP5 C9, TOFA, Cardanol determined using Turbiscan Lab a) 7 days and b) the first 20 minutes

Surfactant	Transmission (%)
DP5 C9 0,1 g.L ⁻¹	89
DP5 C9 2 g.L ⁻¹	89
DP5 Cardanol 0,1 g.L ⁻¹	90
DP5 Cardanol 2 g.L ⁻¹	89
DP5 TOFA 0,1 g.L ⁻¹	87
DP5 TOFA 2 g.L ⁻¹	89
DP10 C9 0,1 g.L ⁻¹	89
DP10 C9 2 g.L ⁻¹	89
DP10 TOFA, 0,1 g.L ⁻¹	89
DP10 TOFA 2 g.L ⁻¹	79
DP10 Cardanol 0,1 g.L ⁻¹	89
DP10 Cardanol 2 g.L ⁻¹	87

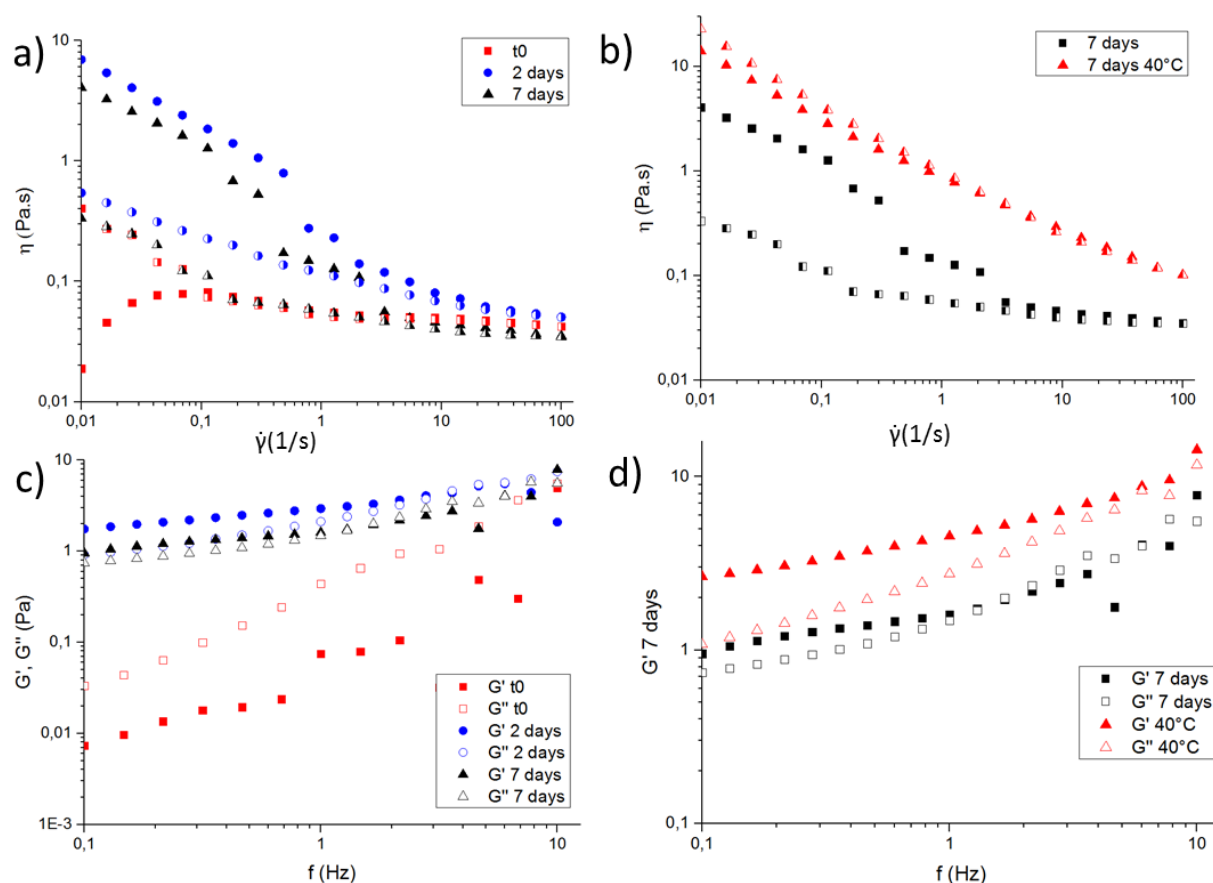
Annexe 47. Transmission of surfactant solutions at different concentrations



Annexe 48. Evolution of interfacial elastic moduli (G_i') of water and oil (w/o) and DP10 oligomer solution and motor oil according to time



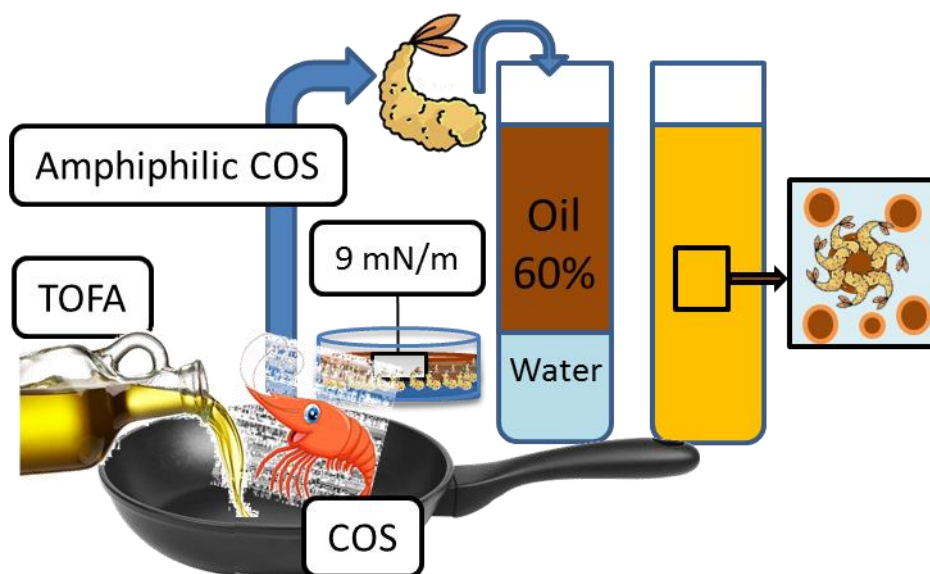
Annexe 49. Evolution of interfacial viscous moduli (G_i'') according to time



Annexe 50. a) Viscosity according to shear rate and time b) Viscosity according to shear rate and temperature c) Elastic (G') and viscous (G'') modulus according to frequency and time d) G' and G'' according to frequency and temperature of DP10TOFA (1% w/w) 60/40 w/w emulsions

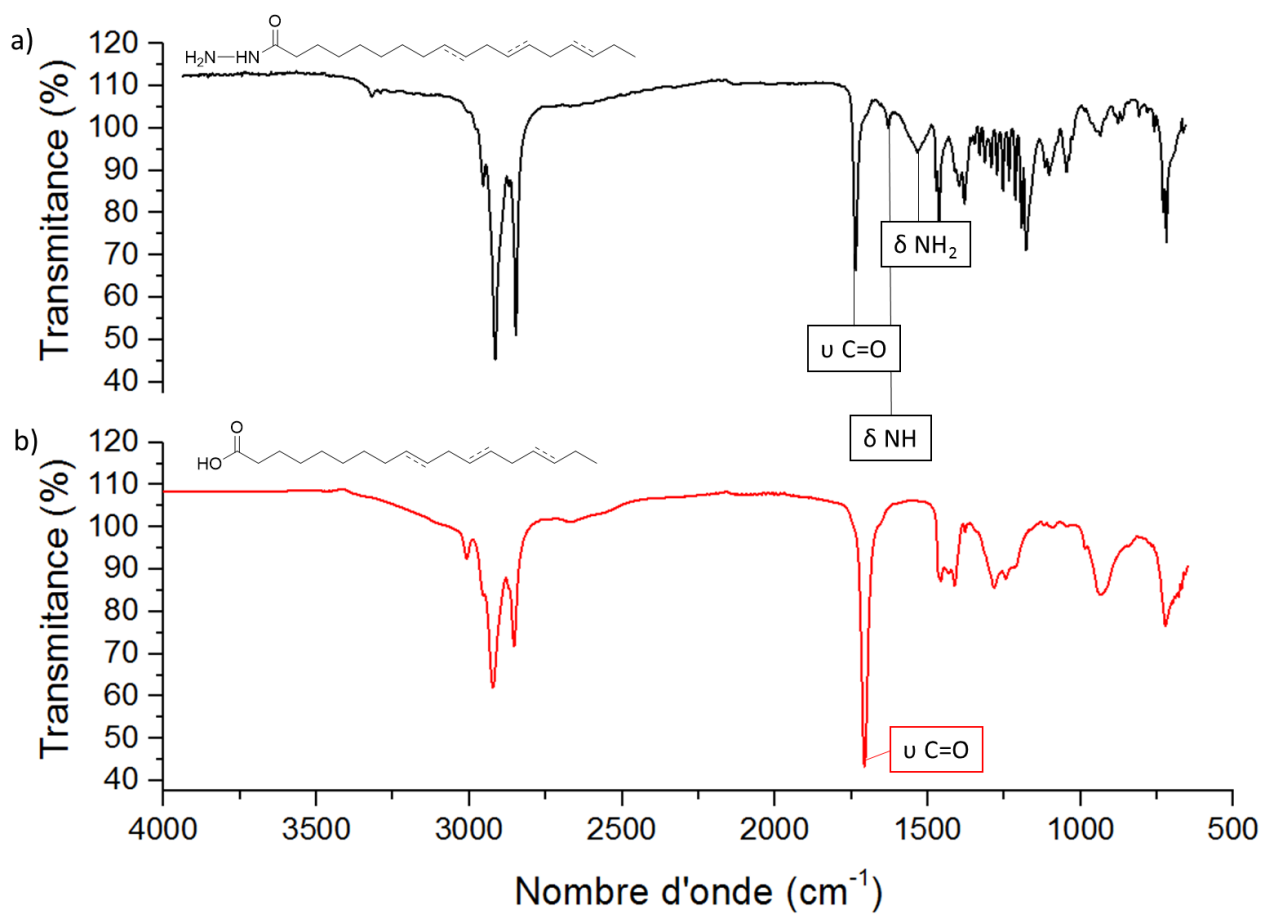
Experiment number	Number of daphnia mobiles after 48h				Inhibition (%)
	1	2	3	4	
Control	5	5	5	5	0
DP5C9 100 mg.L ⁻¹	5	5	5	5	0
DP10C9 100 mg.L ⁻¹	5	5	5	5	0
DP5 TOFA 100 mg.L ⁻¹	5	5	5	5	0
DP10TOFA 100 mg.L ⁻¹	5	5	5	5	0
DP10 Cardanol 100 mg.L ⁻¹	5	5	5	5	0

Annexe 51. Number of daphnia mobiles for DP5 and DP10 surfactant at 100 mg.L⁻¹ after 48 h and inhibition percentage against control sample



Annexe 52. Graphical abstract « Surfactant properties of chemically modified chitooligosaccharides and their potential application in bitumen emulsions » Journal of colloid and interface science.

Annexes Chapitre 5



Annexe 53. Spectre infrarouge de a) Hydrazide de TOFA et b) du TOFA

*Synthèse et caractérisation de tensioactifs à faible impact
environnemental : formulation et évaluation d'émulsions en techniques
routières*

Les émulsions de bitume sont des émulsions directes principalement composées de bitume et d'une phase aqueuse contenant un tensioactif cationique permettant de stabiliser les gouttelettes d'huile dans l'eau. Les tensioactifs utilisés actuellement sont bien souvent des composés aminés, issus de ressources fossiles, généralement toxiques et/ou écotoxiques. Ces travaux ont donc pour objectif de remplacer ces composés par une gamme de produits moins dangereux et en meilleur accord avec l'environnement.

Dans cette optique, une méthode contrôlée et reproductible de dépolymérisation du chitosane a été mise en place. Ainsi, la désamination nitreuse a été choisie dans le but d'obtenir une tête hydrophile constituée de 5 à 20 unités. Par la suite, des oligomères amphiphiles de chitosane ont été obtenues par couplage époxy-amine et amidification. Les caractéristiques physicochimiques de ces tensioactifs ont été évaluées ainsi que leur capacité à stabiliser une émulsion huile dans eau. Finalement, des tensioactifs à base de chitosane, pour certains potentiellement 100% biosourcés, non toxiques et permettant l'obtention d'émulsions directes ont bien été synthétisés pour répondre au cahier des charges imposé par cette étude.

Mots clés : tensioactifs, chitosane, oligomères, amphiphile, émulsion, bitume

*Synthesis and characterization of low environmental impact surfactant:
formulation and evaluation of emulsion in road engineering*

Bitumen emulsions are direct emulsions mainly composed of bitumen and an aqueous phase containing a cationic surfactant to stabilize oil droplets in water. Currently used surfactants are usually amino compounds, derived from fossil resources, generally toxic and/or ecotoxic. Therefore, the purpose of this work is to replace these compounds with a range of environmentally friendly products.

With this in mind, a controlled and reproducible method of depolymerization of chitosan has been developed. Thus, nitrous deamination was chosen in order to obtain a 5 to 20 units hydrophilic head. Subsequently, amphiphilic chitosan oligomers were obtained by epoxy-amine coupling and amidification. The physicochemical characteristics of these surfactants and their ability to stabilize oil-in-water emulsions were evaluated. Finally, chitosan-based surfactants, potentially 100% bio-based, non-toxic and resulting in stabilization of direct emulsions were synthesized to meet the specifications imposed in this study.

Keywords: surfactant, chitosan, oligomers, amphiphilic, emulsion, bitumen