HAL
open science

Auto-assemblage de la gomme d'acacia modifiée par voie enzymatique

Aurélie Adam

To cite this version:

Aurélie Adam. Auto-assemblage de la gomme d'acacia modifiée par voie enzymatique. Génie chimique. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0306 . tel-03708865

HAL Id: tel-03708865

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03708865

Submitted on 29 Jun 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Génie biotechnologique et alimentaire

Par

Aurélie ADAM

AUTO-ASSEMBLAGE DE LA GOMME D'ACACIA MODIFIEE PAR VOIE ENZYMATIQUE

Soutenue publiquement le 17 décembre 2021

Membres du jury

Presidente du jury :	Pr. Catherine Humeau Virot	Professeure, Université de Lorraine, Nancy
Directeurs de thèse :	Dr. Jordane Jasniewski	Maître de conférence HDR, Université de Lorraine
	Dr. Florentin Michaux	Maître de conférence, Université de Lorraine
Rapporteurs :	Dr. Niki Baccile	Chargé de recherche, CNRS, Paris
	Dr. Fabienne Gauffre	Directrice de recherche, CNRS, Rennes
Examinatrice :	Pr. Sylvie Marchesseau	Professeure, Université de Montpellier, Montpellier
Membre invité :	Dr. Lionel Muniglia	Maître de conférence, Université de Lorraine

Remerciements

Je tiens à remercier de nombreuses personnes pour m'avoir entourée tout au long de ma thèse. Tout d'abord, les membres du jury, Dr. Niki Baccile, Dr. Fabienne Gauffre, Pr. Catherine Humeau Virot et Pr. Sylvie Marchesseau que je souhaite remercier pour avoir examiné ce travail.

Je tiens aussi à adresser mes plus chaleureux remerciements à mes encadrants, Jordane, Florentin et Lionel. Merci de m'avoir accordée votre confiance pour ce travail. Je n'aurais jamais pu rêver d'un meilleur encadrement pour ces 3 années. Je ne suis pas quelqu'un de très douée pour exprimer mes sentiments, alors soyez indulgents. Vous êtes pour moi ce qui se rapproche le plus d'un modèle. Merci aussi pour votre bonne humeur, vos blagues en réunion, pour votre patience malgré les fautes d'orthographe et les tournures de phrases bizarres. Mais surtout, merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée. Vous m'avez toujours encouragée. Je ne sais pas comment exprimer à quel point je vous suis reconnaissante. Merci de m'avoir appris autant. Je ne l'oublierai jamais.

Merci à Anne-Marie Revol et Claire Gaiani pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire. Je remercie chaque personne du laboratoire pour leur bienveillance : Alexis, Amine, Arnaud, Aurélie C., Cécile, Corentin, Cyril, Daria, Elmira, Elodie, Elvis, Ezéchiel, Jenifer, Leïla, Loïc, Louise, Mahmoud, Marie, Michel, Nancy, Preethi, Raphael, Régis, Shirin, Stéphane, Urielle.

Merci à PH pour ta réactivité et pour ta gentillesse et toutes ces explications sur les plans d'expériences.

Merci aussi à mes collègues représentants des doctorants à l'école doctorale, Marie, Erwin, Victor, Maxime, Zimming et Jeanne d'avoir partagé tous ces moments avec moi.

Merci à tous les collègues avec qui j'ai pu encadrer les travaux pratiques de biochimie Jordane, Lionel, Catherine et Christelle.

Merci à toutes les techniciennes. Aurélie et Blandine, votre aide m'a été si précieuse. Cette salle de Bioch a été si agréable durant tout ce temps grâce à vous. Merci aussi pour tous ces essais d'ITC et de SEC MALS. Carole P., merci pour ton aide quand j'en avais besoin et merci pour tous ces moments de fou rire au bureau qui m'ont aidée à tenir. Merci aussi à Sylvie et Myriam pour toutes ses longues discussions dans votre bureau et pour votre gentillesse. Merci aussi à Carole J. pour sa gentillesse et son aide.

Je souhaite aussi m'adresser à toutes les personnes avec qui j'ai pu partager mon bureau. Kamil, je n'oublierai jamais nos soirées batchata et nos longues discussions. Jiaqi, merci d'avoir été à mes côtés à Palma. Grâce à toi j'ai passé un très bon moment et j'ai apprécié d'apprendre à te connaitre un peu plus. Faustine, Je tiens à te remercie pour toute l'aide que tu as pu me fournir mais aussi pour ton soutien. Merci Sarah pour cette année que nous avons partagée.

Merci à Marie pour ton appui et ta bonne humeur. Nous avons passé de bon moment à parler de gomme fonc. Merci Loubiana pour toutes nos discussions au labo. Tu as toujours su me remonter le moral quand il fallait. Merci pour la grande empathie dont tu as fait preuve et merci aussi pour ta bonne humeur. Ce fut un plaisir de rire avec toi, tu es toujours un vrai rayon de soleil.

Merci aussi à tous les stagiaires que j'ai pu suivre. J'ai pu apprendre à encadrer grâce à vous. J'ai notamment une pensée particulière pour Lila, pour ces deux fantastiques stages et pour ta joie de vivre.

J'ai une pensée toute particulière pour Aldjia. Je crois bien que je n'y serais pas arrivée sans toi. Tu as toujours été là pour me soutenir, m'écouter et me comprendre, qu'il s'agisse de la thèse ou de ma vie privée. Tu m'épaules depuis le tout début dans les bons moments comme

dans les baisses de moral. Tes conseils de maman m'ont été si précieux. Merci aussi pour tous ces fous rires et ses danses dans la voiture en revenant de Dijon. Merci pour toutes ces folies, pour toutes les soirées passées ensembles, pour tous les gâteaux faits et partagés ensemble. J'ai aussi été si heureuse de partager la responsabilité de représentante avec toi. Même si ce n'était pas facile tous les jours de voir autant de béchers trainer sur les paillasses, ce fut un réel plaisir de râler avec toi. Nous avons traversé tout cela en même temps et je crois que ça nous a rendu plus fortes.

Thibault, d'aussi loin que je me souvienne, tu as toujours été là pour moi. Merci pour toutes ces très longues années et ces discussions remplies de fous rires et de bonheur. Tu es quelqu'un de fondamentalement gentil, tu me redonnes foi en l'humanité. Emeline, tu es mon amie depuis si longtemps et tu es toujours de bon conseil. Je ne sais pas si un cerveau peut bouillir mais en tout cas l'aluminium oui. Je sais que je peux compter sur vous deux. Merci.

J'aimerais aussi remercier Bastien. Mon amour. Tu es avec moi depuis le début de cette thèse et tu es resté à Nancy tout ce temps pour moi. Je sais que mes sautes d'humeur t'en ont fait voir de toutes les couleurs mais tu as toujours su me redonner le sourire quand j'en avais le plus besoin. Même quand je pleurais toutes les larmes de mon corps, tu as su me faire rire. Merci pour ton soutien et pour toutes les fois où je te demandais ton avis et où tu as dû relire mes articles et ma thèse. Merci d'avoir partagé toutes ces années avec moi. J'espère que celles à venir seront moins stressantes et plus reposantes pour toi mais tant que nous sommes ensemble, une chose est sûre, elles seront belles.

Je voudrais aussi remercier ma famille que j'aime plus que tout. Maman, Papa, Nico, merci d'avoir été là pour moi tout au long de ma vie et de m'avoir soutenue. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Merci aussi à Mamie Arlette, Papy Louis, Mamie Marcelle et Papy Paul. J'espère que vous êtes tous fières de moi. Je vous aime fort.

Any fool can know; the point is to understand.

A. Einstein

A toutes les personnes que j'aime

Table des matières :

Introduction générale _____ *2*
Synthèse bibliographique _____ *7*

1 Séparation de phase associative _____ **10**

2 Aspect thermodynamique _____ **12**

3 Quelles interactions en jeux ? _____ **13**

3.1 Liaisons hydrogène _____ 13

3.2 Interactions hydrophobes _____ 13

3.3 Interactions π _____ 14

3.4 Interactions électrostatiques _____ 15

3.5 Interactions de Van der Waals _____ 16

4 Effet ouzo (déplacement de solvant) _____ **17**

4.1 Principe _____ 17

4.2 Exemples de formation de particules par effet ouzo _____ 20

5 Polymerization-induced self-assembly (PISA) _____ **29**

5.1 Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT) _____ 30

5.1.1 Principe _____ 30

5.1.2 Exemples d'auto-assemblages induits par RAFT PISA _____ 31

5.2 Autres méthodes PISA _____ 36

5.2.1 Atom transfer radical polymerization (ATRP) _____ 36

5.2.2 Addition-fragmentation chain transfer (AFCT) _____ 37

5.2.3 Ring opening polymerization (ROP) _____ 38

5.2.4 Ring opening metathesis polymerization (ROMP) _____ 39

6 Fonctionnalisation chimique _____ **41**

6.1 Modification d'un polymère synthétique _____ 41

6.2 Modification d'un polymère induisant un auto-assemblage _____ 46

6.2.1 Protéines _____ 46

6.2.2 Polysaccharides _____ 50

7 Modifications enzymatiques de polysaccharides 59

8 Système étudié 63

8.1 Gomme d'Acacia 69

8.1.1 Usages 69

8.1.2 Structure 70

8.1.3 Propriétés physicochimiques 74

8.2 Curcumine 75

8.3 La laccase 76

Matériels & Méthodes 79

1 Matériels 82

1.1 Polysaccharide utilisé : la gomme d'Acacia 83

1.2 Composé phénolique utilisé : la curcumine 83

1.3 Enzyme utilisée : une laccase 84

2 Méthodes 84

2.1 Caractérisation de l'enzyme 84

2.1.1 Dosage de la quantité de protéines 84

2.1.2 Dosage de l'activité enzymatique de la laccase 85

2.2 Modification de la gomme d'Acacia 87

2.3 Caractérisation des modifications structurales de la gomme d'acacia 89

2.4 Détermination du poids moléculaire 90

2.5 Etude de la modification du comportement thermique de la gomme d'Acacia 91

2.6 Mesure de l'hydrophilie et de l'hygroscopie 92

2.7 Préparation des suspensions de GAC et GACD 94

2.8 Détermination de la tension superficielle 94

2.9 Mesure du pouvoir antioxydant 95

2.10 Caractérisation des particules formées par auto-assemblage 96

2.10.1 Détermination de la distribution de taille des particules et de la polydispersité 96

2.10.2 Mesure de mobilité électrophorétique 98

2.10.3 Observations Microscopiques 99

2.10.4 Impact de la concentration en particules sur la turbidité 101

2.10.5 Mesure des paramètres thermodynamiques par titration calorimétrique isotherme 102

2.10.6 Mesure de l'EC50 de la GAC par thermophorèse à micro-échelle 104

2.11 Etude de l'influence des conditions de formation des particules par plan d'expériences 106

Résultats & Discussion 111

1 Article n°1 114

1.1 Introduction 114

1.1 Article 1 : Enzymatic modification of gum Arabic by curcumin oxidation products: physicochemical and self-assembly study 116

1.2 Contribution de l'article 159

2. Article n°2 162

1.3 Introduction 162

1.4 Article n°2 : Self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products in water: critical aggregation concentration and thermodynamic parameters study 164

1.5 Contribution de l'article 192

3 Article n°3 195

1.6 Introduction 195

1.7 Article n°3 : Experimental design to quantify the effects of physico-chemical factors on self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products 197

1.8 Contribution de l'article 221

Conclusion générale 223

Références bibliographiques 239

Annexes 273

Liste des figures hors publication

Figure 1 : représentation schématique des différents comportements de (A) un polymère dans un solvant et (B) deux polymères en présence _____ 11

Figure 2 : Trois différents types d'interactions π-π_____ 15

Figure 3 : Trouble apparaissant dans l'ouzo lors de l'ajout d'eau (Lohse & Zhang, 2015) __ 18

Figure 4 : Schématisation du diagramme ternaire éthanol/anéthol/eau (Trevisan et al., 2021)19

Figure 5 : Description schématique de (a) la nucléation par ajout de molécules environnantes et (b) l'agrégation par collision de nuclei (Lepeltier et al., 2014)_____ 19

Figure 6 : Diagramme de LaMer_____ 19

Figure 7 : A droite : diagramme ternaire de l'effet ouzo correspondant à la formation de particules d'AltC18 et AltC12 ; à gauche : diagramme de phase bidimensionnel de ces mêmes polymères (Trevisan et al., 2021) _____ 21

Figure 8 : Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules AltC12 et AltC18 préparées dans le THF, le dioxane et l'acétone. Les barres correspondent aux suspensions fraîchement préparées et les symboles (-●-) indiquent le rayon hydrodynamique des suspensions après 6 mois stockées à température ambiante. _____ 23

Figure 9 : (A)schématisation de la structure des particules formées par AltC12 et AltC18 via l'effet ouzo (B) micrographies par Cryo-TEM et TEM pour deux régions représentées ; pour AltC12 (a) et (b) – grossissement x 40k et (c) et (d) –grossissement x 20k ; pour AltC18 (e) et (f) – grossissement x 10k et (g) et (h) – grossissement x 20k. barres d'échelles : 200 nm (Trevisan et al., 2021) _____ 24

Figure 10 : Micrographie par cryo-TEM de nanoparticules de gomme de guar fonctionnalisée (Kundu et al., 2016)_____ 25

Figure 11 : (A) Thermogrammes TGA et DTA obtenus sur GG (Bleu), GGP (vert) et GGPnp (rouge) (Kundu et al., 2016) 27

Figure 12 : Micrographies SEM de (A) dextrane modifié préparé dans eau/THF et (B) dextrane modifié préparé dans eau/acétone. Barres d'échelle : 200 nm (adaptées de Aschenbrenner et al. 2013) 28

Figure 13 : Représentation du module élastique mesuré par AFM en fonction de la HLB des polymères. (HLB : Hydrophilic Lipophilic Balance, plus elle est élevée plus l'hydrophilie est importante) 28

Figure 14 : Auto-assemblage induit par la méthode RAFT et impact du « packing parameter » p (par analogie avec les tensioactifs). a est la surface du segment lyophile et v et l sont respectivement le volume et la longueur du segment lyophobe. (D'Agosto et al., 2020) 30

Figure 15 : Mécanisme de la polymérisation RAFT (Belkhir, 2019) 31

Figure 16 : Synthèse de P(GMA-stat-(MAm-GFF)) macro-CTA et de P(GMA-stat-(MAm-GFF))-b-PHPMA par RAFT. PHPMA : poly(méthacrylate de 2-hydroxypropyle) ; SPPS : solid phase peptide synthesis ; GMA : glycerol monomethacrylate ; HPMA : poly(2-hydroxypropyl methacrylate) ; PGMA : poly(monométhacrylate de glycérol) (PGMA mCTA) ; ACVA : 4,4′-azobis(4-cyanopentanoic acid) ; DMF : dimethylformamide. 32

Figure 17 : Micrographies TEM $PGMA_{40}$-b-P(MAm-GFF) dans un mélange eau/acétonitrile 1 : 1 et 1 : 2 (Dao, Vezenkov, Subra, Ladmiral, et al., 2020) 33

Figure 18 : Micrographies TEM de PGMA83-b-P(MAm-FGD)20 obtenus dans l'eau à 70 °C (Dao, Vezenkov, Subra, Ladmiral, et al., 2020) 34

Figure 19 : (A) Distribution DLS, Dh : diamètre hydrodynamique et PDI : indice de polydispersité (B) micrographie TEM et (C) transmittance électronique au niveau de la ligne horizontale rouge dans (B) de $PHPPA_{71}$ préparée dans THF/eau (1/2, v/v) et pH 7. (D)

Schématisation des chaînes du polymère avec une hydrophobie (a) faible, (b) moyenne, et (c) élevée dans des zones différentes de la membrane de la vésicule et de la liaison hydrogène inter/intra-polymère formée entre les polymères. (Zhu et al., 2013) 35

Figure 20 : (A) Micrographie TEM et (B) schéma des particules de $PHPPA_{71}$ (DMF/eau à pH 11,0). Les sphères jaunes représentent les groupement hydrophobes formant de noyaux. (Zhu et al., 2013) 35

Figure 21 : étape d'initiation des méthodes ATRP (Pearson et al., 2017) 36

Figure 22 : (a-e) Mécanisme de la formation des chaines de PA par interaction π-π des noyaux et (f) micrographie d'une chaine obtenue (Yoon et al., 2012) 40

Figure 23 : Dilution aqueuse en ITC d'une solution de PDMAc11-U2 à 25 °C : (A) chaleur produite par l'injection dans l'eau ; (B) variation d'enthalpie correspondant pour la détermination de la CAC (Mellot et al., 2018). 43

Figure 24 : Vésicules de Dex-g12-PHPMAX via le transfert de chaîne par fragmentation d'addition réversible photomédiée (Photo-RAFT) de HPMA (Irradiation à 405 Nm en présence de TPO-L comme photoinitiateur) à partir d'un agent de transfert de chaîne à base de dextrane (DexCTA12) (Ikkene et al., 2021) 44

Figure 25 : Micrographies de Dex-g12-PHPMA100 – 200 – 300 par TEM, Cryo-TEM et AFM (Ikkene et al., 2021) 45

Figure 26 : Cage protéine-ADN. (A) Modification de la protéine aldolase avec des simples brins d'ADNs. (B) Auto-assemblage de quatre brins d'ADN de manière à former une base triangulaire avec trois simples brins complémentaires à ceux sur la protéine. (C) Le conjugué protéine-ADN et la base triangulaire forment une cage. (Y. Xu et al., 2019) 46

Figure 27 : (a) Schéma de deux protéines adhésives. (b) Conception de la fusion des gènes codant pour les deux protéines indiquées en a. Deux constructions génétiques ont été créées (c)

Schéma des structures prédites pour CsgA-Mfp3 et Mfp5-CsgA. (d) En raison des domaines amyloïdes de Mfps, les monomères s'auto-assemblent en fibrilles. (Zhong et al., 2014)____ 47

Figure 28 : Synthèse des copolymères de polysaccharide-b-ELP. AcOH : acide acétique ; EtOH : éthanol ; NHS : N-hydroxysuccinimide ; DCM : dichloro-methane ; DIPEA : N,N-Diisopropylethyl-amine ; TBTA : Tris-(benzyltriazolylmethyl)ami (adapté de Xiao et al. 2020) _____ 48

Figure 29 : Micrographies AFM de Dex-b-ELP à (A) 35 °C et (B) 65 °C. Lam-b-ELP à (C) 30 °C et (D) 55 °C. HA-b-ELP à (E) 25 °C et (F) 52 °C. La barre d'échelle indique 1µm. (Xiao et al., 2020) _____ 49

Figure 30 : Micrographies (A) de l'amidon non modifié et (B) d'amidon fonctionnalisé dans l'eau (L. Chen et al., 2020) _____ 51

Figure 31 : Schéma de (A) la formation des vésicule à une vitesse de chauffage de 5 $K.min^{-1}$ par la fusion de disques et (B) la réversibilité de la formation – dissolution des vésicules en fonction de la température (adapté de Nishimura et al., 2020) _____ 52

Figure 32 : Schéma de modification du dextrane par (A) acide stéarique et (B) cholestérol. DIC : Cholesteryl chloroformate N,N′-Diisopropylcarbodiimide ; DMAP : 4-dimethylaminopyridine ; TEA : Triethylamine ; DMSO : Dimethyl sulfoxide ; DMF : Dimethylformamide ; RT : room temperature. (adapté de Shaki et al. 2018)_____ 55

Figure 33 : Micrographies TEM de (A) CA-g-Cs et de (B) FA-g-CS (Hu et al., 2016)_____ 58

Figure 34 : (A) réaction de trans estérification du dextrane ; (B) Micrographie TEM et (C) SEM des assemblages obtenus après déplacement du solvant vers l'eau. (adapté de Kraisomdet et al., 2020) _____ 60

Figure 35 : (A) fonctionnalisation du dextrane (DEX) par la curcumine (CUR) par l'intermédiaire d'une laccase immobilisée (HLS) pour former de structures auto-assemblées

(DC), HLS : immobilized laccase. (B) Micrographies confocale des cellules MCF-7 du cancer du sein exposé à de la curcumine (CUR) et des particules de dextrane modifié (DC). Le contrôle (CTRL) correspond aux cellules seules. Les barres d'échelle sont de 20 µm. (C) Micrographie TEM des particules de DC. La barre d'échelle est de 200nm (adapté de Curcio et al., 2019). 62

Figure 36 : Micrographies (A) SEM et (B) TEM de GA-Cur (Sarika et al., 2015) _____ 65

Figure 37 : Photographie de gomme d'acacia (inavea pure acacia, Nexira France.) _____ 69

Figure 38 : (a) Micrographie TEM de la fraction AG de la gomme d'acacia ; (Insert) agrandissement d'une partie de la micrographie a ; (a1, a2) AG isolés de la micrographie TEM (cercles 1 et 2) mais colorés via le logiciel ImageJ ; (b) micrographie Cryo-TEM d'AG (b1) micrographie identique à b après application de la variation de contraste puis (b2) filtrage FFT et (b3) traitement à l'aide du logiciel ImageJ ; (c) micrographie AFM d'AG ; (Insert) Dimensions des deux macromolécules barrées. (Sanchez et al., 2008) _____ 71

Figure 39 : Schématisation de la structure d'un AG de gomme d'acacia (Sanchez et al., 2008) _____ 72

Figure 40 : Fraction AGP de la gomme d'acacia (A) Modèle Wattle Blossom (adapté de Fincher, Stone and Clarke, 1983) et (B) modèle de Renard (Renard et al., 2005) _____ 73

Figure 41 : Micrographies TEM d'AGP avec contraste d'image modifié filtrées à l'aide d'un filtre FFT puis d'ImageJ et Surface Plot. Toutes les barres d'échelle indiquent 20 nm.(Renard et al., 2012) _____ 73

Figure 42 : Oxydation de ortho - et para - diphénols et de monophénol par la laccase en quinones correspondantes (Aljawish et al., 2015) _____ 76

Figure 43 : Droite étalon du dosage de Bradford obtenue sur de la SAB à 595 nm _____ 85

Figure 44 : Réaction d'oxydation de la syringaldazine par la laccase _____ 85

Figure 45 : Protocole de modification de la gomme d'Acacia par voie enzymatique _____ 88

Figure 46 : Exemple de la décroissance de la tension superficielle d'une suspension de GAC à 0.05% (en poids) et du modèle calculé en fonction du temps _____ 95

Figure 47 : Schématisation d'une courbe d'approche et de retrait de la pointe d'AFM avec : (A) approche de la pointe ; (B) contact avec l'échantillon ; (C) pression de la pointe sur l'échantillon ; (D) début du retrait de la pointe ; (E) détachement de la pointe et (F) éloignement de la pointe. _____ 100

Figure 48 : Principe de la titration calorimétrique isotherme et exemples de résultats types obtenus _____ 103

Figure 49 : principe de la thermophorèse (Jerabek-Willemsen et al., 2014) (A) Appareil réalisant l'analyse ; (B) impact du laser sur les capillaires contenant les échantillons ; (C) trace obtenue lors de l'échauffement par le laser (diminution de la fluorescence dû à l'échauffement); (D) obtention d'une courbe dose/réponse _____ 105

Figure 50 : Géométrie des plans d'expériences type (A) Box Behnken, (B) centré composite et (C) Box Behnken « optimisé » _____ 108

Figure 51 : Résultats obtenus par (A) MST, (B) ITC, (C) DLS et (D) spectrométrie dans le but de déterminer la CAC de la GAC (zone bleue) _____ 194

Figure 52 : Grandes questions directrices du travail de thèse _____ 230

Figure 53 : Chromatogrammes HPLC obtenus à différents temps lors de la fonctionnalisation de la gomme d'Acacia _____ 232

Figure 54: Micrographies TEM de particules de GAC. (A) fixée à l'osmium, intégrée dans une gélose et déshydratée à l'acétone ; (B) fixée au glutaraldéhyde, sans gélose et déshydratée à l'éthanol ; (C) fixé au glutaraldéhyde et à l'osmium, sans gélose et déshydratée à l'éthanol 234

Figure 55 : Perspectives de ce travail de thèse _____ 238

Liste des équations hors publication

Équation 1 : Calcul de la différence d'énergie libre de Gibbs _____ 12

Équation 2 : Calcul de l'activité enzymatique spécifique _____ 86

Équation 3 : Calcul de la tension de surface un temps à l'infini _____ 94

Équation 4 : Calcul du pourcentage d'inhibition du radical ABTS _____ 96

Équation 5 : Equation de Stokes Einstein _____ 97

Équation 6 : Equation de Smocluchowski _____ 98

Équation 7 : Calcul de la turbidité _____ 101

Equation 8 : Calcul de la différence d'énergie libre de Gibbs à partir de la CAC' _____ 103

Equation 9 : Calcul de l'entropie _____ 103

Équation 10 : Calcul de l'EC50 _____ 106

Équation 11 : Equation du modèle _____ 110

Liste des tableaux

Liste des tableaux hors publication

Tableau 1 : Récapitulatif des points positifs et négatifs des différentes techniques abordées dans le chapitre Bibliographie _____ 66

Tableau 2 : liste des produits chimiques utilisés _____ 82

Tableau 3 : Temps d'équilibrage en fonction de l'humidité relative imposé à l'échantillon _ 93

Tableau 4 : Bornes choisies pour la création du plan d'expériences_____ 108

Tableau 5 : Matrice de plan d'expériences (en orange les points au centre)_____ 109

Liste des tableaux

Liste des abréviations

A

ABTS : 2,2´-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)

ACVA : acide 4,4-azobis(4-cyanovalérique)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFCT : Addition-fragmentation chain transfer

AFM : atomic force microscopy

AG : arabinogalactane-peptides

AGP : arabinogalactane-protéines

AltC12 : Poly(4-vinylphenol-alt-dodecylmaleimide)

AltC18 : Poly(4-vinylphenol-alt-octadecylmaleimide)

ATRP : Atom transfer radical polymerization,

B

C

CA : acide caféique

CA-g-CS : Chitosane-acide caféique

CAC : concentration critique d'agrégation

cm : centimètres

CMC : concentration critique de micellisation

COT : cyclooctatétraène

CS : chitosane

CTA : chain transfer agent

Cur : curcumine

D

D : coefficient de diffusion

d : diamètre hydrodynamique

Da : dalton

DC : dextrane-curcumine

D-Chol : dextrane greffé avec du cholestérol

Dex : dextrane

Dex-g-PHPMA : dextrane-g-poly(méthacrylate de 2-hydroxypropyle)

Dex-L : dextrane-laurate de vinyle

DIC : N ,N′-diisopropylcarbodiimide

DLS : dynamic light scattering

DMAP : 4-dimethylaminopyridine, : dimethyl amino pyridine

DMAC : Diméthylacétamide

DMF : dimethylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTA : differential thermal analysis

DVS : dynamic vapor sorption

E

E : champ électrique

ELP : elastin like polypeptide

F

FA : acide férulique

FA-g-CS : chitosane-acide caféique

FGD : phénylalanine-glycine-aspartate

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

FT-IR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

G

g : grammes

g : accélération de l'apesanteur

GA : gomme arabique

GAC : gomme d'Acacia modifiée

GACD : gomme d'Acacia modifiée dialysée

GFF : glycine-phénylalanine-phénylalanine

GG : gomme de guar

GGP : propionate de gomme de guar

GGPnp : nanoparticules de propionate de gomme de guar

GP : glycoprotéine

H

h : heure

HA : acide hyaluronique

Hb : hémoglobine

HR : humidité relative

Hyp : hydroxyproline

I

ITC : isothermal titration calorimetry

J

K

k_B : constante de Boltzmann

K_D : constante de dissociation à l'équilibre

KDPG : 2-dehydro-3-deoxyphosphoglucona aldolase

kJ : Kilo joule

L

L : litres

Lam : laminarihexaose

LAMU : laccase *Myceliophthora thermophila* unit

LIBio : laboratoire d'ingénierie des biomolécules

L-Phe NCAs : N-carboxyanhydride de L-phénylalanine

M

M : molaire

mM : millimolaire

MAm : méthacrylamide

mg : milligrammes

min : minute

mL : millilitre

mol : mole

MST : thermophorèse micro-échelle

N

NCA : N-carboxyanhydrides

nm : nanomètre

NMP : polymérisation radicalaire médiée par les nitroxydes

O

P

Pa : pascal

PA : polyacétylène

PAA : poly(acide acrylique)

PAM : polyacrylamide

PDI : indice de polydispersité

PDMAc : poly (N, N-diméthylacrylamide)

PDMAEA : poly(2-(N,N-diméthylamino)éthylacrylate)

PEG : poly(ethylene glycol)

PEG-NH2 : méthoxypolyéthylène glycol amine

PGMA : poly(monométhacrylate de glycérol)

Phe : phénylalanine

PHPMA : poly(méthacrylate de 2-hydroxypropyle)

PHPPA : poly(2-hydroxy-3-phenoxypropyl acrylate)

PISA : polymérisation induisant un auto-assemblage

PNB : polynorbornène

POX : produits d'oxydation de la curcumine

PPO : pullulane-g-polypropylène oxyde

Q

R

R : constante des gaz parfaits

RAFT : Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROMP : ring opening metathesis polymerization

ROP : ring opening polymerization

S

s : seconde

SA : acide stéarique

SAB : sérum albumine bovine

SANS : small-angle neutron scattering

SAXS: small Angle X-rays Scattering

SEM : scanning electron microscopy

SLS : static light scattering

T

T : température

TEM : transmission electronic microscopy

Tg : transition vitreuse

TGA : thermogravimetric analysis

THF : tétrahydrofurane

TPO-L : phénylphosphinate d'éthyle (2, 4, 6-triméthylbenzoyl)

U

U_2 : bis-urée

UV : ultraviolet

V

W

X

Y

Z

Caractères spéciaux

α : alpha

β : bêta

γ : tension de surface

ΔG : énergie libre de Gibbs

ΔH : enthalpie

ΔS : entropie

η : viscosité

μ_E : mobilité électrophorétique

µg : micro grammes

µL : micro litres

ν : vitesse

π : pi

°C : degrés Celsius

Liste des abréviations

Liste des publications et des communications

Posters :

A. A. Adam, F. Michaux, L. Muniglia, J. Jasniewski, 2019.
Auto-assemblage de la gomme d'Acacia modifiée par voie enzymatique, Séminaire de l'école doctorale SIReNA, 7 février 2019, Nancy

A. A. Adam, F. Michaux, L. Muniglia, J. Jasniewski, 2019.
Self-assembly of Acacia gum modified by enzymatic pathway, Biomolecules Research & Development, Market and Acceptability, 24 octobre 2019, Palma de Mallorca

Publications :

Adam, Aurélie A., Jordane Jasniewski, Marie E. Vuillemin, Blandine Simard, Jennifer Burgain, Régis Badin, Lionel Muniglia, et Florentin Michaux. « Enzymatic Mediated Modification of Gum Arabic by Curcumin Oxidation Products: Physicochemical and Self-Assembly Study ». *Food Hydrocolloids* 126 (mai 2022): 107451. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107451.

Adam, A. A., Michaux, F., Dos santos Morais, R Muniglia, L., & Jasniewski, J. (s. d.). *Self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products: Influence of the physicochemical parameters*.

Adam, A. A., Michaux, F., Baudelet, P. H., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (s. d.). *Experimental design to quantify the effects of physico-chemical factors on self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products*

Liste des publications et des communications

Introduction générale

Pourquoi un auto-assemblage ?

Les incroyables ressources présentes dans la nature ont toujours été une source inépuisable d'idées pour les Hommes et notamment les scientifiques, qui depuis toujours essayent de l'imiter. L'apparition de l'ordre à partir du désordre nous a toujours fasciné, depuis la formation des bancs de poissons dans l'océan, jusqu'au cœur de nos cellules. La nature regorge de systèmes créant à première vue un certain ordre. L'un des exemples les plus connu est l'association des brins d'ADN pour former une double hélice (Watson & Crick, 1953; Whitesides & Grzybowsk, 2002). Il est aussi possible de citer la formation des membranes cellulaires ou même des bulles de savons (Mai & Eisenberg, 2012). Ces systèmes ont été appelés auto-assemblages et les Hommes s'en sont alors inspirés. En effet, ils se sont avérés de plus en plus étudiés notamment au niveau de la recherche industrielle et fondamentale. Dans différents domaines tels que la pharmaceutique ou la cosmétique, un des axes majeurs de la recherche vise à protéger des principes actifs, à contrôler leur libération et à diminuer les quantités utilisées (Peer et al., 2007). Ainsi des matrices permettant de stabiliser, de protéger et de cibler la libération de molécules actives, ont été créés. C'est là que l'approche par l'utilisation d'auto-assemblage parait intéressant puisqu'elle permet notamment la formation spontanée de particules en suspension (particules colloïdales). Certaines de ces particules sont alors capables d'encapsuler différents composés (Mura et al., 2013). Récemment, des micelles de conjugués d'acide sialique, de dextrane et d'acide octadécanoïque ont été synthétisées pour encapsuler du méthotrexate et permettre une meilleure inhibition de la réponse inflammatoire dans le traitement de l'arthrose rhumatoïde (X.-L. Xu et al., 2018).

Cette méthode de formation de particules colloïdales par auto-assemblage s'appelle la voie « bottom up ». Elle s'oppose à la voie « top down » qui consiste à réduire une structure de grande taille en objets de tailles plus petites, souvent instables, en apportant de l'énergie *via* des procédés de cisaillement tels que la sonication. L'auto-assemblage, lui en général, ne nécessite pas l'utilisation de techniques énergivores ni l'addition de stabilisant puisqu'il est totalement

spontané et thermodynamiquement stable. Il est reproductible et la formation des particules est réversible en fonction des conditions environnementales (c'est à dire capable d'encapsuler mais aussi de libérer des molécules d'intérêt) (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015; Wiradharma et al., 2009).

Ce phénomène est la résultante d'une séparation de phase associative (ou coacervation) dû à la formation de liaisons faibles permettant l'interaction entre les polymères et entre les polymères et le milieu environnant. Par exemple, si un polymère est amphiphile, ses groupements hydrophobes cherchant à fuir l'eau se regrouperont pour former des zones déshydratées. Ainsi, le polymère sera plus stable sous cette conformation que sous forme non assemblée (Trevisan et al., 2021). L'un des phénomènes les plus connu est l'effet ouzo (cf. le pastis) qui permet la formation de particules colloïdales grâce à un changement de solvant induisant une modification de l'équilibre entre les phases en présence. Cela induit l'apport de nouvelles interactions entre les phases et les polymères qui passent alors de l'état solubilisé à l'état particulaire.

Il existe de nombreux systèmes pouvant mener à la formation d'auto-assemblages. Des molécules peuvent être synthétisées dans ce but ou des polymères naturels peuvent être modifiés pour induire un auto-assemblage dans les conditions souhaitées. Différents types de polymères peuvent être modifiés dans ce but. Les protéines sont par exemple très étudiées. Cependant, elles sont immunogènes ce qui peut représenter un frein à leur utilisation. Une alternative possible pourrait être la modification des polysaccharides car ils sont faiblement immunogènes tout en étant biosourcés et bicompatibles. La plupart des études se basent pourtant sur des techniques chimiques faisant intervenir des produits potentiellement toxiques pour l'Homme ou pour l'environnement. Une des problématiques émergeantes est donc de chercher un moyen d'induire un auto-assemblage par une voie plus verte.

L'objectif de ces travaux, pour répondre à cette problématique, est de modifier un polysaccharide (la gomme d'Acacia), par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique pour induire son auto-assemblage et de déterminer quelles sont ses propriétés. La gomme d'Acacia ou gomme arabique (GA) est un polymère naturellement amphiphile déjà largement utilisé en agroalimentaire. De plus, elle possèderait déjà la capacité à s'auto-assembler à de fortes concentrations. (Sanchez et al., 2018). Sa modification a été tentée par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique indirecte. En effet, une laccase (phénol oxydase) a été choisie pour catalyser l'oxydation de la curcumine. Cette oxydation ayant pour but de former des espèces réactives pouvant se greffer sur la GA de manière non enzymatique et ainsi modifier ses propriétés physicochimiques.

Ce travail de thèse s'est alors porté sur trois axes différents résumés aux trois questions scientifiques suivantes :

- Est-il possible de modifier la GA par l'intermédiaire d'une oxydation enzymatique de la curcumine ?
- Quels sont les propriétés du nouveau polymère formé ? Est-il capable de s'auto-assembler ?
- Quelles sont les propriétés de cet assemblage ? Quels paramètres physicochimiques influent sur la formation des particules ?

Pour répondre à ces questions, la structure de la gomme d'Acacia modifiée par la curcumine (GAC) a d'abord été étudiée de manière à valider la possibilité d'un greffage par la voie choisie. Les propriétés du polymère ont ensuite été déterminées en comparaison avec le polymère natif et notamment son affinité avec l'eau. Par la suite, c'est le polymère en suspension dans l'eau sous forme de particules auto-assemblées qui a été caractérisé. Une nouvelle méthode pour déterminer la concentration critique d'agrégation (CAC) a notamment été décrite. De plus, comme il a été expliqué précédemment, les auto-assemblages sont formés par des interactions

de faible énergie. Ces interactions sont largement influencées par le milieu extérieur. Les conditions environnementales ont donc un grand impact sur la formation des assemblages et il paraît alors intéressant de tenter de décrire leurs influences sur les propriétés des objets formés.

Synthèse bibliographique

Comment induire un auto-assemblage ?

Synthèse bibliographique

1 Séparation de phase associative Erreur ! Signet non défini.

2 Aspect thermodynamique Erreur ! Signet non défini.

3 Quelles interactions en jeux ? Erreur ! Signet non défini.

3.1 Liaisons hydrogène **Erreur ! Signet non défini.**

3.2 Interactions hydrophobes **Erreur ! Signet non défini.**

3.3 Interactions π **Erreur ! Signet non défini.**

3.4 Interactions électrostatiques **Erreur ! Signet non défini.**

3.5 Interactions de Van der Waals **Erreur ! Signet non défini.**

4 Effet ouzo (déplacement de solvant) Erreur ! Signet non défini.

4.1 Principe **Erreur ! Signet non défini.**

4.2 Exemples de formation de particules par effet ouzo **Erreur ! Signet non défini.**

5 Polymerization-induced self-assembly (PISA) Erreur ! Signet non défini.

5.1 Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT) **Erreur ! Signet non défini.**

5.2 Autres méthodes PISA **Erreur ! Signet non défini.**

6 Fonctionnalisation chimique Erreur ! Signet non défini.

6.1 Modification d'un polymère synthétique **Erreur ! Signet non défini.**

6.2 Modification d'un polymère induisant un auto-assemblage **Erreur ! Signet non défini.**

7 Modifications enzymatiques de polysaccharides Erreur ! Signet non défini.

8 Système étudié Erreur ! Signet non défini.

8.1 Gomme d'Acacia **Erreur ! Signet non défini.**

8.2 Curcumine **Erreur ! Signet non défini.**

8.3 La laccase **Erreur ! Signet non défini.**

1 Séparation de phase associative

Lorsqu'un ou plusieurs polymères sont présents dans un solvant, il peut se passer trois choses (Figure 1). Ils peuvent être totalement compatibles et miscibles avec le solvant, ce qui se traduit par une absence de séparation de phase, appelé solution. Il est possible que le ou les polymères soient non miscibles au solvant ce qui mène à une séparation de phase dite dissociative. Enfin, les polymères peuvent interagir entre eux et/ou avec le solvant provoquant ainsi une séparation de la phase continue. Ce phénomène est connu sous le nom de séparation de phase associative. Elle mène généralement à la formation de particules colloïdales en suspension dans une phase continue.

L'échantillon peut alors se présenter sous forme de deux phases. La première correspond au solvant pauvre en polymère et la deuxième correspond au solvant contenant une grande quantité de polymères ayant interagi. Si une séparation liquide/liquide intervient il s'agit du phénomène de coacervation. Il en existe deux types : la coacervation simple et la coacervation complexe. La coacervation simple met en jeu un seul polymère interagissant avec ses pairs et le milieu environnant (Figure 1A). La coacervation complexe correspond à l'association d'au moins deux polymères différents (Figure 1B) (Arshady, 1990; Timilsena et al., 2019). Cependant, une séparation de phase associative n'est pas toujours synonyme de coacervation. Il est aussi possible qu'une séparation de phase solide/liquide se fasse. Les polymères se regroupent alors sous forme de particules plus solides contenant peu de solvant. Le système paraît alors plus proche d'une agrégation bien qu'il puisse parfois être ordonné (Piculell & Lindman, 1992).

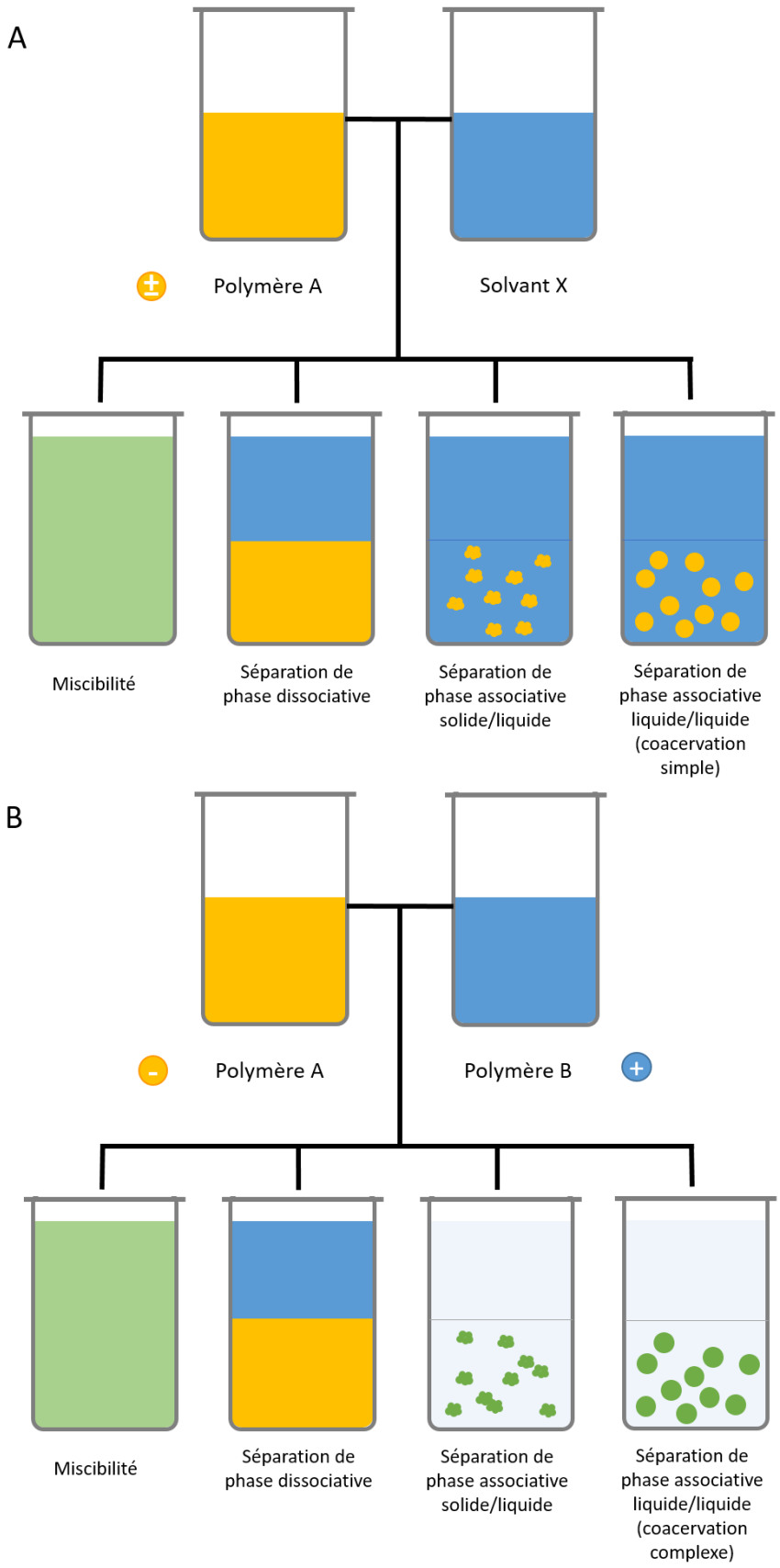


Figure 1 : représentation schématique des différents comportements de (A) un polymère dans un solvant et (B) deux polymères en présence

2 Aspect thermodynamique

Ce sont les lois de la thermodynamique qui permettent cet assemblage. Elles sont définies en plusieurs points. Ce qui est appelé un système est le milieu réactionnel et l'entourage du système est le milieu environnant du système. Ces systèmes sont régis par deux lois :

- L'énergie globale du système étudié doit être constante même si sa forme change (par exemple libération de chaleur). L'énergie globale du système est appelée énergie libre de Gibbs (ΔG) et l'énergie de la réaction est l'enthalpie (ΔH). Si $\Delta G < 0$ (exergonique), l'interaction entre les polymères est spontanée au contraire si $\Delta G>0$ (endergonique) alors la réaction ne se fera pas spontanément.
- L'entropie (ΔS) du système et son entourage doit augmenter pour qu'une réaction soit spontanée. L'entropie est classiquement définie comme étant le désordre inhérent au milieu étudié.

Ces deux lois sont liées par une formule :

Équation 1 : Calcul de la différence d'énergie libre de Gibbs

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Si l'entropie totale doit augmenter pour que la réaction soit thermodynamiquement favorable, la formation de particules colloïdales semble pourtant diminuer le désordre puisqu'il s'agit d'une certaine forme d'organisation. Cependant, lorsque les polymères hydrophobes interagissent, des molécules d'eau de leur couche de solvatation sont libérées. Cela permet finalement une augmentation de l'entropie. Ce phénomène est appelé effet hydrophobe (Bates, 1991; Bouchemal et al., 2010; Piculell & Lindman, 1992; Trevisan et al., 2021).

La contribution de l'enthalpie, ΔH, repose aussi sur la balance entre forces attractives et répulsives. Ces grandeurs dépendent donc des interactions entre les polymères et le solvant mais aussi entre les polymères eux-mêmes. C'est donc la formation de l'assemblage qui en dépend.

3 Quelles interactions en jeux ?

Tous ces évènements sont liés aux interactions entre la phase continue et le polymère et/ou entre les polymères eux-mêmes en fonction des systèmes. Il peut s'agir d'interactions électrostatiques, de liaisons hydrogènes, de forces de van der Waals ou d'interactions hydrophobes.

3.1 Liaisons hydrogène

La nature des liaisons hydrogène les rend idéales pour la construction et la stabilisation d'architectures supramoléculaires. En effet, le monde regorge d'exemples de systèmes utilisant ces liaisons. L'ADN et la structure tertiaire des protéines sont parmi les exemples les plus connus. Elles se forment lorsqu'un accepteur avec un atome d'hydrogène disponible est mis en contact avec un donneur portant des paires d'électrons libres. La force des liaisons hydrogène varie de 1 à 13 $kJ.mol^{-1}$ (Philp & Stoddart, 1996a).

3.2 Interactions hydrophobes

Il s'agit d'interactions qui favorisent le regroupement de molécules non polaires de par les interactions entre les molécules polaires. En effet, lorsque des groupements apolaires sont présents dans un milieu polaire, les molécules d'eau ne peuvent former des liaisons hydrogène qu'entre elles. Ceci est entropiquement défavorable puisque les molécules d'eau sont obligées de s'organiser. Cependant, lorsque plusieurs groupements apolaires se rapprochent, la zone exposée au solvant diminue et les molécules d'eau sont alors libérées augmentant ainsi le désordre conduisant vers un phénomène entropiquement favorable.

Un grand nombre de processus d'auto-assemblage sont en partie favorisés par les interactions hydrophobes comme la formation de micelles, de vésicules, de bicouches ainsi que le repliement des protéines (Meyer et al., 2006). L'énergie des interactions hydrophobes est d'environ 2 à 15 $kJ.mol^{-1}$ (Kong & Muthukumar, 1998). Ces liaisons dépendent de la

température puisqu'elles sont favorisées par la chaleur mais aussi du type de solvant utilisé. Si l'affinité pour le solvant est trop faible, alors les molécules peuvent s'agréger par l'intermédiaire des interactions hydrophobes (Netz & Joanny, 1999).

3.3 Interactions π

Les interactions π peuvent être réparties en plusieurs catégories, parmi lesquelles le π-π stacking, les interactions cation-π, anion-π et CH_3-π (Claessens & Stoddart, 1997; D. A. Dougherty, 2013; Schottel et al., 2008). Le π-π stacking est l'interaction entre des orbitales π. Ce type d'interactions intervient souvent entre les cycles aromatiques. Ils peuvent s'empiler de 3 façons : de manière bord à face, face à face et décalé (Figure 2). La conformation face à face est moins courante du fait de la répulsion entre les électrons. La distance entre les deux cycles est d'environ 3,5 Å pour une conformation décalée et la force de ce type de liaison varie de 1 à 50 $kJ.mol^{-1}$ (Hunter & Sanders, 1990).

Les interactions CH_3-π possèdent une très faible énergie d'interaction (-6 $KJ.mol^{-1}$). Il s'agit d'interactions électrostatiques entre les orbitales π des cycles aromatiques et un groupement – CH_n (Dent & Kokes, 1970; Tsuzuki et al., 2006).Les interactions cation-π s'établissent en présence d'une charge positive pouvant interagir avec une orbitale π. Elles possèdent une force comprise entre 8 et 20 $kJ.mol^{-1}$ (D. A. Dougherty, 2013). Les interactions anion-π s'établissent, elles, en présence d'un anion plus riche en électrons que le système π. Leur force est comprise entre 20 et 50 $kJ.mol^{-1}$ (Schottel et al., 2008).

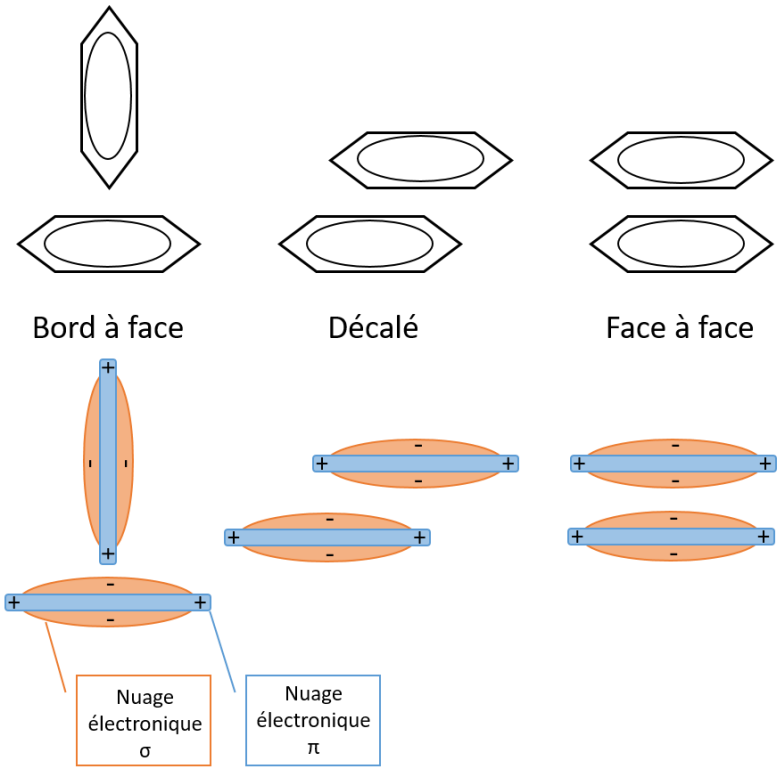


Figure 2 : Trois différents types d'interactions π-π

3.4 Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques dépendent de la charge électrique des molécules. Elles sont dues aux interactions entre un anion et un cation du fait de leurs charges opposées. L'interaction entre deux atomes de charges opposées dans l'eau a une énergie de 5 à 9 kJ.mol^{-1} (Borue & Erukhimovich, 1990). La force ionique et la nature des ions du milieu ainsi que le pH peuvent permettre de contrôler les interactions électrostatiques. Ces interactions peuvent entrainer une diminution de la mobilité des chaines des polymères (Kong & Muthukumar, 1998; Tsianou & Alexandridis, 1999).

3.5 Interactions de Van der Waals

Les liaisons de Van der Waals résultent de l'interaction des nuages électroniques des molécules en jeu. La répartition d'un nuage électronique d'un atome n'est pas toujours homogène, ce qui peut conduire à une asymétrie de la charge. Plus les nuages électroniques sont proches, plus la force est grande (entre 2 et 4 $kJ.mol^{-1}$). Néanmoins, à une distance trop courte, la répulsion de nuages électroniques devient prédominante (Kong & Muthukumar, 1998). Même si leur force sont plutôt faibles, comme toutes les liaisons faibles, c'est leur nombre qui fait leur importance.

Différents types d'interactions ont été recensés :

- Les interactions de Keesom (interaction dipôle permanent – dipôle permanent) ;
- Les interactions de Debye (interaction dipôles induits – dipôle permanent) ;
- Les interactions de London (interaction dipôle instantané provoqué par une fluctuation dans la distribution de charges électriques – dipôle permanent). (Van Oss et al., 1986)

Toutes les interactions précédemment citées peuvent donc mener à la génération spontanée d'objets en suspension par séparation de phase associative. Il s'agit d'un phénomène thermodynamiquement spontané. La synergie entre ces différentes interactions non covalentes détermine la stabilité thermodynamique et l'état d'énergie minimale des structures formées. Cependant, en raison de leur nature relativement faible, ces interactions peuvent être modulées en fonction de paramètre physico-chimiques du milieu tels que le pH, la température, la présence de contre-ions, les concentrations et les solvants (J. Wang, 2016). Un des exemples le plus connu de séparation de phase associative est l'effet ouzo, un phénomène de nano-précipitation mettant en jeu un déplacement de solvant.

4 Effet ouzo (déplacement de solvant)

Il existe à ce jour de nombreuses méthodes pour former des particules par voie ascendante dite « bottom up ». La nano-précipitation en est un exemple. Elle permet de former des précipités hydrophobes sous l'effet d'un changement de solvant. Il existe trois procédés faisant appel à ce système :

- L'émulsion-évaporation,
- L'émulsion-diffusion,
- Le déplacement de solvant.

Le déplacement de solvant fait appel à deux solvants miscibles. Dans une solution l'équilibre d'un solvant est déplacé vers un autre appelé non-solvant. Le non-solvant permet alors la précipitation d'une molécule d'intérêt précédemment dissoute. C'est dans ce cadre que se place l'effet ouzo (Goubault, 2020).

4.1 Principe

Une molécule étant soluble dans un solvant devient insoluble dans un non-solvant (souvent l'eau), ce qui conduit à la formation de particules alors relativement stables.

Il s'agit d'un procédé bien plus souvent utilisé que ce que l'on pourrait penser. En effet, tout à chacun a dû en faire l'expérience ou l'observer puisqu'il tire son origine de boissons bien connues. Son nom provient d'une boisson : l'ouzo. Il s'agit d'un alcool anisé qui lorsqu'il est consommé est souvent coupé avec de l'eau. Il devient alors turbide (Figure 3) (Carteau et al., 2008; Sitnikova et al., 2005). Une autre boisson faisant appel à l'effet ouzo, et peut être plus connue dans nos régions, est le Pastis. Il s'agit d'un autre alcool anisé, qui devient turbide lors de l'ajout de l'eau (Carteau et al., 2008; Grillo, 2003; Lepeltier et al., 2014). D'autres exemples dans le monde peuvent encore être donnés comme le raki en Turquie (Anli et al., 2007).

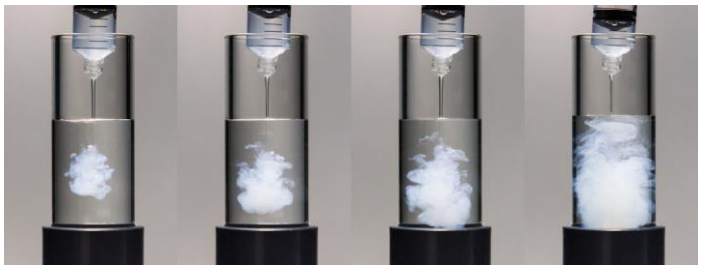


Figure 3 : Trouble apparaissant dans l'ouzo lors de l'ajout d'eau (Lohse & Zhang, 2015)

Lors de l'obtention d'un effet ouzo, une molécule hydrophobe d'intérêt est dissoute dans un solvant (comme l'éthanol, l'acétone ou le tétrahydrofurane par exemple). Dans ce mélange est ajoutée une grande quantité d'un non-solvant tel que l'eau. Si la concentration du soluté dans la solution résultante dépasse sa limite de solubilité (concentration critique) le système est dans un état dit de sursaturation. Le système évolue alors vers une séparation de phase induisant la formation de particules insolubles dans le milieu (Lepeltier et al., 2014).

Il existe plusieurs méthodes pouvant conduire à la sursaturation :

- L'ajout direct du solvant, comme dans l'ouzo ou le pastis
- La dialyse, permettant un remplacement total du solvant par le non-solvant
- L'évaporation du solvant si le soluté est soluble dans un mélange solvant/non-solvant

Il est possible de représenter sur un diagramme de phases ternaire solvant/soluté/non-solvant les compositions pouvant mener à la formation de particules. La région d'ouzo est délimitée par deux frontières : la courbe binodale (limite de miscibilité) et la limite d'ouzo ou spinodale (limite de stabilité). Par exemple, le diagramme ternaire du système éthanol/anéthol/eau bien connu dans le pastis est schématisé dans la Figure 4. Il semble très simple de préparer un Pastis mais l'obtention du trouble caractéristique de cette boisson ne se produit que dans des conditions très précises. Cet apéritif se prépare en ajoutant de l'eau à une solution alcoolique contenant de l'anéthol. Le mélange suit donc le chemin 1 vers 2 montré sur la Figure 4 (Lepeltier et al., 2014; Sitnikova et al., 2005; Trevisan et al., 2021).

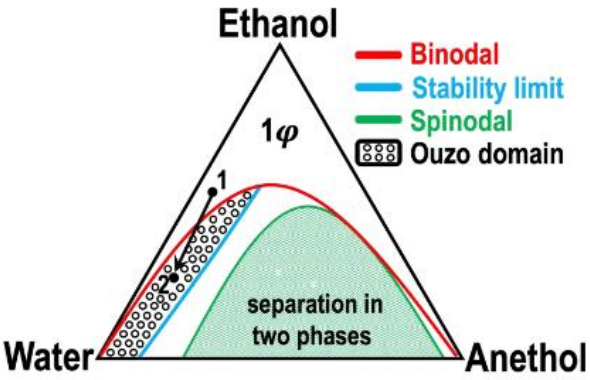


Figure 4 : Schématisation du diagramme ternaire éthanol/anéthol/eau (Trevisan et al., 2021)

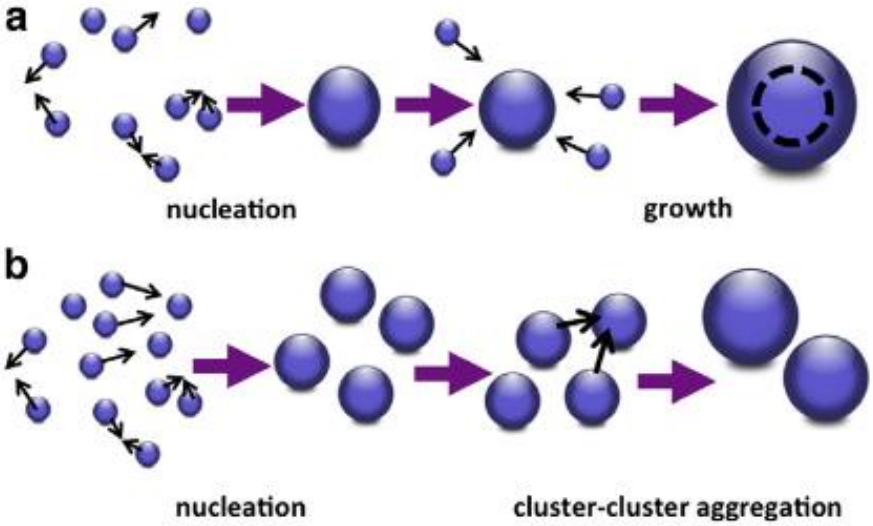


Figure 5 : Description schématique de (a) la nucléation par ajout de molécules environnantes et (b) l'agrégation par collision de nuclei (Lepeltier et al., 2014)

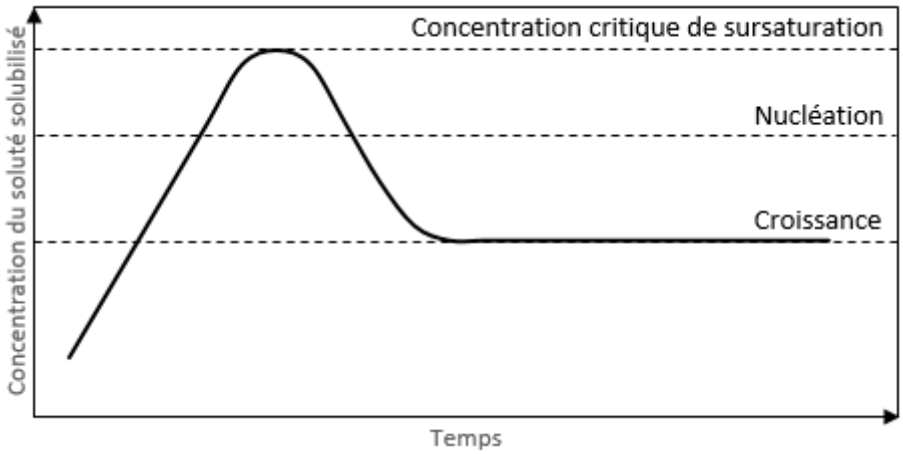


Figure 6 : Diagramme de LaMer

Le système évolue ensuite par nucléation de particules ou de gouttelettes de la molécule d'intérêt. Lorsque la sursaturation est atteinte, des nuclei se forment spontanément à partir de fluctuations locales de la concentration en soluté. Ils peuvent ensuite grossir *via* l'association à d'autres molécules ou la collision à d'autres nuclei (Figure 5) jusqu'à ce qu'une concentration en molécules dissoutes inférieure à la limite de solubilité soit atteinte. Une concentration inférieure à la concentration critique doit donc être atteinte dans le solvant pour que des particules arrêtent de se former. Il reste cependant toujours une part de soluté solubilisé dans le solvant. Ce processus est notamment décrit par le diagramme de LaMer (Figure 6) (LaMer & Dinegar, 1950).

4.2 Exemples de formation de particules par effet ouzo

Le premier exemple présenté ici porte sur l'assemblage spontané de copolymères (poly(4-vinylphenol-alt-dodecylmaleimide : AltC12 et poly(4-vinylphenol-alt-octadecylmaleimide) : AltC18), formés par polymérisation. Cette étude traite de l'influence du type de solvant utilisé et de l'hydrophobie des polymères en jeu pour la formation de particules par effet ouzo.

Lors du changement de solvant (Tétrahydrofurane (THF) vers eau) des nanoparticules s'assemblaient spontanément par interaction entre les chaines hydrophobes des polymères. Le moteur de cette association est, comme expliqué dans le paragraphe 0 page 10, l'ampleur du gain entropique associé à la libération des molécules d'eau de la couche de solvatation, et plus particulièrement, du fait que le gain est supérieur à la perte associée à l'assemblage des chaînes de copolymères (Trevisan et al., 2021).

Dans cette étude, les auteurs ont représenté un diagramme de phase ternaire (Figure 7) pour les deux ensembles de copolymères testés (AltC12 et AltC18). Ce diagramme a été converti en diagramme de phase binaire en échelle logarithmique représentant les phases formées en fonction de la fraction en copolymère et la fraction massique de THF. En effet, la représentation

classique ne permettait pas de distinguer clairement le domaine d'ouzo car cette région était trop mince.

Lorsque la fraction massique en eau augmentait, les polymères se structuraient pour former des nanoparticules auto-assemblées. Le mélange passait donc de la région monophasée (1) au domaine ouzo. Une augmentation de la fraction massique de copolymère pourrait conduire, quant à elle, à la formation d'agrégats macroscopiques (2). Il est possible d'observer que la binodale de AltC18 est plus basse que celle d'AltC12. En réalité ceci est expliqué par l'hydophobie du composé. AltC18 était plus hydrophobe que AltC12 dû à la longueur des chaînes carbonées qui le composaient (18 carbones contre 12), les assemblages se formaient donc plus tôt. La CAC (concentration critique d'agrégation) était plus faible, due à l'hydrophobie du composé.

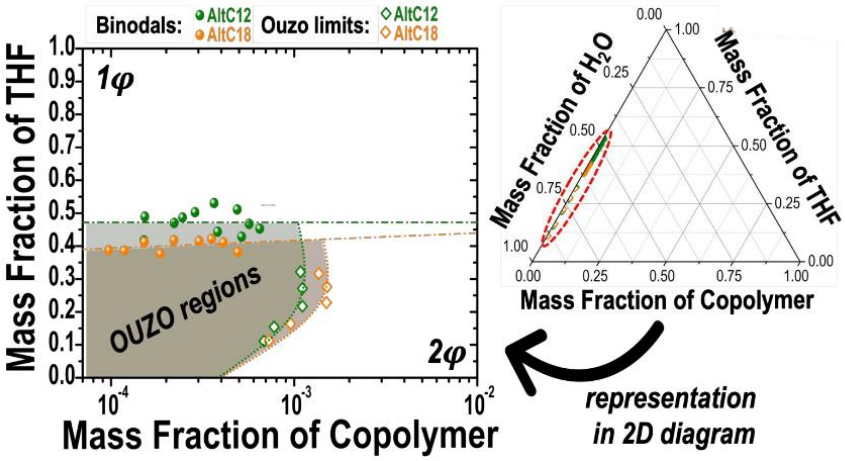


Figure 7 : A droite : diagramme ternaire de l'effet ouzo correspondant à la formation de particules d'AltC18 et AltC12 ; à gauche : diagramme de phase bidimensionnel de ces mêmes polymères (Trevisan et al., 2021)

Le choix du solvant organique est aussi important (le second étant généralement de l'eau). Avec un solvant possédant une grande affinité avec l'eau, le changement de solvant et donc le phénomène de sursaturation s'effectue plus rapidement. Ce phénomène est notamment visible lorsque les particules sont obtenues par dialyse puisque l'affinité entre le solvant et l'eau est un paramètre déterminant la vitesse d'élimination du solvant. Si le changement de solvant est

rapide la sursaturation est d'autant plus rapide et homogène. Les objets obtenus sont plus petits qu'avec un solvant qui diffuserait plus lentement, puisque les nuclei formés n'ont pas le temps de fusionner. Il est aussi nécessaire de prendre en compte l'affinité du solvant avec le soluté hydrophobe ainsi que sa viscosité puisque ces paramètres peuvent aussi augmentait le temps pour atteindre la sursaturation (Goubault, 2020; Trevisan et al., 2021; Vitale & Katz, 2003).

L'impact du type de solvant sur la taille des particules d'AltC18 et AltC12 a donc été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Figure 8). Les auteurs ont utilisé du THF, du dioxane et de l'acétone. L'acétone ayant une viscosité plus faible et une affinité plus forte pour l'eau, la sursaturation est plus rapide est uniforme, ce qui a donné des nanoparticules d'une taille moyenne inférieure à 100 nm contre 150 nm obtenue avec le dioxane et 300 nm avec le THF (pour AltC18).

En parallèle, lorsque le solvant reste inchangé et que seule l'hydrophobie des solutés augmente, la taille des particules obtenue augmente. Le soluté ayant une grande affinité pour le solvant, le phénomène de sursaturation intervient plus lentement.

Ainsi, les particules d'AltC18 étaient plus grosses que les particules d'AltC12 du fait de leur hydrophobie plus élevée. Pour AltC12 la diffusion du solvant a été plus rapide ce qui a conduit à des particules plus petites. C'est pour le THF, avec lequel AltC18 avaient beaucoup d'affinité, que les tailles augmentaient le plus. Les particules, du fait de cette affinité, pourraient aussi être capables d'emprisonner une certaine quantité de solvant en leur cœur.

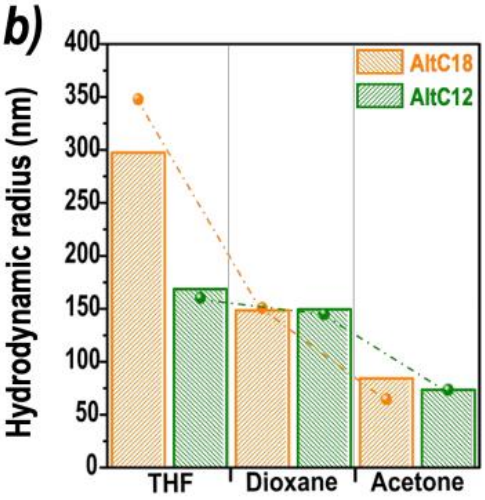


Figure 8 : Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules AltC12 et AltC18 préparées dans le THF, le dioxane et l'acétone. Les barres correspondent aux suspensions fraîchement préparées et les symboles (-●-) indiquent le rayon hydrodynamique des suspensions après 6 mois stockées à température ambiante.

La taille des particules formées par effet ouzo dépend de la vitesse de mélange et donc :

- L'inter-diffusion solvant/non-solvant ;
- L'interaction solvant-copolymère (lyophobe du copolymère) ;
- Et la diffusion de la chaîne de polymère (majoritairement gouvernée par le poids moléculaire du polymère).

La vitesse de sursaturation est bien cruciale comme montré dans une autre étude de Pucci *et al.* (2018). Dans le cas d'un ajout rapide d'eau, la sursaturation s'établit instantanément formant ainsi de nombreux nuclei. Dans ce cas, les auteurs ont constaté l'apparition d'objets de petit diamètre avec une distribution de taille étroite. Dans le cas d'un mélange lent, la nucléation est plus hétérogène et le temps du mélange laisse la possibilité de former des particules plus grosses. Elles peuvent alors croître au fur et à mesure que la fraction de solvant diminue. Cela mène donc à la formation particules plus polydisperses (Pucci et al., 2018).

Trevisan et al. (2021) ont ensuite essayé de déterminer la structure des particules *via* SLS (static light scattering) et SANS (small-angle neutron scattering). Il s'est avéré que l'hydrophobie de AltC18 lui permettait bien d'emprisonner une grande quantité de THF et d'obtenir une structure

cœur-couronne ou « core shell », alors que pour AltC12 le solvant se répartissait dans l'ensemble des particules (Figure 9 A). Les observations précédentes ont pu être validées par la prise de micrographies par TEM et Cryo-TEM. En effet, après séchage, les particules d'AltC18 semblent éclatées en raison de l'évaporation du solvant qui se trouvait en leur centre (Figure 9 B).

Il est à noter que les particules possédaient une grande stabilité dans le temps sans ajout de stabilisants. Ceci était dû à l'adsorption d'ions hydrogénocarbonates. Ceux-ci composaient une couche électronique chargée et induisaient une répulsion entre les particules empêchant la coalescence (Trevisan et al., 2021).

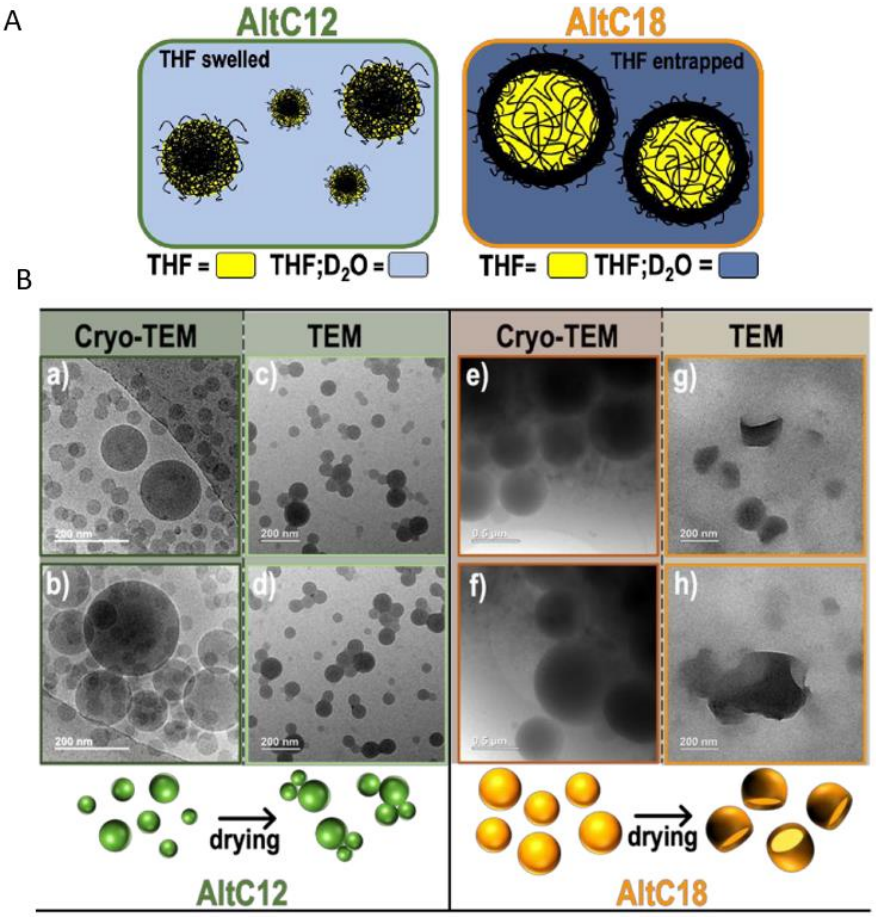


Figure 9 : (A)schématisation de la structure des particules formées par AltC12 et AltC18 via l'effet ouzo (B) micrographies par Cryo-TEM et TEM pour deux régions représentées ; pour AltC12 (a) et (b) – grossissement x 40k et (c) et (d) –grossissement x 20k ; pour AltC18 (e) et (f) – grossissement x 10k et (g) et (h) – grossissement x 20k. barres d'échelles : 200 nm (Trevisan et al., 2021)

Un autre paramètre important à prendre en compte est la température. Elle joue notamment un rôle sur de nombreux paramètres tels que la viscosité, le coefficient de diffusion, la solubilité, etc. Une étude a pu le montrer sur le pastis. Il a notamment été observé qu'en augmentant la température cela favorisait la diffusion de l'anéthol et donc une augmentation de la taille des particules. Le rôle de la température est important puisqu'un certain nombre de paramètres physicochimiques en dépendent, elle peut donc favoriser l'instabilité de ce type de suspension (Grillo, 2003).

L'effet ouzo a aussi été utilisé pour la préparation de nanoparticules à base de polysaccharides. Un premier exemple porte sur la synthèse d'un ester de propionate de gomme de guar (GGP) en présence de LiCl et de dimethyl amino pyridine (DMAP) solubilisé dans du DMSO (Kundu et al., 2016). Le greffage a été confirmé par FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) et RMN (résonance magnétique nucléaire).

Les composés nouvellement formés, plus fortement hydrophobes que la gomme de guar originelle, sont alors solubles dans le DMSO. Une dialyse a ensuite permis de diminuer la quantité de DMSO en faveur de la quantité d'eau. L'échange de solvant a entrainé une association des chaînes du polymère menant à une nucléation et à l'arrangement en particules nanométriques (GGPnp) d'environ 258 nm et d'un indice de polydispersité de 0,339 à l'état humide et de 60 nm à l'état sec (Figure 10).

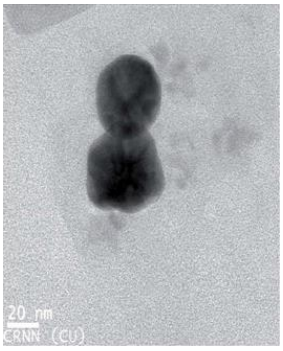


Figure 10 : Micrographie par cryo-TEM de nanoparticules de gomme de guar fonctionnalisée (Kundu et al., 2016)

Des analyses de thermogravimétrie (TGA) (Figure 11A) ont montré que les composés ainsi formés possédaient une affinité vis-à-vis de l'eau différente de la gomme de guar native (GG). Les pertes de masses entre 50 et 100 °C correspondent à l'eau faiblement liée alors que les pertes entre 100 et 150 °C correspondent à l'eau liée. Il était visible sur les thermogrammes de GG qu'environ 20 % de la masse totale correspondait à de l'eau libre. Le polymère natif contenait très peu d'eau liée. Pour la GGP, 10 % de la masse était de l'eau libre et un peu moins de 5 % de l'eau liée. Le polymère fonctionnalisé est donc bien plus hydrophobe que le polymère natif. Cependant, sous forme de nanoparticules GGPnp présentait une quantité d'eau libre encore plus importante que le polymère natif.

Les résultats obtenus par analyse thermodifférentielle (DTA) (Figure 11B) ont confirmé les conclusions déduites par TGA. Un pic endothermique sur le thermogramme de GG était observé à 55 °C, alors que dans le cas du GGP, il était apparu à une température plus élevée. Ceci montre une structure plus lâche. Pour les GGPnp, le premier pic endothermique était apparu à une température plus faible. Cela était dû à la plus grande quantité d'eau emprisonnée dans les assemblages. Les propriétés thermiques de GGPnp étaient influencées par leur capacité à emprisonner de l'eau (Kundu et al., 2016).

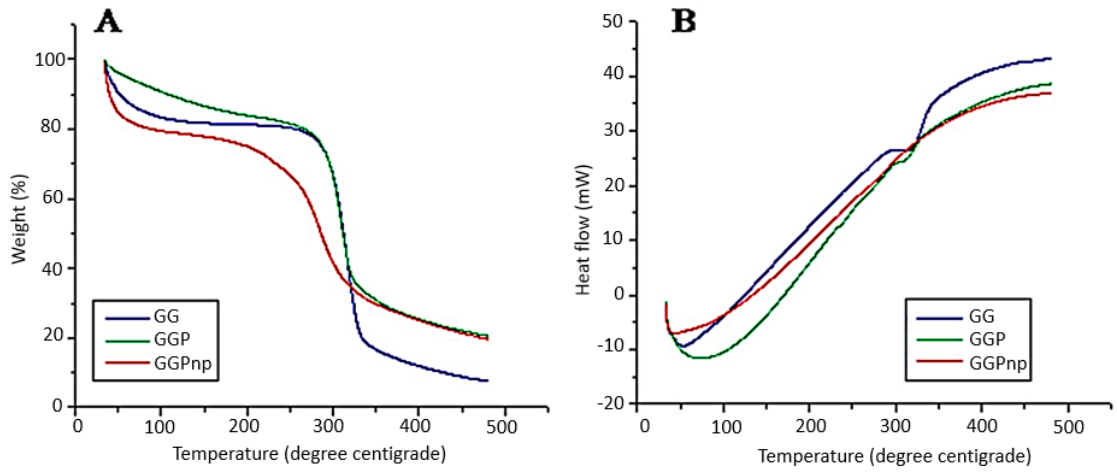


Figure 11 : (A) Thermogrammes TGA et DTA obtenus sur GG (Bleu), GGP (vert) et GGPnp (rouge) (Kundu et al., 2016)

Dans une autre étude le dextrane, le pullulane et l'amidon ont été estérifiés par des anhydrides d'acides carboxyliques hydrophobes de manière à augmenter leur hydrophobie. Des nanoparticules ont pu être préparées avec de l'acétone et du THF pour être suspendues dans de l'eau.

Les tailles des particules et les distributions de tailles différaient entre les deux solvants. Ces différences étaient dues aux solubilités différentes des polymères dans les solvants. De plus, changer le solvant implique de changer le coefficient de diffusion et la viscosité et donc la vitesse de formation des assemblages. Les particules préparées à partir d'acétone présentaient une morphologie sphérique pleine. Les particules préparées avec le THF étaient sphériques et présentaient une cavité (Figure 12). L'affinité des solutés pour les solvants a donc permis de modifier la morphologie des assemblages formés comme montré précédemment avec AltC18 et AltC12 (Aschenbrenner et al., 2013; Trevisan et al., 2021).

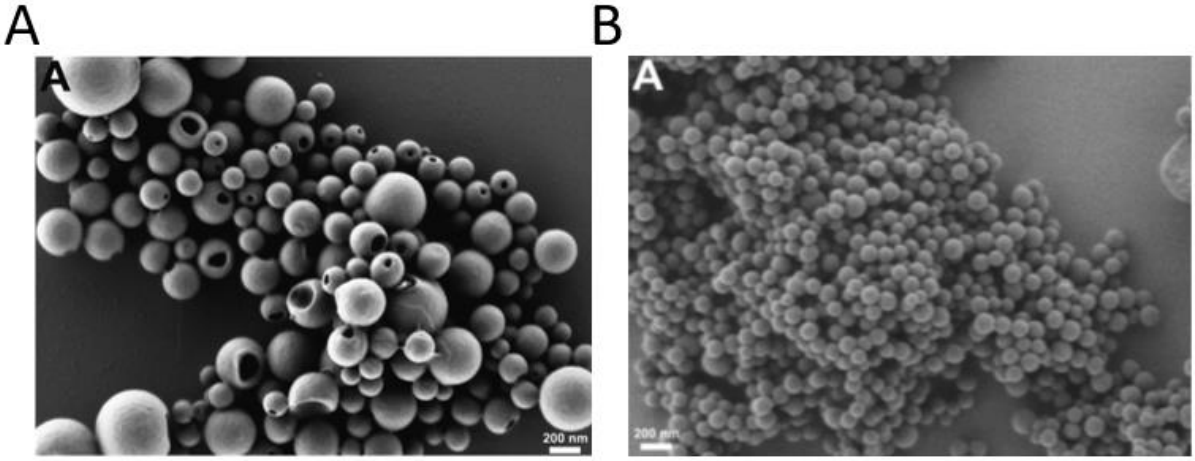


Figure 12 : Micrographies SEM de (A) dextrane modifié préparé dans eau/THF et (B) dextrane modifié préparé dans eau/acétone. Barres d'échelle : 200 nm (adaptées de Aschenbrenner et al. 2013)

Les analyses suivantes ont été réalisées sur des particules préparées dans l'acétone.

La microscopie à force atomique montrait une morphologie sphérique, comparable à celle observable sur la Figure 12. Il a aussi été possible de mesurer le module de Young, c'est-à-dire l'élasticité des particules. Les auteurs ont étudié la modification du module de Young en fonction de l'hydrophobie des polymères (Figure 13). Avec la diminution de l'hydrophobie, les particules incorporaient plus d'eau, réduisant ainsi le module élastique.

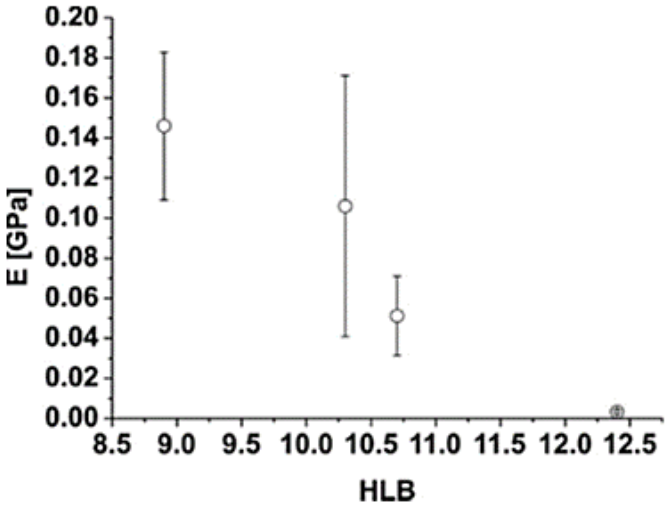


Figure 13 : Représentation du module élastique mesuré par AFM en fonction de la HLB des polymères. (HLB : Hydrophilic Lipophilic Balance, plus elle est élevée plus l'hydrophilie est importante)

Ici le BODIPY-B612-MA un colorant fluorescent a été choisi pour des essais d'encapsulation. La dispersion montrait une fluorescence rouge une fois sous UV ce qui confirmait bien l'encapsulation de la molécule fluorescente hydrophobe. Les polysaccharides offrent donc la possibilité d'insérer, dans les particules ainsi formées, des substances telles que des médicaments et donc de formuler des vecteurs *via* l'effet ouzo (Aschenbrenner et al., 2013).

Les particules obtenues par effet ouzo ont montré une simplicité d'exécution. Néanmoins, le nombre de molécules formant naturellement et spontanément des particules est limité. Il faut souvent modifier ou synthétiser un polymère pour lui conférer des propriétés d'auto-assemblage.

5 Polymerization-induced self-assembly (PISA)

L'auto-assemblage induit par la polymérisation (PISA) est une des nombreuses stratégies permettant la synthèse de polymères capables de former des particules. Dans ce processus, des copolymères amphiphiles sont synthétisés par l'extension d'une chaîne souvent hydrophobe à partir d'un précurseur soluble dans le solvant utilisé. Ainsi, *via* la polymérisation de chaines lyophobes sur ce précurseur, il est possible d'induire un changement de comportement vis-à-vis du milieu environnant (souvent l'eau) et pouvant mener à la formation d'objets auto-assemblés. La plupart des formulations PISA sont basées sur la polymérisation radicalaire contrôlée telle que le transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT), la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP), ou la polymérisation radicalaire médiée par les nitroxydes (NMP) (An et al., 2021).

5.1 Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT)

5.1.1 Principe

La Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT) est la méthode de polymérisation la plus utilisée dans les techniques de PISA. Cette modification peut permettre d'induire un auto-assemblage des composés modifiés (Figure 14). En effet, l'agent RAFT (le précurseur), peut présenter des unités interagissant par exemple *via* des liaisons hydrogène (Cornel et al., 2021).

La méthode RAFT est une méthode de polymérisation radicalaire contrôlée pouvant induire la formation d'auto-assemblages. Son mécanisme se sépare en plusieurs étapes présentées dans la Figure 15. La première étape est l'initiation. Elle consiste en la formation d'un radical qui, lors de la seconde étape, réagit avec l'agent de transfert (ou CTA pour chain transfer agent). Cette molécule va capter les radicaux R' puis les transférer pour permettre l'élongation des chaines (Boyer et al., 2009).

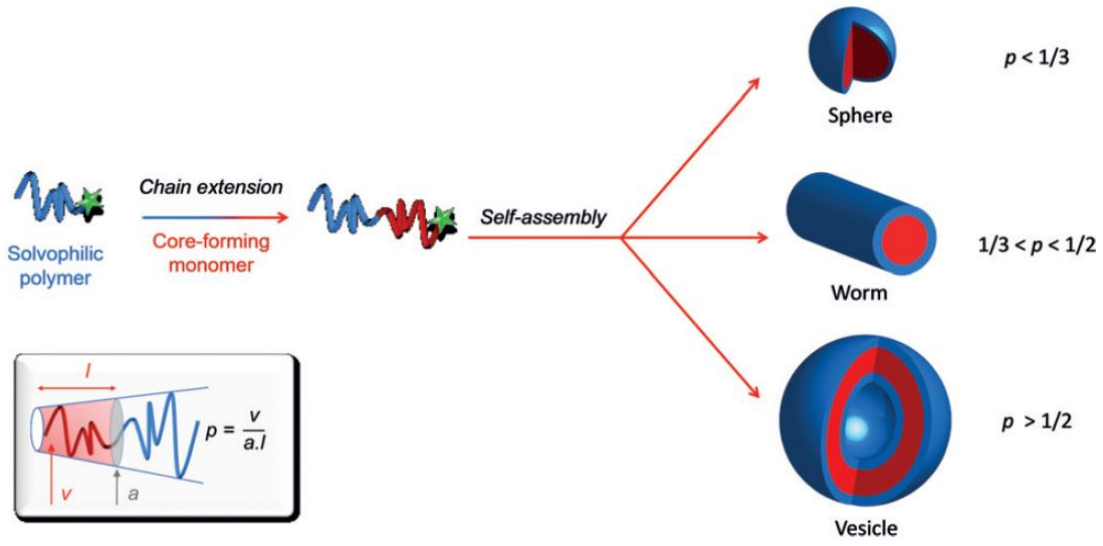


Figure 14 : Auto-assemblage induit par la méthode RAFT et impact du « packing parameter » p (par analogie avec les tensioactifs). a est la surface du segment lyophile et v et l sont respectivement le volume et la longueur du segment lyophobe. (D'Agosto et al., 2020)

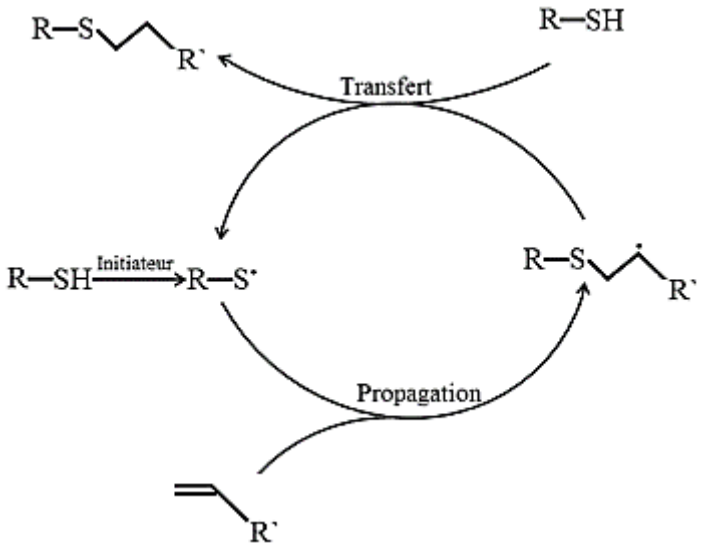


Figure 15 : Mécanisme de la polymérisation RAFT (Belkhir, 2019)

5.1.2 Exemples d'auto-assemblages induits par RAFT PISA

Les auto-assemblages étant fonction des interactions entre les polymères, de nombreuses publications se sont portées sur le sujet. Certaines études (Dao, Vezenkov, Subra, Amblard, et al., 2020; Dao, Vezenkov, Subra, Ladmiral, et al., 2020) sont basées sur la formation de structures auto-assemblées *via* RAFT contenant des noyaux polypeptidiques hydrophobes. Des agents de transfert de chaîne hydrophile de poly(monométhacrylate de glycérol) (PGMA mCTA) ont été utilisés. Des dérivés de méthacrylamide contenant les tripeptides MAm-GFF (MAm-Gly-Phe-Phe-NH_2) et MAm-FGD (MAm-Phe-Gly-Asp-NH_2) ont été utilisés pour synthétiser les chaînes. Dans un premier temps la réaction s'est faite à 70 °C dans de l'éthanol pour Mam-GFF aboutissant à la formation de différentes structures auto-assemblées. La Figure 16 représente la polymérisation de P(GMA-stat-(MAm-GFF)) macro-CTA et de P(GMA-stat-(MAm-GFF))-b-PHPMA.

Des mesures de spectroscopie à dichroïsme circulaire ont montré une interaction π-π entre les phénylalanines présentes sur MAm-GFF. Ainsi, l'organisation sous forme de fibres a été attribuée à un empilement des cycles aromatiques des résidus de phénylalanine. En outre, les

nano-assemblages étaient également stabilisés par des liaisons hydrogène (Phe-Phe ou Phe-solvant) et d'autres interactions faibles telles que les interactions hydrophobes, électrostatiques et de Van der Waals (Dao, Vezenkov, Subra, Amblard, et al., 2020; Dao, Vezenkov, Subra, Ladmiral, et al., 2020). Dans le cas du MAm-GFF, ce sont les liaisons hydrogène entre les groupes amides qui contribuaient probablement le plus à l'auto-assemblage. La formation de structures assemblées pouvait donc dépendre des conditions environnementales comme la température ou le type de solvant utilisé (Dao, Vezenkov, Subra, Ladmiral, et al., 2020).

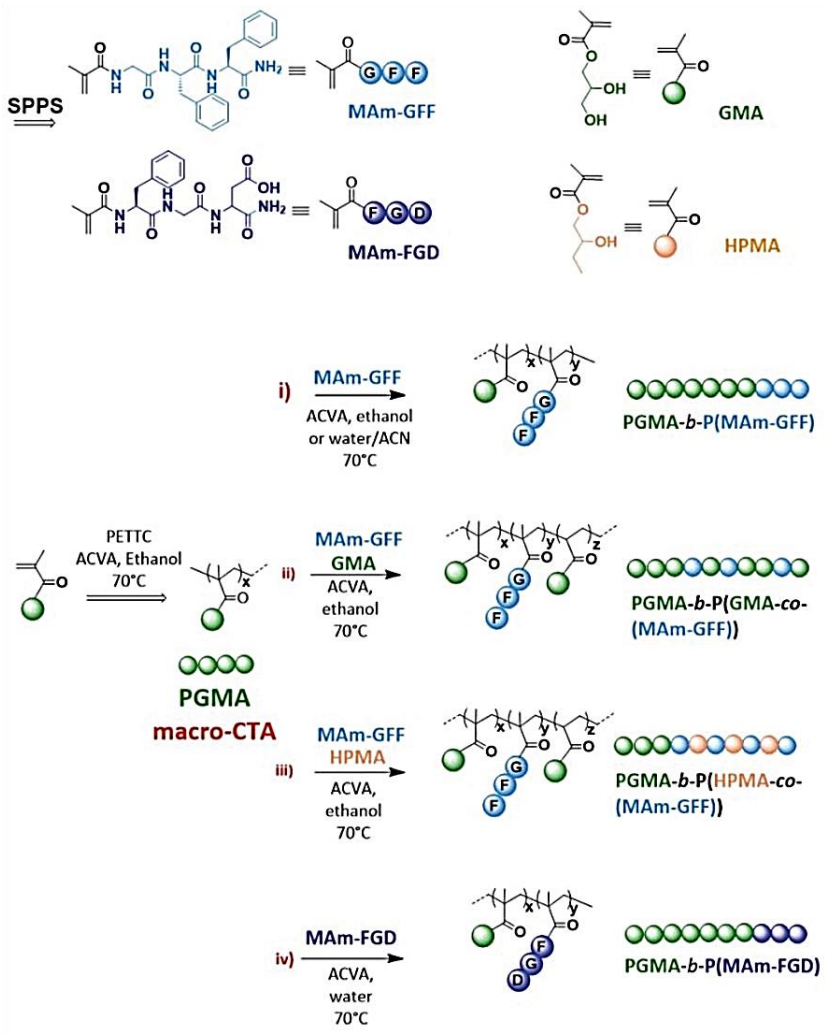


Figure 16 : Synthèse de P(GMA-stat-(MAm-GFF)) macro-CTA et de P(GMA-stat-(MAm-GFF))-b-PHPMA par RAFT. PHPMA : poly(méthacrylate de 2-hydroxypropyle) ; SPPS : solid phase peptide synthesis ; GMA : glycerol monomethacrylate ; HPMA : poly(2-hydroxypropyl methacrylate) ; PGMA : poly(monométhacrylate de glycérol) (PGMA mCTA) ; ACVA : 4,4′-azobis(4-cyanopentanoic acid) ; DMF : dimethylformamide.

L'effet du solvant sur PGMA-b-P(MAm-GFF) a donc ensuite été étudié. L'éthanol a été remplacé par un mélange eau/acétonitrile 1 : 1. Les images TEM (Figure 17) ont ensuite montré que le PGMA40-b-(MAm-GFF) formait des particules sphériques monodisperses dans ce nouveau solvant, alors que PGMA40-b-(MAm-GFF), conduisait quant à elle à des vésicules polydisperses. La modification de la stabilité des colloïdes en fonction du solvant utilisé était probablement due aux interactions GFF-GFF (liaisons hydrogène et interactions π-π). Les mélanges eau/acétonitrile testés étaient de bien meilleurs solvants des GFF que l'éthanol ce qui empêchait les interactions GFF-GFF responsables de la formation des structures fibreuses.

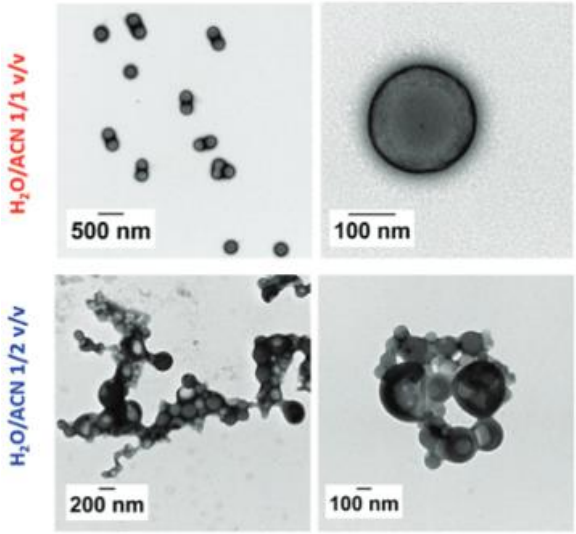


Figure 17 : Micrographies TEM $PGMA_{40}$-b-P(MAm-GFF) dans un mélange eau/acétonitrile 1 : 1 et 1 : 2 (Dao, Vezenkov, Subra, Ladmiral, et al., 2020)

Afin de réaliser la PISA dans des conditions de dispersion aqueuse, le MAm-FGD a été conçu. Ce monomère, est moins hydrophobe car il contient un acide aspartique au lieu d'un second fragment phénylalanine. Les images TEM (Figure 18) des suspensions ont révélé la formation de grandes structures dendritiques ressemblant à des nœuds papillon. Malgré un résidu de phénylalanine en moins ces composés restent capables de s’assembler. Néanmoins, ce changement de motif et donc d’hydrophilie a une influence sur la morphologie des assemblages obtenus (Dao, Vezenkov, Subra, Ladmiral, et al., 2020).

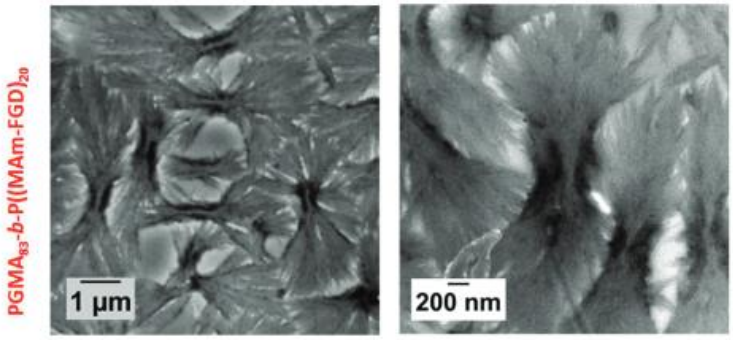


Figure 18 : Micrographies TEM de PGMA83-b-P(MAm-FGD)20 obtenus dans l'eau à 70 °C (Dao, Vezenkov, Subra, Ladmiral, et al., 2020)

Dans une étude de Zhu et al. (2013), la polymérisation du poly(2-hydroxy-3-phenoxypropyl acrylate) (PHPPA) a été menée par RAFT dans du dimethylformamide (DMF) à 70 °C durant vingt heures.

La synthèse des composés a été vérifiée par RMN. Différentes longueurs de chaînes (faisant varier l'hydrophobie des composés) ont été synthétisées et 2 solvants différents (eau : THF et eau : DMF) ont été utilisés pour les suspendre. La formation de particules a été démontrée par TEM. Deux morphologies ont pu être observées : des vésicules et des sphères (plus ou moins hydratées).

Dans le mélange de solvant eau : THF, des vésicules ainsi que des sphères peu hydratées ont pu être observées. La membrane des vésicules était constituée de chaînes avec une amphiphilie différente, comme illustré dans la Figure 19, ce qui est tout à fait différent de la membrane des vésicules traditionnelles en bicouches. Dans la membrane de la vésicule, des liaisons hydrogène se formaient entre les groupements -OH et les molécules d'eau du milieu extérieur. La présence de sphères pleines pourrait être causée par la formation en plus grand nombre de liaisons hydrogène entre les chaines de polymère.

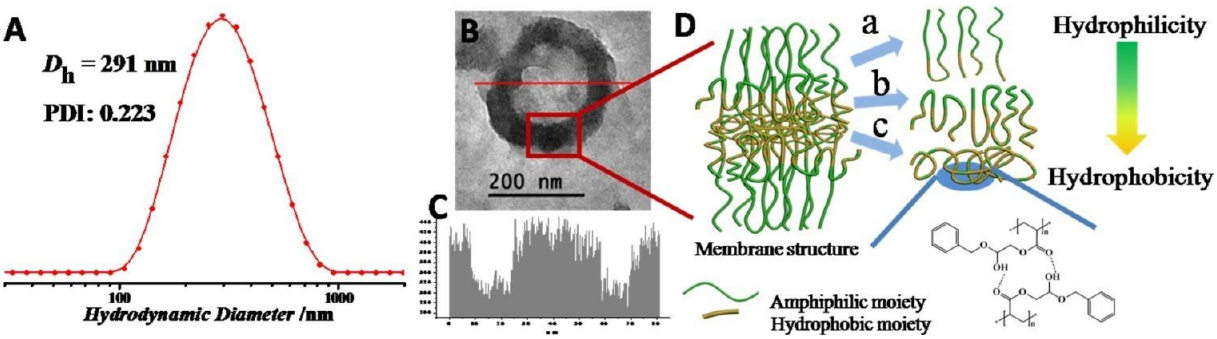


Figure 19 : (A) Distribution DLS, Dh : diamètre hydrodynamique et PDI : indice de polydispersité (B) micrographie TEM et (C) transmittance électronique au niveau de la ligne horizontale rouge dans (B) de $PHPPA_{71}$ préparée dans THF/eau (1/2, v/v) et pH 7. (D) Schématisation des chaînes du polymère avec une hydrophobie (a) faible, (b) moyenne, et (c) élevée dans des zones différentes de la membrane de la vésicule et de la liaison hydrogène inter/intra-polymère formée entre les polymères. (Zhu et al., 2013)

Les conditions physicochimiques telles que le pH ou la température ont aussi une influence sur les liaisons faibles permettant la formation des auto-assemblages. C'est pourquoi l'influence du pH sur les assemblages a aussi été étudiée. En effet, à un pH basique, les liaisons hydrogène inter et intra-polymère sont clivées. $PHPPA_{71}$ à un pH basique formait alors des structures plus hydratées puisque les particules avaient une structure interne plus lâche pouvant donc contenir plus d'eau. Les groupements hydrophobes se regroupaient alors pour former des noyaux déshydratés à l'intérieur de ces particules, apparaissant au TEM comme des sortes de taches (Figure 20).

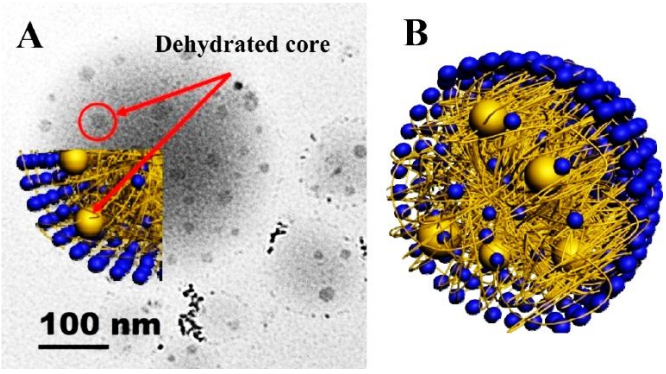


Figure 20 : (A) Micrographie TEM et (B) schéma des particules de $PHPPA_{71}$ (DMF/eau à pH 11,0). Les sphères jaunes représentent les groupement hydrophobes formant de noyaux. (Zhu et al., 2013)

La charge de surface est aussi un facteur clé du maintien de la stabilité de l'auto-assemblage. Les mesures de potentiel Zêta ont révélé que tous les auto-assemblages étudiés dans cet article étaient chargés négativement (en raison du groupe terminal carboxyle à la surface). L'échantillon à pH neutre avait un potentiel Zêta inférieur à celui de l'échantillon à pH basique car plus de groupements carboxyles étaient pris dans les liaisons hydrogène. De plus, les groupements carboxyles à pH basique étaient déprotonés, ce qui lui conférait une charge plus élevée. L'échantillon à pH neutre se dégradait lorsqu'il était exposé à une température élevée alors que l'échantillon à pH basique restait stable. Après avoir été auto-assemblés dans des conditions basiques, il n'y avait pas de liaisons hydrogène inter/intra-polymères pouvant être clivées par la chaleur.

5.2 Autres méthodes PISA

5.2.1 Atom transfer radical polymerization (ATRP)

Cette méthode repose sur la formation de radicaux permettant l'élongation d'une chaîne tout comme la RAFT (Figure 21). Néanmoins, cette dernière s'est avérée plus pratique que l'ATRP notamment, vis-à-vis de la PISA. En effet, cette méthode nécessite l'utilisation d'un catalyseur de cuivre qui forme des composés toxiques souvent indésirables dans le produit final. Les nanoparticules obtenues par ATRP-PISA sont donc bien moins indiquées pour applications biomédicales ou pharmaceutiques. Néanmoins, des améliorations de cette technique ont été développées de manière à diminuer la quantité d'ions métalliques (Cornel et al., 2021; C. Liu et al., 2020; Pearson et al., 2017).

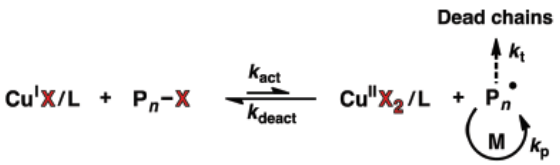


Figure 21 : étape d'initiation des méthodes ATRP (Pearson et al., 2017)

Une étude de Wang *et al*. (2019), a été réalisée sur l'ATRP-PISA. Trois macro-initiateurs ont été synthétisés : PEG113-Br, PEG45-Br, et un poly(méthacrylate de 2-hydroxypropyle) substitué par du bromure (PHPMA29-Br). Au début de la polymérisation tous les composés étaient solubles, puis, lors de la réaction, les polymères synthétisés devenaient insolubles formant ainsi des objets par auto-assemblage. En modifiant le degré de polymérisation l'épaisseur de la membrane vésiculaire augmentait (Y. Wang et al., 2019).

5.2.2 Addition-fragmentation chain transfer (AFCT)

La nécessité inhérente de la rapidité de réaction d'une polymérisation pendant la PISA a été remise en question par Zhou, Kundel et Zetterlund en 2017. Une polymérisation AFCT a donc été tentée pour la PISA, conduisant à des nanoparticules sans soufre. Il s'agit d'une technique de polymérisation relativement proche de la polymérisation RAFT. La différence essentielle est que la vitesse d'addition des chaînes au polymère en croissance est beaucoup plus lente (Cornel et al. 2021 ; Zhou, Kuchel, et Zetterlund 2017).

La polymérisation AFCT du méthacrylate de benzyle dans l'éthanol en utilisant un agent AFCT contenant du méthacrylate de poly(éthylène glycol) méthyléther générait un copolymère amphiphile capable de s'auto-assembler. Dans cette étude des copolymères diblocs amphiphiles poly(PEGMA-b-BzMA) avec des extrémités 2-carbométhyl-2-prope-nyl ont été obtenus. Le poly(PEGMA) était soluble dans le milieu alors que le poly(BzMA) ne l'était pas, ce qui menait à l'auto-assemblage du polymère. L'agent AFCT polymérique (c'est-à-dire le premier bloc) a été préparé par polymérisation dans solution de PEGMA dans du toluène à 80 °C en utilisant de l'acrylate de méthyle-α-(bromométhyle) comme agent AFCT et celle de BzMA a été réalisée dans de l'éthanol à 80 °C en utilisant l'acide 4,4-azobis(4-cyanovalérique) (ACVA) comme initiateur.

Le mélange initialement limpide était devenu turbide, indiquant la formation de particules par auto-assemblage. La morphologie des particules a été observée par TEM, révélant des assemblages sphériques.

Dans le procédé PISA RAFT, le principal paramètre qui dicte la morphologie des particules est le rapport entre les longueurs des blocs lyophiles et lyophobes obtenu en fonction du degré de polymérisation, mais dans cette technique les chaînes gardent une taille constante c'est le nombre de chaînes qui varie. Dans le cas du PISA RAFT, l'auto-assemblage ne se produit donc que lorsque les chaînes ont atteint une longueur suffisante. Dans le PISA AFCT, les conditions sont ajustées de telle sorte que la longueur des chaînes et la quantité greffée soient suffisantes pour que l'auto-assemblage se produise, à condition que la concentration du copolymère séquencé dépasse la concentration critique micellaire (CMC). C'est-à-dire la concentration la plus faible à partir de laquelle le polymère n'est plus soluble et à laquelle des particules commencent à se former (Zhou et al., 2017).

5.2.3 Ring opening polymerization (ROP)

La polymérisation par ouverture de cycle (ROP) est une autre forme de polymérisation par croissance de chaîne. Pour polymériser ces fragments, l'un des cycles de molécules en jeu doit s'ouvrir avant la polymérisation. Dans le processus ROP conventionnel, l'eau doit être rigoureusement exclue, car elle conduirait à l'hydrolyse et à une polymérisation incontrôlée des N-carboxyanhydrides (NCA) utilisés.

Les exemples de PISA utilisant le ROP sont rares. Récemment, le groupe de Jiang *et al.* (2019) a rapporté le premier cas de PISA basé sur le ROP des N-carboxyanhydride de L-phénylalanine (L-Phe NCAs) initié par la méthoxypolyéthylène glycol amine (PEG-NH_2) dans du THF. Avec l'augmentation du degré de polymérisation, la solubilité dans le THF était réduite, entraînant ainsi une séparation de phase. Les morphologies des nano-objets pouvaient être contrôlées en

faisant varier la longueur des blocs hydrophobes formant le noyau. Différentes morphologies de nanoparticules telles que des micelles sphériques et des vésicules ont pu être obtenues (J. Jiang et al., 2019; C. Liu et al., 2020).

5.2.4 Ring opening metathesis polymerization (ROMP)

Différente de la polymérisation radicalaire conventionnelle, la ROMP est une méthodologie non radicalaire permettant d'obtenir une grande variété de morphologies de particules.

En 2012, le groupe de Yoon et al., a rapporté la préparation de nanostructures auto-assemblées directement à partir de copolymères diblocs de polyacétylène (PA), qui ont été synthétisés *via* ROMP de cyclooctatétraène (COT) en utilisant le polynorbornène (PNB) comme macro-initiateur et du (H2IMes) (py)2(Cl)2RuvCHPh (G3) comme catalyseur.

Les morphologies des particules variaient selon la longueur des chaines de PA obtenues. Plus celles-ci étaient longues, plus des chaines (nanocaterpillars) étaient obtenues ; plus elles étaient courtes, plus des sphères étaient obtenue. Le rapport entre les populations de chaînes et de micelles sphériques augmentait avec la quantité de COT. Ceci a été attribué aux fortes interactions π-π des noyaux de PA exposés entre des sphères voisines. Les zones autours de ces noyaux lyophobes tendaient ainsi à être minimisées et les particules formaient alors des chaînes comme il est visible sur la Figure 22 (C. Liu et al., 2020; Yoon et al., 2012).

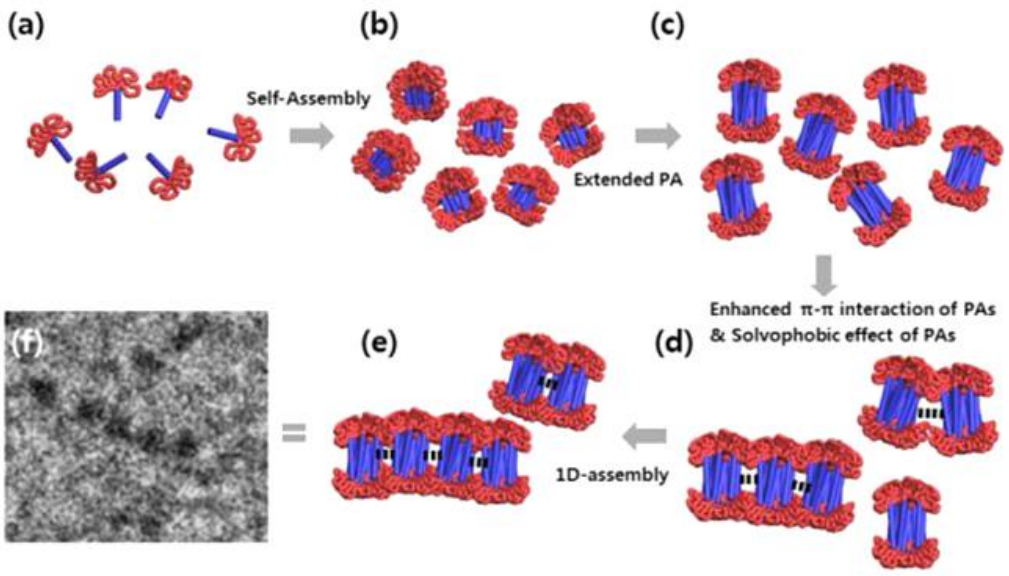


Figure 22 : (a-e) Mécanisme de la formation des chaines de PA par interaction π-π des noyaux et (f) micrographie d'une chaine obtenue (Yoon et al., 2012)

Les méthodes PISA sont donc de bons instruments pour former des particules de morphologies variées (sphères, fibres, chaines, vésicules, etc). Il a été montré dans ce chapitre que les interactions entres les polymères formant ces assemblages sont contrôlables par les paramètres environnementaux tels que le pH ou le solvant utilisé. Néanmoins, il est aussi possible de modifier le polymère en lui-même pour contrôler les interactions induisant l'auto-assemblage dans un milieu donné.

6 Fonctionnalisation chimique

6.1 Modification d'un polymère synthétique

Il est possible de modifier les agents de transfert de chaîne utilisés avec différents composés dans le but de modifier leurs comportements afin d'induire un auto-assemblage. Cette technique est attrayante du fait du contrôle possible de la conformation des objets et de leurs propriétés chimiques et physiques.

Par exemple, Mellot *et al.* (2018) ont rapporté une stratégie reposant sur un agent RAFT fonctionnalisé par une bis-urée. Ici les divers composés synthétisés ont été du poly (N, N-diméthylacrylamide) (PDMAc), poly(acide acrylique) (PAA), polyacrylamide (PAM), et poly(2-(N,N-diméthylamino)éthylacrylate) (PDMAEA) selon différents degrés de polymérisation, fonctionnalisés par une molécule de bis-urée (U_2). Des micrographies par cryo-TEM ont été réalisées sur des suspensions de PDMAc-U_2 dans l'eau et confirmaient la formation spontanée de micelles stables dans le temps et de forme cylindrique. Un spectre RMN a permis d'observer une interaction entre les molécules d'urée ce qui, selon les auteurs montrait que les unités s'auto-assemblaient grâce à des liaisons hydrogène. Il a donc été montré que la fonctionnalisation permettait bien d'induire l'auto-assemblage du PDMAc pour former des micelles cylindriques.

Les autres composés synthétisés ont aussi reçu la capacité de s'auto-assembler dans l'eau sous formes de micelles cylindriques et pour PAM-U_2 de micelles sphériques. Néanmoins, lorsque la taille des chaînes diminuait, PAM-U_2 formait lui aussi des micelles cylindriques. Le PAM était en fait un polymère plutôt hydraté qui possédait des sites disponibles pour les liaisons hydrogène. Ajouter une molécule de bis-urée dans un long PAM semblerait donc diminuer l'importance des interactions des molécules de bis-urée, empêchant l'assemblage sous forme de structures cylindriques. La taille du polymère de même que son hydrophilie impactent donc la

taille et la morphologie des assemblages. Il paraît donc important de choisir un polymère adapté à l'usage souhaité.

Des analyses de titration calorimétrique isotherme (ITC) ont aussi été menées dans l'eau de manière à étudier les paramètres thermodynamiques des assemblages (Figure 23). Les premières injections d'un assemblage dans l'eau montraient des évènements endothermiques correspondant à une dissociation des objets. Plus le nombre d'injections augmentaient, plus la concentration augmentait, jusqu'à dépasser la CAC. A ce moment, les pics correspondant à la dissociation disparaissaient, montrant la stabilité des auto-assemblages à la dilution. Les auteurs ont ainsi pu déterminer une CAC autour de 0,05 mM.

Ici, ce sont donc les groupements de bis urées qui orientent la formation des assemblages *via* des liaisons faibles. Comme expliqué précédemment ces liaisons sont sensibles aux conditions physicochimiques qui les entourent. L'influence du pH sur les micelles a donc été étudiée. L'augmentation du degré d'ionisation induisait un désassemblage pouvant être expliqué par des répulsions électrostatiques. D'autre part, la diminution du degré d'ionisation conduisait quant à lui à une agrégation (Mellot et al., 2018).

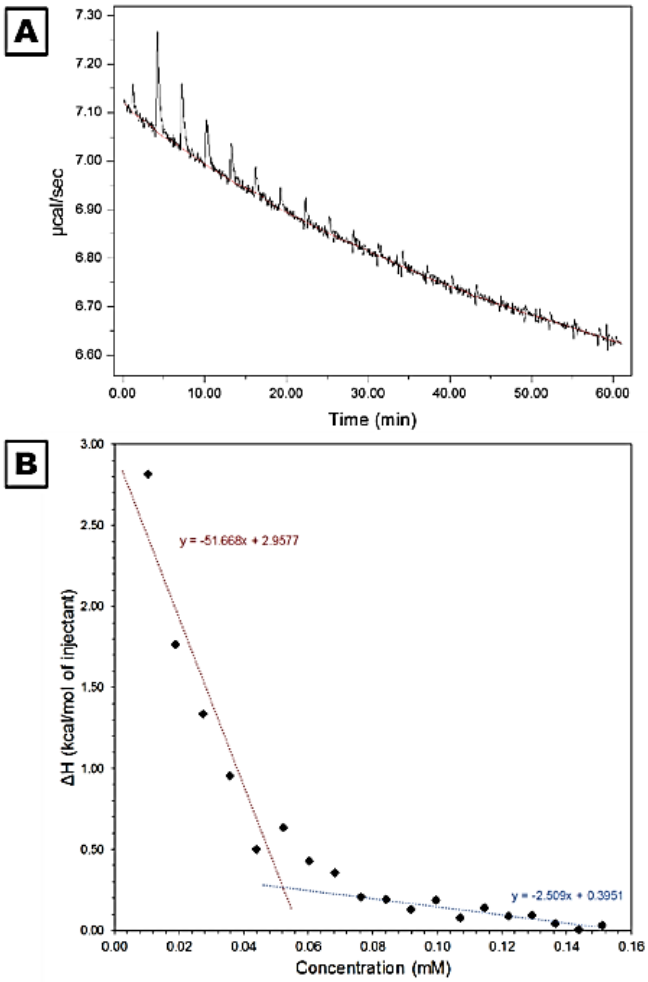


Figure 23 : Dilution aqueuse en ITC d'une solution de PDMAc11-U2 à 25 °C : (A) chaleur produite par l'injection dans l'eau ; (B) variation d'enthalpie correspondant pour la détermination de la CAC (Mellot et al., 2018).

Il est aussi possible d'utiliser de plus grosses molécules telles que des polysaccharides pour induire un assemblage. Ikken *et al*. (2021) ont utilisés la PISA pour préparer des vésicules à partir d'un copolymère greffé à du dextrane : le dextrane-g-poly(méthacrylate de 2-hydroxypropyle) (Dex-g-PHPMA). La croissance des greffons de PHPMA a été réalisée avec du dextrane préalablement modifié par des agents de transfert. Cette modification a été photoinitiée à 405 nm en présence de phénylphosphinate d'éthyle (2, 4, 6-triméthylbenzoyl) (TPO-L) solubilisé dans du DMSO comme photoamorceur et sous azote (Figure 24). Le degré de polymérisation de PHPMA variait entre 100 et 500. La modification a été confirmée par RMN.

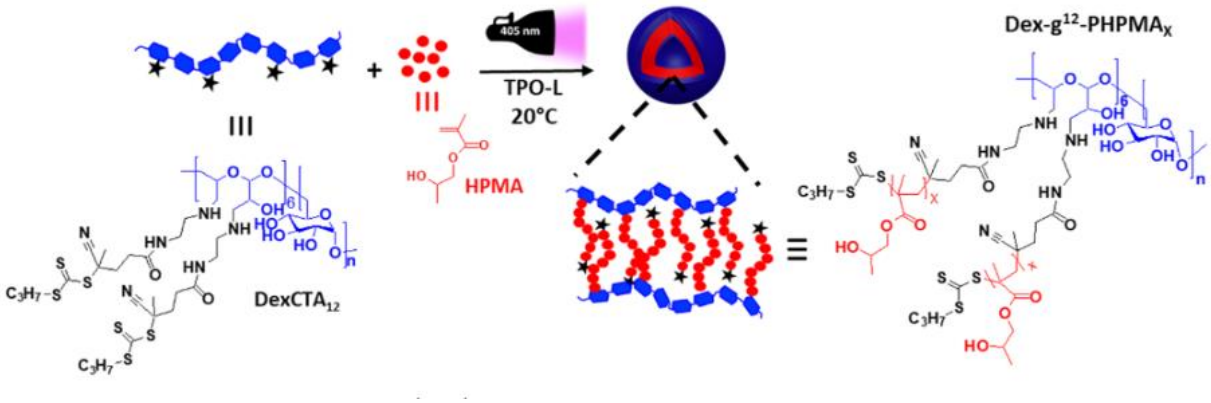


Figure 24 : Vésicules de Dex-g12-PHPMAX via le transfert de chaîne par fragmentation d'addition réversible photomédiée (Photo-RAFT) de HPMA (Irradiation à 405 Nm en présence de TPO-L comme photoinitiateur) à partir d'un agent de transfert de chaîne à base de dextrane (DexCTA12) (Ikkene et al., 2021)

Généralement, l'auto-assemblage de copolymères amphiphiles en une morphologie vésiculaire est plutôt prévisible en fonction de l'augmentation de l'hydrophobie et donc ici du degré de polymérisation. Les auteurs ont donc étudié 3 degrés différents : X = 100 -– 200 - 300. La Figure 25 montre les images TEM de nano-objets formés.

Premièrement, des nano-objets sphériques contenant une membrane claire entourant un compartiment sombre, ont été observés avec Dex-g12-PHPMA100. Les images montrent clairement une morphologie de type vésiculaire avec une membrane hydrophobe de PHPMA renfermant un cœur de phase aqueuse.

L'augmentation du degré de polymérisation induit une augmentation de l'épaisseur de la membrane (Tcryo). En effet, une augmentation a été observée pour les nano-objets X = 200 (Tcryo = 31 ± 4 nm) et X = 300 (Tcryo=40 ± 4 nm), par rapport à X = 100 (Tcryo = 16 ± 2 nm).

Des analyses AFM (Figure 25) ont aussi été réalisées de manière à pouvoir étudier les propriétés mécaniques des vésicules en conditions aqueuses. Toutes les vésicules présentaient une membrane relativement flexible puisque les valeurs du module de Young obtenues étaient inférieures à 2 MPa. De plus, la rigidité augmentait avec la valeur de X, ce qui confirmait l'augmentation de l'épaisseur de la membrane mais aussi de l'hydrophobie. En effet, ce résultat

n'est pas sans rappeler celui obtenu par Aschenbrenner *et al*. (2013) paragraphe 4 sur l'effet ouzo d'un dextrane modifié. Les vésicules de Dex-g12-PHPMAX présentaient une valeur proche de celle des lipides tels que la phosphatidylchloline de jaune d'œuf (2 ± 0,8 MPa) (Ikkene et al., 2021).

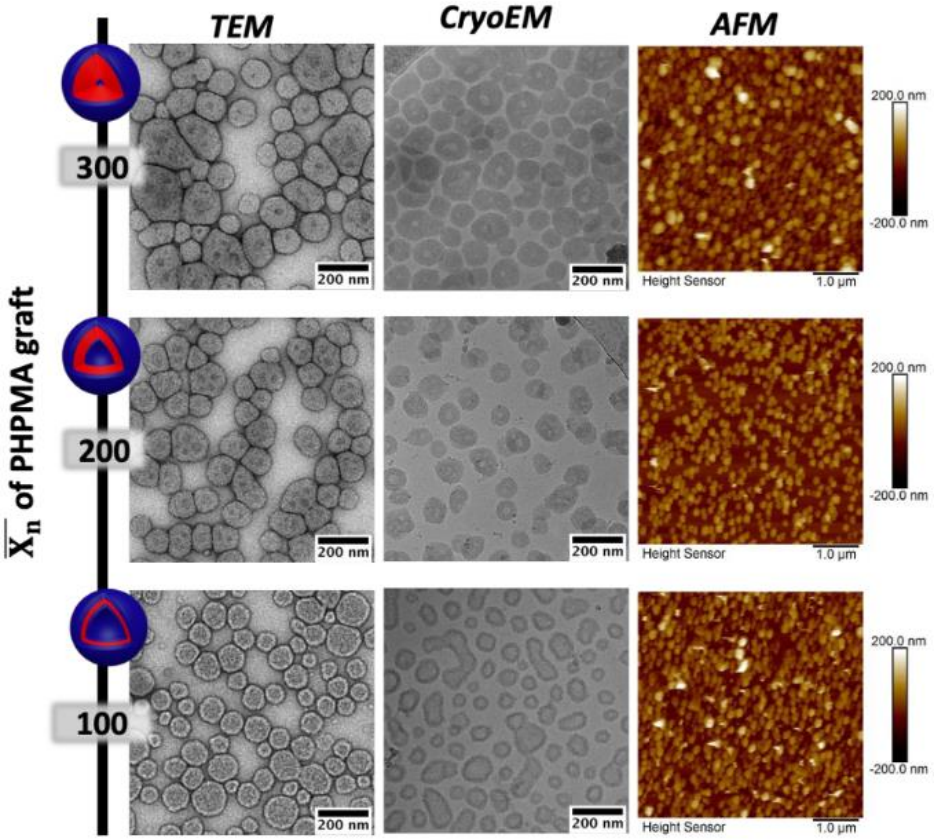


Figure 25 : Micrographies de Dex-g12-PHPMA100 – 200 – 300 par TEM, Cryo-TEM et AFM (Ikkene et al., 2021)

Ces techniques permettent un bon contrôle des polymères formés et donc permettent d'étudier l'influence des structures sur les morphologies. Néanmoins, elles sont souvent longues d'exécution (faisant intervenir plusieurs étapes) et complexes. Il paraît alors plus simple de modifier des polymères natifs en y greffant une simple molécule tout en contrôlant la formation d'objets auto-assemblés.

6.2 Modification d'un polymère induisant un auto-assemblage

6.2.1 Protéines

Certaines protéines sont capables de s'auto-assembler naturellement. Néanmoins, il est possible de les modifier dans le but de changer leurs propriétés ou d'induire leur auto-assemblage pour former des structures données quand cela n'est pas le cas naturellement. Beaucoup d'études utilisent la voie de la recombinaison génétique dans le but d'obtenir ces assemblages.

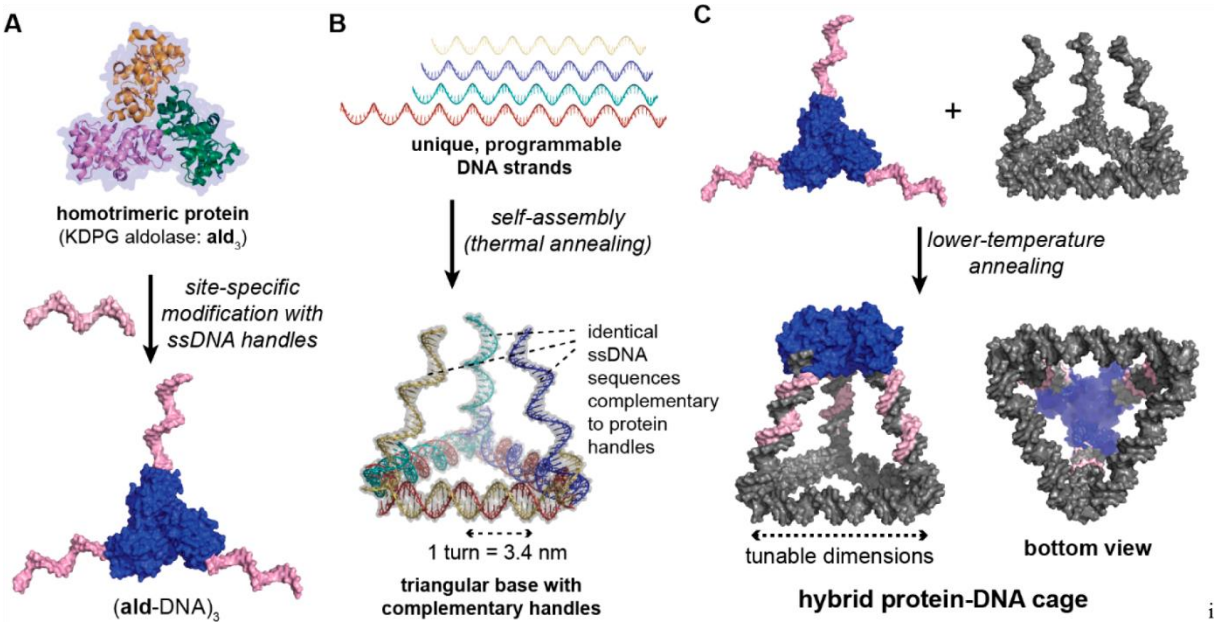


Figure 26 : Cage protéine-ADN. (A) Modification de la protéine aldolase avec des simples brins d'ADNs. (B) Auto-assemblage de quatre brins d'ADN de manière à former une base triangulaire avec trois simples brins complémentaires à ceux sur la protéine. (C) Le conjugué protéine-ADN et la base triangulaire forment une cage. (Y. Xu et al., 2019)

Par exemple, des protéines et de l'ADN ont été utilisés pour former des cages nanométriques grâce à l'utilisation de conjugués covalents protéine-ADN. Une 2-dehydro-3-deoxyphosphoglucona aldolase (KDPG) a été formée avec trois brins d'ADN simple brin par fonctionnalisation des résidus cystéine de la protéine introduit par mutagenèse dirigée. Des cages tétraédriques ont ainsi été obtenues. Les dimensions des objets ont pu être ajustées grâce au nombre de tours des brins d'ADN. Le processus est schématisé dans la Figure 26 (Y. Xu et al., 2019).

Dans une autre étude, la conception d'adhésifs sous-marins a été réalisée en fusionnant des protéines de pied de moule (Mfp) avec les protéines CsgA d'*Escherichia coli via* recombinaison génétique. La fusion de ces deux protéines conférait à cette protéine hybride la capacité de s'auto-assembler. Les domaines adhésifs des Mfp étaient exposés à l'extérieur des noyaux formés par les CsgA. L'auto-assemblage se formait par stratification des feuillets β par empilement latéral de la CsgA (Figure 27). La capacité adhésive est due aux liaisons hydrogène pouvant s'établir entre le support et les assemblages. Ainsi il a été possible de fusionner les propriétés de ces polymères pour obtenir une protéine chimère avec les propriétés recherchées (Zhong et al., 2014).

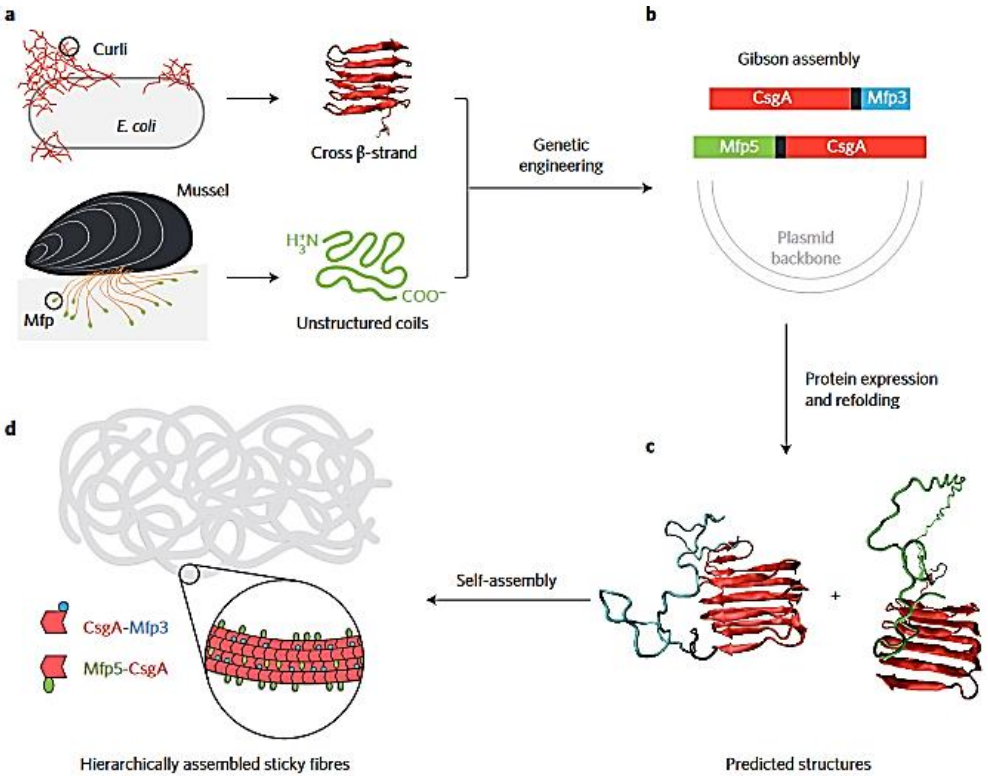


Figure 27 : (a) Schéma de deux protéines adhésives. (b) Conception de la fusion des gènes codant pour les deux protéines indiquées en a. Deux constructions génétiques ont été créées (c) Schéma des structures prédites pour CsgA-Mfp3 et Mfp5-CsgA. (d) En raison des domaines amyloïdes de Mfps, les monomères s'auto-assemblent en fibrilles. (Zhong et al., 2014)

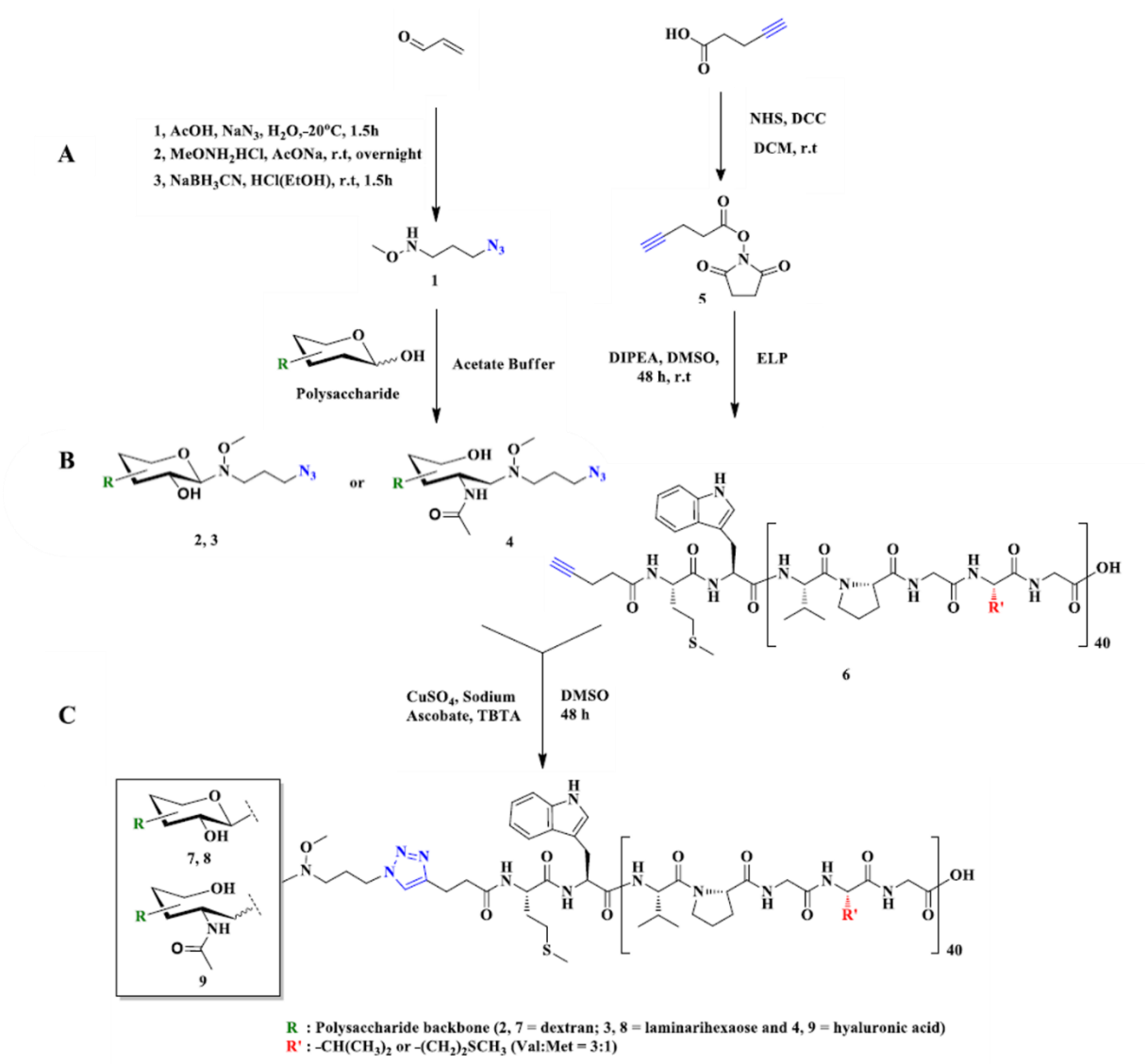


Figure 28 : Synthèse des copolymères de polysaccharide-b-ELP. AcOH : acide acétique ; EtOH : éthanol ; NHS : N-hydroxysuccinimide ; DCM : dichloro-methane ; DIPEA : N,N-Diisopropylethyl-amine ; TBTA : Tris-(benzyltriazolylmethyl)ami (adapté de Xiao et al. 2020)

Une modification par des polysaccharides est aussi possible sans passer par la recombinaison génétique. A titre d'exemple, un couplage chimique entre des polysaccharides et les blocs ELP (Elastin like polypeptide) *via* la cycloaddition azide-alkyne catalysée par le cuivre (I) a été réalisée dans une autre étude. Les trois polysaccharides choisis sont le dextrane (Dex), de l'acide hyaluronique (HA) et un laminarihexaose (Lam) préalablement fonctionnalisés par un groupe azide ou alkyne. La méthode de fonctionnalisation est résumée dans le Figure 28.

Les polymères résultant de cette fonctionnalisation (ainsi que l'ELP) étaient capables de s'auto-assembler en nanoparticules sphériques en solution aqueuse. L'auto-assemblage du polysaccharide-b-ELP était dû à une agrégation des chaînes suivie d'une déshydratation du noyau lorsque la température dépassait un seuil critique : la température de transition spécifique. Pour l'ELP classique, la température de transition était de 32 °C. Elle a été augmentée lorsque l'ELP a été modifié (respectivement 36, 39 et 48 °C pour Lam-b-ELP, Dex-b-ELP et HA-b-ELP) (Figure 29). Plus l'hydrophilie du conjugué était élevée, plus la température de transition était importante, ce comportement étant entièrement réversible (Xiao et al., 2020).

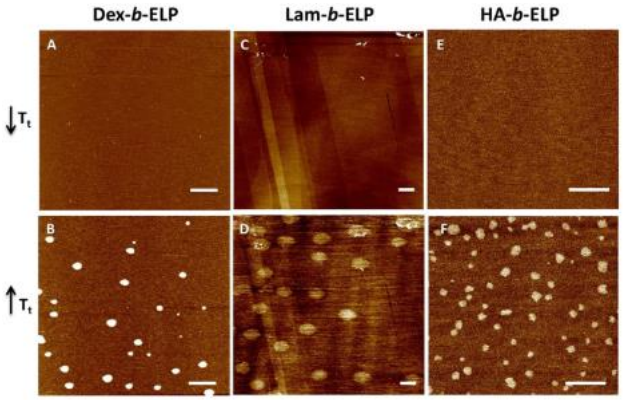


Figure 29 : Micrographies AFM de Dex-b-ELP à (A) 35 °C et (B) 65 °C. Lam-b-ELP à (C) 30 °C et (D) 55 °C. HA-b-ELP à (E) 25 °C et (F) 52 °C. La barre d'échelle indique 1µm. (Xiao et al., 2020)

Les protéines permettent d'obtenir des assemblages de diverses morphologies mais possèdent un point faible : leur immunogénicité. L'administration répétée de protéines, naturelles ou recombinantes, notamment à visée thérapeutique, conduit souvent à la production d'anticorps. L'effet recherché peut alors être perturbé ou neutralisé (De Groot & Scott, 2007). Les polysaccharides, sont aussi des produits biosourcés, biocompatibles mais présentent une faible immunogénicité ce qui les rend particulièrement intéressants (Ikkene et al., 2021; J. Liu et al., 2018).

6.2.2 Polysaccharides

6.2.2.1 Modification via des molécules synthétiques

Les exemples de modification de polysaccharides par des molécules synthétiques sont très nombreux et permettent de former des assemblages bien définis avec différentes morphologies et différentes caractéristiques physicochimiques. Par exemple, la structure et le comportement d'auto-assemblage formés à base d'amidon fonctionnalisé (GS) par de l'acétate de vinyle (Vac) ont été étudiés (L. Chen et al., 2020). Après le greffage, une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a mis en évidence l'apparition d'un pic supplémentaire autour de 1744 cm^{-1} caractéristique d'une liaison ester. Une caractérisation par RMN et une simulation obtenue par des méthodes de mécanique quantique ont montré que le carbone C2 de l'unité glycosidique était le principal site de greffage. Le Vac, une fois greffé, a augmenté l'encombrement stérique entre les chaînes d'amidon et a donc diminué la possibilité de formation de liaisons hydrogène dans le polymère lui-même. Ceci a aussi modifié les propriétés thermiques telles que la Tg (température de transition vitreuse) qui passait d'environ 114,1 °C à 74,5 °C.

La masse molaire du composé était elle aussi plus faible, ce qui semble contre intuitif, mais cette diminution était en fait due à la méthode de fonctionnalisation utilisée. En effet, l'amidon a dû être traité dans des conditions acides ce qui peut induire une dégradation partielle des chaines du polymère. De plus, la stabilité thermique de l'amidon modifié était plus faible.

La modification introduisant des monomères hydrophobes a entraîné une variation des propriétés de surface, provoquant l'apparition d'agrégats auto-assemblés avec une structure cœur-couronne ; l'amidon hydrophile étant à la surface des particules. De plus, les fragments d'amidon étaient reliés entre eux par des liaisons hydrogène et une chaîne formant un pont entre

2 molécules. Une micrographie TEM des particules est présentée en Figure 30 (L. Chen et al., 2020).

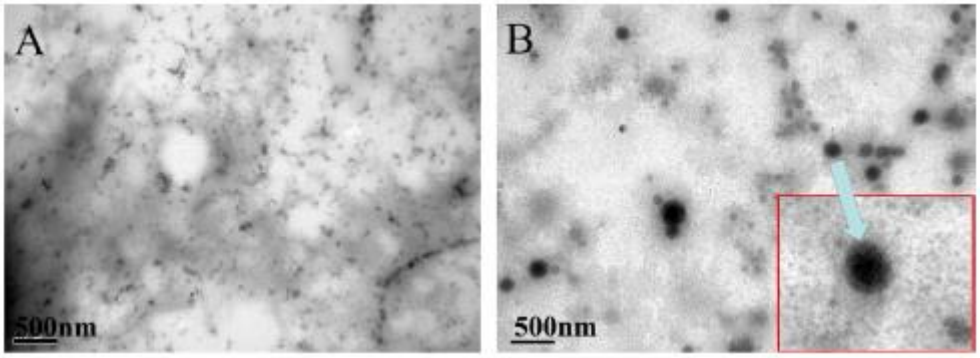


Figure 30 : Micrographies (A) de l'amidon non modifié et (B) d'amidon fonctionnalisé dans l'eau (L. Chen et al., 2020)

Dans un autre article Nishimura et ses collègues (2020) ont formé des polymères de pullulane-g-polypropylène oxyde (PPO). La fonctionnalisation du pullulane a été catalysée par le cuivre entre un PPO à fonction azide et le pullulane modifié par un alcyne.

Lorsque la température dépassait 16 °C, les segments PPO du polymère se déshydrataient ce qui conduisait à la formation de vésicules unilamellaires, d'une masse molaire de $2{,}0.10^{7}$ $g.mol^{-1}$. Puisque la masse molaire du polymère greffé était de $2{,}5.10^{5}$ $g.mol^{-1}$, le nombre moyen d'agrégation calculé était d'environ 80.

A une température légèrement plus faible (13 °C) des précurseurs sont formés sous forme de disques (Figure 31). Au-dessus de la température de transition, les chaînes de PPO étaient déshydratées et hydrophobes, ce qui permettait l'interaction des chaînes de PPO entre elles. Ces chaines s'orientaient alors de manière perpendiculaire au pullulane hydrophile. En revanche, en dessous de la température de transition les chaînes de PPO faiblement déshydratées ne s'orientaient plus perpendiculairement mais s'étalaient en raison des faibles forces de répulsion et d'interaction mises en jeu. Les chaines de PPO étaient donc très proches les unes des autres, ce qui facilitait les interactions intramoléculaires au détriment des interactions intermoléculaires. Cela conduisait dans un premier temps à la formation de disques puis de

vésicules monodisperses. Les auteurs ont aussi montré la formation de vésicules multi lamellaires lorsque la vitesse de chauffe était plus rapide. Le phénomène de formation des objets était totalement réversible. Il a donc été possible de former un assemblage à base de polysaccharides contrôlables par la température (Nishimura et al., 2020).

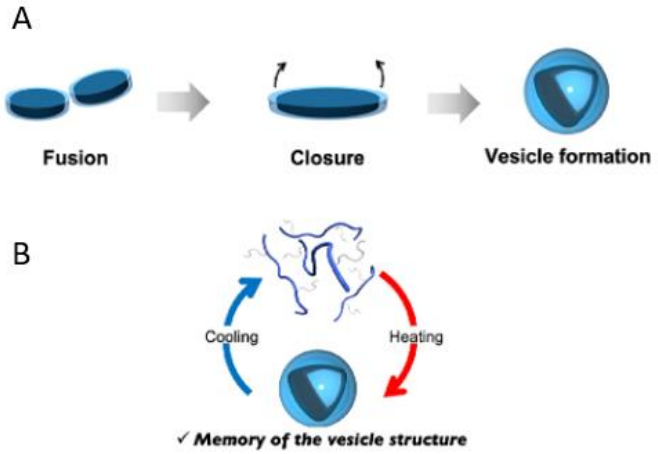


Figure 31 : Schéma de (A) la formation des vésicule à une vitesse de chauffage de 5 $K.min^{-1}$ par la fusion de disques et (B) la réversibilité de la formation – dissolution des vésicules en fonction de la température (adapté de Nishimura et al., 2020)

Il est donc possible d'utiliser les polysaccharides pour former des structures auto-assemblées bien contrôlées avec des caractéristiques intéressantes, par greffage d'un composé d'intérêt. Néanmoins, pour rester dans l'esprit de biocompatibilité des polysaccharides il est bien d'essayer d'éviter au maximum les composés synthétiques. Il convient alors de trouver d'autres composés hydrophobes pouvant modifier le comportement des polymères.

6.2.2.2 Modification via des lipides

Lorsque qu'il est question d'hydrophobie, c'est souvent vers les acides gras que les regards se tournent en premier puisqu'ils sont hydrophobes lorsque leurs chaines sont assez longues. De par ces qualités, ils ont beaucoup été utilisés pour modifier les polysaccharides hydrophiles et amphiphiles.

Par exemple en 2015, Xu et al. (2015) ont formé des globules rouges artificiels en encapsulant l'hémoglobine (Hb) dans de l'amidon fonctionnalisé par un acide gras à longue chaîne. L'amidon a été modifié dans du DMSO en utilisant du persulfate de potassium comme catalyseur. La fonctionnalisation par formation d'une liaison ester a été vérifiée par FTIR (C=O de la liaison ester à 1745 cm^{-1}). Le polymère ainsi modifié s'est assemblé sous forme de nanosphères pouvant encapsuler l'hémoglobine avec une bonne capacité de transport d'oxygène (R. Xu et al., 2015).

Une étude plus récente décrit les effets du greffage de l'acide stéarique (SA) sur le dextrane (D-SA) en présence de N ,N′-diisopropylcarbodiimide (DIC) et de 4-dimethylaminopyridine (DMAP) dans du DMSO (Figure 32 A) (Shaki et al., 2018). Cette réaction avait pour but de former une liaison entre les groupements hydroxyles du dextrane et le carboxyle de l'acide stéarique. Un polymère de dextrane greffé avec du cholestérol (D-Chol) a aussi été synthétisé en présence de triethylamine, DMSO et DMF, de manière à permettre la réaction entre un groupe chloré dans la molécule de cholestérol et un groupe hydroxyle dans le dextrane comme montré dans la Figure 32 B. Cette modification induisait la formation de particules sphériques. La concentration micellaire critique (CMC) a été déterminée par la mesure de la fluorescence du pyrène comme sonde fluorescente hydrophobe. Le rapport de l'intensité d'émission du pic I_{372} nm et du pic I_{391} nm sur un spectre de la suspension de dextrane modifié a permis de définir la CMC. Le rapport de l'intensité était constant pour les faibles concentrations jusqu'à la CMC ou avait lieu une rupture de pente avec l'augmentation de la concentration de dextrane greffé.

Lorsque les concentrations étaient supérieures à la CMC, des micelles étaient formées et le pyrène encapsulé dans le noyau hydrophobe.

La taille ainsi que la CMC des particules formées dépendaient du taux de greffage du SA. Plus la quantité de SA greffée était importante plus la taille diminuait. En effet, dans les polymères amphiphiles synthétisés par RAFT, c'était la taille de la chaine hydrophobe par rapport à la partie hydrophile qui importait le plus, alors que dans les polymères ramifiés, c'est la quantité de molécules hydrophobes greffées au squelette hydrophile qui possédait un impact sur la CMC et sur la taille des particules formées comme pour l'AFCT. Plus le taux de greffage augmentait, plus l'hydrophobie augmentait et donc plus la CMC et la taille diminuaient. La nature du lipide avait aussi entraîné une modification de la taille et de la CMC.

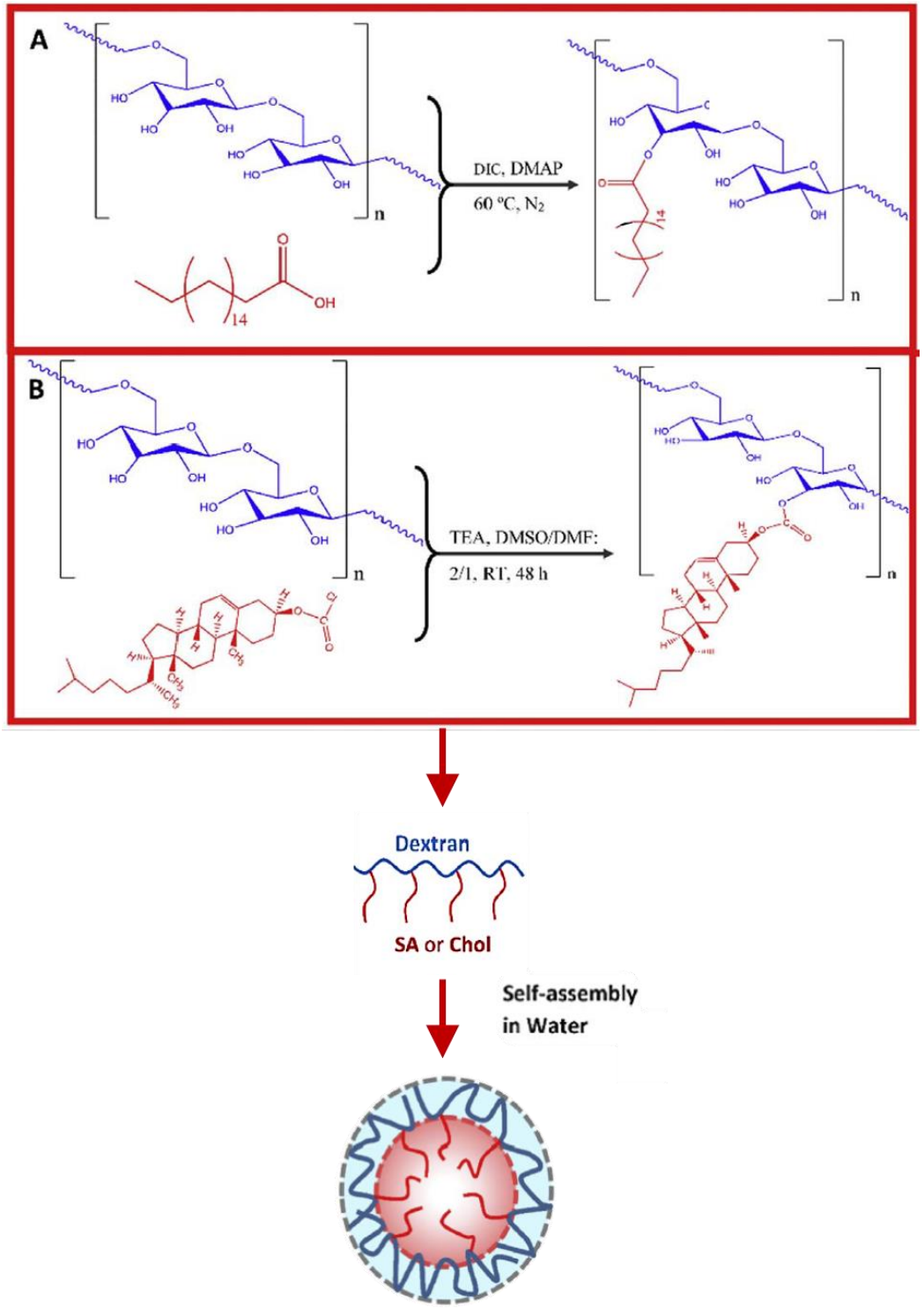


Figure 32 : Schéma de modification du dextrane par (A) acide stéarique et (B) cholestérol. DIC : Cholesteryl chloroformate N,N′-Diisopropylcarbodiimide ; DMAP : 4-dimethylaminopyridine ; TEA : Triethylamine ; DMSO : Dimethyl sulfoxide ; DMF : Dimethylformamide ; RT : room temperature. (adapté de Shaki et al. 2018)

La rapamycine est un médicament hydrophobe avec une faible solubilité en milieu aqueux. Les polymères amphiphiles à base de dextrane ont montré leur capacité à libérer de la rapamycine.

De plus, les polymères synthétisés n'étaient pas toxiques pour la lignée cellulaire (U87 MG) en dessous de 0,3 mg/mL (Shaki et al., 2018).

Les lipides ne sont pas les seuls composés hydrophobes naturels. Il existe une grande variété de molécules pouvant modifier le comportement des polysaccharides vis-à-vis de l'eau. Les phénols en sont un bon exemple. Certains sont très hydrophobes mais possèdent aussi souvent d'autres qualités telles qu'un fort pouvoir antioxydant ou un pouvoir anticancéreux (J. Liu et al., 2018).

6.2.2.3 Modifications via des phénols

Les composés phénoliques sont largement distribués à travers le règne végétal avec plus de 8000 composés différents. La caractéristique structurelle commune des composés phénoliques est un cycle aromatique portant au moins un substituant hydroxyle. Les phénols sont des molécules plutôt hydrophobes très largement étudiées pour les propriétés antioxydantes et parfois anti-tumorales qu'ils peuvent apporter aux polysaccharides en plus de leur conférer une capacité à s'auto-assembler (J. Liu et al., 2018).

Un premier exemple traite de la fonctionnalisation du dextrane par la curcumine en présence de DCC et de DMAP. Le greffage a été confirmé par FTIR. L'intensité du pic -OH à 3250 cm^{-1} a été réduite et un pic correspondant à la liaison C=O à 1737 cm^{-1} (liaison ester) a été détecté. La formation de micelles avec un cœur hydrophobe de curcumine et une enveloppe hydrophile de dextrane résulte de cette modification.

La valeur de la CMC était de 0,469 mg/ml. Cette faible valeur était attribuée au déclenchement de l'auto-assemblage par les interactions hydrophobes entre les molécules de curcumine greffées au dextrane.

Ces objets possédaient une charge globale négative provenant du polysaccharide. Une charge négative est aussi plus avantageuse pour les systèmes de vectorisation car les cellules sanguines

sont elles aussi chargées négativement et les forces répulsives permettent de diminuer les lésions cellulaires et la coagulation. De plus, le greffage au dextrane permet à la curcumine de passer de l'état cristallin à amorphe, ce qui est encore une manière d'augmenter sa biodisponibilité tout en la protégeant de la dégradation à pH physiologique, en la libérant au pH acide des tumeurs (Raveendran et al., 2016). Il a aussi été montré dans une autre étude que les particules de dextrane fonctionnalisées par la curcumine possédaient une bonne capacité à pénétrer spécifiquement dans les cellules cancéreuses sans endommager des cellules saines (Nagahama et al., 2015).

Le chitosane, polysaccharide chargé positivement en dessous d'un pH de 6.3, a, quant à lui, été modifié dans le but de délivrer de l'épigallocatéchine dans l'intestin grêle. La modification du chitosane (CS) par greffage avec de l'acide caféique (CA, CA-g-CS) et de l'acide férulique (FA, FA-g-CS), par conjugaison des groupes amine de CS avec les groupes carboxyle de CA et FA, par l'intermédiaire d'un agent de conjugaison carbodiimide soluble dans l'eau, a donc été réalisé. La fonctionnalisation a été vérifiée par FTIR et RMN. La formation de particules sphériques a été mise en évidence (Figure 33). Ici la quantité de FA fixée au chitosane était plus faible que pour le CA, et comme énoncé précédemment, la quantité de greffon influence la taille des particules. Les particules de FA-g-CS étaient plus petites que les particules de CA-g-CS (Hu et al., 2016).

Ces nanoparticules ont aussi montré une bonne activité antioxydante et une bonne capacité à encapsuler de l'épigallocatéchine. L'intestin grêle est le principal site d'absorption des ingrédients nutraceutiques et des médicaments. Cependant, le CS se dissout dans l'estomac, à cause de l'acidité des sucs gastriques engendrant une forte répulsion entre les groupes amines hautement protonés. Néanmoins, la fixation des phénols a permis de diminuer la quantité d'épigallocatéchine s'échappant de manière très significative. Le greffage d'acides phénoliques sur les groupements amines du CS affaiblissait la répulsion entre ces groupements lorsqu'ils

étaient protonés. De plus, il a été montré qu'au pH de l'intestin les particules permettaient une bonne libération de l'épigallocatéchine (Hu et al., 2016).

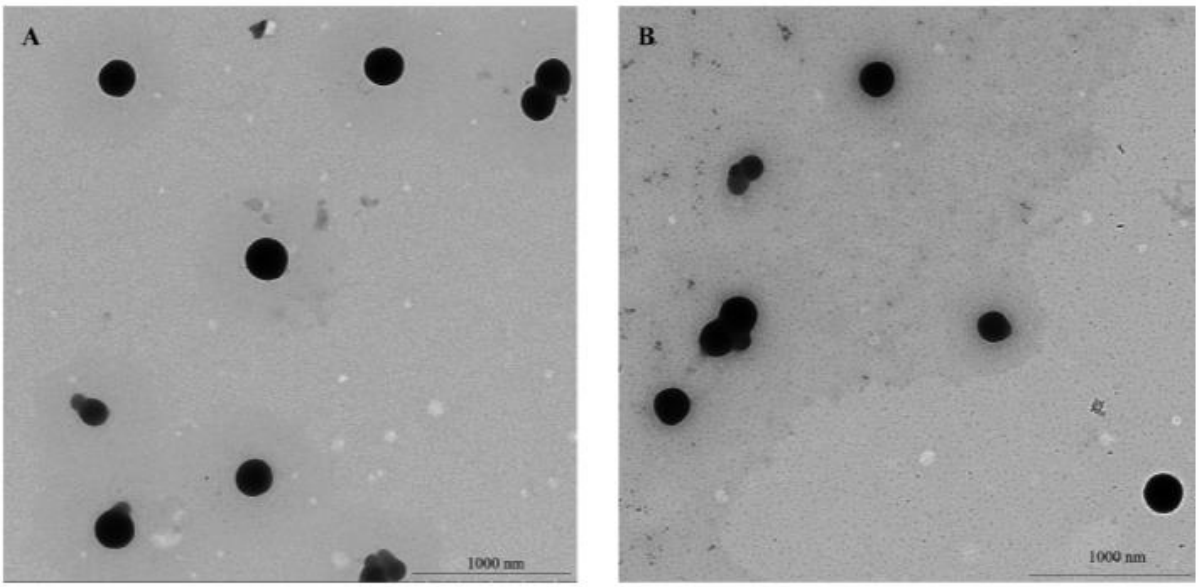


Figure 33 : Micrographies TEM de (A) CA-g-Cs et de (B) FA-g-CS (Hu et al., 2016)

Il est donc possible de fonctionnaliser des polysaccharides par des phénols pour leur donner des propriétés intéressantes telles que celle de s'auto-assembler pour former des particules capables de vectoriser des molécules d'intérêt. Il est aussi possible de former des assemblages présentant directement des propriétés intéressantes comme une bonne activité antioxydante ou anti cancéreuse.

Ces procédés chimiques conduisent généralement à des rendements de conversion élevés mais possèdent un défaut majeur : la toxicité des réactifs utilisés. De plus, ces réactions ne sont pas sélectives vis-à-vis des réactifs. Une volonté de se diriger vers une chimie verte a conduit à des procédés plus respectueux de l'environnement comme le génie enzymatique. De plus, il s'agit de procédés sélectifs vis-à-vis du substrat et pouvant être réalisés dans des conditions douces. Ils sont aussi moins susceptibles de produire des sous-produits indésirables (Karaki, Aljawish, Humeau, et al., 2016).

7 Modifications enzymatiques de polysaccharides

L'intérêt d'une fonctionnalisation plus douce *via* une réaction enzymatique est de plus en plus envisagé par les scientifiques, même si les exemples appliqués à la formation d'auto-assemblage sont encore peu nombreux. Une lipase a été utilisée pour la trans estérification du dextrane avec du laurate de vinyle (Dex-L) (Figure 34 A) (Kraisomdet et al., 2020). Bien que l'utilisation d'une lipase fasse appel à l'utilisation de solvants organiques tels que le DMSO, cette étude constitue néanmoins un exemple de modification enzymatique d'un polysaccharide. L'usage d'une lipase ne permet donc pas d'éviter la présence de solvants mais démontre la faisabilité de la modification par voie enzymatique pour induire un auto-assemblage. En effet, après un changement de solvant vers l'eau, des particules sphériques de 211 nm et d'un indice de polydispersité de 0,205 ont été obtenues (Figure 34 B, C). La fonctionnalisation a été confirmée par RMN.

Une taille plus faible avait été obtenue pour les concentrations les plus élevées. Ceci était expliqué par la présence de Dex-L avec un faible degré de substitution du laurate de vinyle. Ce dernier avait une capacité à diminuer la tension interfaciale plus importante de le Dex-L fortement substitué. Ainsi, l'augmentation de la concentration de Dex-L apportait une plus grande quantité de Dex-L faiblement substitué, ce qui entravait la fusion des noyaux en formation lors du changement de solvant (cf. chapitre 4. Effet ouzo (déplacement de solvant)).

Les auteurs ont montré que les particules pouvaient encapsuler des hydrolysats protéiques tout en restant stables pendant 8 semaines, et possédaient une toxicité négligeable sur les cellules du tractus digestif (Kraisomdet et al., 2020).

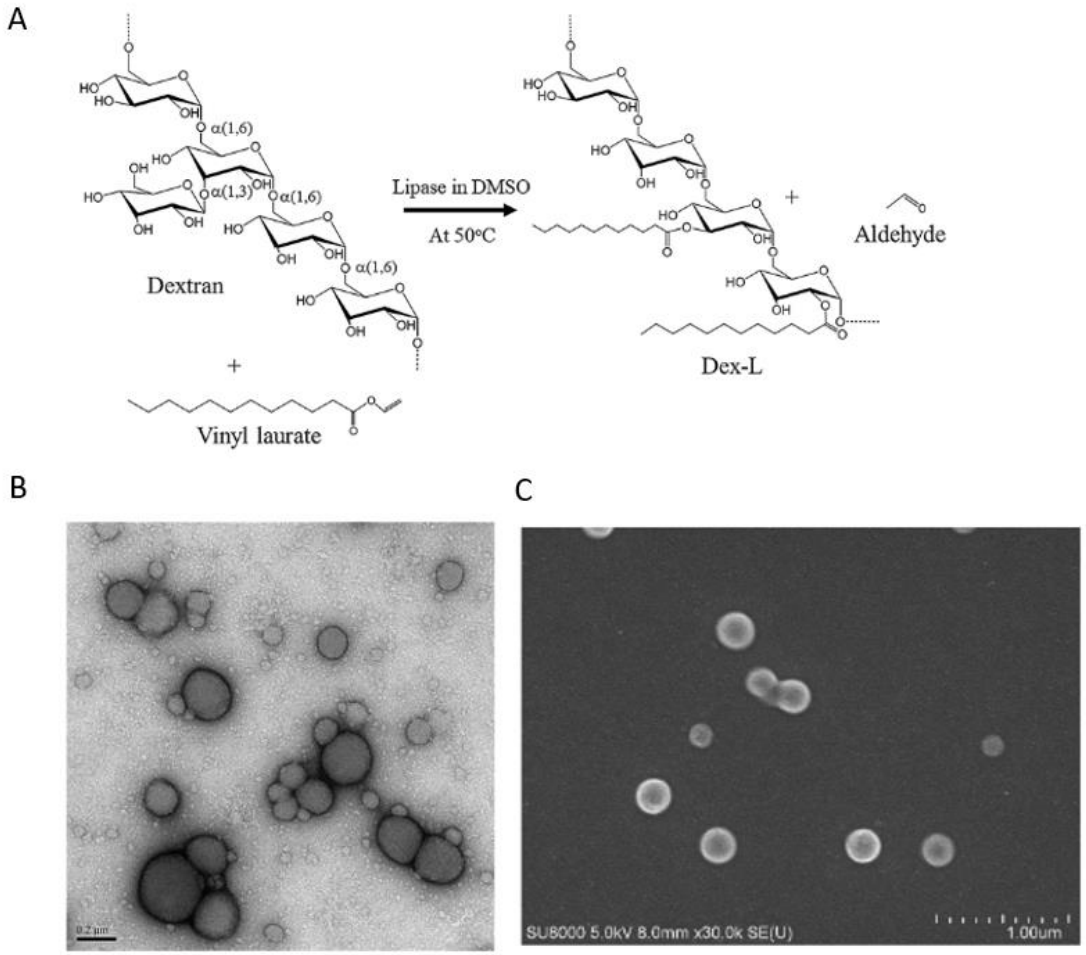


Figure 34 : (A) réaction de trans estérification du dextrane ; (B) Micrographie TEM et (C) SEM des assemblages obtenus après déplacement du solvant vers l'eau. (adapté de Kraisomdet et al., 2020)

Une autre étude a traité de la modification enzymatique pour induire un auto-assemblage du dextrane modifié par de la curcumine (DC). La réaction a eu lieu *via* une laccase utilisant l'oxygène environnant pour induire le greffage de produits d'oxydation sur le polysaccharide (Figure 35 A) (Curcio et al., 2019). Les laccases catalysent une réaction d'oxydation d'ortho ou para – diphénols menant à la formation de quinones (Aljawish et al., 2015).

La laccase a permis le greffage de produits d'oxydation de la curcumine sur le dextrane pour permettre la formation d'auto-assemblages dans l'eau (Figure 35 C). En effet le greffage de curcumine augmente l'hydrophobie du polymère et permet la formation de particules sphériques d'environ 290 nm avec une distribution de taille étroite et une CAC à 0,31 $\mu g.mL^{-1}$. Une CAC faible permet d'imaginer un usage potentiel pour une administration systémique,

car les particules résistent bien à la dilution. De plus, les assemblages formés présentaient une activité antioxydante identique à celle de la curcumine, malgré l'usage de la laccase.

L'effet anti-cancéreux des assemblages a ensuite été testé sur des cellules MCF-7 du cancer du sein. La cytotoxicité avait augmenté par rapport à la curcumine libre. L'EC50 des particules était diminuée. Ceci était dû à la présence du polysaccharide qui permettait une entrée rapide dans les cellules (Figure 35 B). En effet, sur l'image obtenue par microscopie confocale il est possible d'observer que seul DC était capable de pénétrer dans les cellules (visible grâce à la présence de fluorescence).

L'assemblage possédait aussi la capacité d'encapsuler du méthotrexate. Cela conférait aux particules un fort pouvoir anti-cancéreux puisque le dextrane-curcumine et le méthotrexate possédaient une sorte de synergie immédiate. En revanche, lorsque les cellules cancéreuses étaient traitées avec de la curcumine et du méthotrexate libres, pendant 24 h, des effets antagonistes étaient observés, devenant synergiques seulement après 48 h d'incubation (Curcio et al., 2019).

Il faut souligner que la réaction de greffage de la curcumine sur le dextrane a eu lieu dans un mélange 50 : 50 eau DMSO de manière à solubiliser la curcumine. D'autres modifications ont pu être faites sur les polysaccharides dans un milieu essentiellement aqueux (tampon phosphate) ou comprenant une faible quantité de méthanol (Aljawish et al., 2015; Božič et al., 2012a, 2012b; Karaki, Aljawish, Muniglia, et al., 2016; Karaki et al., 2017; Vuillemin et al., 2020). Il serait ainsi possible de diminuer la quantité de solvant utilisé, puisque les laccases sont actives dans un milieu aqueux, ou de remplacer les solvants par une molécule moins nocive, telle que l'éthanol, qui solubilise bon nombre de phénol et notamment la curcumine. La fonctionnalisation enzymatique paraît alors être un bon moyen de tendre vers une « fonctionnalisation verte » c'est-à-dire sans usage de produits toxiques pour l'Homme ou pour l'environnement. Il s'agit d'un procédé méritant plus d'attention.

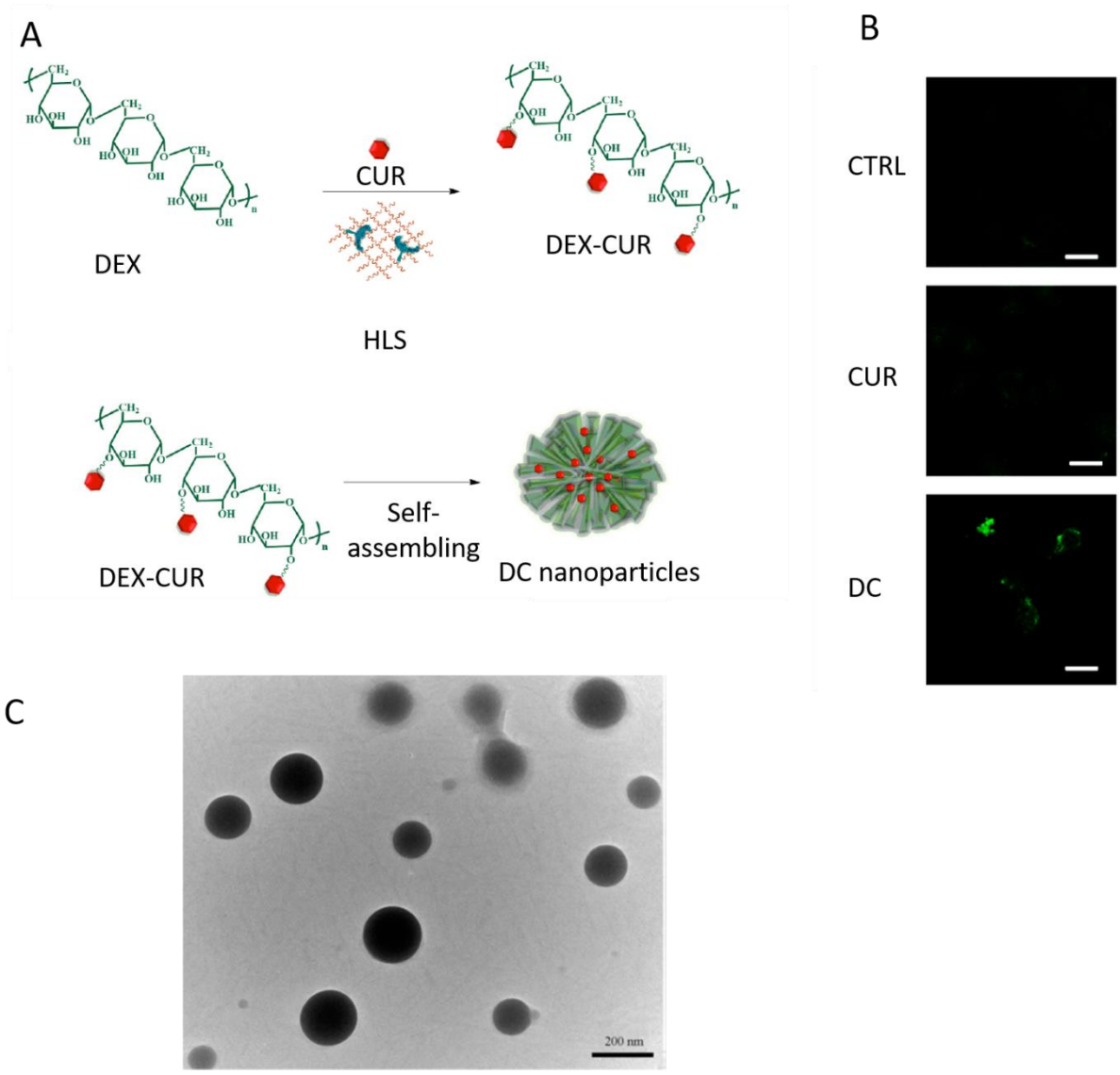


Figure 35 : (A) fonctionnalisation du dextrane (DEX) par la curcumine (CUR) par l'intermédiaire d'une laccase immobilisée (HLS) pour former de structures auto-assemblées (DC), HLS : immobilized laccase. (B) Micrographies confocale des cellules MCF-7 du cancer du sein exposé à de la curcumine (CUR) et des particules de dextrane modifié (DC). Le contrôle (CTRL) correspond aux cellules seules. Les barres d'échelle sont de 20 µm. (C) Micrographie TEM des particules de DC. La barre d'échelle est de 200nm (adapté de Curcio et al., 2019).

8 Système étudié

Toutes les stratégies abordées précédemment possèdent des avantages et des inconvénients. Tous les points positifs et négatifs sont résumés dans le Tableau 1. La PISA par exemple est une technique permettant de former des polymères bien connus et d'en contrôler les propriétés. Néanmoins, elle nécessite souvent d'utiliser des conditions peu respectueuses de l'environnement et potentiellement dangereuses pour le manipulateur (utilisation de produits toxiques, température élevée…). Il en va de même pour la fonctionnalisation chimique. Une alternative intéressante est donc la fonctionnalisation enzymatique, comme expliqué précédemment. Elle permet de diminuer la quantité de solvants toxiques utilisés puisque les réactions peuvent se produire en milieux aqueux.

Les polysaccharides sont des espèces nucléophiles tout à fait intéressantes pouvant être fonctionnalisées par l'intermédiaire d'une réaction catalysée par une laccase. Il s'agit de polymères glucidiques hydrophiles déjà très largement utilisés dans la structuration et la stabilisation des systèmes alimentaires grâce à leurs propriétés émulsifiantes, gélifiantes, et épaississantes. Ils possèdent en plus de nombreux avantages. Ils sont biosourcés et possèdent des qualités comme la biocompatibilité, leur biodégradabilité, leur faible immunogénicité et leur grande abondance. Outre leurs propriétés fonctionnelles, certains polysaccharides possèdent également des propriétés telles que des effets antioxydants, antimicrobiens ou antitumoraux (Ikkene et al., 2021; J. Liu et al., 2018). Ce sont donc des candidats idéaux pour obtenir un processus global plus vert.

De plus, au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), divers études ont été réalisées sur la fonctionnalisation enzymatique par la laccase de différents polysaccharides tels que le chitosane, la pectine et la gomme d'Acacia (Aljawish et al., 2012, 2016; Karaki, Aljawish, Muniglia, et al., 2016; Karaki et al., 2017; Vuillemin et al., 2019, 2020, 2021). Parmi tous les

polysaccharides, le choix de l'étude c'est porté sur la gomme d'Acacia. En effet, certaines fractions de ce polysaccharide auraient déjà, une capacité à s'auto-assembler (Renard et al., 2012). De plus, il s'agit d'un polysaccharide amphiphile. La modification de sa balance hydrophilie/hydrophobie pourrait donc lui permettre de s'auto-assembler dans l'eau à des concentrations bien plus faibles. Par ailleurs, la modification de ce polysaccharide par voie enzymatique a déjà été validé au laboratoire par les produits d'oxydation de l'acide férulique (Vuillemin et al., 2019, 2020). Il a été montré que plusieurs produits d'oxydation avaient été formés pouvant se greffer sur la gomme d'Acacia. Néanmoins, cette modification ne menait pas à un auto-assemblage de la gomme d'Acacia seule. Des interactions avec un autre polymère (chitosane) fonctionnalisé était nécessaire.

Cependant, un dimère de l'acide férulique, la curcumine, a montré que son greffage par voie enzymatique pouvait induire un auto-assemblage sur le dextrane. Il existe aussi une publication montrant qu'il est possible de greffer chimiquement de la curcumine sur la gomme d'Acacia et que cette modification peut induire un auto-assemblage (Figure 36).

Le greffage s'est fait par l'activation des groupes d'acides carboxyliques de GA dans du DMSO, en présence de dimethylamino pyridine et de N,N'dicyclohexyl carbodiimide. Les nanoparticules formées possédaient une charge globale négative. Cette charge permettait un effet anti-agrégation par répulsion électrostatique. Selon les auteurs, l'extérieur des particules serait composé de GA hydrophile et le cœur de curcumine hydrophobe. La CMC de GA-Cur serait aux alentours de 0,023 $g.L^{-1}$ (Sarika et al., 2015).

C'est donc la curcumine qui a été choisie comme phénol pour modifier la gomme d'Acacia par voie enzymatique dans le but d'induire un auto-assemblage en condition aqueuse. Les informations concernant ces trois produits seront détaillées dans les chapitres suivants.

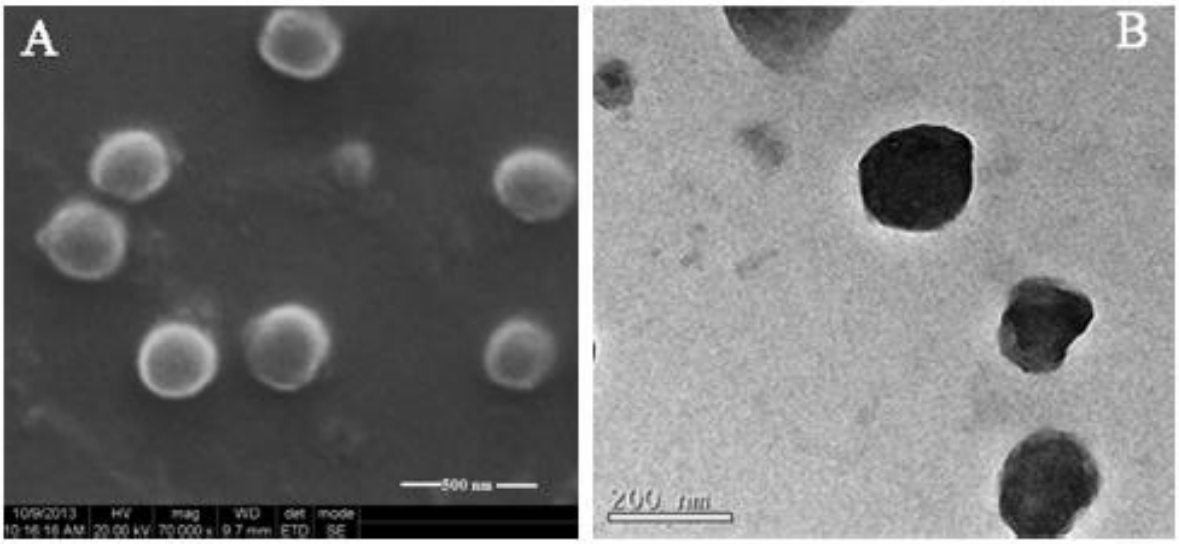


Figure 36 : Micrographies (A) SEM et (B) TEM de GA-Cur (Sarika et al., 2015)

Tableau 1 : Récapitulatif des points positifs et négatifs des différentes techniques abordées dans le chapitre Bibliographie

	Méthode	Points positifs	Points négatifs	Références
PISA	RAFT	● Versatilité des morphologies formées en fonction du polymère et du solvant utilisé ● Impact du pH sur la structure des particules	● Conditions contraignantes : utilisation de solvants (acétonitrile et diethyl ether) et de température élevée durant des long temps de réaction ● Un solvant non approprié peut conduire à la formation d'objets polydisperses	Dao et al., 2020 ; Zhu et al. 2013
	ATRP	● Possibilité de contrôler la vitesse de réaction en fonction de la température	● Utilisation de produits bromés et de cuivre formant des composés toxiques et de fortes températures	Wang et al., 2019
	AFCT	● Possibilité de faire varier le nombre de chaînes greffées ● Formation de particules sans soufre (contrairement à la plupart des agents RAFT)	● Nécessite que la longueur des chaînes soit suffisantes pour que l'auto-assemblage se produise ● Utilisation de températures élevées et de composés toxiques	Zhou, Kuchel and Zetterlund, 2017
	ROMP	● Obtention d'une morphologie atypique en chaînette	● Utilisation de composés toxiques	Yoon et al., 2012

	Méthode	Points positifs	Points négatifs	Références
Modification Chimique	Modification d'un composé synthétique	● Versatilité des morphologies en fonction de l'hydrophobie	● Plusieurs étapes de modification sont nécessaires ● Conditions contraignantes : utilisation de composés toxiques et de températures élevées ● Plusieurs étapes de modification sont nécessaires	Mellot et al., 2018 ; Ikkene et al., 2021
	Modification de protéines	●Possibilité de formation d'une structure totalement définie ● Possibilité de fusionner deux protéines avec différentes propriétés recherchées ● Possibilité de modifier le comportement thermique	● Nécessite souvent de passer par la recombinaison génétique ou par l'utilisation de composés toxiques	Xu et al., 2019 ; Zhong et al., 2014
	Modification de polysaccharide	● Immunogénicité et faible toxicité des polysaccharides ● Possibilité de modifier le comportement thermique ● Possibilité de contrôler la taille et la CMC des assemblages en fonction du greffage effectué ● Possibilité de vectoriser un composé hydrophobe ● Répulsion entre les assemblages dû à la charge globale évitant l'agrégation	● Dégradation partielle des chaines du polymère dû aux conditions expérimentales et utilisation de composés toxiques	Chen et al., 2020 ; Shaki et al., 2018

	Méthode	Points positifs	Points négatifs	Références
Modification enzymatique	Modification de polysaccharides	● Possibilité de modifier des polysaccharides pour induire un auto-assemblage ● Faible immunogénicité et faible toxicité des polysaccharides	● Nécessité de réaliser la réaction dans un milieu organique avec un lipase ● Réaction moins contrôlée	Kraisomdet et al., 2020 ; Curcio et al., 2019
		● Peu d'articles recensés		
		● Possibilité de vectoriser des molécules hydrophobes d'intérêt ● Les laccases peuvent réagir en milieux aqueux ● Répulsion entre les assemblages dû à la charge globale évitant l'agrégation		

8.1 Gomme d'Acacia

La gomme d'acacia ou autrement dit, gomme arabique (GA), est un polysaccharide complexe définit comme étant l'exsudat séché à l'air des branches et des troncs d'*Acacia senegal* ou de proches parents comme l'*Acacia seyal* (Figure 37). Ce sont les deux espèces dont la gomme est la plus commercialisée (McNamee, O'Riordan, et O'Sullivan 1998). La GA est récoltée dans les régions arides d'Afrique subsahariennes ainsi qu'au Pakistan et en Inde.

Figure 37 : Photographie de gomme d'acacia (inavea pure acacia, Nexira France.)

8.1.1 Usages

Elle est utilisée depuis l'âge de pierre comme un aliment. Son usage c'est diversifié dans l'antiquité où elle a été utilisée dans les encres, les peintures, et même dans les linges enveloppant les momies. Aujourd'hui, elle est très couramment utilisée, notamment en agroalimentaire, comme ingrédient sous le code E414 dans la législation européenne (Mortensen et al., 2017).

La GA est utilisée comme agent stabilisant, agent d'enrobage ou émulsifiant, car elle est relativement hydrophile, mais possède tout de même un caractère amphiphile qui lui permet d'augmenter la stabilité des émulsions. Elle est utilisée dans la fabrication de friandises telles que les dragées ou les guimauves, mais aussi dans celle du papier gommé ou des peintures (McNamee et al., 1998; Sanchez et al., 2018).

8.1.2 Structure

Il s'agit d'un polysaccharide riche en sels de calcium, de magnésium et de potassium, et composé pour la plus grande partie de D-galactose, de L-arabinose, de L-rhamnose, d'acide D-glucuronique, et d'acide 4-O-Methyl-β-D-glucuronique, mais aussi d'une plus petite partie protéique (1,5-2,4 %). Sa composition peut varier selon les espèces, la localisation des arbres ou l'âge de la plante.

Sa structure est de manière générale composée de β-D-galactopyranose reliés entre eux par des liaisons 1-3. Il s'agit d'un polysaccharide ramifié dont les chaînes latérales sont composées d'α-L-arabinofuranose et d'α-L-rhamnopyranose liés entre eux par des liaisons 1-3 et reliés aux β-D-galactopyranose en 1-6. Ces chaines latérales se terminent par une unité de rhamnopyranose, liée soit à du β-D-glucuronopyranose, soit à du 4-O-Methyl-β-D-glucuronopyranose. Sa composition influe évidemment sur ses caractéristiques, comme sa charge (principalement due aux acides glucuroniques) ou sa solubilité.

En ce qui concerne les parties protéiques, les chaînes osidiques y sont reliées par des liaisons covalentes dans des domaines riches en sérines et en hydroxyprolines. La proportion en protéines varie selon les espèces. Par exemple, une gomme d'*Acacia senegal* est plus riche en protéines qu'une gomme d'*Acacia seyal* (1,9 % contre 0,9 % de protéines). Les résidus les plus abondants sont dans l'ordre : l'hydroxyproline, la serine, la leucine et la proline. Ils représentent 55 % des acides aminés quelle que soit la variété, mais il existe des différences inter-espèces dans ces proportions. (Lopez-Torrez et al. 2015).

Il est important de noter que la GA est un mélange complexe. Elle est en effet, composée de 3 fractions différentes de par leur taille et leur proportion de protéines. Parmi ces trois fractions il existe encore différentes populations. Par exemple, il existe deux populations dans la fraction arabinogalactane peptide (Atgié, 2018).

8.1.2.1 Fraction Arabinogalactane-Peptides (AG)

La fraction arabinogalactane-peptides (AG) représente 85-90 % de la gomme d'acacia et possède une masse moléculaire d'environ $2{,}8.10^5$ $g.mol^{-1}$. Elle ne contient que des traces de peptides. Sa structure a été modélisée par D. Renard et C Sanchez (2008) sous forme d'un ellipsoïde oblate comme il est montré dans la Figure 38 et la Figure 39 avec une structure interne semblant ramifiée. Elle mesurerait environ 20 nm de diamètre pour une épaisseur de moins de 2 nm.

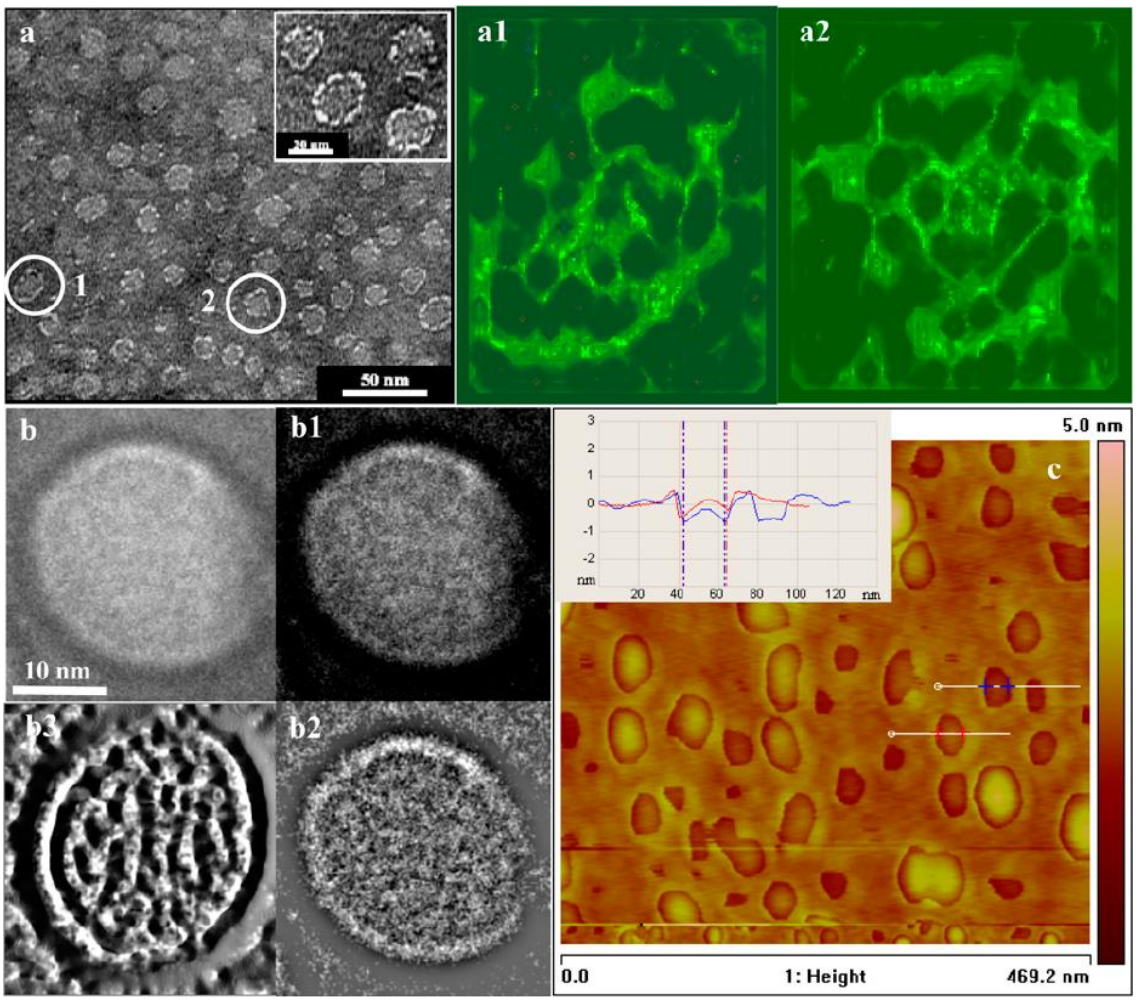


Figure 38 : (a) Micrographie TEM de la fraction AG de la gomme d'acacia ; (Insert) agrandissement d'une partie de la micrographie a ; (a1, a2) AG isolés de la micrographie TEM (cercles 1 et 2) mais colorés via le logiciel ImageJ ; (b) micrographie Cryo-TEM d'AG (b1) micrographie identique à b après application de la variation de contraste puis (b2) filtrage FFT et (b3) traitement à l'aide du logiciel ImageJ ; (c) micrographie AFM d'AG ; (Insert) Dimensions des deux macromolécules barrées. (Sanchez et al., 2008)

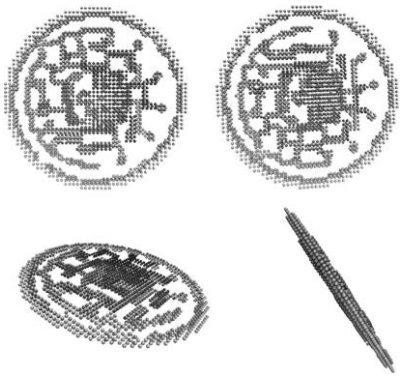


Figure 39 : Schématisation de la structure d'un AG de gomme d'acacia (Sanchez et al., 2008)

8.1.2.2 Fraction Arabinogalactane- protéines (AGP)

La fraction arabinogalactane-protéines (AGP) est le composant responsable de la capacité de la gomme arabique à stabiliser les émulsions du fait de la présence de protéines (12 % environ). C'est donc la partie valorisée à ce jour, alors qu'elle ne représente pourtant que 10 % de la masse du polysaccharide total. Sa masse moléculaire est comprise entre 10^6 et 4.10^6 $g.mol^{-1}$ (Gashua et al., 2016; Renard et al., 2012). Le premier modèle de la fraction AGP a été appelé modèle Wattle Blossom. Il représentait la structure de la GA avec un squelette linéaire ramifié par des unités glucidiques, comme montré dans la Figure 40 A. Environ 5 domaines polysaccharidiques auraient été liés à un squelette d'acides aminés. (Fincher et al., 1983) Ce modèle a été remis en question en 2005 par Renard qui a proposé un modèle en ellipse (Figure 40 B) (Renard et al., 2005). Un autre modèle a vu le jour en 2012, mettant en évidence deux types de conformations (Figure 41) :

- Une population de faible masse molaire avec une ramification à longue chaîne, une conformation compacte
- Une population de masse molaire élevée avec des chaînes courtes et une conformation allongée.

Les conformations iraient de la forme globulaire à la forme allongée selon la taille des chaînes polysaccharidiques. Des images TEM ont pu mettre au jour des particules uniques, avec une forme sphéroïdale plus ou moins anisotrope, et des structures agrégées, avec une forme plus

allongée. Une caractéristique de toutes les morphologies était la présence d'une structure externe plus ou moins anisotrope et d'un réseau interne poreux. Des observations d'AGP assemblées ont aussi été réalisées (Renard et al., 2012).

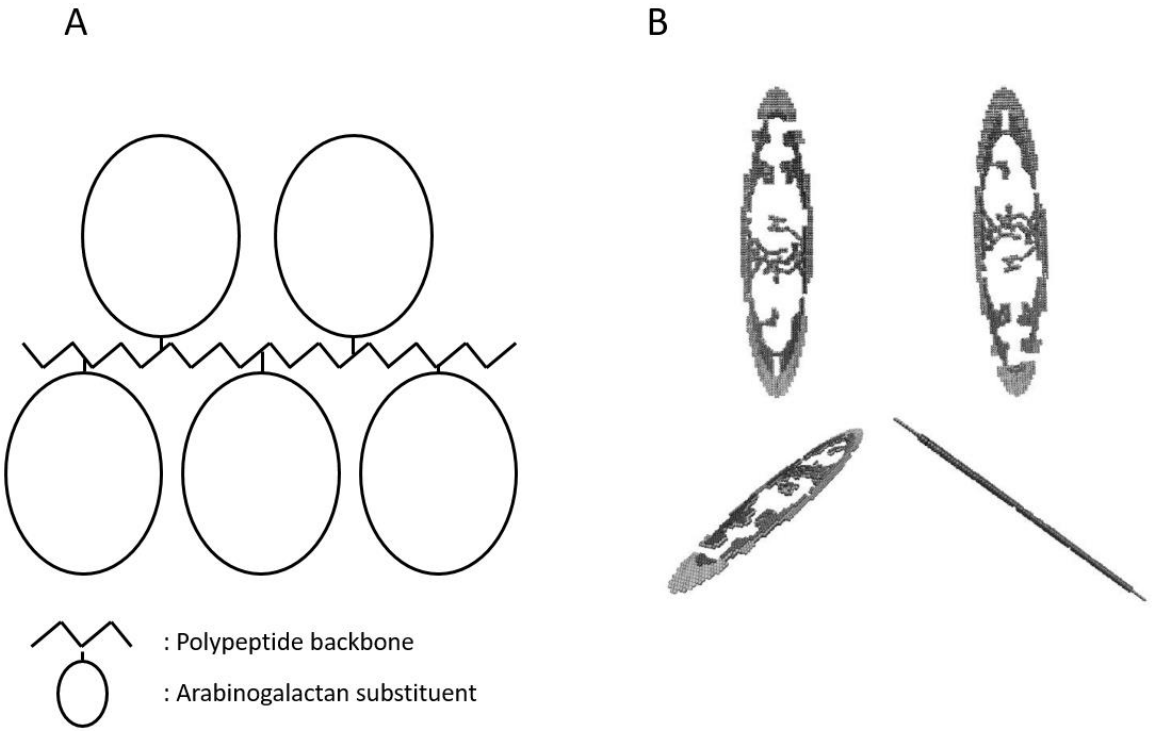


Figure 40 : Fraction AGP de la gomme d'acacia (A) Modèle Wattle Blossom (adapté de Fincher, Stone and Clarke, 1983) et (B) modèle de Renard (Renard et al., 2005)

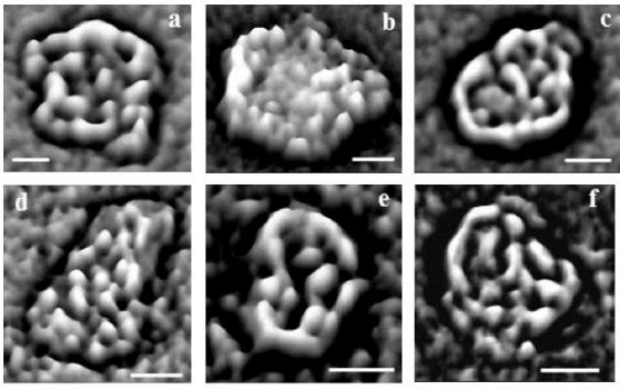


Figure 41 : Micrographies TEM d'AGP avec contraste d'image modifié filtrées à l'aide d'un filtre FFT puis d'ImageJ et Surface Plot. Toutes les barres d'échelle indiquent 20 nm.(Renard et al., 2012)

8.1.2.3 Fraction Glycoprotéine (GP)

La fraction glycoprotéine (GP) représente 2 % de la gomme et contient le taux de protéine le plus élevé (entre 25 et 40 %). Cette fraction est composée de plusieurs glycoprotéines de poids moléculaire compris entre $2{,}5.10^5$ et $2{,}6.10^6$ g/mol. Il s'agirait d'un assemblage de modules de glycoprotéines en anneau dû à des sous-unités hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactane (AG). En effet, la structure secondaire de ces molécules contient beaucoup de feuillets β et de coudes et plus faiblement des polyprolines II et des hélices.

En solution, la GP serait donc un mélange de monomères sphéroïdaux et d'oligomères plus anisotropes. La conformation de la GP analysée par SAXS (small Angle X-rays Scattering) a montré la présence de petits objets avec une morphologie ellipsoïdale triaxiale. Les unités de GP seraient donc capables de s'assembler pour former la structure finale de la fraction GP de la gomme d'acacia (Renard et al., 2014).

8.1.3 Propriétés physicochimiques

La GA est un polysaccharide amphiphile très soluble dans l'eau (43 – 48 % p/v). La viscosité de solutions aqueuses de gomme d'acacia est très proche de celle de l'eau. A titre d'exemple, à 0,5 % en solution aqueuse à 4 °C elle présente une viscosité de 1,75 mPa.s contre respectivement 133,86 et 92,59 mPa.s pour la gomme de guar et la gomme xanthane (Yaseen et al., 2005). De plus, la gomme possèderait un comportement rhéofluidifiant en fonction de la contrainte de cisaillement. Cependant, la viscosité des solutions augmente en fonction du temps de cisaillement (uniquement pour des cisaillements et des concentrations faibles). Cette augmentation serait due aux propriétés de surface de la gomme et leur capacité à s'adsorber aux interfaces et à former un réseau, un cisaillement élevé empêchant la formation de cette structure. (Sanchez et al., 2002)

C'est la présence de protéines hydrophobes qui lui confère son pouvoir émulsifiant bien que la présence de glucides hydrophiles permet d'éviter la floculation *via* des répulsions stériques et électrostatiques. En effet, elle possède une charge globale négative d'environ -1,5 µm.cm.V^{-1}.s^{-1} (pH 4.5) due à la présence des acides carboxyliques des acides glucuroniques. Elle est donc un bon stabilisateur car elle est capable à une concentration de 1 % (p/v) de diminuer la tension de surface de l'eau à 52,5 mN.m^{-1}, et de diminuer la tension interfaciale entre l'eau et l'huile de tournesol de 23,2 à 16.5 mN.m^{-1} (Gashua et al., 2016; Padala et al., 2009; Vuillemin et al., 2020).

La GA est stable à la chaleur jusqu'à environ 250 °C (Mothé & Rao, 2000; Vuillemin et al., 2020; Zohuriaan & Shokrolahi, 2004). À environ 90 °C, la GA cristalline présente un évènement caractéristique de la fonte lorsqu'elle est faiblement hydratée. Cependant, la température de fusion, est déplacée avec l'augmentation de la teneur en eau vers des températures plus importantes (Mothé & Rao, 2000). A ce jour, il n'y a pas de transition vitreuse (Tg) déterminée pour la GA (Mothé & Rao, 2000; Zohuriaan & Shokrolahi, 2004).

8.2 Curcumine

C'est la curcumine qui a été choisie comme phénol pour permettre la modification de la gomme d'Acacia. Il s'agit d'une molécule modèle connu pour son grand pouvoir antioxydant. De plus, elle a déjà permis la modification par voie enzymatique du dextrane (Curcio et al., 2019) ce qui suggère qu'il est possible d'induire un résultat similaire avec la gomme d'Acacia.

Elle est extraite du rhizome de *Curcuma longa* et se présente sous forme d'une poudre jaune-orangée. Elle est notamment utilisée comme colorant dans l'industrie agroalimentaire sous le code E100. Elle a pour formule brute $C_{21}H_{20}O_6$ et possède une masse moléculaire de 368 g/mol. Elle est très peu soluble dans l'eau (sauf à pH basique) mais se solubilise dans les solvants organiques tels que le méthanol ou l'éthanol et présente de nombreuses propriétés biologiques

intéressantes notamment un fort potentiel en tant qu'agent antioxydant et anticancéreux (Abdul Rohman et al., 2015; Curcio et al., 2019).

8.3 La laccase

La laccase (benzenediol:oxygen oxidoreductases, (EC 1.10.3.2)) est une enzyme permettant l'oxydation de composés phénoliques en milieu aqueux (Aljawish et al., 2015). Elles sont abondantes dans la nature et peuvent être d'origine végétale ou fongique. Il s'agit de dimères ou de trimères de glycoprotéines d'un poids moléculaire allant de 50 à 100 kDa. Leur pH optimal d'activité peut varier de 3 à 8 à une température optimale allant de 30 à 50 °C. Par exemple pour la laccase de *Myceliophthora thermophila* le pH optimal est de 7,5 et la température optimale de 30 °C (Aljawish, Chevalot, Jasniewski, Paris, et al., 2014; Aljawish et al., 2016; Karaki, 2015).

Les laccases catalysent une réaction d'oxydation de phénols menant à la formation de quinones (ou semi quinones) en présence d'oxygène (Figure 42) (Aljawish et al., 2015).

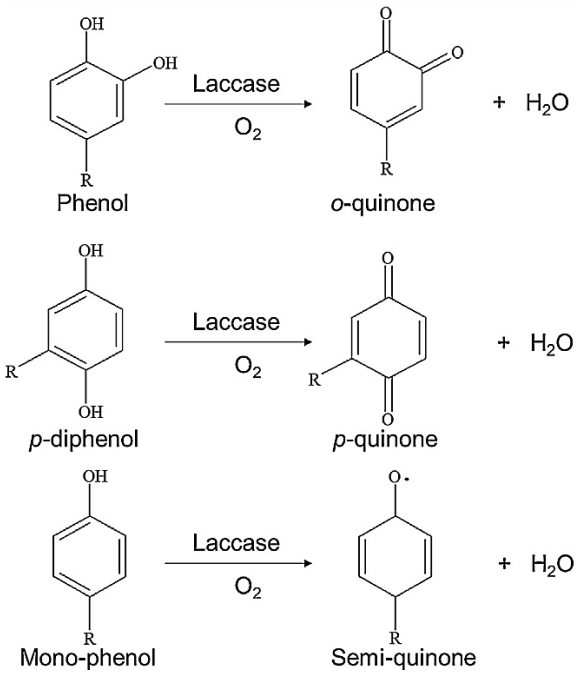


Figure 42 : Oxydation de ortho - et para - diphénols et de monophénol par la laccase en quinones correspondantes (Aljawish et al., 2015)

En milieu aqueux, l'activité des laccases est limitée par la forte réactivité des produits générés qui se condensent spontanément et peuvent inactiver l'enzyme. L'ajout de molécules possédant des groupements nucléophiles dans le milieu limitent cette inactivation en captant les produits d'oxydation. Les radicaux subissent alors une réaction spontanée de couplage non enzymatique (Aljawish, Chevalot, Jasniewski, Paris, et al., 2014).

Matériels & Méthodes

Matériels & Méthodes

1 Matériels _____ Erreur ! Signet non défini.

1.1 Polysaccharide utilisé : la gomme d'Acacia_____ **Erreur ! Signet non défini.**

1.2 Composé phénolique utilisé : la curcumine _____ **Erreur ! Signet non défini.**

1.3 Enzyme utilisée : une laccase_____ **Erreur ! Signet non défini.**

2 Méthodes _____ Erreur ! Signet non défini.

2.1 Caractérisation de l'enzyme_____ **Erreur ! Signet non défini.**

2.2 Modification de la gomme d'Acacia _____ **Erreur ! Signet non défini.**

2.3 Caractérisation des modifications structurales de la gomme d'acacia ___ **Erreur ! Signet non défini.**

2.4 Détermination du poids moléculaire _____ **Erreur ! Signet non défini.**

2.5 Etude de la modification du comportement thermique de la gomme d'Acacia __ **Erreur ! Signet non défini.**

2.6 Mesure de l'hydrophilie et de l'hygroscopie _____ **Erreur ! Signet non défini.**

2.7 Préparation des suspensions de GAC et GACD_____ **Erreur ! Signet non défini.**

2.8 Détermination de la tension superficielle_____ **Erreur ! Signet non défini.**

2.9 Mesure du pouvoir antioxydant _____ **Erreur ! Signet non défini.**

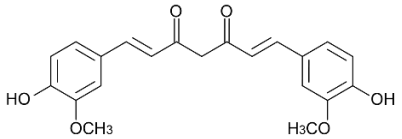
2.10 Caractérisation des particules formées par auto-assemblage _____ **Erreur ! Signet non défini.**

2.11 Etude de l'influence des conditions de formation des particules par plan d'expériences ___ **Erreur ! Signet non défini.**

1 Matériels

Les produits chimiques, ainsi que les solvants utilisés sont référencés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : liste des produits chimiques utilisés

Désignation	Fournisseur	Référence
Acétonitrile	Carlo Erba	412392000
Acide acétique	Merck	33209
Acide chlorhydrique	Fluka	35328
Acide phosphorique	Merck	P5811
2,2´-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS)	Sigma-Aldrich	A1888
Bleu brillant	Sigma-Aldrich	B0770
Chlorure de sodium	Sigma-Aldrich	746398
Curcumine ≥ 65 %	Sigma-Aldrich	C1386
		
DMAC (N,N-Diméthylacétamide)	Sigma-Aldrich	185884
Ethanol	VWR	20824.365
Hydroxyde de sodium	Carlo Erba	369741
Méthanol	Carlo Erba	524102
Persulfate de potassium	Sigma-Aldrich	77214

Phosphate de sodium dibasique dodécahydraté	Sigma-Aldrich	71649
Phosphate de potassium monobasique	Sigma-Aldrich	P0662
Sérum albumine bovine	Sigma-Aldrich	A2153
Syringaldazine	Sigma-Aldrich	S7896

1.1 Polysaccharide utilisé : la gomme d'Acacia

La gomme d'Acacia (GA) purifiée et instantanéisée Instantgum AA d'*Acacia senegal* a été offerte par Nexira (France). Sa masse molaire est d'environ 400 kDa (Renard et al., 2006; Vuillemin et al., 2020). Elle contient au maximum 10 % d'eau. Une solution aqueuse de GA à une concentration de 25 % (p/v) et une température de 20 °C possède un pH compris entre 4,1 et 4,8 et une viscosité de 60 à 130 mPa.s.

1.2 Composé phénolique utilisé : la curcumine

La curcumine se présente sous forme d'une poudre orange fortement colorée extraite des rhizomes de *Curcuma longa* d'une pureté ≥ 65 %. Elle est soluble dans l'éthanol jusque 10 $g.L^{-1}$ et dans le DMSO à plus de 11 $g.L^{-1}$. La curcumine présente un maximum d'absorption dans le spectre UV-visible à 425 nm et est fluorescente (longueur d'onde d'excitation : 425 nm ; longueur d'onde d'émission 540 nm) (Chignell et al., 1994; Mondal & Ghosh, 2021).

1.3 Enzyme utilisée : une laccase

La laccase utilisée a été fournie par Novozymes. Il s'agit de la laccase de *Myceliophthora thermophila* (E.C. 1.10.3.2) produite par *Aspergillus oryzea* (Novozym 51003). Son activité annoncée par le fournisseur est de 1000 LAMU.g^{-1} minimum. Une unité LAMU (laccase *Myceliophthora thermophila* unit) est définie comme la quantité d'enzyme qui oxyde 1 micromole de syringaldazine par minute.

2 Méthodes

2.1 Caractérisation de l'enzyme

La caractérisation de l'enzyme passe par deux étapes. La première permet de définir la quantité de protéine présente dans la solution stock et la seconde permet d'obtenir l'activité vis-à-vis d'un phénol modèle. Ainsi il est possible de déterminer l'activité spécifique de la laccase.

2.1.1 Dosage de la quantité de protéines

Les protéines présentes dans la solution enzymatique ont été dosées à l'aide de la méthode de Bradford. Elle permet de quantifier les protéines par un changement de couleur dû à la fixation de bleu de Coomassie sur ces dernières. Le bleu de Coomassie réagit avec l'arginine ainsi que plus faiblement avec les acides aminés aromatiques et basiques. (Bradford, 1976; Compton & Jones, 1985)

<u>Mode opératoire :</u>

Le réactif de Bradford a été préparé avec 400 mg de bleu de Coomassie, 200 mL d'éthanol, 400 mL d'acide phosphorique à 85 % (en volume) et d'eau ultrapure qsp 1 litre. Une fois réalisé, le réactif a été dilué au dixième avant utilisation.

A partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (SAB), une gamme de concentration de 0 à 1,5 g.L^{-1} a été réalisée. 80 µL de chaque concentration ainsi que des essais ont été ajoutés

à 4 mL de réactif de Bradford. Le mélange a été homogénéisé et incubé 3 min le temps que la coloration se développe. La lecture spectrophotométrique se fait à 595 nm. La droite d'étalonnage est présentée sur la Figure 43.

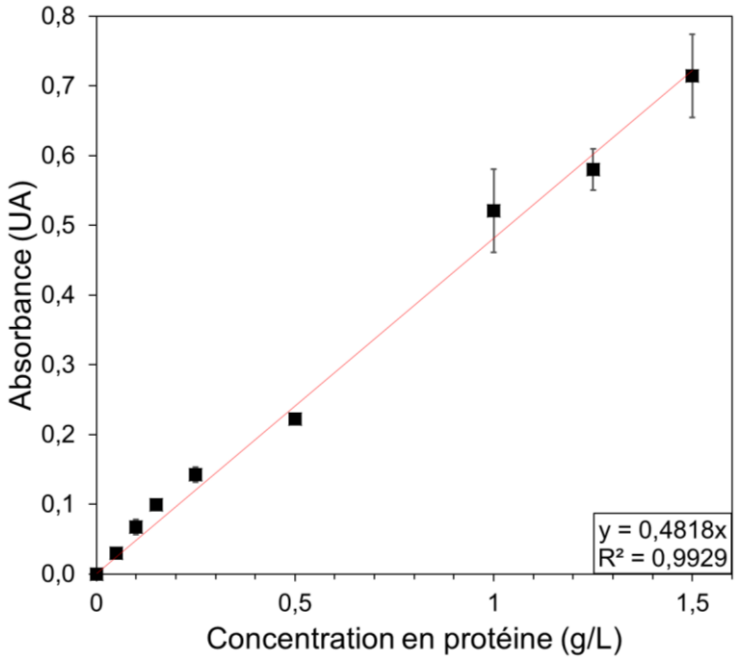


Figure 43 : Droite étalon du dosage de Bradford obtenue sur de la SAB à 595 nm

2.1.2 Dosage de l'activité enzymatique de la laccase

De manière à déterminer l'activité de la laccase utilisée, une mesure de la vitesse d'oxydation de la syringaldazine a été réalisée (Mustafa et al., 2005). L'augmentation de l'absorbance à 525 nm est due à l'apparition de tétraméthoxy-azo-bisméthylènequinone (II) produit par la réaction visible dans la Figure 44.

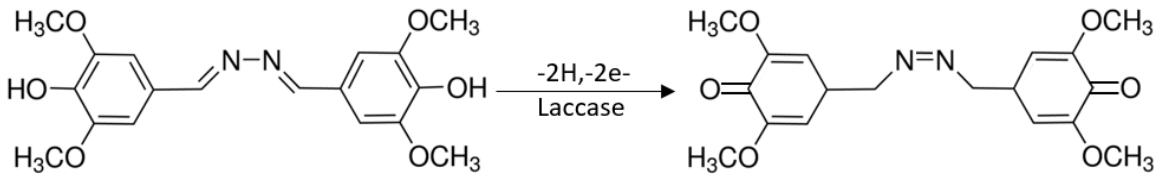


Figure 44 : Réaction d'oxydation de la syringaldazine par la laccase

L'activité enzymatique spécifique Vi a été calculée selon l'Équation 2.

Équation 2 : Calcul de l'activité enzymatique spécifique

$$V_i = \frac{\frac{\Delta A}{\varepsilon\ syringaldazine\ 525nm} . V\ cuve}{Quantité\ de\ protéines}$$

Avec :

- ΔA étant la vitesse d'oxydation de la syringaldazine en unité d'absorbance par unité de temps ;
- V_i, la vitesse initiale de réaction ;
- ε, le coefficient d'extinction molaire de la syringaldazine à 525 nm (65000 $L.cm^{-1}.mol^{-1}$)
- et V_{cuve}, le volume total du milieu réactionnel en L.

L'activité de la solution stock de laccase est exprimée en unités Laccase *Myceliophthora* (LAMU).

<u>Mode opératoire :</u>

Une solution de syringaldazine à 0,2 mM a d'abord été réalisée dans de l'éthanol. 400 µL de cette solution ont été introduits dans une cuve ainsi que 1530 µL de solution tampon phosphate 50 mM ; pH 7,4. Le milieu réactionnel a ensuite été agité et placé à 30 °C, 15 min. La réaction commence lors de l'ajout de 10 µL de la solution de laccase diluée au 1/200 dans du tampon phosphate. L'apparition de la coloration a été suivie par un spectrophotomètre Shimadzu UV-1605 à 525 nm.

2.2 Modification de la gomme d'Acacia

La méthode de fonctionnalisation de la gomme d'Acacia a été adaptée de la littérature (Aljawish et al., 2012; Karaki, Aljawish, Muniglia, et al., 2016; Vuillemin et al., 2020). Elle a été représentée schématiquement dans la Figure 45. Ces étapes permettent d'obtenir, à partir de gomme d'Acacia native et de la curcumine, une gomme d'Acacia modifiée (GAC) par les produits d'oxydation de la curcumine (POX) sous l'action de la laccase.

Mode opératoire :

10 g de gomme d'Acacia ont été ajoutés dans 450 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,4 et agités pendant une nuit à 4 °C. La gomme est dispersée dans le tampon phosphate puisque sa solubilité y est très faible. Cette suspension a ensuite été chauffée sous agitation jusqu'à atteindre 30 °C. Une suspension de curcumine dans de l'éthanol (50 ml à 50 mM) a été ajoutée à la dispersion de gomme d'Acacia à 30 °C. Puis 200 LAMU de laccase (160 µL) ont été ajoutés pour démarrer la réaction. Les éléments n'étant pas solubilisés, la catalyse se fait en milieu hétérogène. La température a ensuite été maintenue à 30 °C durant 1 h.

La réaction a été stoppée par l'addition de 3 volumes (1,5 L) d'éthanol froid et maintenue à -21 °C pendant 24 h. Cette procédure a également permis de séparer le polymère fonctionnalisé et la gomme native contenus dans le mélange en fin de réaction. En effet, la GAC est soluble dans un mélange eau : éthanol 1 : 3, contrairement à la gomme native qui précipite dans ce solvant.

Le mélange a ensuite été séparé par centrifugation à 12100 *g* pendant 10 min. La GAC est présente dans le surnageant et la GA non fonctionnalisée dans le précipité. Les sels du tampon se situent dans les deux phases. L'éthanol contenu dans le surnageant a été évaporé grâce à un évaporateur rotatif à une température de bain de 60 °C et une pression de 175 mbar (BUCHI

R144 - BUCHI SARL, Rungis, France). L'échantillon qui est alors composé de GAC dans de l'eau, a été congelé et lyophilisé pendant 72 h.

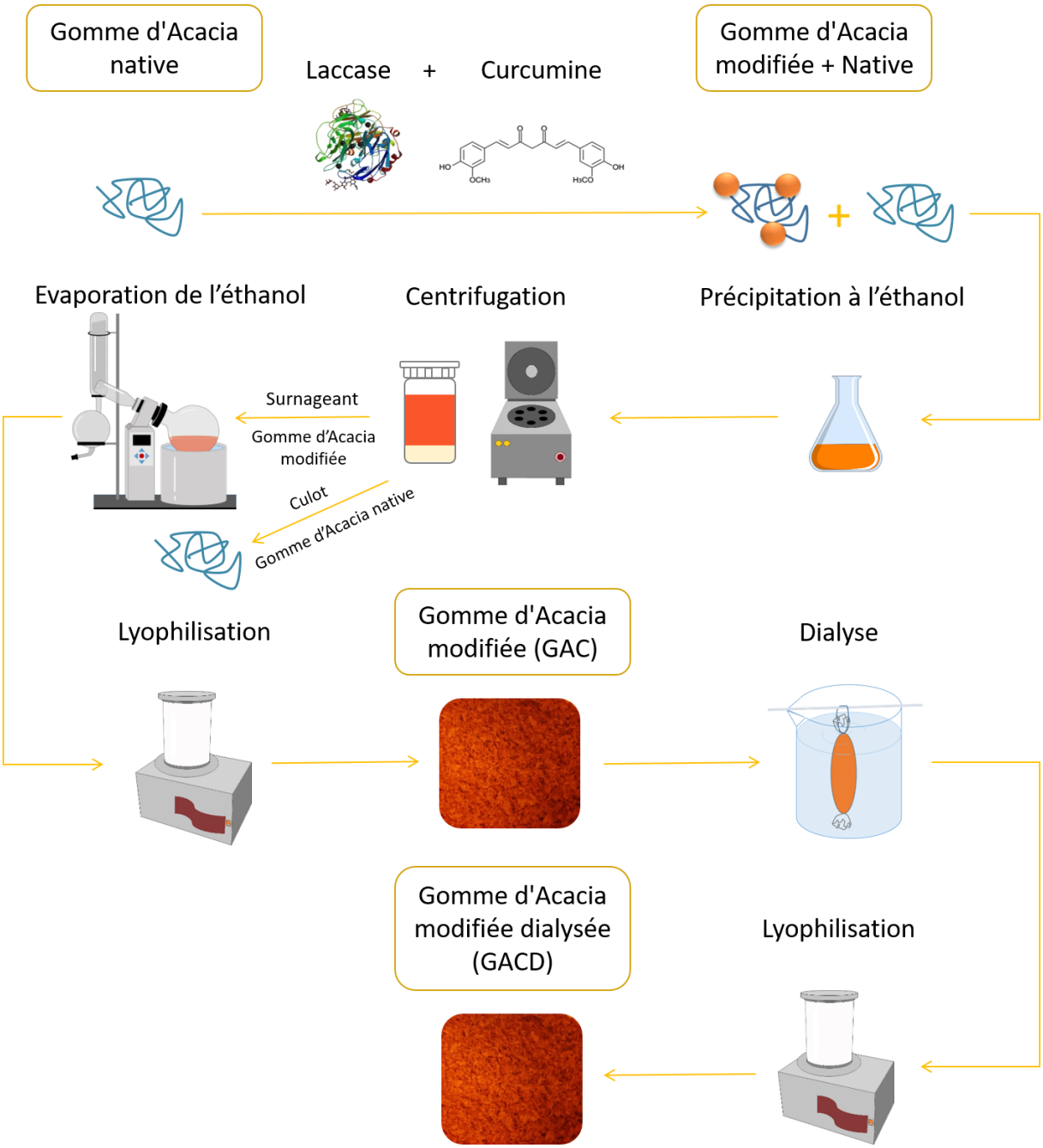


Figure 45 : Protocole de modification de la gomme d'Acacia par voie enzymatique

Une dialyse (MWCO 10000 Da de Membrane Filtration Products Inc.) de l'échantillon lyophilisé contre de l'eau pure a été effectuée pour éliminer les sels du tampon ainsi que d'autres composés hydrosolubles issus de la réaction enzymatique dans le but de récupérer un polymère le plus pur possible pour sa caractérisation fine. L'échantillon obtenu a été appelé GACD.

2.3 Caractérisation des modifications structurales de la gomme d'acacia

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) a été la technique utilisée pour étudier l'impact de la fonctionnalisation sur la structure chimique de la gomme d'Acacia. Cette technique s'appuie sur l'absorption de la lumière dans le domaine de l'infrarouge par les molécules d'intérêt. Il est alors possible d'obtenir un spectre d'absorption dont chaque pic est caractéristique d'un mode de vibration d'une liaison. Ainsi, chaque molécule possède un spectre caractéristique appelé « finger print ».

Les mesures ont été effectuées en utilisant un spectromètre Tensor 27 équipé d'un détecteur DTGS (Bruker, Allemagne). La gomme d'Acacia fonctionnalisée et dialysée GACD a été placée sous forme de poudre sur le cristal du détecteur ATR en diamant (ATR Platinum, Bruker, Allemagne) pour être analysée. L'analyse a été réalisé en 64 scans, avec un balayage à 10 kHz. Les spectres sont obtenus dans une gamme de nombre d'ondes allant de 400 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 6 cm^{-1}. Le spectre de référence a été mesuré sur l'air pour être soustrait aux résultats. Les données brutes ont été collectées par le logiciel OPUS (Bruker, Allemagne) puis soumises à différents traitements, soit : une correction ATR étendue (n = 1.47), une conversion de spectre en absorbance, une compensation H_2O/CO_2, une génération de ligne droite dans la zone aveugle, un lissage en 9 points, une correction de ligne de base selon la méthode concave (10 itérations) et enfin une normalisation selon la méthode offset. Les mesures ont été effectuées en triplicat.

2.4 Détermination du poids moléculaire

Les expériences de chromatographie d'exclusion stétique (SEC : Size Exclusion Chromatography) ont été réalisées avec une pompe HPLC (LC10AD, Shimadzu) couplée à un passeur d'échantillons (Autosampler VE 2001, Malvern Panalytical) et un système multidétecteurs enregistrant les signaux d'UV, de diffusion de la lumière (RALS : right angle light scattering et LALS : left angle light scattering), de viscosité intrinsèque et d'indice de réfraction (Viscotek TDA305, Malvern Panalytical) des échantillons. Deux colonnes SEC (A4000-A6000, 10 ou 13 µm, 8 mm ID x 300 mm, volume vide ~6 mL, volume total ~ 12,5 mL, Malvern Panalytical) ont été montées en série et équipées d'un filtre nylon post-colonne (0,22 µm). Elles ont été équilibrées avec un mélange DMAC : H_2O 50:50. Le débit et la température ont été fixés à respectivement 0,1 $mL.min^{-1}$ et 30 °C. Les données ont été traitées avec le logiciel Omnisec (v5.12, Malvern Panalytical). La procédure d'étalonnage a été réalisée avec de l'albumine de sérum bovin et des validations croisées ont été effectuées avec le standard Dextran 70 kDa (standards Viscotek PolyCal, Malvern Panalytical). Le réfractomètre a été utilisé comme détecteur de concentration et la valeur d'incrément de l'indice de réfraction (dn/dc) utilisée pour déterminer la masse moléculaire était de 0,136 $mL.g^{-1}$ (Grein, Da Silva, Wendel, Tischer, & Sierakowski, 2013). Les échantillons de GACD ont été solubilisés dans le mélange de solvant eau : DMAC à 10 $g.L^{-1}$ et filtrés à travers un filtre RC de 0,22 µm juste avant l'injection. Toutes les mesures ont été effectuées en triplicat et exprimées par la moyenne ± l'écart-type.

2.5 Etude de la modification du comportement thermique de la gomme d'Acacia

Des analyses thermogravimétriques (TGA) ont été effectuées pour étudier l'impact de la fonctionnalisation sur la stabilité thermique de la gomme d'Acacia. Cette technique se base sur la mesure continue du poids d'un échantillon donné soumit à une rampe de température. De cette manière, la perte de masse est caractérisée en fonction de la température.

Les essais ont été réalisés en utilisant un appareil d'analyse thermogravimétrique (TGA 5500, TA Instruments, Waters, France) sous azote pour éviter la combustion. La vitesse de chauffe était de 20 °C.min^{-1} de 30 °C à 600 °C et la masse de l'échantillon était de 6 ± 2 mg. Les données brutes ont été collectées et analysées à l'aide du logiciel TRIOS (TA Instruments, Waters, France) pour obtenir les thermogrammes et leurs dérivées.

Des mesures de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ont été réalisées pour étudier l'impact de la fonctionnalisation sur le comportement thermique de la gomme d'Acacia (DSC 250, TA Instruments, Waters). La DSC est une technique qui consiste à mesurer les flux de chaleurs libérés ou absorbés par un échantillon soumis à des changements de température. Ainsi, il est possible d'obtenir des courbes appelées thermogrammes sur lesquelles chaque évènement visible peut correspondre à une modification de l'état de l'échantillon. Il est possible d'observer des évènements tel que la transition vitreuse possédant une forme typique en marche d'escalier. Les autres évènements sont différenciables selon s'ils sont exothermiques comme la cristallisation, ou endothermiques comme la fonte.

L'échantillon (6 ± 2 mg) a été placé dans une cupule hermétique en aluminium pour être analysé selon une méthode en 3 étapes. Tout d'abord, les échantillons ont été portés de -50 °C à 100 °C à une vitesse de 10 °C.min^{-1} de manière à éliminer l'historique thermique de l'échantillon et s'affranchir d'une potentielle relaxation enthalpique (pic endothermique) qui se produit lorsque l'échantillon a longtemps séjourné à une température inférieure à sa température de transition

vitreuse. L'échantillon a été ensuite refroidi à -50 °C à une vitesse de 10 °C.min^{-1} et enfin chauffé à nouveau jusqu'à 100 °C à la même vitesse. Toutes ces étapes ont été séparées par un isotherme de 2 min permettant la stabilisation de la température dans l'échantillon. C'est la dernière étape de chauffe qui caractérise l'échantillon. Les données ont été collectées grâce au logiciel TRIOS (TA Instruments) qui a permis la détection automatique de la Tg (température de transition vitreuse).

Les mesures de TGA et de DSC ont été réalisées en triplicat.

2.6 Mesure de l'hydrophilie et de l'hygroscopie

L'impact de la fonctionnalisation sur l'hydrophilie ainsi que l'hygroscopie de la gomme d'Acacia a été évalué à partir des isothermes de sorption d'eau de GA et de GACD obtenus par la technique de sorption dynamique de vapeur d'eau. L'échantillon est placé dans une enceinte dont l'humidité relative (HR) est contrôlée. La masse de l'échantillon est suivie en continu et l'humidité relative de l'enceinte est augmentée dès que la masse de l'échantillon est stable. En effet, cela montre que l'équilibre entre l'échantillon et l'atmosphère de l'enceinte est atteint. L'augmentation relative de la masse de l'échantillon en fonction de l'HR permet de tracer un isotherme de sorption.

Les résultats ont été obtenus sur des échantillons de 90 ± 10 mg pour GA et 50 ± 10 mg pour GACD. Les échantillons ont été placés dans la chambre scellée de l'appareil de sorption dynamique de la vapeur (DVS, Surface Measurement Systems Ltd., Londres, UK) à 25 °C. La différence de masse est due à la plus faible densité de la poudre de GACD dans la capsule de l'appareil. L'humidité relative est d'abord amenée au niveau le plus bas possible (environ 0,1 %), puis augmentée par paliers de 10 % jusqu'à 85 %. Les temps d'équilibrage pour les différentes étapes sont réglés manuellement (Tableau 3) de manière que l'équilibre pour chaque

HR soit atteint. Les masses sont mesurées en continu mais seules les masses à l'équilibre sont enregistrées. Les mesures ont été effectuées en triplicat.

Tableau 3 : Temps d'équilibrage en fonction de l'humidité relative imposé à l'échantillon

Humidité relative (%)	Temps d'équilibrage (min)	
	GACD	GA
0,1	500	800
10	200	250
20	200	400
30	200	400
40	200	400
50	200	200
60	200	450
70	300	700
80	500	800
85	250	900

2.7 Préparation des suspensions de GAC et GACD

La GAC a été dispersée dans de l'eau ultra-pure à 0,5 % en poids et laissée une nuit sous agitation à 4 °C. Cette suspension a été ensuite diluée dans l'eau ultra-pure à différentes concentrations en fonction des expérimentations à réaliser.

2.8 Détermination de la tension superficielle

La tension superficielle ou tension de surface de dispersions de GACD dans l'eau ultrapure a été mesurée à 25 °C à l'aide d'un tensiomètre Kruss K100 (Krüss, Paris, France) équipé d'une lame de Wilhelmy. Dans cette méthode une lame de platine est placée à l'interface eau/air et permet de mesurer la force capillaire de la solution à étudier.

Les mesures ont été réalisées en continu sur une durée maximale de 21000 s afin d'atteindre l'équilibre. Avant chaque mesure, la propreté du matériel utilisé a été vérifiée en réalisant une mesure sur de l'eau ultra-pure de manière à éviter toute interférence ; une valeur de 72,5 ± 0,3 $mN.m^{-1}$ devant être atteinte à 25 °C.

L'évolution de la tension superficielle en fonction du temps a été modélisée grâce à l'Équation 2 (Mahfoudhi et al., 2014) (Figure 46). Cette équation permet d'obtenir la valeur de tension superficielle à l'équilibre (γ_f) pour un temps infini.

Équation 3 : Calcul de la tension de surface un temps à l'infini

$$\gamma = \gamma_f + (\gamma_1 - \gamma_f) . e^{-\frac{t}{\tau 1}} + (\gamma_2 - \gamma_f) . e^{-\frac{t}{\tau 2}}$$

Les paramètres τ_1, τ_2, γ_1 et γ_2 sont des paramètres permettant de caractériser la décroissance des valeurs de tension superficielle. τ_1 correspond au temps de migration (en seconde) de l'émulsifiant jusqu'à l'interface et τ_2 au temps nécessaire à la réorganisation des molécules à l'interphase. γ_1 et γ_2 correspondent quant à eux aux tensions de surface correspondant à ces

différents temps en $mN.m^{-1}$. γ représente la tension de surface à l'infini en $mN.m^{-1}$. t correspond au temps de la mesure en seconde.

Les mesures ont été effectuées en triplicat.

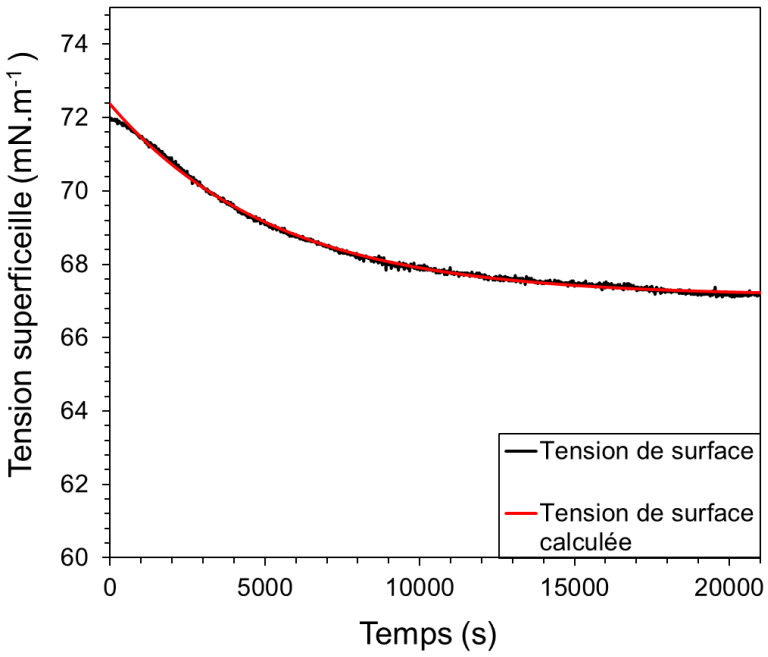


Figure 46 : Exemple de la décroissance de la tension superficielle d'une suspension de GAC à 0.05% (en poids) et du modèle calculé en fonction du temps

2.9 Mesure du pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante de la GAC a été étudiée en réalisant des tests de piégeage des radicaux $ABTS^{\bullet+}$. La méthode a été adaptée à partir de (Karaki, Aljawish, Muniglia, et al., 2016; Vuillemin et al., 2020). La solution d'$ABTS^{\bullet+}$ stock a été diluée pour obtenir une absorbance de 0,680 ± 0,02 UA à 734 nm. 1 ml de cette solution est ensuite ajouté à 10 µL d'échantillon dont la concentration varie de 0,5 à 0,0005 % (p/v). Après incubation à 30 °C pendant 20 min et stabilisation de la couleur, la mesure de l'absorbance est effectuée à 734nm.

Le pourcentage d'inhibition des molécules étudiées est calculé à l'aide de l'Équation 4.

Équation 4 : Calcul du pourcentage d'inhibition du radical ABTS

$$\text{inhibition (\%) ABTS}^{\bullet+} = 1 - \frac{A\ final}{A\ initial} \times 100$$

Avec :

- A_{final} est l'absorbance de la solution d'ABTS$^{\bullet+}$ qui a réagi avec la molécule étudiée en unité arbitraire
- $A_{initial}$ est l'absorbance de la solution d'ABTS$^{\bullet+}$ qui n'a pas encore réagi en unité arbitraire

Les essais sont réalisés en triplicat. Les valeurs sont ensuite exprimées en EC50 ± écart-type µg.mL^{-1}. Il s'agit de la concentration à laquelle la molécule d'intérêt piège50 % des radicaux ABTS$^{\bullet+}$.

2.10 Caractérisation des particules formées par auto-assemblage

2.10.1 Détermination de la distribution de taille des particules et de la polydispersité

La distribution de la taille des particules de GAC en phase aqueuse a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) en utilisant un Zetasizer nano-ZS (Malvern Panalytical, Royaume-Uni) équipé d'un laser He/Ne (λ = 532 nm) en rétrodiffusion à 173 °.

Il s'agit d'une méthode se basant sur la vitesse des particules en suspension soumises au mouvement Brownien. Les objets de plus petite taille bougent plus rapidement que les objets de grande taille. Leur vitesse dépend aussi d'autres paramètres tel que la viscosité du milieu dispersant ou la température. Ce phénomène est caractérisé par l'équation de Stokes Einstein (Équation 5).

Équation 5 : Equation de Stokes Einstein

$$D = \frac{K_B T}{3\pi\eta d}$$

Avec :

- D le coefficient de diffusion en $m^2.s^{-1}$
- k_B la constante de Boltzmann 1,3806503. 10-23 $J.K^{-1}$
- T la température en °K
- η la viscosité du milieu dispersant en Pa.s
- d le diamètre hydrodynamique des particules dispersées en m

Un laser est dirigé sur ces particules qui diffusent la lumière. Les fluctuations d'intensité de lumière diffusée en fonction du temps de la lumière reçue par le détecteur permet alors de définir le coefficient de diffusion et donc leur taille grâce à l'Équation 5.

Les mesures ont été réalisées à 25 °C dans l'eau ultrapure avec un temps d'équilibrage de 2 min et dans des cuves DTS1070 (Malvern Panalytical). L'indice de réfraction utilisé pour la gomme d'Acacia et pour la gomme d'Acacia fonctionnalisée est de 1,47. Le modèle d'analyse utilisé est « general purpose ». Chaque échantillon est analysé 3 fois et chaque essai a été réalisé en triplicat. C'est la taille moyenne en intensité ± l'écart type de qui est retenu.

L'indice de polydispersité est une valeur comprise entre 0 et 1 et s'exprime sans unité. Il correspond à l'étroitesse des distributions de taille des particules dans un milieu. Plus la distribution de taille est large (ou que plusieurs populations sont présentes) plus le PDI sera élevé et la population dite polydisperse. A l'inverse si toutes les particules possèdent une taille relativement proche, le PDI sera faible donc la population sera plutôt monodisperse. Une population est dite faiblement polydisperse si le PDI ne dépasse pas 0,2 et ainsi permettre une exploitation de la taille moyenne obtenue.

2.10.2 Mesure de mobilité électrophorétique

La mesure de la mobilité électrophorétique des particules de GAC en phase aqueuse permet de déterminer leur charge globale de surface. Les mesures ont été réalisées grâce à un Zetasizer nano-ZS (Malvern Panalytical, Royaume-Uni) équipé d'un laser He/Ne (λ = 532 nm).

Cette analyse se base aussi sur la diffusion dynamique de la lumière, à la différence près qu'un champ électrique est appliqué aux particules en suspension. Leur mobilité est alors déterminée en fonction de leur mobilité dans le champ électrique. C'est l'équation de Smocluchowski (Équation 6) qui permet de définir la mobilité électrophorétique des particules. Ici, le potentiel Zêta ne sera pas utilisé car il n'est correct que pour l'étude de la charge des particules dures et non poreuses c'est pourquoi seule la mobilité électrophorétique (dont le potentiel Zêta est issu) sera exploitée. Il s'agit d'une valeur qui reste valable dans le cas de particules molles pouvant se déformer dans le champ électrique.

Équation 6 : Equation de Smocluchowski

$$\mu_E = \frac{\nu}{E}$$

Avec :

- μ_E est la mobilité électrophorétique ($\mu m.cm.s^{-1}.V^{-1}$)
- ν la vitesse des objets observés ($\mu m.cm^{-1}$)
- E le champ électrique appliqué sur une zone donnée ($V.cm^{-1}$)

Les mesures ont été réalisées à 25 °C avec un temps d'équilibrage de 2 min et en triplicat dans des cuves DTS1070 (Malvern Panalytical) comme précédemment. Le voltage utilisé a été réglé automatiquement.

2.10.3 Observations Microscopiques

La morphologie des particules de GAC a été visualisée en utilisant un microscope électronique à balayage à effet de champ Hitachi S-4800 (SEM) fonctionnant à 1,0 kV avec un canon à émission de champ (cathode froide). Cette technique consiste à bombarder un échantillon d'électrons. Des électrons secondaires sont émis à l'impact et captés par le détecteur de manière à reconstituer une image.

Une goutte d'un échantillon à 0,05 % (p/v) dans de l'eau ultra-pure a été déposée sur un support en aluminium et laissée sécher à l'air à température ambiante pendant 48 h, puis recouverte de carbone pour l'imagerie.

Des observations au microscope à épifluorescence avec un microscope LEITZ DMR (Allemagne) et avec un Micfiltre H3 ont également été réalisées afin de visualiser la présence de groupements phénoliques dans les particules. La capture d'images a été réalisée par une caméra CCD COHU monochrome à un grossissement de × 40 et un grossissement oculaire de ×10. La longueur d'onde d'excitation était de 420 nm. Les observations ont été réalisées en réalisant un frotti d'une suspension de GAC à 0,05%.

Des observations au microscope à force atomique (AFM) (Flex-Axiom, Nanosurf, Liestal, Suisse) ont aussi été réalisées. La structure de la surface des particules lyophilisées a été enregistrée avec le logiciel de contrôle Nanosurf C3000. Les poudres ont été doucement dispersées sur une fine couche de colle époxy étalée sur une lame en verre. Les propriétés de surface des particules (topographie et élasticité) ont été enregistrées à 22 ± 2 °C à l'aide d'un cantilever (cantilevers Stat0.2LauD de Nanosurf, Liestal, Suisse) ayant une constante de raideur de 0,2 $N.m^{-1}$. L'acquisition de la topographie a été réalisée dans l'air, en mode contact sur une surface de 5 µm par 5 µm.

Les propriétés mécaniques de la GAC ont été étudiées à l'échelle nanométrique par nanoindentation. Le mécanisme est schématisé dans la Figure 47. Après avoir placé la pointe de l'AFM au-dessus d'une particule choisie, le cantilever (la pointe) est approché de la particule jusqu'à entrer en contact avec celle-ci puis est rétracté. Cela conduit à des courbes force-distance. La courbe rouge montre la force pendant l'approche de la pointe, et la courbe bleue la force pendant le retrait. A partir de ces courbes, les modules de Young peuvent être extraits et donner des informations sur la rhéologie des particules étudiées.

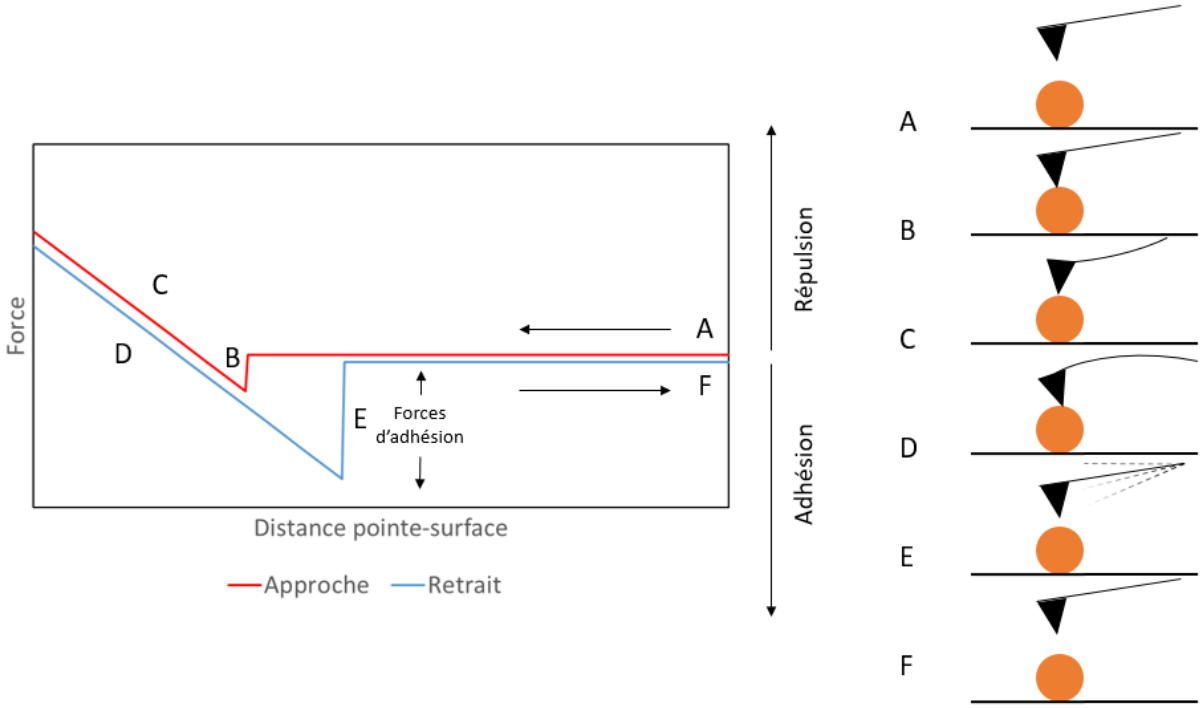


Figure 47 : Schématisation d'une courbe d'approche et de retrait de la pointe d'AFM avec : (A) approche de la pointe ; (B) contact avec l'échantillon ; (C) pression de la pointe sur l'échantillon ; (D) début du retrait de la pointe ; (E) détachement de la pointe et (F) éloignement de la pointe.

Les courbes force-distance enregistrées par l'AFM ont été analysées selon le modèle théorique de Hertz pour obtenir les propriétés mécaniques telle que l'élasticité. Des zones définies de 5 µm par 5 µm ont été analysés de manière à obtenir des cartes d'élasticité. La constante de raideur du cantilever a été calculée grâce à la méthode de calibration thermique et la sensibilité de déflexion calibrée sur une surface de silicium. Les cartes d'élasticité de 1024 courbes de force

ont été traitées avec le logiciel ANA (Nanosurf, Liestal, Suisse). Au moins trois images de topographie et 3 cartes d'élasticité ont été enregistrées et analysées.

2.10.4 Impact de la concentration en particules sur la turbidité

La présence de particules en suspension dans un liquide induit la présence d'un trouble si les particules sont plus grosses que la longueur d'onde du rayonnement utilisé pour les observer divisé par 10 et que les indices de réfraction sont différents entre la particule et le milieu continu. En effet, lorsque la lumière entre au contact de ces objets, la diffusion de Mie (diffusion anisotrope) entre en jeu, ce qui donne au milieu une certaine turbidité. Cette turbidité est fonction de différents facteurs tels que de la taille des objets, de leur concentration ou leur indice de réfraction. Il est possible de quantifier ce trouble via spectrométrie. Ici, c'est un spectromètre Shimadzu UV-1605 à 620 nm qui est utilisé pour suivre l'absorbance à 620 nm. La turbidité est déduite de cette mesure via l'Équation 7. Les essais ont été réalisés en triplicat.

Équation 7 : Calcul de la turbidité

$$\tau = -\frac{1}{L}\ln\left(10^{-A}\right)$$

Avec :

- τ la turbidité (unité arbitraire)
- L la longueur du chemin optique (cm)
- A l'absorbance de l'échantillon à 620 nm (unité arbitraire)

2.10.5 Mesure des paramètres thermodynamiques par titration calorimétrique isotherme

Des mesures de titration calorimétrique isotherme (ITC) (Affinity SV, TA Instruments, eaux, France) ont été réalisées grâce à un système ITC Affinity (TA instruments, Waters, France) de manière à déterminer la CAC et possiblement les paramètres thermodynamiques associés à la formation des assemblages. De petites quantités d'un échantillon sont injectés successivement dans une cellule. Lorsqu'il se produit un évènement comme une complexation, une dissolution, un assemblage ou un désassemblage, cela implique un dégagement ou une absorption de chaleur. L'appareil est capable de mesurer ces chaleurs à chaque injection en comparaison d'une cellule de référence. Ainsi il est possible d'observer des évènements endo- ou exothermiques en fonction de la concentration. Les données sont ensuite analysées comme il est possible de le voir sur la Figure 48.

En réalité, les expériences ont été conçues pour suivre d'abord le désassemblage des particules de GACD dans l'eau, puis leur assemblage en augmentant la concentration de GACD. Lors des premières injections, les particules se sont désassemblées. Au fur et à mesure que la concentration en GAC augmente avec les injections successives dans la cellule de mesure, les particules se reformaient une fois que la concentration dépassait la CAC. Les échantillons ont été préalablement dégazés et des mesures sur des injections d'eau ultra-pure ont été réalisées afin de vérifier la propreté de l'instrument. 50 injections de 5 µL d'une suspension de GAC dialysée à 0.025% (wt)% ont été réalisées à 25°C. Les mesures ont été effectuées dans une cellule de 965µL contenant de l'eau ultra-pure. Les données ont été analysées par le logiciel NanoAnalysis (TA instruments, Waters, France).

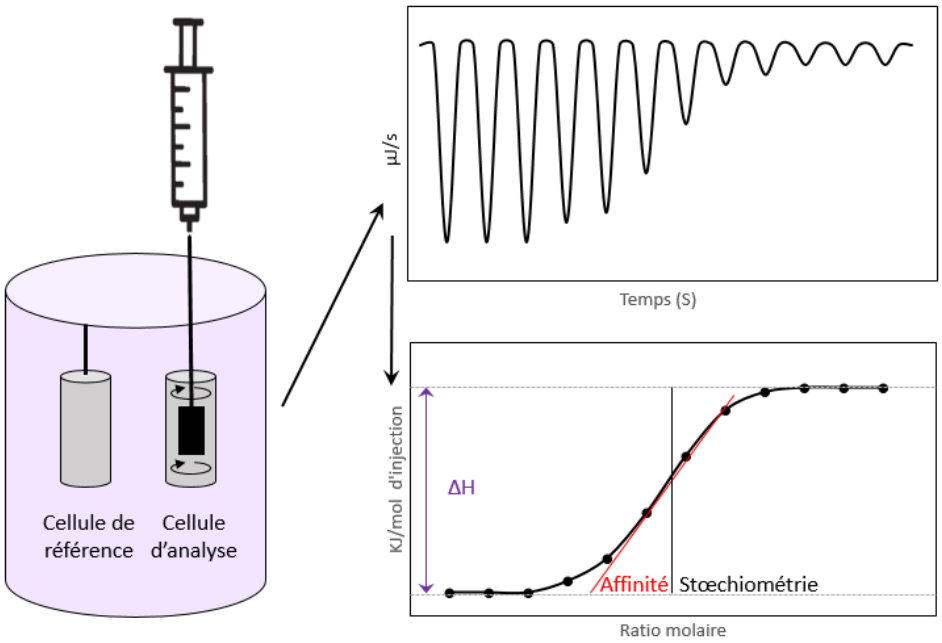


Figure 48 : Principe de la titration calorimétrique isotherme et exemples de résultats types obtenus

Les différents paramètres thermodynamiques ont été obtenus via les équations suivantes en supposant que le mécanisme de formation des particules est proche d'une micellisation (Bouchemal et al., 2010).

Equation 8 : Calcul de la différence d'énergie libre de Gibbs à partir de la CAC'

$\Delta G = R.T.\ln(CAC')$

Equation 9 : Calcul de l'entropie

$T\Delta S = \Delta H - \Delta G$

Avec ΔH l'enthalpie, ΔG l'énergie libre de Gibbs, ΔS l'entropie, CAC' la concentration critique d'agrégation exprimée en termes de fraction molaire, R la constante des gaz parfaits et T la température en Kelvin.

2.10.6 Mesure de l'EC50 de la GAC par thermophorèse à micro-échelle

La méthode de thermophorèse à micro-échelle (MST) (MST-Monolith NT.115, NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Allemagne) a été utilisé pour déterminer l'impact de la concentration sur l'assemblage de la GAC dans l'eau ainsi que des constantes définissant la formation de l'assemblage.

Il s'agit d'une méthode basée sur le mouvement des molécules fluorescentes en fonction d'une augmentation locale de la température (Figure 49). Un laser permet d'échauffer localement un échantillon créant ainsi une déplétion en molécules d'intérêt à l'endroit étudié et donc une diminution de la fluorescence (Figure 49C). Ainsi, il est possible d'obtenir des courbes, appelées traces, qui expriment la diminution de fluorescence au cours du temps (Figure 49 D). Elles représentent la fluorescence initiale normalisée, la diminution d'intensité lors de l'augmentation de température puis un retour à l'état normal lors que le laser s'arrête. La vitesse de diminution de la fluorescence dépendra de l'affinité entre les molécules.

A partir de ces traces il est possible d'obtenir des courbes doses/réponses (fluorescence en fonction de la concentration). Elles sont obtenues en utilisant un point dit froid (laser off) et un point dit chaud (laser on) (Figure 49).

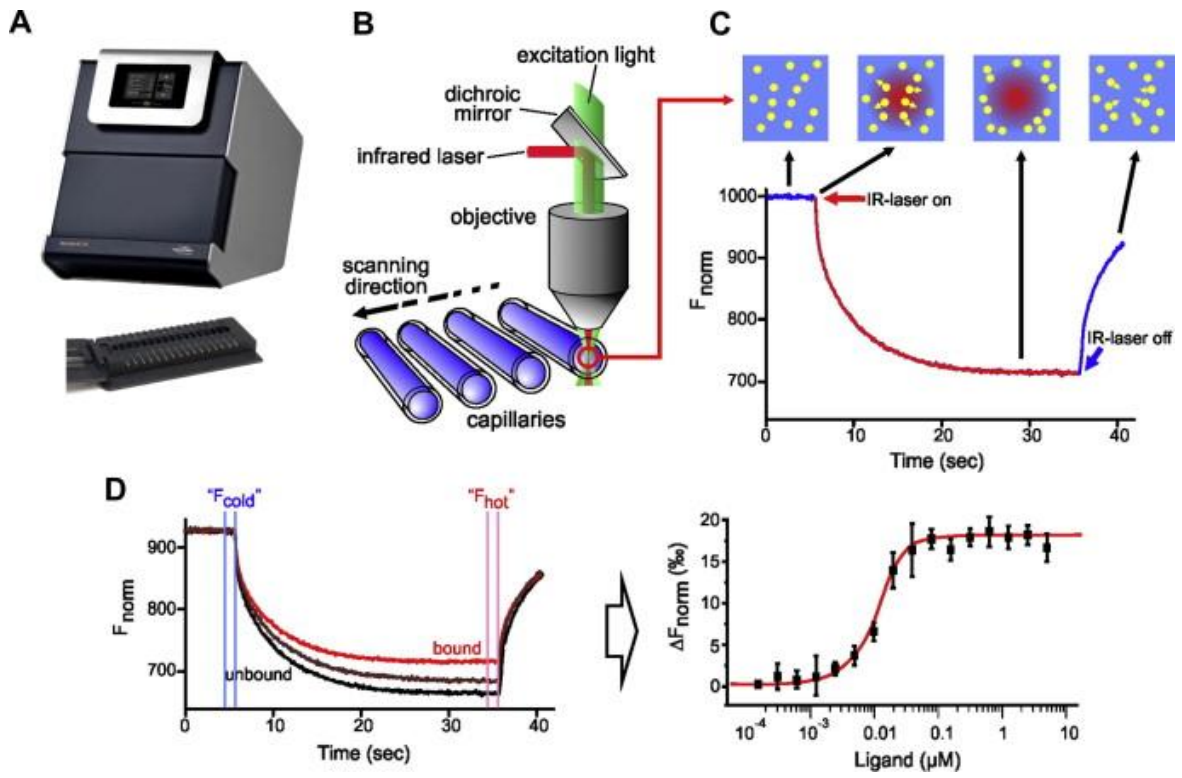


Figure 49 : principe de la thermophorèse (Jerabek-Willemsen et al., 2014) (A) Appareil réalisant l'analyse ; (B) impact du laser sur les capillaires contenant les échantillons ; (C) trace obtenue lors de l'échauffement par le laser (diminution de la fluorescence dû à l'échauffement); (D) obtention d'une courbe dose/réponse

Les expériences de MST ont été réalisées avec un instrument Monolith NT.115 (BLUE/pico-RED, NanoTemper technologies) à 25 °C en configuration Nano BLUE pour enregistrer la fluorescence intrinsèque de la GAC. Les échantillons ont été chargés dans des capillaires standard (NanoTemper Technologies) à une concentration allant de 0,05 % à 0,0005 %. Les paramètres de l'instrument étaient les suivants : puissance des LED de 10 ou 100 %, thermophorèse à micro-échelle moyenne ou élevée, et laser 3/20/1 off/on/off, rapport de fluorescence (froid/chaud) : (-1,0-0,0 s)/(0,5-1,50 s). Les expériences ont été réalisées en triplicata et analysées à l'aide du logiciel MO.Affinity Analysis v2.3 (NanoTemper Technologies). Les données ont été ajustées avec l'équation de Hill (Équation 10 :).

Équation 10 : Calcul de l'EC50

$$f(concentration) = non\ lié + \frac{lié - non\ lié}{1 + \left(\frac{EC50}{C}\right)^{Hill\ coeficiant}}$$

Avec : EC50 la concentration à laquelle 50% des molécules sont sous forme de particules et représentant l'affinité des sous unités de GAC les unes avec les autres et C la concentration de GAC. Le coefficient de Hill correspond au coefficient directeur de la pente des courbes doses réponses et reflète le comportement coopératif mais a été fixé à un (pas de coopérativité) puisque la pente est faible.

Cet appareillage est très sensible à la présence d'agrégats. Lorsque des particules sont présentes dans un échantillon les traces ne correspondent plus aux modèles présentés sur la Figure 49 mais présentent des bosses. Ainsi, la première trace comportant des changements correspond à la première concentration à laquelle se forment des particules.

Des essais ont été réalisés dans un mélange eau : éthanol 50 : 50 qui permet de solubiliser la GAC et ainsi prévenir l'apparition des particules. Cette manipulation est un témoin négatif permettant d'appuyer les résultats obtenus dans l'eau.

2.11 Etude de l'influence des conditions de formation des particules par plan d'expériences

Un plan d'expériences a été conçu pour étudier l'impact des conditions physicochimiques telles que le pH, la température et la force ionique sur la formation des particules de GACD dans l'eau. Il permet de faire varier tous ces paramètres en même temps de manière à obtenir une cartographie représentant la taille et le PDI des particules formées en fonction de la variation des conditions.

Ici un facteur est une condition physico-chimique et un niveau est une valeur de ce facteur par exemple, une température donnée. Pour construire la matrice d'un plan d'expériences il faut définir les bornes des facteurs, c'est-à-dire les valeurs maximales (+1) et minimales (-1).

Ici les facteurs et les bornes sont :

- Température : 20 – 60 °C
- Force ionique : 0 – 130 mM
- pH : 3 - 9

Les plans de type Box Behnken sont de géométrie cubique (Figure 50A) et font appel à 3 niveaux par facteur (-1, 0, +1). Ils sont très utilisés car ils permettent d'obtenir une réponse rapide avec peu d'expérimentations. Néanmoins, ils sont peu robustes en comparaison d'autres types de plans comme les matrices centrées composites qui font appel à 5 niveaux. Ce type de plan fait appel à des points dit en étoiles à l'extérieur des bornes fixées (Figure 50B). Ici, il est impossible d'atteindre une force ionique inférieure à 0 et donc la matrice centrée composite n'est pas utilisable. Cependant, il existe un moyen d'améliorer les plans de type Box Behnken. Il est en effet possible d'optimiser ce type de plan, en ajoutant des niveaux dans les bornes définies (Figure 50C). Ainsi, les points supplémentaires ne se trouvent plus dans un domaine impossible.

Les valeurs des bornes choisies sont présentées dans le Tableau 4. La matrice choisie est présentée dans le Tableau 5. Des points peuvent aussi être ajoutés par la suite de manière à rendre le plan plus robuste.

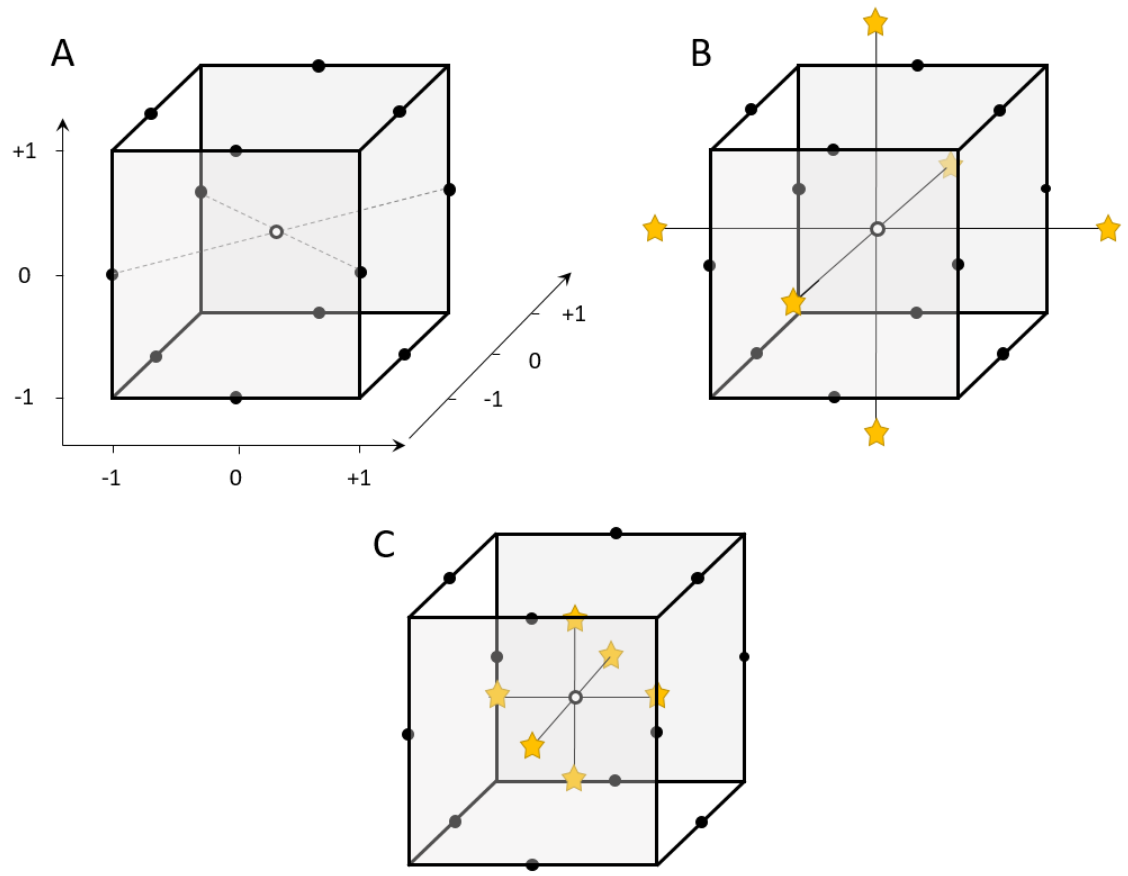


Figure 50 : Géométrie des plans d'expériences type (A) Box Behnken, (B) centré composite et (C) Box Behnken « optimisé »

Tableau 4 : Bornes choisies pour la création du plan d'expériences

Variables indépendants	-α	-1	0	1	+α
Température (°C)	20	27,2	40	52,8	60
Force ionique (mM)	0	23,4	65	106,6	130
pH	3	4,08	6	7,92	9

Tableau 5 : Matrice de plan d'expériences (en orange les points au centre)

Expériences	Température	F ionique	pH
e1	27,2	23,4	7,92
e2	52,8	23,4	7,92
e3	27,2	106,6	7,92
e4	52,8	106,6	7,92
e5	27,2	23,4	4,08
e6	52,8	23,4	4,08
e7	27,2	106,6	4,08
e8	52,8	106,6	4,08
e9	40	65	3
e10	40	65	9
e11	20	65	3
e12	60	65	9
e13	40	0	6
e14	40	130	9
e15	40	65	6
e15	40	65	6
e15	40	65	6
e16	40	65	3
e17	20	65	3
e18	60	65	3
e19	40	65	4,08

Pour étudier l'influence de tous ces paramètres sur la taille et la polydispersité de suspensions aqueuses de GAC, 1 g de GACD a été solubilisé dans 0,5 mL d'un mélange eau : acétonitrile (50 : 50). Tous les échantillons sont thermostatés 15 min à l'avance en fonction de la température désirée. Le mélange a été agité 30 s à l'aide d'un vortex. Le pH a été ajusté grâce à l'ajout de de NaOH ou de HCl. 5 aspirations avec la pipette automatique ont permis d'homogénéiser le milieu, puis, 1,5mL d'eau contenant les sels permettant de fixer la force ionique (NaCl) ont été ajoutés. Cet ajout de phase aqueuse conduit à la formation des particules par effet "ouzo". 5 aspirations avec la pipette automatique ont ensuite à nouveau été effectuées. La lecture de la taille et de la polydispersité des échantillons se fait grâce au Zetasizer Nano à 25°C dans des cuves DTS1070 après 5 min à température. Les points au centre sont réalisés en trois fois.

Pour décrire les données expérimentales, des équations de régression non postulées ont été calculées, avec des régresseurs correspondant à des interactions logiques (ET, OU, SI…) entre les facteurs. Les données expérimentales ont été ajustées à une équation de régression du second degré, conformément à (Lesty, 1999; Lesty & Buat-Ménard, 1982):

L'Équation 11 donne un exemple de modèle généré :

Équation 11 : Equation du modèle

$$Y = b0 + b1\ (Xi\ LIKE\ Xj) + b2\ (X\ ET\ Xj) + ... + bn\ (Xi\ OU\ Xk)$$

Où y est la réponse (taille ou indice de polydispersité), Xi, Xj, sont les variables indépendantes affectant les réponses, b0 est le coefficient d'interception du modèle ; b1, b2... bn sont les coefficients de régression, LIKE, AND, OR, ... sont les expressions des interactions calculées.

Xi LIKE Xj : Y est élevé lorsque X1 varie comme X2

Xi ET Xk : Y est élevé lorsque X1 et X2 sont élevés.

X1 EST MODULÉ par X2 : Y est élevé lorsque X1 est élevé si X2 est élevé.

X1 OU X2 : Y est élevé lorsque X1 est élevé OU X2 est élevé.

Les meilleures conditions pour maximiser ou minimiser les réponses et la frontière de Pareto ont été obtenues en utilisant une méthodologie de surface de réponse (RSM) Monte Carlo de 10 000 tirages. La conception de cette surface de réponse, le traitement des données et l'analyse statistique ont été réalisés à l'aide de pyDOE2 1.3.0 et de Scipy Statsmodels v0.13.0 1.7.1 et des paquets Python LestPy de scriptself-made. Les indices de Sobol de l'analyse de sensibilité ont été réalisés à l'aide de SALib 1.4.5 (Herman & Usher, 2017).

Résultats & Discussion

Résultats & Discussion

1 Article n°1 114

1.1 Introduction 114

1.1 Article 1 : Enzymatic modification of gum Arabic by curcumin oxidation products: physicochemical and self-assembly study 116

1.2 Contribution de l'article 159

2. Article n°2 162

1.3 Introduction 162

1.4 Article n°2 : Self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products in water: critical aggregation concentration and thermodynamic parameters study 164

1.5 Contribution de l'article 192

3 Article n°3 195

1.6 Introduction 195

1.7 Article n°3 : Experimental design to quantify the effects of physico-chemical factors on self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products 197

1.8 Contribution de l'article 221

1 Article n°1

1.1 Introduction

Les derniers travaux menés au sein du LIBio ont permis de démontrer la versatilité de l'utilisation de la laccase pour fonctionnaliser des polysaccharides (chitosane, pectine et gomme d'Acacia) avec des produits d'oxydation de l'acide férulique. Pour ces trois polysaccharides, un greffage covalent des composés phénoliques a été mis en évidence. La présence de ces dérivés d'acide férulique sur ces polymères permet d'apporter à ces derniers une activité antioxydante significative. De plus, le greffage de telles entités entraine un changement important de structure se traduisant par une interaction avec l'eau différente. Lors de ces travaux de thèse, nous nous sommes orientés vers la gomme d'Acacia car cette dernière présente une très grande solubilité dans l'eau avant modification et serait capable de s'auto-assembler à hautes concentrations dans certaines conditions. Lors des travaux de thèse de Marie Vuillemin (Vuillemin, 2019), il s'est avéré que le greffage de produits d'oxydation de l'acide férulique provoquait une diminution de sa solubilité dans l'eau. De nombreux travaux dans la littérature relatent la possibilité de rendre un polysaccharide amphiphile en y greffant des composés hydrophobes tels que des acides gras. D'après les résultats de Marie Vuillemin, la gomme d'Acacia modifiée par des produits d'oxydation de l'acide férulique diminue significativement la tension superficielle. Toujours d'après la bibliographie, jouer sur la balance hydrophilie/hydrophobie d'un polymère est une stratégie de choix pour provoquer son auto-assemblage. Pour se faire, la plupart des travaux misent sur une approche PISA (Polymerization-Induced Self-Assembly) (D'Agosto et al., 2020) ou par le greffage de composés hydrophobes et ce par voie chimique (Besheer et al. 2007; J.-S. Yang, Xie, et He 2011; Y. Yang et al. 2014). D'autres équipes optent pour le greffage de chaines aliphatiques par acylation enzymatique dans des solvants organiques type M2B2 (Kraisomdet et al., 2020) ou par modification dans des solvants non conventionnels comme des liquides ioniques (Lu et

al., 2011; Ma & Lodge, 2016). L'avantage du procédé utilisé au LIBio et basé sur la laccase est que ce dernier est réalisé dans un tampon aqueux. Cependant, toujours d'après les travaux de Marie Vuillemin, il s'avère que les produits d'oxydation de l'acide férulique n'apportent pas suffisamment d'hydrophobie à la gomme d'Acacia pour que cette dernière soit capable de s'auto-assembler dans l'eau. Nous nous sommes donc orientés vers un composé phénolique plus hydrophobe, la curcumine (Kim et al., 2011; Mota et al., 2008). De plus, d'après les travaux de Sarika *et al*., (2015), le greffage de la curcumine par voie chimique sur la gomme d'Acacia entraine la formation de particules nanométriques. Est-ce que cette approche est transposable à la voie de modification utilisant la laccase ? En d'autres termes est-il possible de greffer des dérivés de la curcumine sur la gomme d'Acacia *via* l'oxydation de ce composé phénolique par la laccase ? Quelles sont les propriétés de la gomme d'Acacia ainsi modifiée ? Enfin, que devient son comportement dans l'eau, est-elle capable de s'auto-assembler ?

1.1 Article 1 :

Enzymatic modification of gum Arabic by curcumin oxidation products: physicochemical and self-assembly study

Aurélie A. Adam, Jordane Jasniewski, Marie E. Vuillemin, Blandine Simard, Jennifer Burgain, Régis Badin, Lionel Muniglia and Florentin Michaux*

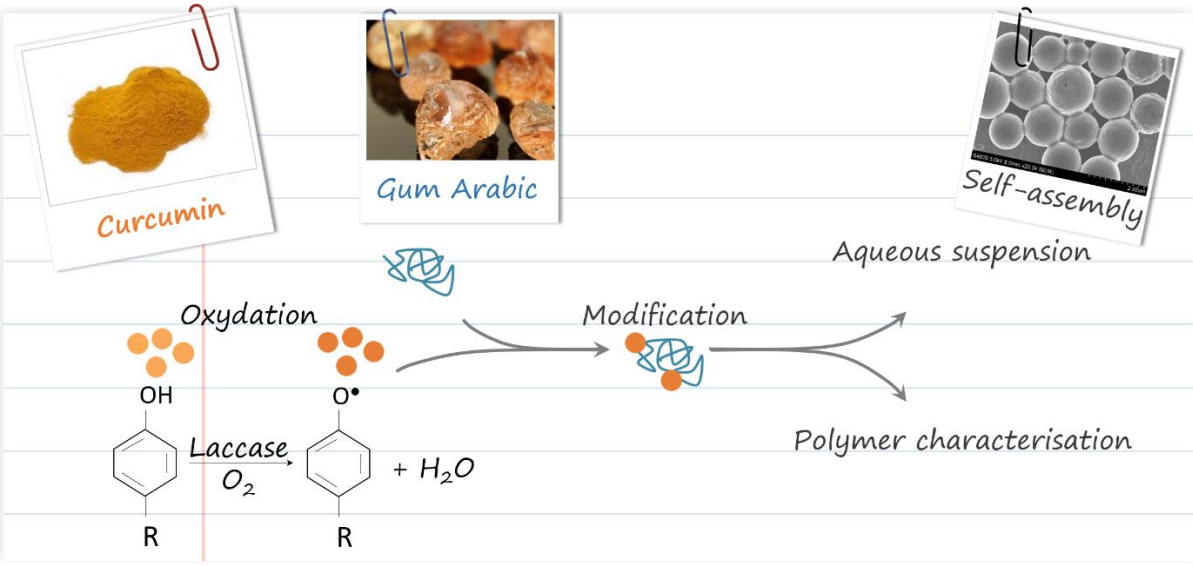
Université de Lorraine, LIBio, F-54000 Nancy, France

* Corresponding author: florentin.michaux@univ-lorraine.fr

Highlights:

- The laccase assisted modification of gum Arabic by curcumin oxidation allowed the grafting of phenolic compounds.
- Contrary to the native one, modified gum Arabic presented a phase transition temperature.
- Due to a higher hydrophobicity, modified gum Arabic formed spherical particles in water.

Graphical abstract:



ABSTRACT: Gum Arabic (GA) is a polysaccharide widely used in industry as an emulsifier and encapsulating agent. Nevertheless, its physicochemical properties can be largely improved. The objective of this study was then to modify its structure to improve its functionalities or to provide new ones. To do so, a heterogeneous catalysis process using a laccase and a phenolic compound, curcumin, in aqueous solution was performed. The laccase allowed the oxidation of curcumin, which was then able to be grafted onto polymer. Therefore, this environmentally friendly process allowed the modification of GA with curcumin oxidation products (OXP) by creating ester bonds between GA and OXP. The molecular mass of GA was largely increased after functionalization. This product contained two fractions of approximately ~1.165 x 10^8 $g.mol^{-1}$ and ~5.057 x 10^6 $g.mol^{-1}$. All these modifications impacted greatly the polymer properties such as its thermal behaviour, with a significant decrease of its glass transition, its hydrophilicity and its hygroscopicity. They also brought antioxidant properties to the modified GA. Moreover, the modification led interestingly to the spontaneous formation of spherical monodisperse micrometric particles in water.

KEYWORDS: gum Arabic, curcumin, self-assembly, thermal behaviour, phenol grafting, laccase

1. Introduction

Gum Arabic (GA), also known as Acacia gum, is a complex polysaccharide exuded by acacia trees such as *Acacia senegal* and *Acacia seyal* to protect themselves against insects and heal their wounds (Lopez-Torrez, Nigen, Williams, Doco, & Sanchez, 2015; Osman, Williams, Menzies, & Philips, 1993; Verbeken, Dierckx, & Dewettinck, 2003). It was already used 70 000 years ago in Africa and by the Egyptians more than 4000 years ago (Renard, Garnier, Lapp, Schmitt, & Sanchez, 2012; Sanchez et al., 2018; Sanchez, Renard, Robert, Schmitt, & Lefebvre, 2002). Nowadays, GA, thanks to its remarkable properties (high solubility in water), is used as a stabilizer or an emulsifier under the European code E414 according to the European food safety authority (EFSA) (Masuelli 2013; Mortensen, Aguilar, Crebelli, Domenico, & Frutos, 2017; Sanchez et al. 2018). It is a common ingredient in confectionery to delay the crystallization of sugar or in wine to prevent pigment precipitation. It is also used in non-food industries, for example as an ingredient in the micro-encapsulation process for the production of carbonless paper (Dickinson, Murray, Stainsby, & Anderson, 1988; Osman et al., 1993; Sanchez et al., 2018).

GA is a highly branched polysaccharide and is composed of main chains of 1,3 linked β-D-galactopyranosyl. The side chains are composed of β-D-galactopyranosyl linked to the main chain in 1,6. Both chains contain α-L-arabinofuranosyl and α-L-rhamnopyranosyl while most of the β-D-glucuronopyranosyl and 4-O-methyl-β-D-glucuropyranosyl are located at the end of the side chains (Aphibanthammakit, Nigen, Gaucel, Sanchez, & Charlier, 2018; Lopez-Torrez et al., 2015; Masuelli 2013; Verbeken, et al., 2003). The exact chemical composition of GA can vary depending on different conditions: origin, age of trees or climatic conditions (Cozic, Picton, Garda, Marlhoux, & Le Cerf, 2009; Lopez-Torrez et al., 2015; Masuelli 2013). Its structure can be separated in three different fractions: arabinogalactan-peptide (AG), arabinogalactan protein (AGP) and glycoprotein (GP), which represent 85-90%, 10% and about

2% of the whole gum, respectively. As suggested by the names of the different fractions, GA also contains a protein part linked to the polysaccharide part by serine and hydroxyproline rich domains. The GP is then the minor fraction but it is the one containing the most proteins, contrary to the AG, which contains the least amount of protein but is the major fraction of the gum. The AGP fraction contains less protein than GP but more than AG. (Lopez-Torrez et al., 2015; Osman et al., 1993; Renard, Lavenant-Gourgeon, Ralet, & Sanchez, 2006; Sanchez et al., 2018).

Despite its many functions, GA has certain limitations. Only one fraction (AGP) is currently valued because it is the only one responsible for the ability of GA to stabilize emulsions (Dickinson et al., 1988; Randall, Phillips, & Williams, 1988; Nakauma et al., 2008).

In addition, compared to other polysaccharides, GA is not the most effective for emulsions stabilization compared to lemon or beet pectin for example (Wu, Kong, Zang, Hua, & Chen, 2015). Nakauma et al (2008) were able to determine that for a 15% wt water : triglyceride emulsion made by high-pressure homogenisation, a higher concentration of GA was required to form a stable emulsion than with beet pectin or soluble polysaccharides from soybean (Nakauma et al., 2008). Another study showed that emulsions formed by agitation in a rotor stator system by GA, would be less stable than those formed by the gum extracted from *Prosopis alba*; for a similar droplet size initially. In addition, the oil/water interface tension is less decreased by GA than by this other gum (Vasile, Martinez, Pizones, Judis, & Mazzobre, 2016). However, from its reactive group, it is possible to modify its properties by modification with exogenous molecules. This has already been recorded in the literature on other polysaccharides (Karaki, Aljawish, Humeau, Muniglia, & Jasniewski, 2016; Li et al. 2016).

GA modifications were then reported. Gum Arabic was functionalized *via* a Maillard reaction with proteins like casein or canola protein to enhance its emulsifying properties (Hou, Wu, Xia, Phillips, & Cui, 2017; Pirestani, Nasirpour, Keramat, Desobry, & Jasniewski, 2017).

It has also been modified to form particles as shown by Sarika, James, Kumar, Raj, & Kumary (2015) where the binding of curcumin derivatives has shown to change the physicochemical properties of GA. The formation of spherical particles closed to 200 nm of diameter was demonstrated as well as an increase in anticancer properties compared to free curcumin.

The latter paper, such as most papers dealing with polysaccharide modification used a chemical pathway to obtain the modified polymer. Softer processes were rarer but still exist. For example, chitosan and pectin were functionalized with phenolic compounds produced by laccase catalyzed oxidation of of ferulic acid and ethyl ferulate. The grafting was found to be covalent between carboxyl groups of pectin or the amine groups of chitosan and the oxidation products of the phenolic compounds. The polymer hygroscopicity was decreased and hydrophilicity increased because the oxidation products inserted into pectin backbone increased the space between the polymer chains. A significant improvement in antioxidant properties was also noted in both polysaccharides (Aljawish et al., 2014; Karaki Aljawish, Muniglia, Humeau, & Jasniewski, 2016).

GA was also modified through an enzymatic process. A laccase was used to oxidize ferulic acid to form reactive derivatives (oxidation products), which could then react with the functional groups of GA such as amines or carboxylic acids. The resulting modified polymer exhibited a greater ability to reduce the surface tension of water compared to GA. This modification also induced a decrease in the interfacial tension between water and oil, which could led to improved emulsifying capabilities. Another interesting aspect of this study was the increase of the antioxidant properties of the modified polysaccharide. These modifications also led to structural changes, modification of its water solubility, its thermal behaviour and its colour (Vuillemin et al., 2020).

In the present study, a similar procedure was used, based on the enzymatic oxidation of curcumin, which then reacted with the functional groups of GA. Curcumin is already in itself a

food-grade compound widely used for its colour but especially for its various properties (antioxidant and anticancer activities). Moreover, it is largely hydrophobic, which could modify the hydrophilic/hydrophobic balance of the GA by increasing the hydrophobicity and thus induce a self-assembly in water. This modification was made in order to modify the physicochemical properties of the GA. Indeed, this one has a great solubility in water (up to 37% at 25 °C) (Sanchez et al. 2018). Grafting a hydrophobic compound such as oxidation products of curcumin would therefore modify its behaviour in aqueous media. Furthermore, phenolic compounds could also bring a certain antioxidant activity to the gum which could be an advantage for the new polymer.

The grafting of the oxidation products (OXP) was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy and SEC-MALS (size exclusion chromatography multi angle light scattering) analysis. The modification of physicochemical properties was analysed by thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and measurement of surface tension in water and antioxidant properties. Finally, the main impact of the modification of GA was the formation of particles by self-assembly in water. These particles were characterized by dynamic light scattering, epifluorescence microscopy, SEM (scanning electron microscopy) and AFM (atomic force microscopy).

2. Materials and methods

2.1 Materials

Gum Arabic (100% w/w) purified Instantgum AA from *Acacia senegal* was a gift from Nexira (France). Curcumin ≥ 65% w/w (Cur) and salt for buffer solution (Na_2HPO_4, KH_2PO_4) were purchased from Sigma Aldrich (France). Ethanol (analytical grade) was purchased from Carlo Erba (France).

The laccase used was Novozym 51003 from Novozymes (BGAsvaerdt, Denmark) which is a fungal phenol oxidase from *Myceliophtora thermophila* produced in *Aspergillus oryzae.* The activity of the laccase stock is expressed in Laccase *Myceliophthora* Units (LAMU). One LAMU is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 micromole of syringaldazine per minute. The laccase activity was 22 315 ± 2 732 LAMU.g^{-1}.

2.2. Methods

2.2.1. Functionalization of Acacia gum by curcumin oxidation products

The method used was adapted from literature (Vuillemin et al., 2020; 2021). 10 g of GA was added in 450 mL of 50 mM phosphate buffer; pH 7.4 and stirred overnight at 4 °C. GA solubility in phosphate buffer is very low but it has been shown that functionalization can be achieved under heterogeneous conditions (Vuillemin et al., 2021; 2020; Aljawish et al.,2012; Karaki, et al., 2016). The resulting dispersion was then heated under stirring to 30 °C using a magnetic heating plate. 50 ml of 50 mM curcumin solution in ethanol was then added to the GA dispersion. Then 10.25 LAMU.mL^{-1} of laccase was added. The reaction was stopped by adding 3 volumes (1.5 L) of frozen ethanol and was then kept at -21 °C for 24 h. This procedure also allowed the separation of functionalized and non-functionalized polymers contained in the mixture at the end of the reaction (Vuillemin et al., 2020). Indeed, gum Arabic-oxidized curcumin (GAC) was soluble in a water/ethanol 1:3 mixture, unlike native GA, which

precipitated in this solvent. The native GA was then eliminated by centrifugation at 12 100 *g* for 10 min. The salts from the buffer were distributed between the two phases. Ethanol contained in the supernatant was evaporated by a BUCHI R144 rotary evaporator at a boiling point of 40 °C at 175 mbar (BUCHI SARL, Rungis, France). The sample (water-suspended GAC) was then frozen and freeze-dried for 24 h. Dialysis (MWCO 10 000 Da from Membrane Filtration Products Inc.) of the freeze-dried sample against pure water was then performed to remove buffer salts and recover pure modified GA referred to GACD to differentiate it from GAC, which was not dialyzed.

2.2.2. Structure of functionalized Acacia gum

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to investigate the impact of functionalization on GA chemical structure. The different compounds were analysed in the solid state so that they would not be affected by water absorption in the region of the amide I band (1720-1580 cm^{-1}). Measurements were performed using a Tensor 27 spectrometer equipped with a DTGS detector (Bruker, Germany). The GACD powder was placed on a diamond ATR top-plate (ATR Platinum, Bruker, Germany). Recording was performed with 64 scans, 10 kHz scanning, spectra from 400 to 4000 cm^{-1} and 6 cm^{-1} of resolution. The background was measured on air to be subtracted from the raw spectra. The raw data were collected by OPUS software version 7.2 (Bruker, Germany) and then underwent different treatments which were in sequence: extended ATR correction; transmittance to absorbance spectrum conversion; H_2O/CO_2 compensation: straight line generation on the blind area of the diamond detector; 9 points smoothing; baseline correction; offset normalization. All the measurements were performed in triplicate. The degree of esterification was calculated using equation 1.

esterification degree = peak area at 1730 cm^{-1} / (peak area at 1730 cm^{-1} + peak area at 1650 cm^{-1}) * 100 Eq (1)

2.2.3. Polymer molecular weight

SEC experiments were performed with a HPLC pump (LC10AD, Shimadzu) coupled to an autosampler (Autosampler VE 2001, Malvern Panalytical) and a multi-detectors system recording UV, light scattering (RALS: right angle light scattering and LALS: left angle light scattering), intrinsic viscosity and refractive index signals (Viscotek TDA305, Malvern Panalytical). Two SEC columns (A4000-A6000, 10 or 13 µm, 8 mm ID x 300 mm, void volume ~6 mL, total volume ~ 12.5 mL, Malvern Panalytical) were mounted in series and equipped with a post-column nylon filter (0.22 µm). The columns were equilibrated with DMAC/H_2O 50:50. The flow rate was 0.1 $mL.min^{-1}$ and the temperature was 30 °C. Data were processed with the Omnisec software (v5.12, Malvern Panalytical). The calibration procedure was done with Bovin Serum Albumin (Sigma) and cross-validations were performed with Dextran 70 kDa standard (Viscotek PolyCal standards, Malvern Panalytical). The refractometer was used as the concentration detector and the refractive index increment value (dn/dc) used to determine the molecular weight was 0.136 $mL.g^{-1}$ (Grein, Da Silva, Wendel, Tischer, & Sierakowski, 2013). GACD samples were solubilized in the aforementioned buffer at 10 $g.L^{-1}$ and filtered through a 0.22 µm RC-filter just before injection. All the measurements were performed in triplicate and expressed with mean ± standard deviation.

2.2.4. Antioxidant activity

The antioxidant activity of GAC and curcumin were determined by carrying out tests of $ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging. The method was adapted from Karaki et al., 2016b and Vuillemin et al., 2020. Solutions of $ABTS^{\bullet+}$ (2,45 mM) were diluted to obtain an absorbance of 0.680 ± 0.02 AU (arbitrary units) at 734 nm. 1 ml of this solution was then added to 10 µL of sample with a concentration ranging from 0.5 to 0.0005% (wt). After incubation at 30 °C for 20 min and colour stabilization, the absorbance was measured at 734 nm in a quartz cell. All the measurements were performed in triplicate and expressed with mean ± standard deviation.

The percentage of inhibition of the studied molecules was calculated using the equation 2 where: final A was the absorbance of the $ABTS^{\bullet+}$ solution which has reacted with the studied molecule and where initial A was the absorbance of the $ABTS^{\bullet+}$ solution which had not yet reacted. The values were then expressed in EC50 ± standard deviation. This was the concentration for which the molecule of interest inhibits 50% of the $ABTS^{\bullet+}$ radicals.

inhibition (%) $ABTS^{\bullet+}$ = 1 - (final A / initial A) *100 Eq (2)

2.2.5. Thermal behaviour analysis

Thermogravimetric Analyses (TGA) were performed on GA, GACD and Curcumin to investigate the impact of functionalization on GA thermal stability. The experiments were performed using a thermogravimetric analysis apparatus (TGA 5500, TA Instruments, Waters, France) under N_2 gas. The heating rate was 20 °C.min^{-1} from 30 °C to 600 °C and the mass of the sample was approximately 6 mg ± 2 mg. Raw data were collected and analysed using TRIOS software (TA Instruments, Waters, France) to recover thermograms and their derivatives. Each step of compound degradation was determined using the obtained derivatives. All the measurements were performed in triplicate.

Differential Scanning Calorimetry (DSC) was performed to investigate the impact of functionalization on GA thermal behaviour (DSC 250, TA Instruments, Waters, France). 6 ± 2 mg of GACD, GA or curcumin were filled in a Tzero hermetic aluminium pan to be analysed (TA Instruments). A Heat-Cold-Heat method was chosen. First, the samples were equilibrated at -50 °C, then heated from -50 °C to 100 °C at 10 °C.min^{-1} to eliminate the thermal history of the samples. Next, they were cooled at -50 °C at 10 °C.min^{-1}, and finally, heated again to 100 °C at 10 °C.min^{-1}. All steps were separated by an isothermal step of 2 min. Data were collected using TRIOS software (TA Instruments), which allowed automatic detection of the Tg (glass

transition temperature). All the measurements were performed in triplicate and expressed with mean ± standard deviation.

2.2.6. Hygroscopy

The water sorption isotherm of GA and GACD was performed to determine whether the functionalization had an impact on the hygroscopy of the polysaccharide. The results were obtained by depositing 90 ± 10 mg for GA and 50 ± 10 mg for GACD in the sealed chamber of the dynamic vapour sorption analyser (DVS, Surface Measurement Systems Ltd., London, UK). This weight difference was due to the greater volume taken up by the GACD powder (lower powder density) in the capsule of the machine. The temperature was set at 25 °C. The relative humidity (RH) was first brought as low as possible (approx. 0.1 %) and then increased by 10% steps to 85%. The balancing times for the individual steps were set manually such as: (1) for GACD: 500 min for 0.1%; 200 min for 10 to 60%; 300 min for 70%; 500 min for 80% and 250 for 85% and (2) for GA: 800 min for 0.1%; 400 min for 20 to 40%; 200 min for 50%; 450 min for 60%; 700 min for 70%; 800 min for 80% and 900 min for 85%. The weights were measured in continuous but only the weights at equilibrium were recorded. All the measurements were performed in triplicate and expressed with mean ± standard deviation.

2.2.7. Preparation of aqueous samples: particle dispersion

GAC was dispersed in ultra-pure water at 0.5 wt.% and stored overnight at 4 °C under stirring. This solution was then diluted in ultra-pure water at a chosen concentration for specific investigations.

2.2.8. Surface tension measurement

The surface tension of GAC dispersions in ultrapure water was measured at 25 °C using a Kruss K100 tensiometer (Krüss, Paris, France) equipped with a Wilhelmy plate. In this method a platinum plate was placed at the water/air interface and allowed the capillary force of the solution to be measured. The data were collected continuously over a maximum duration of 21000 s in order to reach the equilibrium. Before each measurement, the cleanliness of the equipment used was checked by carrying out a measurement on ultra-pure water in order to avoid any interference; a value of 72.5 ± 0.3 $mN.m^{-1}$ had to be reached.

The evolution of surface tension γ as a function of time was modelled using equation 3 (Mahfoudhi et al., 2014). This equation provides the equilibrium surface tension value (γf) for infinite time. The parameters τ1, τ2, γ1 and γ2 were the one to characterize the decay of the surface tension values. τ1 corresponded to the migration time of the emulsifier to the interface and τ2 to the time needed for the reorganization of the molecules at the interphase. γ1 and γ2, in turn, corresponded to the surface tensions corresponding to these different times. γ represented the surface tension at any time. t corresponded to the time of the measurement. The measurements were performed in triplicate and expressed with mean ± standard deviation.

$$\gamma = \gamma_f + (\gamma_1 - \gamma_f) \,.\, e^{-t/\tau 1} + (\gamma_2 - \gamma_f) \,.\, e^{-t/\tau 2} \qquad \text{Eq (3)}$$

2.2.9. Size and electrophoresis mobility measurements

Size of self-assembled GAC particles was determined with Zetasizer nano-ZS apparatus (Malvern Panalytical, United Kingdom) equipped with a He/Ne ion laser (λ = 532 nm) in a backscattering configuration (measurement angle was of 173 °). Experiments were performed at 25 °C with an equilibrating time of 120 s in a disposable folded capillary cell (DTS1070, Malvern Panalytical). Measurements were made in triplicate and expressed with mean ± standard deviation.

2.2.10. Morphological study

Particles morphology of GAC was visualised by a Hitachi S-4800 Field-Effect scanning electron microscopy (SEM) operating at 1.0 kV with a field emission gun (cold cathode). A droplet of a sample at 0.05 wt.% in ultra-pure water was dropped off onto an aluminium plot and let air-dried at room temperature during 48 h and then coated with carbon.

Epifluorescence microscope observations with a LEITZ DMR microscope (Germany) and with an H3 Micfilter were also performed in order to visualize the presence of phenols in the particles. Image capturing was carried out by a monochrome CCD COHU camera and was captured at magnification of × 40 with an ocular magnification of ×10. The excitation wavelength was of 420 nm. Observations were made by smearing a 0.05% aqueous solution of GAC with a magnification × 400 and × 1000 by immersion.

Surface structure of freeze-dried particles was recorded using atomic force microscopy (AFM) (Flex-Axiom, Nanosurf, Liestal, Switzerland) with the Nanosurf C3000 controller software. Powders were gently dispersed on a thin layer of epoxy glue spread onto a circular glass slide. Particle surface properties (topography and elasticity) were recorded at 22 ± 2 °C using an AFM cantilever (Stat0.2LauD cantilevers from Nanosurf, Liestal, Switzerland) having a spring constant of 0.2 $N.m^{-1}$. Topography acquisition was performed in air, in contact mode on a 5 µm × 5 µm surface area. Mechanical properties of GAC were probed at the nanoscale by AFM nanoindentation technique. The force-distance curves recorded by AFM were analysed according to the theoretical Hertz model to extract the mechanical properties (e.g. elasticity). Defined areas of 5 µm × 5 µm were probed to generate elasticity maps. The cantilever spring constant was calculated thanks to the thermal calibration method and deflection sensitivity calibrated onto a silicon surface. Elasticity maps of 1024 force curves were processed with the ANA Software (Nanosurf, Liestal, Switzerland). At least three topography images and 3 elasticity maps were recorded and analysed.

3. Results and discussion

3.1. Structure of modified Acacia gum

FTIR analyses were performed to evidence changes in the chemical structure of GA induced by the functionalization process. The polymer modification can lead to diverse changes in GA structure observable on FTIR spectra. Polysaccharides modification with the OXP of phenolics compounds can lead to the formation of ester and/or amide bonds. Indeed, the oxidation of phenol by phenol oxidases may lead to the formation of semi-quinones which then react with carboxylic acid groups of glucuronic acid of GA (Lopez-Torrez et al., 2015) to form ester bonds. The protein fraction of GA may also react to form amide bonds with oxidised phenol (Vuillemin et al., 2020). Formation of ester bonds have already been reported between pectin and oxidation products obtained from ferulic acid (Karaki, Aljawish, Muniglia, Bouguet-Bonnet, & Laclerc, 2017). The oxidation of phenols such as tannic acid, quercetin, caffeic acid or gallic acid could lead to the formation of ester or amide bond on polysaccharide such as chitosan (Božič, Gorgieva, & Kokol 2012a; 2012b). Indeed the modification *via* phenol oxidases mediated-system has led to the formation of quinones, which can react with nucleophilic groups such as amines to produce Schiff bases (Aljawish et al., 2014; Kumar, Smith, & Payne 1999).

The complete spectra of GACD, curcumin and GA are visible on Figure 1A. The fingerprint of these compounds was found between 1800 and 400 cm^{-1}. A focus on this specific area is presented in Figure 1B.

From 3600 to 3000 cm^{-1} the broad band corresponded to the characteristic stretching of O-H and N-H bonds (Božič et al., 2012b; Liu, You, Tarafder, Zou, & Fang 2019). It was possible to see two peaks on the curcumin spectrum, one at 3510 cm^{-1} and the other one at 1279 cm^{-1} corresponding to the stretching and the bending of the phenolic -OH groups, respectively (Božič

et al., 2012b; Liu et al., Ying, Cai, & Le, 2017; Nascimento da Silva, de Matos Fonseca, Feldhaus, Soares, & Valencia, 2019). Peaks located at 1600 and 1508 cm^{-1} corresponded to the stretching of the C=C bonds of the cyclic alkenes (Božič et al., 2012b; Hasan et al., 2016; Poljanšek, Šebenik, & Krajnc 2006). These peaks were correlated to aromatic rings in curcumin. C-O-C bonds sign at 1026 cm^{-1} corresponding to the $COCH_3$ groups in its structure (Liu et al., 2019; Poljanšek et al., 2006). The peak at 1279 cm^{-1} corresponded to the phenolic C-OH (Liu et al., 2019; Poljanšek et al., 2006)

On the spectrum of GA, peaks corresponding to the amide bands I and II at 1649 cm^{-1} and 1597 cm^{-1} respectively were visible. The amide III band was located at 1225 cm^{-1}. (Liu et al., 2019; Liu, Cai, Jiang, Wu, & Le, 2016; Lopez-Torrez et al., 2015)

On the GACD spectrum the same two peaks as visible on curcumin spectra were reported at 1600 and 1508 cm^{-1} which corresponded to the stretching of the C=C bonds of the cyclic alkenes (Božič et al., 2012b; Hasan et al., 2016; Poljanšek et al., 2006). These peaks suggested that aromatic rings were also present in GACD structure. However, the peak at 1600 cm^{-1} was, on GACD spectrum, broadened by the presence of two other peaks and in particular a peak at 1589 cm^{-1} corresponding to the signals of the amide II band (Liu et al., 2019; Liu et al., 2016) indicating the presence of proteins brought by the GA. The amide III band was not clearly visible because it signed in an area where too many bonds vibrated. The amide I band was present at 1627 cm^{-1} but this peak also corresponded to the signals of the C=O from curcumin and from COO- groups notably brought by the polysaccharidic part of the GA (Abdul Rohman, Sudjadi, Devi, Dwiky Ramadhani, & Ardi Nugroho, 2015; Lopez-Torrez et al., 2015; Mundlia, Ahuja, Kumar, & Pillay, 2019).

The peak corresponding to the phenolic C-OH at 1279 cm^{-1} on the curcumin spectrum shifted to 1265 cm^{-1} on the GACD spectrum. This change could be induced by the formation

of ester bonds since this type of bond brings C-O bonds that stretched asymmetrically at this wave number (Liu et al., 2019; Poljanšek et al., 2006).

This hypothesis was correlated by the appearance of a new peak on the GACD spectrum at 1730 cm^{-1}. This peak was characteristic of the stretching vibration of the C=O carbonyl bonds of esterified carboxyl functions (Božič et al., 2012a; 2012a; Karaki et al., 2017; 2017; Vuillemin et al., 2020). There was therefore a combination of clues that an ester bond was formed between the hydroxyl groups of curcumin and the carboxyl groups of GA.

The degree of esterification of GACD, calculated from the intensity of the free and esterified carbonyl peaks, was 11.4% whereas it was equal to 2.6% for native GA. The functionalization allowed to esterify 8.8% more of COO^- group. This result should be taken with caution because the presence of the amide I band at the same wave number as the carbonyl groups did not allow to evaluate precisely the esterification degree. Nevertheless, the presence of amide band also allowed to think that some of the protein fraction of the GA was well present. It is also possible that some bonds were formed between the OXP of curcumin and proteins.

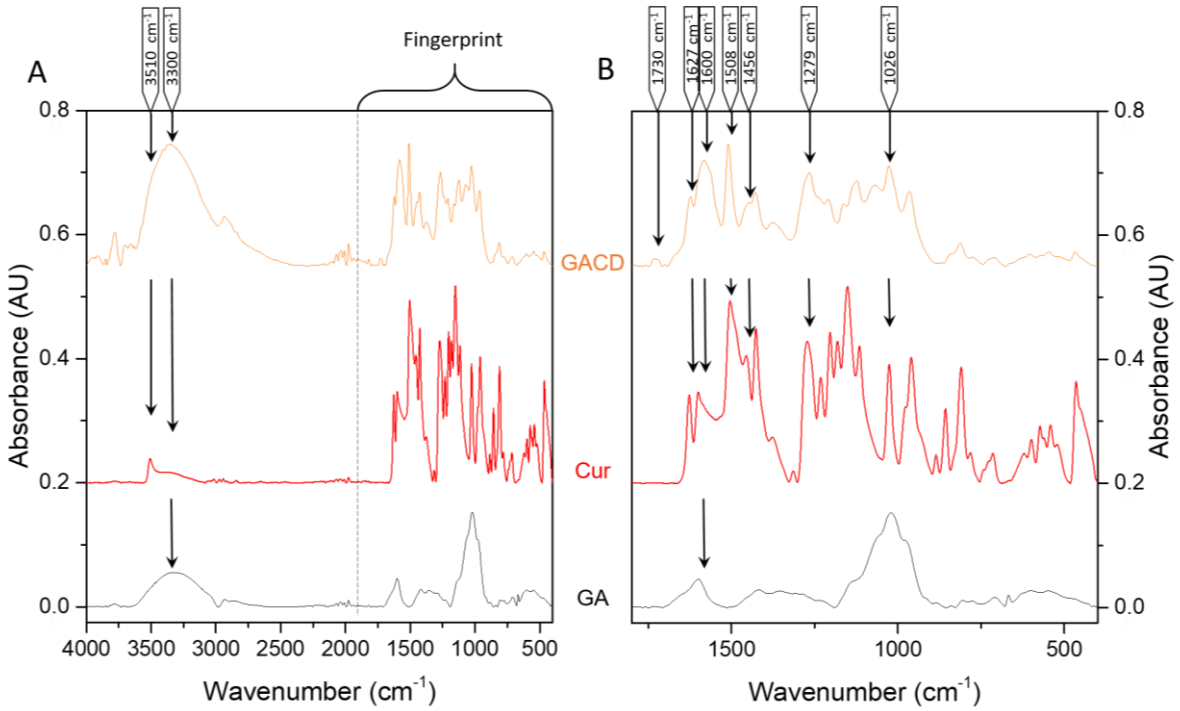


Figure 1: (A) FTIR spectra of gum Arabic (GA) (black), of curcumin (Cur) shifted by 0.2 AU (red) and GACD shifted by 0.55 AU (orange); (B) focused FTIR spectra of GA, Cur and GACD between 600 and 1800 cm^{-1}

3.2. Polymer weight

The impact of curcumin OXP grafting on the molecular weight and hydrodynamic radius of GA has been determined using size exclusion chromatography coupled to a multi-detectors system (UV, LS, IV and RI signals were recorded). GAC was analyzed (Figure 2) and two peaks were observed, probably corresponding to the modified AGP and AG fractions of 1.249 x 10^6 $g.mol^{-1}$ (Vuillemin et al., 2021). Indeed, due to the low UV signal at 280 nm, it was concluded that GP fraction was eliminated during ethanol precipitation realized after the enzymatic reaction leaving only a purified and functionalized AGP and AG fractions. The proportion of each fraction was determined using RI detector (2.5% for AGP and 97.5% for AG). The determination of *Mw* using light scattering gave *Mw* of ~1.165 x 10^8 $g.mol^{-1}$ and ~5.057 x 10^6 $g.mol^{-1}$ for these respective fractions. Finally, the determination of the hydrodynamic radius (*Rh*) was performed thanks to IV detector, giving values of ~222 and 59 nm (see Table S1 in supplementary materials for a summary of the derived parameters).

Compared to the native gum Arabic (Vuillemin et al., 2021), the calculated molecular weights of the two fractions of the GAC were very high, suggesting an important grafting of curcumin OXP onto the polysaccharide and probably a crosslinking between the fractions.

A very low UV signal at 280 nm was observed, the determination or estimation of the protein content of each fraction was not possible. However, a considerable absorbance at 300 nm was observed, certainly due to curcumin OXP present on GAC. Surprisingly, no UV signal at 420 nm was observed suggesting the absence of accessible curcumin onto GAC.

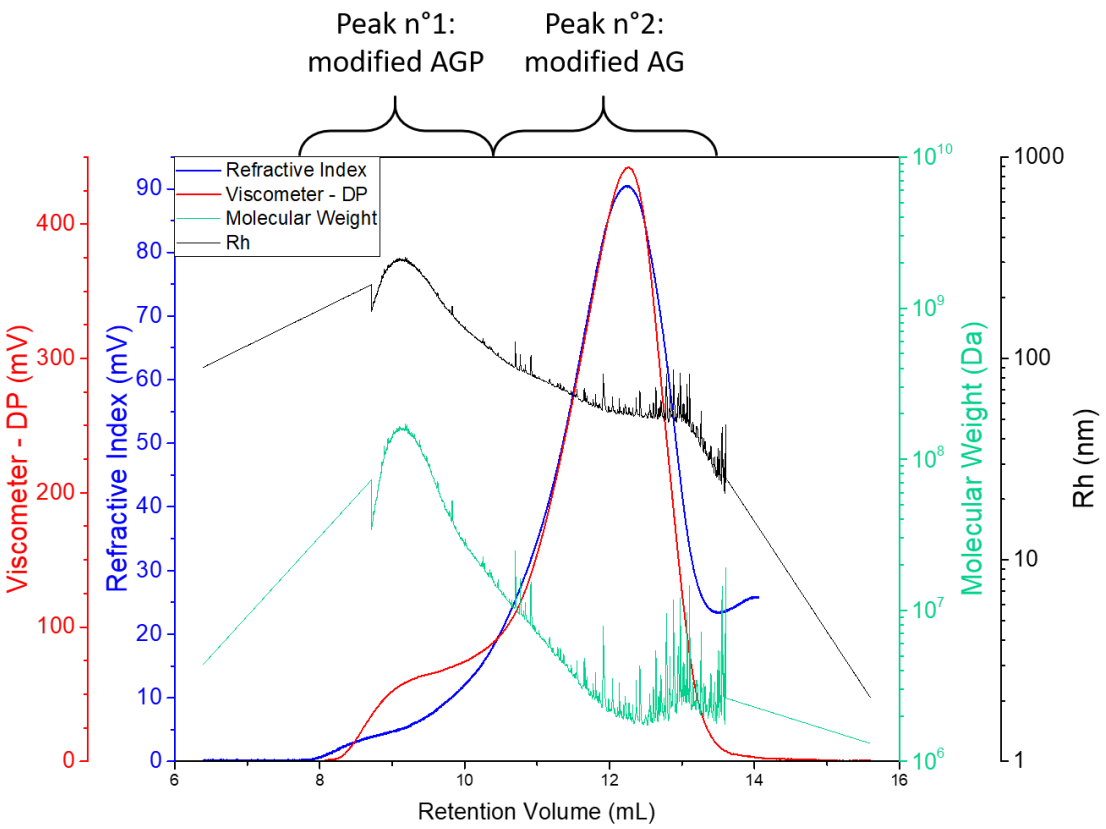


Figure 2: Size exclusion chromatography characterization (refractive index blue, viscometer red, M_w green and Rh black) of GAC. AG = arabinogalactan-peptide, AGP = arabinogalactan protein.

Table S1: parameters calculated from SEC-multi-detectors experiments

Peak	Peak 1	Peak 2
Ret Vol (mL)	9.39	12,225
Mn ($g.mol^{-1}$)	1.029×10^7	3.527×10^6
Mw ($g.mol^{-1}$)	1.165×10^8	5.057×10^6
Mz ($g.mol^{-1}$)	1.713×10^8	8.969×10^6
Mp ($g.mol^{-1}$)	1.524×10^8	2.607×10^6
Mw/Mn	11.325	1.434
IV (dL/g)	7.2531	3.2351
Rh(w) (nm)	222.166	59.39
Wt Fr (Peak)	2.5%	97.5%
RI Area (mVmL)	4.5	172.11
RALS Area (mVmL)	448.43	444.17
LALS Area (mVmL)	1043.24	794.15
IVDP Area (mVmL)	44.92	798.68
Input Conc (mg/mL)	50	
Calculated Conc (mg/mL)	5.084	
Recovery %	10.168	
dn/dc (mL/g)	0.136	

3.3. Antioxidant activity

GA is a polymer that contains a small proportion of phenolic compounds such as catechin and gallic acid. These phenols give to the GA a very low antioxidant activity (Hamdani, Wani, Bhat, & Masoodi, 2018; Tahir et al., 2018). Their quantity is so small in relation to the total amount of GA that it shows only a very low antioxidant activity. Its EC50 is around 560 $g.L^{-1}$ according to the literature (Vuillemin et al., 2020). The addition of phenol derivatives improved its antioxidant activity. The EC50 of the GAC was 20.9 ± 0.8 $mg.L^{-1}$ (about 0.002% wt). The antioxidant activity of the gum was stepped up by 25 000, due to the intake of OXP. In comparison, pure native curcumin, which is well known for its antioxidant activity, presents an EC50 of 3.7 ± 0.5 $mg.L^{-1}$. The modification of GA from the grafting of antioxidant molecules

such as oxidation products of ferulic acid, a structural analogue of curcumin with only one phenolic ring, using a similar pathway as the one use in this study, has already allowed to increase the antioxidant activity of GA to 1.33 $g.L^{-1}$ (Vuillemin et al., 2020). Using OXP coming from curcumin allowed an even better antioxidant activity.

3.4. Thermal analysis

Modification of GA with curcumin derivatives modified many physicochemical properties of GA. With this mind, thermal analyses were carried out by TGA and DSC.

Thermal stability has been determined to observe the change in GA degradation upon temperature after functionalization. Figure 3 shows the thermograms of GA, GACD and curcumin.

The first weight loss recorded before 100 °C corresponded to weakly bound water whereas more strongly bound water was detected up to 150 °C. In this temperature range, different behaviours between the native and the functionalized gum were reported. This first stage of degradation before 150 °C represented about 6 and 3% of their total weight for GA and GACD, respectively. Moreover, GACD lost all of its water before 100 °C, whereas GA weight losses were about 6% before 100 °C and 4% between 100 and 150 °C. It seemed then that GACD was relatively less hygroscopic than GA since it contained a lower amount of strongly bound water. GACD was also more hydrophobic than GA because it contained less water, and the greater the degradation step in this temperature range is, the more hydrophilic the polymers are (Zohuriaan & Shokrolahi 2004). These differences could be due to the presence of grafted OXP that would have modified the hydrophilic properties of gum Arabic by increasing its hydrophobicity. This was already noticed by Vuillemin et al., (2020) for gum Arabic modified by oxidation products of ferulic acid. It may also modify the inter-chain spacing of the polymer, giving more space to water adsorption which then modified the hygroscopy. Curcumin contained almost no water

without any weight loss below 150 °C. This seemed to make sense since it was a very hydrophobic molecule.

A second and more important stage of degradation was observed at higher temperatures. This weight decrease was the greatest for GA (~ 60% of the total weight between 225 °C and 400 °C and ~ 40% of the total weight for GACD in the given temperature range) and could correspond to a decomposition step of the polymer. This degradation step showed that GACD was less temperature stable than native GA since it started to degrade before.

At 600 °C, at the end of the heating process, more residue remained for GACD (~ 40%) than for GA (~20%). These obtained data with GA have been correlated with those reported in the literature (Cozic et al., 2009; Mothé & Rao 2000; Zohuriaan et al., 2004).

Therefore, functionalization had an impact by changing the thermal stability of the polymer. It had already been noted in the literature that the functionalization of gum Arabic modified its temperature stability (Ahmad, Mazumdar, & Kumar 2013; Zohuriaan-Mehr, Motazedi, Kabiri, & Ershad-Langroudi, 2005) and especially its functionalization by phenols (Vuillemin et al., 2020).

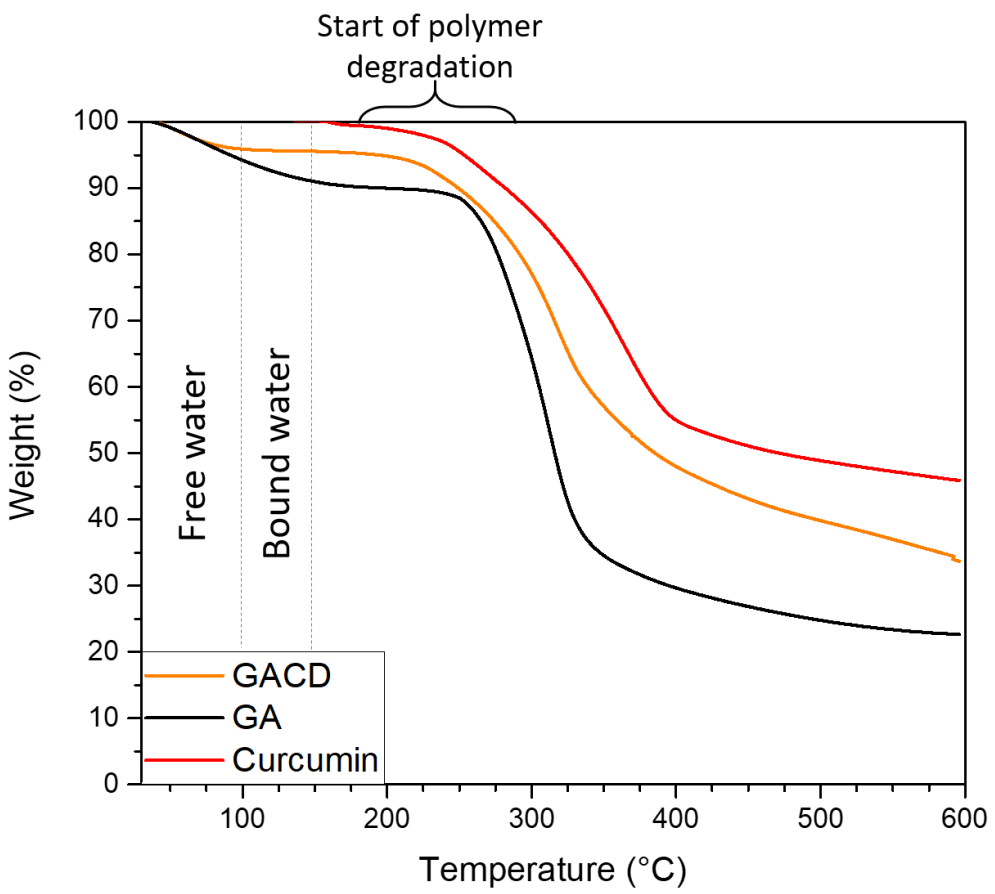


Figure 3: Thermograms of GA (black), GACD (orange) and Curcumin (red) obtained by TGA

Thermal behaviour was studied by DSC (Figure 4). GA and curcumin thermogram did not show any significant event in the studied temperature range. It is quite frequent that in the studied temperature range no Tg was detected on the GA thermograms as it has been reported by various authors such as Mothé et al., (2000), Zohuriaan et al., (2004) or Sabet, Rashidinejad, Melton, Zujovic, & Akbarinejad et al., (2021). The difference that can be observed on DSC thermograms closed to 60 °C between the first heating vs. cooling and second heating corresponded to an enthalpic relaxation due to the thermal history of the sample.

After functionalization with OXP of curcumin, gum Arabic exhibited a glass transition (a significative endothermic thermal event) at 51 °C ± 7 °C. The presence of this new event allowed thinking that oxidized compounds fixed onto the polysaccharide modified the inter-chain spaces of the polymer by filling steric hindrance. This steric modification allowed gum

Arabic to obtain a rubber amorphous state over 51 °C. These kind of results were already reported onto pectin or inulin modified by ferulic acid or catechin (Karaki et al., 2016; Spizzirri et al., 2010) and on GA modified by ferulic acid (Vuillemin et al., 2020).

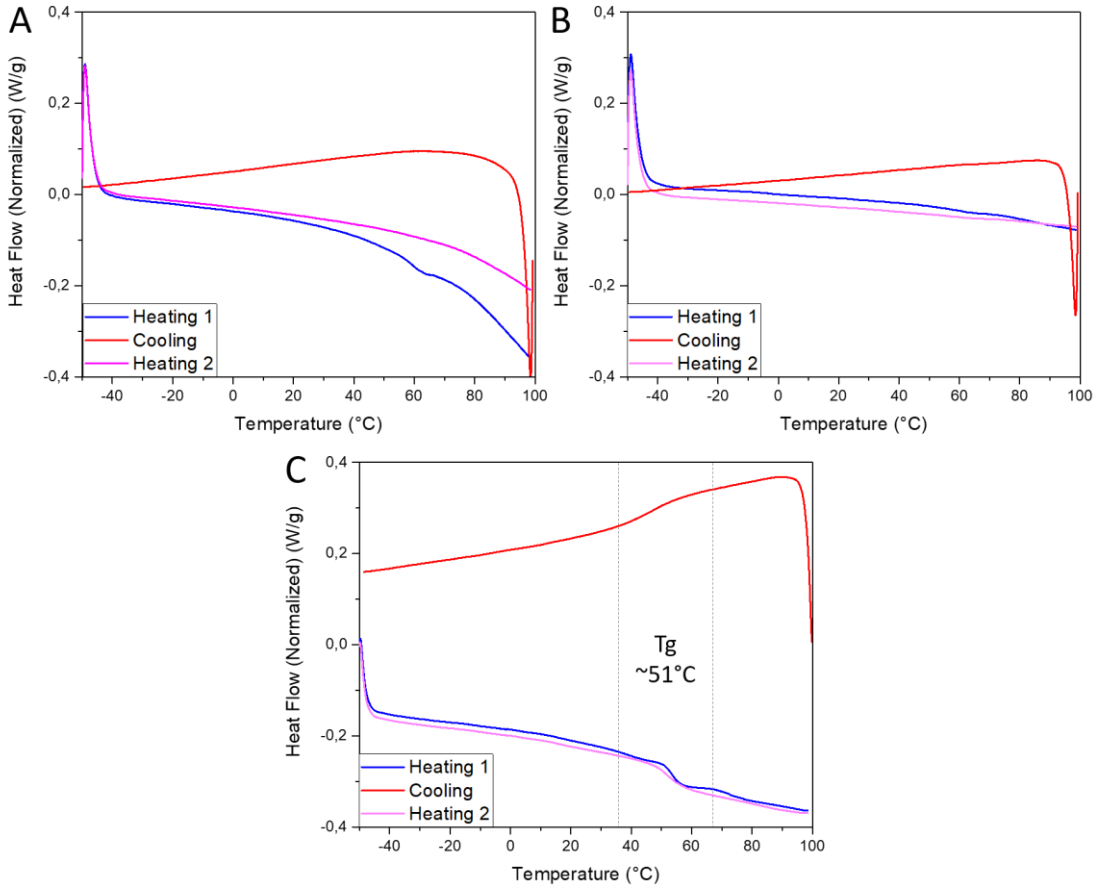


Figure 4: Thermograms obtained by DSC of (A) GA,(B) Curcumin and (C) GACD with in blue line the first heating, in red line the cooling and in pink line, the second heating. Tg : glass transition

3.5. Hygroscopy

Gum Arabic is a hydrophilic polymer soluble up to 42.5 ± 2.6% w/v (Vuillemin et al., 2020) and curcumin is an hydrophobic molecule (Peng et al., 2018). By grafting OXP of curcumin, GA seemed to become less hydrophilic and less hygroscopic as suggested by the TGA results. Indeed, modification by hydrophobic compounds such as phenols could modify the affinity of the polysaccharide with water (Karaki et al., 2016). The sorption curves of the GA and GACD were then carried out to determine whether the functionalization changed interaction of modified GA with water (Figure 5).

The water sorption isotherm of GA was of type II according to international union of pure and applied chemistry (IUPAC). The part at low relative humidity (RH), corresponded to the strongly bound water related to the hygroscopy of the material. The second part in the middle RH range corresponding to the quasi linear section which matched to the weakly bound multilayer water absorbed by capillarity. The third region (high RH) corresponded to free water (Lykiema, Sing, Haber, Kerker, & Wolfram, 1984). For GA the first part could be between 0.1 and 20% of RH, which would correspond to the water necessary to form a monolayer around the polymer. Multilayer adsorption then starts up till 60%. Above this humidity, only free water is added around the polymer. This behaviour has already been reported by some authors (Frascareli, Silva, Tonon, & Hubinger, 2012; Pérez-Alonso, Beristain, Lobato-Calleros, Rodríguez-Huezo, & Vernon-Carter, 2006).

The sorption isotherm obtained for GACD was also of type II but was significantly different from GA. The monolayer adsorption of water was terminated at the very latest at 10% relative humidity. The formation of multilayer water around the polymer was terminated at 60% and then only free water was added. In addition, less water was adsorbed onto the polymer.

The effect of the grafting of phenolic groups could therefore be seen at lower RH since the adsorbed water content was lower, this meant that GACD was less hygroscopic than GA. At high RH the weight intake of GACD was also lower than for GA suggesting that GACD was less hydrophilic than native gum.

As previously supposed from TGA experiments, the functionalization due to the addition of OXP, decreased hygroscopy and hydrophilicity. Karaki et al., (2017) were able to show that oxidation product of ferulic acid bound to pectin induced a higher hydrophilicity than native pectin. Authors argued that this result was due to the opening of the structure by the oxidation products creating larger spaces between the chains and allowing more water to be absorbed. In the present case, for GACD, hydrophilicity is lower than that of the native polymer. It is therefore at this stage complicated to affirm something about inter-chain space with absolute confidence. However, it was not the same polysaccharide nor the same phenol that in this study. GA was slightly more hydrophilic and less hygroscopic than pectin. Moreover, thanks to the DSC thermograms, it was possible to show a Tg on the GACD and not on the GA whereas the GA was more hydrophilic and water has a plasticizing effect on polymers. It was then possible to consider that the oxidation products from curcumin were much more hydrophobic and repelled more water and due to this hydrophobicity, the spaces created between the chains were insufficient to accept as much water as the GA. It is also possible that the spaces between the chains were filled with OXP and thus water cannot get into them and these OXP may had a plasticizing effect on GACD, allowing it to exhibit a phase transition.

It has also already been shown that the functionalization of gum Arabic could lead to a reduction of its hydrophilicity, in particular through the addition of hydrophobic phenol derivatives (Vuillemin et al., 2020). It has also already been shown on other polysaccharide like chitosan (Aljawish et al., 2016).

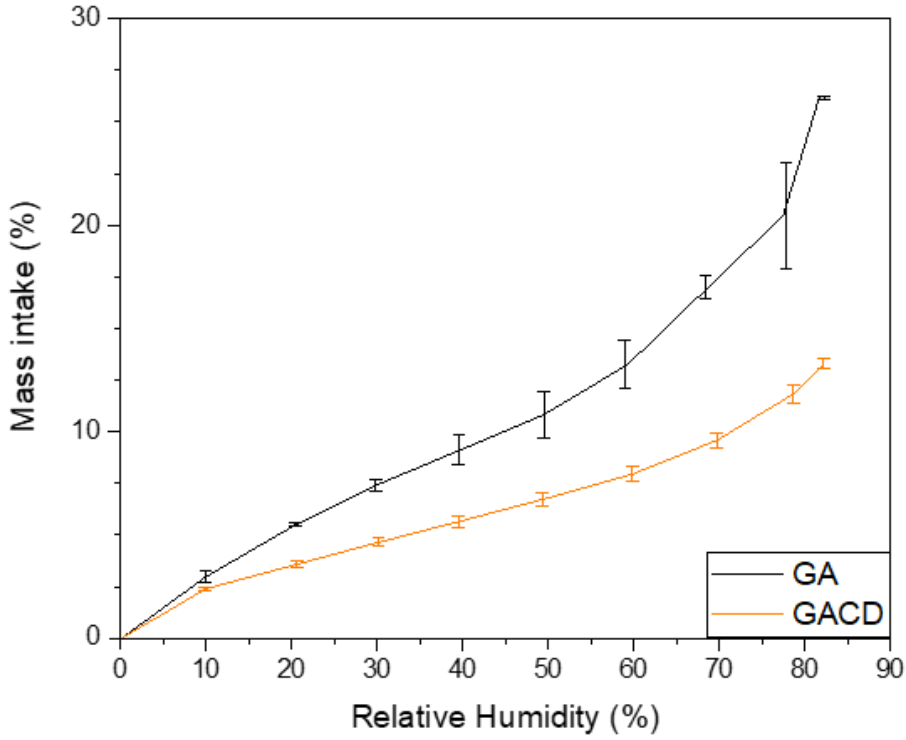


Figure 5: Water sorption isotherms of GA (black) and GACD (orange)

3.6. Behaviour in water

Gum Arabic is a naturally amphiphilic polymer. The grafting of hydrophobic phenolic compounds has made the GAC more hydrophobic and thus modifying its behavior in water. Indeed, GA has a natural ability to lower the surface tension of water. Various studies have been conducted on this subject (Wu et al., 2015; Ebrahimi, Homayouni Rad, Ghanbarzadeh, Mohammadali, & Pasquale, 2020; Cao, Zhang, Zhang, & Du, 2013; Wang, Williams, & Senan, 2014; Vuillemin et al., 2020). It is able to lower the water surface tension about 65 $mN.m^{-1}$ at a concentration of 0.5% (wt). Once modified by phenols, the GAC lowered even more the water surface tension. It was then able to lower the water surface tension to 51.6 ± 0.3 $mN.m^{-1}$ at 0.5% (wt). A decrease of the surface tension is shown in Figure S1 in supplementary materials.

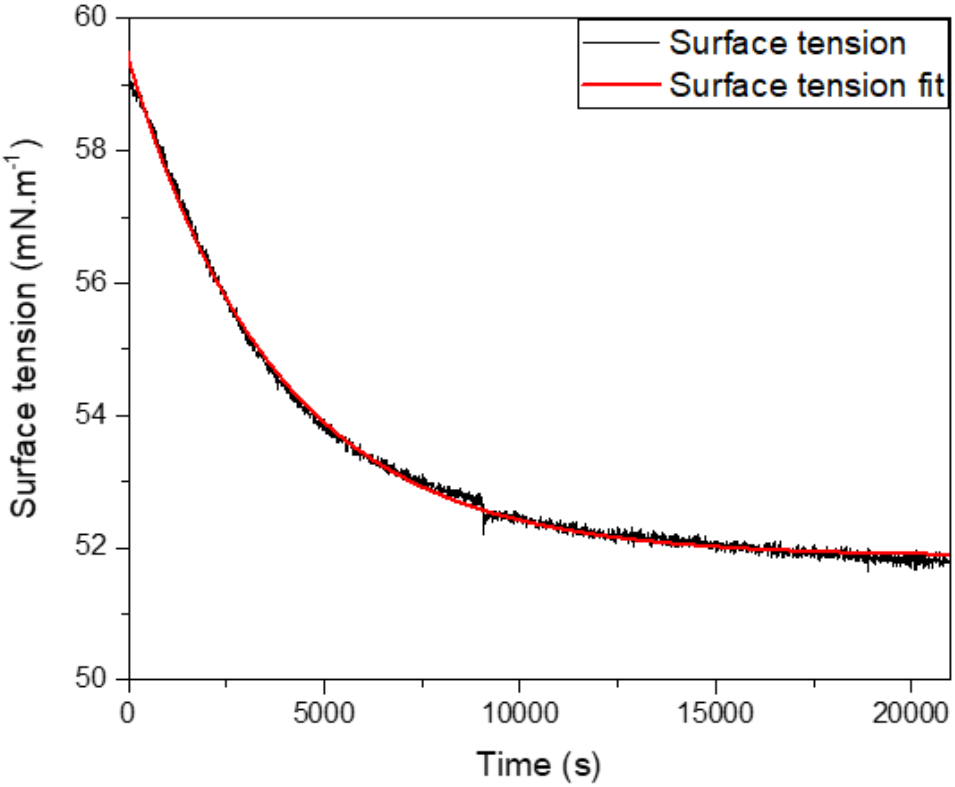


Figure S1: Surface tension decrease of a GAC suspension (black) and fit applied to the decrease (red)

It has already been shown that modification of GA with hydrophobic compounds improves the ability of the gum to decrease the surface tension of water (Vuillemin et al., 2020; Wang et al., 2014). It should also be noted that the ability of GA to decrease surface tension is primarily due to the AGP fraction (Dickinson et al., 1988; Randall, Phillips, & Williams, 1988; Nakauma et al., 2008). In GAC, the AG fraction is also functionalized and thus could participates in the lowering of surface tension. Functionalization thus allowed the valorisation of an important part of the GA which was not exploited until now.

The modification of the amphiphilicity of the GA may also induced a self-assembly phenomenon since it depended on the balance between hydrophobic and hydrophilic interactions to minimize energetically unfavourable interactions as reported by Sarika et al.

(2015). By increasing the hydrophobicity, the interactions with water were less favourable and therefore the polymer promoted particle formation (Akiyoshi & Sunamoto 1996; Huie 2003; Six & Ferji 2019), whereas, for the same concentration, the native polymer was solubilized in water. GAC preparation in water thus led to very turbid sample even at very low concentrations. The presence of this cloudiness indicated the spontaneous formation of particles in water. This behavior had not, to this day, been shown on enzymatically modified GA with phenols such as ferulic acid (Vuillemin et al., 2020). However it has been reported in literature that the polysaccharides chemical modification using phenolic compounds could lead to the formation of particles as demonstrated with pectin and curcumin (Mundlia et al., 2019). It has already also been shown that a chemical grafting of curcumin onto gum Arabic lead to the formation of particles in water composed of an hydrophobic curcumin core and a hydrophilic polysaccharide shell (Sarika et al., 2015). A recent study also shows that dextran enzymatically modified with curcumin could form self-assemblies in water (Curcio et al., 2019) as it is shown today with GA.

Measurements of particles hydrodynamic diameter by dynamic light scattering have shown that the size of these particles was in mean 1621 ± 94 nm in diameter. The polydispersity index of the particle size populations was 0.130 ± 0.068. Size distributions expressed in intensity, volume and number are presented on Figure 6. The polydispersity appeared then to be very low and did not correspond to particles formed by a simple aggregation but rather a self-assembly phenomenon.

Furthermore, the surface charge of the particles has been determined. The particles surface was negatively charged and the corresponding electrophoretic mobility was equal to -3.062 +/- 0.039 µmcm/V.s. This negative charge could prevent aggregation although the large particle size lead to rapid sedimentation. A simple agitation then allowed the particles to be resuspended.

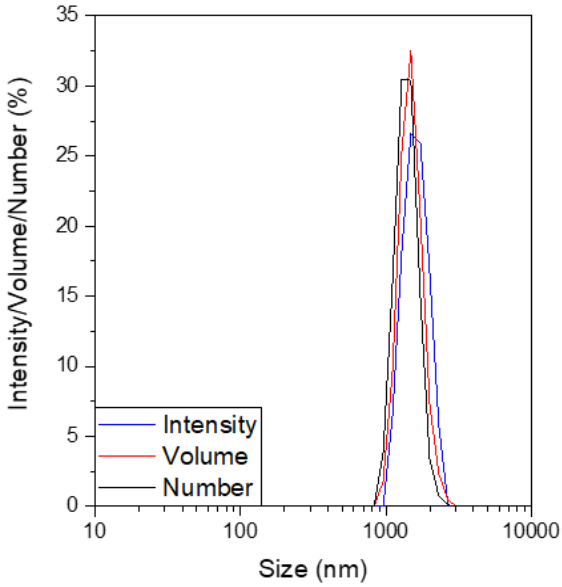


Figure 6: Size distribution expressed in intensity (blue), volume (red) and number (black), of GAC dispersed in water at 0.005% w/v

3.7. Morphological study

In order to investigate further the self-assembly behaviour of the modified gum Arabic in water, the structure of the obtained particles had been studied by several microscopy technics. Obtained micrographs are shown in Figure 7. Epifluorescence microscopy images Figure 7A confirmed the presence of the OXP, that emit fluorescence from spherical particles. SEM (Figure 7C and E) confirmed the spherical shape of the particles. These particles presented a relatively smooth surface which was also observed by AFM topography measurements where particles presented a roughness of 24.50 ± 9.87 nm (Figure 7B, D and F). Size determined from the SEM micrograph analysis revealed the majority particles size was of 1.1 µm and AFM images showed a size below 1.5 µm, which was smaller than the one determined from DLS measurement. This was consistent since DLS measures the hydrodynamic radius of the particles, which includes a hydration layer. It is also possible that drying induces a slight contraction of the particles due to water loss.

Additionally, the elastic modulus of the GAC particles was evaluated by AFM nanoindentation (see Figure S2 in supplementary materials) and a value of 38 ± 9 MPa was recorded. This value may seem high if compared to alginate microbead (about 300 µm) which has an elastic modulus slightly lower than 3 kPa (Chui, Bonilla-Brunner, Seifert, Contera, & Ye, 2019). The assemblies were therefore rather strong, which may explain their good resistance to drying imposed by the microscopy techniques used.

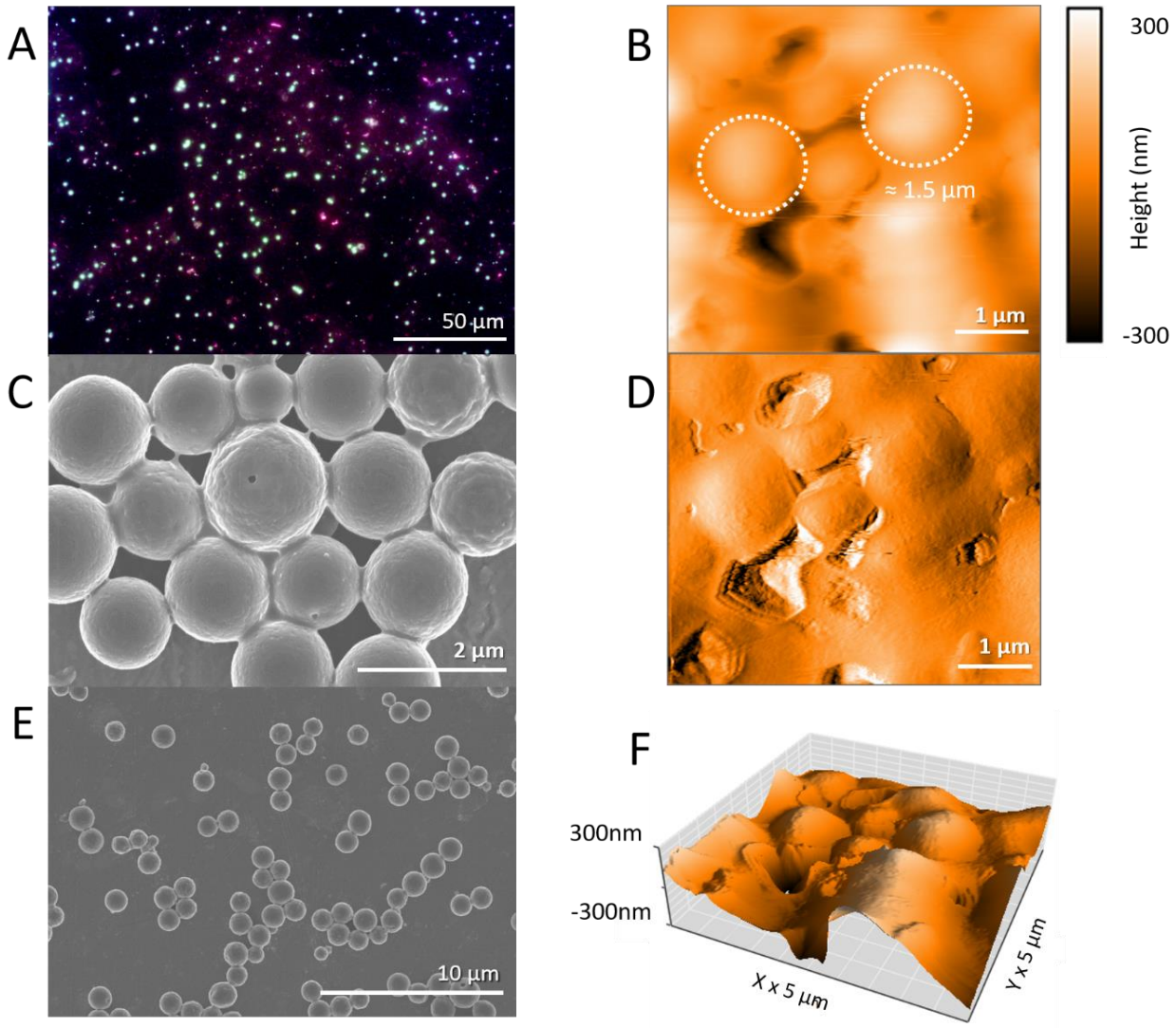


Figure 7: Micrographs obtained by (A) fluorescence microscopy magnification × 400, AFM: (B) height image (D) deflection view (F) 3D view and SEM magnification (C) × 20,000 and (D) × 5,000

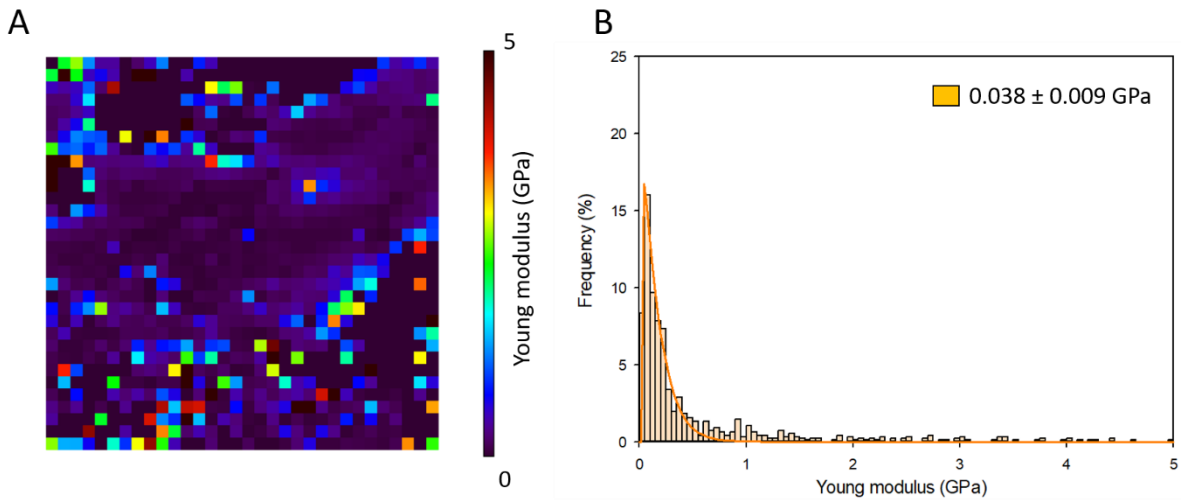


Figure S2: (A) elasticity map obtained by nanoindentation of the area shown in Figure 7B and (B) Young's modulus distribution corresponding to image A.

4. Conclusions

In this study, the modification of gum Arabic by an enzymatic process led to the addition of curcumin oxidation products to its structure which was confirmed by infrared spectroscopy. Ester bonds were created between GA and the products resulting from the oxidation of curcumin by the laccase. The polysaccharide molecular weight determined by SEC-MALS was greatly increased. The presence of these OXP modifies the properties of the polysaccharide. Indeed, the presence of these new compounds in the GAC structure have increased the antioxidant activity of the gum by 25,000 times. From DSC measurements, the grafting of the curcumin OXP entities induced a plasticizing effect and lead to a lowering of the polymer glass transition temperature to 51 °C. A lowering of the polysaccharide hygroscopy and hydrophily was also reported. The modification changed then the GA hydrophobicity/hydrophobicity balance. This change allows the GAC to obtain a greater capacity to decrease the surface tension of water than the GA until 51.6 $mN.m^{-1}$ compared to 65 $mN.m^{-1}$ for the native polymer at a polymer concentration in water of 0.5% (wt). As a result of these modifications, GAC became able to form spontaneously spherical particles of about 1.6 µm in aqueous solution with a very low polydispersity. It denotes the change of properties of the gum in water since it is naturally

very polydisperse. It is therefore interesting to see that the modification by OXP of curcumin allowed to pass from a very soluble and polydispersed polymer (Atgié, Garrigues, Chennevière, Masbernat, & Roger, 2019; Renard et al., 2006) to an insoluble and quite monodispersed polymer at the same concentrations.

5. Acknowledgments

The authors acknowledge support of the LIBio by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d'avenir – ANR).

The authors acknowledge support of the CPER Agrovalor.

We would like to thank Nexira for kindly providing the gum Arabic used in this article.

We would like to thank Novozyme for kindly providing the laccase used in this article.

We also thank Aurelie Seiler for the technical support.

6. Declaration of interest

Declarations of interest: none

7. Author contribution

Aurélie A. ADAM: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Data curation; Writing original draft

Jordane Jasniewski: Conceptualization; Investigation; Validation; Data curation; Supervision;

Writing - reviewing & editing

Marie E. Vuillemin: Reviewing

Blandine Simard: Investigation; Data curation

Jennifer Burgain: Investigation; Data curation

Régis Badin: Investigation; Data curation

Lionel Muniglia: Validation & reviewing

Florentin Michaux: Conceptualization; Validation; Data curation; Supervision; Writing - reviewing & editing

8. References

Abdul Rohman, Sudjadi, Dwiky Devi, and Ardi Dwiky Ramadhani. 2015. 'Analysis of Curcumin in Curcuma Longa and Curcuma Xanthorriza Using FTIR Spectroscopy and Chemometrics'. *Research Journal of Medicinal Plant* 9 (4): 179–86. https://doi.org/10.3923/rjmp.2015.179.186.

Ahmad, Syed Ishraque, Nasreen Mazumdar, and Sunil Kumar. 2013. 'Functionalization of Natural Gum: An Effective Method to Prepare Iodine Complex'. *Carbohydrate Polymers* 92 (1): 497–502. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.049.

Akiyoshi, K., and J. Sunamoto. 1996. 'Supramolecular Assembly of Hydrophobized Polysaccharides'. *Supramolecular Science* 3 (1–3): 157–63. https://doi.org/10.1016/0968-5677(96)00031-4.

Aljawish, Abdulhadi, Isabelle Chevalot, Jordane Jasniewski, Anne-Marie Revol-Junelles, Joël Scher, and Lionel Muniglia. 2014. 'Laccase-Catalysed Functionalisation of Chitosan by Ferulic Acid and Ethyl Ferulate: Evaluation of Physicochemical and Biofunctional Properties'. *Food Chemistry* 161 (October): 279–87. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.076.

Aljawish, Abdulhadi, Isabelle Chevalot, Bernadette Piffaut, Corinne Rondeau-Mouro, Michel Girardin, Jordane Jasniewski, Joël Scher, and Lionel Muniglia. 2012. 'Functionalization of Chitosan by Laccase-Catalyzed Oxidation of Ferulic Acid and Ethyl Ferulate under

Heterogeneous Reaction Conditions'. *Carbohydrate Polymers* 87 (1): 537–44. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.016.

Aljawish, Abdulhadi, Lionel Muniglia, Amira Klouj, Jordane Jasniewski, Joël Scher, and Stephane Desobry. 2016. 'Characterization of Films Based on Enzymatically Modified Chitosan Derivatives with Phenol Compounds'. *Food Hydrocolloids* 60 (October): 551–58. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.032.

Aphibanthammakit, Chutima, Michaël Nigen, Sébastien Gaucel, Christian Sanchez, and Pascale Chalier. 2018. 'Surface Properties of Acacia Senegal vs Acacia Seyal Films and Impact on Specific Functionalities'. *Food Hydrocolloids* 82 (September): 519–33. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.032.

Atgié, M., J.C. Garrigues, Alexis Chennevière, O. Masbernat, and K. homogenous. 2019. 'Gum Arabic in Solution: Composition and Multi-Scale Structures'. *Food Hydrocolloids* 91 (June): 319–30. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.033.

Božič, Mojca, Selestina Gorgieva, and Vanja Kokol. 2012a. 'Laccase-Mediated Functionalization of Chitosan by Caffeic and Gallic Acids for Modulating Antioxidant and Antimicrobial Properties'. *Carbohydrate Polymers* 87 (4): 2388–98. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.006.

Božič, Mojca, Selestina Gorgieva, and Vanja Kokol. 2012b. 'Homogeneous and Heterogeneous Methods for Laccase-Mediated Functionalization of Chitosan by Tannic Acid and Quercetin'. *Carbohydrate Polymers* 89 (3): 854–64. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.021.

Cao, Chong, Lu Zhang, Xiao-Xi Zhang, and Feng-Pei Du. 2013. 'Effect of Gum Arabic on the Surface Tension and Surface Dilational Rheology of Trisiloxane Surfactant'. *Food Hydrocolloids* 30 (1): 456–62. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.07.006.

Chui, Chih-Yao, Andrea Bonilla-Brunner, Jacob Seifert, Sonia Contera, and Hua Ye. 2019. 'Atomic Force Microscopy-Indentation Demonstrates That Alginate Beads Are Mechanically Stable under Cell Culture Conditions'. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 93 (May): 61–69. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.01.019.

Cozic, Céline, Luc Picton, Marie-Rose Garda, Franck Marlhoux, and Didier Le Cerf. 2009. 'Analysis of Arabic Gum: Study of Degradation and Water Desorption Processes'. *Food Hydrocolloids* 23 (7): 1930–34. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.009.

Curcio, Manuela, Giuseppe Cirillo, Paola Tucci, Annafranca Farfalla, Emilia Bevacqua, Orazio Vittorio, Francesca Iemma, and Fiore Pasquale Nicoletta. 2019. 'Dextran-Curcumin Nanoparticles as a Methotrexate Delivery Vehicle: A Step Forward in Breast Cancer Combination Therapy'. *Pharmaceuticals* 13 (1): 2. https://doi.org/10.3390/ph13010002.

Dickinson, Eric, Brent S. Murray, George Stainsby, and Douglas M.W. Anderson. 1988. 'Surface Activity and Emulsifying Behaviour of Some Acacia Gums'. *Food Hydrocolloids* 2 (6): 477–90. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80047-X.

Ebrahimi, Behzad, Aziz Homayouni Rad, Babak Ghanbarzadeh, Torbati Mohammadali, and Falcone Pasquale M. 2020. 'The Emulsifying and Foaming Properties of Amuniacum Gum (Dorema Ammoniacum) in Comparison with Gum Arabic | EndNote Click'. 2020. https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1002%2Ffsn3.1658&token=WzIxOTg3NzgsIjEwLjEwMDIvZnNuMy4xNjU4Il0.oVeHd9FwBRzqRdFvh-9ew1ZTFOA.

Frascareli, Elen Cristina, Vanessa Martins Silva, Renata Valeriano Tonon, and Míriam Dupas Hubinger. 2012. 'Determination of Critical Storage Conditions of Coffee Oil

Microcapsules by Coupling Water Sorption Isotherms and Glass Transition Temperature'. *International Journal of Food Science & Technology* 47 (5): 1044–54. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02939.x.

Grein, Aline, Bruno C. da Silva, Cinthia F. Wendel, Cesar A. Tischer, Maria Rita Sierakowski, Angela B. Dewes Moura, Marcello Iacomini, Philip A.J. Gorin, Fernanda F. Simas-Tosin, and Izabel C. Riegel-Vidotti. 2013. 'Structural Characterization and Emulsifying Properties of Polysaccharides of Acacia Mearnsii de Wild Gum'. *Carbohydrate Polymers* 92 (1): 312–20. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.041.

Hamdani, Afshan Mumtaz, Idrees Ahmed Wani, Naseer Ahmad Bhat, and F.A. Masoodi. 2018. 'Chemical Composition, Total Phenolic Content, Antioxidant and Antinutritional Characterisation of Exudate Gums'. *Food Bioscience* 23 (June): 67–74. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.006.

Hasan, M, G. Ben Messaoud, F. Michaux, A. Tamayol, C.J.F. Kahn, M. Linder, and E. Arab-Tehrany. 2016. 'Chitosan-Coated Liposomes Encapsulating Curcumin: Study of Lipid–Polysaccharide Interactions and Nanovesicle Behavior'. *RSC Advances*, 15.

Hou, Chuchu, Shengfang Wu, Yongmei Xia, Glyn O. Phillips, and Steve W. Cui. 2017. 'A Novel Emulsifier Prepared from Acacia Seyal Polysaccharide through Maillard Reaction with Casein Peptides'. *Food Hydrocolloids* 69 (August): 236–41. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.038.

Huie, Jiyun C. 2003. 'Guided Molecular Self-Assembly: A Review of Recent Efforts'. *Smart Materials and Structures* 12 (2): 264–71. https://doi.org/10.1088/0964-1726/12/2/315.

Karaki, Nadine, A. Aljawish, L. Muniglia, S. Bouguet-Bonnet, S. Leclerc, C. Paris, J. Jasniewski, and C. Humeau-Virot. 2017. 'Functionalization of Pectin with Laccase-

Mediated Oxidation Products of Ferulic Acid'. *Enzyme and Microbial Technology* 104 (September): 1–8. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.05.001.

Karaki, Nadine, Abdulhadi Aljawish, Catherine Humeau, Lionel Muniglia, and Jordane Jasniewski. 2016. 'Enzymatic Modification of Polysaccharides: Mechanisms, Properties, and Potential Applications: A Review'. *Enzyme and Microbial Technology* 90 (August): 1–18. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004.

Karaki, Nadine, Abdulhadi Aljawish, Lionel Muniglia, Catherine Humeau, and Jordane Jasniewski. 2016. 'Physicochemical Characterization of Pectin Grafted with Exogenous Phenols'. *Food Hydrocolloids* 60 (October): 486–93. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.004.

Kumar, Guneet, Paul J. Smith, and Gregory F. Payne. 1999. 'Enzymatic Grafting of a Natural Product onto Chitosan to Confer Water Solubility under Basic Conditions'. *Biotechnology and Bioengineering* 63 (2): 154–65. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990420)63:2<154::AID-BIT4>3.0.CO;2-R.

Li, Shijie, Qingping Xiong, Xiaoping Lai, Xia Li, Mianjie Wan, Jingnian Zhang, Yajuan Yan, et al. 2016. 'Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities'. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15 (2): 237–50. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12161.

Liu, Xiaocui, Lijun You, Solaiman Tarafder, Lin Zou, Zhexiang Fang, Jingdi Chen, Chang Hun Lee, and Qiqing Zhang. 2019. 'Curcumin-Releasing Chitosan/Aloe Membrane for Skin Regeneration'. *Chemical Engineering Journal* 359 (March): 1111–19. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.073.

Liu, Yujia, Yanxue Cai, Xueying Jiang, Jinping Wu, and Xueyi Le. 2016. 'Molecular Interactions, Characterization and Antimicrobial Activity of Curcumin–Chitosan Blend

Films'. *Food Hydrocolloids* 52 (January): 564–72. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.005.

Liu, Yujia, Danyang Ying, Yanxue Cai, and Xueyi Le. 2017. 'Improved Antioxidant Activity and Physicochemical Properties of Curcumin by Adding Ovalbumin and Its Structural Characterization'. *Food Hydrocolloids* 72 (November): 304–11. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.007.

Lopez-Torrez, Lizeth, Michaël Nigen, Pascale Williams, Thierry Doco, and Christian Sanchez. 2015. 'Acacia Senegal vs. Acacia Seyal Gums – Part 1: Composition and Structure of Hyperbranched Plant Exudates'. *Food Hydrocolloids* 51 (October): 41–53. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.019.

Lykiema, J, K S W Sing, J Haber, M Kerker, E Wolfram, J H Block, N V Churaev, et al. 1984. 'Reporting Physiosorption Data Fot Gas/Solid Systems', 17.

Masuelli, Martin A. 2013. 'Hydrodynamic Properties of Whole Arabic Gum'. *American Journal of Food Science and Technology* 1 (3): 60–66.

Mortensen, Alicja, Fernando Aguilar, Riccardo Crebelli, Alessandro Di Domenico, Maria Jose Frutos, Pierre Galtier, David Gott, et al. 2017. 'Re-Evaluation of Acacia Gum (E 414) as a Food Additive'. *EFSA Journal* 15 (4): e04741. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4741.

Mothé, C.G, and M.A Rao. 2000. 'Thermal Behavior of Gum Arabic in Comparison with Cashew Gum'. *Thermochimica Acta* 357–358 (August): 9–13. https://doi.org/10.1016/S0040-6031(00)00358-0.

Mundlia, Jyoti, Munish Ahuja, Pradeep Kumar, and Viness Pillay. 2019. 'Pectin–Curcumin Composite: Synthesis, Molecular Modeling and Cytotoxicity'. *Polymer Bulletin* 76 (6): 3153–73. https://doi.org/10.1007/s00289-018-2538-0.

Nakauma, Makoto, Takahiro Funami, Sakie Noda, Sayaka Ishihara, Saphwan Al-Assaf, Katsuyoshi Nishinari, and Glyn O. Phillips. 2008. 'Comparison of Sugar Beet Pectin, Soybean Soluble Polysaccharide, and Gum Arabic as Food Emulsifiers. 1. Effect of Concentration, PH, and Salts on the Emulsifying Properties'. *Food Hydrocolloids* 22 (7): 1254–67. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.004.

Nascimento da Silva, Milena, Jéssica de Matos Fonseca, Helena Kirchner Feldhaus, Lenilton Santos Soares, Germán Ayala Valencia, Carlos Eduardo Maduro de Campos, Marco Di Luccio, and Alcilene Rodrigues Monteiro. 2019. 'Physical and Morphological Properties of Hydroxypropyl Methylcellulose Films with Curcumin Polymorphs'. *Food Hydrocolloids* 97 (December): 105217. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105217.

Osman, Mohamed E., Peter A. Williams, Alan R. Menzies, and Glyn O. Phillips. 1993. 'Characterization of Commercial Samples of Gum Arabic'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (1): 71–77. https://doi.org/10.1021/jf00025a016.

Peng, Shengfeng, Ziling Li, Liqiang Zou, Wei Liu, Chengmei Liu, and David Julian McClements. 2018. 'Improving Curcumin Solubility and Bioavailability by Encapsulation in Saponin-Coated Curcumin Nanoparticles Prepared Using a Simple PH-Driven Loading Method'. *Food & Function* 9 (3): 1829–39. https://doi.org/10.1039/C7FO01814B.

Pérez-Alonso, C., C.I. Beristain, C. Lobato-Calleros, M.E. Rodríguez-Huezo, and E.J. Vernon-Carter. 2006. 'Thermodynamic Analysis of the Sorption Isotherms of Pure and Blended Carbohydrate Polymers'. *Journal of Food Engineering* 77 (4): 753–60. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.002.

Pirestani, Safoura, Ali Nasirpour, Javad Keramat, Stéphane Desobry, and Jordane Jasniewski. 2017. 'Effect of Glycosylation with Gum Arabic by Maillard Reaction in a Liquid System on the Emulsifying Properties of Canola Protein Isolate'. *Carbohydrate Polymers* 157 (February): 1620–27. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.044.

Poljanšek, Ida, Urška Šebenik, and Matjaž Krajnc. 2006. 'Characterization of Phenol–Urea–Formaldehyde Resin by Inline FTIR Spectroscopy'. *Journal of Applied Polymer Science* 99 (5): 2016–28. https://doi.org/10.1002/app.22161.

Randall, R.C., G.O. Phillips, and P.A. Williams. 1988. 'The Role of the Proteinaceous Component on the Emulsifying Properties of Gum Arabic'. *Food Hydrocolloids* 2 (2): 131–40. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80011-0.

Renard, D., C. Garnier, A. Lapp, C. Schmitt, and C. Sanchez. 2012. 'Structure of Arabinogalactan-Protein from Acacia Gum: From Porous Ellipsoids to Supramolecular Architectures'. *Carbohydrate Polymers* 90 (1): 322–32. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.046.

Renard, Denis, Laurence Lavenant-Gourgeon, Marie-Christine Ralet, and Christian Sanchez. 2006. 'Acacia Senegal Gum: Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges'. *Biomacromolecules* 7 (9): 2637–49. https://doi.org/10.1021/bm060145j.

Sabet, Saman, Ali Rashidinejad, Laurence D. Melton, Zoran Zujovic, Alireza Akbarinejad, Michel Nieuwoudt, Chris K. Seal, and Duncan J. McGillivray. 2021. 'The Interactions between the Two Negatively Charged Polysaccharides: Gum Arabic and Alginate'. *Food Hydrocolloids* 112 (March): 106343. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106343.

Sanchez, C., M. Nigen, V. Mejia Tamayo, T. Doco, P. Williams, C. Amine, and D. Renard. 2018. 'Acacia Gum: History of the Future'. *Food Hydrocolloids* 78 (May): 140–60. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.008.

Sanchez, Christian, Denis Renard, Paul Robert, Christophe Schmitt, and Jacques Lefebvre. 2002. 'Structure and Rheological Properties of Acacia Gum Dispersions'. *Food Hydrocolloids* 16 (3): 257–67. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00096-0.

Sarika, P.R., Nirmala Rachel James, P.R. Anil Kumar, Deepa K. Raj, and T.V. Kumary. 2015. 'Gum Arabic-Curcumin Conjugate Micelles with Enhanced Loading for Curcumin Delivery to Hepatocarcinoma Cells'. *Carbohydrate Polymers* 134 (December): 167–74. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.068.

Six, Jean-Luc, and Khalid Ferji. 2019. 'Polymerization Induced Self-Assembly: An Opportunity toward the Self-Assembly of Polysaccharide-Containing Copolymers into High-Order Morphologies'. *Polymer Chemistry* 10 (1): 45–53. https://doi.org/10.1039/C8PY01295D.

Spizzirri, U. Gianfranco, Ortensia Ilaria Parisi, Francesca Iemma, Giuseppe Cirillo, Francesco Puoci, Manuela Curcio, and Nevio Picci. 2010. 'Antioxidant–Polysaccharide Conjugates for Food Application by Eco-Friendly Grafting Procedure'. *Carbohydrate Polymers* 79 (2): 333–40. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.010.

Tahir, Haroon Elrasheid, Zou Xiaobo, Shi Jiyong, Gustav Komla Mahunu, Xiaodong Zhai, and Abdalbasit Adam Mariod. 2018. 'Quality and Postharvest-Shelf Life of Cold-Stored Strawberry Fruit as Affected by Gum Arabic (Acacia Senegal) Edible Coating'. *Journal of Food Biochemistry* 42 (3): e12527. https://doi.org/10.1111/jfbc.12527.

Vasile, Franco Emanuel, María Julia Martinez, Víctor Manuel Pizones Ruiz-Henestrosa, María Alicia Judis, and María Florencia Mazzobre. 2016. 'Physicochemical, Interfacial and

Emulsifying Properties of a Non-Conventional Exudate Gum (Prosopis Alba) in Comparison with Gum Arabic'. *Food Hydrocolloids* 56 (May): 245–53. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.016.

Verbeken, D., S. Dierckx, and K. Dewettinck. 2003. 'Exudate Gums: Occurrence, Production, and Applications'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (1): 10–21. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1354-z.

Vuillemin, Marie E., Florentin Michaux, Aurélie A. Adam, Michel Linder, Lionel Muniglia, and Jordane Jasniewski. 2020. 'Physicochemical Characterizations of Gum Arabic Modified with Oxidation Products of Ferulic Acid'. *Food Hydrocolloids*, April, 105919. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105919.

Vuillemin, Marie E., Florentin Michaux, Aurélie Seiler, Michel Linder, Lionel Muniglia, and Jordane Jasniewski. 2021. 'Polysaccharides Enzymatic Modification to Control the Coacervation or the Aggregation Behavior: A Thermodynamic Study'. *Food Hydrocolloids*, August, 107092. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107092.

Wang, Hao, P.A. Williams, and C. Senan. 2014. 'Synthesis, Characterization and Emulsification Properties of Dodecenyl Succinic Anhydride Derivatives of Gum Arabic'. *Food Hydrocolloids* 37 (June): 143–48. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.033.

Wu, Y., N.A.M. Eskin, W. Cui, and B. Pokharel. 2015. 'Emulsifying Properties of Water Soluble Yellow Mustard Mucilage: A Comparative Study with Gum Arabic and Citrus Pectin'. *Food Hydrocolloids* 47 (May): 191–96. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.020.

Zohuriaan, M.J, and F Shokrolahi. 2004. 'Thermal Studies on Natural and Modified Gums'. *Polymer Testing* 23 (5): 575–79. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2003.11.001.

Zohuriaan-Mehr, Mohammad J., Z. Motazedi, K. Kabiri, and A. Ershad-Langroudi. 2005. 'New Super-Absorbing Hydrogel Hybrids from Gum Arabic and Acrylic Monomers'. *Journal of Macromolecular Science, Part A* 42 (12): 1655–66. https://doi.org/10.1080/10601320500246859.

1.2 Contribution de l'article

Les résultats de cet article ont permis de démontrer que la laccase *de Myceliophthora thermophila* est capable de catalyser l'oxydation de la curcumine pouvant ainsi se greffer sur la gomme d'Acacia. D'après la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, les produits d'oxydation de la curcumine sont greffés de manière covalente à la gomme, à priori majoritairement *via* une liaison ester. La présence de groupements phénoliques au sein de la structure confère à la gomme une activité antioxydante significative et comparable à celles déjà mesurées avec d'autres polysaccharides et des produits d'oxydation de l'acide férulique.

Le but principal de cette modification enzymatique était de provoquer un changement important de la structure et de modifier les propriétés amphiphiles de la gomme d'Acacia. Il s'avère que d'après les résultats obtenus par SEC-MALS, la GAC est composée de deux fractions majoritaires contenant une partie protéique. Les rendements massiques suggèrent que la partie arabinogalactane-peptide (AG), représentant environ 98 % en masse de la GAC, est bien présente dans l'échantillon ainsi que probablement la fraction arabinogalactane-protéine (AGP). Cependant, les résultats suggèrent également une augmentation très importante de la masse moléculaire et du rayon hydrodynamique de ces deux fractions. Le simple greffage de produits d'oxydation de la curcumine ne permet pas à lui seul d'expliquer une telle différence. L'hypothèse la plus plausible serait un phénomène de pontage covalent entre les fractions. Cette modification structurelle doit probablement provoquer une augmentation de l'espace inter-chaine du fait de l'encombrement stérique. Pour vérifier cette hypothèse, des mesures thermiques ont été réalisées. Il s'avère que comparativement à la gomme d'Acacia native, la gomme modifiée est moins stable à l'augmentation de température (approche TGA). Cependant le résultat le plus probant est celui obtenu par DSC, car contrairement à la gomme native, la gomme d'Acacia modifiée présente une transition vitreuse autour de 51 °C ce qui pourrait

s'expliquer par un effet plastifiant des produits greffés entrainant une augmentation importante de l'espace inter-chaine.

Cette gomme modifiée présente un comportement très différent de la gomme native dans l'eau. Pour comprendre ce phénomène, des mesures de sorption dynamique de vapeur d'eau ont été réalisées. D'après les isothermes de sorption, la GAC serait moins hygroscopique et moins hydrophile que la gomme native. Le greffage de composés phénoliques hydrophobes sur la gomme peut expliquer la diminution de l'hygroscopie. Par contre, pour l'hydrophilie nous nous attendions aux mêmes résultats que ceux obtenus par Karaki et al. (2016) sur la pectine modifiée par les produits d'oxydation de l'acide férulique à savoir une augmentation de l'hydrophilie. En effet, la pectine modifiée présentait une transition vitreuse et un aspect en écaille en MEB. Ces cavités et l'espace inter-chaine pouvaientt expliquer cette augmentation de l'hydrophilie. Dans le cas de la GAC, l'espace inter-chaine n'est à priori pas suffisant ou les composés greffés, dérivant de la curcumine, beaucoup plus hydrophobes, limitent les interactions avec l'eau.

Son comportement vis-à-vis de l'eau étant modifié nous avons vérifié le comportement de la GAC sur la tension de surface. Il s'avère que la GAC diminue significativement plus la tension superficielle de l'eau à 25 °C que le GA suggérant que ce polysaccharide présente une amphiphilie plus marquée. Le résultat le plus intéressant reste néanmoins la formation de particules monodisperses par effet ouzo. En effet, lorsque la GAC est solubilisée dans un mélange éthanol / eau 3 : 1, (étape de purification du protocole de fonctionnalisation), puis que l'éthanol est éliminé par évaporation, une turbidité associée à une séparation de phase associative apparaît. Les mesures de diffusion dynamique de la lumière sur cet échantillon trouble ont mis en évidence une très faible polydispersité des particules formées. En effet, nous avons obtenu des distributions de taille en intensité, en volume et en nombre superposées et centrées sur un diamètre de 1.6 µm. Cette très faible polydispersité a été confirmé par microscopie électronique à balayage, microscopie optique à épifluorescence et microscopie à

force atomique. Grâce au greffage de produits d'oxydation de la curcumine, la GAC, qui est un mélange de fractions polydisperses lorsqu'elle est solubilisée, est capable de s'auto-assembler par effet ouzo par un excès d'eau sous forme de particules parfaitement sphériques. Des témoins ont aussi été réalisés pour appuyer l'impact de la fonctionnalisation sur la GA (cf. annexe 1, 2, 3 et 4).

La formation d'objets similaires avec la gomme d'Acacia modifiée chimiquement par la curcumine a été rapportée par Sarika et al. (2015). Récemment, Curcio et al. (2019) ont décrit la formation de particules sphériques avec du dextrane modifié avec de la curcumine, et ce, en présence de laccase. Les mécanismes de la formation spontanée de ces particules parfaitement définies restent à élucider. Par la suite nous nous sommes alors orientés vers l'étude de la concentration d'agrégation critique.

2. Article n°2

1.3 Introduction

Les travaux reportés dans le premier chapitre de résultats (publication 1 page 116) ont permis de montrer que la gomme d'Acacia modifiée par voie enzymatique est capable de former spontanément des particules dans l'eau. L'une des premières caractéristiques de ce phénomène d'auto-assemblage que nous avons choisi de déterminer est la valeur de la CAC. Il s'agit de la concentration à laquelle la première particule se forme. Elle correspond à une limite de solubilité du polymère. Elle est intéressante à déterminé car elle représente la stabilité à la dilution des particules. Il s'agit d'un paramètre important si une administration systémique peut être envisagée mais aussi plus simplement elle est importante pour pouvoir étudier par la suite les caractéristiques des assemblages formés.

D'après la bibliographie, il existe de nombreuses méthodes permettant d'étudier ce paramètre. Les techniques de détermination de la concentration critique d'agrégation les plus connues font appel à l'utilisation de composés hydrophobes fluorescents ou colorés. Ces molécules, en milieu aqueux sont capables de s'insérer dans les parties hydrophobes des particules. Par exemple, la CAC de dextrane modifié par de l'acide stéarique ou du cholestérol a pu être déterminée par la mesure de la fluorescence du pyrène. Le rapport de l'intensité de la fluorescence émise à 372 nm et 391 nm est constant pour les faibles concentrations jusqu'à la CAC ou à lieu une rupture de pente. Lorsque les concentrations sont supérieures à la CAC, des objets sont formés et le pyrène encapsulé dans le noyau hydrophobe (Shaki et al., 2018). Cependant, un grand nombre de méthodes différentes sont utilisées dans la littérature. Par exemple, des mesures de turbidité ont été réalisées par Onesippe et Lagerge en 2008 pour étudier l'interaction du SDS (sodium dodecyl sulfate) et du chitosane ou en 2009 entre le SDS et la gélatine. La mesure de la turbidité leur a permis de déterminer la CAC des objets formés par l'interaction entre ces polymères et le SDS. Une cassure dans la courbe de la turbidité en fonction de la concentration est alors

obtenue. En effet, les particules en suspension dans un milieu diffusent la lumière, ce qui donne un aspect trouble aux suspensions (Kitchener et al., 2017). Il est donc possible d'étudier les variations de l'intensité de lumière diffusée en fonction de la concentration en polymères. Un changement doit être perçu au moment du passage entre un état solubilisé du polymère et un état sous forme de particules (M. Li et al., 2019).

D'autres données peuvent aussi être déterminées tels que les paramètres thermodynamiques. Pour ce faire de nombreuses études misent sur la titration calorimétrique isotherme. Cette technique, permet de de mettre en évidence non seulement la CAC mais aussi de mesurer des paramètres tels que l'enthalpie ou l'entropie associé au phénomène suivi et qui permettent de mieux comprendre le processus d'assemblage. Cependant cette technique peut parfois être complexe à mettre en place et la modélisation des données peut être complexe.

Une autre technique plus innovante a aussi été utilisée : la thermophorèse microéchelle. Il s'agit d'une méthode habituellement utilisée dans l'étude des interactions entre des polymères tels que les protéines et des ligands. Il s'agit d'une méthode basée sur des mesures de fluorescence (naturellement présente chez la GAC). Son principe est décrit dans la partie Matériel & Méthode page 104. Elle permet de définir la constante de dissociation ou l'EC50 (représentant l'affinité entre les molécules). Cette technique n'a encore, à notre connaissance, jamais été utilisé dans le but d'étudier la formation de particules. Nous croyons donc qu'il s'agit d'un bon outil pour essayer de mieux comprendre les auto-assemblages et de définir leurs propriétés. Cette étude pourrait alors permettre d'élargir le champ d'application de cette méthode.

1.4 Article n°2 :

Self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products in water: critical aggregation concentration and thermodynamic parameters study

Aurélie A. Adam, Florentin Michaux, Raphael Dos Santos Morais, Lionel Muniglia, Jordane Jasniewski

Université de Lorraine, LIBio, F-54000 Nancy, France

* Corresponding author: florentin.michaux@univ-lorraine.fr

Highlights:

- Micro-scale thermophoresis was used to define the critical aggregation concentration and self-assembly parameters
- Isothermal calorimetric titration allows to define the critical concentration of aggregation and thermodynamic parameters of the assembly
- Dynamic light scattering measurements allowed a precise definition of the critical aggregation concentration and the size determination of gum Arabic modified by oxidation products of curcumin

ABSTRACT: Gum Arabic has been enzymatically modified with curcumin oxidation products which induced a self-assembly of the modified polymer in water at low concentrations for which native gum Arabic was completely soluble. The critical aggregation concentration (CAC) and the thermodynamic parameters associated to the self-assembly phenomenon were determined. CAC was studied by turbidity measurements and dynamic light scattering (DLS). Thanks to these methods, a first approximation of the CAC was proposed around 0.0015%. Isothermal calorimetric titration (ITC) and micro-scale thermophoresis (MST) experiments were then performed to define more precisely the CAC and to obtain associated thermodynamical parameters. MST has been used here for the first time, to our knowledge, to determine the CAC of particles self-assembly. This was made possible by the intrinsic fluorescence of the modified gum Arabic provided by the grafted oxidation products of curcumin. The CAC was finally established at 0.0015%. This method also allowed to determine a very low EC50 value of 0.007% for the self-assembly. These results show a high uniformity between the GAC sub-units and a good stability of the assemblies to dilution.

KEYWORDS: Gum Arabic, curcumin, self-assembly, isothermal calorimetric titration, dynamic light scattering, micro-scale thermophoresis

1. Introduction

Self-assembly is defined as the spontaneous organization of building blocks as a result of their interactions with each other to form well-organized structures. These are weak interactions such as hydrophobic or electrostatic (van der Waals, ionic interactions and hydrogen bonds), which allow the spontaneous organization of colloidal particles to reach a stable thermodynamic equilibrium. The involved molecules thus start from a disordered state (solubilized in a liquid for example) to reach a more organized final state (Douglas et al., 2009; Mendes et al., 2013; Zhang, 2002).

Self-assemblies are very common in nature. Some well-known examples can be found. Silk fibres are made up of 1µm fibroins which assemble to form strong fibres of much greater length (Zhang, 2002). The DNA forms its double strands by an assembly due to hydrogen bonds. The capsid of the tobacco mosaic virus is composed of 2,130 identical peptide subunits that are capable of assembling around an RNA strand to give the virus its shape (Philp & Stoddart, 1996b). Humans have always wanted to reproduce the amazing feats of nature and self-assembly is one of the few techniques capable of forming complex structures by “bottom up” way from simple components. It can also be a good way to form a wide range of morphologies such as lamellae, spheres, cylinders or more complex structures. It is therefore normal that the researchers wanted to reproduce this in many fields as biomedicine, cosmetics or food industries and others (Mai & Eisenberg, 2012; Six & Ferji, 2019).

Natural polymers such as polysaccharides have been widely used to form self-assemblies. Indeed, they are largely available, cheap, and customisable. They are also known for their low immunogenicity and low toxicity. Moreover, they are easily modified in order to induce self-assembly properties. Their functionalization has been widely studied by chemical methods for this purpose. For example, dextran was modified with vinyl laurate. This modification allowed the formation of 200 nm spherical self-assemblies in water capable of

encapsulating porcine placenta hydrolysate (Kraisomdet et al., 2020). Also modified with deoxycholic acid-oligoethyleneglycol polyester, dextran was able to form self-assemblies of different shapes. Worm-like and vesicles particles were formed with a molar weight of 4500 Da and 8000 Da respectively, due to the impact that the size of the dextran has on the solubility, the fluidity and the stability of the membrane being formed (Nichifor et al., 2021). Gum Arabic was also modified to induce self-assembly. Curcumin was grafted through a chemical pathway onto the carbohydrate backbone of the gum in order to increase the hydrophobicity of the polymer. This modification induced the formation of spherical particles of about 270 nm with an outer surface composed of hydrophilic GA and a hydrophobic curcumin core. The CAC of GA-Curcumin would be around 0.023 $g.L^{-1}$ (Sarika et al., 2015).

Nevertheless, it has recently been shown in various studies that it is possible to use milder methods such as functionalization by enzymatic ways. One study discussed enzymatic functionalization to induce self-assembly of curcumin-modified dextran (Curcio et al., 2019). The reaction occurred *via* a laccase using surrounding oxygen to induce grafting of these compounds onto the polysaccharide. Thus, laccase enabled the grafting of curcumin oxidation products onto dextran to allow the formation of self-assemblies in water. Indeed, the grafting of curcumin increased the hydrophobicity of the polymer and thus allowed the formation of spherical particles of about 290 nm with a narrow size distribution. In addition, the assemblies formed exhibited antioxidant activity identical to that of curcumin, despite the use of an oxidative process. A good penetration and a good cytotoxicity towards cancer cells could also be observed as well as an innocuity towards healthy cells. The CAC of the assemblies was of 0.31 $mg.L^{-1}$ (Curcio et al., 2019). This value appears to be much lower than that obtained by Sarika et al., (2015). Therefore, it would be interesting to see if the enzymatic way can create more dilution-stable polymers.

GA has also been modified by an enzymatic way. Indeed, in a previous study it was reported that the modification of GA by curcumin *via* the action of a laccase could modify the behavior of the gum towards water by making it more hydrophobic. Its behavior in solution was thus modified. The GA went from a highly polydisperse and water-soluble polymer to spontaneously self-assembled in monodisperse particles. These particles possessed a natural fluorescence due to the presence of curcumin oxidation products within them. Nevertheless, only the size and external structure of these particles could be determined (Adam et al., 2022). The present work aims to go further in the study of the reported self-assembly phenomenon, especially by determination of CAC of the modified polymer.

CAC determination is a basic parameter to define self-assemblies. A low CAC allows to imagine a potential use for a systemic administration. Indeed, this suggests that the self-assembled polymer particles are rather stable to dilution. This allows to maintain the particles despite the dilution in the bloodstream or the food bowl (Curcio et al., 2019). Nevertheless, this is not the only important parameter to determine. Indeed, the assembly takes place because the studied system seeks to minimize the Gibbs free energy. It is therefore an exergonic reaction (i.e. spontaneous), based on many low energy interactions. The thermodynamic parameters are also important in the formation of assemblies (Akiyoshi & Sunamoto, 1996; Marsh, 2012; J. Wang, 2016). Therefore, we propose to study in more detail the parameters involved in the formation of modified gum Arabic (GAC) particles.

In this paper, it was the dilution stability that was studied by determining the CAC. Different techniques had been used such as the measurement of turbidity, size, polydispersity index as a function of concentration by spectrophotometric measurements and dynamic light scattering analysis. Isothermal calorimetric titration experiments were also carried out to try to understand the thermodynamic parameters of the assembly. Moreover, an innovative micro-

scale thermophoresis method was also implemented using intrinsic particle fluorescence to determine the CAC and relative affinity between GAC subunits.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Gum Arabic (GA) from *Acacia senegal* called Instantgum AA was a gift from Nexira (France). Ultra-pure water was filter at the laboratory (18 MΩ). Curcumin (> 65 %) (Cur) and salt for buffer solution (Na_2HPO_4, KH_2PO_4) was purchased from Sigma Aldrich (France) and ethanol at analytical grade from Carlo Erba (France).

The Novozymes laccase (BGAsvaerdt, Denmark) marketed under the name Novozym 51003 is a fungal phenol oxidase from *Myceliophthora thermophila* produced in *Aspergillus oryzae*. Laccase activity was expressed in Laccase *Myceliophthora* Units (LAMU) which was defined as the amount of enzyme that oxidized 1 micromole of syringaldazine per minute. The activity of Laccase was 22,315 ± 2,732 $LAMU.g^{-1}$.

2.2. Method

2.2.1. Functionalization of Arabic Gum by curcumin oxidation products

The method used has been reported in previous study (Adam et al., 2022). The enzymatic reaction was carried out at 30 °C and involved 10 g of gum suspended in 50 mM phosphate buffer pH 7.4, 50 ml curcumin at 50 mM and 10.25 $LAMU.mL^{-1}$ of laccase. It was stopped by the addition of 3 volumes of ice-cold ethanol and maintained at -21 °C for 24 h and centrifuged in order to separate the functionalized (supernatant) and non-functionalized (precipitate) polymers. The ethanol in the supernatant was evaporated by a rotary evaporator and the resulting sample was then frozen and freeze-dried. A dialysis (MWCO 10,000 Da from Membrane Filtration Products Inc.) of the resulting sample against distilled water was then

carried out to recover pure GAC. This purification is of main importance to perform isothermal titration calorimetry analysis in good conditions without the potential impact of the residual salts of the functionalization dilution on the recorded signal.

2.2.2. Preparation of aqueous samples

GAC was dispersed in ultra-pure water at 0.5% and stored overnight at 4 °C under stirring. This solution was then diluted in ultra-pure water at desired concentrations for several investigations. The non-dialyzed modified gum (GAC) has been used for all the experiments except for the isothermal calorimetric titration which required the use of a dialyzed GAC (GACD) to avoid the impact of residual salts from the functionalization process. Indeed, the amount of salts present in the GAC was unknown. The GACD has been therefore suspended in phosphate buffer to control the amount of salts while getting closer to the initial conditions of the GAC.

2.2.3. Particles formation characterization

2.2.3.1. Turbidity measurement

Turbidity was measured by UV-Vis spectrophotometry (Shimadzu UV-1605) at 620 nm. GAC and GA sample were made at different concentrations (wt) in water: from 0.2 to 0.0005 %. The turbidity (τ) was obtained using Equation 1 with L the length of the optical path and A, the absorbance of the sample. Measurements were made in triplicate and expressed with mean ± standard deviation.

$$\tau = -\frac{1}{L}\ln\left(10^{-A}\right) \qquad \text{Eq (1)}$$

The sample being colored, an absorbance spectrum was realized to be able to affirm that the measurement is not distorted at the chosen wavelength (insert Figure 1).

2.2.3.2. Size and polydispersity index measurements

Size and polydispersity index of particles was studied with Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical, United Kingdom) equipped with a He/Ne ion laser at λ = 532 nm in a backscattering configuration with a measurement angle of 173 °. Experiments were performed at 25 °C after 120 s of equilibrating time. The same concentrations as paragraph 0 were used. Measurements were also made by setting the attenuator at 6 to analyze the number of counts per second received in intensity. Measurements were made in triplicate in a disposable folded capillary cell (DTS1070, Malvern Panalytical) and expressed with mean ± standard deviation.

2.2.3.3. Isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) (Affinity SV, TA Instruments, Waters, France) measurements were performed to determine the thermodynamic parameters related to the formation of the assemblies. In reality, the experiments have been designed to first follow the disassembly of GAC particles in ultra-pure water, followed by their assembly by increasing the concentration of GAC particles. During the first injections, the particles were splitting. As the GAC concentration increased with successive injections in the measuring cell the particles were re-forming once the concentration exceeded the CAC. Samples were previously degassed at the temperature of the experiment. 50 injections of 5 µL of a dialyzed GAC suspension at 0.025% in water were performed at 25 °C. Measurements were made in a 965 µL cell containing ultra-pure water. The data were analyzed by the NanoAnalysis software (TA Instruments, Waters, France).

The different thermodynamic parameters were obtained *via* the following equations assuming that the particle formation mechanism was close to a micellization (Bouchemal et al., 2010; Kabiri et al., 2013).

$$\Delta G = R.T.\ln(CAC') \qquad \text{Eq 2}$$

$T\Delta S = \Delta H - \Delta G$ Eq 3

With ΔH the enthalpy graphically determined, ΔG the free energy, ΔS the entropy, CAC' the critical aggregation concentration expressed in mole fraction terms, R the constant of perfect gases and T the temperature in Kelvin.

2.2.3.4. Microscale thermophoresis

MST experiments were performed with a Monolith NT.115 instrument (BLUE/pico-RED, NanoTemper technologies) operating at 25 °C in Nano BLUE configuration to record GAC intrinsic fluorescence. Experiments were performed in water or in water:ethanol solution (50/50 v/v), as a negative control, which prevented the formation of GAC particles. The samples were loaded into standard capillaries (NanoTemper Technologies) at concentration ranging from 0.05 % to 0.0005 %. Instrument parameters were as follows: 10 or 100 % LED power, medium or high microscale thermophoresis (MST), and 3/20/1 laser off/on/off, fluorescence ratio (cold/hot): (-1.0-0.0 s)/(0.5-1.50 s). Experiments were performed in triplicate and analyzed using the MO.Affinity Analysis software v2.3 (NanoTemper Technologies). Data were fitted with the Hill equation:

$$f(concentration) = unbound + \frac{bound - unbound}{1 + \left(\frac{EC50}{C}\right)^{Hill\ coefficient}} \quad \text{Eq (4)}$$

With EC50 the concentration at which 50% of the molecules were in the form of particles and C the concentration in GAC. The Hill coefficient corresponding to the steepness of the slope and reflecting cooperative behavior was fixed to one (no cooperativity).

3. Results and discussion

3.1. Turbidity measurements

The presence of particles in suspension in a liquid induces the presence of a turbidity if the solvent/polymer refractive indices are different and the particle size is greater than 50 nm. Indeed, when the light enters in contact with these objects, it is scattered in anisotropic way, which gives the medium a certain turbidity. This is a method already used to determine the CAC of micelles (Bakshi & Sachar, 2004; Das et al., 2016; Froehner et al., 2017). This is notably one of the techniques used by Bharmoria et al., (2013) to study the association between chitosan and surfactants and thus define a CAC value. This method has already shown to give results close to tensiometric measurements or pyrene fluorescence; well-knowns methods of determining the CAC (Bakshi & Sachar, 2004; Das et al., 2016; Peng et al., 2018). This measure would allow a good estimation of the CAC.

The aspect of GAC suspension upon concentration is depicted on Figure 1A. The apparition of the turbidity appeared clearly after 0.01%. This was confirmed by turbidity measurements performed at 620 nm reported on Figure 1B.

For the GA, the turbidity was always almost zero. Indeed, it is a polysaccharide highly soluble in water and at the concentrations studied it was totally dissolved into a clear solution. On the other hand, GAC being more hydrophobic, it formed spontaneous assemblies in water (Adam et al., 2022). The turbidity of GAC samples increased from a concentration of 0.01 % in pure water. Above this concentration the presence of turbidity was made visible. This could have corresponded to the CAC.

Above 0.1% the turbidity was so high that it saturated the instrument, which was shown by the inflection of the curve at higher concentrations. In addition, a minimum number of particles was required to be detected by the spectrophotometer. The CAC was thus largely exceeded

since at the lowest concentrations where the particles were formed, they were not numerous enough to induce a significant turbidity to be detectable by the spectrophotometer. However, this method allowed an approximation in the case where few devices were available. When the samples appeared clearly turbid, it was sure to have a large number of particles. It is nevertheless preferable if possible, to refine the results with other techniques.

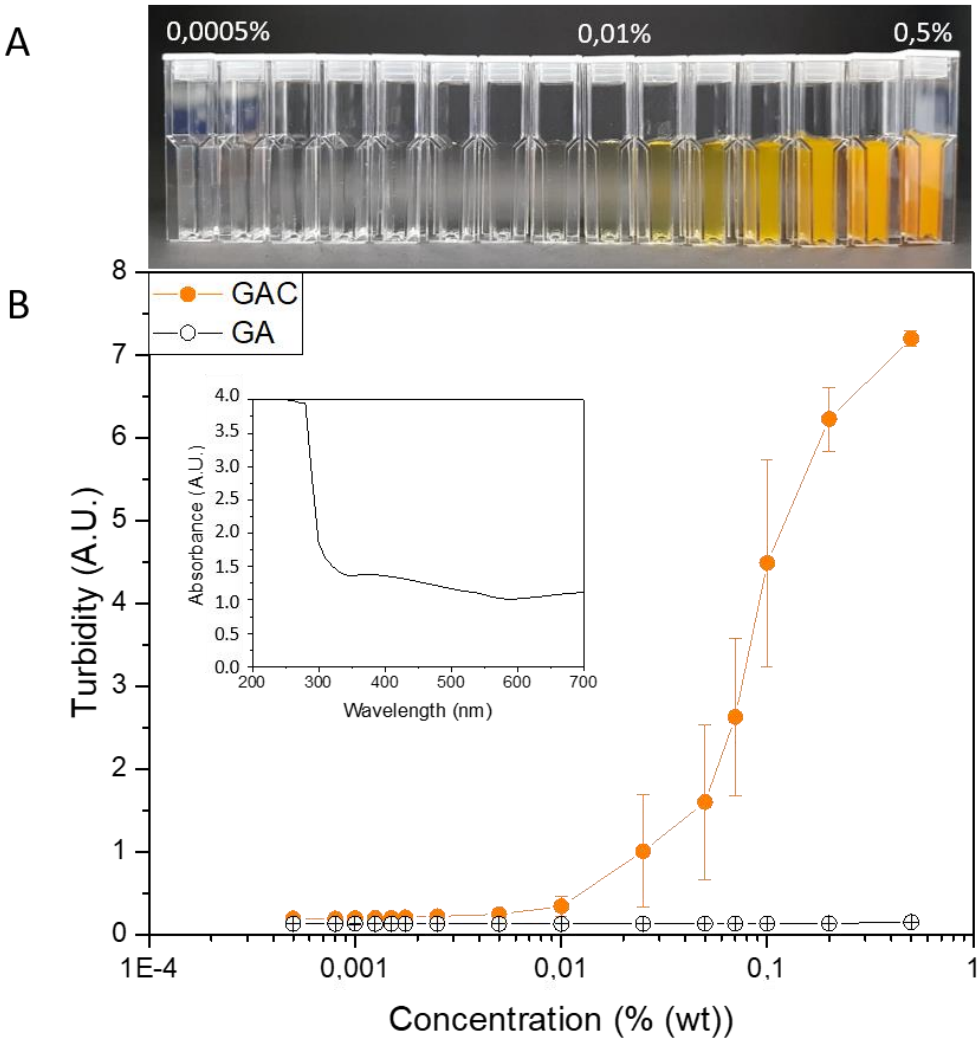


Figure 1: (A) Appearance of GAC dilutions in ultrapure water and (B) turbidity obtained by diluting GAC (orange) and GA (black) in ultra-pure water (log scale). insert: UV Visible spectrum of GAC

3.2. Size measurement and electrophoresis mobility

Dynamic light scattering is another technique used to determine the CAC of self-assemblies (Nagai et al., 2007). The size of the particles formed by self-assembly in water as well as their polydispersity index were studied as a function of the concentration of GAC in order to investigate the behavior of this polymer in water. Below CAC, DLS results could correspond to the free polydispersed polymer solubilized in water while upon CAC it could measure the monodispersed particles (Das et al., 2016). A drastic change in size and polydispersity was therefore expected at the CAC. In addition, GA is well known to be polydisperse contrary to GAC which formed monodispersed particles in water (Adam et al.,2022).

The obtained results are depicted in Figure 2. The most obvious event at first sight was the drop of the polydispersity index around 0.01% of GAC in water (Figure 2B). For the lowest concentrations it was rather high (on average about 0.7) which was in agreement with the theory that at low concentrations the polymer was under a dissolved form in the medium and since its polydispersity was quite high (Das et al., 2016). Before CAC, polymer macromolecules were dissolved in the solvent leading to a clear solution. At the CAC, the first particles were formed and coexisted with the solubilized macromolecules. The concentration of the free macromolecules remained then constant as the CAC corresponded to a solubility limit of the polymer in the solvent. Increasing the concentration could then led to the increase of the particles number. Since these particles presented a low polydispersity (Adam et al., 2022), the global polydispersity of the sample decreased drastically. Indeed, the number of dispersed particles increased and made the part of dissolved unassembled polymer negligible compared to the total amount of particles. So, a decrease of the polydispersity index would indicate that this CAC was exceeded. The measurement then represented only the well assembled particles. Thus, although the standard deviations were large (due to the strong polydispersity), it was

possible to think that the polydispersity index started to decrease around 0.0025%. The CAC would be below this concentration.

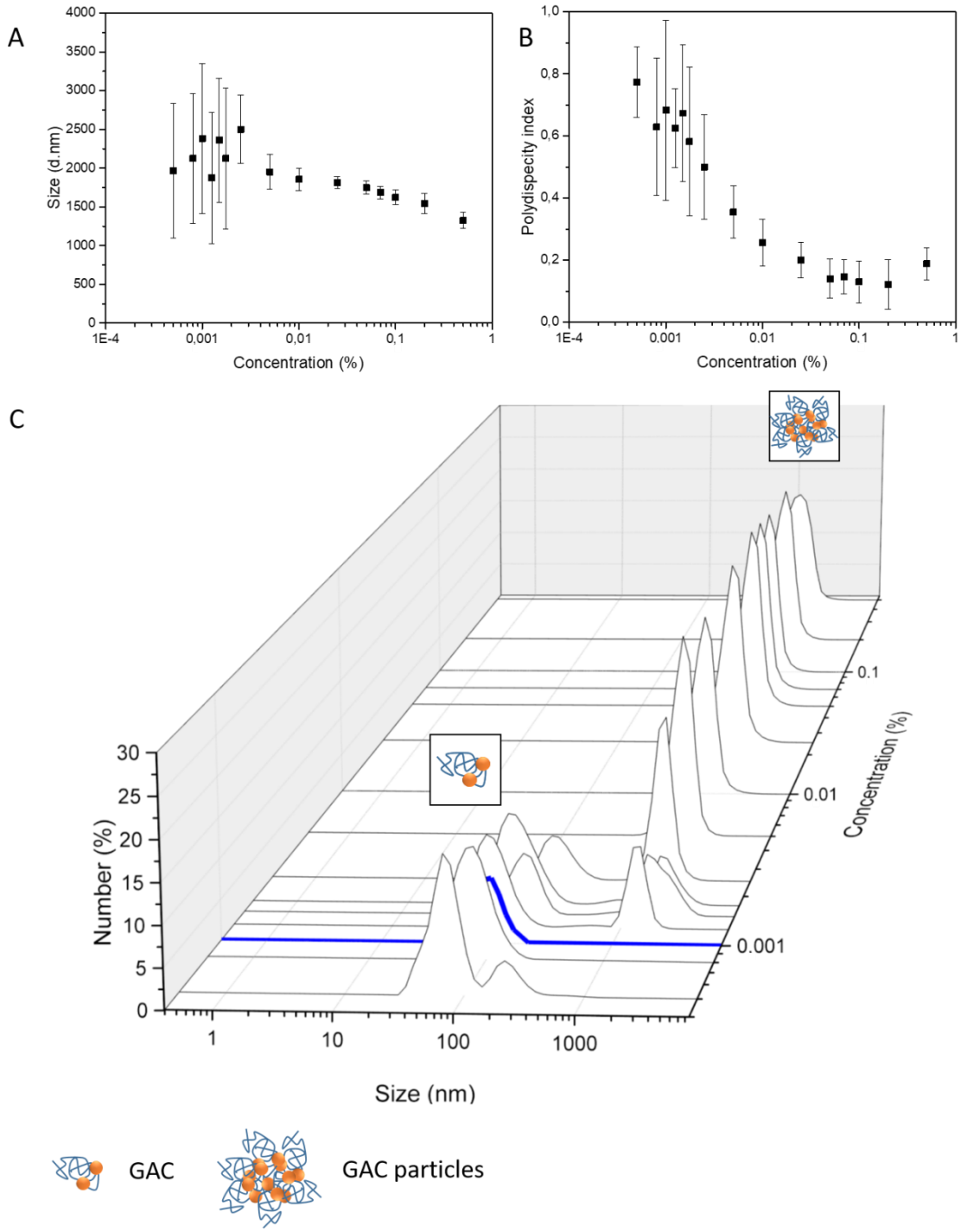


Figure 2: Representation of the evolution of (A) the obtained sizes expressed in intensity and (B) the polydispersity index upon GAC concentration (wt.%) in pure water (log scale). (C) Particles size distribution expressed in number of GAC in water upon polymer concentration. The distribution in blue corresponds to the possible CAC.

The size of the particles (Figure 2A) did not vary significantly because it was the average representation of a size in intensity of a polydisperse sample, as shown by the standard deviations obtained. Thus, the small objects were hidden by the larger ones. It was expected that the objects found could be smaller (subunits) and that when assembly occurred, the size of the objects increased (assembly) (M. Li et al., 2019; Nagai et al., 2007).

A look at the size distribution expressed in number should better inform on the state of the polymer at a given concentration as it has been schematized in Figure 3. Below the CAC, the polymer starts by adsorbing at the interphase. Indeed, it has been shown that GAC was able to decrease the surface tension (Adam et al., 2022). When this interphase is saturated then a certain amount of the polymer is present in solubilized form and only the signal of free polymer has been recorded since a bimodal distribution has appeared at the CAC with the formation of the first particles. Finally, when the number of particles increases upon concentration, only the population corresponding to the particles could be maintained. It was possible to consider distributions expressed in number (Figure 2C), shedding some light on this interesting event. At high concentrations one main population was present and centered around less than 1600 nm. Decreasing the concentration under 0.0025% caused the appearance of a smaller population. This population appeared to be about 80 nm in size, with was consistent with Rh value obtained from SEC MALS experiments (Adam et al., 2022). It would therefore be the unassembled polymer in solution – this measurement being quite close. These results were in agreement with those just above stated as they corroborated the presence of a CAC at a concentration lower than 0.0025%. Moreover, from 0.001% the population representing the self-assemblies disappeared. It seems that this concentration corresponds to the CAC value.

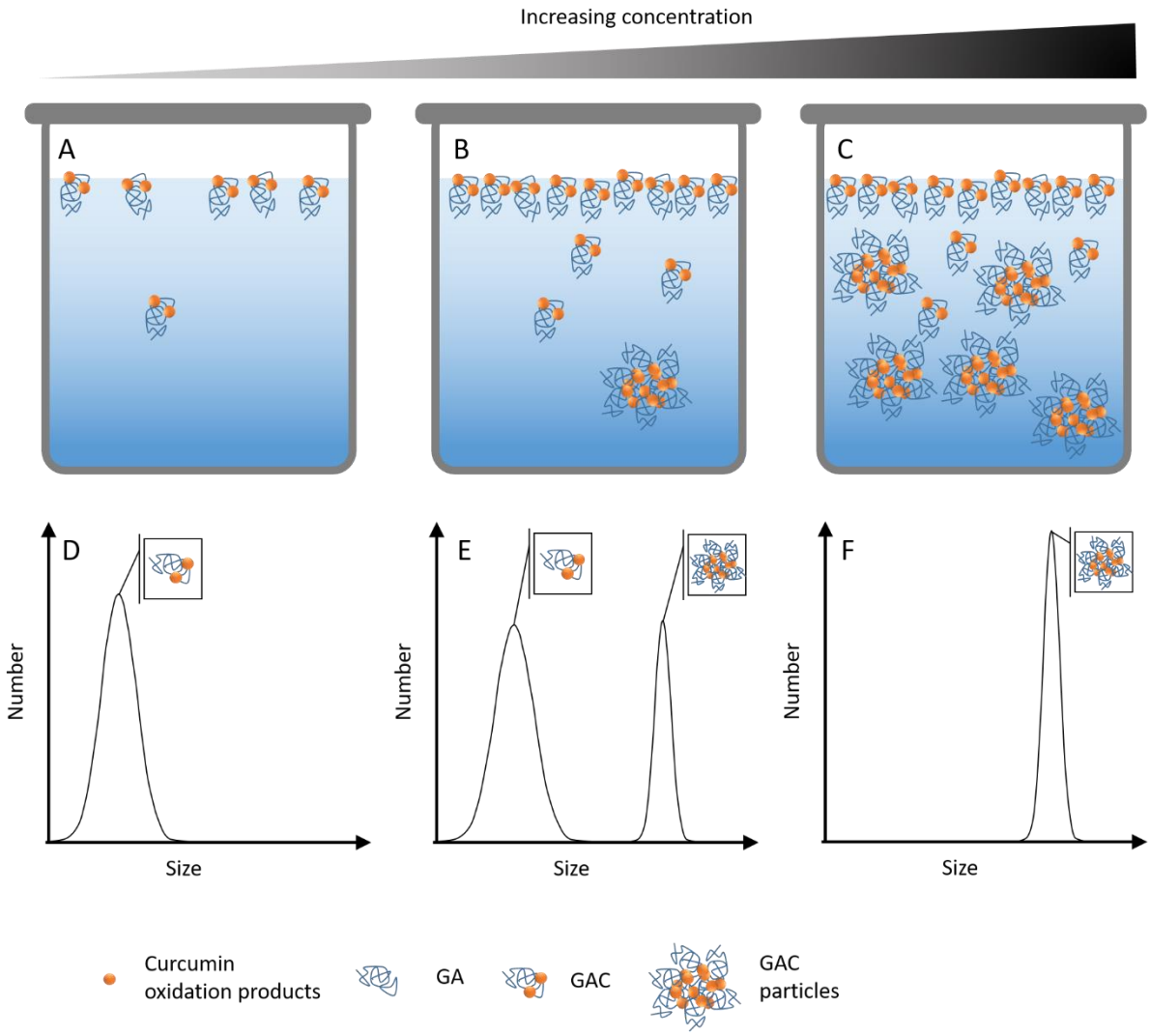


Figure 3: Schematic representation of the impact of increasing GAC concentration. (A) At a low concentration the polymer was soluble in the medium. (B) When the concentration increased the solubility limit was exceeded and particles started to form. The CAC was reached. (C) If the concentration continued to increase the number of subunits of the polymer remained stable but the number of particles increased. The graphs represent the DLS distributions if (D) the concentration was below the CAC, (E) the concentration was slightly above the CAC and (F) the concentration was well above the CAC.

Li et al., (2019), studied the formation of beta casein micelles to vectorize naringenin. DLS measurements also allowed them to determine the CAC of their assemblies. The diffusion intensity increased linearly with the protein concentration. Below the CMC (critical micellar concentration), the scattering intensities still had low values and above the CMC, the intensity as a function of protein concentration increased. It appeared that when the attenuator was fixed (Figure 4), a similar increase can be seen on the GAC system. The increase in scattered intensity

begun at 0.0015%. This concentration - lower than the one found by turbidity measurement - would therefore be the most accurate value of CAC.

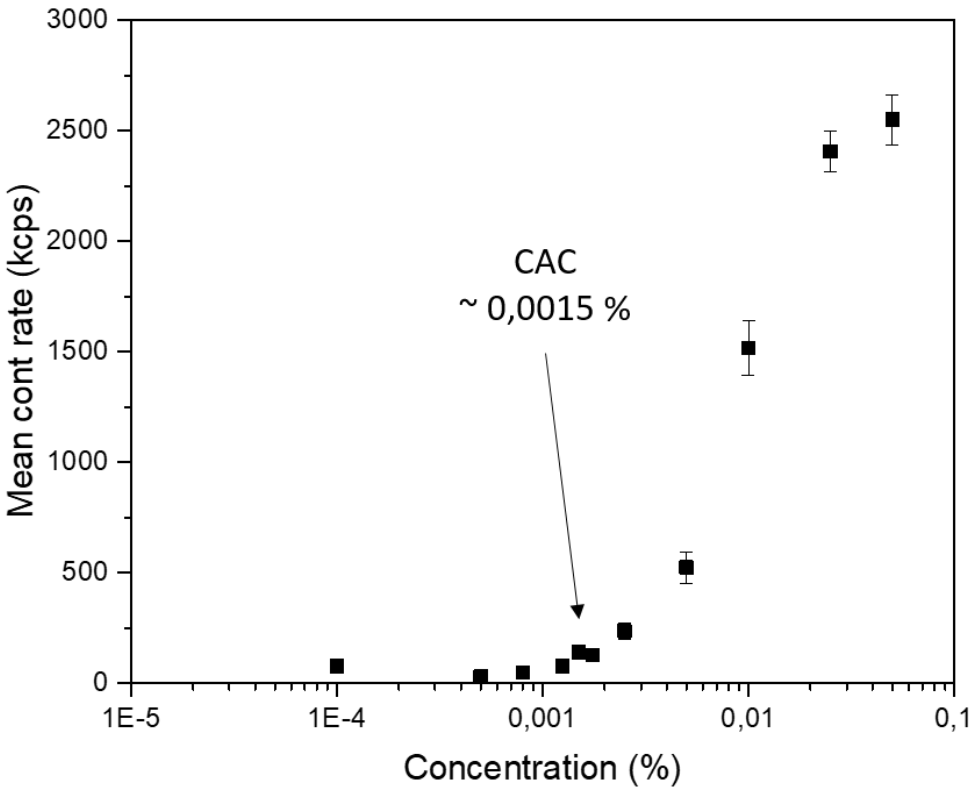


Figure 4: Plot of scattered light in counts per second as a function of GAC concentration measured by DLS when the attenuator was set at 6.

This technique allowed to see the polymer in solution in its unassembled form, which was quite interesting. This allowed to have an idea of its size and possibly to cross-check with other analyses previously performed such as SEC MALS analysis already carried out in a previous study (Adam et al., 2022). The representation of the strokes per second gave a rather accurate idea of the CAC. Nevertheless, these results had to be checked in parallel with other methods because results obtained at too low concentrations and were close the detection limit of DLS. To work at very low concentrations, other techniques could be considered. Li et al., (2019) who determined the CMC of casein also used ITC to validate DLS experiments. It

showed more accurate results with naringenin. Indeed, this method also allowed to show the solubility limit of free naringenin which was not visible in DLS.

3.3. Isothermal titration calorimetry

ITC measurements were performed as it is a common technique to determine the parameters of assembly forming micelles (Bouchemal et al., 2010). However, it was not possible to follow directly the self-assembly of GACD because the particles are already present in the samples. Therefore, it was chosen to inject a suspension of GACD into the measurement cell. The particles arriving in a very diluted medium first started to disassemble because the concentration was lower than the CAC. When the concentration increased to the CAC the particles begin to form. This is the common method to study this kind of phenomena (Bouchemal et al., 2010). It is possible to observe on the Figure 5 the experimental results obtained by ITC hoping to determine more precisely the CAC as well as the energy released during the assembly of the GAC particles. The results could not be fitted *via* the classical models because they did not present a classical form. However, it was possible to observe an increase in energy followed by a violent drop in energy. This drop would be the CAC at 0.0015% since this event was exothermic. It should be noted that despite the different conditions, the CAC appears identical to the DLS measurements. After CAC the exothermic signal go up. This could be due to a reorganization of the micelles.

The enthalpy of the assembly was determined at -500 $KJ.mol^{-1}$. It was largely negative. Assuming that this process was analogous to a micellization, it was then possible to determine the other thermodynamic parameters. ΔG was thus -60.8 $KJ.mol^{-1}$ and $T\Delta S$ was -439.2 $KJ.mol^{-1}$. A negative ΔG shown the spontaneity of the assembly while the $T\Delta S$ being also negative was unfavorable to this phenomenon (Bouchemal et al., 2010; Kabiri et al., 2013; Vuillemin et al., 2022). The enthalpogram clearly showed a first part negative enthalpy. This corresponded to the dilution of the assemblies which created disorder while at the CAC, the particles were

formed creating order. It therefore seems logical that the enthalpy became negative and the entropy unfavorable.

ITC is a good technique to determine the CAC to go further in the description of the system. Indeed, it allows to determine the thermodynamic parameters associated with the formation of self-assemblies.

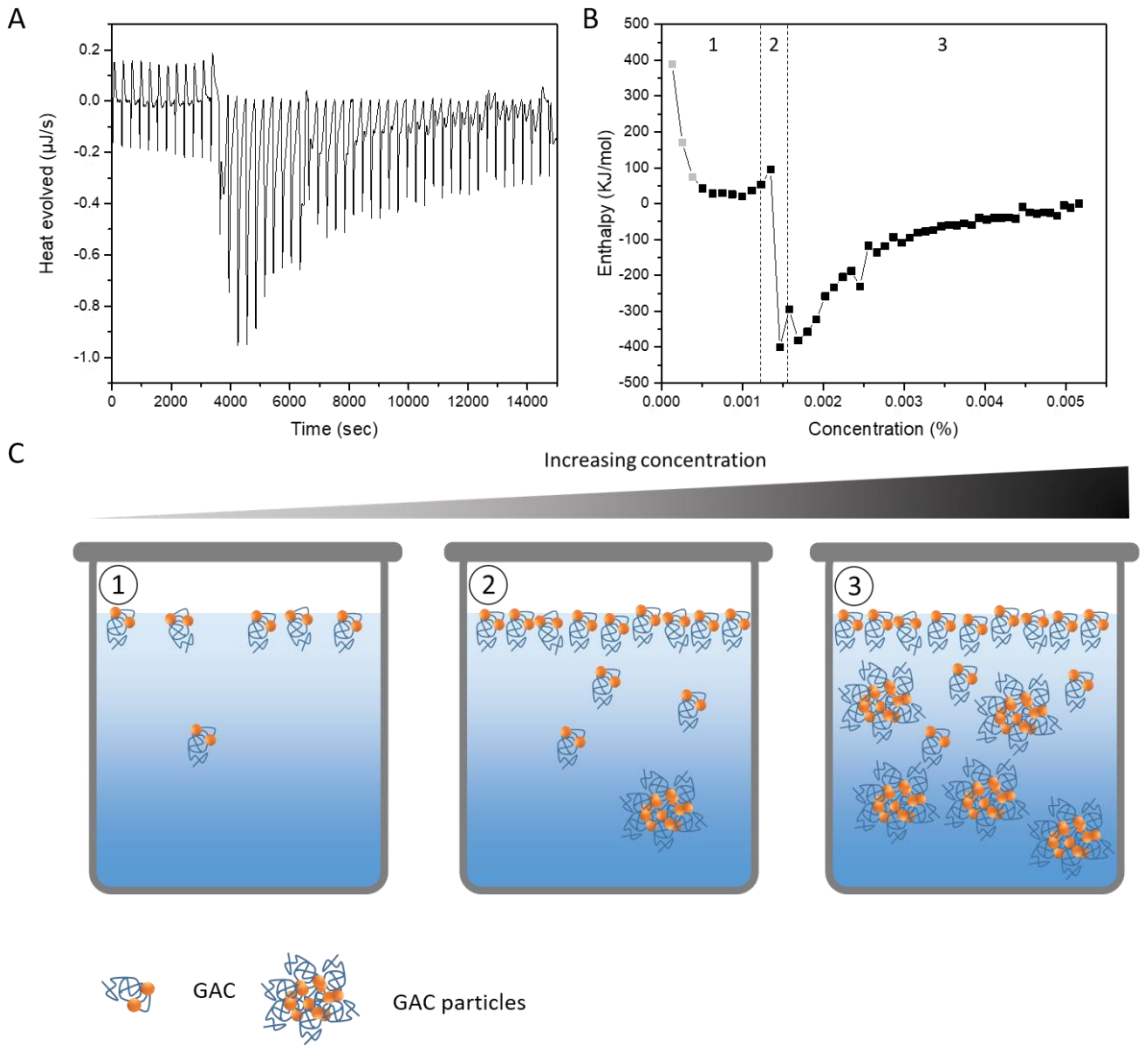


Figure 5: Enthalpogram corresponding to successive addition of GACD in water (A) raw data (B) molar enthalpy change (C) schematic representation of the impact of increasing the concentration of GAC. (1) At low concentration, the polymer was soluble in the medium. (2) CAC was reached (3) the number of particles formed increases. The 3 schematized steps correspond to the three steps on the enthalpogram.

3.4. Microscale thermophoresis

Microscale thermophoresis experiments were performed to determine the CAC. This technique is usually employed to determine affinity between molecules, studying chemical stabilities, among others (Jerabek-Willemsen et al., 2014) and is based on the migration of molecules into a thermal gradient (Duhr & Braun, 2006a, 2006b). This technique was perfectly adapted to determine a CAC though the modification follow-up of the thermophoretic behavior of GAC at different concentration. Foremost, the linearity of the fluorescence of GAC as a function of its concentration was verified either in water (Figure 6A) or in a 50:50 water:ethanol mixture (Figure 6B) in which GAC was highly soluble as negative control. It was therefore used as a control to compare a solution of GAC to a suspension in water. The fluorescence was linear in both cases (Figure 6A and B) which showed that the results are usable. The MST traces obtained for each GAC concentrations were an important evidence in the study of the CAC. Indeed, the traces had a smooth aspect in the absence of aggregates (Figure 6C at 0.0005%), while they presented bumps when a particle were found in the capillary ((Figure 6C at 0.001%). It was therefore possible to evidence that the lowest concentration for which particles were detected was ~0.001% corresponding to the CAC. This result was very close to the one found in ITC which showed that this technique also allowed a reliable determination of the CAC.

When GAC was dissolved in a water: ethanol (Figure 6D), no modifications of MST traces were observed which confirmed the absence of particles formation in the H_2O/EtOH mixture and so, the presence of particles in the water.

From the ratio of initial fluorescence and the fluorescence at the beginning of the IR-laser switch on, it was possible to draw response curves (Figure 6E). In water it was possible to draw this curve since the traces were different as a function of the concentration due to the interaction of the GAC molecules between them. In the water:ethanol mixture, it was not possible to define a fit according to the dose response model. Indeed, the points were similar as the traces were

identical since the GAC was totally solubilized. This was an additional evidence showing the interaction of GAC molecules between them to assemble in an aqueous medium.

These curves allowed to determine the EC50 value reflecting the affinity of GAC subunit during the self-assemblies in water by analogy with the dissociation constant (K_D). The EC50 value was evaluated at 0.007% which was equivalent to 8.9 nM. For example, Chebl et al., (2016) reported the formation of chitosan oligosaccharide lactate self-assemblies with an association constant of 3.9x104 $L.mol^{-1}$ which gives a K_D of 0.026 mM. In addition, Qin & Gronenborn, (2014) reported that a K_D of less than 10^{-6} M was indicative of a high affinity between the subunits of a complex. If we consider the EC50 as a value analogous to the K_D then it is possible to say that the affinity between the GAC subunits is very high. These results seem to be in agreement with the enthalpy value of the reaction which showed the spontaneity of the formation of the assemblies. The MST is however a very interesting technique because it is fast and gives complementary information to the ITC.

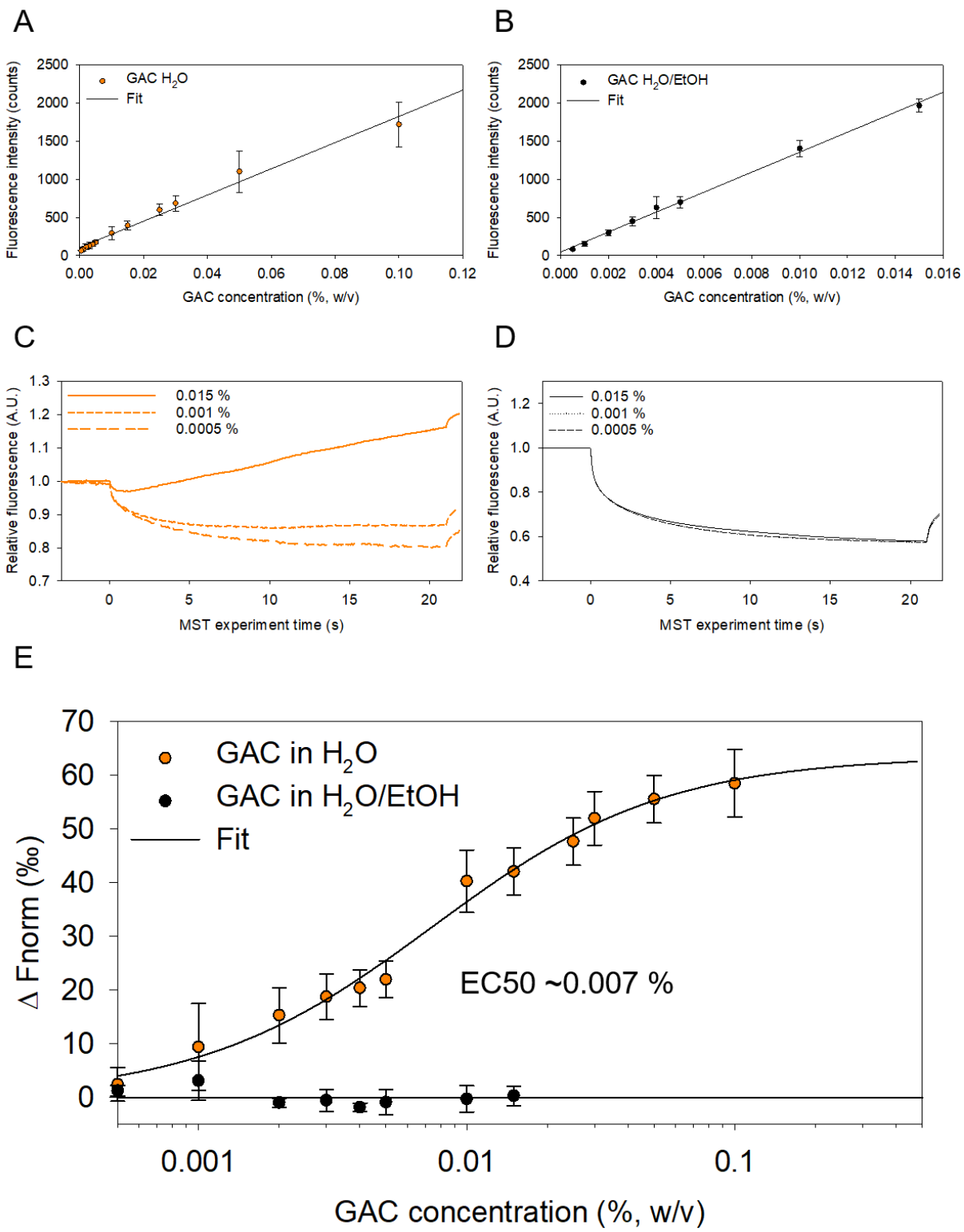


Figure 6: Linear representation of GAC fluorescence in (A) water and (B) water:ethanol mixture obtained from the initial fluorescence of capillaries. MST traces at 0.015%, 0.001% and 0.0005% for GAC in water (C) and in water:ethanol mixture (D); (E) dose-response curves of GAC in water (orange) and in water:ethanol mixture (black).

4. Conclusion

In a previous study, we reported that gum Arabic, once modified by the oxidation products of curcumin, could form micrometrics assemblies with a very low polydispersity (Adam et al., 2022). In the present study, characteristics of this assembly in water have been further investigated. It was shown that the formation of these particles induced a turbidity beyond 0.01 %. Nevertheless, this method may have overerestimated the CAC. DLS measurements allowed below a certain concentration to measure the size of the polymer dissolved in water and the follow-up of the PDI bring clues on the concentration at which particles start to appear. However, these methods were not very reliable for determining the CAC as they had a too high detection limit. Therefore, other methods had been considered. ITC could give sufficiently useful results to corroborate DLS and microscale thermophoresis could give several relatively reliable information on the assembly characteristics thanks to the intrinsic fluorescence of the polymer. The CAC was found to be within 0.001%. The EC50 value of the assembly was determined to be 0.007% which is relatively low. The GAC units therefore had a high affinity to each other.

5. Acknowledgments

The authors acknowledge support of the LIBio by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d’avenir – ANR).

The authors acknowledge support of the CPER Agrovalor.

We would like to thank Nexira for kindly providing the gum Arabic used in this article.

We would like to thank Novozymes for kindly providing the laccase used in this article.

We also thank Blandine Simard for the technical support.

We also thank Claire Gaiani for the Thermophoresis.

6. Declaration of interest

Declarations of interest: none

7. Author contribution

Aurélie A. ADAM: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Data curation; Writing original draft

Florentin Michaux: Conceptualization; Validation; Data curation; Supervision; Writing - reviewing & editing

Aurélie Seiler: Investigation; Data curation

Raphael Dos Santos Morais: Investigation; Data curation ; reviewing

Lionel Muniglia: Validation & reviewing

Jordane Jasniewski: Conceptualization; Investigation; Validation; Data curation; Supervision;

Writing - reviewing & editing

5. References

Adam, Aurélie A., Jordane Jasniewski, Marie E. Vuillemin, Blandine Simard, Jennifer Burgain, Régis Badin, Lionel Muniglia, and Florentin Michaux. « Enzymatic Mediated Modification of Gum Arabic by Curcumin Oxidation Products: Physicochemical and Self-Assembly Study ». Food Hydrocolloids 126 (mai 2022): 107451. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107451.

Akiyoshi, K., & Sunamoto, J. (1996). Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides. *Supramolecular Science*, *3*(1–3), 157–163. https://doi.org/10.1016/0968-5677(96)00031-4

Bakshi, M. S., & Sachar, S. (2004). Surfactant polymer interactions between strongly interacting cationic surfactants and anionic polyelectrolytes from conductivity and turbidity measurements. *Colloid and Polymer Science*, *282*(9), 993–999. https://doi.org/10.1007/s00396-003-1022-y

Bouchemal, K., Agnely, F., Koffi, A., Djabourov, M., & Ponchel, G. (2010). What can isothermal titration microcalorimetry experiments tell us about the self-organization of surfactants into micelles? *Journal of Molecular Recognition*, *23*(4), 335–342. https://doi.org/10.1002/jmr.998

Chebl, M., Abiad, M. G., Moussa, Z., & Patra, D. (2016). Two Modes of Associations of Curcumin with Pre- and Nanoaggregated Chitosan Oligosaccharide Lactate: Ionic Strength and Hydrophobic Bile Salt Modulate Partition of Drug and Self-Assembly Process. *The Journal of Physical Chemistry C*, *120*(20), 11210–11224. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01486

Curcio, M., Cirillo, G., Tucci, P., Farfalla, A., Bevacqua, E., Vittorio, O., Iemma, F., & Nicoletta, F. P. (2019). Dextran-Curcumin Nanoparticles as a Methotrexate Delivery Vehicle: A Step Forward in Breast Cancer Combination Therapy. *Pharmaceuticals*, *13*(1), 2. https://doi.org/10.3390/ph13010002

Das, S., Mondal, S., & Ghosh, S. (2016). Interaction of cationic gemini surfactant tetramethylene-1,4-bis(dimethyltetradecylammonium bromide) with anionic polyelectrolyte sodium carboxymethyl cellulose, with two different molar masses, in aqueous and aquo-organic (isopropanol) media. *RSC Advances*, *6*(37), 30795–30803. https://doi.org/10.1039/C6RA00640J

Denadai, Â. M. L., Teixeira, K. I., Santoro, M. M., Pimenta, A. M. C., Cortés, M. E., & Sinisterra, R. D. (2007). Supramolecular self-assembly of β-cyclodextrin: An effective

carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydrate Research*, *342*(15), 2286–2296. https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.05.002

Douglas, S. M., Dietz, H., Liedl, T., Högberg, B., Graf, F., & Shih, W. M. (2009). Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, *459*(7245), 414–418. https://doi.org/10.1038/nature08016

Duhr, S., & Braun, D. (2006a). Optothermal Molecule Trapping by Opposing Fluid Flow with Thermophoretic Drift. *Physical Review Letters*, *97*(3), 038103. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.038103

Duhr, S., & Braun, D. (2006b). Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(52), 19678–19682. https://doi.org/10.1073/pnas.0603873103

Froehner, S., Sánez, J., Dombroski, L. F., & Gracioto, M. P. (2017). Critical aggregates concentration of fatty esters present in biodiesel determined by turbidity and fluorescence. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(25), 20747–20758. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9593-1

Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P., & Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*, *1077*, 101–113. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009

Kabiri, M., Bushnak, I., McDermot, M. T., & Unsworth, L. D. (2013). Toward a Mechanistic Understanding of Ionic Self-Complementary Peptide Self-Assembly: Role of Water Molecules and Ions. *Biomacromolecules*, *14*(11), 3943–3950. https://doi.org/10.1021/bm401077b

Kraisomdet, P., Pratess, T., Na Nakorn, P., Sangkaew, P., Naneto, A., Inprakon, P., Panbangred, W., & Patikarnmonthon, N. (2020). Amphiphilic dextran-vinyl laurate-based nanoparticles: Formation, characterization, encapsulation, and cytotoxicity on human intestinal cell line. *Progress in Biomaterials*, *9*(1–2), 15–23. https://doi.org/10.1007/s40204-020-00128-1

Li, M., Fokkink, R., Ni, Y., & Kleijn, J. M. (2019). Bovine beta-casein micelles as delivery systems for hydrophobic flavonoids. *Food Hydrocolloids*, *96*, 653–662. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.005

Mai, Y., & Eisenberg, A. (2012). Self-assembly of block copolymers. *Chemical Society Reviews*, *41*(18), 5969. https://doi.org/10.1039/c2cs35115c

Marsh, D. (2012). Thermodynamics of Phospholipid Self-Assembly. *Biophysical Journal*, *102*(5), 1079–1087. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.049

Mendes, A. C., Baran, E. T., Reis, R. L., & Azevedo, H. S. (2013). Self-assembly in nature: Using the principles of nature to create complex nanobiomaterials. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *5*(6), 582–612. https://doi.org/10.1002/wnan.1238

Nagai, A., Nagai, Y., Qu, H., & Zhang, S. (2007). Dynamic Behaviors of Lipid-Like Self-Assembling Peptide A₆D and A₆K Nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *7*(7), 2246–2252. https://doi.org/10.1166/jnn.2007.647

Nichifor, M., Stanciu, M. C., & Doroftei, F. (2021). Self-assembly of dextran – b – deoxycholic acid polyester copolymers: Copolymer composition and self-assembly procedure tune the aggregate size and morphology. *Carbohydrate Polymers*, *252*, 117147. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117147

Peng, S., Li, Z., Zou, L., Liu, W., Liu, C., & McClements, D. J. (2018). Improving curcumin solubility and bioavailability by encapsulation in saponin-coated curcumin nanoparticles prepared using a simple pH-driven loading method. *Food & Function*, *9*(3), 1829–1839. https://doi.org/10.1039/C7FO01814B

Philp, D., & Stoddart, J. F. (1996). Self-Assembly in Natural and Unnatural Systems. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *35*(11), 1154–1196. https://doi.org/10.1002/anie.199611541

Qin, J., & Gronenborn, A. M. (2014). Weak protein complexes: Challenging to study but essential for life. *The FEBS Journal*, *281*(8), 1948–1949. https://doi.org/10.1111/febs.12744

Sarika, P. R., James, N. R., Kumar, P. R. A., Raj, D. K., & Kumary, T. V. (2015). Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, *134*, 167–174. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.068

Six, J.-L., & Ferji, K. (2019). Polymerization induced self-assembly: An opportunity toward the self-assembly of polysaccharide-containing copolymers into high-order morphologies. *Polymer Chemistry*, *10*(1), 45–53. https://doi.org/10.1039/C8PY01295D

Vuillemin, M. E., Michaux, F., Seiler, A., Linder, M., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2022). Polysaccharides enzymatic modification to control the coacervation or the aggregation behavior: A thermodynamic study. *Food Hydrocolloids*, *122*, 107092. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107092

Wang, J. (2016). Peptide self-assembly: Thermodynamics and kinetics. *Chem Soc Rev*, 17.

Zhang, S. (2002). Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnology Advances*, *20*(5–6), 321–339. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00026-5

1.5 Contribution de l'article

Lorsque la GAC est présente en très faible concentration dans un milieu aqueux, elle peut être soluble. Cependant lorsque la concentration augmente, la limite de solubilité de ce polymère peut être dépassée. C'est à cet instant que la CAC est atteinte et que des assemblages peuvent se former. Si la concentration continue d'augmenter, alors la part de polymères solubles deviendra négligeable par rapport à la quantité de particules.

Dans cette étude, il a été montré que pour déterminer la CAC, la mesure de la turbidité permet une première approximation à 0,01%. Cependant, elle est peu précise à cause de la limite de sensibilité des spectrophotomètres – un très faible nombre de particules n'induisant pas suffisamment de turbidité. Il est possible de voir en Figure 51 un comparatif des résultats obtenus entre les différentes méthodes.

La diffusion dynamique de la lumière a quant à elle permis de détecter le polymère solubilisé à de faibles concentrations. De plus, lorsque la quantité de lumière diffusée en fonction de la concentration est suivie, il est tout à fait possible d'obtenir une valeur de CAC précise (0.0015%). En effet, la valeur obtenue a été validée par les deux autres méthodes utilisées : l'ITC et la MST. Ces deux méthodes peuvent paraître plus complexes à mettre en œuvre mais permettent d'obtenir d'autres types d'informations sur l'assemblage. L'ITC a donc permis de définir une valeur précise de la CAC (0,0015%) mais également d'obtenir les paramètres thermodynamiques de l'assemblage. Il a été vu que l'enthalpie liée à l'assemblage est négative et que malgré une entropie négative, l'énergie libre de Gibbs reste négative. Cela démontre la spontanéité de l'assemblage et met en lumière un certain degré d'organisation de la matière surement dû à la formation de liaisons de faible énergie.

La thermophorèse microéchelle a permis avec succès de déterminer la CAC de la gomme d'Acacia modifiée (0,001%) mais aussi de définir un autre paramètre intéressant : l'EC50. Ainsi

il a pu être montré que l'affinité entre les sous unités de GAC était très forte ce qui semble en accord avec le fait que l'enthalpie dirige cet assemblage. Cet article a pu montrer que malgré qu'elle n'ait jamais été utilisée pour étudier la formation de particules, la thermophorèse microéchelle est une méthode plutôt prometteuse pour déterminer une CAC. Cependant, il faut garder à l'esprit que cette technique repose sur la fluorescence. Il faut alors souvent avoir à recourir à des modifications des polymères pour les rendre fluorescents et ces modifications structurales peuvent impacter significativement les interactions entre les polymères.

Ces résultats ont donc permis de définir la CAC de la GAC à environ 0,001 % ainsi que d'autres paramètres permettant de mieux comprendre l'assemblage. Cependant la compréhension de ce phénomène n'est pas encore complet. Il reste encore à étudier les interactions intervenant entre les sous unités de GAC. Cela peut être réalisé en étudiant les propriétés des assemblages en fonction des conditions physicochimiques du milieu notamment le pH, la température et la force ionique.

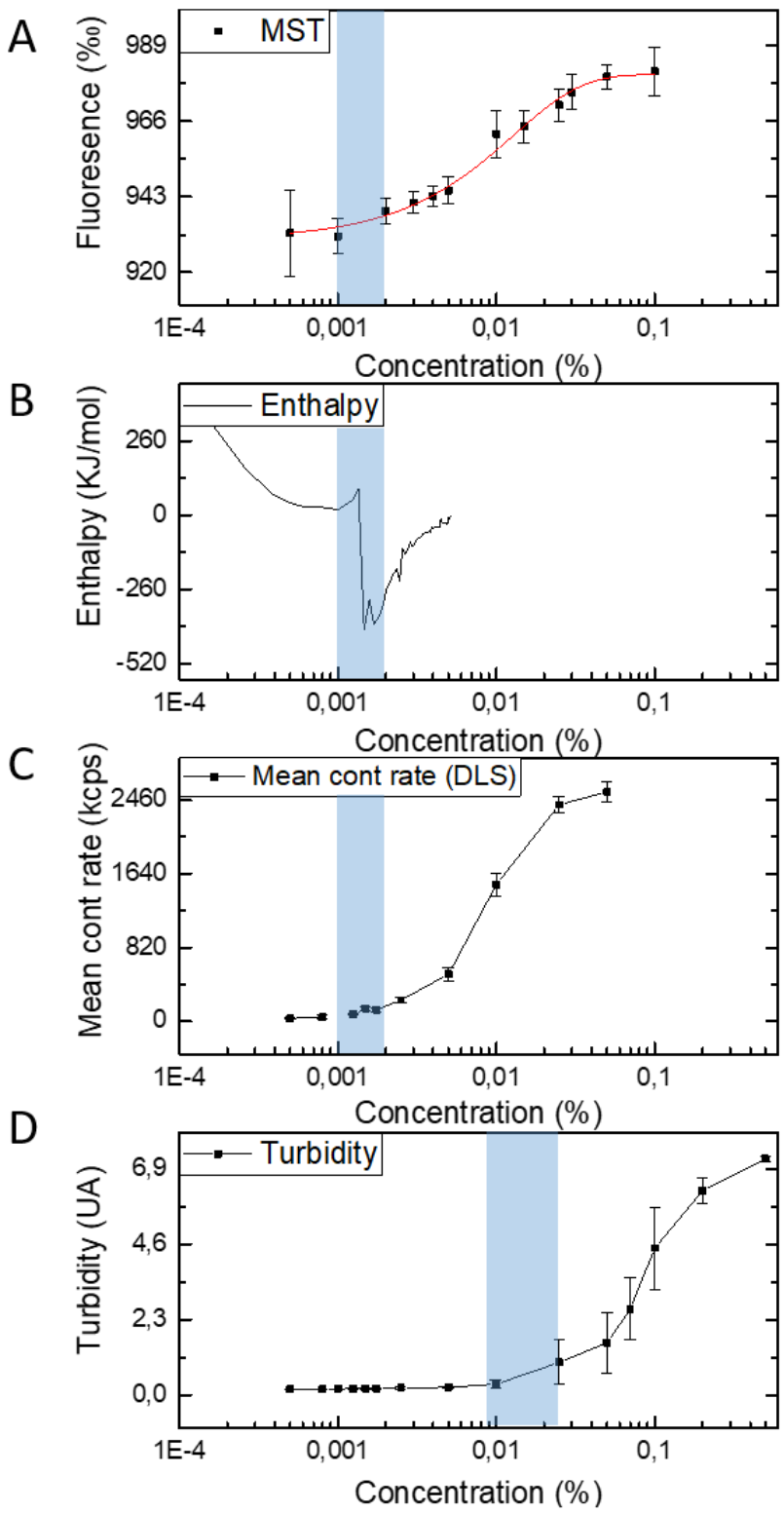


Figure 51 : Résultats obtenus par (A) MST, (B) ITC, (C) DLS et (D) spectrométrie dans le but de déterminer la CAC de la GAC (zone bleue)

3 Article n°3

1.6 Introduction

Suite à la détermination de la CAC de la GAC dans l'eau, nous nous sommes intéressés à l'impact des conditions physicochimiques sur la formation des particules obtenues par déplacement de solvant. En effet, comme les assemblages sont régis par les interactions ou répulsions de faible énergie, ils sont tout à fait dépendants des conditions du milieu dans lequel ils se forment. Ainsi, nous avons étudié l'impact du pH, de la force ionique et de la température sur la distribution de taille (taille moyenne et indice de polydispersité) des particules formées par la GAC par déplacement de solvant. Pour étudier l'impact de la force ionique sur les particules, il a fallu dialyser les échantillons de GAC. Lors des premières mesures de tailles et d'indice de polydispersité sur cette GAC dialysée (GACD), quelle que soit la force ionique utilisée elle ne semblait pas avoir d'effet. En réalité les particules de GAC étaient déjà formées dans la poudre issue de la fonctionnalisation et n'étaient que resuspendues dans le milieu. En effet, après la précipitation à l'éthanol, qui permet d'arrêter la réaction enzymatique et de séparer gomme fonctionnalisée et gomme non fonctionnalisée, la GAC se trouvait dans un mélange eau : éthanol 1 : 3. Lorsque l'éthanol était évaporé, alors l'équilibre de solvant était déplacé vers l'eau. La GAC étant insoluble dans l'eau au-dessus de 0,001%, les particules commençaient à se former dans le ballon de l'évaporateur rotatif. Les particules de GAC étant très solides elles résistaient ensuite à l'étape de lyophilisation. Elles étaient donc déjà formées dans la poudre obtenue et ne répondaient pas aux conditions du milieu environnant.

Pour remédier à ce problème, nous avons alors décidé d'essayer de solubiliser la GACD (cf. annexe 1). Cela nous permettait de pouvoir contrôler les conditions dans lesquelles se formaient les particules en ajoutant un volume connu de solution aqueuse pour déplacer l'équilibre des solvants vers l'eau. Les particules ainsi obtenues, pouvaient donc répondre aux conditions physicochimiques environnantes.

Pour éviter d'étudier indépendamment l'impact de chaque facteur, il a été décidé de mettre en place une approche par plan d'expériences. Cette méthode permet de minimiser le nombre d'essai tout en permettant de modéliser l'impact des différents facteurs choisis et leurs interactions. A partir de l'impact de ces différents facteurs il est alors possible d'imaginer quelles interactions sont responsables de la formation des assemblages.

1.7 Article n°3 :

Experimental design to quantify the effects of physico-chemical factors on self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products

Aurélie A. Adam[1], Florentin Michaux[1], Paul Hubert Baudelet[2], Lionel Muniglia[1], Jordane Jasniewski[1]

[1] Université de Lorraine, LIBio, F-54000 Nancy, France

[2] Université de Lorraine, IAM, F-54000 Nancy, France

* Corresponding author:

Highlights:

- The modified gum Arabic can form assemblies by ouzo effect
- A response surface methodology was used to evidence the influence of the physio-chemical factors onto the size distribution of the particles and to determine the conditions necessary to obtain the desired optimum
- Ionic, hydrophobic interactions and hydrogen bonds play a key role in the assembly of modified gum Arabic
- The modified gum Arabic assembly seems to be a pH responsive system

ABSTRACT: Gum Arabic (GA) is a complex polysaccharide widely used for its amphiphilic properties. It has been enzymatically modified by the oxidation products of curcumin obtained by enzymatic way in aqueous solution. This green process allows to modify the physicochemical properties of the gum. In particular, it induces a decrease in the hydrophilicity of the polysaccharide leading to its ability to self-assemble in aqueous medium. As all assemblies are formed by low energy interactions, they are totally dependent on the physicochemical conditions of their environment. In this study, a three-factor, five-level central composite design was developed to investigate the impact of temperature, ionic strength and pH on the final size characteristics of the particles. In particular, it was shown that controlling the pH modified the sizes of the observed objects. Ionic strength and temperature affected more the distribution of size than the size itself. The formation of the assemblies thus depends on the strength of electrostatic interactions between the monomers of modified gum Arabic but also on hydrophobic interaction and hydrogen bonds.

KEYWORDS: Gum Arabic, curcumin, self-assembly, ouzo effect, response surface methodology, optimization

1. Introduction

Self-assemblies are structures formed by associative phase separation. Instead of being miscible or separating completely, a phenomenon can occur where the polymers in presence form colloidal particles. The interactions between polymers and between polymers and solvent *via* weak bonds are the basis for the formation of self-assemblies. The synergy between these different non-covalent interactions determines if these particles can be formed and how. However, due to their nature, these interactions can be modulated as a function of physicochemical factors of the medium, such as pH, temperature, counterions or even concentrations (J. Wang 2016). These are therefore factors that can allow to modulate the assembly characteristics.

Chen et al. (2020) studied the influence of ionic strength on the assembly of soybean proteins. For this purpose, different salt concentrations were tested. Solutions at 0.1, 0.15 and 0.2 M NaCl were turbid, while at 0.05 M they were clear. The appearance of this turbidity was due to the presence of spherical particles with a diameter of 1 µm. This was due to a coacervation of the proteins thanks to the addition of salts capable to screened the charges of the proteins in presence. This allowed to decrease the electrostatic repulsion between the proteins, thus favouring the assembly. The salt concentration influenced the exposure of the basic polypeptides which were more hydrophobic and therefore influenced the hydrophobicity of the protein surface. The authors then studied the effect of pH on coacervation at an ionic strength set at 0.1 M NaCl. They showed that decreasing the pH towards the isoelectric point of the proteins decreased the charge density of the proteins, which in turn decreased the strength of the electrostatic repulsions. This then favoured coacervation. However, if the charge was too low this led to flocculation.

The pH has also a fundamental role in the assembly of colloidal objects. Indeed, the degree of ionization influences the electrostatic interactions. An ionization increase can therefore lead

to a higher repulsion while a decrease may lead to aggregation (Mellot et al., 2018). Giannotti et al. (2011) studied the formation of functional polyelectrolyte nanoparticles. Trimethyl chitosan was able to form polyelectrolyte complexes with the lysosomal enzyme α-GAL by self-assembly forming monodisperse spherical particles less than 200 nm in size, and positively charged. These nanoparticles were stable under physiological conditions. However, at acidic pH, the mean diameter increased and the size distribution was wider. The modified chitosan showed a much lower positive charge density. Since electrostatic interactions were the most important forces in maintaining the assembly, the drop in pH weakened the assembly. As a result, these particles were able to disassemble due to electrostatic repulsion.

The temperature can also be very important as it affects the interactions between the polymers. For example, it has been shown that some polymers only assemble above a certain temperature. Indeed, the hydrogen bonds with the solvent are broken which can induce an assembly of the polymer chains by dehydration as for pullulan-grafted-poly(propylene oxide) (Nishimura et al., 2020).

Other authors report that the increase in temperature induced an increase in turbidity of green fluorescent protein grafted with poly[(oligo ethylene glycol)methyl ether methacrylate]. This change is believed to be due to the formation of dispersed aggregates with a hydrophobic core and a rather hydrophilic outer layer composed of the protein part. The polymers were able to assemble at high temperature thanks to the hydrophobic interactions that are favored by increasing temperature (Moatsou et al., 2015).

Previous studies reported self-assembled particles (Adam, Michaux, et al., s. d.) were formed by laccase-mediated system with gum Arabic and curcumin. The laccase oxidized curcumin to produce reactive oxidation products (POX) grafting to the gum Arabic (GA) by ester bonding to form a modified gum (GAC). The native assembly of these particles was characterized simply by size measurements, microscopic observations and measurement of the

critical aggregation concentration (CAC). However, it was not question to study the physicochemical conditions of the medium whereas these can modify the obtained objects. This article focuses on the study of the modification of these factors and particularly of the temperature, pH and ionic strength.

To study the impact of these different factors, it is possible to opt for a systematic method namely, to vary each factor independently while fixing the other factors (One Factor At a Time, OFAT). However, this method is tedious because it often requires a large number of experiments and does not allow to study the interactions between factors and to model the phenomena. An alternative that allows the effects of factors and interactions to be predicted is the response surface methodology. It was originally developed and described by Box and Wilson (Hill & Hunter, 1966; Kotz & Johnson, 1992). Experimental design is a set of tools used to study the behavior of a system. It involves planning and conducting a series of experiments to model the effects of experimental variables (factors) on that system (Hill & Hunter, 1966; Khuri & Mukhopadhyay, 2010; Mäkelä, 2017). In this way, thanks to modelization, it is possible to determine in advance the impact of physicochemical conditions on the formation of the studied assemblies.

For example, Liu et al. (2019) studied the assembly of sodium alginate and β-conglycinin. They studied the influence of 3 factors (the total concentration of the two compounds, the mass ratio between the two and the influence of pH) on particles formation. The order of importance of the three factors could be determined. In order of importance: mass ratio between sodium alginate and β-conglycinin > pH > total concentration. It could also be determined how pH influenced the assembly. At low pH, the positive charges of β-conglycinin increased while the negative charges of sodium alginate molecules decreased. With increasing pH, the charge density changed as well as the interactions between the molecules. This led to a favored formation of the assemblies.

In this study, the formation of modified gum acacia assemblies as a function of environmental factors (pH, ionic strength and temperature) will be investigated through the use of a response surface methodology. It should bring information on the kind of interactions which drive the formation of the assemblies of GAC molecules by ouzo effect molecules in aqueous solutions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Gum Arabic (GA) from *Acacia senegal* called Instantgum AA was a gift from Nexira (France). Curcumin (> 65 %) (Cur), salt for buffer solution (Na_2HPO_4 and KH_2PO_4), NaCl, NaOH and HCl was purchased from Sigma Aldrich (France) and ethanol and acetonitrile at analytical grade was purchased from Carlo Erba (France).

The Novozymes laccase “Novozym 51003” (BGAsvaerdt, Denmark) is a fungal phenol oxidase from *Myceliophthora thermophila* produced in *Aspergillus oryzae*. Laccase activity is expressed in Laccase *Myceliophthora* Units (LAMU) which is defined as the amount of enzyme that oxidises 1 micromole of syringaldazine per minute. The activity of Laccase was 22,315 ± 2,732 $LAMU.g^{-1}$.

2.2. Methods

2.2.1. Functionalization of Acacia Gum by curcumin oxidation products

The method used has been reported in previous study (Adam, Michaux, et al., s. d.). Briefly, the enzymatic reaction was carried out at 30 °C and involves 10 g of gum suspended in 50 mM phosphate buffer at pH 7.4, 50 ml curcumin at 50 mM in ethanol and 10.25 LAMU.mL^{-1} of laccase. The sample was frozen and freeze-dried. A dialysis (MWCO 10,000 Da from Membrane Filtration Products Inc.) of the of the resulting sample against distilled water was then carried out to recover pure GAC to remove buffer salts and recover pure modified GAC. Thus, the influence of the ionic strength can be studied without interference.

2.2.2. Experimental design

A three-factor-five-level central composite design (CCD) based on 16 experimental runs at various numerical values of pH, ionic strength, temperature was conducted to investigate their main and interactions contribution on particle size and polydispersity index. Table 1 shows the levels of the three independent variables and their coded values.

Table 1: Actual and coded values of central composite design factors.

Independent variables	**-α**	**-1**	**0**	**1**	**+α**
Temperature (°C)	20.0	27.2	40.0	52.8	60.0
Ionic strength (mM)	0.0	23.4	65.0	106.6	130.0
pH value	3.0	4.08	6.0	7.92	9.0

To describe the experimental data, non-postulated regression equations were computed, whose regressors correspond to logical interactions (AND, OR, IF….) between factors according to Lesty 1999 and Lesty & Buat-Ménard (1982). Equation (1) gives an example of a generated model:

$$Y = b_0 + b_1 (X_i \; LIKE \; X_j) + b_2 (X_k \; AND \; X_j) + \ldots + b_n (X_i \; OR \; X_k) \qquad \text{Eq (1)}$$

Where *y* was the response (size or polydispersity index), X_i, X_j, were the independent variables affecting the responses, b_0 was the model intercept coefficient; b_1, b_2... b_n were the regression coefficients, *LIKE, AND, OR*, … are the expressions of computed interactions.

X_i LIKE X_j : Y is high when X_1 varies like X_2

X_i AND X_k : Y is high when X_1 and X_2 are high.

X_1 IS MODULATED by X_2 : Y is high when X_1 is high if X_2 is high.

X_1 OR X_2 : Y is high when X_1 is high OR X_2 is high.

Best conditions to maximize or minimize the responses and the Pareto frontier were obtained using a Monte Carlo methodology of 10,000 draws.

2.2.3. Statistical tools

Response surface design, data processing and statistical analysis were performed using pyDOE2 1.3.0 and Statsmodels v0.13.0 and the LestPy package. The Sobol indices of the Sensitivity analysis was performed using SALib 1.4.5 (Herman & Usher, 2017).

2.2.4. Sample preparation

1g of GAC was solubilized in 0.5 mL of a 50:50 water:acetonitrile mixture and vortexed 30 sec to dissolve the entire sample. Then, the pH was adjusted to the desired value by adding 50 µL of NaOH or HCl (pH3: 7mM; pH4: 0.5mM; pH6: 3mM; pH7.9: 6mM; pH9: 23mM) and the sample was homogenized. 1.5 mL of saline solution (NaCl) was then added to fix the ionic strength. The sample was again homogenized. The addition of this large quantity of aqueous solution allowed the particles to be form by ouzo effect.

2.2.5. Size and polydispesity index measurements

Measurements were made with Zetasizer Nano-ZS apparatus (Malvern Panalytical, United Kingdom) equipped with a He/Ne ion laser (λ = 532 nm) in a backscattering with a measurement angle of 173 °. Experiments were performed at 25 °C with an equilibrating time of 120 s in a disposable folded capillary cell (DTS1070, Malvern Panalytical).

Measurements were made in triplicate and expressed with mean ± standard deviation.

2. Results and discussion

2.1. Validation of the results

An experimental design was set up to determine the impact of environmental conditions on the formation of GAC particles. All the results are presented in experiments in the center of the domain and has been repeated 3 times.

Table 2 which groups the different tests carried out and the results obtained. The experiment n°15 represents experiments in the center of the domain and has been repeated 3 times.

Table 2: List of experiments and results of the experimental design

Experiences	Temperature	Ionic strength (mM)	pH	Particles size (nm)	Polydispersity index
e1	28	23	8	172.5 ± 4.3	0.150 ± 0.015
e2	53	23	8	128.4 ± 18.8	0.343 ± 0.050
e3	28	106	8	180.7 ± 3.1	0.148 ± 0.003
e4	53	106	8	186.5 ± 1.8	0.183 ± 0.018
e5	28	23	4	184.6 ± 5.9	0.247 ± 0.080
e6	53	23	4	226.6 ± 21.0	0.334 ± 0.066
e7	28	106	4,	175.4 ± 11.7	0.401 ± 0.104
e8	53	106	4	197.4 ± 3.9	0.204 ± 0.019
e9	40	65	3	244.2 ± 5.5	0.192 ± 0.009
e10	40	65	9	152.2 ± 3.0	0.160 ± 0.011
e11	20	65	3	209.0 ± 13.2	0.262 ± 0.038

e12	60	65	9	116.5 ± 7.1	0.242 ± 0.007
e13	40	0	6	178.8 ± 2.9	0.205 ± 0.022
e14	40	130	9	150.6 ± 1.7	0.177 ± 0.019
e15	40	65	6	196.1 ± 6.2	0.167 ± 0.009
e16	40	65	3	244.2 ± 5.5	0.192 ± 0.009

The sizes and polydispersity indices were variable depending on the physicochemical conditions applied. The PDI can be high, so it was necessary to check if the average size in intensity was exploitable in these conditions. In Figure 1 are presented the populations of sizes in intensity measured for a PDI lower than 0.2 (monodisperse) and a PDI higher than 0.2 (polydisperse). Only one population was visible. Therefore, we decided to use the average sizes even when the polydispersity index was high since it seemed representative.

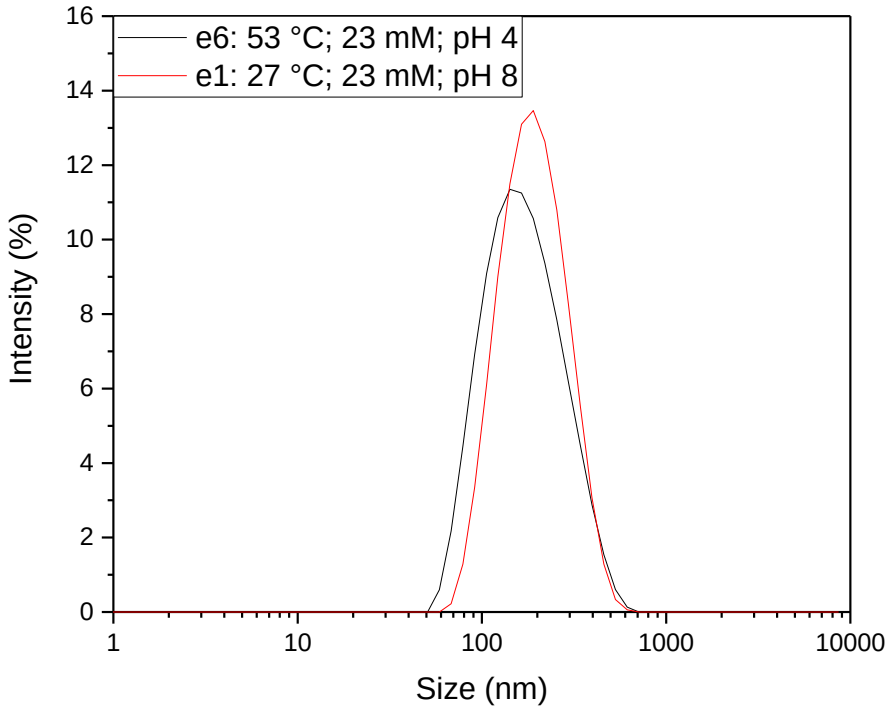


Figure 1: Size distribution in intensity of experiments 1 (monodisperse, PdI 0.15) and 6 (polydisperse, PdI = 0.34)

Based on these results, a model was performed. It allowed to predict which size and which PDI would be formed according to the conditions of the environment. The parameters of this

modeling are described below. Equation 2 modeled size as a function of pH, ionic strength and temperature. The associated coefficient of determination and adjusted coefficient of determination were 0.79, and 0.74 respectively.

YParticle Size = 181 – 126 pH + 35 Ionic Strength LIKE pH + 35 Temperature HIGH AND pH LOW OR VICE VERSA Eq (2)

Equation 3 was used to model PDI as a function of pH, ionic strength and temperature. The associated coefficient of determination and adjusted coefficient of determination were 0.73, and 0.67, respectively.

YPDI = 0.221 – 0.196 Temperature LIKE Ionic Strength + 0.157 Temperature HICH OR pH LOW + 0.080 Ionic Strength HIGH AND pH LOW OR VICE VERSA Eq (3)

The coefficients of determination being rather good, the models appear to be usable. However, before using the model it is necessary to check if the predictions are correct. In this mind, different tests were performed. They are summarized in Table 3. The results were in the predicted range. The model therefore seemed to accurately define what size and polydispersity index would possess the formed assembly.

Table 3: Expected modeled results compared to the experimental results obtained and the experimental conditions corresponding to the three factors studied

Temperature (°C)	Ionic strength (mM)	pH	Calculated size (nm)	Experimental size (nm)	Calculated PDI	Experimental PDI
20	4	9	119 ± 28	129.6 ±1.3	0.132 ± 0.009	0.136 ± 0.022
40	50	3	228 ± 28	207.7 ± 0.3	0.206 ± 0.009	0.187 ± 0.010
20	65	9	160 ± 28	136.1 ± 4.2	0.140 ± 0.009	0.168 ± 0.007
40	65	3	215 ± 28	186.0 ± 2.8	0.202 ± 0.009	0.211 ± 0.007

3.2. Influence of the studied factors to the size properties of GAC

The obtained experimental results clearly showed that both size and polydispersity index were impacted by temperature, pH and ionic strength. To better understand the effect of each factor individually, a 3D representation of the model was made. In Figure 2A and Figure 3A, the graphs correspond to the influence of pH and ionic strength when the temperature was set at 20, 41, and 60 °C. In Figure 2B and Figure 3B the ionic strength was set at 0, 65, and 130 mM and in Figure 2C and Figure 3C it was the pH that was set at 3, 6, and 9.

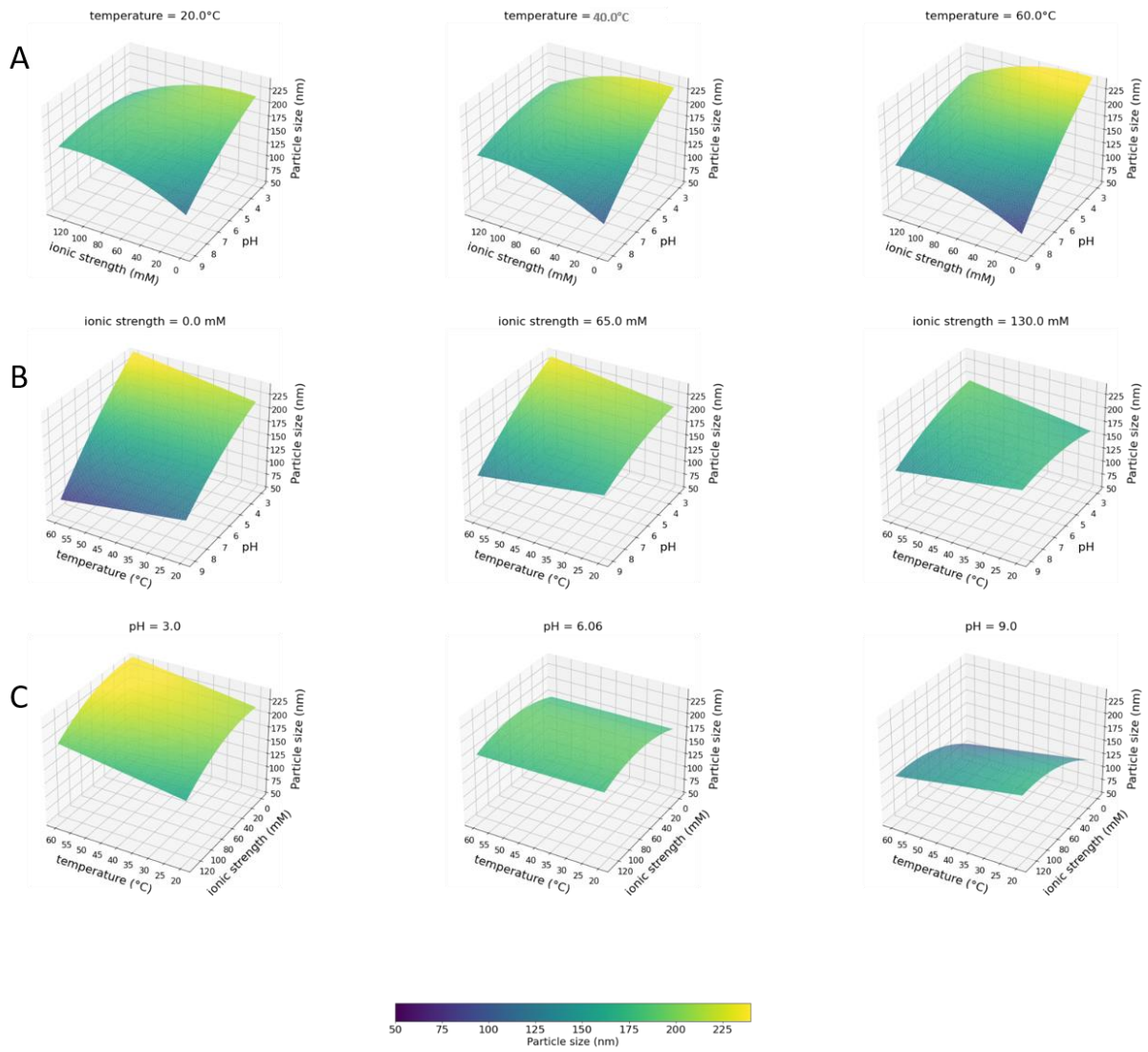


Figure 2: Response surface of GAC size as a function of temperature, pH and ionic strength. Each line corresponds to a factor fixed on 3 levels: (A) temperature (20, 40 and 60 °C); (B) ionic strength (0, 65 and 130 mM); (C) pH (3, 6.06 and 9).

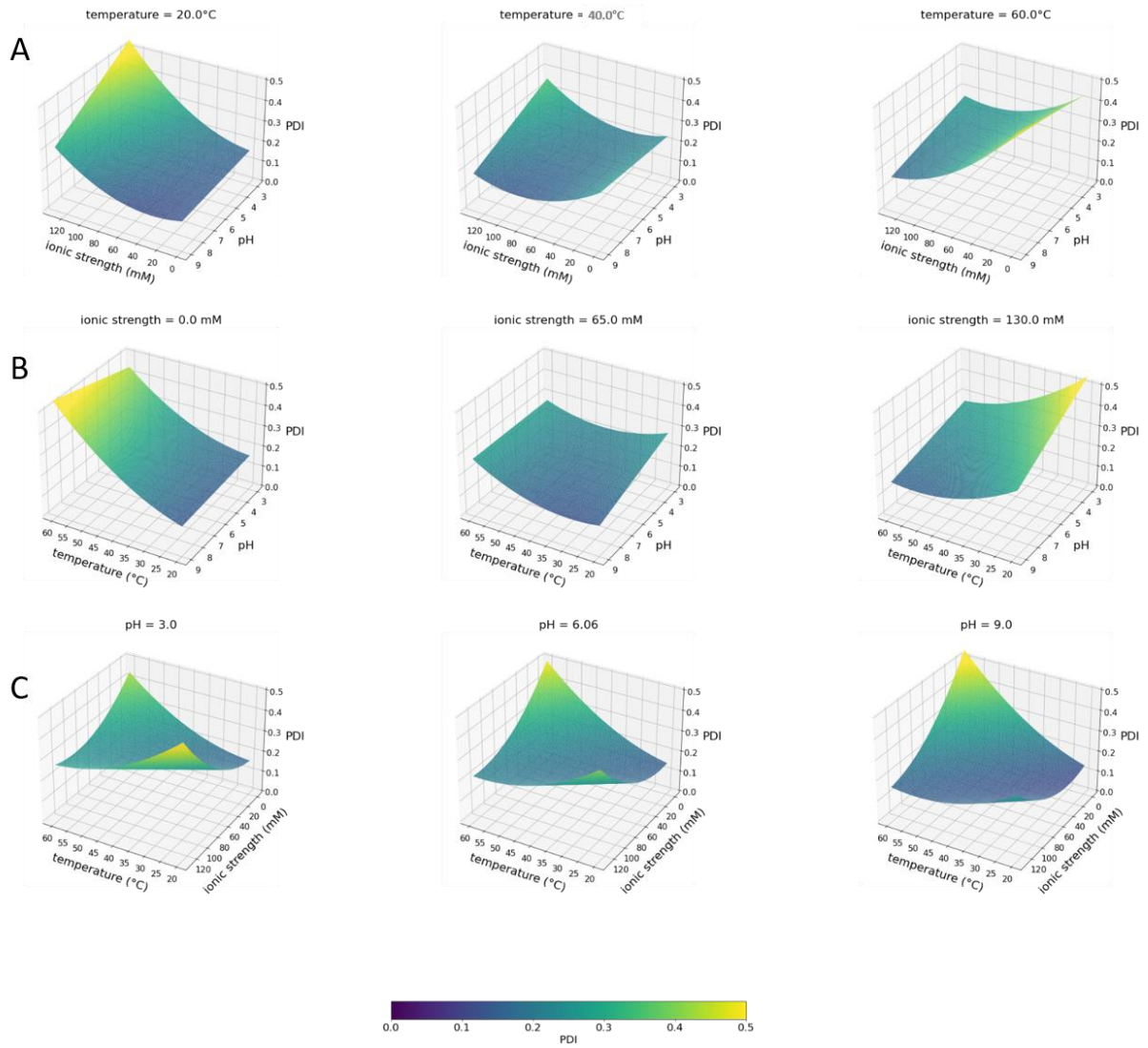


Figure 3: Response surface of GAC PDI as a function of temperature, pH and ionic strength. Each line corresponds to a factor fixed on 3 levels: (A) temperature (20, 40 and 60°C); (B) ionic strength (0, 65 and 130 mM); (C) pH (3, 5.06 and 9).

In Figure 2A it appears at first glance that temperature led to an increase of the size. However, in reality, it was the extremes that were exacerbated for both large and small sizes. It appears that the lower the ionic strength the smaller the size and the lower the pH the larger the size. Figure 3A shows that temperature has a strong effect on PDI as the response surfaces are reversed between 20 and 60 °C.

In Figure 2B, ionic strength appeared to have an inverse effect to pH. Indeed, for an ionic strength at 0: when the pH was low, the size was high and when the pH was high, the size was

low. For a strong ionic strength (130mM) at a low pH, the size decreased but at a high pH the size increased. In this figure the impact of temperature seems to be rather small on the observed size. In Figure 2B, we see the same type of effect as temperature on PDI with an inversion of the behaviors described on response surfaces.

In Figure 1C, the pH seemed to have a quite clear impact on the size of the objects formed. The lower the pH the larger the size of the objects. We can also see on this representation that temperature does not seem to have a such a big impact on the size. The impact of the ionic strength visible on this figure was not really strong either. Regarding the PDI, at pH 9 it seemed to be higher than at other pH but the impact did not seem as great as for the other factors.

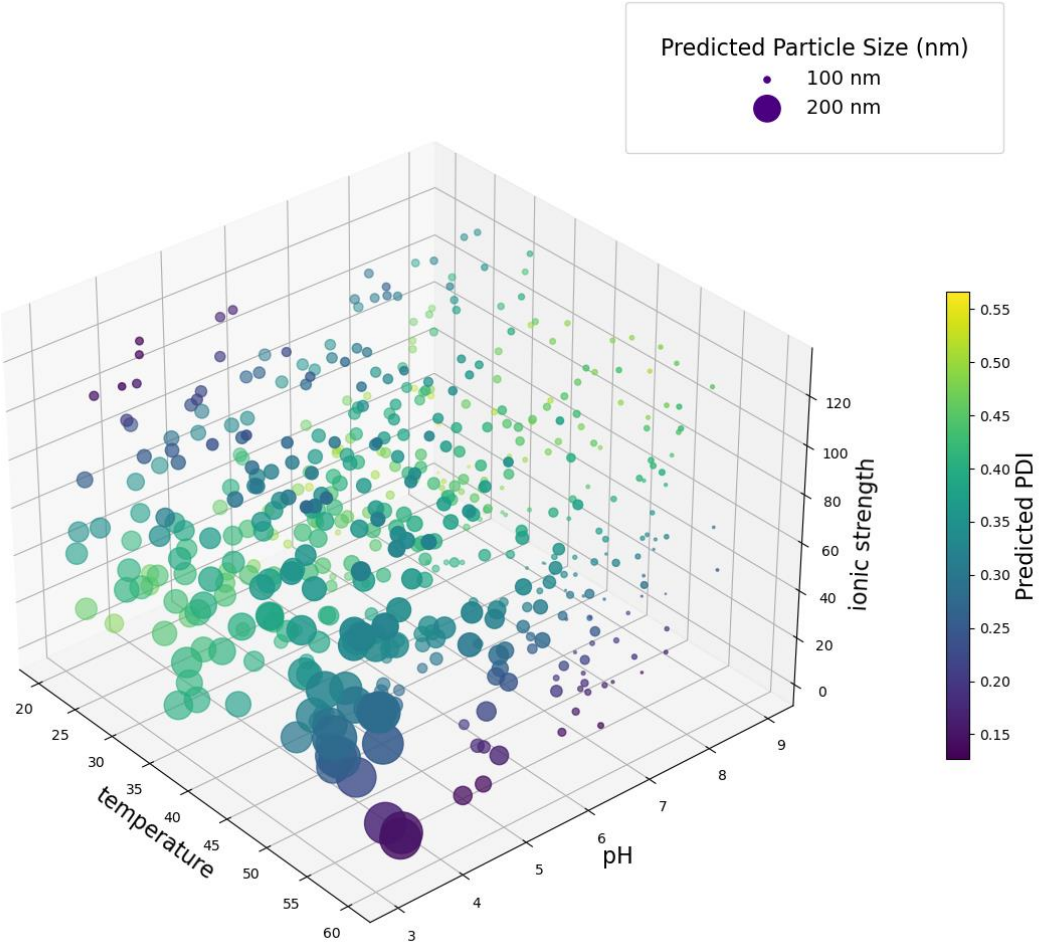


Figure 4: Representation of observed size in nm and PDI as a function of temperature pH and ionic strength.

To better visualize the impact of pH, a 3D plot was made. Figure 4 represents the evolution of the size and PDI as a function of temperature, for 3 pH at 0 mM and ionic strength. It shows that the more basic the pH, the smaller the size of the assemblies. It was found that at pH 9, the size of the objects appeared to be similar to the size of the GAC subunits previously observed by DLS and steric exclusion chromatography (Adam, Jasniewski, et al. n.d.; Adam, Michaux, et al. n.d.).

In Figure 5 is represented the Pareto diagram. It is the set of possible draws of the experimental design. Here, the blue border represents the draws of a minimum size and a minimum PDI. Below a certain size (about 100 nm), it was impossible to obtain a low polydispersity index. Indeed, we believe that these are the results of conditions that cannot lead to the formation of self-assemblies in which the GAC molecules are solubilized in the aqueous phase. This seems to support the observations made on the response surfaces. However, it should be noted that the sizes are outside the range obtained experimentally. This extrapolation of the model should therefore be studied with caution.

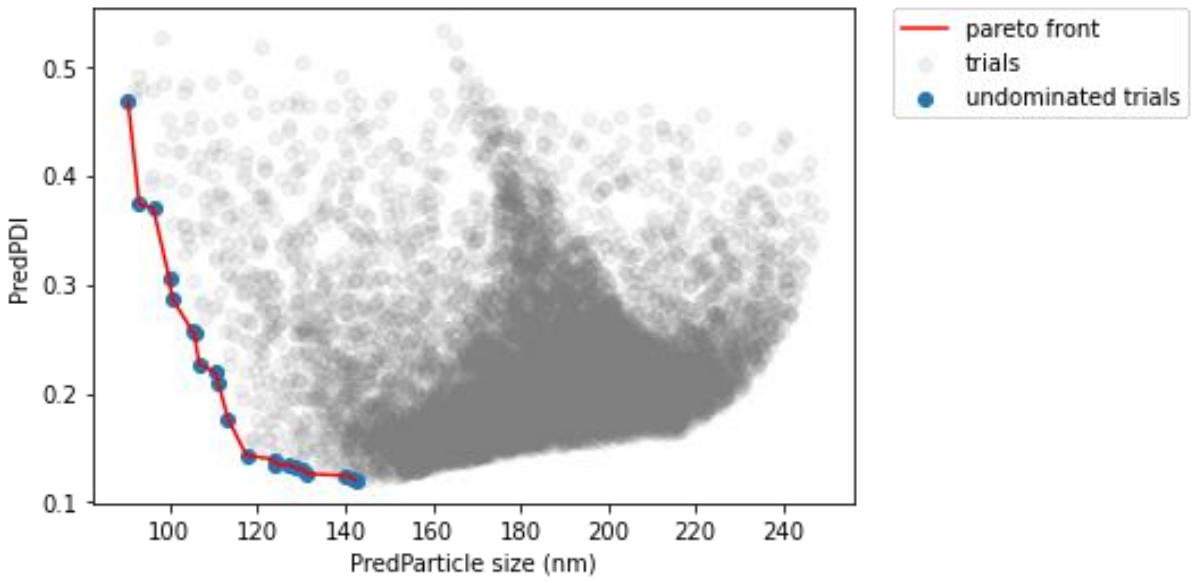


Figure 5: Pareto diagrams representing a random draw of possible size and PDI pair. The blue points determine the optimal draws for a minimal PDI and a minimal size. The red line is the corresponding Pareto frontier.

Based on these results, a 3D representation of the impact of the different factors on the size was made. In blue are presented the size higher than 100 nm and in red the size lower or equal to 100 nm (Figure 6). The boundary between the assemblies and the monomers appeared very clearly. For the assembly not to be able to form it, was necessary: a weak or null ionic strength, a pH higher than 8 and a temperature higher than 45 °C. It is thus clear that all these parameters influenced the formation of the assemblies. This is due to the influence that these factors exert on the various interactions allowing the formation of the particles.

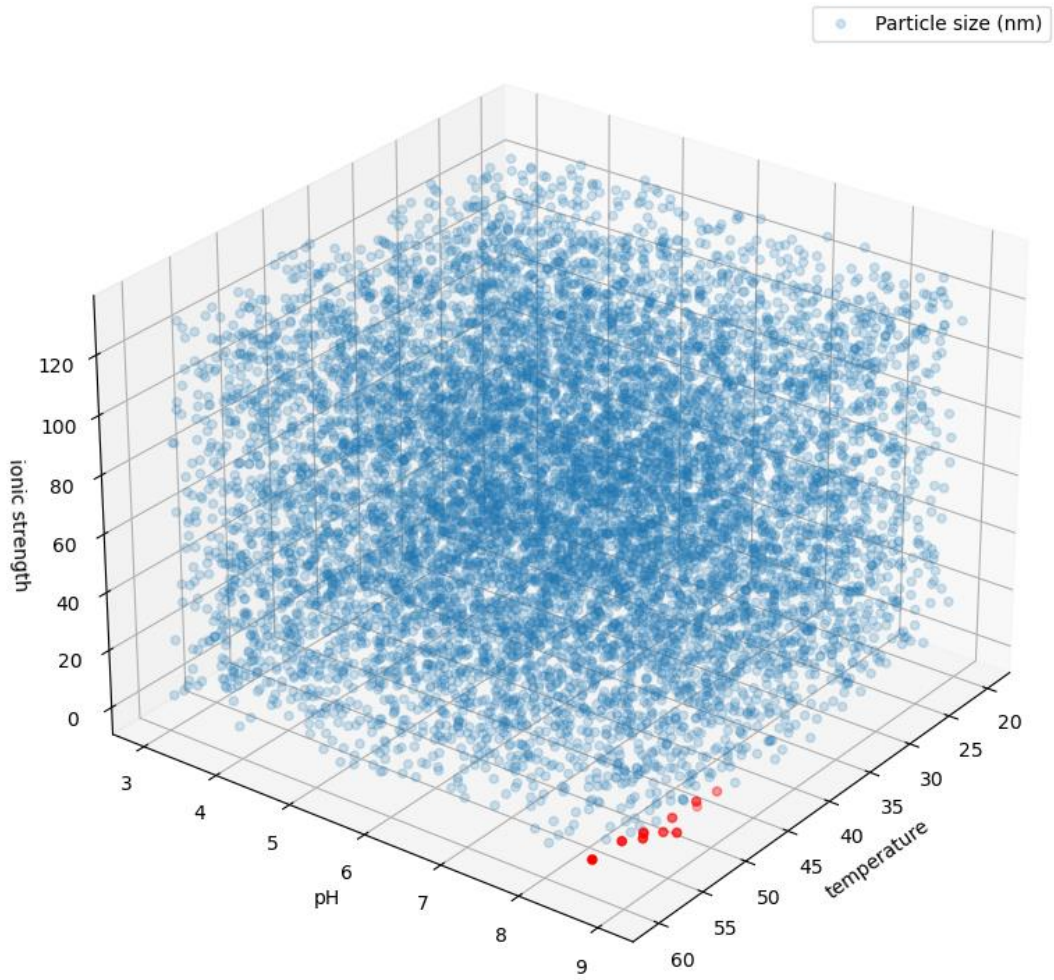


Figure 6: 3D representation of the predicted size distribution of objects (blue) > 100 nm and (red) ≤ 100 nm

3.3. Determination of the interactions leading to self-assembly

To try to explain the impact of these different factors on the assembly phenomenon, different hypotheses have been formulated.

As the pH increases, the overall charge of the gum arabic decreases. Indeed, the pKa of gum arabic is found to be around 2 (Gulão et al., 2016; Sabet et al., 2021). Chanamai and McClements 2002), in particular, studied the impact of pH on the charge of emulsion droplets stabilized with gum arabic. The more acidic the pH, the lower the charge.

This allowed us to think that the charge of the modified gum subunits had an electrostatic repulsion effect and prevented the assembly from forming and the global charge facilitated the solubilization of the GAC. However, when the pH decreases, the charge decreases as well as the repulsion. This allows the sub-units to assemble. The appearance of the sample is also modified. It changes at an acidic pH from yellow and turbid to red and clear at a basic pH. The color change is a trait that can be attributed to curcumin (Etxabide et al., 2021). However, the change in turbidity is indicative of the presence or absence of particles.

A similar result was obtained by Ghosh et al. (2012) who worked on the assembly of amphiphilic peptides. They showed that decreasing the degree of ionization and thus the electrostatic repulsion of peptide chains by adjusting the pH, induced the assembly in the form of nanofibers. Mohanty et al. (2021) studied the self-assembly of ferritins. Playing on the pH allowed to play on the charges of the proteins. The more charged they were, the greater the repulsions and the less assembly occurred.

When the particles were formed, the more acidic the pH, the larger they were. It is possible that less repulsion leads to the association of more subunits. Procházka et al. (2016) indeed showed that the number of aggregation was proportional to the size of the particles and variable with pH.

However, the pH is not the only parameter allowing to play on the electrostatic forces. The ionic strength also reduced the repulsions. An increase of the ionic strength thus promoted the formation of assemblies. Indeed, Mohanty et al. (2021) have shown that salts can screen the charges of ferritins and thus promote the formation of assemblies. This is also the result found by Yan et al. (2012) who studied collagen assembly or Carrick et al. (2007) on synthetic peptides. It seems that the ionic strength has the same role for the modified gum arabic and allowed to decrease the repulsion and thus promoted the assembly.

If electrostatic repulsions prevent assembly, we believe that hydrophobic interactions are the driving force. These are interactions that promote the assembly of non-polar or amphiphilic molecules. This is a very common phenomenon. A large number of processes are partly driven by hydrophobic interactions such as the formation of micelles, vesicles, bilayers and also protein folding (Meyer et al., 2006). Here, the hydrophobic oxidation products of curcumin would be responsible for the formation of assemblies. However, it was seen that the ionic strength influenced the polydispersity of the samples. The higher the salt concentration, the higher the polydispersity. At first it would be possible to ask if several size populations could be present, but as shown earlier this is not the case. In a second step the hypothesis was formulated that this would be due to the ability of small alkali ions such as those used here, to break down hydrogen bonds as seen by Morrow, Payne, and Shen (2015).

Temperature has also a quite visible impact on the polydispersity index. This is because hydrogen bonds were inhibited by temperature (R. C. Dougherty, 1998) between the subunits, leading more polydispersed particles as it was shown for ionic strength.

Another possibility was that the glass transition temperature, which is in the studied range, makes the samples polydisperse. It was previously determined at 51 °C on functionalized gum powder (Adam, Jasniewski, et al., s. d.) however in aqueous medium, it is very likely that this

value is lower (Kilburn et al., 2005). Polymers in amorphous rubber form have more mobile chains and are more disorganized (Roudaut et al., 2004) which could explain the PDI increase.

3.4. importance of factors and interactions

Figure 7 represents the effects of the different factors studied on the predicted size and PDI. The different factors influencing the size, pH has by far the most impact. The ionic strength and temperature have negligible effects. Regarding the effects of interactions, pH and ionic strength are the strongest but may seem small compared to the effect of the two factors alone. This seems logical since both factors influence the electrostatic strength but in a different direction. The temperature did not impact the size because the hydrophobic interactions only allowed to form the assembly when the electrostatic repulsions were weak enough.

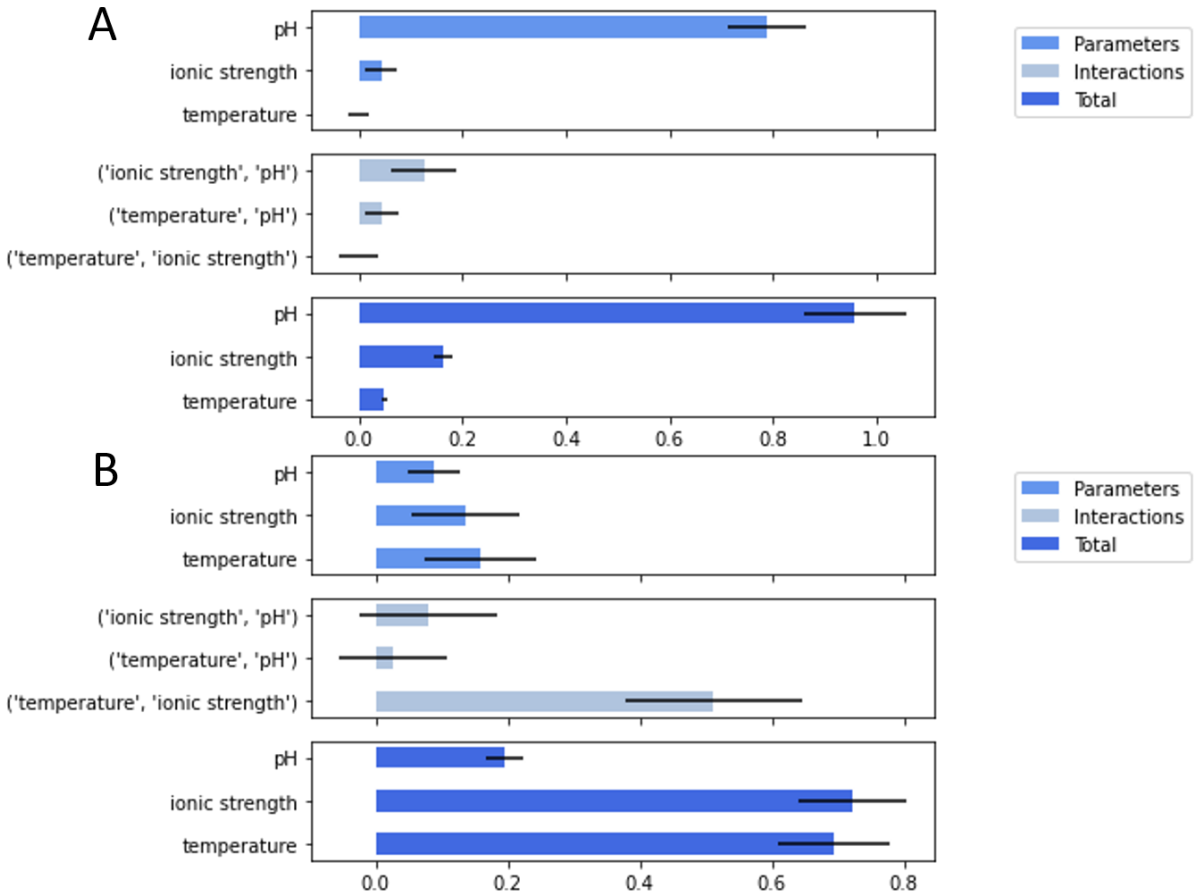


Figure 7: Sobol indexes to visualize the impact of ionic strength, pH, and temperature (light blue) alone, (grey) their pairwise interactions, and (dark blue) the total (alone plus interaction) on (A) size and (B) PDI

Regarding the polydispersity index, it was the temperature and the ionic strength that had the most impact, especially because their interaction was strong. They seemed to have a synergistic effect. This seems logical if we consider that the two factors influenced the hydrogen bonds. The pH has a much weaker effect but still not negligible since it influences the presence of sub-units or not and these are more polydispersive than well-defined assemblies.

4. Conclusion

In this paper, we studied the influence of three physicochemical factors on the size and polydispersity index of GAC suspended in an aqueous medium using an experimental design strategy. It was shown that the assembly was highly dependent on the physicochemical conditions of the medium. Indeed, the temperature, the pH and the ionic strength modified the results obtained by dynamic light scattering. Size was highly dependent on pH while temperature and ionic strength influenced PDI. The appearance of the sample was also modified by changing pH (from turbid in acidic condition to clear in basic condition). It was then deduced from this information that the more the molecules were charged, the stronger the electrostatic repulsion forces between them. However, these forces could be counterbalanced by the presence of salts that could screen the charges on the surface of the polymers. Then the hydrophobic interactions could come into play and lead to the formation of the assemblies. However, the dominant forces that allowed the assembling were rather hydrogen bonds between the different sub-units. It should be noted, that not all conditions were conducive to the formation of particles.

4. References

Adam, Aurélie A., Jordane Jasniewski, Marie E. Vuillemin, Blandine Simard, Jennifer Burgain, Régis Badin, Lionel Muniglia, and Florentin Michaux. « Enzymatic Mediated Modification of Gum Arabic by Curcumin Oxidation Products: Physicochemical and Self-Assembly Study ». *Food Hydrocolloids* 126 (mai 2022): 107451. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107451.

Adam, Aurélie A., Florentin Michaux, et al. 'Self-Assembly of Gum Arabic Functionalized by Curcumin Oxidation Products: Critical Aggregation Concentration Study'.

Carrick, Lisa M. et al. 2007. 'Effect of Ionic Strength on the Self-Assembly, Morphology and Gelation of PH Responsive β-Sheet Tape-Forming Peptides'. Tetrahedron 63(31): 7457–67.

Chanamai, R., and D.j. McClements. 2002. 'Comparison of Gum Arabic, Modified Starch, and Whey Protein Isolate as Emulsifiers: Influence of PH, CaCl2 and Temperature'. Journal of Food Science 67(1): 120–25.

Chen, Nannan, Taco Nicolai, Christophe Chassenieux, and Yong Wang. 2020. 'PH and Ionic Strength Responsive Core-Shell Protein Microgels Fabricated via Simple Coacervation of Soy Globulins'. Food Hydrocolloids 105: 105853.

Dougherty, Ralph C. 1998. 'Temperature and Pressure Dependence of Hydrogen Bond Strength: A Perturbation Molecular Orbital Approach'. The Journal of Chemical Physics 109(17): 7372–78.

Etxabide, Alaitz, Paul A. Kilmartin, and Juan I. Maté. 2021. 'Color Stability and PH-Indicator Ability of Curcumin, Anthocyanin and Betanin Containing Colorants under Different Storage Conditions for Intelligent Packaging Development'. Food Control 121: 107645.

Ghosh, Arijit et al. 2012. 'Fine-Tuning the PH Trigger of Self-Assembly'. Journal of the American Chemical Society 134(8): 3647–50.

Giannotti, Marina I. et al. 2011. 'PH-Responsive Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complexes As Nanocarriers for Lysosomal Delivery of Therapeutic Proteins'. Biomacromolecules 12(7): 2524–33.

Gulão, Eliana da S., Clitor J.F. de Souza, Cristina T. Andrade, and Edwin E. Garcia-Rojas. 2016. 'Complex Coacervates Obtained from Peptide Leucine and Gum Arabic: Formation and Characterization'. Food Chemistry 194: 680–86.

Herman, Jon, and Will Usher. 2017. 'SALib: An Open-Source Python Library for Sensitivity Analysis'. The Journal of Open Source Software 2(9): 97.

Hill, William J., and William G. Hunter. 1966. 'A Review of Response Surface Methodology: A Literature Survey'. Technometrics 8(4): 571.

Khuri, André I., and Siuli Mukhopadhyay. 2010. 'Response Surface Methodology'. WIREs Computational Statistics 2(2): 128–49.

Kilburn, Duncan et al. 2005. 'Carbohydrate Polymers in Amorphous States: An Integrated Thermodynamic and Nanostructural Investigation'. Biomacromolecules 6(2): 864–79.

Kotz, Samuel, and Norman Lloyd Johnson, eds. 1992. Breakthroughs in Statistics. New York: Springer-Verlag.

Lesty, Michel. 1999. 'Une Nouvelle Approche Dans Le Choix Des Régresseurs de La Régression Multiple En Présence d'interactions et de Colinéarités'. La revue de Modulad (22): 41–77.

Lesty, Michel, and P Buat-Ménard. 1982. 'La synthèse géométrique des corrélations multidimensionnelles'. Les cahiers de l'analyse des données 7(3).

Liu, Yong et al. 2019. 'Nanoparticles Based on Sodium Alginate and β-Conglycinin: Self-Assembly and Delivery of Phyllanthus Urinaria Phenolic Compounds'. Journal of Food Processing and Preservation 43(1): e13851.

Mäkelä, Mikko. 2017. 'Experimental Design and Response Surface Methodology in Energy Applications_ A Tutorial Review'. Energy Conversion and Management: 11.

Mellot, Gaëlle et al. 2018. 'Bisurea-Functionalized RAFT Agent: A Straightforward and Versatile Tool toward the Preparation of Supramolecular Cylindrical Nanostructures in Water'. Macromolecules 51(24): 10214–22.

Meyer, Emily E, Kenneth J Rosenberg, and Jacob Israelachvili. 2006. 'Recent Progress in Understanding Hydrophobic Interactions'. 103(43): 8.

Moatsou, Dafni et al. 2015. 'Self-Assembly of Temperature-Responsive Protein–Polymer Bioconjugates'. Bioconjugate Chemistry 26(9): 1890–99.

Mohanty, Abhinav, Mithra K, Sidhartha S. Jena, and Rabindra K. Behera. 2021. 'Kinetics of Ferritin Self-Assembly by Laser Light Scattering: Impact of Subunit Concentration, PH, and Ionic Strength'. Biomacromolecules 22(4): 1389–98.

Morrow, Brian H., Gregory F. Payne, and Jana Shen. 2015. 'PH-Responsive Self-Assembly of Polysaccharide through a Rugged Energy Landscape'. Journal of the American Chemical Society 137(40): 13024–30.

Nishimura, Tomoki, Shen Shishi, Yoshihiro Sasaki, and Kazunari Akiyoshi. 2020. 'Thermoresponsive Polysaccharide Graft Polymer Vesicles with Tunable Size and Structural Memory'. Journal of the American Chemical Society 142(27): 11784–90.

Procházka, Karel et al. 2016. 'Self-Assembly and Co-Assembly of Block Polyelectrolytes in Aqueous Solutions. Dissipative Particle Dynamics with Explicit Electrostatics'. Molecular Physics 114(21): 3077–92.

Roudaut, G. et al. 2004. 'Molecular Mobility around the Glass Transition Temperature: A Mini Review'. Innovative Food Science & Emerging Technologies 5(2): 127–34.

Sabet, Saman et al. 2021. 'The Interactions between the Two Negatively Charged Polysaccharides: Gum Arabic and Alginate'. Food Hydrocolloids 112: 106343.

Yan, Mingyan, Bafang Li, Xue Zhao, and Song Qin. 2012. 'Effect of Concentration, PH and Ionic Strength on the Kinetic Self-Assembly of Acid-Soluble Collagen from Walleye Pollock (Theragra Chalcogramma) Skin'. Food Hydrocolloids 29(1): 199–204.

1.8 Contribution de l'article

Cette étude nous a permis de mettre en évidence à quel point les particules formées par la GAC sont dépendantes des conditions physicochimiques du milieu au travers de l'utilisation d'un plan d'expériences. Dans un premier temps il a fallu vérifier que les mesures de tailles effectuées étaient bien exploitables. En effet, lorsque la polydispersité est forte, il est possible que plusieurs populations de tailles différentes soient présentes, rendant la mesure de taille moyenne inexploitable. Cependant, ici, la polydispersité était due à l'élargissement de la population et non pas à l'apparition d'une autre. Les résultats obtenus à partir des 16 expériences du plan nous ont permis d'obtenir un modèle décrivant l'évolution de la taille et du PDI des particules en fonction du pH, de la force ionique et de la température. Ce modèle a tout d'abord été vérifié avec des expériences supplémentaires validant que les prédictions étaient correctes en comparant les valeurs prédites aux valeurs expérimentales. Cela nous a ensuite permis d'exploiter les résultats expérimentaux et d'obtenir des surfaces de réponses montrant la variation de taille et de PDI en fonctions des différents facteurs choisis.

Différents effets ont pu être constatés. Plus le pH était basique plus les tailles des objets étaient faibles. A des pH élevés, la GAC était fortement ionisée ce qui induisait de fortes répulsions électrostatiques entre les molécules de GAC (sous-unités) et empêchait potentiellement l'association des sous-unités sous forme de particules. Cela a été mis en évidence car dans ces conditions, l'échantillon était limpide mais aussi les tailles des objets observés étaient très faibles et très proches de la taille des sous-unités déterminées dans les études précédentes. Plus le pH était acide, plus les tailles des objets étaient importantes car la charge globale était plus faible et donc les répulsions électrostatiques étaient elles aussi faibles. Cela menait à l'augmentation du nombre d'association et donc logiquement à l'augmentation de la taille des objets. Le pH joue ainsi un rôle important sur l'association des molécules de GAC entre elles pour former les particules. Une forte ionisation des molécules à pH élevé conduit à une forte

répulsion empêchant l'association. L'assemblage ne semble donc pas conduit par des interactions ioniques qui semblent à l'opposé contrer le phénomène de structuration sous forme de particules. Il est ainsi envisagé que les particules se forment à partir d'autres interactions (hydrophobes, liaisons hydrogène) dans des conditions où les répulsions ioniques sont plus faibles.

La force ionique et la température quant à elles avaient un impact négligeable sur la taille mais très fort sur l'indice de polydispersité. Deux hypothèses ont alors été formulées. La transition vitreuse, se trouvant dans la gamme de température étudiée, pourrait avoir un impact en modifiant la mobilité et l'organisation des chaines du polysaccharide. Elle avait précédemment été déterminée sur la poudre à 51 °C mais serait surement plus basse dans un milieu aqueux puisque l'eau possède un caractère plastifiant. En effet, des premiers essais ont été réalisés pour tenter d'observer la transition vitreuse de la gomme réhydratée (cf. Annexe 2). Les suspensions étaient centrifugées pour obtenir un concentré de GACD. Cependant, il était compliqué d'observer cet évènement notamment car nous maquions de matière dans les culots obtenus. Une autre possibilité serait qu'une température élevée empêche les liaisons hydrogène de se former. Il est aussi possible que la force ionique impacte ces liaisons. De plus le terme d'interaction entre la température et la force ionique a une influence importante sur le PDI ce qui semble corroborer cette thèse.

L'assemblage est donc régi par un certain nombre d'interactions de faible énergie comme les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes qui sont des forces favorables à la formation des particules ou les répulsions électrostatiques qui sont des forces plutôt défavorables.

Conclusion générale

Les auto-assemblages suscitent depuis longtemps un grand intérêt de la part de la communauté scientifique du fait de leur spontanéité, de leur stabilité, de leur versatilité, etc. En effet, ils se sont avérés tout à fait intéressants dans divers domaines industriels comme en pétrochimie par exemple, secteur dans lequel l'entreprise Total vise à utiliser des auto-assemblages pour contrôler la viscosité de ses goudrons en fonction de la température (Isare et al., 2009). Un autre exemple issu de l'industrie pharmacologique, où un assemblage entre la phosphatidine choline et le glycérol dioléate a été testé dans des essais cliniques pour lutter contre des cancers du cou ou du visage (Barauskas et al., 2014). Les auto-assemblages sont tout à fait intéressants en pharmacologie car ils peuvent permettre de protéger des principes actifs, de contrôler leur libération et par là de diminuer les quantités utilisées. Ils sont aussi beaucoup étudiés en recherche fondamentale dans le but de mieux comprendre leurs structuration, les interactions faibles s'établissant entre les sous unités, ainsi que les différentes morphologies possibles, etc (X. C. Jiang et al., 2011).

Il est possible d'obtenir des assemblages par coacervation simple ou complexe. Il s'agit d'une séparation de phase associative mettant en jeu des polymères dans un solvant. Elle mène à la formation de particules colloïdales formées d'un (coacervation simple) ou de plusieurs polymères (coacervation complexe) en suspension dans une phase continue. La formation de ces objets repose sur les interactions de faible énergie entre les polymères d'une part et entre les polymères et le solvant d'autre part (Dubin et al., 1994). Il est donc possible de former des assemblages en modifiant les interactions polymère-solvant.

Cependant, toutes les molécules ne sont pas capables de former spontanément des assemblages. Pour obtenir des particules avec les caractéristiques souhaitées il est souvent nécessaire de modifier ou de synthétiser un polymère spécifique. Une des méthodes les plus utilisées est la méthode PISA (Polymerization induced self-assembly). Elle permet de synthétiser des polymères à façon pour induire la formation de particules de taille et de morphologie désirées.

Il est aussi possible de modifier des polymères déjà existants dans la nature comme les polysaccharides. La plupart des études traitent de modifications par voie chimique. Le point positif est que ce genre de procédé est bien connu et bien maitrisé. Il est possible de faire varier les caractéristiques des objets obtenus. Cependant, ces approches font souvent appel à l'utilisation de solvants organiques ou de produits toxiques. Une autre voie possible de modification est l'utilisation d'un procédé enzymatique. Cette démarche plus respectueuse de l'environnement permet de diminuer la quantité de solvants organiques utilisés tout en permettant la modification de manière à induire un auto-assemblage.

C'est donc de ce type d'approche qu'il a été question dans ce travail de thèse. La gomme d'Acacia, un polysaccharide déjà très utilisé dans le domaine agroalimentaire, a été modifiée par les produits d'oxydation de la curcumine obtenus par catalyse enzymatique avec une laccase. Les premières questions posées étaient : est-il possible de modifier la GA par greffage des produits d'oxydation de la curcumine ? Quelles sont les propriétés du nouveau polymère formé ? Est-il capable de s'auto-assembler ?

Pour répondre à ces interrogations, une analyse des spectres FTIR de la gomme modifiée a d'abord été effectuée. Nous avons ainsi pu montrer que ce procédé menait à la formation d'une liaison ester entre la GA et les produits d'oxydation menant à la formation d'une gomme d'Acacia modifiée, dénommée GAC. Il a ensuite été montré que la GAC était constituée de 2 fractions contenant des protéines ou des peptides surement issus d'AG et d'AGP. La masse molaire de ces nouveaux composés et leur rayon hydrodynamique étant largement supérieurs aux fractions natives de la GA, il a été supposé que les composés d'oxydation permettaient de former une liaison entre les fractions (phénomène de cross-linking entre les macromolécules). L'insertion des produits d'oxydation entre les chaînes de polymère a eu un effet plastifiant sur le polymère. En effet, la modification de l'espace entre les chaînes a mené à l'apparition d'une transition vitreuse aux alentours de 51 °C alors que la GA ne présente pas de tel événement

dans la gamme de température étudiée. La présence de ces composés a également rendu la gomme moins hydrophile et moins hygroscopique. Ce changement de comportement vis-à-vis de l'eau induisait forcément un changement de comportement en milieu aqueux. En effet, la GA est un polymère très hydrophile et hautement soluble dans l'eau. Pour des concentrations auxquelles la GA était soluble, des échantillons préparés avec la GAC présentaient un trouble important. Il a alors été montré que la GAC était capable de s'auto-assembler en milieu aqueux. Des particules sphériques à la surface lisses (d'après les observations réalisées par microscopie), d'une taille d'environ 1,6 µm et présentant une distribution de taille étroite avec une seule population bien définie se formaient alors. Il a donc bien été possible de modifier la GA par voie enzymatique et d'induire son auto-assemblage dans l'eau.

A partir de cet instant d'autres questions se sont alors posées : dans quelles conditions se forment ces assemblages ? A partir de quelle concentration ? Quels paramètres physicochimiques influencent la formation de ces particules ?

Il a alors été envisagé de déterminer la concentration d'agrégation critique, concentration à partir de laquelle se forment les particules dans l'eau. Pour ce faire, différentes techniques ont été envisagées. Tout d'abord des mesures de turbidité ont été effectuées. Elles ont permis de réaliser une première estimation de la valeur de la CAC conduisant cependant à une surestimation détectée suite à l'analyse par DLS mettant en évidence une valeur plus faible. En effet, il a été possible, en étudiant l'intensité de lumière diffusée par l'échantillon en fonction de la concentration pour une valeur d'atténuateur constant, de déterminer une valeur plus précise de la CAC. L'analyse de la taille et de l'indice de polydispersité des particules a aussi permis de mettre en évidence une population de taille plus faible et plus polydisperse à de faibles concentrations, associée à un état correspondant au polymère solubilisé, donc à une concentration inférieure à la CAC.

Des analyses par ITC ont ensuite été réalisées pour valider la valeur de CAC obtenue par DLS. Une stratégie par dissociation et réassemblage des particules a été choisie. Il s'est avéré que les résultats obtenus confirmaient ceux déterminés par DLS. Le type de résultat obtenu étant plutôt atypique, les résultats n'ont pas pu être modélisés. Néanmoins, les paramètres thermodynamiques ont pu être approximés. Cette méthode a permis de valider que la formation des particules est tout à fait spontanée car l'énergie libre de Gibbs est négative. De plus, malgré une entropie négative et donc non favorable à la réaction, l'enthalpie plus fortement négative permet de maintenir la spontanéité de la réaction.

Une dernière méthode a été utilisée afin de confirmer les résultats obtenus. Il s'agit d'une étude de thermophorèse microéchelle (appelée MST pour Microscale Thermophoresis), technique originale pour l'étude de l'auto-association de polymères. La MST est une technique plus souvent utilisée pour étudier l'interaction protéine-ligand. Cependant, elle a été utilisée ici pour déterminer la CAC de la GAC mais aussi son EC50, c'est-à-dire la concentration à laquelle 50 % des molécules sont inclues dans l'assemblage. L'EC50 est une valeur analogue à la constante de dissociation qui définit la force de l'affinité entre les sous unités polymériques. Une valeur de CAC identique aux autres méthodes a pu être déterminée, validant ainsi l'utilisation de cette technique pour l'étude des auto-assemblages. Elle a aussi permis de montrer que l'affinité entre les sous unités était relativement forte.

Cette affinité est le résultat des interactions faibles entres les sous unités formant les particules de GAC. Ces interactions étant dépendantes des conditions physicochimiques du milieu telles que le pH et la force ionique (influençant les interactions électrostatiques) et la température (influençant les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène), il est alors paru logique d'étudier leurs impacts sur la formation des assemblages. Pour cela il a fallu désassembler les particules en les solubilisant dans un mélange eau : acétone puis les former dans le milieu souhaité par déplacement de solvant. L'ajout d'un volume d'eau a alors permis de déplacer

l’équilibre des solvants, ce qui a mené à la reformation des particules dans des conditions contrôlées (pH, température et force ionique).

Un plan composite central à trois facteurs et cinq niveaux a alors été développé pour étudier l'impact de la température, de la force ionique et du pH sur la distribution de taille des particules (taille moyenne et indice de polydispersité). Les conditions pour obtenir une taille minimale ou une taille maximale pour à chaque fois un indice de polydispersité minimal ont alors pu être déduites des modélisations effectuées. Cela a permis de mettre à jour les différentes interactions jouant un rôle dans l’assemblage de la gomme d’Acacia modifiée. En effet, il a été montré que la taille était plus importante lorsque la température était élevée et que par conséquent les interactions hydrophobes étaient motrices de l’assemblage. Il a aussi été constaté que l’ionisation ainsi que la présence de sel modifiait les tailles des objets formés. La formation des assemblages dépend donc aussi de la force des répulsions électrostatiques entre les monomères de gomme arabique modifiée.

L’ensemble de ces résultats ont été récapitulés dans la Figure 52.

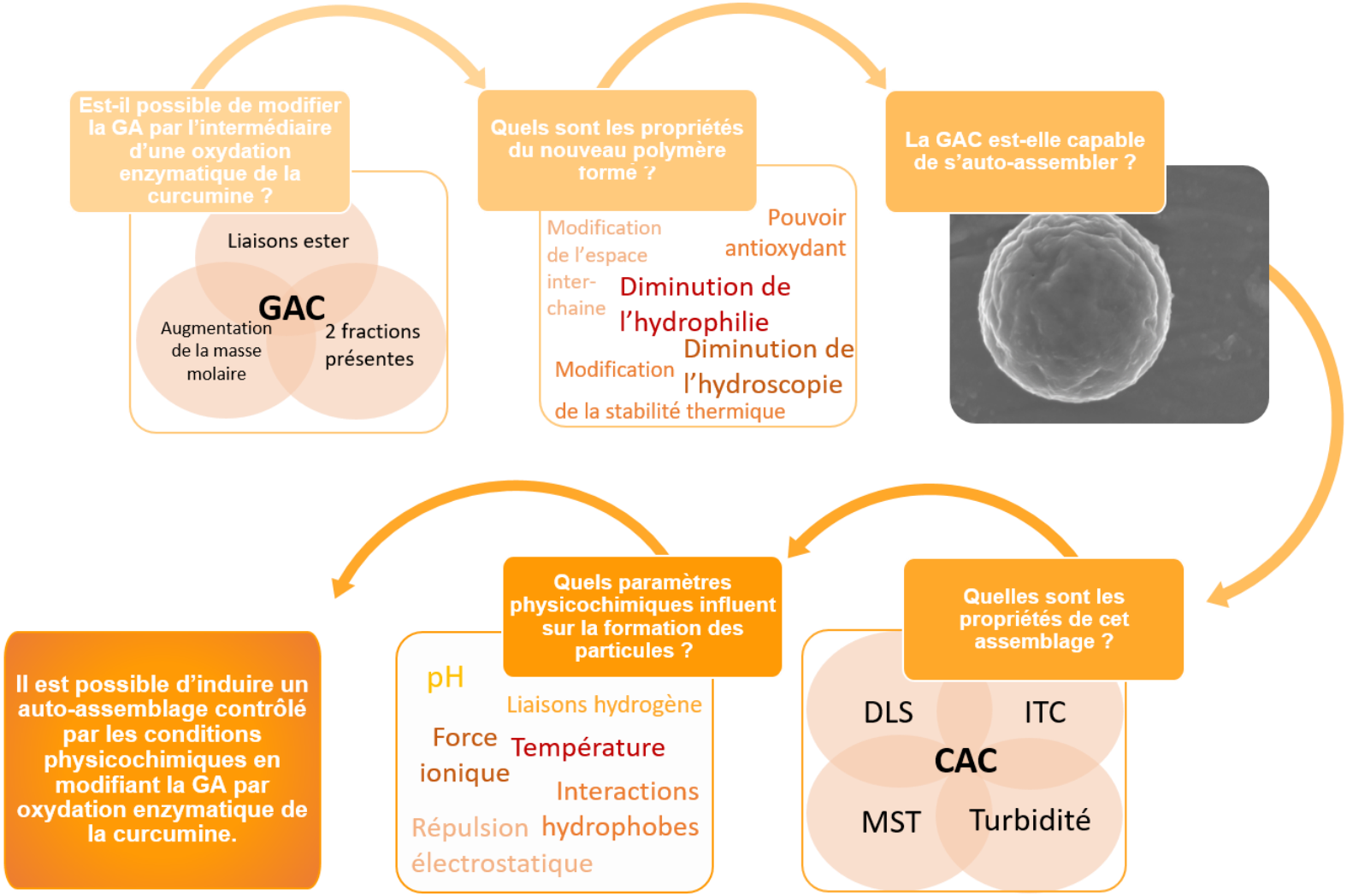


Figure 52 : Grandes questions directrices du travail de thèse

Tous ces résultats répondent aux premières questions que nous nous étions posées. Cependant, comme il est souvent le cas, ils ouvrent encore plus de perspectives qu'ils n'en referment. Elles sont synthétisées dans la Figure 55 page 238.

Il pourrait par exemple être très intéressant d'essayer de déterminer le nombre et la structure des produits d'oxydation qui permettent ce changement de comportement entre la GA et la GAC. Est-il possible qu'une espèce en particulier soit responsable ou est-ce l'association de molécules différentes qui est importante ? En connaissant les propriétés de chaque élément, serait-il possible alors de contrôler plus précisément l'assemblage ? Serait-il possible d'induire un assemblage chez d'autres polymères et ainsi modifier les propriétés des particules formées ? Est-il possible d'induire la formation de diverses morphologies en jouant sur les produits greffés ?

Des analyses par chromatographie liquide haute pression ont été réalisé sur les milieux réactionnels gomme d'Acacia-curcumine-laccase (Figure 53). Le temps de rétention de la curcumine était de 21 min. D'autres composés semblaient aussi être présents avant le début de la réaction (0 min de réaction). Cela était simplement du au fait que la curcumine utilisée n'était pas pure à 100 %. La quantité de curcumine diminue entre 0 et 8 min car elle est consommée par l'enzyme. Cependant elle semble ne plus évoluer au-delà. Il semble donc qu'après 8 min l'enzyme n'était plus active. Deux pics apparaissaient dès les deux premières minutes. Il s'agissait de deux produits d'oxydation différents. Leur quantité ne semblait pas sensiblement évoluer au cours du temps, certainement car une partie était greffée à la gomme d'Acacia.

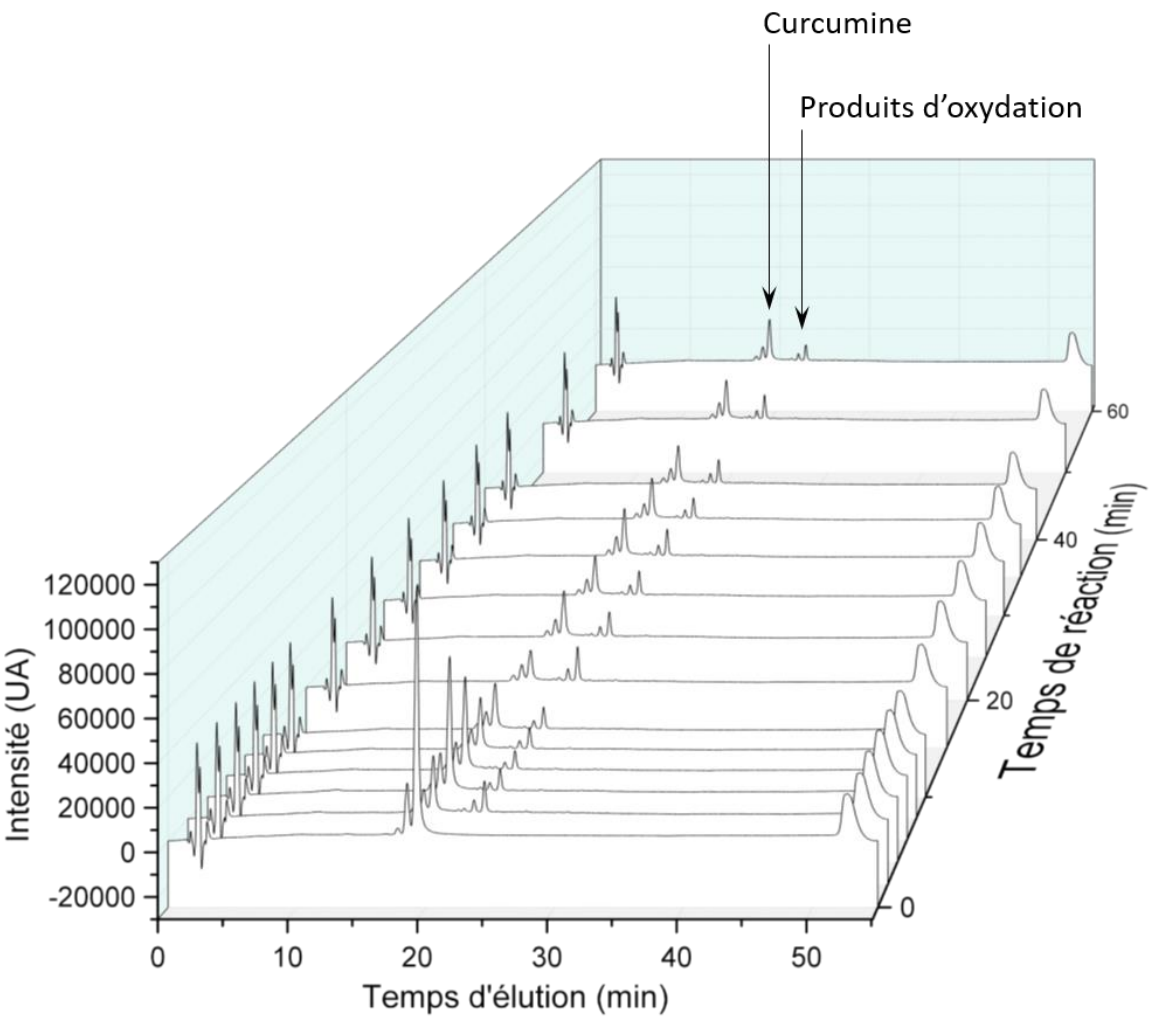


Figure 53 : Chromatogrammes HPLC obtenus à différents temps lors de la fonctionnalisation de la gomme d'Acacia

Néanmoins, par manque de temps il a été choisi de se concentrer sur d'autres aspects plus aboutis à ce moment de l'étude. Cependant, il serait tout à fait intéressant de poursuivre et d'essayer de purifier et de définir les structures des différents produits d'oxydation. Par exemple, il est possible que l'un des composés soit de la vanilline ou un analogue odorant car la GAC possède une odeur typique de vanille caramélisée. De plus, différentes études ont montré que la curcumine se dégradait en majorité en bicyclopentadione par oxydation mais pouvait aussi se dégrader en vanilline et en acide férulique (Esparan et al., 2015; Gordon & Schneider, 2012; Schneider et al., 2015).

Si les produits d'oxydation présentent des cycles aromatiques dans leur structure (ce qui est fortement probable d'après des études basées sur l'oxydation enzymatique de l'acide férulique), il est possible qu'ils induisent entre les polysaccharides modifiés des interactions de type π (π-π staking, π-anion, π-cation) et que cela ait une influence sur la formation de particules. Dans une étude de Dao et al. (2020) il a été montré qu'il était possible de détecter les interactions π par dichroïsme circulaire. Cela permettrait d'augmenter la compréhension que nous avons aujourd'hui de l'impact des structures des produits d'oxydation greffés sur les interactions mises en œuvre dans la formation des particules de gomme d'Acacia modifiée.

La structure interne des particules pourrait elle aussi être étudiée plus en détail. Des premières tentatives par microscopie électronique à transmission ont été réalisées (Figure 54) dans l'optique de déterminer quelle était la structure interne des particules. Il est possible de voir que la structure semble pleine et composée de couches de densité différentes type Core-Shell. Cependant, la déshydratation par des solvants organiques pourrait impacter les particules. En effet, une part du polymère modifié se solubilisait lors de la déshydratation de l'échantillon nécessaire à la création des coupes par ultramicrotome.

Deux possibilités sont alors envisageables. Il faudrait trouver un solvant qui ne solubilise pas cette part de le GAC ou utiliser une matrice qui permette d'éviter cette étape de déshydratation comme les matrices de mélamine.

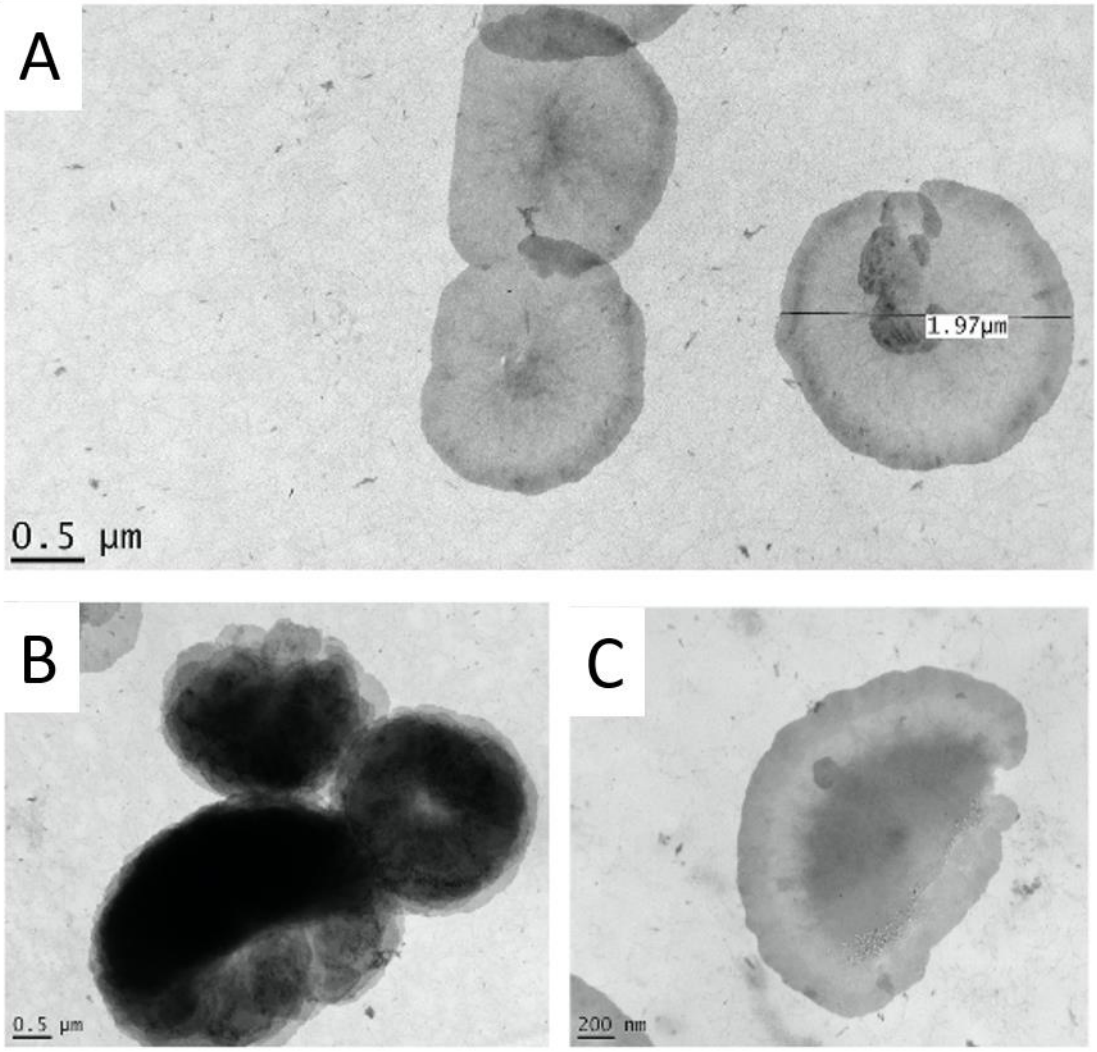


Figure 54: Micrographies TEM de particules de GAC. (A) fixée à l'osmium, intégrée dans une gélose et déshydratée à l'acétone ; (B) fixée au glutaraldéhyde, sans gélose et déshydratée à l'éthanol ; (C) fixé au glutaraldéhyde et à l'osmium, sans gélose et déshydratée à l'éthanol

Après avoir mieux compris le fonctionnement de ces assemblages il pourrait être intéressant d'essayer de les modifier à façon. Par exemple, en jouant sur les paramètres associés à la réaction enzymatique (quantité de phénol, d'enzyme, de GA, etc.) il serait peut-être possible de sélectionner certains produits et ainsi jouer sur les propriétés du polymère final. En effet, sur le chromatogramme en Figure 53 il n'y avait plus d'évolution dans le milieu après 8 minutes de réaction. Que se passerait-il si de l'enzyme était ajoutée à ce moment ? D'autres produits d'oxydation se formeraient-ils ? Quel serait l'impact sur les particules formées par le polymère modifié ?

Il a aussi été vu que modifier les conditions de formation des assemblages jouait sur les particules formées. Il est aussi connu que lorsque les particules se forment par effet ouzo, modifier le solvant ou la méthode (évaporation de solvant, dialyse, ajout direct d'eau) peut avoir un impact sur les assemblages. Il a notamment été vu que les particules obtenues directement après le procédé de modification (obtenue à l'étape d'évaporation de l'éthanol ayant été utilisé pour séparer la GA de la GAC) étaient différentes des particules formées dans des conditions contrôlées (dissolution puis reformation par l'ajout d'eau). Il pourrait être intéressant de faire varier les solvants et les méthodes.

Une autre variation qui pourrait être appliquée serait de modifier le polymère greffé. Il est déjà connu que le greffage des produits d'oxydation de la curcumine a aussi permis d'induire l'assemblage de dextrane (Curcio et al. 2019). Il serait donc possible de modifier d'autres polymères de cette manière. Il a été montré que le chitosane et la pectine pouvaient être modifiés par ce même procédé mais par d'autres phénols sans pour autant s'assembler en milieux aqueux (Aljawish et al., 2012, 2016; Karaki, Aljawish, Muniglia, et al., 2016; Vuillemin et al., 2020). Serait-il possible d'induire leur assemblage en les modifiant en utilisant de la curcumine ? Possèderaient-ils les mêmes propriétés ?

Cependant, connaissons-nous réellement toutes les propriétés de la GAC ? Nous avons montré que son pouvoir antioxydant était très largement augmenté par rapport au polymère natif, mais d'autres propriétés ont aussi été vue chez les polysaccharides modifiés par la curcumine dans la littérature. Curcio et al. (2019) ont montré que le dextrane modifié par les produits d'oxydation de la curcumine présentait une activité anticancéreuse et Sarika et al. (2015) ont montré que la gomme d'Acacia modifiée par voie chimique par la curcumine était aussi un bon anticancéreux. L'effet des polymères modifiés a été étudié sur des cellules MCF-7 du cancer du sein et des cellules HepG2 de carcinome hépatique en comparaison avec de la curcumine

libre. L'IC50 (c'est-à-dire la dose nécessaire pour être létale pour 50 % des cellules) était pour la GA-curcumine respectivement de 4,07 $g.L^{-1}$ et de 2,29 $g.L^{-1}$ chez les cellules MCF-7 et HepG2, contre pour la curcumine libre respectivement 3.8 $g.L^{-1}$ et 5.6 $g.L^{-1}$ pour les cellules MCF-7 et HepG2. La forte hydrophobie de la curcumine est un gros handicap car elle ne lui permet pas d'être bien internalisée par les cellules et lui impose d'être vite éliminée par les cellules. La gomme d'Acacia semble donc avoir un rôle à jouer. De plus, la présence de galactose dans sa structure lui permet d'être identifiée par le récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR) à la surface des hépatocytes. Ainsi le polymère est internalisé par les cellules et se retrouve dans leur cytoplasme et leur noyau. Cela augmente donc sa cytotoxicité. Le galactose et les arabinogalactanes de par leur fixation sur les récepteurs de cellules hépatiques, possèdent aussi une activité bénéfique puisqu'il a été montré qu'ils pouvaient empêcher l'installation de métastase du foie chez les souris (Beuth et al., 1987).

Il est alors légitime de se demander : Qu'en est-il de l'activité anticancéreuse de la GAC ? En effet, il semble fort probable qu'elle possède elle aussi ce genre d'activité. Il serait donc intéressant de tester la cytotoxicité du composé sur les cellules de lignées cancéreuses et notamment les cellules hépatiques puisque la partie polysaccharidique du composé permettrait une meilleure internalisation dans ce type de cellules.

Par la suite il serait intéressant de vérifier l'impact du polymère sur les cellules saines pour vérifier s'il possède ou non un effet cytotoxique sur elles. Si l'effet est moins important sur les cellules saines, cela permettrait un traitement beaucoup plus doux. En effet, des études mettent en évidence que la gomme d'Acacia présente une activité protectrice vis à vis des cellules hépatiques des rats (Ahmed et al., 2015; Ali et al., 2009; Hamid et al., 2021).

Une autre perspective quant aux propriétés de la GAC serait d'étudier sa capacité d'encapsulation pour potentiellement vectoriser des molécules actives. Il s'agit d'une méthode permettant de protéger un composé d'intérêt et de cibler sa délivrance (Van Butsele et al., 2007).

Dans l'étude de Curcio et al. (2019) le conjugué à base de dextrane était capable d'encapsuler du méthotrexate. Il serait donc intéressant de tester la possibilité de vectoriser des molécules d'intérêt dans les particules de GAC. La GAC pourrait alors être administrée par voie intraveineuse ou par voie orale. Il serait alors intéressant de vérifier la stabilité des particules aux pH physiologiques.

Il faut aussi noter que ces particules étaient très solides et résistaient notamment à la lyophilisation. Cela ouvre des perspectives quant à leurs usages futurs, les produits secs se conservant plus longtemps. De plus, s'il est possible d'administrer la GAC oralement, elle pourrait se présenter sous forme de sachet à réhydrater directement par le consommateur, ce qui en fait un moyen d'administration relativement simple.

Ce travail a donc finalement permis l'élaboration d'un nouveau polymère *via* un procédé « vert ». Les propriétés de ce polymère et notamment sa capacité à s'auto-assembler ont pu être étudiées. Il a aussi été mis en évidence que ce polymère est plutôt prometteur mais que de nombreuses études restent encore à mener. Une étude plus approfondie de sa structure et de l'impact des structures des produits d'oxydation est nécessaire pour mieux comprendre le phénomène mis en œuvre et pouvoir totalement le maitriser voir le transposer à d'autres polysaccharides. Cependant, cela permettrait surement d'exploiter toutes les propriétés de l'assemblage et pourrait permettre la vectorisation de divers composés d'intérêt.

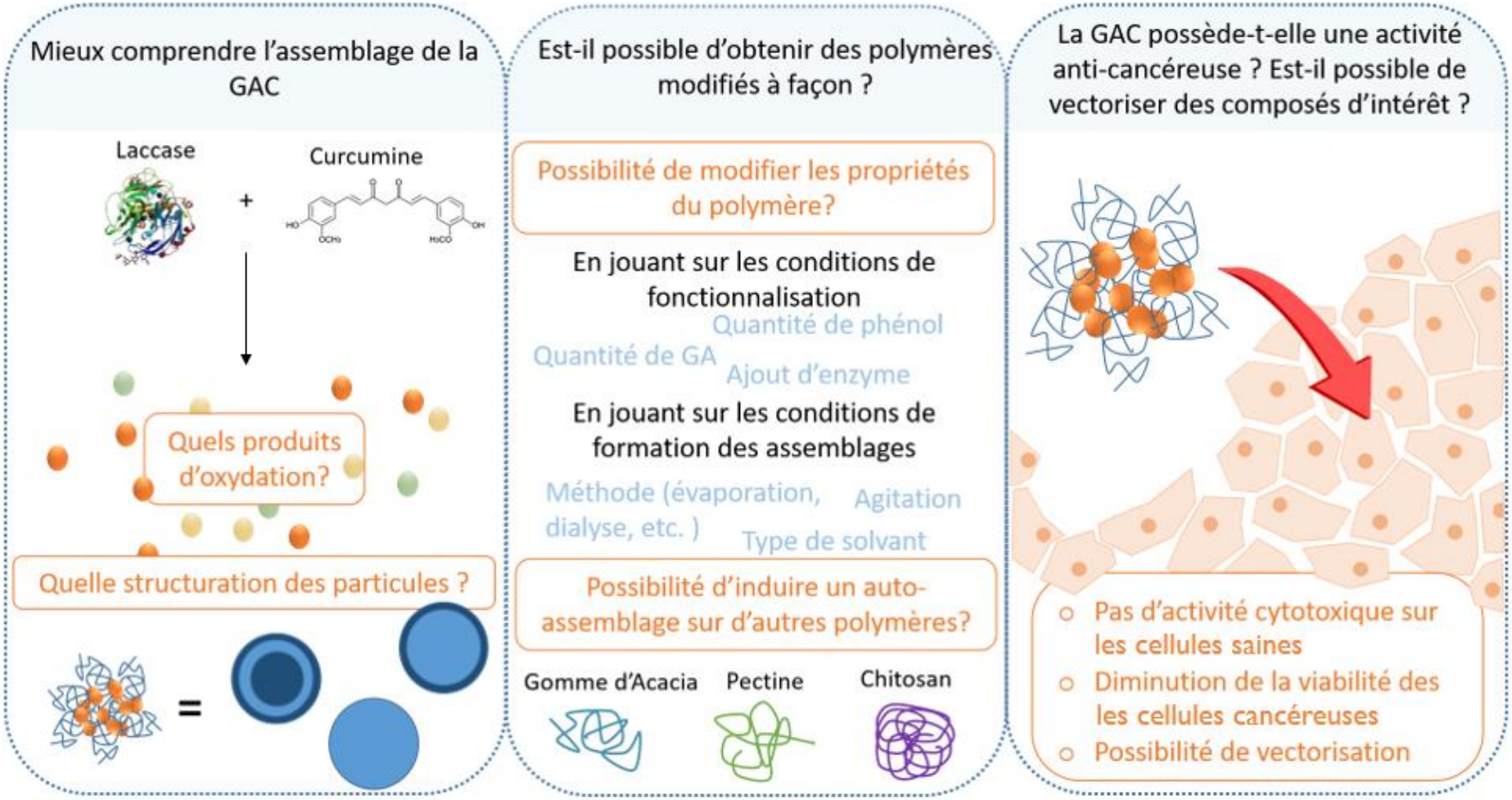


Figure 55 : Perspectives de ce travail de thèse

Références bibliographiques

Abdul Rohman, Sudjadi, Devi, D., & Dwiky Ramadhani, A. (2015). Analysis of Curcumin in Curcuma longa and Curcuma xanthorriza Using FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *Research Journal of Medicinal Plant*, *9*(4), 179-186. https://doi.org/10.3923/rjmp.2015.179.186

Adam, A. A., Jasniewski, J., Vuillemin, M. E., Simard, B., Burgain, J., Badin, R., Muniglia, L., & Michaux, F. (s. d.). *Enzymatic modification of gum Arabic by curcumin oxidation products : Physicochemical and self-assembly study*.

Adam, A. A., Michaux, F., Dos santos Morais, R., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (s. d.). *Self-assembly of Gum Arabic functionalized by curcumin oxidation products : Critical aggregation concentration study*.

Ahmad, S. I., Mazumdar, N., & Kumar, S. (2013). Functionalization of natural gum : An effective method to prepare iodine complex. *Carbohydrate Polymers*, *92*(1), 497-502. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.049

Ahmed, A. A., Fedail, J. S., Musa, H. H., Kamboh, A. A., Sifaldin, A. Z., & Musa, T. H. (2015). Gum Arabic extracts protect against hepatic oxidative stress in alloxan induced diabetes in rats. *Pathophysiology*, *22*(4), 189-194. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2015.08.002

Akiyoshi, K., & Sunamoto, J. (1996). Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides. *Supramolecular Science*, *3*(1-3), 157-163. https://doi.org/10.1016/0968-5677(96)00031-4

Ali, B. H., Ziada, A., & Blunden, G. (2009). Biological effects of gum arabic : A review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(1), 1-8. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.001

Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Paris, C., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium : A green procedure for the synthesis of new compounds. *Food Chemistry*, *145*, 1046-1054. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.119

Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Revol-Junelles, A.-M., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed functionalisation of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate : Evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food Chemistry*, *161*, 279-287. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.076

Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., & Muniglia, L. (2015). Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *112*, 25-39. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.10.014

Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., Scher, J., & Muniglia, L. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, *87*(1), 537-544. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.016

Aljawish, A., Muniglia, L., Klouj, A., Jasniewski, J., Scher, J., & Desobry, S. (2016). Characterization of films based on enzymatically modified chitosan derivatives with phenol compounds. *Food Hydrocolloids*, *60*, 551-558. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.032

An, N., Chen, X., & Yuan, J. (2021). Non-thermally initiated RAFT polymerization-induced self-assembly. *Polymer Chemistry*, *12*(22), 3220-3232. https://doi.org/10.1039/D1PY00216C

Anli, R. E., Vural, N., & Gucer, Y. (2007). Determination of the Principal Volatile Compounds of Turkish Raki. *Journal of the Institute of Brewing*, *113*(3), 302-309. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00290.x

Aphibanthammakit, C., Nigen, M., Gaucel, S., Sanchez, C., & Chalier, P. (2018). Surface properties of Acacia senegal vs Acacia seyal films and impact on specific functionalities. *Food Hydrocolloids*, *82*, 519-533. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.032

Arshady, R. (1990). Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques Part II : Coacervation. *Polymer Engineering & Science*, *30*(15), 905-914. https://doi.org/10.1002/pen.760301505

Aschenbrenner, E., Bley, K., Koynov, K., Makowski, M., Kappl, M., Landfester, K., & Weiss, C. K. (2013). Using the Polymeric Ouzo Effect for the Preparation of Polysaccharide-Based Nanoparticles. *Langmuir*, *29*(28), 8845-8855. https://doi.org/10.1021/la4017867

Atgié, M. (2018). *Composition and structure of gum arabic in solution and at oil-water interfaces*.

Atgié, M., Garrigues, J. C., Chennevière, A., Masbernat, O., & homogenous, K. (2019). Gum Arabic in solution : Composition and multi-scale structures. *Food Hydrocolloids*, *91*, 319-330. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.033

Bakshi, M. S., & Sachar, S. (2004). Surfactant polymer interactions between strongly interacting cationic surfactants and anionic polyelectrolytes from conductivity and turbidity measurements. *Colloid and Polymer Science*, *282*(9), 993-999. https://doi.org/10.1007/s00396-003-1022-y

Barauskas, J., Christerson, L., Wadsäter, M., Lindström, F., Lindqvist, A.-K., & Tiberg, F. (2014). Bioadhesive Lipid Compositions : Self-Assembly Structures, Functionality, and

Medical Applications. *Molecular Pharmaceutics*, *11*(3), 895-903. https://doi.org/10.1021/mp400552u

Bates, F. S. (1991). Polymer-Polymer Phase Behavior. *Science*, *251*(4996), 898-905. https://doi.org/10.1126/science.251.4996.898

Belkhir, K. (2019). *Elaboration en phase fondue de matériaux polymères à activité biologique*.

Besheer, A., Hause, G., Kressler, J., & Mäder, K. (2007). Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Starch : Synthesis, Characterization, and Aqueous Self-Assembly into Nano-Sized Polymeric Micelles and Vesicles. *Biomacromolecules*, *8*(2), 359-367. https://doi.org/10.1021/bm0609487

Beuth, J., Ko, H. L., Oette, K., Pulverer, G., Roszkowski, K., & Uhlenbruck, G. (1987). Inhibition of liver metastasis in mice by blocking hepatocyte lectins with arabinogalactan infusions and d-galactose. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *113*(1), 51-55. https://doi.org/10.1007/BF00389966

Borue, V. Yu., & Erukhimovich, I. Ya. (1990). A statistical theory of globular polyelectrolyte complexes. *Macromolecules*, *23*(15), 3625-3632. https://doi.org/10.1021/ma00217a015

Bouchemal, K., Agnely, F., Koffi, A., Djabourov, M., & Ponchel, G. (2010). What can isothermal titration microcalorimetry experiments tell us about the self-organization of surfactants into micelles? *Journal of Molecular Recognition*, *23*(4), 335-342. https://doi.org/10.1002/jmr.998

Boyer, C., Bulmus, V., Davis, T. P., Ladmiral, V., Liu, J., & Perrier, S. (2009). Bioapplications of RAFT Polymerization. *Chemical Reviews*, *109*(11), 5402-5436. https://doi.org/10.1021/cr9001403

Božič, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012a). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, *87*(4), 2388-2398. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.006

Božič, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012b). Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydrate Polymers*, *89*(3), 854-864. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.021

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.

Cao, C., Zhang, L., Zhang, X.-X., & Du, F.-P. (2013). Effect of gum arabic on the surface tension and surface dilational rheology of trisiloxane surfactant. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 456-462. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.07.006

Carrick, L. M., Aggeli, A., Boden, N., Fisher, J., Ingham, E., & Waigh, T. A. (2007). Effect of ionic strength on the self-assembly, morphology and gelation of pH responsive β-sheet tape-forming peptides. *Tetrahedron*, *63*(31), 7457-7467. https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.05.036

Carteau, D., Bassani, D., & Pianet, I. (2008). The “Ouzo effect” : Following the spontaneous emulsification of trans-anethole in water by NMR. *Comptes Rendus Chimie*, *11*(4-5), 493-498. https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.11.003

Chanamai, R., & McClements, D. j. (2002). Comparison of Gum Arabic, Modified Starch, and Whey Protein Isolate as Emulsifiers : Influence of pH, CaCl2 and Temperature. *Journal of Food Science*, *67*(1), 120-125. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11370.x

Chebl, M., Abiad, M. G., Moussa, Z., & Patra, D. (2016). Two Modes of Associations of Curcumin with Pre- and Nanoaggregated Chitosan Oligosaccharide Lactate : Ionic Strength and Hydrophobic Bile Salt Modulate Partition of Drug and Self-Assembly Process. *The Journal of Physical Chemistry C*, *120*(20), 11210-11224. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01486

Chen, L., Xiong, Z., Xiong, H., & Din, Z. (2020). Investigating the structure and self-assembly behavior of starch-g-VAc in starch-based adhesive by combining NMR analysis and multi-scale simulation. *Carbohydrate Polymers*, *246*, 116655. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116655

Chen, N., Nicolai, T., Chassenieux, C., & Wang, Y. (2020). PH and ionic strength responsive core-shell protein microgels fabricated via simple coacervation of soy globulins. *Food Hydrocolloids*, *105*, 105853. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105853

Chignell, C. F., Bilskj, P., Reszka, K. J., Motten, A. G., Sik, R. H., & Dahl, T. A. (1994). Spectral and Photochemical Properties of Curcumin. *Photochemistry and Photobiology*, *59*(3), 295-302. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05037.x

Chui, C.-Y., Bonilla-Brunner, A., Seifert, J., Contera, S., & Ye, H. (2019). Atomic force microscopy-indentation demonstrates that alginate beads are mechanically stable under cell culture conditions. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *93*, 61-69. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.01.019

Claessens, C. G., & Stoddart, J. F. (1997). π–π INTERACTIONS IN SELF-ASSEMBLY. *Journal of Physical Organic Chemistry*, *10*(5), 254-272. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1395(199705)10:5<254::AID-POC875>3.0.CO;2-3

Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, *151*(2), 369-374. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3

Cornel, E. J., Jiang, J., Chen, S., & Du, J. (2021). Principles and Characteristics of Polymerization-Induced Self-Assembly with Various Polymerization Techniques. *CCS Chemistry*, *3*(4), 2104-2125. https://doi.org/10.31635/ccschem.020.202000470

Cozic, C., Picton, L., Garda, M.-R., Marlhoux, F., & Le Cerf, D. (2009). Analysis of arabic gum : Study of degradation and water desorption processes. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1930-1934. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.009

Curcio, M., Cirillo, G., Tucci, P., Farfalla, A., Bevacqua, E., Vittorio, O., Iemma, F., & Nicoletta, F. P. (2019). Dextran-Curcumin Nanoparticles as a Methotrexate Delivery Vehicle : A Step Forward in Breast Cancer Combination Therapy. *Pharmaceuticals*, *13*(1), 2. https://doi.org/10.3390/ph13010002

D'Agosto, F., Rieger, J., & Lansalot, M. (2020). RAFT-Mediated Polymerization-Induced Self-Assembly. *Angewandte Chemie International Edition*, *59*(22), 8368-8392. https://doi.org/10.1002/anie.201911758

Dao, T. P. T., Vezenkov, L., Subra, G., Amblard, M., In, M., Le Meins, J.-F., Aubrit, F., Moradi, M.-A., Ladmiral, V., & Semsarilar, M. (2020). Self-Assembling Peptide—Polymer Nano-Objects *via* Polymerization-Induced Self-Assembly. *Macromolecules*, *53*, 7034-7043. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01260

Dao, T. P. T., Vezenkov, L., Subra, G., Ladmiral, V., & Semsarilar, M. (2020). Nano-assemblies with core-forming hydrophobic polypeptide *via* polymerization-induced self-assembly (PISA). *Polymer Chemistry*, *12*, 113-121. https://doi.org/10.1039/D0PY00793E

Das, S., Mondal, S., & Ghosh, S. (2016). Interaction of cationic gemini surfactant tetramethylene-1,4-bis(dimethyltetradecylammonium bromide) with anionic polyelectrolyte sodium carboxymethyl cellulose, with two different molar masses, in aqueous and aquo-organic (isopropanol) media. *RSC Advances*, *6*(37), 30795-30803. https://doi.org/10.1039/C6RA00640J

De Groot, A. S., & Scott, D. W. (2007). Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology*, *28*(11), 482-490. https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.011

Denadai, Â. M. L., Teixeira, K. I., Santoro, M. M., Pimenta, A. M. C., Cortés, M. E., & Sinisterra, R. D. (2007). Supramolecular self-assembly of β-cyclodextrin : An effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydrate Research*, *342*(15), 2286-2296. https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.05.002

Dent, A. L., & Kokes, R. J. (1970). Nature of adsorbed propylene on zinc oxide. I. Formation of .pi.-allyl species. *Journal of the American Chemical Society*, *92*(23), 6709-6718. https://doi.org/10.1021/ja00726a001

Dickinson, E., Murray, B. S., Stainsby, G., & Anderson, D. M. W. (1988). Surface activity and emulsifying behaviour of some Acacia gums. *Food Hydrocolloids*, *2*(6), 477-490. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80047-X

Dougherty, D. A. (2013). The Cation−π Interaction. *Accounts of Chemical Research*, *46*(4), 885-893. https://doi.org/10.1021/ar300265y

Dougherty, R. C. (1998). Temperature and pressure dependence of hydrogen bond strength : A perturbation molecular orbital approach. *The Journal of Chemical Physics*, *109*(17), 7372-7378. https://doi.org/10.1063/1.477343

Douglas, S. M., Dietz, H., Liedl, T., Högberg, B., Graf, F., & Shih, W. M. (2009). Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, *459*(7245), 414-418. https://doi.org/10.1038/nature08016

Dubin, P., Bock, J., Davis, R., Schulz, D. N., & Thies, C. (Éds.). (1994). *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78469-9

Duhr, S., & Braun, D. (2006a). Optothermal Molecule Trapping by Opposing Fluid Flow with Thermophoretic Drift. *Physical Review Letters*, *97*(3), 038103. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.038103

Duhr, S., & Braun, D. (2006b). Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(52), 19678-19682. https://doi.org/10.1073/pnas.0603873103

Ebrahimi, B., Homayouni Rad, A., Ghanbarzadeh, B., Mohammadali, T., & Pasquale M., F. (2020). *The emulsifying and foaming properties of Amuniacum gum (Dorema ammoniacum) in comparison with gum Arabic | EndNote Click*. https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1002%2Ffsn3.1658&token=WzIxOTg3NzgsIjEwLjEwMDIvZnNuMy4xNjU4Il0.oVeHd9FwBRzqRdFvh-9ew1ZTFOA

Esparan, V., Krings, U., Struch, M., & Berger, R. (2015). A Three-Enzyme-System to Degrade Curcumin to Natural Vanillin. *Molecules*, *20*(4), 6640-6653. https://doi.org/10.3390/molecules20046640

Etxabide, A., Kilmartin, P. A., & Maté, J. I. (2021). Color stability and pH-indicator ability of curcumin, anthocyanin and betanin containing colorants under different storage conditions for intelligent packaging development. *Food Control*, *121*, 107645. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107645

Fincher, G. B., Stone, B. A., & Clarke, A. E. (1983). Arabinogalactan-Proteins : Structure, Biosynthesis, and Function. *Annual Review of Plant Physiology*, *34*(1), 47-70. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.000403

Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V., & Hubinger, M. D. (2012). Determination of critical storage conditions of coffee oil microcapsules by coupling water sorption isotherms and glass transition temperature. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*(5), 1044-1054. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02939.x

Froehner, S., Sánez, J., Dombroski, L. F., & Gracioto, M. P. (2017). Critical aggregates concentration of fatty esters present in biodiesel determined by turbidity and fluorescence. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(25), 20747-20758. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9593-1

Gashua, I. B., Williams, P. A., & Baldwin, T. C. (2016). Molecular characteristics, association and interfacial properties of gum Arabic harvested from both Acacia senegal and Acacia seyal. *Food Hydrocolloids*, *61*, 514-522. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.005

Ghosh, A., Haverick, M., Stump, K., Yang, X., Tweedle, M. F., & Goldberger, J. E. (2012). Fine-Tuning the pH Trigger of Self-Assembly. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(8), 3647-3650. https://doi.org/10.1021/ja211113n

Giannotti, M. I., Esteban, O., Oliva, M., García-Parajo, M. F., & Sanz, F. (2011). PH-Responsive Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complexes As Nanocarriers for Lysosomal Delivery of Therapeutic Proteins. *Biomacromolecules*, *12*(7), 2524-2533. https://doi.org/10.1021/bm2003384

Gordon, O. N., & Schneider, C. (2012). Vanillin and ferulic acid : Not the major degradation products of curcumin. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(7), 361-363. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.011

Goubault, C. (2020). *L'effet ouzo pour l'élaboration de nanocapsules hybrides (Hybridosomes®), l'encapsulation de composés hydrophobes par nanoprécipitation et la radiothérapie*.

Grein, A., da Silva, B. C., Wendel, C. F., Tischer, C. A., Sierakowski, M. R., Moura, A. B. D., Iacomini, M., Gorin, P. A. J., Simas-Tosin, F. F., & Riegel-Vidotti, I. C. (2013). Structural characterization and emulsifying properties of polysaccharides of Acacia mearnsii de Wild gum. *Carbohydrate Polymers*, *92*(1), 312-320. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.041

Grillo, I. (2003). Small-angle neutron scattering study of a world-wide known emulsion : Le Pastis. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *225*(1-3), 153-160. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00331-5

Gulão, E. da S., de Souza, C. J. F., Andrade, C. T., & Garcia-Rojas, E. E. (2016). Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum arabic : Formation and characterization. *Food Chemistry*, *194*, 680-686. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.062

Hamdani, A. M., Wani, I. A., Bhat, N. A., & Masoodi, F. A. (2018). Chemical composition, total phenolic content, antioxidant and antinutritional characterisation of exudate gums. *Food Bioscience*, *23*, 67-74. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.006

Hamid, M., Abdulrahim, Y., Abaker, A., Hejair, H. M. A., Elkhier, T., & Mohmoud, T. N. (2021). *Protective Effect of Gum Arabic on Liver Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis Induced by CCl4 in vivo*. *3*, 8. https://doi.org/10.36349/easjnm.2021.v03i01.005

Hasan, M., Ben Messaoud, G., Michaux, F., Tamayol, A., Kahn, C. J. F., Linder, M., & Arab-Tehrany, E. (2016). Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin : Study of lipid–polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. *RSC Advances*, 15.

Herman, J., & Usher, W. (2017). SALib : An open-source Python library for Sensitivity Analysis. *The Journal of Open Source Software*, *2*(9), 97. https://doi.org/10.21105/joss.00097

Hill, W. J., & Hunter, W. G. (1966). A Review of Response Surface Methodology : A Literature Survey. *Technometrics*, *8*(4), 571. https://doi.org/10.2307/1266632

Hou, C., Wu, S., Xia, Y., Phillips, G. O., & Cui, S. W. (2017). A novel emulsifier prepared from Acacia seyal polysaccharide through Maillard reaction with casein peptides. *Food Hydrocolloids*, *69*, 236-241. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.038

Hu, B., Ma, F., Yang, Y., Xie, M., Zhang, C., Xu, Y., & Zeng, X. (2016). Antioxidant Nanocomplexes for Delivery of Epigallocatechin-3-gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(17), 3422-3429. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00931

Huie, J. C. (2003). Guided molecular self-assembly : A review of recent efforts. *Smart Materials and Structures*, *12*(2), 264-271. https://doi.org/10.1088/0964-1726/12/2/315

Hunter, C. A., & Sanders, J. K. M. (1990). *The nature of .pi.-.pi. Interactions*. 10.

Ikkene, D., Arteni, A. A., Ouldali, M., Francius, G., Brûlet, A., Six, J.-L., & Ferji, K. (2021). Direct Access to Polysaccharide-Based Vesicles with a Tunable Membrane Thickness in a Large Concentration Window via Polymerization-Induced Self-Assembly. *Biomacromolecules*, *22*(7), 3128-3137. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00569

Inavea pure acacia. (s. d.). Nexira. Consulté 12 septembre 2021, à l'adresse https://www.nexira.com/fr/brand/inavea/

Isare, B., Petit, L., Bugnet, E., Vincent, R., Lapalu, L., Sautet, P., & Bouteiller, L. (2009). The Weak Help the Strong : Low-Molar-Mass Organogelators Harden Bitumen. *Langmuir*, *25*(15), 8400-8403. https://doi.org/10.1021/la804086h

Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P., & Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis : Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*, *1077*, 101-113. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009

Jiang, J., Zhang, X., Fan, Z., & Du, J. (2019). Ring-Opening Polymerization of *N* -Carboxyanhydride-Induced Self-Assembly for Fabricating Biodegradable Polymer Vesicles. *ACS Macro Letters*, *8*(10), 1216-1221. https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.9b00606

Jiang, X. C., Zeng, Q. H., Chen, C. Y., & Yu, A. B. (2011). Self-assembly of particles : Some thoughts and comments. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(42), 16797. https://doi.org/10.1039/c1jm12213d

Kabiri, M., Bushnak, I., McDermot, M. T., & Unsworth, L. D. (2013). Toward a Mechanistic Understanding of Ionic Self-Complementary Peptide Self-Assembly : Role of Water Molecules and Ions. *Biomacromolecules*, *14*(11), 3943-3950. https://doi.org/10.1021/bm401077b

Karaki, N. (2015). *Impact de la fonctionnalisation enzymatique de la pectine par des composés phénoliques sur la structure et les propriétés physicochimiques du polymère*. http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2015_0205_KARAKI.pdf

Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2016). Enzymatic modification of polysaccharides : Mechanisms, properties, and potential applications: A

review. *Enzyme and Microbial Technology*, *90*, 1-18. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004

Karaki, N., Aljawish, A., Muniglia, L., Bouguet-Bonnet, S., Leclerc, S., Paris, C., Jasniewski, J., & Humeau-Virot, C. (2017). Functionalization of pectin with laccase-mediated oxidation products of ferulic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, *104*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.05.001

Karaki, N., Aljawish, A., Muniglia, L., Humeau, C., & Jasniewski, J. (2016). Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols. *Food Hydrocolloids*, *60*, 486-493. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.004

Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *WIREs Computational Statistics*, *2*(2), 128-149. https://doi.org/10.1002/wics.73

Kilburn, D., Claude, J., Schweizer, T., Alam, A., & Ubbink, J. (2005). Carbohydrate Polymers in Amorphous States : An Integrated Thermodynamic and Nanostructural Investigation. *Biomacromolecules*, *6*(2), 864-879. https://doi.org/10.1021/bm049355r

Kim, T. H., Jiang, H. H., Youn, Y. S., Park, C. W., Tak, K. K., Lee, S., Kim, H., Jon, S., Chen, X., & Lee, K. C. (2011). Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity. *International Journal of Pharmaceutics*, *403*(1-2), 285-291. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.041

Kitchener, B. G. B., Wainwright, J., & Parsons, A. J. (2017). A review of the principles of turbidity measurement | EndNote Click. *Progress in Physical Geography*, *41*, 620-642.

Kong, C. Y., & Muthukumar, M. (1998). Monte Carlo study of adsorption of a polyelectrolyte onto charged surfaces. *The Journal of Chemical Physics*, *109*(4), 1522-1527. https://doi.org/10.1063/1.476703

Kotz, S., & Johnson, N. L. (Éds.). (1992). *Breakthroughs in statistics*. Springer-Verlag.

Kraisomdet, P., Pratess, T., Na Nakorn, P., Sangkaew, P., Naneto, A., Inprakon, P., Panbangred, W., & Patikarnmonthon, N. (2020). Amphiphilic dextran-vinyl laurate-based nanoparticles : Formation, characterization, encapsulation, and cytotoxicity on human intestinal cell line. *Progress in Biomaterials*, *9*(1-2), 15-23. https://doi.org/10.1007/s40204-020-00128-1

Kumar, G., Smith, P. J., & Payne, G. F. (1999). Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, *63*(2), 154-165. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990420)63:2<154::AID-BIT4>3.0.CO;2-R

Kundu, S., Abdullah, Md. F., Das, A., Basu, A., Halder, A., Das, M., Samanta, A., & Mukherjee, A. (2016). Antifungal ouzo nanoparticles from guar gum propionate. *RSC Advances*, *6*(108), 106563-106571. https://doi.org/10.1039/C6RA19658F

LaMer, V. K., & Dinegar, R. H. (1950). Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical Society*, *72*(11), 4847-4854. https://doi.org/10.1021/ja01167a001

Lepeltier, E., Bourgaux, C., & Couvreur, P. (2014). Nanoprecipitation and the “Ouzo effect” : Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *71*, 86-97. https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009

Lesty, M. (1999). Une nouvelle approche dans le choix des régresseurs de la régression multiple en présence d’interactions et de colinéarités. *La revue de Modulad*, *22*, 41-77.

Lesty, M., & Buat-Ménard, P. (1982). La synthèse géométrique des corrélations multidimensionnelles. *Les cahiers de l’analyse des données*, *7*(3).

Li, M., Fokkink, R., Ni, Y., & Kleijn, J. M. (2019). Bovine beta-casein micelles as delivery systems for hydrophobic flavonoids. *Food Hydrocolloids*, *96*, 653-662. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.005

Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., Yan, Y., Cao, M., Lu, L., Guan, J., Zhang, D., & Lin, Y. (2016). Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(2), 237-250. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12161

Liu, C., Hong, C.-Y., & Pan, C.-Y. (2020). Polymerization techniques in polymerization-induced self-assembly (PISA). *Polymer Chemistry*, *11*(22), 3673-3689. https://doi.org/10.1039/D0PY00455C

Liu, J., Wang, X., Yong, H., Kan, J., & Jin, C. (2018). Recent advances in flavonoid-grafted polysaccharides : Synthesis, structural characterization, bioactivities and potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *116*, 1011-1025. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.149

Liu, X., You, L., Tarafder, S., Zou, L., Fang, Z., Chen, J., Lee, C. H., & Zhang, Q. (2019). Curcumin-releasing chitosan/aloe membrane for skin regeneration. *Chemical Engineering Journal*, *359*, 1111-1119. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.073

Liu, Y., Cai, Y., Jiang, X., Wu, J., & Le, X. (2016). Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin–chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, *52*, 564-572. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.005

Liu, Y., Liao, Y., Wei, S., Zhang, H., & Wang, X. (2019). Nanoparticles based on sodium alginate and β-conglycinin : Self-assembly and delivery of Phyllanthus urinaria phenolic compounds. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(1), e13851. https://doi.org/10.1111/jfpp.13851

Liu, Y., Ying, D., Cai, Y., & Le, X. (2017). Improved antioxidant activity and physicochemical properties of curcumin by adding ovalbumin and its structural characterization. *Food Hydrocolloids*, *72*, 304-311. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.007

Lohse, D., & Zhang, X. (2015). Surface nanobubbles and nanodroplets. *Reviews of Modern Physics*, *87*(3), 981-1035. https://doi.org/10.1103/RevModPhys.87.981

Lopez-Torrez, L., Nigen, M., Williams, P., Doco, T., & Sanchez, C. (2015). Acacia senegal vs. Acacia seyal gums – Part 1 : Composition and structure of hyperbranched plant exudates. *Food Hydrocolloids*, *51*, 41-53. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.019

Lu, H., Akgun, B., Wei, X., Li, L., Satija, S. K., & Russell, T. P. (2011). Temperature-Triggered Micellization of Block Copolymers on an Ionic Liquid Surface. *Langmuir*, *27*(20), 12443-12450. https://doi.org/10.1021/la2024988

Lykiema, J., Sing, K. S. W., Haber, J., Kerker, M., Wolfram, E., Block, J. H., Churaev, N. V., Everett, D. H., Hansen, R. S., Haul, R. A. W., Hightower, J. W., & Hunter, R. J. (1984). *Reporting physiosorption data fot gas/solid systems*. 17.

Ma, Y., & Lodge, T. P. (2016). Poly(methyl methacrylate)- *block* -poly(*n* -butyl methacrylate) Diblock Copolymer Micelles in an Ionic Liquid : Scaling of Core and Corona Size with Core Block Length. *Macromolecules*, *49*(9), 3639-3646. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b00315

Mahfoudhi, N., Sessa, M., Chouaibi, M., Ferrari, G., Donsì, F., & Hamdi, S. (2014). Assessment of emulsifying ability of almond gum in comparison with gum arabic using response surface methodology. *Food Hydrocolloids*, *37*, 49-59. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.009

Mai, Y., & Eisenberg, A. (2012). Self-assembly of block copolymers. *Chemical Society Reviews*, *41*(18), 5969. https://doi.org/10.1039/c2cs35115c

Mäkelä, M. (2017). Experimental design and response surface methodology in energy applications_ A tutorial review. *Energy Conversion and Management*, 11.

Marsh, D. (2012). Thermodynamics of Phospholipid Self-Assembly. *Biophysical Journal*, *102*(5), 1079-1087. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.049

Masuelli, M. A. (2013). Hydrodynamic Properties of Whole Arabic Gum. *American Journal of Food Science and Technology*, *1*(3), 60-66.

McNamee, B. F., O'Riorda, E. D., & O'Sullivan, M. (1998). Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(11), 4551-4555. https://doi.org/10.1021/jf9803740

Mellot, G., Guigner, J.-M., Jestin, J., Bouteiller, L., Stoffelbach, F., & Rieger, J. (2018). Bisurea-Functionalized RAFT Agent : A Straightforward and Versatile Tool toward the Preparation of Supramolecular Cylindrical Nanostructures in Water. *Macromolecules*, *51*(24), 10214-10222. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b02156

Mendes, A. C., Baran, E. T., Reis, R. L., & Azevedo, H. S. (2013). Self-assembly in nature : Using the principles of nature to create complex nanobiomaterials. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *5*(6), 582-612. https://doi.org/10.1002/wnan.1238

Meyer, E. E., Rosenberg, K. J., & Israelachvili, J. (2006). *Recent progress in understanding hydrophobic interactions*. *103*(43), 8.

Moatsou, D., Li, J., Ranji, A., Pitto-Barry, A., Ntai, I., Jewett, M. C., & O'Reilly, R. K. (2015). Self-Assembly of Temperature-Responsive Protein–Polymer Bioconjugates.

Bioconjugate Chemistry, *26*(9), 1890-1899. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00264

Mohanty, A., K, M., Jena, S. S., & Behera, R. K. (2021). Kinetics of Ferritin Self-Assembly by Laser Light Scattering : Impact of Subunit Concentration, pH, and Ionic Strength. *Biomacromolecules*, *22*(4), 1389-1398. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01562

Mondal, S., & Ghosh, S. (2021). Spectroscopic study on the interaction of curcumin with single chain and gemini surfactants. *Chemical Physics Letters*, *762*, 138144. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.138144

Morrow, B. H., Payne, G. F., & Shen, J. (2015). PH-Responsive Self-Assembly of Polysaccharide through a Rugged Energy Landscape. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(40), 13024-13030. https://doi.org/10.1021/jacs.5b07761

Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Domenico, A. D., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Lambré, C., Leblanc, J.-C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Oskarsson, A., Parent-Massin, D., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., Wright, M., … Dusemund, B. (2017). Re-evaluation of acacia gum (E 414) as a food additive. *EFSA Journal*, *15*(4), e04741. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4741

Mota, F. L., Queimada, A. J., Pinho, S. P., & Macedo, E. A. (2008). *Aqueous Solubility of Some Natural Phenolic Compounds*. *47*, 5182-5189.

Mothé, C. G., & Rao, M. A. (2000). Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum. *Thermochimica Acta*, *357-358*, 9-13. https://doi.org/10.1016/S0040-6031(00)00358-0

Mundlia, J., Ahuja, M., Kumar, P., & Pillay, V. (2019). Pectin–curcumin composite : Synthesis, molecular modeling and cytotoxicity. *Polymer Bulletin*, *76*(6), 3153-3173. https://doi.org/10.1007/s00289-018-2538-0

Mura, S., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*, *12*(11), 991-1003. https://doi.org/10.1038/nmat3776

Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B., & Girardin, M. (2005). Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International*, *38*(8-9), 995-1000. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.019

Nagahama, K., Sano, Y., & Kumano, T. (2015). Anticancer drug-based multifunctional nanogels through self-assembly of dextran–curcumin conjugates toward cancer theranostics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *25*(12), 2519-2522. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.04.062

Nagai, A., Nagai, Y., Qu, H., & Zhang, S. (2007). Dynamic Behaviors of Lipid-Like Self-Assembling Peptide A₆D and A₆K Nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *7*(7), 2246-2252. https://doi.org/10.1166/jnn.2007.647

Nakauma, M., Funami, T., Noda, S., Ishihara, S., Al-Assaf, S., Nishinari, K., & Phillips, G. O. (2008). Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, *22*(7), 1254-1267. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.004

Nascimento da Silva, M., de Matos Fonseca, J., Feldhaus, H. K., Soares, L. S., Valencia, G. A., Maduro de Campos, C. E., Di Luccio, M., & Monteiro, A. R. (2019). Physical and morphological properties of hydroxypropyl methylcellulose films with curcumin polymorphs. *Food Hydrocolloids*, *97*, 105217. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105217

Netz, R. R., & Joanny, J.-F. (1999). Adsorption of Semiflexible Polyelectrolytes on Charged Planar Surfaces : Charge Compensation, Charge Reversal, and Multilayer Formation. *Macromolecules*, *32*(26), 9013-9025. https://doi.org/10.1021/ma990263h

Nichifor, M., Stanciu, M. C., & Doroftei, F. (2021). Self-assembly of dextran – b – deoxycholic acid polyester copolymers : Copolymer composition and self-assembly procedure tune the aggregate size and morphology. *Carbohydrate Polymers*, *252*, 117147. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117147

Nishimura, T., Shishi, S., Sasaki, Y., & Akiyoshi, K. (2020). Thermoresponsive Polysaccharide Graft Polymer Vesicles with Tunable Size and Structural Memory. *Journal of the American Chemical Society*, *142*(27), 11784-11790. https://doi.org/10.1021/jacs.0c02290

Onesippe, C., & Lagerge, S. (2008). Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and chitosan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *317*(1-3), 100-108. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.10.002

Onesippe, C., & Lagerge, S. (2009). Study of the complex formation between sodium dodecyl sulphate and gelatin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *337*(1-3), 61-66. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.11.057

Osman, M. E., Williams, P. A., Menzies, A. R., & Phillips, G. O. (1993). Characterization of commercial samples of gum arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(1), 71-77. https://doi.org/10.1021/jf00025a016

Padala, S. R., Williams, P. A., & Phillips, G. O. (2009). Adsorption of Gum Arabic, Egg White Protein, and Their Mixtures at the Oil−Water Interface in Limonene Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(11), 4964-4973. https://doi.org/10.1021/jf803794n

Pearson, S., St Thomas, C., Guerrero-Santos, R., & D'Agosto, F. (2017). Opportunities for dual RDRP agents in synthesizing novel polymeric materials. *Polymer Chemistry*, *8*(34), 4916-4946. https://doi.org/10.1039/C7PY00344G

Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, *2*(12), 751-760. https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387

Peng, S., Li, Z., Zou, L., Liu, W., Liu, C., & McClements, D. J. (2018). Improving curcumin solubility and bioavailability by encapsulation in saponin-coated curcumin nanoparticles prepared using a simple pH-driven loading method. *Food & Function*, *9*(3), 1829-1839. https://doi.org/10.1039/C7FO01814B

Pérez-Alonso, C., Beristain, C. I., Lobato-Calleros, C., Rodríguez-Huezo, M. E., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. *Journal of Food Engineering*, *77*(4), 753-760. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.002

Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer : Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *93*, 52-79. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018

Philp, D., & Stoddart, J. F. (1996a). Self-Assembly in Natural and Unnatural Systems. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *35*(11), 1154-1196. https://doi.org/10.1002/anie.199611541

Philp, D., & Stoddart, J. F. (1996b). Self-Assembly in Natural and Unnatural Systems. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *35*(11), 1154-1196. https://doi.org/10.1002/anie.199611541

Piculell, L., & Lindman, Bj. (1992). *ASSOCIATION AND SEGREGATION IN AQUEOUS POLYMEWPOLYMER, POLYMER/ SURFACTANT, AND SURFACTANTBURFACTANT MIXTURES: SIMILARITIES AND DIFFERENCES*. *41*, 149-178.

Pirestani, S., Nasirpour, A., Keramat, J., Desobry, S., & Jasniewski, J. (2017). Effect of glycosylation with gum Arabic by Maillard reaction in a liquid system on the emulsifying properties of canola protein isolate. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 1620-1627. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.044

Poljanšek, I., Šebenik, U., & Krajnc, M. (2006). Characterization of phenol–urea–formaldehyde resin by inline FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, *99*(5), 2016-2028. https://doi.org/10.1002/app.22161

Procházka, K., Šindelka, K., Wang, X., Limpouchová, Z., & Lísal, M. (2016). Self-assembly and co-assembly of block polyelectrolytes in aqueous solutions. Dissipative particle dynamics with explicit electrostatics. *Molecular Physics*, *114*(21), 3077-3092. https://doi.org/10.1080/00268976.2016.1225130

Pucci, C., Cousin, F., Dole, F., Chapel, J.-P., & Schatz, C. (2018). Impact of the Formulation Pathway on the Colloidal State and Crystallinity of Poly-ε-caprolactone Particles Prepared by Solvent Displacement. *Langmuir*, *34*(7), 2531-2542. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04198

Qin, J., & Gronenborn, A. M. (2014). Weak protein complexes : Challenging to study but essential for life. *The FEBS Journal*, *281*(8), 1948-1949. https://doi.org/10.1111/febs.12744

Randall, R. C., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (1988). The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, *2*(2), 131-140. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(88)80011-0

Raveendran, R., Bhuvaneshwar, G. S., & Sharma, C. P. (2016). Hemocompatible curcumin–dextran micelles as pH sensitive pro-drugs for enhanced therapeutic efficacy in cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 497-507. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.017

Renard, D., Garnier, C., Lapp, A., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2012). Structure of arabinogalactan-protein from Acacia gum : From porous ellipsoids to supramolecular architectures. *Carbohydrate Polymers*, *90*(1), 322-332. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.046

Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M.-C., & Sanchez, C. (2006). Acacia senegal Gum : Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules*, *7*(9), 2637-2649. https://doi.org/10.1021/bm060145j

Renard, D., Lepvrier, E., Garnier, C., Roblin, P., Nigen, M., & Sanchez, C. (2014). Structure of glycoproteins from Acacia gum : An assembly of ring-like glycoproteins modules. *Carbohydrate Polymers*, *99*, 736-747. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.090

Renard, D., Sanchez, C., Lavenant-Gourgeon, L., & Schmitt, C. (2005). *AGP 1.png.emf*. Biologie structurale d'hétéropolyosides: cas desarabinogalactane-protéines de gomme d'acacia, Pessac.

Roudaut, G., Simatos, D., Champion, D., Contreras-Lopez, E., & Le Meste, M. (2004). Molecular mobility around the glass transition temperature : A mini review. *Innovative*

Food Science & Emerging Technologies, *5*(2), 127-134. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2003.12.003

Sabet, S., Rashidinejad, A., Melton, L. D., Zujovic, Z., Akbarinejad, A., Nieuwoudt, M., Seal, C. K., & McGillivray, D. J. (2021). The interactions between the two negatively charged polysaccharides : Gum Arabic and alginate. *Food Hydrocolloids*, *112*, 106343. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106343

Sanchez, C., Nigen, M., Mejia Tamayo, V., Doco, T., Williams, P., Amine, C., & Renard, D. (2018). Acacia gum : History of the future. *Food Hydrocolloids*, *78*, 140-160. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.008

Sanchez, C., Renard, D., Robert, P., Schmitt, C., & Lefebvre, J. (2002). Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. *Food Hydrocolloids*, *16*(3), 257-267. https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00096-0

Sanchez, C., Schmitt, C., Kolodziejczyk, E., Lapp, A., Gaillard, C., & Renard, D. (2008). The Acacia Gum Arabinogalactan Fraction Is a Thin Oblate Ellipsoid : A New Model Based on Small-Angle Neutron Scattering and Ab Initio Calculation. *Biophysical Journal*, *94*(2), 629-639. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109124

Sarika, P. R., James, N. R., Kumar, P. R. A., Raj, D. K., & Kumary, T. V. (2015). Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, *134*, 167-174. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.068

Schneider, C., Gordon, O. N., Edwards, R. L., & Luis, P. B. (2015). Degradation of Curcumin : From Mechanism to Biological Implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(35), 7606-7614. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00244

Schottel, B. L., Chifotides, H. T., & Dunbar, K. R. (2008). Anion-π interactions. *Chem. Soc. Rev.*, *37*(1), 68-83. https://doi.org/10.1039/B614208G

Shaki, H., Ganji, F., Kempen, P. J., Dolatshahi-Pirouz, A., & Vasheghani-Farahani, E. (2018). Self-assembled amphiphilic-dextran nanomicelles for delivery of rapamycin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *44*, 333-341. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.010

Sitnikova, N. L., Sprik, R., Wegdam, G., & Eiser, E. (2005). Spontaneously Formed *trans* -Anethol/Water/Alcohol Emulsions : Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir*, *21*(16), 7083-7089. https://doi.org/10.1021/la046816l

Six, J.-L., & Ferji, K. (2019). Polymerization induced self-assembly : An opportunity toward the self-assembly of polysaccharide-containing copolymers into high-order morphologies. *Polymer Chemistry*, *10*(1), 45-53. https://doi.org/10.1039/C8PY01295D

Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Iemma, F., Cirillo, G., Puoci, F., Curcio, M., & Picci, N. (2010). Antioxidant–polysaccharide conjugates for food application by eco-friendly grafting procedure. *Carbohydrate Polymers*, *79*(2), 333-340. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.010

Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Jiyong, S., Mahunu, G. K., Zhai, X., & Mariod, A. A. (2018). Quality and postharvest-shelf life of cold-stored strawberry fruit as affected by gum arabic (Acacia senegal) edible coating. *Journal of Food Biochemistry*, *42*(3), e12527. https://doi.org/10.1111/jfbc.12527

Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation : Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *121*, 1276-1286. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144

Trevisan, henrique, Nishimori, K., Aime, S., Guigner, J.-M., Ouchi, M., & Tournilhac, F. (2021). Ouzo phase occurrence with alternated lipo/hydrophilic copolymers in water. *Soft Matter*.

Tsianou, M., & Alexandridis, P. (1999). Control of the Rheological Properties in Solutions of a Polyelectrolyte and an Oppositely Charged Surfactant by the Addition of Cyclodextrins. *Langmuir*, *15*(23), 8105-8112. https://doi.org/10.1021/la990701d

Tsuzuki, S., Honda, K., Uchimaru, T., Mikami, M., & Fujii, A. (2006). Magnitude and Directionality of the Interaction Energy of the Aliphatic CH/π Interaction : Significant Difference from Hydrogen Bond. *The Journal of Physical Chemistry A*, *110*(33), 10163-10168. https://doi.org/10.1021/jp064206j

Van Butsele, K., Jérôme, R., & Jérôme, C. (2007). Functional amphiphilic and biodegradable copolymers for intravenous vectorisation. *Polymer*, *48*(26), 7431-7443. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.09.048

Van Oss, C. J., Good, R. J., & Chaudhury, M. K. (1986). The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, *111*(2), 378-390. https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90041-X

Vasile, F. E., Martinez, M. J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Judis, M. A., & Mazzobre, M. F. (2016). Physicochemical, interfacial and emulsifying properties of a non-conventional exudate gum (Prosopis alba) in comparison with gum arabic. *Food Hydrocolloids*, *56*, 245-253. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.016

Verbeken, D., Dierckx, S., & Dewettinck, K. (2003). Exudate gums : Occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *63*(1), 10-21. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1354-z

Vitale, S. A., & Katz, J. L. (2003). Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid−Liquid Nucleation : “The Ouzo Effect”. *Langmuir*, *19*(10), 4105-4110. https://doi.org/10.1021/la026842o

Vuillemin, M. E. (2019). *Auto-assemblages de polysaccharides fonctionnalisés : Une étude thermodynamique* [Université de lorraine]. http://docnum.univ-lorraine.fr.bases-doc.univ-lorraine.fr/ulprive/DDOC_T_2019_0177_VUILLEMIN.pdf

Vuillemin, M. E., Michaux, F., Adam, A. A., Linder, M., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2020). Physicochemical characterizations of gum Arabic modified with oxidation products of ferulic acid. *Food Hydrocolloids*, 105919. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105919

Vuillemin, M. E., Michaux, F., Muniglia, L., Linder, M., & Jasniewski, J. (2019). Gum Arabic and chitosan self-assembly : Thermodynamic and mechanism aspects. *Food Hydrocolloids*, *96*, 463-474. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.048

Vuillemin, M. E., Michaux, F., Seiler, A., Linder, M., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2021). Polysaccharides enzymatic modification to control the coacervation or the aggregation behavior : A thermodynamic study. *Food Hydrocolloids*, 107092. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107092

Vuillemin, M. E., Michaux, F., Seiler, A., Linder, M., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2022). Polysaccharides enzymatic modification to control the coacervation or the aggregation behavior : A thermodynamic study. *Food Hydrocolloids*, *122*, 107092. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107092

Wang, H., Williams, P. A., & Senan, C. (2014). Synthesis, characterization and emulsification properties of dodecenyl succinic anhydride derivatives of gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, *37*, 143-148. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.033

Wang, J. (2016). Peptide self-assembly : Thermodynamics and kinetics. *Chem Soc Rev*, 17.

Wang, Y., Han, G., Duan, W., & Zhang, W. (2019). ICAR ATRP in PEG with Low Concentration of Cu(II) Catalyst : A Versatile Method for Synthesis of Block Copolymer Nanoassemblies under Dispersion Polymerization. *Macromolecular Rapid Communications*, *40*(2), 1800140. https://doi.org/10.1002/marc.201800140

Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, *171*, 737-738.

Whitesides, George. M., & Grzybowsk, B. (2002). Self-Assembly at All Scales. *Science*, *295*(5564), 2418-2421. https://doi.org/10.1126/science.1070821

Wiradharma, N., Zhang, Y., Venkataraman, S., Hedrick, J. L., & Yang, Y. Y. (2009). Self-assembled polymer nanostructures for delivery of anticancer therapeutics. *Nano Today*, *4*(4), 302-317. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.06.001

Wu, Y., Eskin, N. A. M., Cui, W., & Pokharel, B. (2015). Emulsifying properties of water soluble yellow mustard mucilage : A comparative study with gum Arabic and citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, *47*, 191-196. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.020

Xiao, Y., Chinoy, Z. S., Pecastaings, G., Bathany, K., Garanger, E., & Lecommandoux, S. (2020). Design of Polysaccharide- *b* -Elastin-Like Polypeptide Bioconjugates and Their Thermoresponsive Self-Assembly. *Biomacromolecules*, *21*(1), 114-125. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01058

Xu, R., Zhang, J., Zhou, P., Yang, R., Feng, X., & Xu, L. (2015). A novel artificial red blood cell substitute : Grafted starch-encapsulated hemoglobin. *RSC Advances*, *5*(54), 43845-43853. https://doi.org/10.1039/C5RA00772K

Xu, X.-L., Li, W.-S., Wang, X.-J., Du, Y.-L., Kang, X.-Q., Hu, J.-B., Li, S.-J., Ying, X.-Y., You, J., & Du, Y.-Z. (2018). Endogenous sialic acid-engineered micelles : A multifunctional platform for on-demand methotrexate delivery and bone repair of rheumatoid arthritis. *Nanoscale*, *10*(6), 2923-2935. https://doi.org/10.1039/C7NR08430G

Xu, Y., Jiang, S., Simmons, C. R., Narayanan, R. P., Zhang, F., Aziz, A.-M., Yan, H., & Stephanopoulos, N. (2019). Tunable Nanoscale Cages from Self-Assembling DNA and Protein Building Blocks. *ACS Nano*, *13*(3), 3545-3554. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09798

Yan, M., Li, B., Zhao, X., & Qin, S. (2012). Effect of concentration, pH and ionic strength on the kinetic self-assembly of acid-soluble collagen from walleye pollock (Theragra chalcogramma) skin. *Food Hydrocolloids*, *29*(1), 199-204. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.014

Yang, J.-S., Xie, Y.-J., & He, W. (2011). Research progress on chemical modification of alginate : A review. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 33-39. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.048

Yang, Y., Wang, S., Wang, Y., Wang, X., Wang, Q., & Chen, M. (2014). Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. *Biotechnology Advances*, *32*(7), 1301-1316. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.007

Yaseen, E. I., Herald, T. J., Aramouni, F. M., & Alavi, S. (2005). Rheological properties of selected gum solutions. *Food Research International*, *38*(2), 111-119. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.01.013

Yoon, K.-Y., Lee, I.-H., Kim, K. O., Jang, J., Lee, E., & Choi, T.-L. (2012). One-Pot in Situ Fabrication of Stable Nanocaterpillars Directly from Polyacetylene Diblock

Copolymers Synthesized by Mild Ring-Opening Metathesis Polymerization. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(35), 14291-14294. https://doi.org/10.1021/ja305150c

Zhang, S. (2002). Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnology Advances*, *20*(5-6), 321-339. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00026-5

Zhong, C., Gurry, T., Cheng, A. A., Downey, J., Deng, Z., Stultz, C. M., & Lu, T. K. (2014). Strong underwater adhesives made by self-assembling multi-protein nanofibres. *Nature Nanotechnology*, *9*(10), 858-866. https://doi.org/10.1038/nnano.2014.199

Zhou, D., Kuchel, R. P., & Zetterlund, P. B. (2017). A New Paradigm in Polymerization Induced Self-Assembly (PISA) : Exploitation of "Non-Living" Addition-Fragmentation Chain Transfer (AFCT) Polymerization. *Polymer Chemistry*, *8*(29), 4177-4181. https://doi.org/10.1039/C5PY01483B

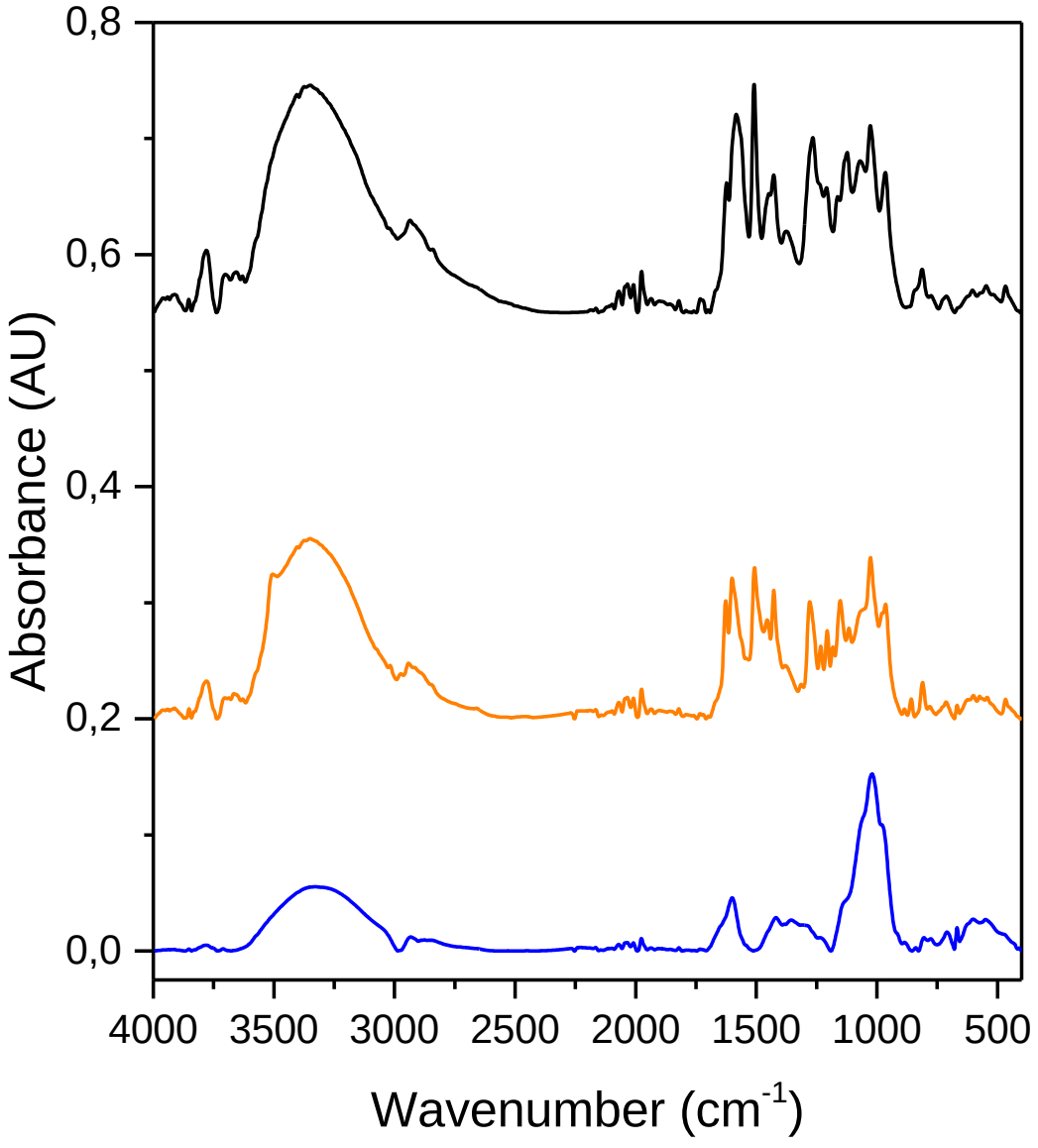
Zhu, Y., Liu, L., & Du, J. (2013). Probing into Homopolymer Self-Assembly : How Does Hydrogen Bonding Influence Morphology? *Macromolecules*, *46*(1), 194-203. https://doi.org/10.1021/ma302176a

Zohuriaan, M. J., & Shokrolahi, F. (2004). Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, *23*(5), 575-579. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2003.11.001

Zohuriaan-Mehr, M. J., Motazedi, Z., Kabiri, K., & Ershad-Langroudi, A. (2005). New Super-Absorbing Hydrogel Hybrids from Gum Arabic and Acrylic Monomers. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, *42*(12), 1655-1666. https://doi.org/10.1080/10601320500246859

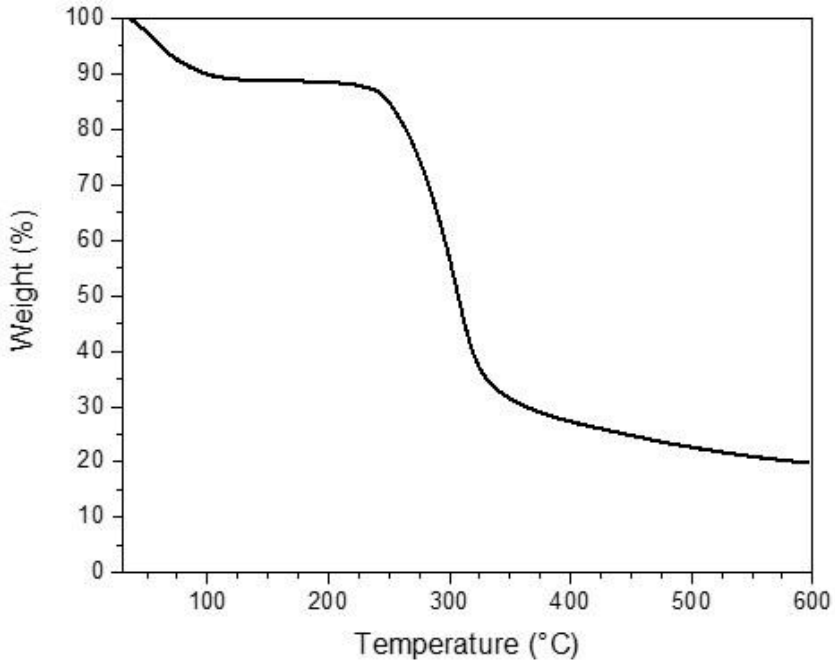
Annexes

Annexe 1 : Spectre FTIR obtenu avec (bleu) la gomme d'Acacia native, (orange) les produits d'oxydation de la curcumine et (noir) la GACD.

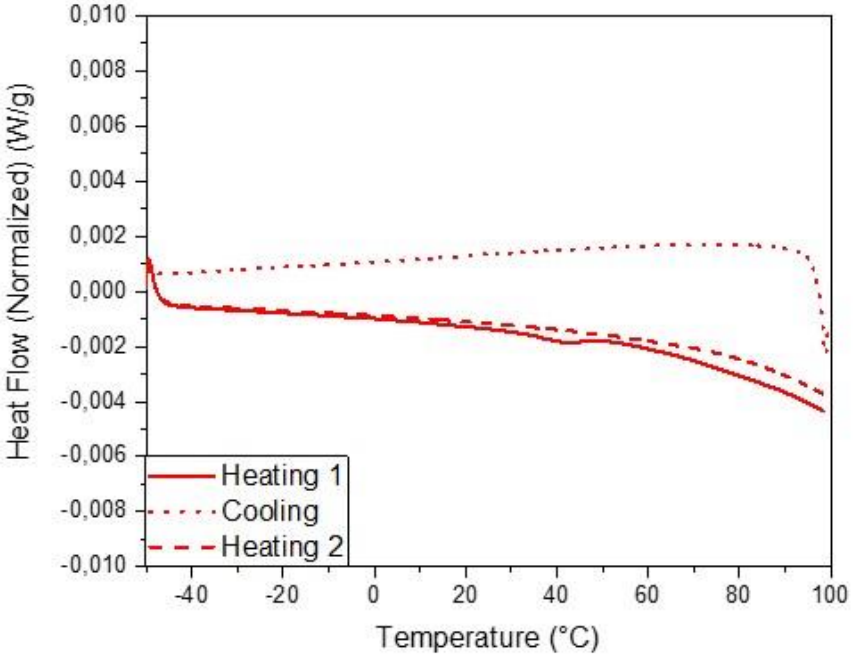


Annexe 2 : (A) TGA et (B) DSC obtenues avec un mélange physique GA – Curcumine lyophilisé

A

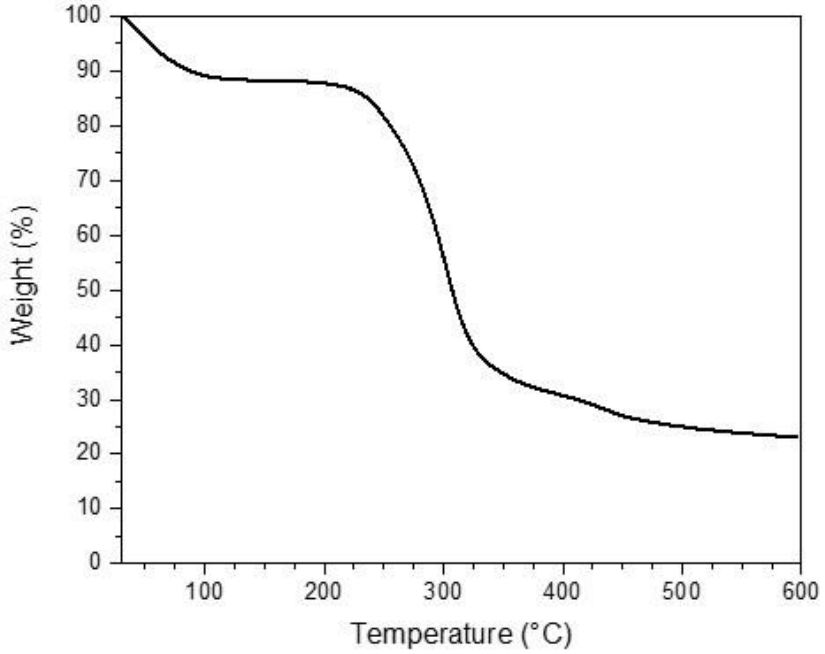


B

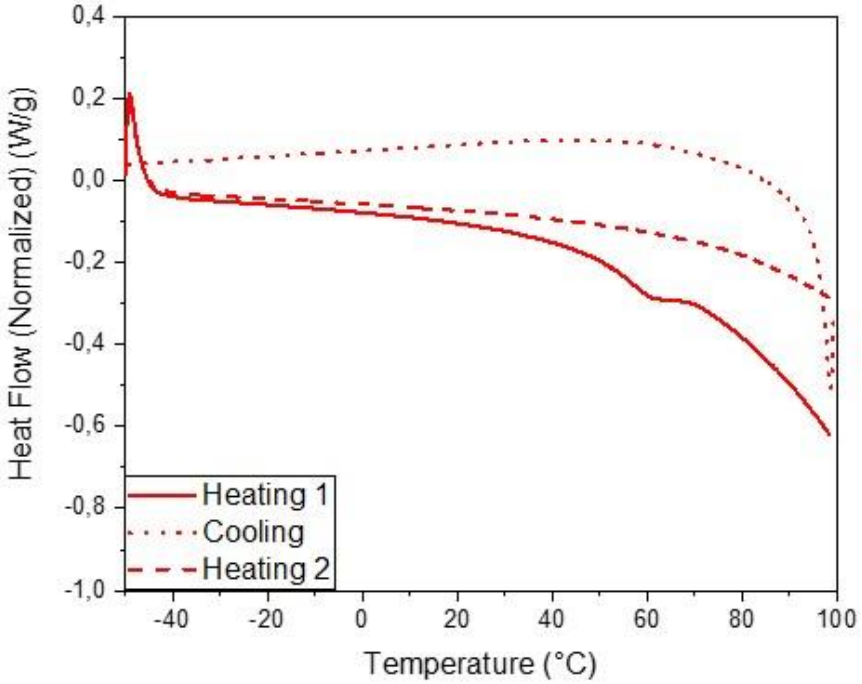


Annexe 3 : (A) TGA et (B) DSC obtenues avec un mélange physique GA – POX lyophilisé

A

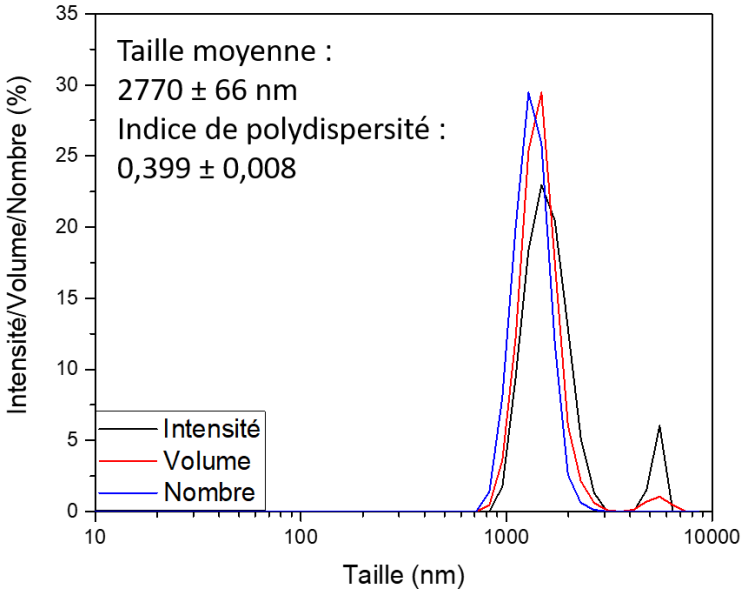


B

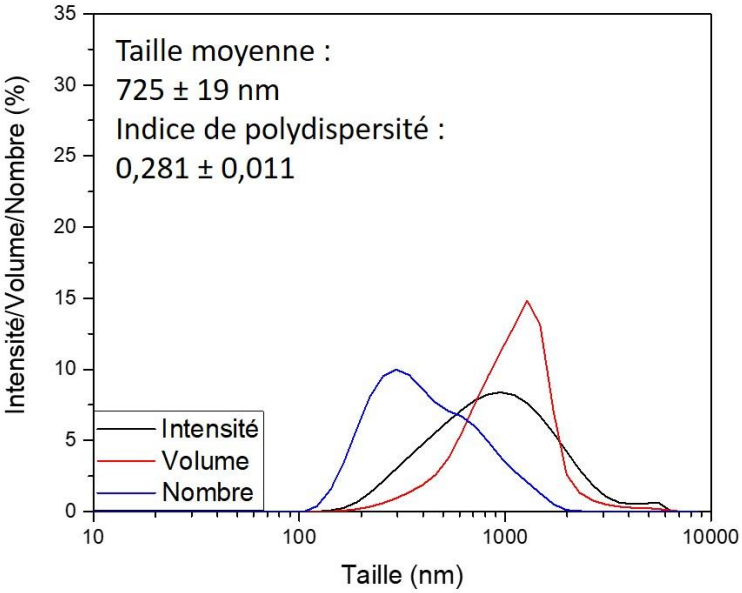


Annexe 4 : Distribution en intensité, volume et nombre pour un mélange physique (A) GA – curcumine et (B) GA – POX à 0,1% (p/v)

A



B

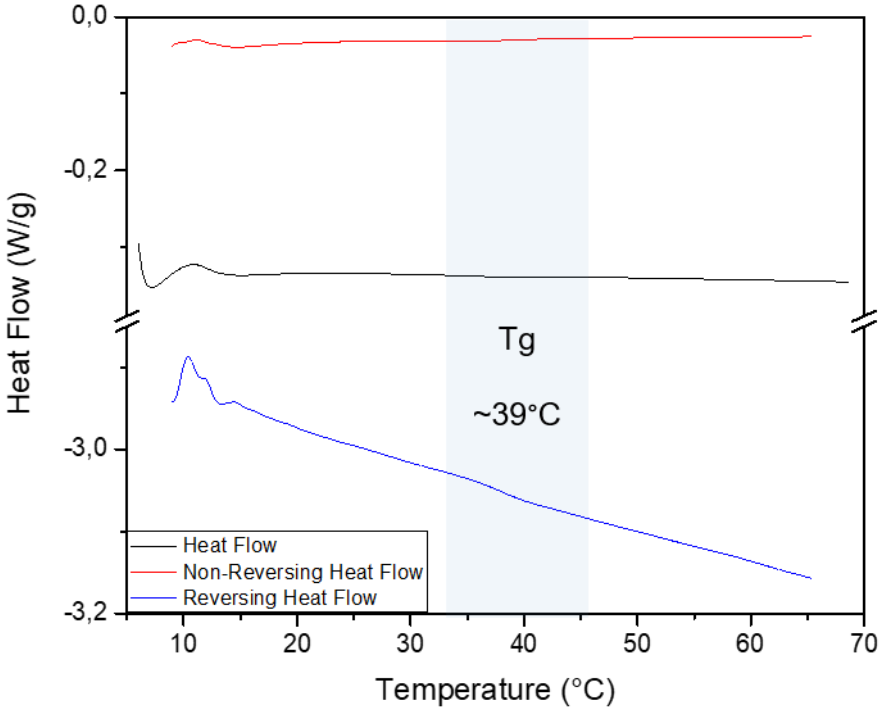


Annexe 5 : Essais de solubilisation de la GAC dans différents solvants et à différentes concentrations

Solvant	Ratio solvant : eau	Concentration de GAC (%)	Solubilité (O : oui ; N : non)
Acide acétique	1:99	0,1	N
Ethanol	1:0	0,1	N
	1:1	0,1	O
	3:1	0,1	O
	3,5:1	0,05	N
	4:1	0,05	N
Méthanol	1:0	0,1	N
	1:4	0,1	N
	3:1	0,1	N
	1:1	0,1	N
	1:3	0,1	N
Acétone	1:0	0,1	N
	3:5	0,5	N
	4:5	0,5	O
Acétonitrile	1:0	0,1	N
	1:1	5	N
		3,4	N
		3	N
		2	N
		1	N
		0,75	N
		0,5	N
		0,25	N
		0,1	N
		0,05	O
	3:5	0,1	N
		0,25	N
		0,5	N
	4:5	0,1	N
		0,25	N
		0,5	N
	6:5	0,1	N
		0,25	N
		0,5	N
	7:5	0,1	N
		0,25	N
		0,5	N
Tétrahydrofurane	1:0	0,1	N
Diméthylsulfoxyde	1:0	0,1	N
Chloroforme	1:0	0,1	N
Ether de pétrole	1:0	0,1	N
Ether diéthylique	1:0	0,1	N

Diméthylacétamide	3:5	0,5	N
	4:5	0,5	O
	1:1	0,5	O
		5	O
	6:5	0,5	O
	7:5	0,5	O
Huile de paraffine	1:0	Inconnue	O

Annexe 6 : Thermogramme obtenu par DSC modulée sur un culot de GACD resuspendu dans de l'eau ultra pure à 25°C et centrifugé



Auto-assemblage de la gomme d'Acacia fonctionnalisée par voie enzymatique

L'apparition de l'ordre à partir du désordre nous a toujours fasciné et notamment les auto-assemblages. En effet, ils permettent de former spontanément des particules en suspension (particules colloïdales) sans apport d'énergie. La plupart des études cherchant à induire un auto-assemblage se basent sur des techniques chimiques, faisant souvent appel à des solvants organiques ou des composés toxiques. Ici, dans un souci de se diriger vers une chimie plus verte, la gomme d'Acacia, une agro-ressource naturelle, a été modifiée en milieu aqueux par l'intermédiaire de l'oxydation enzymatique de la curcumine.

Les produits d'oxydations ont alors formé des liaisons esters avec la gomme d'Acacia. Seul deux fractions de la gomme native ont été modifiées (arabinogalactan peptide et arabinogalactane protéine) – induisant surement un cross linking entre les fractions. Les produits d'oxydation étant hydrophobes ont modifié le comportement de la gomme en la rendant moins hydrophile et moins hygroscopique. Ainsi en milieu aqueux, à des concentrations ou la gomme d'Acacia native est soluble, la gomme d'Acacia modifiée forme des particules sphériques monodispersées. La concentration critique d'agrégation de ces assemblages a été définie grâce à l'usages de diverses méthodes permettant par la même occasion la définition d'autres paramètres tels que les paramètres thermodynamiques et l'affinité entre les différentes sous unités formant les particules. Ensuite, il a été question d'étudier l'influence des paramètres physicochimiques sur la formation des particules grâce à un plan d'expérience. En effet, les assemblages se forment grâce aux liaisons faibles entre les sous unités de gomme d'Acacia modifiée et ces interactions sont directement dépendantes du milieu environnement.

Mots Clef : Auto-assemblage, gomme d'Acacia, curcumine, laccase, modification enzymatique, concentration critique d'agrégation, interactions, plans d'expérience

Self-assembly of Acacia gum functionalized by enzymatic way

The appearance of order from disorder has always fascinated us, especially self-assemblies. Indeed, they allow the spontaneous formation of particles in suspension (colloidal particles) without any energy input. Most studies seeking to induce self-assembly are based on chemical techniques, often using organic solvents or toxic compounds. Here, in an effort to move toward greener chemistry, Acacia gum, a natural agro-resource, was modified in aqueous media via enzymatic oxidation of curcumin.

The oxidation products then formed ester bonds with the Acacia gum. Only two fractions of the native gum were modified (arabinogalactan peptide and arabinogalactan protein) - probably inducing a cross linking between the fractions. The oxidation products being hydrophobic have modified the behavior of the gum by making it less hydrophilic and less hygroscopic. Thus in aqueous medium, at concentrations where native Acacia gum is soluble, modified Acacia gum forms monodisperse spherical particles. The critical aggregation concentration of these assemblies was defined by using various methods allowing at the same time the definition of other parameters such as thermodynamic parameters and affinity between the different sub-units forming the particles. Then, it was a question of studying the influence of the physicochemical parameters on the formation of the particles thanks to an experimental plan. Indeed, the assemblies are formed thanks to the weak bonds between the sub-units of modified Acacia gum and these interactions are directly dependent on the environment.

Key words: Self-assembly, Acacia gum, curcumin, laccase, enzymatic modification, critical aggregation concentration, interactions, experimental designs