

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	4
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	9
CHAPITRE I LES EMULSIONS : DE LEUR FORMULATION A LEUR STABILITE	13
<i>I.1 Introduction aux émulsions : des fluides complexes instables</i>	<i>14</i>
I.1.1 Paramètres influençant l'organisation structurale et la stabilité des émulsions	14
I.1.1.1 Les interactions entre particules dispersées	14
I.1.1.2 Techniques d'émulsification et taille des gouttelettes	18
I.1.1.3 Organisation structurale des émulsions	22
I.1.2 Démixtion et stabilité d'un produit cosmétique	24
I.1.2.1 Migration réversible de la phase dispersée : sédimentation ou crémage et floculation	25
I.1.2.2 Migration irréversible de la phase dispersée : coalescence et murissement d'Ostwald	26
I.1.2.3 Stabilisation par les tensioactifs	27
I.1.3 Formulation : influence de la composition	29
I.1.4 Les grandeurs mesurables liées à la stabilité	31
<i>I.2 Relation entre la stabilité et les propriétés rhéologiques des émulsions</i>	<i>33</i>
I.2.1 Caractérisation viscoélastique des émulsions	34
I.2.2 Impact de la composition des émulsions sur les propriétés d'écoulement	38
I.2.3 Lien entre la stabilité et les propriétés dynamiques	41
<i>I.3 Suivi et contrôle de la prolifération des micro-organismes en milieux complexes</i>	<i>43</i>
I.3.1 Les émulsions, milieux de culture pour les micro-organismes	43
I.3.2 Détecter et limiter la croissance des micro-organismes	48
I.3.2.1 La conservation des produits cosmétiques et la détection des micro-organismes	48
I.3.2.2 Méthodes alternatives permettant de limiter le développement de micro-organismes	50
I.3.3 Prolifération des micro-organismes en milieux complexes	54
<i>I.4 Conclusion</i>	<i>58</i>
CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES	61
<i>II.1 Formulation des émulsions</i>	<i>61</i>
II.1.1 Choix des matières premières	62
II.1.1.1 L'eau	62
II.1.1.2 Le gélifiant : les polymères et copolymères d'acide acryliques	62
II.1.1.3 L'huile : le palmitate d'isopropyle	64
II.1.1.4 Les tensioactifs	65
II.1.2 Détermination des proportions par le calcul du HLB et optimisation de la formule	66
II.1.3 Protocole de formulation et émulsion de référence	67
II.1.4 Suivi organoleptique de la stabilité : stockage et vieillissement	68
<i>II.2 Caractérisation multi-échelles des émulsions</i>	<i>70</i>
II.2.1 Techniques de caractérisation classiques utilisées pour l'étude	70
II.2.2 Rhéologie macroscopique (basse fréquence 1 Hz)	72
II.2.3 Microrhéologie (rhéologie ultrasonore ou haute fréquence)	74

II.3	<i>Incorporation et dénombrement des micro-organismes</i>	77
II.3.1	Préparation.....	77
II.3.2	Choix de la souche bactérienne : <i>Pseudomonas fluorescens</i>	77
II.3.3	Contamination forcée des émulsions et suivi	78
II.3.4	Méthode de dénombrement.....	80
CHAPITRE III ETUDE MULTI-ECHELLE DE LA STRUCTURE DES EMULSIONS.....		83
III.1	<i>Grandeurs choisies et critères d'analyse des émulsions</i>	84
III.1.1	Grandeurs d'influences retenues dans l'étude	84
III.1.2	Choix de l'émulsion de référence.....	85
III.2	<i>Etude de la stabilité et de répétabilité par la microrhéologie de l'émulsion de référence</i>	87
III.3	<i>Etude de la structuration des émulsions a différentes échelles</i>	91
III.3.1	Changement de la structure des émulsions par modification de la phase dispersée.....	91
III.3.2	Observation de la structure par microscopie optique.....	94
III.3.2.1	Effets de la variation du pourcentage en huile sur la structuration	94
III.3.2.2	Effets de la variation du pourcentage en émulsifiant sur la structuration.....	95
III.3.3	Validation des propriétés rhéologiques macroscopique des émulsions	97
III.3.3.1	Etude de l'impact de la concentration en huile IPP sur les propriétés rhéologiques macroscopiques.....	97
III.3.3.2	Etude de l'impact de la quantité d'émulsifiants sur les propriétés rhéologiques macroscopiques.....	104
III.3.4	Détermination des caractéristiques viscoélastiques multi-échelles en lien avec la structuration des émulsions	107
III.3.4.1	Effets de la concentration en huile	107
III.3.4.2	Effet de la concentration en émulsifiants	109
III.4	<i>Conclusion</i>	111
CHAPITRE IV UN DEBOUCHE PROMETTEUR : INFLUENCE DE LA PSEUDOMONAS FLUORESCENS SUR LA STRUCTURE D'EMULSIONS		113
IV.1	<i>Travail en conditions stériles : impact de l'autoclave sur les émulsions</i>	113
IV.1.1	Stérilisation par autoclave de l'émulsion de référence.....	114
IV.1.2	Influence de l'autoclavage sur la stabilité de formules cosmétiques	117
IV.1.2.1	Modification du taux de gélifiant.....	117
IV.1.2.2	Modification de la concentration en huile.....	119
IV.1.2.3	Modification de la nature de l'émulsifiant	121
IV.2	<i>Suivi de Croissance de Pseudomonas fluorescens dans l'émulsion de référence par la méthode de dénombrement</i>	123
IV.3	<i>Etude de l'impact des micro-organismes sur la structuration par un suivi microrhéologique</i> 126	
IV.3.1	Suivi des propriétés viscoélastiques de l'émulsion de référence.....	126
IV.3.2	Suivi des émulsions avec le capteur vertical	130
IV.3.3	Suivi d'une émulsion ayant un réseau de gélifiant plus dense avec le capteur vertical	134
IV.4	<i>Conclusion et discussion</i>	138

CONCLUSION GENERALE.....	141
BIBLIOGRAPHIE.....	147
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	159
COMMUNICATIONS	163
Publications.....	163
Communications orales.....	163
Communications par affiches.....	164
Communications vulgarisées.....	164
MISSIONS D'ENSEIGNEMENT.....	166



LISTE DES ABREVIATIONS

a_w : activity of water (activité de l'eau)

Brij : BrijTM S2 (émulsifiant cosmétique, INCI : steareth-2)

CND : contrôle non destructif

D.E.F.I. : device for exclusive formula integrity (dispositif exclusif de formule intacte soit un dispositif de fermeture d'emballage pour assurer la stérilité du produit cosmétique)

DLS : dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)

DLVE : domaine linéaire viscoélastique

E. coli : souche bactérienne d'*Escherichia coli*

E/H : (émulsion) eau dans huile

GMS : monostéarate de glycerol (INCI : glyceryl monostearate)

HLB : hydrophilic-lipophilic balance (équilibre hydrophile-lipophile)

H/E : (émulsion) huile dans eau

HF : haute fréquence

HHP : homogénéisation haute pression

INCI : international nomenclature of cosmetics ingredients (nomenclature international des ingrédients cosmétiques)

IPP : palmitate d'isopropyle (INCI : isopropyl palmitate)

P. fluo 76A : souche bactérienne de *Pseudomonas fluorescens* MFAF76A

P80 : polysorbate 80 (Eumulgin SMO 20 ; INCI : polysorbate 80)

PIT : phase inversion temperature (température d'inversion de phase)

PSM : poste de sécurité microbiologique

TSA : tryptic soy agar (milieu de culture bactérien solide)

TSB : tryptic soy broth (milieu de culture bactérien liquide)

UHT : ultra haute température (processus de stérilisation)

UV : ultraviolet

TSM : thickness shear mode (mode de cisaillement)

UFC : unité formant colonie (CFU : colony forming unit)

INTRODUCTION

Les produits cosmétiques actuellement mis sur le marché se développent dans un contexte socio-économique pour lequel l'avis du consommateur joue un rôle clé. Outre les innovations technologiques, qui permettent de rester concurrentiel, et l'évolution des tests d'efficacité de plus en plus performants, qui répondent aux exigences réglementaires [1], l'influence des médias et leurs répercussions sur le marketing créent de nouveaux comportements chez les consommateurs. Les scandales médiatiques liés à l'emploi des parabènes ou encore à celui des silicones par exemple, conduisent les consommateurs à faire la chasse aux produits synthétiques et aux conservateurs, et alimentent ainsi la grande tendance du naturel et des produits biologiques.

Dans ce contexte, les émulsions cosmétiques - systèmes composés de deux fluides non miscibles et stabilisés par des molécules amphiphiles (émulsifiants) - sont particulièrement intéressantes par l'apparence qu'elles peuvent prendre (crèmes, pommades, fonds de teint, etc.) et leur caractère malléable. Ces fluides complexes sont de ce fait très largement répandus dans l'industrie cosmétique et représentent plus de 50 % des parts du marché mondial. Pour qu'elles soient industriellement réalisables et qu'elles répondent au cahier des charges des consommateurs, les émulsions renvoient à des questions relatives à leurs préparations (procédés d'émulsification), à leurs propriétés intrinsèques (physico-chimiques et sensorielles) et à leurs mécanismes d'altération (stabilité) et donc de conservation. Les réponses à toutes ces questions supposent une compréhension et une maîtrise des procédés de formulations de plus en plus pointues en adéquation avec les exigences nouvelles imposées par la législation.

La recherche du domaine de stabilité des émulsions constitue un enjeu majeur, puisqu'il conditionne la conservation et le mode d'utilisation de ces produits après leur fabrication. Cette stabilité dépend de la composition chimique des émulsions, mais également de facteurs physiques et environnementaux tels que la température, les rayonnements UV, l'hygrométrie, etc., qui sont des paramètres associés à des grandeurs mesurables [2]. De plus, il s'avère que ces paramètres peuvent induire des conditions favorables au développement de micro-organismes présents dans l'environnement immédiat des émulsions et pouvant les contaminer lors de leur fabrication ou de leur utilisation et nuisant

ainsi à leur conservation. Or d'un point de vue sanitaire, il est établi que les produits cosmétiques ne doivent pas représenter un risque pour la santé des consommateurs. Ainsi, leur mise sur le marché nécessite des tests toxicologiques et l'utilisation de conservateurs pour limiter les contaminations microbiologiques. Pour l'heure, les outils classiquement utilisés pour l'étude des émulsions [3]–[5] permettent d'accéder, pour des échelles d'observation différentes, aux propriétés physiques (rhéologie, potentiel zêta, granulométrie, etc.), chimiques (pH, conductimétrie, etc.) et structurales (microscopies, etc.). Pourtant même si ces matériaux sont généralement bien caractérisés d'un point de vue macroscopique (textural, organoleptique, mécanique et électrique) et à l'échelle moléculaire (composition élémentaire), le lien avec les échelles d'investigation intermédiaire microscopique et mésoscopique n'est pas trivial et le manque d'homogénéité des techniques utilisées dans les différents laboratoires ne permet pas d'établir un lien discursif entre les échelles d'études et les grandeurs mesurées associées.

Par conséquent, de nouveaux outils d'investigations deviennent nécessaires et sont d'autant plus perfectionnés que les processus d'élaboration d'émulsions deviennent complexes et innovants. En effet, l'incorporation de nouveaux actifs, mettant en jeu des interactions physico-chimiques et biologiques complexes, implique le développement ou la création de ces nouveaux outils. Ils doivent permettre d'une part de caractériser finement l'évolution des structures analysées, et d'autre part de favoriser l'innovation. Ils doivent également permettre d'optimiser la stabilité des formulations, y compris vis-à-vis de la contamination microbienne. C'est sans doute la combinaison de ces différents outils à travers l'analyse multi-échelle et multi-modale des émulsions cosmétiques qui est à considérer pour l'obtention de résultats pertinents.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portent sur l'étude des caractéristiques structurales à différentes échelles de mesure d'émulsions cosmétiques et de leurs impacts sur la prolifération bactérienne. Ces travaux tentent de répondre à deux problématiques : 1/ peut-on corréler l'organisation et les modifications structurales d'une émulsion à sa composition et à son domaine de stabilité ? 2/ existe-t-il un lien entre l'organisation structurale d'une émulsion et le développement bactérien qui peut se faire en son sein ?

Pour pouvoir apporter des éléments de réponse aux problématiques exprimées plus haut, il convient de les préciser davantage et celles-ci soulèvent les questions suivantes :

1/ le suivi multi-échelle et notamment le suivi des propriétés mécaniques via différents outils rhéologiques permet-il de prévoir la zone de stabilité d'une formulation cosmétique ? 2/ l'analyse des propriétés mécaniques d'une émulsion cosmétique permettent-elles la détection et le suivi d'une contamination biologique ? 3/ la connaissance fine de la structuration d'une émulsion cosmétique et des modifications judicieuses peuvent-elles limiter cette contamination ? 4/ quelles modifications de la structuration d'une émulsion pourraient limiter l'utilisation des conservateurs de plus en plus controversés ?

La compréhension de l'organisation structurale à l'échelle microscopique et mésoscopique d'une émulsion cosmétique pourrait représenter une première piste pour le développement d'émulsions qui soient à la fois stables physiquement et possédant des propriétés biostatiques.

Le présent manuscrit se divise en quatre chapitres.

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique. Les produits cosmétiques et en particulier les émulsions y sont présentés. Une attention particulière est portée sur les paramètres influençant la structuration et la stabilité des émulsions afin de déclinier les corrélations possibles entre les propriétés rhéologiques et la stabilité des émulsions.

Le deuxième chapitre développe les méthodes et techniques utilisées pour la réalisation des travaux présentés ici. Il se divise en trois parties distinctes : la première décrit les procédés de formulation utilisés pour toutes les émulsions analysées ; la deuxième présente les méthodes utilisées pour la caractérisation multi-échelle (cette partie permet d'introduire la technique innovante de microrhéologie) ; enfin, la dernière partie expose les protocoles liés à la microbiologie.

Les troisième et quatrième chapitres sont consacrés aux résultats obtenus au cours de cette thèse : ils décrivent les différentes étapes de mes travaux de recherche menés, respectivement, sur les données structurales obtenues pour des émulsions contrôlées de compositions variables et les suivis microbiologiques.

Ce manuscrit se conclut par une mise en perspective des résultats obtenus permettant de mettre en évidence l'importance d'une approche multi-échelle pour la caractérisation des

émulsions cosmétiques et comme piste d'amélioration et d'optimisation des procédés de formulation en cosmétique.

L'ensemble des travaux présentés ont été réalisés au sein du laboratoire SATIE (systèmes et applications des technologies de l'information et de l'énergie ; UMR 8029) sur les sites de l'université de Cergy-Pontoise. Pour certaines expériences, des collaborations ont été nécessaires notamment avec le LMSM (Laboratoire de microbiologie, signaux et microenvironnement ; EA4312) à Rouen et la société GALDERMA à Nice.

Chapitre I LES EMULSIONS : DE LEUR FORMULATION A LEUR STABILITE

Les émulsions sont des systèmes dispersés métastables¹ constitués d'au moins deux fluides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre, et d'au moins une molécule amphiphile. On distingue donc une phase dite dispersée, le plus souvent minoritaire en terme de volume, contenue dans une phase dite continue, le plus souvent majoritaire. La non miscibilité des deux phases impose, par répulsions d'origine électrique et stérique, la formation de gouttes - obtenues après mélange par une action mécanique - dont l'énergie interfaciale (à l'interface des deux fluides) a un niveau élevé qui tend à évoluer vers un niveau le plus faible possible : il s'agit des processus de démixtion. D'un point de vue thermodynamique, une émulsion est donc instable même si en pratique, les émulsions commercialisées ont une stabilité cinétique qui peut atteindre plusieurs années. Ce sont généralement des émulsions huile dans eau (H/E), qui correspondent à la dispersion d'une phase huileuse dans une phase aqueuse continue, et dans une moindre mesure des émulsions eau dans huile (E/H) où une phase aqueuse est dispersée dans une phase huileuse continue.

Cette base de fluides complexes est très largement utilisée dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques pour obtenir des crèmes, des pommades ou des lotions (plus liquides). On les retrouve aussi dans les produits de notre quotidien comme par exemple en agroalimentaire (lait, beurre, vinaigrette, mayonnaise, etc.) et dans les produits pétrochimiques ; dans ce cas il s'agit plutôt d'émulsions E/H (émulsions pétrolières, etc.).

Ce chapitre de contexte rappelle de manière synthétique les mécanismes qui caractérisent les émulsions et les éléments physico-chimiques et biologiques qui contribuent à leur stabilité. Au cours du vingtième siècle, la formulation des émulsions, représentées par des systèmes eau/huile/tensioactif, a suscité de nombreuses études. Bancroft, en 1913, énonce une règle empirique selon laquelle la phase continue de l'émulsion est celle dans laquelle le tensioactif est le plus soluble. En 1949, Griffin propose la notion de HLB (cf.

¹ Les émulsions sont des systèmes dont la vitesse de transformation (dégradation) est tellement faible qu'ils ont l'apparence de la stabilité (définition du crntl). D'un point de vue énergétique, l'état métastable peut être assimilé à un minimum local d'énergie.

paragraphe I.1.2.3) qui permet de quantifier l'affinité du tensioactif pour les phases aqueuses et huileuses. Un autre concept de formulation introduit dans les années 80, est celui de la température d'inversion de phase ou PIT pour « phase inversion temperature ». Elle correspond à la température à laquelle se produit l'inversion d'une émulsion formulée avec un tensioactif non ionique. Tous ces concepts de formulations révèlent l'influence majeure des modifications de composition, de température ou de temps d'émulsification sur la stabilité d'un produit [2]. Dans cette partie, l'influence de la composition ainsi que celle du procédé d'émulsification dans le cadre d'émulsions simples H/E est développée.

I.1 INTRODUCTION AUX EMULSIONS : DES FLUIDES COMPLEXES INSTABLES

I.1.1 Paramètres influençant l'organisation structurale et la stabilité des émulsions

Dans le cas le plus simple d'une crème cosmétique, il faut associer deux composés non miscibles pour réaliser une émulsion H/E : d'une part une phase huileuse (notée H), généralement composée d'huiles végétales ou synthétiques, de beurres ou de cires et d'autre part une phase polaire (notée E), correspondant à une solution aqueuse plus ou moins complexe contenant des polymères, des sels et des actifs (de nature glucidique, protéique, etc.), et dans laquelle des équilibres chimiques (acido-basiques par exemple) sont possibles. L'émulsion la plus rudimentaire correspond au minimum à un mélange de l'huile (fluide minoritaire) dans de l'eau (noté H/E).

À l'interface entre les deux liquides, l'absence de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques est responsable de la non miscibilité [6]. Cette interface se distingue donc par une énergie interfaciale (en $J.m^{-2}$), autrement désignée sous le terme de tension interfaciale élevée (en $N.m^{-1}$). Pour abaisser cette tension et rendre possible les interactions intermoléculaires entre les deux liquides, l'ajout de molécules amphiphiles est nécessaire. Il s'agit de molécules tensioactives qualifiées d'émulsionnantes.

I.1.1.1 Les interactions entre particules dispersées

Dans le cas d'une émulsion simple diluée H/E, nous distinguons deux phases liquides. Au sein de ce mélange, des interactions sont possibles entre particules au sein d'une même phase et entre les deux phases. Dans la phase continue aqueuse contenant des composés le

plus souvent chargés (polymères, sels, etc.), les interactions électrostatiques (existantes entre molécules polaires et chargées) et liaisons hydrogènes sont prédominantes. Dans la phase huileuse (ici dispersée sous forme de gouttes), dominant principalement des interactions attractives de type Van der Waals entre les atomes des molécules d'huiles contenues dans les gouttelettes. Ces gouttelettes huileuses sont recouvertes de molécules amphiphiles (émulsifiants, polymères, etc.) ne présentant pas de charges et de polarité du côté huileux, mais étant polaires pouvant être chargées à l'interface avec l'eau. Ces molécules adsorbées à la surface des gouttelettes représentent une barrière stérique qui, associée aux interactions longues distances possibles entre les gouttelettes du fait des charges électriques externes, participe au maintien de celles-ci à l'état dispersé et à la diminution de la tension interfaciale. Les structures internes des émulsions et leurs évolutions sont donc fortement déterminées par les forces existantes entre particules dispersées. Les deux phases sont maintenues dans un état d'équilibre grâce à la superposition de différents types de forces à l'interface via la présence de tensioactifs.

D'une part, on distingue les interactions attractives² de Van der Waals qui, avec les mouvements browniens, sont à l'origine de la floculation des particules. L'attraction entre particules dispersées dans un solvant résulte en fait des interactions des nombreuses molécules constituant ces particules avec la phase continue. Elle possède généralement une portée effective de quelques dizaines de nanomètres³. Les interactions de Van der Waals regroupent les interactions intermoléculaires dipolaires de faible intensité (Debye, Keesom et London) qui rend-compte de la dissymétrie de répartition des charges électriques (positives et négatives) de molécules ou de particules polaires, de par sa structure chimique (dipôle permanent) ou de par son environnement proche (dipôle induits).

D'autre part, interviennent également des interactions répulsives (électrostatiques) qui à l'inverse empêchent une agrégation totale de l'ensemble des particules les unes aux autres. Ces interactions électrostatiques sont en effet des forces coulombiennes répulsives entre particules chargées de même signe. Cette répulsion est d'autant plus grande que les particules sont proches. Elles permettent ainsi l'obtention de suspensions cinétiquement stables.

² Interactions, le plus souvent intermoléculaires/interparticulaires de faible énergie au regard d'une liaison covalente.

³ Pour les interactions de Van der Waals, les forces d'interaction diminuent en $1/r^7$, r étant la distance entre les deux particules considérées. Pour les interactions électrostatiques, les forces d'interaction diminuent en $1/r^2$, elles décroissent donc moins vite avec la distance.

Le potentiel d'interaction entre les particules colloïdales tient compte des interactions à la fois de Van der Waals et électrostatiques. Les chercheurs Derjaguin et Landau (1941), puis Verwey et Overbeek (1948), ont calculé ce potentiel d'interaction dans le cadre du modèle DLVO (défini d'après les noms de ses concepteurs) [7]. Selon ce modèle, les répulsions électrostatiques engendrent une barrière d'énergie susceptible d'empêcher les colloïdes de se rapprocher à une distance où les interactions attractives de Van der Waals dominent. La Figure I.1-1A, illustre en trait plein le bilan type des forces impliquées entre deux particules quelconques en interaction. La partie positive de l'axe des ordonnées correspond aux forces de répulsion, tandis que la partie négative correspond aux forces d'attraction des particules et l'axe des abscisses indique la distance entre les deux particules considérées [8]. Les courbes en pointillés rendent compte des interactions électrostatiques et de Van der Waals.

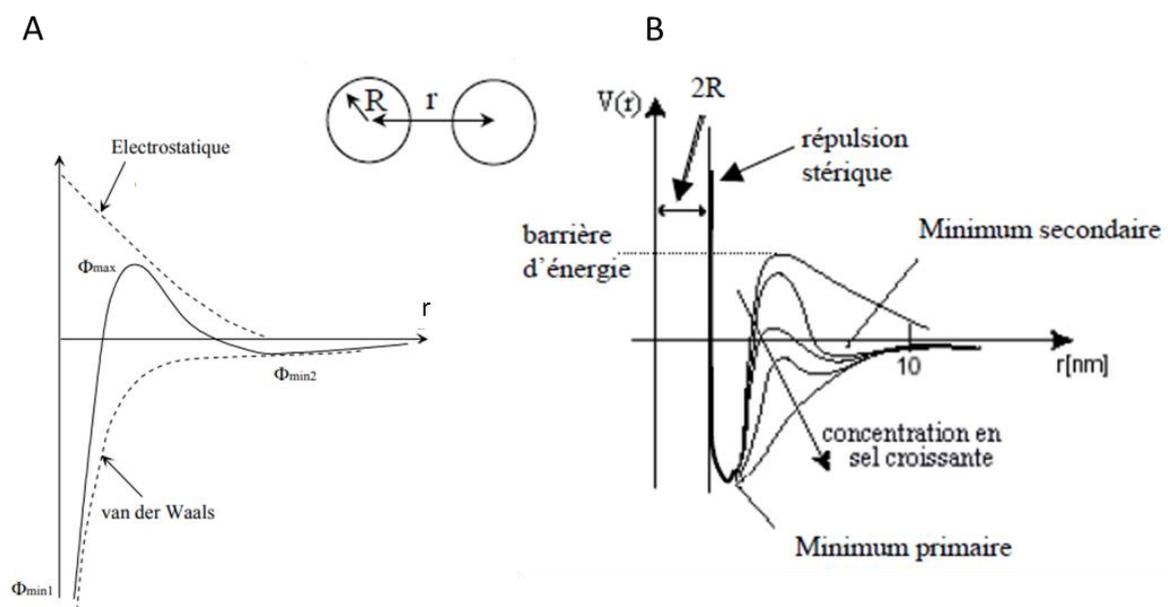


Figure I.1-1. Potentiels d'interaction DLVO : (A) pour deux particules en interactions et (B) pour différentes concentrations salines (R : rayon de la goutte et r : distance entre les gouttes) [9].

Dans le cas de grandes distances de séparation, les interactions électrostatiques décroissent plus rapidement que celles de Van der Waals : ce sont donc les forces d'attraction qui dominent avec la présence d'un minimum dans le bilan énergétique. La Figure I.1-1B met en évidence l'influence de la concentration de charge (via la présence de sels) sur le profil énergétique. Quand la salinité augmente, la portée des forces de répulsion

diminue, il en va de même du maximum énergétique, noté barrière d'énergie. Pour de très fortes forces ioniques, le potentiel d'interaction est dominé par les forces d'attraction de Van der Waals, et dans ce cas, la coagulation (floculation) des particules est rapide. Cette figure, montre ainsi l'influence du pH et de la force ionique sur les interactions entre particules. Ces interactions peuvent aussi être modifiées en faisant varier la concentration ou le type de stabilisant qui adhèrent et influencent l'état de charge de la surface des particules dispersées [10].

Cette théorie s'applique généralement aux émulsions contenant des tensioactifs chargés, ou ayant subi des modifications par l'adsorption de polymères ou d'autres molécules polaires. Par exemple, par l'adsorption de protéines, il est possible de modifier les propriétés électriques de la phase dispersée et de former par hétéroagrégation [11], [12], des arrangements de gouttelettes originaux dans des émulsions (figure ci-après).

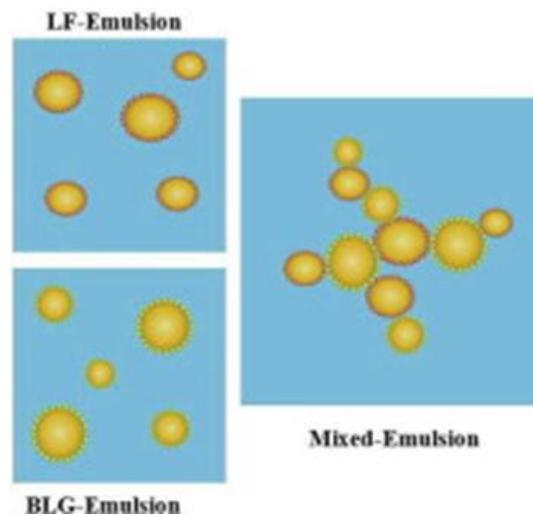


Figure I.1-2. Formation d'une émulsion mixte contenant des gouttelettes lipidiques dont la surface est différemment chargée suite à l'adsorption de lactoferrine (LF), chargée positivement, et de β -Lactoglobuline (BLG), chargée négativement, à pH 6 [11].

En 2007, Leunissen et son équipe ont étudié l'importance de la polarité de la phase aqueuse et de ses propriétés électrostatiques sur le contrôle et l'organisation de la phase dispersée. Ils mettent en évidence la formation d'une asymétrie ionique influant directement sur les interactions électrostatiques et de Van der Waals se faisant à l'interface entre un milieu polaire (phase aqueuse) et un milieu non polaire (phase huileuse) [13], [14].

I.1.1.2 Techniques d'émulsification et taille des gouttelettes

Le système eau-huile thermodynamiquement le plus stable (c'est-à-dire ayant le niveau d'énergie interfaciale le plus bas) correspond à un système ayant la surface de contact la plus réduite possible entre les deux liquides. Naturellement en présence d'huile et d'eau, ces deux fluides se séparent totalement pour ne former qu'une seule interface huile-eau, conduisant alors à une démixtion totale. La formation d'une émulsion nécessite par conséquent un apport énergétique permettant la formation de la phase dispersée sous forme de gouttelettes. L'énergie nécessaire à cette étape d'émulsification peut être apportée au système considéré de différentes manières.

Il est nécessaire d'apporter par agitation mécanique une énergie favorisant la formation des gouttelettes dispersées. En effet, il est tout à fait possible de réaliser une émulsion à température ambiante. Cependant, un apport d'énergie thermique permettant la liquéfaction des composés constituant une émulsion constitue un complément (cet apport thermique reste insuffisant pour former une émulsion). Le cisaillement de ce mélange complexe favorise en fait la rupture de la phase dispersée en gouttelettes de plus en plus fines. Et leur taille est d'autant plus petite que le taux de cisaillement (c'est-à-dire la vitesse de cisaillement) est grand. Certains outils à fort taux de cisaillement tels que les homogénéiseurs permettent une réduction importante de la taille des gouttelettes en forçant la phase dispersée à passer au travers d'une zone confinée où elle est soumise à un fort gradient de vitesse. Il existe cependant d'autres techniques telles que les procédés ultrasonores (par cavitation) [15], ou à membranes (par cisaillement) [16], ou encore l'homogénéisation haute pression [17]. Toutes ces techniques concourent à l'obtention d'un panel d'émulsions plus ou moins stables présentant des tailles de gouttelettes variables et contrôlables, dans une certaine mesure toutefois.

Parmi tous les procédés d'émulsification existants, la production d'émulsion par homogénéisation mécanique est la plus courante. Les homogénéiseurs permettent de formuler des émulsions dont les gouttelettes ont des diamètres de l'ordre de quelques micromètres [18], grâce à leurs géométries complexes du type « rotor-stator », produisant un fort taux de cisaillement. Ainsi, la taille moyenne des gouttes formées à une vitesse

donnée, diminue avec le temps et se stabilise au-delà d'une durée optimale. En effet, dans les premières secondes d'agitation, le diamètre moyen décroît très rapidement jusqu'à atteindre une taille qui résulte d'un équilibre entre les processus de rupture de gouttelettes et de coalescence. Néanmoins, pour les émulsions concentrées en phase dispersée, l'augmentation de la durée de l'agitation peut provoquer l'apparition d'une polydispersité de taille des gouttelettes importante. Elle s'explique par l'augmentation de la viscoélasticité progressive du milieu avec la diminution de la taille des gouttes. Le terme d'émulsion classique ou encore de macroémulsion fait référence aux formules obtenues généralement par ce procédé. Ces macroémulsions sont généralement opaques et la morphologie de la phase dispersée peut être observée par microscopie optique.

D'autres méthodes d'émulsification ont été développées au cours de ses dernières années dans l'objectif de produire des émulsions plus fines et plus stables, telles que les nanoémulsions. Les nanoémulsions, autrement appelées miniémulsions, nécessitent un cisaillement plus intense lors de leur formulation et se caractérisent par des tailles de gouttes de l'ordre d'une centaine de nanomètres de diamètre (~100 nm) [19]. Les procédés mécaniques permettant d'aboutir à ces nanoémulsions nécessitent une production élevée d'énergie, généralement obtenue par des homogénéiseurs à haute pression ou des générateurs d'ultrasons. L'utilisation d'ondes ultrasonores (16 kHz et 1 MHz) produit des bulles de cavitation qui vont casser les gouttelettes conduisant à une réduction progressive du diamètre moyen de celles-ci dans les émulsions. C'est une méthode viable pour la production de nanoémulsions transparentes ayant des gouttelettes jusqu'à 40 nm de diamètre [22]. D'un point de vue macroscopique, ces nanoémulsions sont généralement d'un aspect opalescent blanc-bleuté, voire transparent à l'œil nu.

L'utilisation des ultrasons présente des avantages : une granulométrie plus petite, une meilleure efficacité du tensioactif grâce à l'absence de perte par moussage et la possibilité de disperser une fraction volumique d'huile plus élevée [20]. Cependant, elle présente l'inconvénient que la sonde (sonotrode) produit des particules métalliques qui se détachent pendant l'application des ultrasons (cet effet peut s'accompagner d'un dégagement de chaleur localisé incontrôlé suivant la puissance appliquée). La Figure I.1-3 met en évidence l'organisation interne variable d'une émulsion en fonction de la technique d'émulsification et montre que l'émulsification par ultrasons permet une réduction de la taille des gouttes par

rapport à l'utilisation d'un homogénéiseur classique. Le principal inconvénient à l'emploi des ultrasons est que cette technique est productrice de chaleur. De plus, elle n'est éprouvée qu'à l'échelle du laboratoire ; la recherche fondamentale sur les mécanismes et les principaux facteurs influençant la perturbation des gouttelettes ainsi que les problèmes de mise à l'échelle sont encore à l'étude.

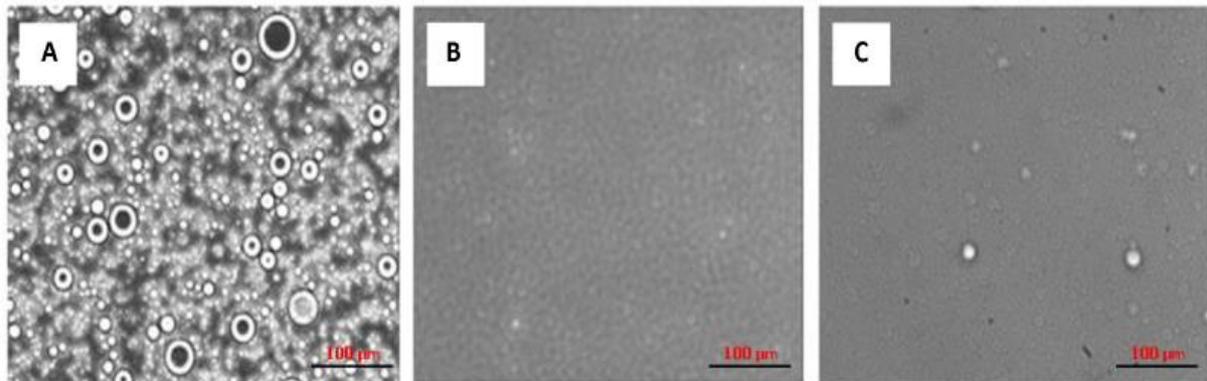


Figure 1.1-3. Images de microscopie optique ($\times 200$) d'émulsions simples H/E obtenues par trois méthodes différentes d'émulsification et après deux semaines de stockage. A : agitation magnétique ; B : homogénéiseur ; C : ultrasons [21].

L'homogénéisation haute pression, quant à elle, fonctionne selon le principe de la pompe à piston qui consiste à faire passer une préémulsion (émulsion grossière formée en amont) très fortement comprimée par un orifice de très petite dimension. Ainsi, à la sortie du dispositif, la détente subite engendre un phénomène de cavitation provoquant l'éclatement des gouttes par l'implosion de microbulles de gaz. La pression d'homogénéisation est généralement comprise entre 5 et 50 MPa. En utilisant des dispositifs introduits plus récemment, comme par exemple les microfluidiseurs et les disperseurs à jet, il est possible de produire des émulsions à des pressions beaucoup plus fortes pouvant atteindre 700 MPa [22], [23]. En 2011, l'équipe de Qian [17] a montré que le diamètre moyen des particules diminuait avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation et le nombre de passages réalisés, selon une relation linéaire (en représentation log-log) liant le diamètre moyen des particules à la pression d'homogénéisation. Le diamètre minimal des gouttelettes dépend également fortement du type et de la concentration de l'émulsifiant. La taille minimale atteinte par les gouttelettes diminuait lorsque le rapport des viscosités des phases dispersée et continue diminuait pour des émulsions stabilisées au dodécylsulfate de sodium

(SDS, détergent tensioactif ionique fort), mais était relativement indépendante pour des émulsions stabilisées avec de la β -lactoglobuline (protéine de lait) [17]. Cependant, en dépit des émulsions fines et stables obtenues par cette méthode, l'homogénéisation haute pression implique un coût énergétique élevé.

Des émulsions submicroniques ($100 \text{ nm} < \varnothing < 1 \text{ }\mu\text{m}$) peuvent également être obtenues en jouant sur les propriétés physico-chimiques des systèmes, grâce à des procédés d'émulsification à basse énergie (agitation mécanique modérée $< 1000 \text{ rpm}$). Ces méthodes reposent sur la modification de la courbure spontanée des gouttes dispersées par l'ajout d'un tensioactif dans les émulsions H/E. Ceci est le cas pour les tensioactifs non ioniques, pour lesquels l'élévation de la température jusqu'à la PIT (température d'inversion de phase) entraîne un changement d'affinité de l'émulsifiant pour les phases aqueuse et huileuse (la PIT des tensioactifs non ioniques est corrélée à leur HLB, cf. paragraphe I.1.2.3). Il y a alors transition d'une émulsion H/E à basse température vers une émulsion E/H à des températures plus élevées. Pendant le refroidissement, l'interface phase continue/phase dispersée passe spontanément par un point de courbure nul et une tension interfaciale minimale, favorisant la formation de gouttelettes d'huile finement dispersées [24]. Ainsi, par chauffage d'une émulsion H/E assez grossière, on obtient une émulsion E/H qui, par refroidissement, conduit sous agitation mécanique modérée à une émulsion opalescente voire bleutée, stable vis-à-vis de la sédimentation en raison de la finesse des gouttelettes (diamètre moyen $\sim 120 \text{ nm}$) qu'elle contient.

Enfin l'émulsification par membrane est un procédé de faible énergie, qui permet l'obtention d'émulsions peu concentrées contenant des gouttes de tailles régulières (Figure I.1-4). L'un des procédés les plus utilisés est celui dit à courants croisés dans lequel on force la phase dispersée à passer dans la phase continue, qui contient les tensioactifs, à travers une membrane de microfiltration ou d'ultrafiltration. Par un choix judicieux des paramètres, tels que le type de membrane, la taille moyenne des pores, la porosité, la vitesse de flux transversal, la pression transmembranaire et le système d'émulsifiants, il est alors possible de produire des émulsions avec des tailles de gouttelettes moyennes comprises entre $0,2$ et $24 \text{ }\mu\text{m}$ [16]. Cette méthode présente l'avantage d'être moins énergétique. Cependant l'un des principaux facteurs limitant concerne la mise à l'échelle industrielle qui s'avère difficile en raison du faible taux de production (le flux de la phase dispersée à travers la membrane

est limité). Le tableau ci-après reprend les caractéristiques des différentes techniques d'émulsification actuelles. Toutes ces techniques ont d'abord été développées pour et par l'industrie alimentaire et font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches en cosmétique.

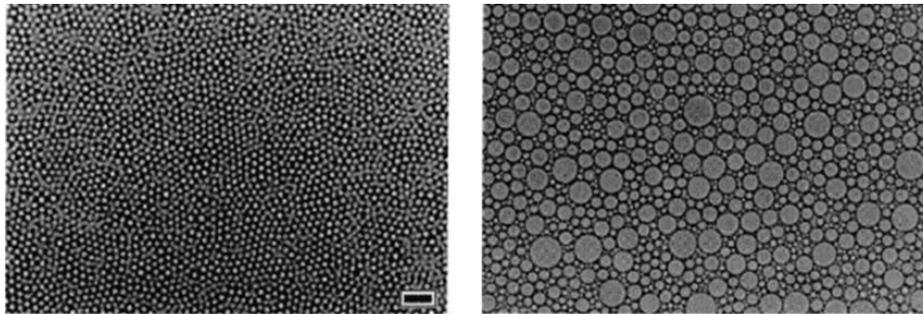


Figure 1.1-4. Comparaison de deux émulsions simples H/E préparées à partir de kérosène, d'eau et de dodécyl sulfate de sodium (SDS), émulsifiées par membrane (à gauche) ou par un homogénéiseur classique (à droite). Sur ces images de microscopie optique la barre d'échelle indique 10 μm [25].

Système d'émulsification	Rotor-Stator	Haute pression	Ultrasons	Membranes
Exemples	mixeur, agitateur (Silverson, Ultra-Turrax)	valve d'homogénéiseur, jet disperseur, microfluidiseur	sonotrodes	membranes
Rupture des gouttelettes	cisaillement en flux laminaire et/ou contrainte de cisaillement ou inertielle en écoulement turbulent	contrainte de cisaillement ou inertielle en écoulement turbulent, cavitation en flux laminaire	cavitation en flux micro-turbulent	flux de phase dispersée
Diamètre minimal des gouttelettes (μm)	1,0	0,1	0,1-0,2	0,2-0,5
Viscosité optimale (mPa.s)	faible à élevée 20-5000	faible à moyenne 1-200	faible à moyenne 1-200	faible à moyenne 1-200
Applications	laboratoire / industrielle	laboratoire / industrielle	laboratoire	laboratoire

Tableau 1.1-1. Comparaison de différents procédés d'émulsification [26].

1.1.1.3 Organisation structurale des émulsions

Les mélanges eau-huile offrent donc de nombreuses possibilités de formulation, ce qui permet à l'industrie cosmétique de proposer une large palette de textures en termes de sensorialité. En effet, en fonction de la nature des émulsifiants, des phases grasse et aqueuse et du procédé d'émulsification, il est possible d'obtenir des émulsions ayant des propriétés et

des morphologies totalement différentes en fonction de l'échelle d'observation (macroscopique et microscopique). Parmi les émulsions classiques, on distingue les émulsions simples des émulsions dites multiples. De plus, en fonction de la taille des gouttes de la phase dispersée, plusieurs classes d'émulsions peuvent être définies.

Les émulsions simples sont généralement réalisées à partir d'un système de tensioactifs composé d'un émulsifiant et d'un co-émulsifiant judicieusement choisis par rapport à leurs valeurs de HLB (cf. paragraphe I.1.2.3). Lorsque la phase continue est aqueuse, l'émulsion est dite huile dans eau (H/E). À l'inverse une phase continue huileuse est représentative d'une émulsion eau dans huile (E/H). C'est principalement la nature du système émulsionnant qui va déterminer le sens de l'émulsion obtenue (Figure I.1-5).

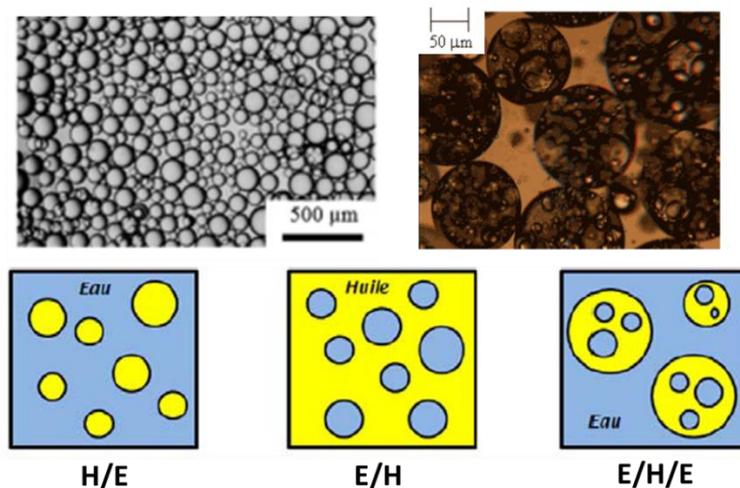


Figure I.1-5. En haut, images de microscopie optique d'une émulsion simple H/E [26] et photomicrographie d'une émulsion multiple E/H/E [27]. En bas, schémas représentant des émulsions simples H/E et E/H et une émulsion multiple E/H/E.

Les émulsions multiples, quant à elles, ont des morphologies plus complexes, puisque leur phase dispersée est une émulsion. Dans le cas d'une émulsion de type E/H/E, une émulsion E/H est dispersée dans une phase continue aqueuse. De manière analogue, on obtient une émulsion H/E/H par la dispersion d'une émulsion H/E dans une phase continue huileuse (Figure I.1-5). Ce type de formulation est très utilisé en pharmaceutique afin de retarder la diffusion d'un principe actif à l'intérieur d'une crème par exemple.

En fonction de sa structuration interne, les aspects visuels et sensoriels d'une émulsion sont modifiés. Ils dépendent en particulier de la taille des gouttelettes et de la concentration de la phase dispersée. Cette concentration peut être évaluée par la mesure de la fraction volumique⁴ de la phase dispersée, ϕ . La fraction ϕ peut prendre des valeurs comprises entre 0 et 1, qualifiant ainsi les émulsions des plus diluées aux plus concentrées. Une émulsion est dite concentrée lorsque la phase dispersée représente plus de 30% de l'ensemble en volume. Ainsi, une fraction ϕ de 0,3 peut être retenue comme valeur seuil. Cette distinction est naturellement à lier avec l'intensité des interactions entre les gouttelettes de la phase dispersée. Intuitivement, on peut comprendre que les gouttelettes dans une émulsion diluée ont moins d'interactions les unes avec les autres que dans une émulsion concentrée. Ainsi en théorie, une fraction ϕ supérieure à 0,74 (correspondant à une émulsion très concentrée) correspond à un empilement maximal hexagonal compact des gouttelettes [27], [28]. D'un point de vue pratique, cette valeur peut être dépassée du fait de la déformabilité des gouttelettes, mais également de leur polydispersité (dispersion de taille des gouttes dans l'émulsion).

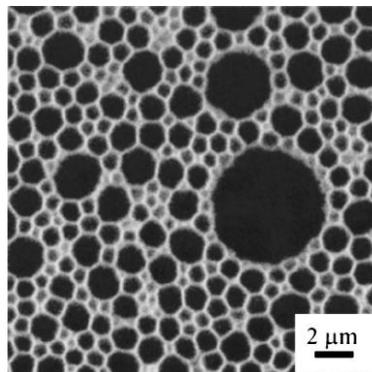


Figure I.1-6. Image de microscopie à fluorescence confocale d'une émulsion simple H/E très concentrée ($\phi = 0,77$) [29].

I.1.2 Démixtion et stabilité d'un produit cosmétique

Compte tenu des phénomènes d'interactions faibles contribuant à la stabilité d'un produit cosmétique, le processus de démixtion est inévitable. Le vieillissement de celui-ci se manifeste par la séparation progressive, puis totale des phases. Pour une émulsion H/E par

⁴ La fraction volumique correspond au rapport du volume de la phase dispersée ($V_{dis.}$) sur le volume total des phases constituant l'émulsion ($V_{dis.} + V_{con.}$) : $\phi = V_{dis.}/(V_{dis.} + V_{con.})$. Cependant, ce calcul ne tient pas compte des contractions de volume induites lors d'un mélange de composés.

exemple, la transformation de la phase huileuse dispersée mène à la formation de gouttelettes d'huile de plus en plus grosses, aboutissant à la séparation totale des deux phases. Il existe néanmoins différents processus réversibles ou irréversibles conduisant à la démixtion. Les émulsions mises sur le marché, et considérées comme stables, sont celles pour lesquelles les différents processus réversibles et irréversibles conduisant à la démixtion sont très lents (sur plusieurs années). On parle alors de stabilité cinétique. L'objectif des industriels est de formuler des émulsions dont les processus de déstabilisations sont ralentis par l'ajustement judicieux des matières premières en tenant compte des conditions extérieures (température, lumière, etc.) pouvant accélérer ces processus.

I.1.2.1 Migration réversible de la phase dispersée : sédimentation ou crémage et floculation

La sédimentation et le crémage résultent de la différence de densité⁵ entre la phase continue et la phase dispersée. On parle de crémage lorsque les gouttelettes d'huile dispersées remontent à la surface (cas des émulsions H/E) et de sédimentation lorsque les gouttelettes d'eau chutent dans le fond du contenant (cas des émulsions E/H). Ces phénomènes sont réversibles, puisqu'il suffit d'agiter l'émulsion pour revenir à un système dispersé. Il est possible de volontairement provoquer le crémage par centrifugation et de l'évaluer par une observation macroscopique de l'échantillon (Figure I.1-7).

La floculation correspond à l'agrégation des gouttelettes entre elles. Celle-ci est principalement due aux mouvements browniens, aux interactions d'attraction de type Van der Waals, qui dépendent de la composition moléculaire des deux phases, et aussi aux interactions électrostatiques, qui dépendent des charges portées par les molécules à l'interfaces entre les deux phases (émulsifiants, polymères, etc.). Ce phénomène est également réversible. La floculation est observable par microscopie optique et estimée via des techniques de granulométrie ou des mesures du potentiel zêta (Figure I.1-7).

⁵ La densité de la phase aqueuse assimilable à de l'eau pure est très proche de 1, celle de la phase grasse est généralement plus faible, aux environs de 0,9.

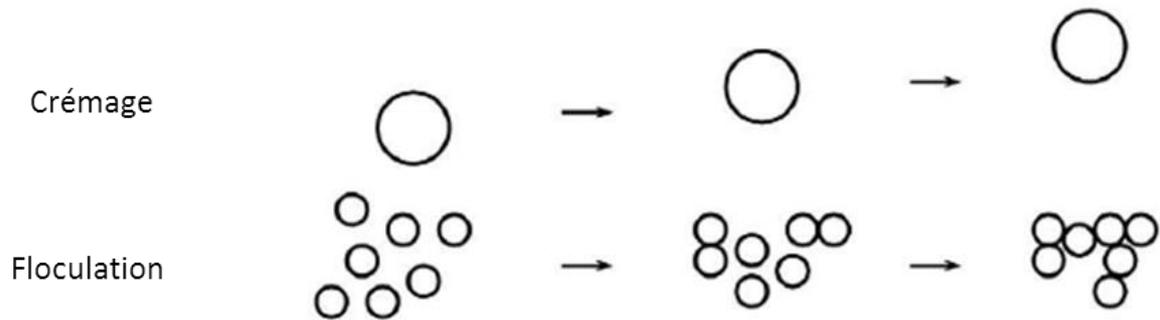


Figure I.1-7. Schémas des différents processus réversibles conduisant à la démixtion d'une émulsion cosmétique simple H/E : crémage (en haut) et flocculation (en bas) [30].

I.1.2.2 Migration irréversible de la phase dispersée : coalescence et murissement d'Ostwald

La coalescence résulte de la rupture du film interfacial au contact des phases continue et dispersée suite au phénomène de flocculation. Il y a alors fusion des petites gouttelettes entre elles qui en forment de plus grosses. Ce processus se traduit par une diminution du nombre de gouttelettes de petites tailles et une augmentation du nombre de celles de plus grandes tailles jusqu'à démixtion complète. Ce mécanisme est irréversible et énergétiquement favorable car il conduit à une réduction de la surface de l'interface. Par observation au microscope optique, cela se traduit par une polydispersité croissante de la taille des gouttelettes (Figure I.1-8).

Enfin le murissement d'Ostwald, ou la diffusion moléculaire, est principalement la conséquence de la plus ou moins forte solubilité de la phase discontinue dans la phase continue. En effet, la taille des gouttelettes n'étant pas homogène suite au processus d'émulsification, un flux de matière des petites vers les grosses gouttelettes diffuse au travers de la phase continue. Et les gouttelettes de petites tailles disparaissent au profit des gouttelettes de grandes tailles. Par observation au microscope optique, cela se manifeste par une homogénéisation de la taille des gouttelettes et une polydispersité de taille décroissante. Ce phénomène irréversible est dû à la fois à la différence de taille (et donc de surface) des gouttelettes et à la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur des

gouttelettes⁶. Il s'agit d'un phénomène observable dans les macroémulsions mais également dans le cas des nanoémulsions. En effet la taille des gouttelettes étant petite, les mouvements browniens préviennent le crémage ou la sédimentation, en revanche la petite taille des gouttelettes augmente leur diffusion dans la phase continue et peut conduire au murissement d'Ostwald (Figure I.1-8).

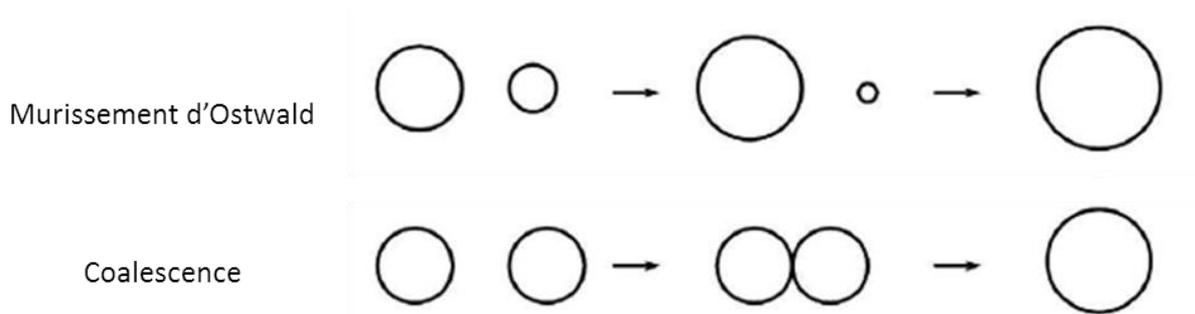


Figure I.1-8. Schémas des différents processus irréversibles conduisant à la démixtion d'une émulsion cosmétique simple H/E : murissement d'Ostwald (en haut) et la coalescence (en bas) [30].

I.1.2.3 Stabilisation par les tensioactifs

Les gouttelettes formées par l'émulsification sont stabilisées par des molécules tensioactives appelées émulsifiants. Il s'agit de molécules amphiphiles généralement non chargées (non ioniques, dans le cas des émulsions cosmétiques)⁷ constituées d'une tête polaire et d'une queue apolaire. Du fait de leur structure bivalente, ces tensioactifs vont s'adsorber et former des monocouches au niveau des interfaces eau/huile. Elles vont permettre la réduction de la tension interfaciale et favoriser la formation d'émulsions durables dont l'état dispersé demeure lorsque l'agitation mécanique cesse.

La capacité d'un tensioactif à réduire les tensions de surfaces, donc la nature des parties hydrophiles et hydrophobes ayant plus ou moins d'affinité avec les deux phases d'une émulsion, représente un critère de choix en vue d'obtenir une émulsion cinétiquement

⁶ La loi de Laplace, aussi appelée équation de Laplace-Young, lie la courbure de l'interface de deux milieux à la différence de pression qui existe entre ces deux milieux. Ainsi, la pression est plus élevée dans une goutte d'huile qu'à l'extérieur de celle-ci ; ceci dépend de la tension interfaciale et de la courbure moyenne de la surface.

⁷ Les tensioactifs rassemblent quatre grands groupes de molécules amphiphiles : des molécules anioniques (chargées négativement) et amphotères (chargées à la fois positivement et négativement), qui sont généralement utilisées comme agents moussants, mouillants et détergents, des molécules cationiques (chargées positivement) qui jouent très souvent le rôle de bactéricide ou fongicide, et enfin des molécules non ioniques, qui sont peu irritants, biocompatibles et largement utilisés dans la formulation des émulsions cosmétiques.

stable. Ce critère dit de HLB (hydrophilic-lipophilic balance ou équilibre hydrophile-lipophile en français) a été introduit en 1949 par Griffin [31]. Le nombre HLB traduit la solubilité préférentielle ou l'affinité relative des molécules tensioactives pour l'une des deux phases constituant une émulsion : la phase aqueuse ou la phase grasse.

Griffin propose de calculer le HLB en fonction des masses molaires des parties hydrophile et hydrophobe de la molécule tensioactive considérée. En 1961, Davies et Rideal [31] proposent la formule empirique suivante :

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

Les valeurs de HLB s'étendent de 0 à 20 et sont répertoriées dans des tables en fonction des groupements chimiques portés par les tensioactifs : plus la valeur de HLB est élevée plus la molécule est soluble dans l'eau (Figure I.1-9).

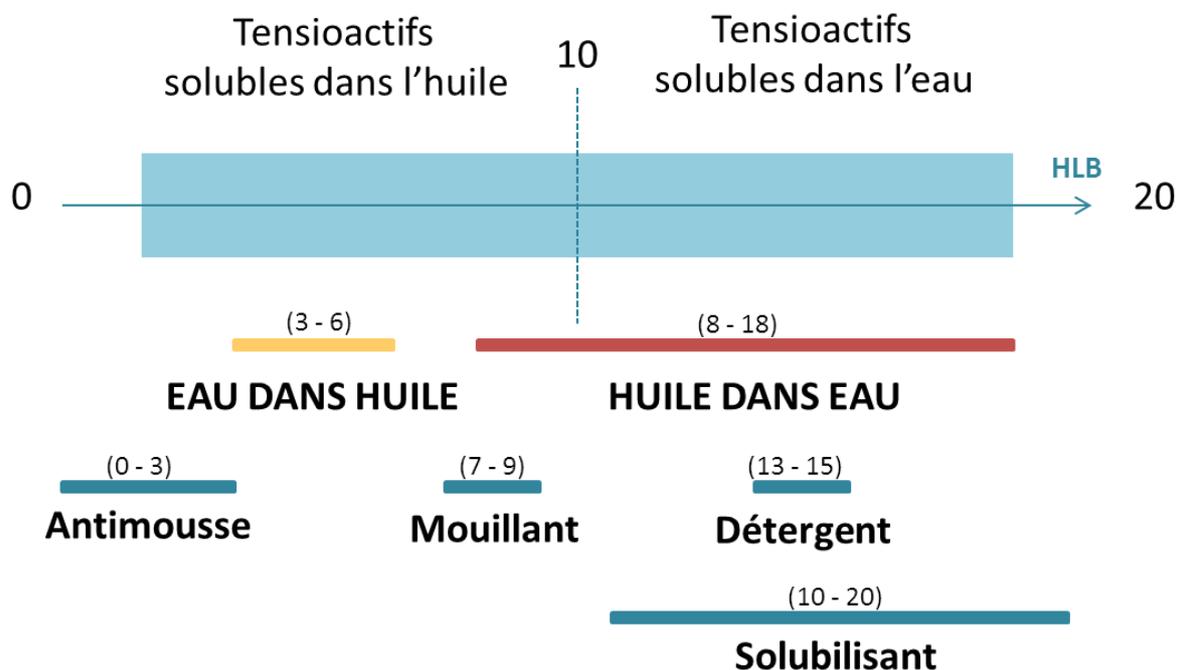


Figure I.1-9. Propriétés des tensioactifs en fonction de leur nombre HLB.

Par conséquent les huiles ont une valeur de HLB requis (RHLB). De nombreuses valeurs ont été déterminées expérimentalement en recherchant un émulsifiant, dont la valeur HLB

est adéquate, précisant ainsi la stabilité optimale d'une émulsion contenant une seule huile. Les valeurs de HLB sont additives et très utiles lorsqu'on utilise un mélange d'émulsifiants et pour comparer la qualité des émulsions et les propriétés stabilisatrices des émulsifiants. Les produits commercialisés contiennent quasi-exclusivement des mélanges (au moins deux) de tensioactifs. Cependant la notion de HLB ne prend pas en considération certains facteurs comme : l'état d'ionisation des molécules dépendant du pH, la température de formulation, la(les) concentration(s) en émulsifiant(s), les interactions possibles avec d'autres molécules et enfin les concentrations respectives des phases continues et dispersées [32]. En pratique, c'est la texture (et les propriétés physico-chimiques associées) souhaitée pour une émulsion qui orientent le choix de la nature de la phase grasse et des émulsifiants.

I.1.3 Formulation : influence de la composition

La formulation d'une émulsion stable est un exercice complexe devant concilier l'obtention d'une texture souhaitée avec la variabilité imposée par le choix des matières premières, qui ont elles-mêmes une influence sur les interactions entre et au sein des particules dispersées (limitant les phénomènes de floculation, de coalescence, de mûrissement d'Ostwald) et sur les propriétés macroscopiques (sensorielles). Ainsi, plusieurs études ont été menées afin d'évaluer l'influence de la nature et de la stœchiométrie des composants d'une émulsion sur les comportements microscopiques et macroscopiques de celle-ci.

L'optimisation des « bons » rapports huile/eau/tensioactifs dépend des propriétés rhéologiques et électriques des composés. L'émulsifiant joue le rôle le plus important dans la stabilisation des émulsions et l'ajout d'un co-émulsifiant est un moyen très souvent utilisé pour stabiliser les gouttelettes huileuses [33]. Il s'avère que l'addition de co-émulsifiants conduit souvent à la formation de couches mixtes autour des gouttelettes, ayant une très forte viscosité, et stabilisant par conséquent celles-ci. Cette barrière protectrice semble être d'autant plus efficace que le film formé par les émulsifiants est présent sous forme de gel lamellaire partiellement solidifié [33], [34]. Toujours dans l'objectif de renforcer les gouttelettes et de les maintenir dispersées, certaines études proposent de stabiliser les gouttelettes d'huiles par la formation d'une couche supplémentaire de protéines à leur surface. Cette couche est formée par adsorption des protéines via des interactions

électrostatiques principalement. L'adsorption dépend alors directement de la salinité de la phase aqueuse et de son pH, donc des charges portées à la surface des gouttelettes, et permet de limiter les phénomènes de coalescence et de floculation [35], [36].

Il arrive aussi que la nature des composés tensioactifs et gras, favorise la formation de cristaux liquides [37], [38]. Les cristaux liquides se caractérisent par la mise en place de phases lamellaires dans la phase aqueuse et de bicouches de molécules émulsionnantes autour des gouttes (Figure I.1-10).

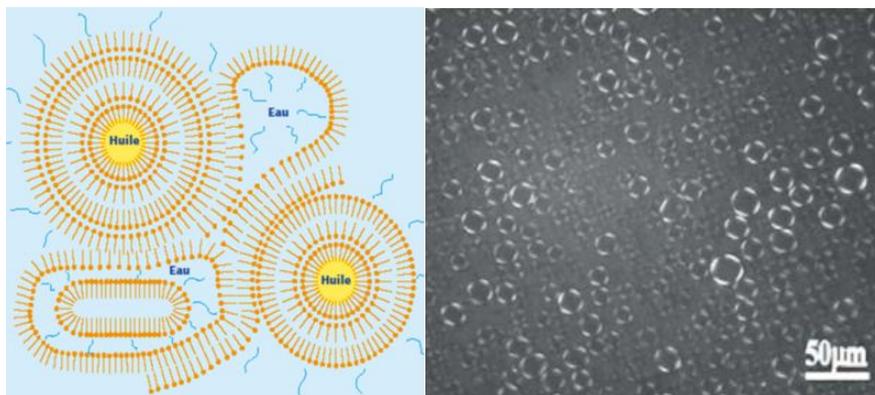


Figure I.1-10. Représentation schématique de la formation de cristaux liquides dans une émulsion H/E. Les émulsifiants sont représentés en orange (à gauche ; source : www.seppic.com). Image de microscopie optique montrant des cristaux liquides dans une émulsion (à droite) [39].

Contrairement aux émulsions classiques, qui sont généralement constituées d'huiles et d'eau, les émulsions à cristaux liquides présentent donc une variété de structures qui conduit à des organisations microscopiques particulières [40]. La présence de cristaux entraîne des distorsions des contenus induisant des forces élastiques fortes et anisotropes⁸ entre les particules. Ainsi, la bicouche d'émulsifiants forme une coque rigide autour des gouttelettes d'huile et prévient les phénomènes de coalescence, tandis que la phase lamellaire, présente en phase aqueuse, forme un réseau apportant une certaine élasticité au produit final. Finalement, ces structures ordonnées rencontrées dans les émulsions de cristaux liquides présentent un intérêt en tant qu'exemples d'organisations contrôlées. Elles sont également d'une importance pratique potentielle comme un nouveau moyen de

⁸ Ce sont principalement les huiles qui possèdent des propriétés anisotropes vis-à-vis de la lumière notamment, c'est-à-dire qu'elles ont des propriétés optiques qui varient en fonction de la direction considérée.

contrôler à la fois la stabilité et les structures des gouttelettes que représente la phase dispersée [40].

Les polymères (gélifiants, épaississants) représentent une classe particulièrement importante des adjuvants utilisés pour la fabrication des émulsions. Outre leur capacité à modifier considérablement les propriétés mécaniques (rhéologiques) de la formulation, ils permettent également de stabiliser l'interface eau/huile en s'y adsorbant et limitent alors la floculation et la coalescence. A cette fin, il convient d'utiliser des polymères ayant des portions hydrophiles et des portions lipophiles pour produire un effet d'encombrement stérique qui empêche le rapprochement des gouttelettes [41]–[43].

Les microémulsions stables thermodynamiquement, quant à elle, peuvent donc être considérées comme des dispersions dont les tensioactifs complémentaires fournissent la répulsion interfaciale stabilisante pour inhiber le coalescence des gouttelettes [44].

I.1.4 Les grandeurs mesurables liées à la stabilité

Il n'existe pas de définition officielle de la stabilité d'un produit cosmétique, cependant une définition communément admise peut être établie à partir d'un ensemble de paramètres associés à des grandeurs mesurables. Le terme stabilité renvoie généralement à la capacité du produit à résister aux contraintes environnementales extrinsèques et aux modifications intrinsèques au cours du temps.

La stabilité d'une formulation cosmétique peut être appréhendée de différentes façons :

- (i) chimiquement, les composants du produit ne doivent pas provoquer de réaction pouvant modifier de manière significative la stabilité physique, l'efficacité ou perturber les propriétés organoleptiques (aspect, odeur, couleur) du produit ;
- (ii) physiquement, dans ce cas le comportement rhéologique, les propriétés granulométriques et électriques du produit cosmétique doivent demeurer constantes ;
- (iii) microbiologiquement, le cosmétique ne doit pas constituer un milieu de culture pour les levures, les moisissures et les bactéries ;

- (iv) fonctionnellement, elle est alors relative aux revendications et à l'efficacité du produit.

La stabilité fonctionnelle d'un produit dépend aussi de :

- (i) la stabilité des actifs cosmétiques qu'il contient et de leur efficacité qui peut évoluer cours du temps, il est nécessaire alors de s'assurer de leur fonctionnalité au cours de l'utilisation par le consommateur ;
- (ii) la stabilité entre le contenant et le contenu qui est également à considérer, l'inertie d'un emballage n'est pas totale ce qui peut engendrer une altération des propriétés organoleptiques du produit cosmétique ou éventuellement un problème toxicologique via la perturbation de sa stabilité physique.

Chaque catégorie de produits cosmétiques a des spécifications et des paramètres différents à évaluer et mesurer (maintien des pigments en maquillage, oxydation des corps gras dans les émulsions, évolution olfactive des produits parfumés, etc.). Les conditions de suivi de stabilité et les critères d'acceptabilité des produits cosmétiques sont définis par chaque fabricant, dans le respect de la réglementation en vigueur. Il existe cependant des points récurrents : une étude de stabilité est réalisée à température ambiante dans le conditionnement définitif sur un minimum de trois lots.

Les laboratoires mettent en œuvre différentes procédures pour suivre l'évolution temporelle des produits [45], [46]. Mise à part les techniques classiques couramment utilisées [3], un manque d'homogénéité des pratiques et des interprétations persiste entre les différents fabricants. Mes travaux se focalisent sur les instabilités physiques, chimiques et microbiologiques.

L'équilibre d'une émulsion dépend de sa capacité à résister intrinsèquement aux perturbations mécaniques, électriques (au sens électromagnétique si l'on inclut également l'influence de l'exposition lumineuse) et thermiques aux interfaces des différentes phases. Pour mimer ces perturbations, des tests de vieillissements accélérés (résistance à la température, à la lumière, à la centrifugation, etc.) sont généralement réalisés.

Ainsi, pour évaluer les évolutions structurelles et de texture, différentes techniques de mesures sont utilisées. D'un point de vue chimique, les mesures de pH et le suivi des propriétés organoleptiques (couleurs, odeurs, etc.) sont systématiques. Il est également

fréquent de réaliser des mesures des propriétés mécaniques (viscosité, rhéologie) ou granulométriques (par diffusion de lumière). Une mesure des propriétés électriques (par conductivité et potentiel zêta [47]) et leur suivi au cours du temps peuvent donner également des informations sur la stabilité des interactions interfaciales intrinsèques. L'association de ces techniques permet aux chercheurs, aux formulateurs, d'établir des liens entre la composition d'un produit, ses propriétés électrostatiques et sa stabilité.

Ainsi, l'étude de la stabilité d'un produit cosmétique occupe une place importante lors du développement en laboratoire et de la fabrication industrielle de celui-ci. Elle permet notamment la détermination d'une date de durabilité minimale appelée durée limite d'utilisation optimale (DLUO) et/ou d'une période après ouverture (PAO). Ces informations sont présentes sur les emballages et permettent ainsi de garantir aux consommateurs la sécurité, la qualité et la fonctionnalité de leur produit sur une durée préétablie. La DLUO correspond à une date de péremption. Elle traduit la stabilité intrinsèque du produit cosmétique en conditionnement fermé. Elle est déterminée par des tests de vieillissement accéléré qui permettent un suivi de la stabilité physico-chimique principalement au cours du temps. Ces tests ont pour objectif d'appréhender la résistance du produit cosmétique au stockage et à l'expédition [47]. La PAO, quant à elle, est estimée à partir du risque microbiologique, c'est-à-dire de la propension du produit cosmétique à être un milieu propice à la contamination microbienne. Les instabilités microbiologiques seront développées dans le paragraphe I.3.

I.2 RELATION ENTRE LA STABILITE ET LES PROPRIETES RHEOLOGIQUES DES EMULSIONS

La rhéologie a été introduite en 1920 par Eugène Bingham (1878-1945) et correspond à la science de l'écoulement et de la déformation de la matière sous l'action de contraintes. Elle est particulièrement efficace pour étudier les comportements mécaniques de fluides complexes, allant du liquide parfait (fluide newtonien) aux gels même rigides, soumis à une contrainte de cisaillement. C'est pourquoi la rhéologie est une méthode analytique quasi incontournable lors du développement de formules cosmétiques. Pour l'optimisation des émulsions, elle joue un rôle important lors des procédés de formulation pour la rationalisation des opérations de mélange et de dispersion [48]. Plus largement, le champ

d'utilisation de la rhéologie permet également, d'une part, l'étude des comportements lors du prélèvement et de l'étalement sur la peau d'un produit cosmétique et, d'autre part, le suivi des propriétés mécaniques au cours de son vieillissement. Dans ce travail de thèse, plusieurs techniques rhéologiques ont été utilisées afin d'interpréter et d'identifier le domaine de stabilité en fonction du vieillissement, de la formulation et de la composition de produits cosmétiques basiques, notamment les émulsions simples diluées H/E.

I.2.1 Caractérisation viscoélastique des émulsions

Soumis à une sollicitation mécanique de cisaillement, un matériau de type émulsion ou gel subit une déformation issue des interactions multiples entre les phases dispersées et la phase continue. Le rapport entre la déformation, γ , et la contrainte, σ , permet de remonter à l'information d'écoulement apparent de la phase continue et d'élasticité apparente des gouttelettes interagissant entre elles et avec le fluide continu. Cet écoulement est en effet dû aux mouvements relatifs de ses constituants. Si l'on considère que cet écoulement est laminaire à l'échelle d'investigation, il n'y a alors pas de turbulences introduisant des effets non linéaires.

Notons x la position d'un élément de volume sur l'axe longitudinal, z sa hauteur. Pour une surface cisailée S donnée en $z = 0$, la vitesse de déplacement des éléments de volume entraînés varient suivant l'axe des z en fonction du gradient de cisaillement. Ce terme également appelé taux de cisaillement, est noté $\dot{\gamma}$, correspond à la variation de la déformation au cours du temps et est exprimé en s^{-1} .

Le rapport des deux grandeurs physiques :

- (i) la contrainte, σ , exprimée en Pa, est définie comme la force de cisaillement F par unité de surface S imposée au fluide :

$$\sigma = F/S$$

- (ii) la déformation, γ , est quant à elle sans dimension et se définit comme la variation du déplacement, lorsqu'on se déplace d'une couche à l'autre :

$$\gamma = dx/dz \text{ avec } \dot{\gamma} = \frac{\partial \gamma}{\partial t}$$

Si les émulsions cosmétiques ont, généralement, un comportement à la fois élastique (solide) et visqueux (fluide), c'est en raison de leur structure complexe. Car au repos, ou encore sous l'effet d'une déformation, les molécules qui les constituent sont amenées à interagir les unes avec les autres et la contrainte résultante dépend de l'historique de ces interactions. La Figure I.2-1, présente le comportement d'un tel matériau soumis à une contrainte tangentielle⁹ dynamique.

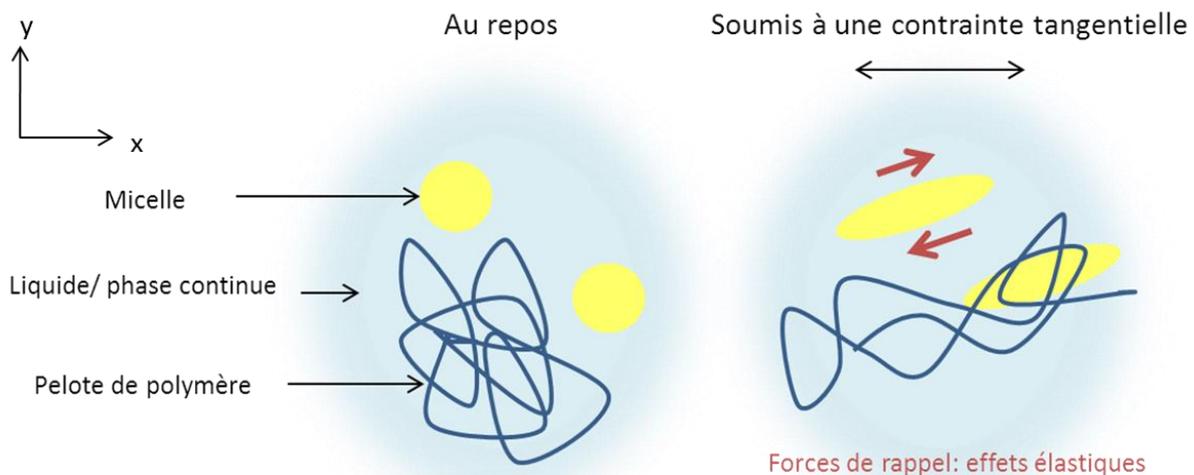


Figure I.2-1. Représentations d'un matériau au repos et soumis à des mouvements de cisaillement.

Lorsque l'on soumet un fluide complexe à une contrainte dynamique tangentielle, il en résulte l'apparition de forces de rappel qui vont aller à l'encontre de l'écoulement. Ainsi, le lien entre la contrainte et la déformation est représentatif de l'inertie du matériau. Dans une émulsion, deux effets peuvent être alors notés : le déplacement du liquide porteur et la déformation des éléments dispersés sous l'action de la contrainte. Le liquide porteur correspond à la phase continue dans laquelle sont dispersées les gouttelettes ainsi que des macromolécules qui peuvent être réticulées ou enchevêtrées. En conséquence, les contraintes imposées par une sollicitation mécanique peuvent entraîner la rigidification du milieu. En effet, les forces entropiques perpendiculaires au cisaillement tendent à restaurer la forme initiale des macromolécules et des gouttelettes. Dans le cas de petites déformations

⁹ Une contrainte tangentielle est une contrainte appliquée de manière parallèle par rapport au matériau étudié.

et de petites contraintes, les effets liés à la rigidité et à la viscosité se superposent et dépendent de l'ensemble des interactions inter et intramoléculaires.

Une émulsion possède un comportement élastique. En mécanique, le lien entre la contrainte et la déformation peut être en partie décrit par la loi de Hooke. Cette loi (indiquée ci-dessous) fait intervenir le module de cisaillement, G , qui rend compte de la rigidité apparente du matériau.

$$\sigma = G \gamma$$

Une émulsion étant également un fluide visqueux, le lien entre la contrainte et la déformation fait intervenir la viscosité apparente, η_{app} , et est décrit par la loi de Newton (voir ci-dessous). Cette grandeur est exprimée en Pa.s, et correspond à la résistance du matériau à l'écoulement. La contrainte peut alors s'écrire partiellement en fonction du taux de déformation comme suit :

$$\sigma = \eta_{app} \dot{\gamma}$$

Par superposition des caractères visqueux et élastiques des émulsions, l'expression est donnée localement par l'équation ci-dessous :

$$\sigma(t) = G \gamma(t) + \eta_{app} \dot{\gamma}(t)$$

La modélisation des liens temporels entre la contrainte et la déformation du matériau n'est pas aisée ; aussi il est courant de recourir à des modèles mécaniques simplifiés pour approcher au mieux la réponse du matériau. Un solide parfait est représenté par un ressort de coefficient de raideur donné par G , tandis qu'un fluide purement visqueux est représenté par un amortisseur (piston) de viscosité η . Plusieurs modèles piston-ressort existent dans la littérature. La modélisation d'un élément de volume viscoélastique peut être représentée par l'association d'un ressort et d'un piston mis en série. Cela étant dit, ce modèle simpliste ne rend pas compte des arrangements structuraux qui peuvent s'établir au sein des fluides complexes. En effet, sous l'action d'une sollicitation mécanique, les contraintes s'accumulent dans le matériau et se répartissent sur ses différents constituants. Par effet viscoélastique, ces contraintes sont relâchées au fil du temps selon des temps caractéristiques τ liés à l'échelle des sous-entités considérées.

Il convient alors de recourir au modèle généralisé de Maxwell illustré en Figure I.2-2. Ce modèle permet de mieux décrire le comportement des fluides à élasticité, comme les émulsions. Chaque branche du modèle peut être associée à un temps de relaxation τ_n du matériau, correspondant à l'échelle d'investigation *considérée*. On peut montrer que :

$$\tau_n = \frac{\eta_n}{G_n} \quad (I.2-1)$$

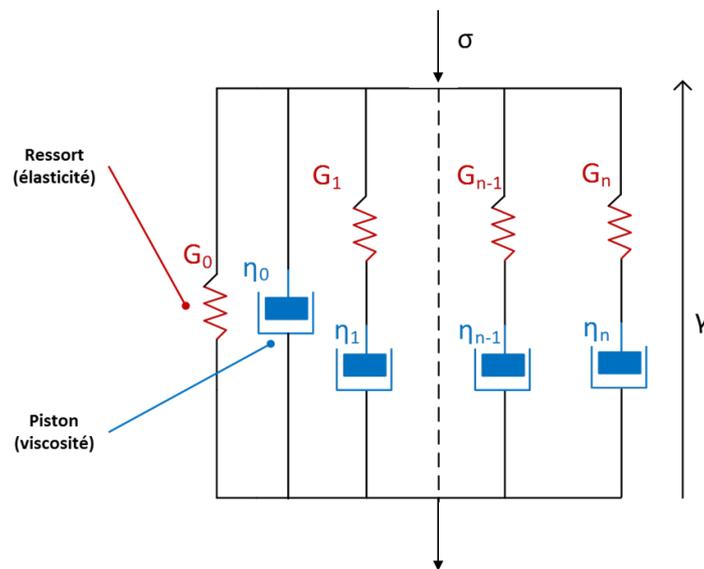


Figure I.2-2. Modèle de Maxwell généralisé.

Du fait de cette relation entre échelle de temps et échelle d'investigation, il est intéressant d'étudier les fluides complexes par des mesures en oscillation. En effet, en régime harmonique, changer de fréquence d'excitation revient à changer l'échelle d'investigation. Pour cette caractérisation, il est nécessaire de travailler dans le domaine linéaire de déformation pour lequel l'émulsion est déformée sans qu'il y ait de modification définitive de sa structure. Dans ce régime linéaire, les amplitudes de la contrainte et de la déformation restent proportionnelles. On note $\sigma(t, \omega)$ la contrainte appliquée en notation complexe, dans le cas d'un cisaillement harmonique, on aura :

$$\sigma(t, \omega) = \sum_n \sigma_0 e^{i\omega t}$$

où i est le nombre complexe, t le temps durant lequel la contrainte est appliquée et ω la pulsation (proportionnelle à la fréquence au facteur 2π près). Compte tenu de l'inertie du matériau à se déplacer sous l'action de la contrainte, un déphasage, δ , apparaît entre la contrainte et la déformation. Le système étant linéaire, la réponse à la contrainte harmonique est une déformation dont la variation est aussi harmonique à la même pulsation. Ainsi, le gradient de cisaillement s'exprime sous la forme complexe suivante :

$$\gamma(t, \omega) = \gamma_0 e^{i(\omega t - \delta)}$$

De manière générale, pour un cas uniaxial et à une échelle donnée, la contrainte et la déformation sont finalement reliées par le module complexe de cisaillement dans une relation qui n'est pas sans rappeler la loi de Hooke. Ce module complexe est défini par l'expression suivante :

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma(t, \omega)}{\gamma(t, \omega)} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} e^{i\omega t} e^{-i\delta} = G'(\omega) + i G''(\omega) \quad (1.2-2)$$

où $G'(\omega)$ représente le module élastique de cisaillement et $G''(\omega)$ représente le module visqueux de cisaillement. D'un point de vue énergétique, $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ rendent-compte respectivement de l'énergie emmagasinée et de l'énergie dissipée dans le milieu. $G'(\omega)$ est le module de conservation (élastique) et $G''(\omega)$ le module de perte (visqueux).

Accéder au module complexe de cisaillement $G^*(\omega)$, à l'aide d'un système instrumental, revient à étudier le matériau viscoélastique en régime harmonique établi. Il nous donne une image des interactions de la structure dans une échelle d'investigation donnée, liée à la fréquence d'oscillation de la déformation. Le recours à différents systèmes de mesures dont les gammes fréquentielles diffèrent permet donc d'avoir une analyse à plusieurs échelles d'un même matériau.

1.2.2 Impact de la composition des émulsions sur les propriétés d'écoulement

La rhéologie rotative permet d'accéder aux propriétés d'écoulement en régime permanent (c'est-à-dire à l'échelle macroscopique). Dans ce cas, des mouvements de rotation dans une direction sont appliqués au matériau. Les grandeurs accessibles sont d'une

part, la vitesse de cisaillement (ou taux de déformation, $\dot{\gamma}$) déterminée à partir du type de la géométrie du support de l'échantillon, de sa surface et de la vitesse de rotation, et d'autre part, la contrainte de cisaillement, σ , mesurée à partir du couple à appliquer pour maintenir le mouvement du rotor. En imposant l'une de ces deux grandeurs le rhéogramme qui représente la signature de l'écoulement du matériau est établi. La Figure I.2-3 présente les rhéogrammes en déformation imposée pour les différents comportements possibles d'un fluide.

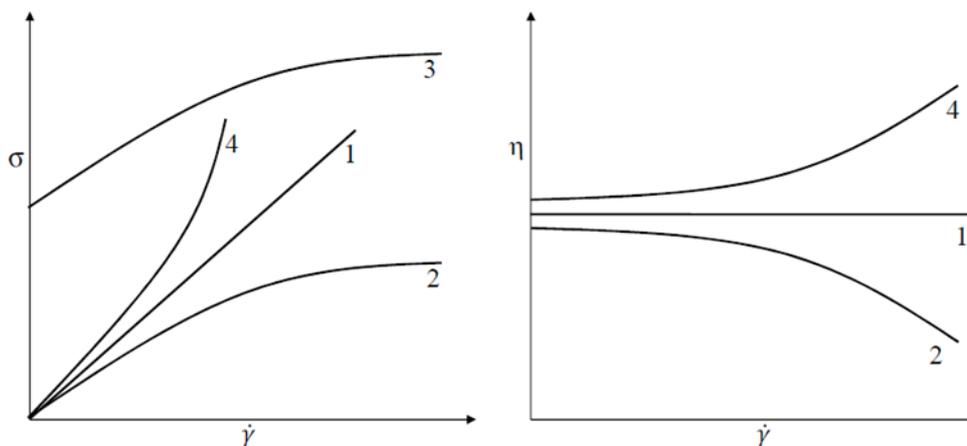


Figure I.2-3. Courbes d'écoulements pour des fluides newtonien (1), rhéofluidifiant (2), viscoplastique (3) et rhéoépaississant (4) [49].

En cosmétique, les mesures en régime permanent permettent d'accéder à la viscosité macroscopique η_0 des émulsions, même si cette estimation reste fautive puisque les émulsions fluides diluées peuvent être assimilées à des dispersions de solides dans un liquide : les particules dispersées de l'émulsion se comportent comme les particules solides en suspension dans un fluide (suspensions colloïdales). Dans le cas des émulsions plus épaisses (concentrées), l'augmentation du nombre de gouttelettes dans l'émulsion à faible taux de cisaillement provoque non seulement une augmentation de la viscosité mais également l'apparition d'effets non newtoniens et d'un caractère rhéofluidifiant [48]. À forte concentration en huile dans la phase dispersée, on observe très souvent ce passage d'un comportement newtonien à un comportement viscoplastique [50].

Dans le cas des émulsions inverses E/H la nature de l'huile a un impact majeur sur les propriétés rhéologiques finales de l'émulsion, permettant d'avoir des textures ayant une

large gamme de viscosités [51]. De même, pour les émulsions H/E, c'est la nature des composés dissous dans la phase aqueuse continue (synthétique ou naturelle, la longueur de chaîne pour les polymères, etc.) qui est déterminante pour les propriétés mécaniques de l'émulsion et la sensorialité [52].

L'influence de l'arrangement structural et des interactions entre les particules dispersées dans un système sur ses propriétés rhéologiques a été mise en évidence dans le cas des émulsions par les travaux de Yingyi Mao en 2012 [53]. Des émulsions mixtes ont été préparées à partir d'émulsions contenant des gouttelettes anioniques et des gouttelettes cationiques, conduisant à une hétéroagrégation des gouttes de charges opposées. Les résultats montrent qu'il est possible de créer des systèmes ayant des caractéristiques rhéologiques très différentes en mélangeant des gouttelettes de tailles et de charges différentes. En effet, les émulsions contenant des grandes gouttelettes cationiques et des grandes gouttelettes anioniques sont fluides et ont des viscosités apparentes relativement faibles. Alors que, les émulsions contenant des petites gouttelettes cationiques et des petites gouttelettes anioniques sont, quant à elles, très pâteuses (Figure I.2-4).

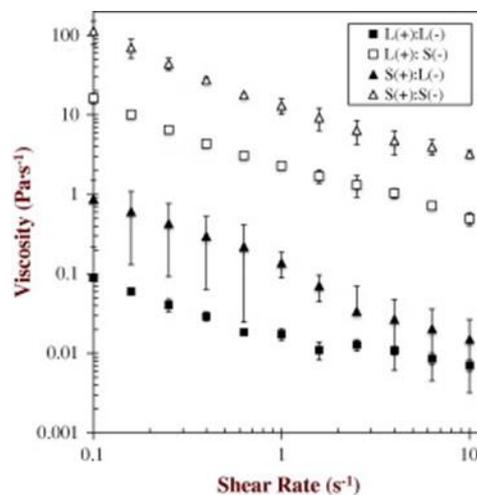


Figure I.2-4. Évolution des viscosités apparentes en fonction de la vitesse de cisaillement pour des émulsions mixtes, contenant des gouttelettes de tailles et de charges différentes, préparées en mélangeant deux émulsions contenant des gouttelettes lipidiques respectivement enrobées de lactoferrine (LF) et de β -Lactoglobuline (BL) à pH 6. L : grosses gouttelettes ; S : petites gouttelettes ; + : gouttelettes cationiques ; - : gouttelettes anioniques [53].

I.2.3 Lien entre la stabilité et les propriétés dynamiques

Généralement les rhéomètres rotatifs permettent également de faire des mesures en oscillations. Ainsi, la plupart des géométries de support des échantillons donnent accès à la fois aux propriétés d'écoulement d'un matériau et à ses propriétés viscoélastiques. Dans le cas de la rhéologie harmonique, le fluide peut être soumis à deux types de mouvement permettant de déterminer ses paramètres viscoélastiques. Un balayage en déformation (ou en contrainte) imposée peut être effectué à une fréquence constante et un balayage en fréquence peut être effectué à une déformation (ou contrainte) constante. Ces mesures nous permettent d'obtenir les valeurs des modules élastique G' et visqueux G'' , entre autres, dans le domaine linéaire viscoélastique (DLVE) ; domaine pour lequel G' et G'' sont constants et indépendants de la déformation (ou de la contrainte) appliquée. De plus, cette analyse rhéologique dynamique permet une caractérisation très précise de la structure du fluide étudié. Dans le cas des polymères par exemple, sous l'effet d'oscillations à une amplitude donnée, les macromolécules subissent des élongations brutales dues à la réorientation soudaine des chaînes correspondant à l'élasticité instantanée. Il est également possible de réaliser des tests de fluage statique (par des mouvements rotatifs) qui consistent à imposer brutalement et de façon transitoire une contrainte, ou une vitesse de déformation constante (on parle alors de tests de relaxation), permettant d'obtenir le spectre des temps de réarrangements moléculaires. Bien que les techniques de fluages-recouvrance¹⁰ soient souvent utilisées, les mesures viscoélastiques, de loin les plus puissantes et les plus fréquemment mises en œuvre, sont effectuées en régime dynamique en imposant par exemple une contrainte de cisaillement sinusoïdale.

La sollicitation mécanique d'une émulsion induit le mouvement des gouttelettes les unes par rapport aux autres. La rhéologie des émulsions est finalement directement liée au comportement mécanique de la phase continue, à la granulométrie, aux interactions entre gouttelettes, mais également à la déformabilité des gouttelettes (viscosité de la phase dispersée). De plus, le vieillissement des émulsions entraîne des modifications de leurs propriétés rhéologiques (du fait de nombreux facteurs : déshydratation, oxydation par l'air, autres transformations chimiques éventuelles, contaminations biologiques, etc.). Dans un

¹⁰ Le fluage correspond à l'application d'une contrainte constante au matériau dont on suit la déformation au cours du temps. Et la recouvrance représente la déformation au cours du temps du matériau une fois la contrainte supprimée.

premier temps, les gouttelettes se coagulent et des amas apparaissent. Ce processus se traduit par une augmentation de la viscosité à des taux de cisaillement faibles. La coalescence conduit à une diminution du nombre de gouttelettes par unité de volume, ce qui conduit inévitablement à une évolution des propriétés rhéologiques de l'émulsion [50].

De nombreux auteurs [54]–[57] mentionnent que le vieillissement affecte les composantes élastique et visqueuse. La variation de ces paramètres rhéologiques va dépendre du processus de déstabilisation impliqué (floculation, crémage, coalescence, murissement d'Ostwald) et des interactions entre les gouttelettes (interactions longues distances attractives ou répulsives). En 2006, l'équipe de Masmoudi [56] a étudié le vieillissement accéléré d'émulsions H/E concentrées par rhéologie, microscopie électronique, et microscopie à contraste de phase. Cette étude montre que le vieillissement sur 6 mois des émulsions, conduit à une diminution importante des modules viscoélastiques due à la coalescence et au crémage. Cette diminution est d'autant plus importante que l'émulsion est instable.

La mesure rhéologique est parfois utilisée afin de déterminer la combinaison optimale en émulsifiants permettant d'obtenir une viscoélasticité adéquate au maintien de l'intégrité d'une émulsion dans le temps [58], [59]. En effet, les émulsifiants impactent la rhéologie de l'émulsion en fonction de la taille de la couche qu'ils forment autour des gouttelettes. Et cet impact croît avec l'augmentation de la taille des gouttelettes [60]. Ainsi, la rhéologie de l'émulsion va dépendre des propriétés rhéologiques de la couche interfaciale créée par les émulsifiants. Il existe donc une corrélation entre les couches interfaciales formées par les tensioactifs et la stabilité d'une émulsion. Car, la stabilité est principalement estimée d'une part par l'élasticité (facteur thermodynamique) et d'autre part par la viscosité (facteur cinétique) de la couche d'émulsifiant qui joue un rôle dans les interactions entre les gouttelettes dispersées [50].

I.3 SUIVI ET CONTROLE DE LA PROLIFERATION DES MICRO-ORGANISMES EN MILIEUX COMPLEXES

I.3.1 Les émulsions, milieux de culture pour les micro-organismes

On entend par micro-organismes l'ensemble des êtres vivants ne pouvant être observés à l'œil nu et dont les cellules ne sont pas différenciées et ne forment pas de tissus. Parmi eux, on retrouve les bactéries, les levures, les champignons, les micro-algues, les protozoaires, ainsi que les virus. Pour se multiplier, ces micro-organismes doivent trouver dans leur milieu de vie les éléments nécessaires à la synthèse de leurs composants (acides nucléiques, protéines, lipides, etc.). Ils prélèvent donc dans leur environnement les nutriments, les éléments chimiques, dont ils ont besoin et qui les composent (carbone, hydrogène, oxygène, azote, phosphore et soufre principalement) [61]. En laboratoire, leur développement est favorisé dans des milieux de cultures spécifiques et enrichis en ces différents éléments. Cependant les micro-organismes sont capables de se développer dans les milieux naturels (sols, air, eaux) et chez les animaux et l'homme. Ainsi, les émulsions peuvent représenter des milieux propices au développement des micro-organismes et sont assimilables à des milieux de culture non renouvelés en nutriments.

Dans le cas des bactéries, la croissance d'une population bactérienne s'arrête en moyenne au bout de 16 à 24 heures en milieu liquide nutritif non renouvelé car elles n'ont plus les ressources nécessaires à leurs multiplications. On observe un profil de croissance caractéristique et caractérisé par différentes phases (Figure I.3-1). La première correspond à une phase de latence qui permet l'adaptation des bactéries à leur environnement et la synthèse des enzymes nécessaires à la transformation de leurs nouveaux substrats. Par la suite les phases d'accélération et de croissance exponentielle permettent aux bactéries de se multiplier grâce aux nutriments présents dans le milieu de culture. S'ensuivent les phases de ralentissement et stationnaire qui correspondent à l'épuisement des ressources du milieu de culture. Lors de la phase stationnaire, la croissance est nulle : il y a une compensation entre les divisions et les morts bactériennes. Lorsque la totalité des ressources nutritives est épuisée, les bactéries meurent progressivement, il s'agit de la phase finale de décroissance ou déclin.

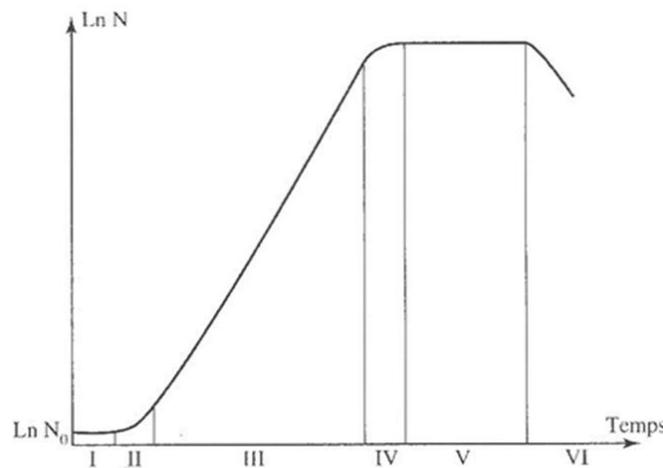


Figure 1.3-1. Profil de croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (logarithme du nombre de bactéries N est porté en fonction du temps). Phase de latence (I), phase d'accélération (II), phase d'accélération (III), phase de ralentissement (IV), phase stationnaire (V) et phase de déclin (VI) [62].

La stabilité des émulsions dépend de leur composition chimique, de facteurs physiques (température, rayonnement UV, hygrométrie, etc.), mais également environnementaux. La recherche du domaine de stabilité des émulsions constitue un enjeu pour l'industrie cosmétique. Cependant celui-ci peut parfois correspondre à des conditions favorables au développement de micro-organismes pouvant contaminer les émulsions lors de leur fabrication ou de leur utilisation et nuisant à leur conservation.

Les matières premières contenues dans les émulsions (huiles, émulsifiants, polymères, sels, etc., [63], [64]) sont des sources d'éléments nutritifs essentiels (carbone, oxygène, azote, etc.) au développement des micro-organismes. Ces matières représentent autant de substrats permettant la viabilité, voire la croissance de micro-organismes exogènes. En revanche, outre l'apport en nutriments, les micro-organismes doivent être dans des conditions environnementales adéquates de pH, de salinité, de température et de disponibilité en oxygène et en eau, pour se développer de manière optimale [65]. Les conditions de stockage et d'utilisation des produits cosmétiques varient généralement pour des températures comprises entre 5 et 40°C en fonction du mode de transport, de la zone géographique et des conditions de stockage et de rayonnage en magasin. Celles-ci coïncident avec les températures de croissance des micro-organismes dits psychotrophes¹¹ et mésophiles¹² [62]. De plus, la plupart des germes ont un développement optimal dans des

¹¹ Un micro-organisme psychrotrophe est adapté et capable de survivre à des températures comprises entre 0 et 37°C.

¹² Un micro-organisme mésophile est prospère pour des températures comprises entre de 10 à 45°C.

milieux liquides ayant des pH proches de la neutralité (pH 6,5 - 7,5) [65] qui coïncident avec ceux des émulsions les plus couramment formulées en cosmétiques (la plupart des crèmes visages et corps et les produits capillaires sans rinçage ont un pH compris entre 5 et 8). Pour finir l'un des éléments essentiels, faisant des émulsions un milieu propice au développement des micro-organismes, est leur forte teneur en eau (autour de 70% en masse).

La teneur en eau d'un produit cosmétique peut être évaluée par la notion d'activité de l'eau, a_w (pour activity of water). Celle-ci correspond à la part d'eau libre (et par conséquent disponible pour le développement de micro-organismes) présente dans un produit. Il s'agit du rapport entre la pression de vapeur d'eau d'un produit et la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température, a_w est par conséquent sans unité. Elle est comprise entre 0 (produit sec) et 1 (eau pure) : donc pour un produit donné, plus la valeur de a_w est élevée, plus le produit contient d'eau disponible. Une forte valeur de a_w est nécessaire au développement des bactéries, levures et moisissures [66], [67]. Pour indication, les valeurs minimales d' a_w permettant la croissance de certains micro-organismes ubiquitaires sont répertoriées dans le Tableau I.3-1.

Micro-organismes	Type	Activité de l'eau (a_w)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bactérie	0,97
<i>Escherichia coli</i>	bactérie	0,95
<i>Staphylococcus aureus</i>	bactérie	0,86
<i>Aspergillus niger</i>	champignon	0,77
<i>Candida albicans</i>	levure	0,87

Tableau I.3-1. Activité de l'eau minimale pour les micro-organismes utilisés ou recherchés lors des tests cosmétiques.

Cependant, les produits cosmétiques n'étant pas soumis à une autorisation de mise sur le marché, au contraire des médicaments, il est nécessaire pour l'industrie de s'assurer de leur innocuité vis-à-vis du consommateur. Le Règlement cosmétique CE n°1223/2009 définit les critères de spécificité d'une formulation à usage cosmétique. L'annexe I de ce règlement exige la rédaction d'un rapport concernant la sécurité du produit et notamment sa qualité microbiologique. L'objectif est de protéger l'utilisateur de toute contamination qui pourrait

nuire à sa santé. Les principaux micro-organismes (bactéries et champignons) recherchés dans les produits cosmétiques sont les suivants¹³ [65] :

- (i) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027TM (agent biologique de niveau 2), bactérie gram négative, ubiquitaire (air, eau douce, eau de mer, sols humides, etc.), commensale des muqueuses humaines, qui peut être pathogène ;
- (ii) *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538TM (agent biologique de niveau 2), bactérie gram positive, ubiquitaire, commensale de l'homme et des animaux, qui peut être pathogène ;
- (iii) *Escherichia coli* ATCC® 8739TM (agent biologique de niveau 1), bactérie gram négative, entérique, il existe des souches pathogènes, dont certaines sont responsables d'infections humaines entériques, urinaires, pulmonaires, etc., mais qui diffèrent de l'espèce intestinale commensale de l'homme ;
- (iv) *Candida albicans* ATCC® 10231TM (agent biologique de niveau 1), champignon (levure) commensal humain ;
- (v) *Aspergillus niger* ATCC® 16404TM (agent biologique de niveau 1), champignon ubiquitaire.

La contamination des produits cosmétiques avant leur utilisation relève essentiellement de l'hygiène des procédés de production. En revanche, la contamination après utilisation est en partie due aux contacts avec les doigts des utilisateurs et l'air environnant menant à la formation de colonies et de biofilms au sein des émulsions et au contact des parois des contenants.

La croissance des bactéries sous forme de biofilm, par définition s'oppose à celle en milieu liquide dite planctonique. Les biofilms sont localisés aux interfaces solide/liquide, liquide/air ou solide/air. Ils se définissent comme un consortium de micro-colonies essentiellement bactériennes enrobées d'une matrice d'exopolymères, adhérant sur une surface inerte ou vivante [68] (Figure I.3-2). Le développement de biofilms pose des problèmes dans les industries agroalimentaires, de production et de distribution d'eau potable, dans le monde médical, mais également dans l'industrie cosmétique.

¹³ <https://www.atcc.org/>

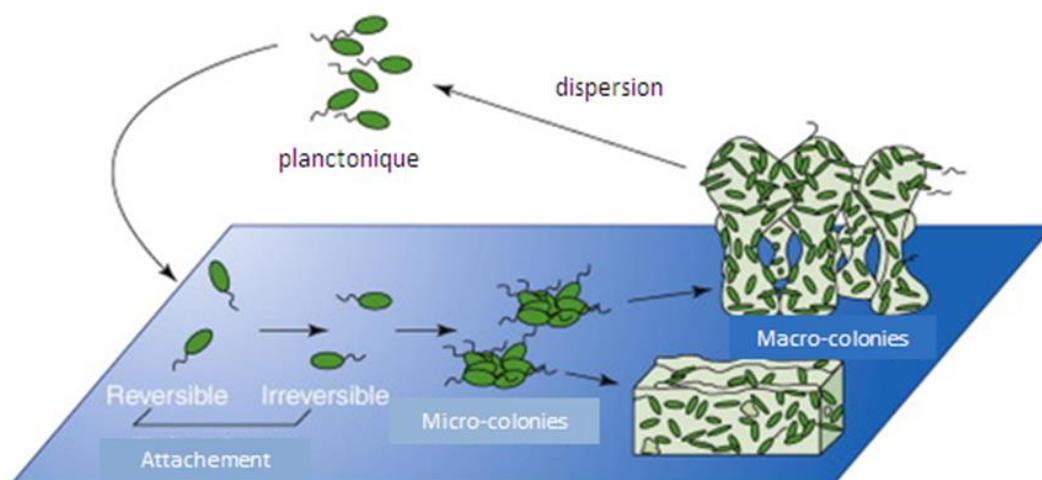


Figure 1.3-2. Représentation schématique du processus de formation d'un biofilm [78] : 1. les bactéries isolées évoluent librement dans un milieu liquide (formes planctoniques) ; 2. elles se fixent sur une surface (adhésion réversible) et s'organisent en amas ; 3. elles s'ancrent de façon irréversible sur la surface via des appendices cellulaires et les exopolymères qu'elles sécrètent ; 4. le biofilm acquiert une structure tridimensionnelle et instaure au sein des microenvironnements (maturation) ; 5. un certain nombre de cellules bactériennes retournent à l'état planctonique et pourront former un nouveau biofilm.

La formation de biofilm dans le cas des émulsions cosmétiques a lieu aux interfaces crème/air et crème/contenant. Les études réalisées par l'industrie alimentaire ont montré que l'accumulation de nutriments à la surface du contenant favorisait la formation de biofilms. Il semblerait également que l'organisation sous forme de macro-colonies permet un transfert plus rapide des nutriments que pour les cellules bactériennes isolées évoluant dans un milieu liquide. La nature du contenant et ses propriétés physico-chimiques peuvent affecter le processus de formation du biofilm [68].

En définitive, les micro-organismes trouvent dans les produits cosmétiques et notamment dans les émulsions un environnement favorable permettant leur développement. Ainsi pour s'assurer de l'innocuité des produits mis sur le marché, les industriels ont recours à différentes méthodes de détection des micro-organismes et à différents systèmes de conservation.

I.3.2 Détecter et limiter la croissance des micro-organismes

I.3.2.1 La conservation des produits cosmétiques et la détection des micro-organismes

Les conservateurs sont utilisés afin de protéger un produit cosmétique des altérations et des contaminations pouvant se produire lors de leur production ; mais ils ont également un rôle de protection lors de l'utilisation du produit par l'utilisateur. En effet, la réglementation cosmétique CE n°1223/2009 définit par « agents conservateurs » les substances qui sont exclusivement ou principalement destinées à empêcher le développement de micro-organismes dans le produit cosmétique. En Europe, les conservateurs antimicrobiens pouvant être utilisés sont inscrits sur la liste positive de l'annexe V de la directive cosmétique européenne (arrêté du 6 février 2001 pour la législation française). Celle-ci fixe également leurs concentrations, leurs limites et conditions d'utilisation.

L'utilisation des conservateurs en cosmétique est un sujet central de nos jours. En effet, suite à l'utilisation de molécules controversées, et notamment des parabènes, les consommateurs sont de plus en plus attentifs à la composition et aux systèmes de conservation présents dans leurs produits. La liste positive de l'annexe V définit les conservateurs d'origine synthétique autorisés en cosmétique. Cependant, avec la tendance grandissante du naturel et du biologique, aujourd'hui les industriels tendent à utiliser des conservateurs d'origines naturelles. Ce sont principalement des huiles essentielles, dont les propriétés antimicrobiennes et antifongiques ont été le centre d'intérêt de nombreuses recherches. Cependant, ces huiles essentielles étant des mélanges complexes de plusieurs dizaines de molécules différentes [69], elles sont souvent allergènes, photosensibles, ont des propriétés médicinales ou curatives et présentent un inconvénient en matière de formulations de par leurs odeurs et couleurs très marquées ainsi que leur coût élevé [70].

Ainsi, la préservation des produits cosmétiques face aux contaminations microbiennes se caractérise par la volonté de l'industrie de concilier efficacité avec volonté de naturalité et de sécurité du consommateur. Cependant, l'utilisation de substances alternatives ou naturelles n'assure pas tout le temps l'élimination complète des micro-organismes et peut engendrer des effets irritants ou sensibilisants chez le consommateur. La « solution idéale » qui remplacera les agents de conservation traditionnels et qui sera absolument sûre, efficace et sans contrainte sensorielle, n'a pas encore été trouvée [71].

Pour évaluer l'innocuité des produits cosmétiques et l'efficacité des systèmes conservateurs, la pharmacopée européenne a institué deux méthodes de contrôle. La première méthode est un contrôle microbiologique, qui correspond à la détection des bactéries aérobies mésophiles, des levures et des moisissures présentes dans les cosmétiques. Ce contrôle s'effectue par dénombrement des colonies sur milieu gélosé après une incubation aérobie en milieu de culture liquide ou par vérification de l'absence de croissance après enrichissement. Les germes aérobies mésophiles correspondent aux micro-organismes qui se développent en présence d'oxygène à des températures autour de 30°C le plus souvent. Le second contrôle correspond au challenge test qui permet, quant à lui, de vérifier l'efficacité des conservateurs antimicrobiens. Il consiste en la contamination volontaire d'un produit cosmétique par différents micro-organismes introduits en quantité connue. La viabilité de ces micro-organismes dans le produit est ensuite évaluée à 1, 2, 3, 7, 14 et 28 jours par dénombrement sur milieu gélosé. Les micro-organismes utilisés dans le « challenge-test » sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Escherichia coli* (dont une description succincte est donnée au paragraphe I.3.1). Ces deux contrôles sont recommandés par la législation et imposent un délai d'attente d'au moins 28 jours associé à un important volume d'analyses.

D'autres méthodes de détection et de dénombrement ont été développées dans le but d'alléger le procédé du challenge test permettant ainsi de réduire les délais entre les développements de formules et la validation des tests microbiologiques. C'est le cas du système vendu par BioLumix¹⁴ ou du BacT/Alert 3D commercialisé par BioMérieux¹⁵ qui permettent le suivi de croissances de bactéries, de champignons et de levures en temps réel. Le principe de ces outils repose sur l'association d'un capteur à CO₂ et d'un capteur optique. En effet, le CO₂ dégagé par les micro-organismes pendant leur développement diffuse à travers une matrice solide de polymère et acidifie le milieu de révélation par la formation d'acide carbonique. Au moyen d'une sonde chromophore, la variation du pH induit un changement de couleur du milieu qui reflètera la quantité de CO₂ dégagée par une population donnée de micro-organismes (Figure I.3-3). Après calibration, il est alors possible de quantifier la population de micro-organismes initialement présents dans le produit cosmétique considéré. Ces appareils de mesures sont utilisés en laboratoire de

¹⁴ <http://www.mybiolumix.com>

¹⁵ <http://www.biomerieux.fr/>

développement ou par les laboratoires dédiés à l'évaluation des produits cosmétiques principalement pour réaliser des criblages. Ces méthodes commercialisées « clé en main » permettent d'éviter les étapes chronophages et coûteuses de préparation des milieux de culture, de dilutions des échantillons et de comptage lors des dénombrements et donc de limiter l'utilisation de nombreux consommables (milieux, boîtes de pétri, etc.). Elles nécessitent cependant une calibration préalable permettant de relier la quantité de CO₂ mesurée à une concentration connue et ce pour chaque souche étudiée.



Figure 1.3-3. Flacons utilisés pour la détection du CO₂ avec le système BioLumix (à gauche) et BacT/Alert 3D (à droite). Sources : www.mybiolumix.com et www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/bactalertr-3d-systeme-de-detection-microbienne.

Il existe aussi de nombreuses autres techniques physiques (acoustiques [72], [73], de fluorescence [74], électriques [75]) développées par les laboratoires de recherche afin de suivre la croissance bactérienne, mais la transposition à des milieux complexes tels que les émulsions ou encore pour un usage à une échelle industrielle reste encore délicate.

1.3.2.2 Méthodes alternatives permettant de limiter le développement de micro-organismes

Comme mentionné précédemment, plusieurs conditions environnementales doivent être réunies pour permettre la viabilité et la prolifération des micro-organismes dans une émulsion cosmétique. Ces conditions diffèrent en fonction de la souche microbienne considérée. Ceci laisse à penser qu'en faisant varier « correctement » l'organisation intrinsèque et les propriétés physico-chimiques des formulations, il serait possible de limiter, ou mieux d'empêcher, le développement de ces micro-organismes. Et c'est sur cette

hypothèse que certains développements de formules se font pour réduire les éventuelles contaminations.

Par exemple, l'eau est le constituant majoritaire de la plupart des produits cosmétiques. Elle influence la structure, l'apparence, la conservation, etc., des cosmétiques, mais elle permet aussi aux bactéries de se développer et de dégrader les composants des produits. Il n'est donc pas étonnant que l'un des critères les plus importants pour contrer le développement bactérien soit la mesure de la quantité d'eau suffisante et disponible pour la croissance de micro-organismes, les réactions chimiques, biochimiques ou un changement d'état. Cette quantité d'eau nécessaire qualifiée d'« eau libre » ou « eau disponible » [76] est estimée par l'activité de l'eau a_w (cf. paragraphe I.3.1). Ainsi, en termes de formulation, il est possible de réduire l'activité de l'eau en utilisant des molécules qui vont capter les molécules d'eau, soit en formant des liaisons hydrogènes avec l'eau (des humectants tels que le glycérol, le propylène glycol ou le sorbitol, etc.), soit en réduisant la mobilité de l'eau (des polymères tels que la gomme de xanthane, la gomme de guar, etc.) [71]. Le laboratoire Novexpert¹⁶ développe des produits sans conservateurs au moyen d'une production assurant la stérilité de leurs produits, associée à l'utilisation d'un gélifiant breveté mettant ainsi en évidence l'efficacité de mélanges de pentylène glycol et d'Acnacidol BG¹⁷ contre les pollutions microbiennes et ceci pour des faibles doses de 2 à 4%. Les effets désagréables (collant) des polyols sur la texture et la sensorialité sont donc limités ainsi que le coût du produit [77].

Il est également possible d'influer sur la prolifération microbienne en jouant avec les autres matières premières qui composent une émulsion. En effet, certains tensioactifs [78], [79], acides gras, esters (glyceryl caprate, glyceryl caprylate, glyceryl laurate)¹⁸ et chélatants (molécules utilisées en parfumeries) [80] ont des propriétés antimicrobiennes ou permettent de renforcer celles du conservateur. C'est ainsi le cas pour le polysorbate 80¹⁹ qui est une molécule tensioactive très largement utilisée dans les formulations cosmétiques mais également dans la préparation des aliments et des médicaments à des concentrations comprises généralement entre 0,1 et 5%. Il a été montré qu'à des concentrations dix fois plus

¹⁶ <http://www.novexpert-lab.fr>

¹⁷ Pentylène glycol (nom INCI) : 1,2-dihydroxypentane (nom chimique), numéro CAS : 5343-92-0 ; Acnacidol BG : butylene Glycol (and) 10-Hydroxydecanoic Acid (and) Sebacic Acid (and) 1,10-Decanediol.

¹⁸ Glyceryl caprate (nom INCI), numéro CAS : 26402-22-2 ; glyceryl caprylate (nom INCI), numéro CAS : 26402-26-6 ; glyceryl laurate (nom INCI) : 2,3-dihydroxypropyl laurate (nom chimique), numéro CAS : 27215-38-4 / 142-18-7

¹⁹ Polysorbate 80 (nom INCI) : polyoxyéthylènesorbitan monooléate (nom chimique), numéro CAS : 9005-65-6.

faibles, le polysorbate 80 était capable d'inhiber la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sur des surfaces solides. En revanche, le polysorbate 80 apparaît être sans effet sur le mode de croissance planctonique des bactéries et ses propriétés anti biofilm n'ont pas été testées dans un fluide complexe tel qu'une émulsion [81], [82].

Outre le fait de vouloir éviter le développement des micro-organismes au cours de la fabrication d'un produit, il est possible de les éliminer après fabrication via des méthodes de stérilisations. Il en existe de nombreuses, mais la stérilisation à Ultra Haute Température (UHT) est la plus emblématique car elle est déjà utilisée depuis très longtemps en agroalimentaire notamment pour le conditionnement des produits lactés. Le procédé UHT a été breveté pour une utilisation cosmétique par les laboratoires Dermatherm en 2007 [83]. Cette méthode de stérilisation implique un passage rapide à haute température (135°C pendant 3 à 7 s), suivi d'un refroidissement immédiat du produit. Elle est effectuée directement après production, puis les produits sont conditionnés dans des packagings de type airless²⁰ munis en plus d'un bouchon antimicrobien (contenant un antiseptique) [70]. Cependant, ce procédé n'est pas applicable à tous les types de produits cosmétiques, car il est réservé aux textures fluides capables d'être distribués par la pompe airless.

Depuis quelques années, la technique d'homogénéisation à haute pression (HHP) généralement utilisée pour la formation des nanoémulsions en cosmétique [17], [84], [85] ; représente une nouvelle alternative à la stérilisation des émulsions en agroalimentaire [85]–[87] et tend à s'étendre à l'industrie cosmétique. En agroalimentaire, c'est le traitement à haute pression hydrostatique ou pascalisation qui apparaît comme alternative à la pasteurisation par UHT pour la conservation des aliments. Elle inactive rapidement les micro-organismes végétatifs et, comme elle peut être appliquée à basse température, les produits traités sous pression ont généralement une qualité nutritionnelle et sensorielle mieux préservée. Cependant, la mise en œuvre de cette technologie à ultra-haute pression est entravée par des coûts d'investissement élevés, dus aux pressions d'utilisation élevées (200-500 MPa) nécessaires pour une inactivation efficace des micro-organismes pathogènes. Par conséquent, la pascalisation n'est économiquement rentable que pour les produits ultra-frais tels que les jus de fruits, la charcuterie, les fruits de mer, des produits de luxe non pasteurisables [88].

²⁰ Procédé de distribution par lequel un produit cosmétique est pulvérisé sans air par une haute pression. Ce système est également très utilisé pour l'application de peinture.

En agroalimentaire le principe de la « hurdle technology » est très largement utilisé. Il consiste à créer un environnement hostile pour les micro-organismes grâce à une combinaison de méthodes de conservation différentes [89]. Par exemple, de nombreuses espèces bactériennes gram-positives sont intrinsèquement sensibles à certains peptides ou lysozymes, alors que les bactéries gram-négatives sont généralement protégées en raison de la présence de leur membrane externe imperméable. L'utilisation de la haute pression élargit alors la gamme antimicrobienne de ces composés en perméabilisant la membrane externe [90]. L'étude de l'action synergique de peptides et lysozymes modérément concentrés associée à la technique de stérilisation haute pression, semble être une approche prometteuse pour renforcer l'effet antimicrobien des produits à des pressions plus faibles donc moins coûteuses dans les aliments non acides [91]–[95]. Il s'agit de stopper la croissance microbienne par l'accumulation de diverses contraintes qui doivent chacune, l'une après l'autre, permettre de réduire leur population.

La stérilisation par autoclave quant à elle est largement utilisée pour les dispositifs médicaux, en laboratoire de microbiologie. Il s'agit d'une stérilisation par la vapeur d'eau. En revanche, son utilisation pour la stérilisation des émulsions est complexe car elle peut induire des phénomènes déstabilisant l'émulsion. L'autoclave nécessite donc le développement de formules spécifiques qui résistent aux 121°C sous une faible pression (2 bar, au regard de celle imposée par les stérilisations par haute pression) et pour une durée de 15 à 20 minutes imposées par cette méthode [96], [97].

Enfin, pour préserver la stérilité du produit cosmétique, le choix du contenant, autrement dit du packaging, est crucial. En effet, des packagings spécifiques ont été élaborés afin de limiter au maximum la pénétration des micro-organismes présents dans l'air ou introduits par le consommateur. Il s'agit de systèmes de fermeture (capuchons et embouts) qui protègent ainsi le produit avant et après ouverture en limitant les contacts avec l'environnement extérieur. Les plus répandus utilisent des pompes dites airless, comme système de sortie du produit ; cela permet de s'affranchir des contaminations extérieures en limitant les entrées d'air lors de l'utilisation du produit et garantis une formule stérile uniquement si les systèmes de remplissage à la fabrication ont été assemblés sous atmosphère stérile. Il existe également d'autres dispositifs de fermeture spécifique, notamment le D.E.F.I. (Device for Exclusive Formula Integrity), développé pour la marque

Avène® et breveté par le laboratoire Pierre Fabre²¹, d'une étanchéité totale (avec absence de volume mort) empêchant les entrées d'air dans le contenant.

En conclusion, le respect des bonnes pratiques de fabrication (BPF) et l'utilisation d'un emballage approprié en combinaison avec le contrôle de facteurs cruciaux pour la croissance des micro-organismes, peuvent considérablement réduire la quantité de conservateurs traditionnels (chimiques) ou dans d'autres cas les remplacer. L'association de toutes ces méthodes selon le principe de la « hurdle technologie » semble représenter une solution attrayante pour les industriels [71], [80]. Mais certains inconvénients demeurent : soit des points de vue financier et de transposition à une échelle industrielle ; soit en imposant des contraintes de formulation limitant les bénéfices sensoriels du produit (car bien évidemment tous les produits ne sont pas adaptés à tous les systèmes de stérilisation). Une meilleure compréhension des interactions entre la structure des émulsions et les micro-organismes, offrirait alors plus de liberté dans le développement des formules micro-biostatiques.

I.3.3 Prolifération des micro-organismes en milieux complexes

Les premières études du comportement des micro-organismes en milieu complexe ont été menées dans des gels (agar, gélatine, etc.). L'objectif était alors de comprendre l'influence d'un réseau tridimensionnel sur leur développement. Il a été démontré que la modification de la structure d'un milieu perturbe la croissance des micro-organismes sans l'inhiber pour autant. En milieu homogène, les micro-organismes ont préférentiellement une croissance planctonique, tandis qu'en milieu complexe ils vont se développer plutôt sous la forme de colonies voire de biofilms. La forme et la taille des colonies sont directement liées à la disponibilité des nutriments du milieu et à la structuration du réseau qui forme des pores de diamètres plus ou moins grands permettant ou non la motilité des bactéries et la diffusion des nutriments. Dans le cas d'un gel, l'augmentation de la concentration des unités constituant le réseau induit une modification de la forme des cellules ou des colonies qui vont avoir tendance à se développer sous forme de micro-colonies avec des morphologies différentes (sphériques, convexes, etc. ; Figure I.3-4) [98]–[100]. L'immobilisation des micro-organismes dans une zone limitée conduit à des diminutions locales du pH et de a_w ; cela peut provoquer des modifications aussi bien morphologiques que physiologiques des micro-

²¹ <https://www.eau-thermale-avene.fr/lunite-de-production>

organismes [101], [102]. Tout cela mis bout à bout a pour conséquence la diminution du taux de croissance et la diminution de la concentration des micro-organismes lorsqu'ils atteignent leur phase stationnaire [103], [104].

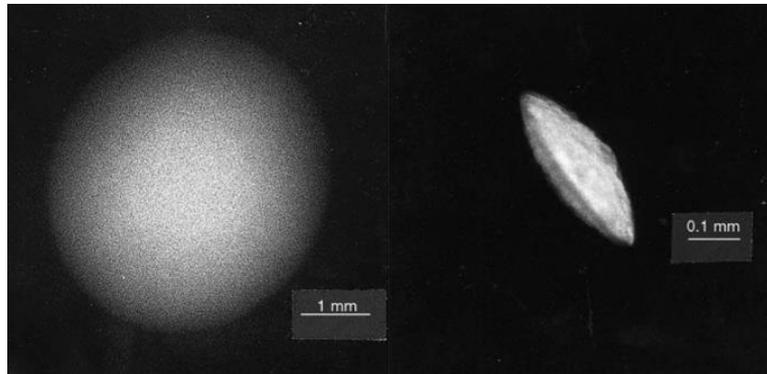


Figure I.3-4. Images de microscopie électronique à transmission montrant les morphologies de colonies de *Pseudomonas aeruginosa* après 24 h passées dans un gel d'agar : à 0,5% (morphologie sphérique, à gauche) ; à 1% (morphologie convexe, à droite) [100]. Les colonies convexes ont une densité plus élevée en cellules bactériennes.

Lorsque l'on s'intéresse à la contamination microbienne des émulsions, il est donc évident que leurs structures encore plus complexes influent également sur la croissance microbienne (le temps de génération). On retrouve alors des comportements similaires à ceux décrits dans le cas des gels. La survie et le développement des micro-organismes sont directement liés à la composition de la phase aqueuse qu'ils occupent [103], mais également à l'environnement créé par la phase dispersée. Dans le cas des émulsions H/E, pour des produits laitiers, la phase grasse (lipidique principalement) dispersée impose l'organisation interne de l'émulsion et par conséquent affecte la croissance des bactéries en fonction de la nature, de la concentration (du nombre) et de la taille des gouttelettes (de leur morphologie). A faible concentration lipidique, les bactéries ont tendance à croître sous forme planctonique (cellules bactériennes isolées et libres). En revanche, à forte concentration (au-delà de 80% d'huile), les bactéries tendent à former des colonies entre les interstices laissés libres par les gouttelettes [105]. Les équipes de Brocklehurst et Parker (1995) [106], [107] ont observés des colonies *in situ* de *Listeria monocytogenes* et ont montré que les colonies formées à partir d'une seule bactérie se déployaient en déplaçant les gouttelettes des émulsions H/E. Les micro-organismes ayant des architectures très

différentes sont capables de s'adapter à un environnement complexe (Figure I.3-5) [98], [108] et d'influencer, de modifier, ces architectures.

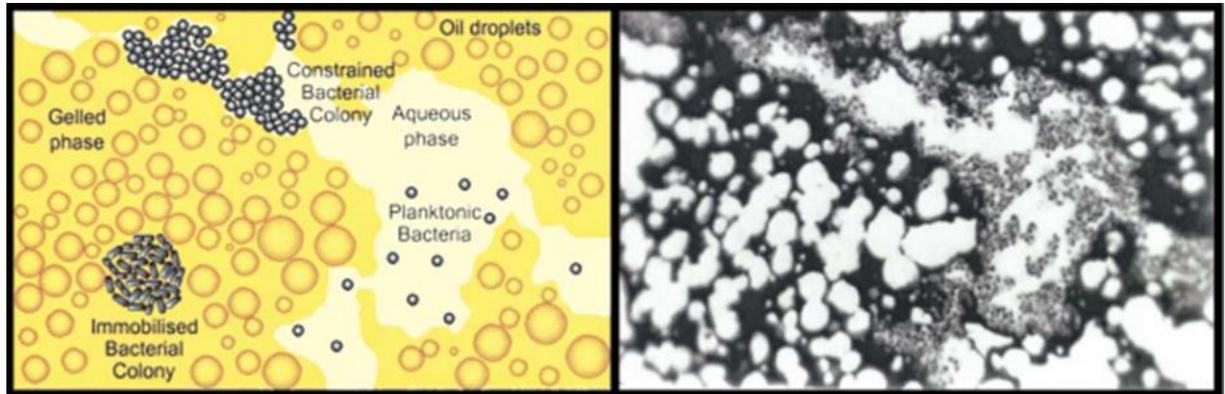


Figure I.3-5. Schéma (à gauche) et image micrographie optique (à droite) montrant la croissance d'une population microbienne mixte (bactéries lactiques, coliformes et staphylocoques) dans un échantillon de fromage [108], [109]. Le fromage, considéré comme un fluide complexe, est réalisé à partir de lait se trouve être une émulsion.

En effet, la physiologie des bactéries est modifiée en milieu complexe ; elles s'adaptent comme si elles étaient soumises à un stress induit par la présence des gouttelettes. Ce stress peut correspondre à une gêne stérique qui peut perturber l'accès des bactéries aux nutriments du milieu. Outre la présence des gouttelettes d'huile, la concentration de cette phase grasse semble également influencer. Dans l'étude menée par Prachaiyo et Mclandsborough [110], le temps de génération d'*Escherichia coli* (*E. coli*) augmente lorsque la concentration en hexadécane (composant la phase grasse) augmente au sein de l'émulsion, tandis que la densité des cellules en phase stationnaire diminue. Ils expliquent l'augmentation du temps de génération des bactéries dans les émulsions, d'une part, par la diminution de l'espace disponible, car l'espace entre les gouttelettes dans les émulsions (environ 1 à 2 μm) est similaire au diamètre des cellules bactériennes (environ 1 à 5 μm) et, d'autre part, par la limitation à l'accès aux nutriments étant donné que leur diffusion est plus lente dans les émulsions riches en huile. Chez *E. coli*, on note une production plus importante de structures extracellulaires protéiques nommées Curli lorsque les bactéries évoluent dans une émulsion par rapport à un milieu de culture liquide classique (Figure I.3-6) [110]. Ces Curli sont des complexes protéiques qui jouent un rôle important dans la formation et l'adhésion des biofilms d'*E. coli* [111], [112]. La croissance sous forme

planctonique ou de biofilm semble dépendre de la concentration en huile et du diamètre des gouttelettes [105], [106].

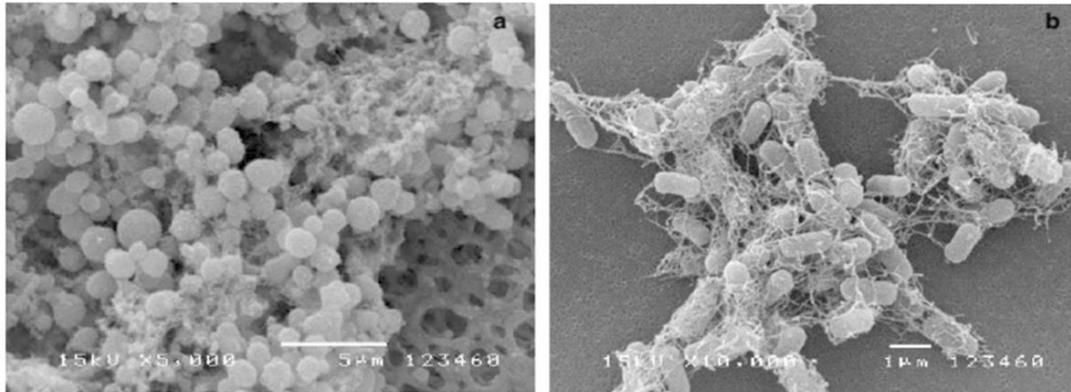


Figure 1.3-6. Images de microscopie électronique à balayage de colonies de E. coli 0157 H7 en phase stationnaire cultivées : dans un milieu de culture minimum complété par 0,4% de glucose (à gauche) et dans une émulsion à 40% à hexadécane complétée par 0,4% de glucose (à droite) [110]. Dans cette seconde émulsion, les colonies sont recouvertes de Curli.

Si on s'intéresse en particulier à la taille des gouttelettes, dans le cas des systèmes monophasiques stables tels que les microémulsions [113], l'une des interprétations suggère que ce sont des formules « auto-conservatrices ». Celle-ci repose sur le fait que dans les microémulsions, ayant une fraction volumique d'eau très faible, l'accès à l'eau pour les micro-organismes est limité car le peu d'eau présente n'est pas libre. Il semblerait même que la structure des microémulsions affecterait la structure, et donc la composition, des membranes bactériennes [114]. Notamment, les études menées par Al-Adham en 2000 décrivent les microémulsions comme des substances inhibant la croissance de souches bactériennes [115], [116]. Des travaux ont par ailleurs été effectués avec des nanoémulsions (dont le diamètre des gouttelettes d'huile est compris entre 0,1 à 1,0 µm). Ceux-ci ont tenté de montrer l'influence de la taille de gouttelettes d'huile ayant des propriétés antimicrobiennes (car contenant une huile essentielle aux propriétés antimicrobiennes comme actif) sur la prolifération bactérienne. Selon Terjung [117], la taille des gouttes semble avoir un impact sur l'inhibition de la prolifération des bactéries, les émulsions constituées de plus grosses gouttes ont une meilleure efficacité antibactérienne. À l'inverse, l'étude menée par Buranasuksombat [118] mentionne qu'il ne semble pas y avoir de lien entre la taille des gouttes et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles que ces gouttes

contiennent. Finalement, les différentes recherches sur l'effet de la taille des gouttelettes de la phase dispersée sur l'activité antimicrobienne montrent des résultats contradictoires.

Le développement des micro-organismes dans les milieux complexes que sont les émulsions est dépendant du type de micro-organisme considéré et des propriétés physico-chimiques de celles-ci, mais également de leur architecture à l'échelle microscopique. Il semblerait que leurs croissances puissent être perturbée et ralentie, aboutissant parfois à des changements de leurs physiologies ; cependant leur inhibition n'est pas totale.

I.4 CONCLUSION

L'industrie cosmétique offre un large choix d'émulsions possible ayant des compositions, des textures et, par conséquent, des structures internes différentes. Dans ce domaine, l'innovation est rendue possible notamment par la découverte et le développement de nouveaux ingrédients et de nouveaux procédés d'émulsification. Pour autant, l'optimisation de la stabilité physique d'un cosmétique au cours de son vieillissement (stockage, conservation, utilisation) demeure un objectif invariable et récurrent. Les phénomènes d'instabilités propres aux émulsions sont décrits et étudiés depuis de nombreuses années et les méthodes de caractérisations des produits cosmétiques évoluent pour une meilleure compréhension. Les phénomènes d'instabilités se déroulant à une échelle microscopique, voire moléculaire, leurs liens avec les propriétés macroscopiques ne sont pas toujours évidents à établir.

Le plus couramment, la composition et les données obtenues par mesures microscopiques et granulométriques sont confrontées aux propriétés physiques, notamment rhéologiques associées [119]–[121]. Cependant, des études plus récentes, commencent enfin à s'intéresser au lien entre la rhéologie et la « microstructure ». En effet, en 2017 Sharu et son équipe [122] mettent en évidence l'augmentation du module élastique avec la diminution de la tailles des gouttelettes et leur arrangement microscopique au sein de l'émulsion. Aussi, les travaux de Katépalli [123] sur des émulsions stabilisées par des particules de silice tentent de corrélérer la forme des gouttes dispersées et les interactions entre celles-ci avec les propriétés rhéologiques. Ils montrent une augmentation des propriétés viscoélastiques, liée aux interactions attractives entre les gouttelettes ; cette

augmentation est d'autant plus importante lorsqu'un réseau de gouttelettes et de particules de silice s'établit. Le terme de microstructure renvoie donc à la fois à l'organisation microscopique de l'émulsion et aux interactions qui en sont la cause.

C'est pourquoi l'étude de la structure des émulsions à travers le suivi des propriétés rhéologiques à différentes fréquences (donc échelles) d'investigation devrait permettre, par exemple, d'apporter des réponses supplémentaires pour appréhender les interactions, les évolutions d'un produit, et éventuellement faciliter le développement d'émulsions plus stables ou ayant une meilleure stabilité quelles que soient les conditions de production ou de conservation.

Par ailleurs, les contaminations microbiennes peuvent venir perturber la stabilité de ces fluides complexes que sont les émulsions, dans un contexte où l'utilisation des systèmes conservateurs est de plus en plus controversée. Des solutions alternatives sont actuellement à l'étude. Elles reposent principalement sur l'ajustement des paramètres physico-chimiques du produit (composition, pH, a_w , etc.) permettant d'inhiber la croissance des micro-organismes [124]–[126]. De surcroît, les interprétations courantes décrivant la croissance microbienne dans les émulsions reposent sur des conceptions d'ordre stérique : l'architecture des gouttelettes de la phase dispersée limitant la disponibilité en l'eau, l'espace et l'accès aux nutriments. La présence de réseaux complexes gélifiés et bi-phasiques entraîne l'immobilisation des bactéries qui sont contraintes à former des colonies ou des biofilms. Les critères de taille de gouttelettes et de concentration semblent être des facteurs très importants influençant le développement des micro-organismes dans les émulsions. Ces différentes explications laissent à penser qu'en faisant varier de façon idoine l'organisation intrinsèque et les propriétés physico-chimiques des émulsions, il serait possible de limiter, ou mieux, d'empêcher le développement des micro-organismes. C'est dans cette démarche que mon travail de thèse s'inscrit. L'étude de la structure des émulsions par des outils d'investigation multi-échelle, dont la rhéologie ultrasonore, devrait permettre d'apporter des réponses complémentaires aux travaux cités ci-dessus. En effet, en jouant sur l'organisation microscopique des émulsions, les rapports eau/émulsifiants/huile, ou la morphologie des gouttelettes dispersées (encombrement stérique, etc.), il serait ainsi possible d'établir un (des) lien(s) entre le domaine de stabilité et le contrôle microbiologique des émulsions cosmétiques.

Pour optimiser la formulation et comprendre le lien entre stabilité, structure et prolifération de bactéries possibles, on effectue généralement des mesures rhéologiques à très basses fréquences (de 0,1 à 100 Hz). Or, ce domaine de fréquences donne accès à une information volumique à une échelle macroscopique. Par conséquent de tels suivis des paramètres rhéologiques peuvent être insuffisants.

Le laboratoire SATIE a développé au cours de ces dernières années une technique de mesure à haute fréquence (de l'ordre de dizaine de MHz) permettant de remonter aux paramètres viscoélastiques de matériaux complexes, appelée rhéologie ultrasonore ou encore « microrhéologie ». Le suivi à haute fréquence permet ainsi d'obtenir les paramètres rhéologiques des constituants des fluides à une échelle microscopique ou du moins à une échelle inférieure à celle de la rhéologie classiquement utilisée (100 Hz au maximum). Le principe de mesure de cette technique sera plus amplement détaillé dans le chapitre 2.

De nombreuses études utilisant la microrhéologie ont déjà été menées, notamment pour le suivi de la formation de biofilms bactériens dans un milieu de culture enrichi, mais aussi pour suivre la polymérisation de fibres amyloïdes de protéines impliquées dans des pathologies dites de conformation comme la maladie d'Alzheimer [127], ou encore pour suivre la formation d'un yaourt [128]. Dans le cas des émulsions, l'intérêt est de pouvoir observer le comportement de ces fluides complexes à une échelle d'investigation microscopique. En effet, les méthodes classiques de caractérisation des produits cosmétiques permettent d'obtenir des informations structurales à l'échelle du micromètre, voire du nanomètre, grâce à la microscopie optique ou la granulométrie par exemple, et à une échelle macroscopique avec la rhéologie conventionnelle. En dépit de toutes les techniques utilisées, l'industrie cosmétique peine parfois à établir un lien entre le comportement macroscopique d'une émulsion et sa structuration microscopique.

La microrhéologie est un outil, supplémentaire, que nous comptons utiliser afin de mieux appréhender les évolutions de textures et d'anticiper les phénomènes d'instabilité d'une part, mais d'autre part également dans l'objectif de détecter la présence de microorganismes et leur croissance au sein des émulsions.

Chapitre II MATERIELS ET METHODES

Le suivi et l'analyse des propriétés structurales à l'échelle microscopique pour une optimisation simultanée de la stabilité d'une émulsion et de sa capacité naturelle à ne pas favoriser la prolifération de micro-organismes (c'est-à-dire à éviter l'emploi de conservateur) sont les buts visés par mes travaux. Ces objectifs supposent une bonne compréhension des interactions à cette échelle d'investigation entre la phase continue et la phase dispersée dans des émulsions cosmétiques et de leur organisation structurale. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des protocoles de recherches précis et judicieusement sélectionnés afin d'examiner au mieux les propriétés des émulsions. Ces protocoles incluent une validation par la mesure de plusieurs grandeurs physiques caractéristiques des milieux complexes considérés et de leurs évolutions à différentes échelles.

En dépit de toutes les techniques disponibles, l'industrie cosmétique peine parfois à établir un lien entre le comportement macroscopique d'une émulsion et sa structuration microscopique. En effet les méthodes classiques de caractérisation des produits cosmétiques permettent d'obtenir des informations structurales à l'échelle du micromètre, voire du nanomètre, grâce à la microscopie optique ou la granulométrie par exemple.

Outre les techniques rhéologiques classiquement utilisées, la méthode moins conventionnelle de mesure microrhéologique par ondes ultrasonores sera présentée dans ce chapitre. Dans le cas des émulsions, l'intérêt serait de pouvoir étudier les interactions intrinsèques entre les phases continues et dispersées à une échelle d'investigation microscopique et ainsi pouvoir suivre toute modification structurale induite par des micro-organismes présents et par instabilité.

II.1 FORMULATION DES EMULSIONS

Pour mener à bien cette étude, nous avons fait le choix de travailler avec des formulations de compositions très simples afin de limiter les variables. Le support d'étude est une émulsion huile dans eau (H/E) composée uniquement d'une huile synthétique dispersée dans une phase aqueuse gélifiée. La dispersion est stabilisée par un système de deux émulsifiants seulement. Le gélifiant est un carbomère synthétique dont le réseau se

déploie dans l'eau. Les formules ne contiennent ni conservateur, ni antioxydant, ni actif ou parfum, qui sont des constituants minoritaires en termes de proportion entrant dans la composition des crèmes ou des émulsions.

II.1.1 Choix des matières premières

Le choix de matières premières synthétiques pour les émulsions repose sur la volonté de disposer d'ingrédients ayant des caractéristiques physico-chimiques stables contrairement aux ingrédients naturels. De plus, l'intérêt est également d'utiliser des matières premières qui entrent très largement dans la composition des émulsions commercialisées et connues par l'industrie cosmétique.

II.1.1.1 L'eau

Premier ingrédient et non des moindres puisqu'il est majoritaire en masse dans la quasi-totalité des produits cosmétiques. Le choix s'est porté sur une eau stérilisée de qualité milliQ® : eau de qualité constante et contrôlée.

II.1.1.2 Le gélifiant : les polymères et copolymères d'acide acryliques

Les polymères hydrophiles utilisés dans les émulsions cosmétiques jouent généralement le rôle d'épaississant, de gélifiants, permettant de stabiliser les formules [122], [123]. Lors des développements de formules, nous avons utilisé divers polymères ayant des structures et de propriétés variables.

Le Carbopol ETD2050 (CETD) et le Carbopol Ultrez 10 (CU10), (*noms INCI : carbomer*), sont des homopolymères d'acide acrylique réticulé (Figure II.1-1) fournis par Lubrizol. Ils ont l'avantage, dû à leur groupement acide carboxylique, d'être faciles à disperser dans la phase aqueuse et ainsi d'augmenter les paramètres viscoélastiques pour de très faibles concentrations. Les concentrations usuelles pour une utilisation cosmétique sont de l'ordre de 0,3 à 1% (les pourcentages indiquent des proportions en masse, sauf mention contraire) dans les gels et comprises entre 0,2 et 0,6% dans les émulsions. Ces deux polymères se

différencient entre autres, par leur degré de réticulation plus élevé pour le CU10 que pour le CETD.

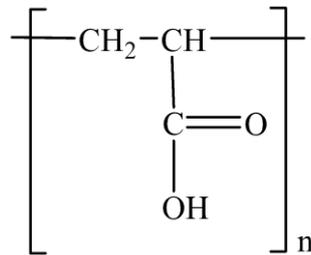


Figure II.1-1. Structure du motif acrylique.

Le Carbopol Ultrez 21 (CU21) et le Pemulen TR-1 (PEM-TR1), (*noms INCI : Acrylate/C10-30 et alkyl acrylate crosspolymer* respectivement) sont des copolymères dérivés de l'acide acrylique ou méthacrylique associé à une longue chaîne d'alkyl acrylate (Figure II.1-2). Leurs concentrations d'utilisation dans les émulsions varient entre 0,3 et 0,6%.

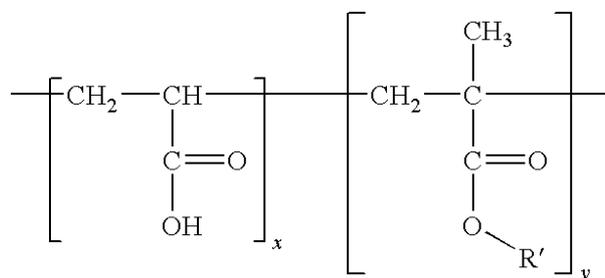


Figure II.1-2. Structure des monomères d'acrylate et d'alkyl acrylate (R' : groupes alkyl à longues chaînes).

Pour les trois types de Carbopol, la formation d'un réseau tridimensionnel passe par une ionisation des fonctions carboxylates grâce à une neutralisation avec une base (ici, la soude) ; les fonctions carboxylates ainsi formées permettent de déployer le polymère par répulsions électrostatiques à travers toute la formulation. L'assemblage et l'empilement de tout ce qu'on appelle des « microgels²² » constituent le gel [122]. Ces polymères se

²² Les microgels représentent des pelotes de gels sous formes colloïdales. Ce sont les interactions entre les différents microgels (liaisons hydrogènes, électrostatiques, etc.) qui vont influencer sur les propriétés mécaniques et optiques de l'hydrogel global [132].

différencient par leur structure chimique, c'est-à-dire la longueur des groupements alkyles, ainsi que par leur degré de réticulation permettant la formation de réseaux tridimensionnels plus ou moins denses dans les émulsions. En effet, comme l'atteste la Figure II.1-3, ces différents Carbopols ont des propriétés rhéologiques distinctes et ce sur une large gamme de pH.

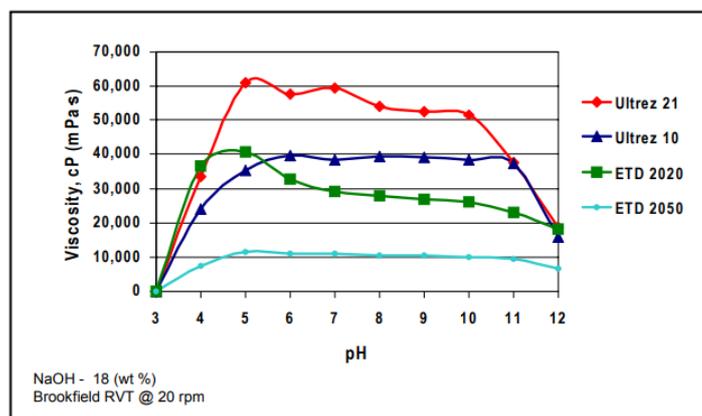


Figure II.1-3. Effet du pH sur la viscosité à 25°C pour différents Carbopol dispersés dans l'eau (0,5%). La neutralisation a été réalisée avec de la soude à 18% et les mesures de viscosité avec un viscosimètre Brookfield RVT. Source : Fiche technique du Carbopol Ultrez 21 datant du 6 Novembre 2002, Lubrizol.

Les chaînes alkyles portées par les carbopols permettent une meilleure stabilisation par la formation de microgels adsorbés autour des gouttelettes d'huiles. En ce qui concerne le Pemulen TR-1 par exemple, il est constitué de très longues chaînes hydrophobes offrant une affinité pour la phase grasse et par conséquent, il possède des propriétés à la fois gélifiante et émulsionnante.

II.1.1.3 L'huile : le palmitate d'isopropyle

Le palmitate d'isopropyle (nom INCI : *Isopropyl palmitate*, IPP, numéro CAS : 142-91-6) est une huile synthétique incolore et inodore fournie par BASF. Elle est obtenue par l'estérification de l'acide palmitique et de l'alcool isopropyle (Figure II.1-4).

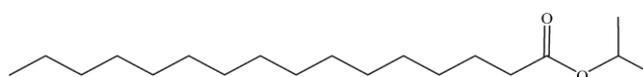


Figure II.1-4. Structure de l'IPP (densité à 20°C de 0,852 g.cm³ et HLB requis = 11,5).

II.1.1.4 Les tensioactifs

Les tensioactifs utilisés pour la formation des émulsions cosmétiques sont généralement des tensioactifs non ioniques autrement appelés émulsifiants. Ils permettent alors la stabilisation des gouttelettes d'huiles (émulsions H/E) dans la phase aqueuse. Ils présentent l'avantage d'être plus doux pour la peau et par conséquent ils conviennent à une application cutanée sans rinçage.

Les émulsifiants Eumulgin SMO 20 (*nom INCI : polysorbate 80, P80*, numéro CAS : 9005-65-6) et Cutina GMS (*nom INCI : glyceryl monostearate, GMS*, numéro CAS : 50825-78-0) sont des tensioactifs non ioniques fournis par BASF. Il est important de noter que le P80 a une tête polaire volumineuse et joue le rôle d'émulsifiant tandis que le GMS, dont la tête polaire est moins volumineuse, vient renforcer l'action de l'émulsifiant principal sur les gouttelettes huileuses en s'intercalant entre les molécules de P80 et joue donc le rôle de co-émulsifiant. Il est courant d'utiliser des couples d'émulsifiants pour stabiliser au mieux les émulsions [124] (Figure II.1-5).

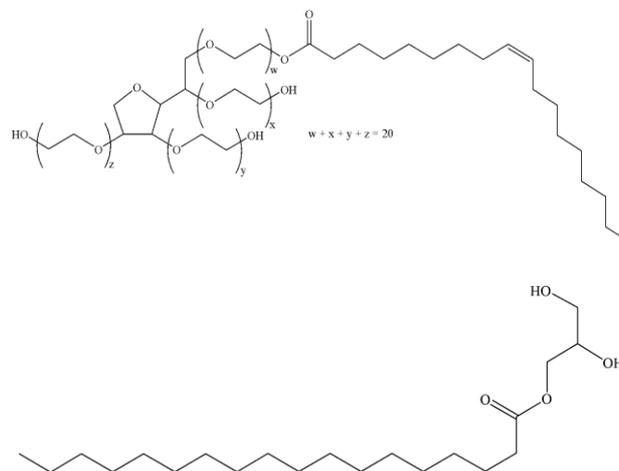


Figure II.1-5. Structure du P80 (en haut) et du GMS (en bas).

Ces deux tensioactifs sont largement utilisés dans l'industrie cosmétique pour stabiliser les émulsions et améliorer leurs textures. Le P80 (HLB = 15) est utilisé habituellement comme émulsifiant et tensioactif. Le GMS (HLB = 3,8) est régulièrement utilisé comme agent épaississant, émulsionnant, antiagglomérant et conservateur.

Dans le cadre du développement d'une formule stable après stérilisation par autoclave, nous avons également utilisé l'émulsifiant Brij™ S721 MBAL-PA-(SG) (*nom INCI : steareth 21, Brij*) fourni par CRODA. Il s'agit également d'un éther gras de polyoxyéthylène dérivé d'alcools stéariques (tensioactif non ionique HLB = 15,5) dont la structure est représentée dans la Figure II.1-6.

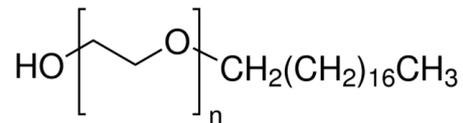


Figure II.1-6. Structure du steareth-21 ($n = 21$).

II.1.2 Détermination des proportions par le calcul du HLB et optimisation de la formule

L'émulsion, dont le protocole de formulation est présenté ci-dessous (Tableau II.1-1), sera nommée par la suite « émulsion de référence ». Il s'agit d'une émulsion dont la formulation définitive a été obtenue suite à un processus de développement faisant varier le rapport huile/tensioactif permettant d'aboutir à une émulsion stable. Afin d'être guidée dans les premiers essais de formulation de cette émulsion, je me suis appuyée sur le principe du calcul de HLB décrit dans le chapitre précédent.

Le HLB requis de l'huile (IPP) étant de 11,5 ; il convient donc d'utiliser un rapport massique relatif 70/30 (P80/GMS) afin d'optimiser la stabilité de l'émulsion. En effet pour rappel, les valeurs de HLB sont les suivantes : P80 (HLB = 15) et GMS (HLB = 3,8). Et selon la théorie de Davies et Rideal, le calcul des rapports permet d'obtenir une valeur de HLB proche de celle requise pour l'IPP :

$$\text{HLB}_{\text{mélange}} = (70/100) \times 15 + (30/100) \times 3,8 = 11,64$$

Nous avons donc utilisé un rapport relatif de 70% de P80 pour 30% de GMS. De plus, une phase d'optimisation de formule a permis de déterminer la quantité globale de tensioactifs fixée à 6% pour stabiliser l'émulsion contenant 15% d'IPP. En effet, le choix d'une émulsion à 15% d'huile reposait sur la volonté d'obtenir une émulsion simple diluée et de texture pas trop épaisse. Pour une concentration d'huile fixée à 15%, des émulsions ont

été réalisées avec des concentrations croissantes en système émulsionnant (P80+GMS) afin de déterminer quelle formulation était la plus stable.

II.1.3 Protocole de formulation et émulsion de référence

Le protocole de formulation a été mis en place avec pour objectif d’avoir un protocole indépendant des changements de matières premières et d’assurer au mieux la reproductibilité des différentes émulsions formulées au cours de la thèse.

Toutes les matières premières sont pesées avec une balance de précision ($d = 0,0001$ g), excepté l’eau pour laquelle est utilisée une balance de précision moindre ($d = 0,01$ g). L’eau utilisée est de qualité milliQ®. Les pourcentages des matières premières utilisées pour l’émulsion de référence ont été définis suite à une phase de développement dont l’objectif était d’obtenir une émulsion stable macroscopiquement sur deux mois au moins.

Noms commerciaux	Noms INCI	Fournisseurs	% (masse)
Phase A			
Eau	<i>water</i>	-	78,7
Carbopol ETD2050	<i>carbomer</i>	LUBRIZOL	0,3
Phase B			
Isopropyl Palmitate	<i>isopropyl palmitate</i>	BASF	15
Eumulgin SMO 20	<i>polysorbate 80</i>	BASF	4,2
Cutina GMS	<i>glyceryl stearate</i>	BASF	1,8
TOTAL			100

Tableau II.1-1. Liste des matières premières et leurs pourcentages au sein de l’émulsion de référence.

Le Carbopol ETD 2050 est déposé dans un bécher avec l’eau et mis de côté un moment pour lui laisser le temps de se disperser (phase A). Tous les ingrédients de la phase B sont déposés dans un second bécher. Puis parallèlement, les deux phases sont chauffées à 80°C avec une agitation modérée (avec un barreau aimanté à 400 rpm). Lorsque les deux phases sont bien liquides et homogènes visuellement, qu’elles ont atteint 80°C, la phase B est incorporée à la phase A, puis le tout est mis sous agitation à l’ultra Turrax T 18 IKA (rotor-stator S18N-19G) pendant 10 minutes à 10000 rpm. L’émulsion est laissée à refroidir jusqu’à atteindre la température ambiante sous agitation modérée (200 rpm) à l’aide d’une

quadripale (IKA Eurostar 40 digital). Afin de limiter la perte en eau par évaporation, les béchers sont systématiquement recouverts avec du papier aluminium au cours de la chauffe, de l'émulsification et de la phase de refroidissement. Une fois l'émulsion revenue à température ambiante, le pH est ajusté avec de la soude (NaOH à 10% en masse) jusqu'à atteindre une valeur comprise entre 6,5 et 6,8.

L'émulsion ainsi formée est conservée à 25°C (à l'étuve) pendant 24 heures afin de s'assurer de sa maturation (organisation des particules dispersées, murissement d'Ostwald). Le lendemain (J_{+1}), le pH est contrôlé et ajusté au besoin. Cette formule de référence représente une émulsion pivot à partir de laquelle des modifications de rapports ou de constitution de matières premières seront effectuées dans le cadre des différentes manipulations réalisées. Le protocole de formulation demeure le même pour toutes les formules présentées dans la thèse.

A noter, le P80 a une concentration micellaire critique dans l'eau de 15 mg.L^{-1} (Sigma-Aldrich). Celle-ci est largement inférieure à la concentration du P80 dans les émulsions formulées (42 g.L^{-1}). Le GMS quant à lui, possède une concentration micellaire critique dans l'eau déterminée par mesure de conductivité [129] de $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ soit $16,1 \text{ g.L}^{-1}$. La concentration micellaire critique n'est donc pas atteinte pour cet émulsionnant.

II.1.4 Suivi organoleptique de la stabilité : stockage et vieillissement

Au cours du développement de l'émulsion de référence, afin de s'assurer de la stabilité dans le temps des différents essais, ceux-ci ont été placés en vieillissement accéléré. Le principe du vieillissement accéléré repose sur la Loi d'Arrhenius qui relie la constante de vitesse d'une réaction chimique à l'énergie d'activation nécessaire à la réalisation de cette réaction et à la température à laquelle la réaction est effectuée. Globalement, on considère que la vitesse de réaction est doublée pour une variation de température de 10°C [125].

Au cours de l'optimisation de la formule de référence, les essais sont alors soumis à différentes conditions de conservation, faisant varier la température et la luminosité. Dans des piluliers en verre transparents, 12 g d'émulsion sont déposés. Ces émulsions sont ensuite placées dans les différentes conditions indiquées dans le tableau ci-dessous et observées

régulièrement pendant deux mois. De plus, le pH, la conductimétrie et un suivi microrhéologique ont été régulièrement effectués sur cette période d'observation.

Conditions normales	Conditions extrêmes	Contrôles	Mesures, observations
25°C, obscurité	50°C, obscurité (étuve)	5°C, obscurité (réfrigérateur)	Caractéristiques organoleptiques, pH, conductivité, rhéologie, microrhéologie*
	25°C, lumière naturelle		

Tableau II.1-2. Conditions de stockage pour le suivi du vieillissement accéléré (* uniquement pour la formule de référence).

Les essais de formulation ont été soumis à une dégradation forcée par centrifugation (10 minutes, 10 621 g, à température ambiante) le lendemain de la formulation afin de déterminer les conditions de rupture de stabilité. Les essais, ayant présenté des démixtions après centrifugation, ont été considérés comme non stables. La résistance à la centrifugation dépend directement de la différence de densité entre la phase aqueuse et la phase huileuse, mais également du système émulsionnant. Une résistance à la centrifugation reflète l'efficacité du système émulsionnant présent dans la formule [130] [131]. A noter que les conditions de centrifugation (temps, vitesse de rotation, etc.) sont très variables en fonction des équipes de recherches (Tableau II.1-3). Notre choix s'est porté sur des conditions de centrifugation similaires à celles utilisées dans l'étude de Roland [3], à savoir : 10 minutes, 20 mL, à 25°C, 10 000 rpm (10 621 g correspondant à la vitesse maximale de l'appareil utilisé).

Vitesse de centrifugation (g ou rpm)	Température (°C)	Volume (mL)	Durée (min)	Références
1529 g- 10000 rpm	25	20	10	[3]
5000/10000/15000 g	5/20/40	-	20/40/60	[132]
3500 g	20	10	45	[133]
3000 rpm	25	10	30	[134]
2000/4000/12000 g	-	50	60	[135]

Tableau II.1-3. Conditions de centrifugations pour différentes études sur les émulsions.

Pour s'assurer de la stabilité des émulsions préparées par la suite, une observation est faite le lendemain de leur formulation, dans des conditions de stockage à 25°C dans l'obscurité.

II.2 CARACTERISATION MULTI-EHELLES DES EMULSIONS

Pour optimiser la formulation et la stabilité des émulsions, il est essentiel de caractériser les propriétés physiques et les interactions intrinsèques et extrinsèques à différentes échelles. Ces interactions influent en effet sur l'organisation interne des phases continues et dispersées et leurs évolutions en fonction des conditions de conservation ou d'utilisation. Les techniques couramment utilisées par l'industrie cosmétique permettent l'obtention d'informations dans une large gamme d'échelles. D'un point de vue microscopique et mésoscopique, la microscopie optique et les mesures physico-chimiques de pH et de conductivité par exemple sont classiquement utilisées. D'un point de vue macroscopique, on favorise souvent des mesures de viscosité qui permettent de s'assurer de la répétabilité et de la conformité des essais sans pour autant comprendre les phénomènes intrinsèques liés à la structure des émulsions et responsables des variations des propriétés viscoélastiques. Pour les analyses les plus macroscopiques, les mesures se rapprochant des sens humains, notamment les observations organoleptiques, sont également exploitées. Dans cette thèse, on cherche à corrélérer les mesures des propriétés rhéologiques réalisées à différentes échelles : rhéologie standard à basses fréquences (de 0,1 à 100 Hz) et à l'échelle microscopique par microrhéologie ultrasonore (quelques MHz).

II.2.1 Techniques de caractérisation classiques utilisées pour l'étude

Les premières mesures font appel aux techniques classiques de physico-chimie ; c'est-à-dire pH-métrie et conductimétrie. Elles sont réalisées pour s'assurer de la similarité des essais ou répliques d'émulsions réalisées.

Les mesures de pH sont réalisées avec un pH-mètre Hanna instrument (Edge kit pH HI2020) muni d'une électrode spécialement conçue pour les émulsions (HI10530) à 25°C. Les mesures de pH sont faites au moment de la formulation lors de l'ajustement du pH de l'émulsion à J_0 , puis le lendemain à J_{+1} pour vérification, puis lors des suivis en stabilité sur les premiers essais de formulation.

Un conductimètre type CORV 62 (Tacussel électronique) est utilisé pour les mesures de conductivité. Ces mesures donnent une information sur le type des émulsions (huile dans eau ou eau dans huile) et confirme qu'il n'y a pas eu d'inversion de phase pendant ou après la formulation. Elles sont réalisées à 25°C.

Afin d'observer l'arrangement des gouttelettes d'huile dans les émulsions et également avoir une idée de la taille de celles-ci, des images de microscopie optique sont réalisées avec un microscope Leica DMLB 100. Pour cela, 3 à 4 mg d'émulsion sont déposés entre lame et lamelle préalablement lavées avec un mélange Piranha (acide sulfurique H_2SO_4 /peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ; 4/1 en volume), puis rincées à l'eau et à l'éthanol et enfin séchées au four à 180°C. Les observations sont faites au grossissement $\times 63$ (soit un grandissement de $\times 0,77$ en tenant-compte du grossissement de l'oculaire) à température ambiante sur des lames préparées extemporanément.

Les mesures de granulométrie permettent de remonter à la taille (diamètre) et à la dispersion en taille (polydispersité) des gouttelettes d'huile contenues dans l'émulsion. Ce sont donc des informations supplémentaires qu'il est possible de confronter aux clichés microscopiques. Une dilution des échantillons est nécessaire pour permettre la mesure de la diffusion de lumière par les échantillons d'émulsions opaques, mais elle peut induire des changements physico-chimiques de l'environnement autour des gouttelettes et par conséquent conduire à des résultats qui ne reflètent pas l'organisation structurale telle qu'elle est dans les échantillons non dilués [3]. Dans le cadre de l'étude sur la structure des émulsions, les différentes émulsions formulées et ayant des concentrations croissantes en huile, demeurent opaques malgré les fortes dilutions pratiquées (au 200^e au moins). C'est pourquoi nous avons privilégié la microscopie optique pour donner une image de la morphologie des émulsions.

Une estimation de la taille des gouttelettes a été réalisée sur les échantillons non-dilués à l'aide d'un logiciel de traitement et d'analyse d'images (ImageJ®). Chaque élément (goutte) de l'image est détecté afin de mesurer son diamètre, les éléments se chevauchant et les éléments liés aux bords de l'image sont rejetés. Environ 400 éléments sont sélectionnés pour constituer la distribution granulométrique de chaque population de gouttes (nombre minimal requis pour assurer un échantillonnage correct d'une population d'éléments discrets).

L'évolution macroscopique des émulsions au cours de leur vieillissement est enfin validée par des observations organoleptiques. Ces observations consistent à apprécier à l'œil nu la couleur, la granulosité, la fluidité et la présence de démixtion ou d'un film huileux en surface des émulsions. On peut suivre également olfactivement la dégradation du parfum ou le rancissement des huiles présentes en leur sein, et éventuellement, opérer une rapide évaluation sensorielle par prélèvement et application. Ces critères sont facilement observables et permettent d'appréhender la dégradation et les instabilités des émulsions. Une émulsion stockée à 5°C dans l'obscurité a été utilisée comme référence.

Des observations sont réalisées au cours du développement de formules (vieillissement accéléré ou dégradation forcée par centrifugation), mais également après stérilisation afin d'évaluer l'impact de la stérilisation par autoclave sur les émulsions étudiées.

II.2.2 Rhéologie macroscopique (basse fréquence 1 Hz)

A l'échelle intermédiaire, ce sont les mesures rhéologiques que nous avons privilégiées. D'un point de vue macroscopique nous avons utilisé un rhéomètre classique à mouvements rotatifs et oscillants en régime continu et harmonique. Dans les deux cas, le fluide est soumis à des mouvements de cisaillement dont la sensibilité de mesure dépend des géométries des surfaces de cisaillement. On distingue trois grands types de géométrie différents : la géométrie plan-plan, la géométrie cône-plan et la géométrie cylindres coaxiaux (Figure II.2-1).

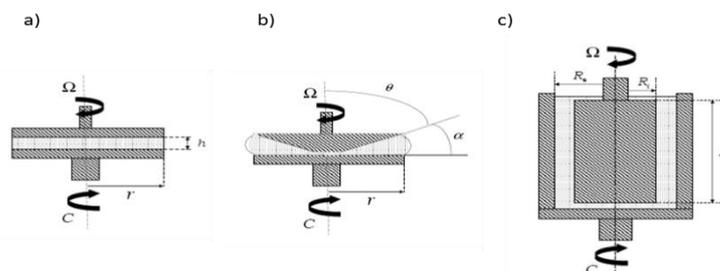


Figure II.2-1. Schéma des différentes géométries des rhéomètres : (a) plan-plan (h la hauteur de l'entrefer, r le rayon du disque) ; (b) cône-plan (α l'angle entre le cône et le plan horizontal, θ l'angle entre le cône et l'axe vertical, r le rayon du disque) ; (c) couette (R_i le rayon du cylindre interne, R_e le rayon du cylindre externe, H la hauteur du cylindre interne). Ω et C sont respectivement la vitesse de rotation en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ et le couple transmis en $\text{N}\cdot\text{m}$ [49].

Le rhéomètre utilisé est un rhéomètre Anton Paar Physica MCR 301 avec une géométrie cône-plan (CP40, diamètre de la géométrie supérieure = 40 mm ; angle = 1°, d = 0,08 mm) adaptée aux émulsions. Les échantillons ont été prélevés et déposés sur le plan métallique inférieur du rhéomètre à la spatule. Les mesures ont toutes été réalisées à 25°C (température contrôlée par effet Peltier).

Chaque expérience se décompose en trois phases de mesures : les deux premières phases d'initialisation permettent de s'affranchir du régime transitoire propre à chaque échantillon ; la phase suivante permet de mesurer les propriétés viscoélastiques en régime permanent continue ou harmonique. Cette phase permet de remonter à la viscosité apparente macroscopique et au caractère rhéofluidifiant de nos émulsions, ainsi qu'aux propriétés viscoélastiques et aux constantes de relaxation associées.

Ainsi la première phase de mesure correspond à une rotation en déformation imposée à une vitesse de cisaillement constante ($\dot{\gamma}$) de $0,1 \text{ s}^{-1}$ pendant 50 s. Suivi d'une deuxième phase correspondant à 20 s de repos. Ces deux premières étapes permettent d'appliquer un historique identique pour chaque échantillon mesuré. La troisième phase de mesures appliquée correspond à une rotation en contrainte de cisaillement imposée comprise entre 0,1 et 1000 Pa (échelle log, 6 points de mesure par décade, 10 s de mesure par point). Les données obtenues permettent le calcul de la vitesse (ou du taux) de cisaillement ($\dot{\gamma}$), de la viscosité apparente (η) et de montrer leur évolution en fonction de la contrainte (σ).

Les mesures en oscillation et déformation imposée donnent accès aux paramètres mécaniques à travers l'estimation des modules viscoélastiques G' et G'' qui correspondent respectivement aux modules de stockage et de perte à la fréquence d'étude. Un balayage en amplitude d'oscillations à fréquence constante est réalisé. On impose des oscillations en déformation imposée avec une déformation (γ) comprises entre 0,1 et 10000% à une fréquence constante de 1 Hz (échelle log, 6 points par décade, 10 s par mesure). La plage de viscoélasticité linéaire (DLVE) est déterminée alors par l'évolution de G' et G'' en fonction de ($\dot{\gamma}$). La réponse en vitesse d'oscillation variable, nous permet ensuite de déduire les temps de relaxation à l'échelle macroscopique caractéristiques des émulsions [136].

II.2.3 Microrhéologie (rhéologie ultrasonore ou haute fréquence)

D'un point de vue microscopique, nous avons utilisé la technique de mesure microrhéologique par ultrasons développée par le laboratoire SATIE. Elle utilise un capteur piézoélectrique à quartz de coupe AT dont les mouvements de cisaillement sont autour des harmoniques impaires (5, 15, 25, 35 et 45 MHz) qui repose sur des mesures d'impédance électrique à haute fréquence (de l'ordre du MHz). Ces mouvements de cisaillement induisent alors la propagation d'une onde ultrasonore dans le fluide en contact sur une profondeur de l'ordre de la longueur d'onde (autour de quelques micromètres Figure II.2-2) à travers la matière. Etant donné que la contrainte imposée est faible (déplacement d'une dizaine de nanomètres) cette technique est non destructive. Elle est également non invasive car elle ne provoque pas non plus d'échauffement local.

Les modifications de propagation de cette onde dans le milieu sont reliées à la viscosité et l'élasticité du produit à une échelle d'investigation microscopique (de l'ordre de 10 μm) [126]. Compte tenu de la taille des gouttelettes dans une émulsion (entre le nanomètre et le micromètre) cette technique est pertinente pour étudier le comportement de la phase dispersée. Pour une concentration suffisante, le développement microbien dans les émulsions pourra également être détecté à cette échelle puisque les bactéries ont une taille du même ordre de grandeur (de 0,2 à 2 μm).

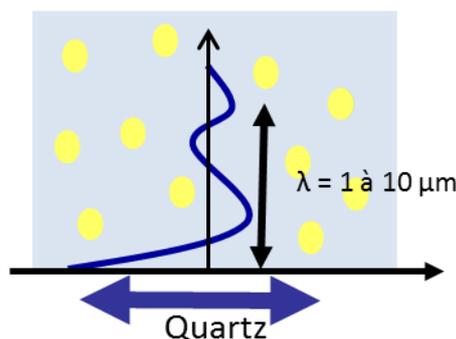


Figure II.2-2. Propagation d'une onde de cisaillement à travers un fluide complexe de type émulsion. Les ronds jaunes représentent les gouttelettes d'huile dispersées dans une phase aqueuse en bleu. Pour plus de clarté, le schéma n'est pas à l'échelle.

La chaîne de mesure est donc composée d'un capteur piézoélectrique disposé dans une cellule porte échantillon (commercialisée par Q-senseTM) maintenue à température

constante, d'un analyseur de réseau et d'un système informatique de commande, de récupération et de traitement des données (Figure II.2-3).

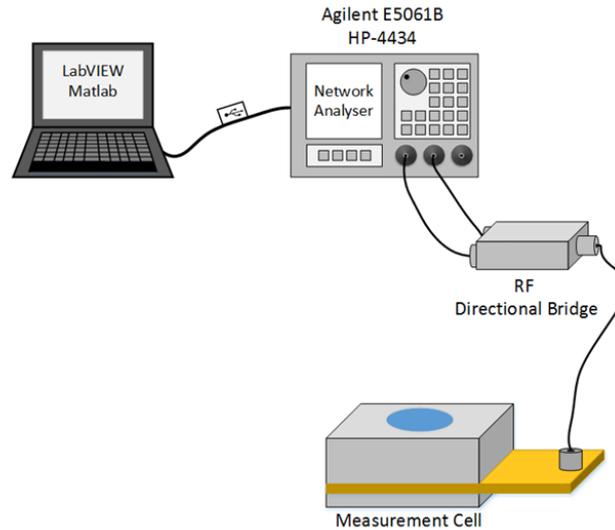


Figure II.2-3. Schéma de la chaîne de mesure complète pour le suivi microrhéologique de fluide complexes.

Le capteur a un diamètre de 14 mm. La stabilité et la linéarité de ce capteur en fonction de la température est garantie dans une gamme largement supérieure à la gamme de température d'étude.

Les modifications de l'onde ultrasonore propagée dans le milieu sont mesurées par réflectométrie. En pratique, ces informations sont accessibles à l'aide d'un analyseur de réseau (Agilent) qui mesure la variation d'impédance électrique du capteur piézoélectrique chargé (c'est-à-dire en contact avec le milieu). Le capteur est donc utilisé en émission/réception et l'on peut alors montrer que [127], [128] :

$$Z_{charge} = K_{meca}^{elec} \sqrt{\rho_m G_m^* (\omega)} \quad (II.2-1)$$

où K_{meca}^{elec} est un coefficient de transduction dépendant de la géométrie du capteur et de ses propriétés piézoélectriques, ρ_m est la masse volumique du fluide étudié et G^* est le module complexe de cisaillement du matériau représentatif des propriétés viscoélastiques du milieu à la fréquence considérée.

Pour suivre l'évolution du matériau une mesure de l'impédance de charge est réalisée à intervalle de temps régulier (au minimum toutes les minutes).

Dans cette thèse, les résultats donnés pour les paramètres viscoélastiques extraits correspondent à une moyenne d'au moins 30 mesures, sauf mention contraire.

Pour chaque expérience, une étape de calibration est réalisée par la mesure de 1,0 g d'eau milliQ® déposé sur le quartz. A l'issue de cette étape, 1,0 g d'émulsion est déposé sur le quartz pour réaliser la série de mesures des propriétés viscoélastiques au cours du temps. La cellule porte échantillon est recouverte par un film adhésif et étanche afin de protéger l'échantillon analysé des poussières, de limiter l'évaporation d'eau et les déviations de mesure. Les mesures sont réalisées à température constante et contrôlée (généralement 25°C et 28°C pour ce qui a trait à la microbiologie), à une seule fréquence (3^e harmoniques, 15 MHz).

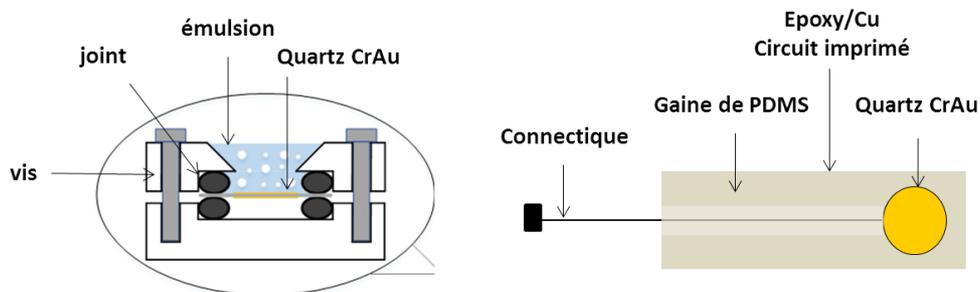


Figure II.2-4. Les différents types de cellules de mesures utilisées pour les mesures microrhéologiques d'émulsions. A gauche quartz sur cellule Q-sens. A droite quartz monté sur support placé verticalement.

Pour les mesures de suivi de développements bactériens dans les émulsions une géométrie de cellule différente a été développée et utilisée. Le capteur est monté sur un support plat qui peut alors être plongée verticalement dans un grand volume d'émulsion, ce qui permet d'éviter les phénomènes de sédimentation sur le quartz, possibles en cas de fort développement bactérien, ou encore la déshydratation de l'émulsion testée qui peut se produire lorsque l'on travaille sur plusieurs jours ou semaines de mesures.

Lors de l'utilisation de cette cellule, l'étape de calibration consiste alors à immerger le capteur vertical dans 40 mL d'eau milliQ® contenus dans un tube de 50 mL. Les mesures de l'échantillon d'émulsion à analyser se font de ce fait aussi dans un volume de 40 mL.

II.3 INCORPORATION ET DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES

Différentes expériences ont été menées dans le but de pouvoir évaluer la présence de micro-organismes et les perturbations structurales qu'elles engendrent dans une émulsion cosmétique. Le choix du micro-organisme d'étude a été porté sur une bactérie ubiquitaire, proche de celle utilisée dans les tests couramment effectués en industrie et facilement manipulable.

II.3.1 Préparation

En microbiologie, l'étude des souches microbiennes nécessite la préparation de milieux de cultures nutritifs solides ou liquides. Ils jouent le rôle de support pour la multiplication cellulaire, pour l'identification de souches (milieux sélectifs) et aussi pour le dénombrement des colonies.

Les milieux de cultures solides, la gélose TSA (Tryptic Soy Agar), et les milieux de cultures liquides, le bouillon TSB (Tryptic Soy broth, TSB), qui sont utilisés, correspondent à des milieux nutritifs déshydratés issus du commerce (VWR). Ces milieux sont utilisés pour les micro-organismes qui ne présentent pas d'exigences particulières. Une solution de sérum physiologique (chlorure de sodium à 9 g.L^{-1} , pH 7) est également utilisée pour les dilutions.

Le matériel, les milieux de cultures ainsi que les émulsions utilisées pour les tests microbiologiques sont stérilisés par autoclave (20 minutes à 121°C et 2 bar). Toutes les manipulations de la préparation sont réalisées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) afin de travailler sous atmosphère stérile. L'eau utilisée pour les préparations est de qualité milliQ® et systématiquement stérilisée par autoclave avant utilisation.

II.3.2 Choix de la souche bactérienne : *Pseudomonas fluorescens*

Nous avons fait le choix de travailler avec une souche bactérienne du genre *Pseudomonas* car ce sont des bactéries ubiquistes. L'espèce *Pseudomonas fluorescens* MFAF76A (*P. fluo.* 76A) a été choisie parce qu'elle n'est pas dangereuse et présente des caractéristiques similaires à l'espèce utilisée pour le « challenge test » qui est *Pseudomonas aeruginosa* (bien moins inoffensive). Cette souche, *P. fluo.* 76A, est non pathogène (agent biologique de niveau 1) et ne nécessite pas de confinement particulier pour être manipulée

à la différence de *Pseudomonas aeruginosa* (agent biologique de niveau 2) qui est susceptible de provoquer des maladies chez l'homme mais pour lesquelles il existe une prophylaxie ou un traitement efficace. De plus, *P. fluo 76A* présente l'avantage de fluorescer sous rayonnements UV (365 nm) si elle est cultivée sur une gélose de type King B. Il est alors aisé de vérifier que les bactéries présentes dans les émulsions correspondent bien à celles qui y ont été inoculées et non à des micro-organismes provenant de contaminations lors des manipulations. La souche *P. fluo. 76A* a été fournie par le laboratoire LMSM et ce travail de microbiologie a été réalisé en collaboration avec les Pr. Nicole Orange et Dr. Cécile Duclairoir-Poc issues du même laboratoire.

Des suivis de croissances de la souche *P. fluo 76A*, ultérieurement réalisés par ce laboratoire par des mesures d'absorbance à 580 nm, ont permis de déterminer qu'une valeur d'absorbance à 580 nm (A_{580}) égale à 1 correspondait à une concentration en *P. fluo 76A* de $6,4 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹.

Les bactéries *P. fluo. 76A* sont stockées à -80°C. A partir d'une colonie isolée sur gélose TSA, une pré-culture de nuit (en bouillon TSB sous agitation à 180 rpm et à 28°C) est systématiquement lancée avant chaque expérimentation.

II.3.3 Contamination forcée des émulsions et suivi

La contamination forcée consiste à inoculer une concentration donnée en bactérie dans une émulsion stérile. A partir d'une culture liquide en TSB, une dilution avec du sérum physiologique est réalisée afin d'atteindre la concentration souhaitée. Le protocole d'inoculation a évolué au cours de la thèse afin d'optimiser le suivi de croissance par microrhéologie.

Dans un premier temps, nous procédions à une dilution du milieu de culture pour obtenir une concentration de 10^5 UFC.mL⁻¹ comme recommandée par la pharmacopée européenne. Nous travaillions avec des inoculas de 50 µL (5 x 10 µL) de culture bactérienne à 10^5 UFC.mL⁻¹ pour 5 g d'émulsion contenue dans des piluliers en verre soit une concentration finale de 10^3 UFC.mL⁻¹. Le schéma d'ensemencement est repris en Figure II.3-1.

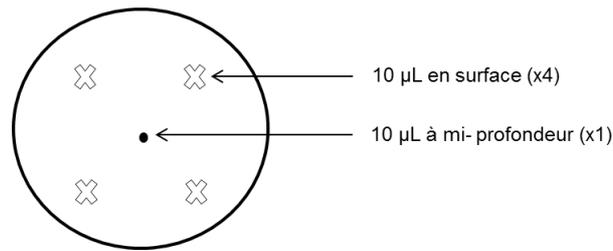


Figure II.3-1. Méthode de contamination forcée des émulsions par *P. fluo 76A* : $5 \times 10 \mu\text{L}$ de culture bactérienne sont répartis dans 5 g d'émulsion, les volumes de cultures bactériennes sont prélevés et déposés à la micropipette.

Par la suite les pots sont agités quelques secondes au vortex, puis stockés 28°C sous agitation (agitateur rotatif orbital à 180 rpm). La durée de stockage varie en fonction du nombre de jours pendant lesquels la croissance est suivie. Il faut prévoir un pot par jour de suivi de croissance. Cette méthode d'ensemencement permettait d'inoculer une grande quantité de bactéries dans une partie de l'émulsion proche de la surface donc bien oxygénée. En revanche les multiples prélèvements à la micropipette sur des petits volumes apportaient une incertitude sur la concentration en bactéries inoculée dans le volume total d'émulsion et donc sur la concentration initiale en bactéries (t_0). A partir des 5 g d'émulsion contaminée, 1 g était prélevé afin de réaliser les mesures de microrhéologie (Figure II.3-1). Il n'est pas évident que le prélèvement du gramme d'émulsion, même après homogénéisation, ait été représentatif de l'ensemble du contenu des 5 g d'échantillon inoculé, et par conséquent cela induit un biais, une variabilité et des problèmes de reproductibilité.

Aussi, suite à des problèmes de déshydratation liée à la géométrie du capteur, le choix a été fait de travailler avec un capteur vertical à plonger dans une quantité plus importante d'émulsion. Nous avons utilisé des tubes stériles de 50 mL, contenant 40 mL d'émulsion stérile dans lesquels une plus grande quantité de bactéries a été introduite. Il s'agit d'avoir une connaissance précise de la quantité bactérienne de départ fixée à 10^3 UFC.mL^{-1} d'émulsion totale. L'ensemencement est réalisé en une fois à l'aide d'une micropipette à hauteur du premier tiers du tube afin que les bactéries se trouvent dans une région riche en oxygène (Figure II.3-2). Les mesures de suivi microrhéologique et les prélèvements pour le dénombrement sont ensuite réalisés directement dans ce tube. L'avantage de ce nouveau système est qu'il devient possible d'y insérer un ou deux capteurs

permettant des mesures doublées et continues au cours du temps pour un même échantillon.

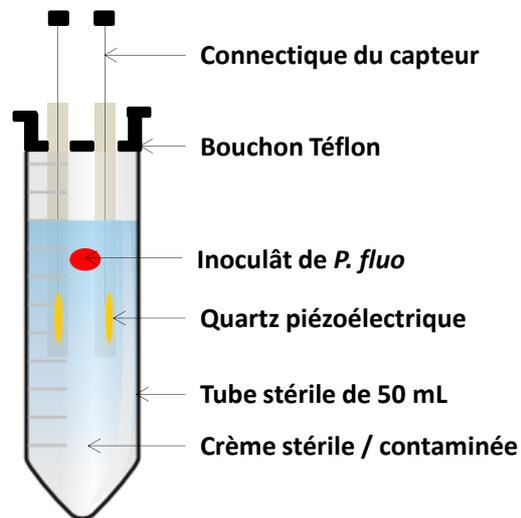


Figure II.3-2. Dispositif pour la contamination forcée d'émulsion et le de suivi de croissance bactérien par microrhéologie.

II.3.4 Méthode de dénombrement

Deux séries d'expériences ont été réalisées pour lesquelles le dénombrement est réalisé à J_0 , J_{+7} et J_{+14} ou à J_{+1} , J_{+2} et J_{+3} . Dans le cas des expérimentations menées dans les piluliers contenant 5 g d'émulsions, une pré-dilution, permettant de fluidifier l'émulsion et donc de rendre possible le prélèvement à la micropipette, était réalisée (2 mL d'eau physiologique pour 5 g d'émulsion). En revanche, à partir des tubes contenant 40 mL d'émulsions, un prélèvement de 1 mL à la micropipette était effectué. Ce prélèvement était pesé dans des conditions stériles permettant alors de remonter précisément au volume prélevé ($\rho = 950$ g/L). Puis une dilution comparable à celle utilisée dans la première série d'expériences était faite.

A partir de cette émulsion pré-diluée, des dilutions en cascade sont réalisées (100 μ L pour 900 μ L d'eau physiologique ; Figure II.3-3). Ces dilutions en cascades sont réalisées dans des tubes stériles de 15 mL. Entre chaque prélèvement une agitation au vortex est nécessaire pour assurer l'homogénéité du contenu des tubes.

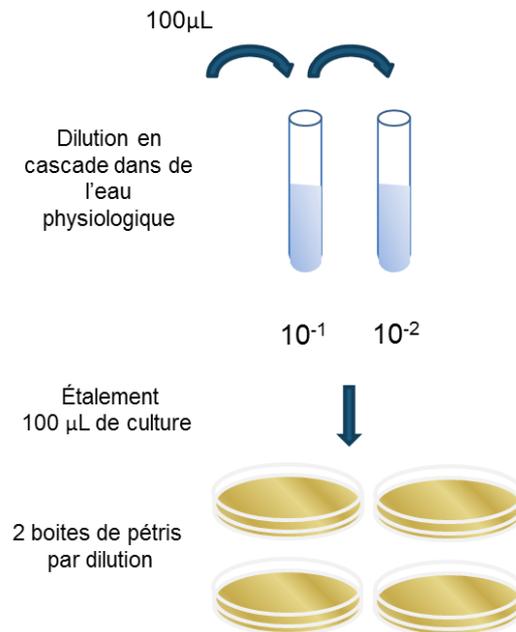


Figure II.3-3. Dilutions en cascade et étalement sur boîtes de Pétri.

Pour finir, 100 μ L de chaque dilution sont étalées sur une boîte de pétri contenant de la gélose TSA, à raison de deux boîtes de Pétri par dilution. L'étalement au râtelier est fait jusqu'à ce que la culture se soit bien imprégnée dans la gélose, puis les boîtes de Pétri sont stockées à 28°C pendant 18 à 24 heures. Le lendemain, les colonies présentes dans chaque boîte sont dénombrées et la concentration en bactéries initialement présente dans l'émulsion au moment du prélèvement peut être déduite [137]. Ce protocole, s'inspirant du challenge test est une méthode de dénombrement complexe et longue à mettre en œuvre et coûteuse en consommables.

Chapitre III ETUDE MULTI-ECHELLE DE LA STRUCTURE DES EMULSIONS

Même si les études de cette dernière décennie sur les formulations des émulsions montrent que les émulsions doubles peuvent encapsuler des actifs ou des substances sensibles, voire les libérer de manière contrôlée de la phase interne à la phase externe [138]–[140], il n’en reste pas moins que la question de l’optimisation des mécanismes intrinsèques contribuant à la stabilité d’émulsions même simples n’est pas triviale. Compte tenu de leur malléabilité structurelle issue de l’ensemble des interactions faibles intrinsèques mises en jeu, l’étude rhéologique à différentes échelles doit d’évidence apporter scientifiquement une complémentarité d’analyse en vue d’une optimisation de la formulation sans apport supplémentaire d’agents stabilisants ou de conservateurs [55].

La composition des émulsions, leurs propriétés physico-chimiques, la distribution de la taille des gouttelettes et surtout leur concentration sont des facteurs importants jouant sur les propriétés rhéologiques des émulsions quelle que soit l’échelle d’investigation. Les interactions à ces échelles modifient en effet les propriétés mécaniques macroscopiques de l’émulsion et donc les relations contrainte-déformation. Le fait que les émulsions peuvent passer d’un simple liquide visqueux à une émulsion ou un gel élastique dense, en changeant la fraction volumique des gouttelettes par exemple, permet d’appréhender l’impact de ces modifications sur leurs propriétés mécaniques [141]. La relation complexe structure/propriétés mécaniques varie plus largement en fonction de la composition, des actions interfaciales, de la structure et de la taille des gouttelettes microscopiques. Pour les nanoémulsions où les tailles des gouttelettes sont nanométriques, les propriétés intrinsèques allongent même la durée de conservation outre un transport diffusif renforcé [142].

L’objectif de ce chapitre est donc d’extraire de nouvelles signatures rhéologiques pertinentes à partir d’une étude multi-échelles d’émulsions simples. En association à différentes techniques de caractérisation plus classiques (microscopie optique, mesures macroscopiques de rhéologie classique basses fréquences), les mesures à l’échelle mésoscopique voire microscopique par microrhéologie ultrasonore du laboratoire SATIE, permettent de valider ces signatures [127], [128], [143].

L'utilisation de cette technique, inédite pour l'étude des émulsions et de leur stabilité, permet en effet de valider la stabilité des émulsions sur plusieurs mois grâce à sa capacité de suivi non destructif du milieu. Cette technique permet également l'étude de validation sur des formulations d'émulsions simples huile dans eau (H/E) dépourvues d'actif, de conservateur et d'antioxydant, de manière à limiter les variables d'influence. L'analyse des liens existant entre l'organisation structurale de ces émulsions et leur composition, et donc leur stabilité, constitue l'objet de ce chapitre. L'intérêt est de pouvoir associer et corrélérer les paramètres microrhéologiques à des modèles physiques reliant structuration interne et stabilité dans les émulsions considérées.

III.1 GRANDEURS CHOISIES ET CRITERES D'ANALYSE DES EMULSIONS

III.1.1 Grandeurs d'influences retenues dans l'étude

D'un point de vue rhéologique, en augmentant la fraction volumique des gouttelettes ϕ , une émulsion peut passer d'un simple liquide visqueux proche d'un liquide newtonien à un quasi-solide élastique ayant un module de cisaillement élastique substantiellement fort, comme le montre le schéma ci-dessous [141].

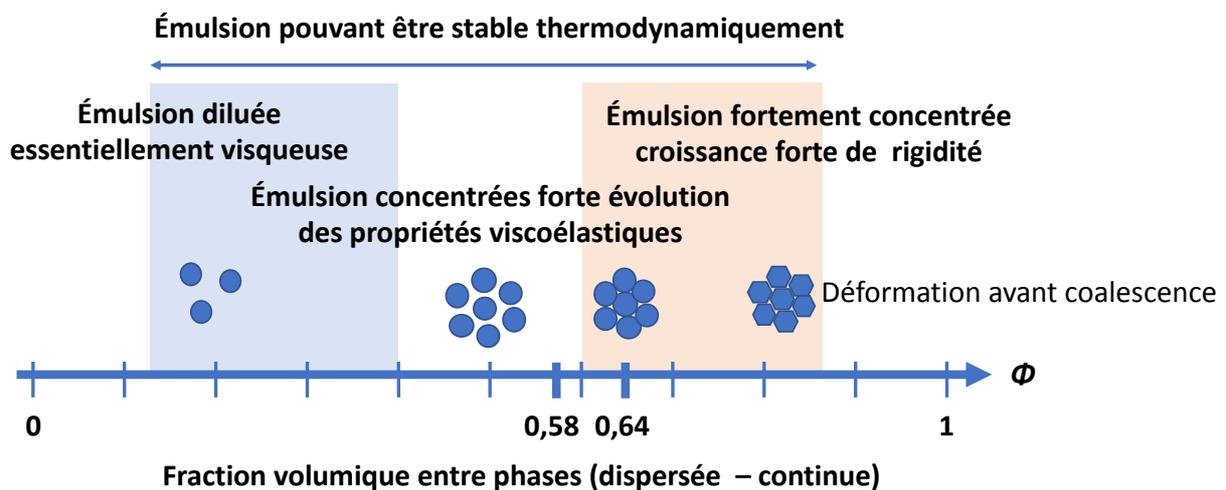


Figure III.1-1. Comportement schématique structurel et rhéologique des émulsions en fonction de la fraction entre phases (selon [141]).

En régime dilué ($\phi \ll 0,5$), les gouttelettes sont sphériques en l'absence de cisaillement. A partir de $\phi = 0,58$, on peut montrer que les gouttes sphériques sont emprisonnées par les sphères voisines imposant des interactions répulsives fortes tendant à augmenter leur rigidité apparente, c'est le régime fortement concentré. Au fur et à mesure que ϕ augmente dans ce régime, une réorganisation des gouttelettes due à leur compression mutuelle aux interfaces induit une déformation des gouttelettes engendrant finalement un processus de coalescence²³. Les gouttelettes deviennent presque polyédriques et forment une mousse bi-phasique. L'élasticité apparente qui augmente au fur et à mesure de la concentration de gouttelettes résulte du travail mécanique (au sens énergétique du terme) effectif cherchant à s'opposer aux tensions interfaciales. En présence d'un cisaillement imposé, il en résulte une augmentation de la surface des gouttelettes déformant les gouttelettes déjà comprimées par les forces stériques et répulsives.

De manière réciproque, les forces répulsives peuvent être régulées par la proportion dans la phase continue d'un tensioactif. La concentration de ce tensioactif joue donc un rôle clé sur l'équilibre thermodynamique et la stabilité de l'ensemble. A priori, comme on l'a établi pour le P80, dans nos préparations, on se situe bien au-dessus des concentrations micellaires critiques (de l'ordre d'un facteur 100 pour le P80).

L'optimisation des propriétés rhéologiques des lotions et des émulsions peut alors être obtenue par un ajustement pertinent de la proportion d'huile, d'émulsifiant et du processus d'émulsification pour modifier la distribution de la taille des gouttelettes et leur réarrangement. Réciproquement une étude judicieuse des contraintes par rapport aux déformations doit permettre d'anticiper l'optimum des réarrangements améliorant la stabilité [144].

III.1.2 Choix de l'émulsion de référence

Afin de pouvoir simultanément faire une analyse de la structure et des effets des grandeurs modifiant la stabilité et les propriétés rhéologiques, une étape de mise au point d'une émulsion, « de référence », la plus simple possible mais stable au moins pendant deux

²³ La coalescence conduit à une diminution du nombre de gouttelettes par unité de volume, ce qui conduit inévitablement à une évolution des propriétés rhéologiques de l'émulsion [50].

mois a été nécessaire. Les différents ingrédients utilisés ont été précédemment justifiés dans le chapitre 2. Ces matières premières sont rappelées dans le Tableau III.1-1 ci-après.

A partir du taux relatif en émulsifiant 70/30 (P80/GMS) établi par le calcul de la HLB, différentes émulsions ont été développées. Pour cette étape, la quantité d'IPP dans la formule a été fixée à 15% (c'est à dire la concentration d'huile) dans un objectif de respect simultané de plusieurs critères : stabilité, émulsion standard suffisamment diluée et aspect macroscopique représentatif des émulsions en cosmétique.

Compte tenu de la sensibilité aux perturbations thermodynamique de ces types de produits, une résistance à la centrifugation reflète l'efficacité en terme de stabilité du système émulsionnant présent dans la formule [45], [130]. La résistance à la centrifugation dépend en effet de la densité des phases aqueuse et huileuse de l'émulsion mais également du système émulsionnant présent à l'interface. Ce critère de sélection a de ce fait été un premier critère de validation de la formulation. En conséquence, chaque formulation a été centrifugée à J_1 pendant 10 minutes à une vitesse de rotation de 10 000 rpm (10 621 g).

Le second critère consiste à suivre la stabilité des systèmes ayant résisté au test de centrifugation en les stockant pendant deux mois sous deux conditions extrêmes : à 50°C dans le noir ; à 25°C dans le noir et à la lumière du jour.

A l'issue de ce temps nécessaire de stabilité, un suivi organoleptique a été effectué afin de voir si les échantillons restent toujours stables sur quelques semaines (absence de déphasage par exemple). Le tableau ci-dessous présente la composition des échantillons testés ainsi que les résultats du suivi organoleptique. Deux séries ont été réalisées : Les essais de la série A, sont des formules simples composées uniquement d'eau, d'huile et d'émulsifiants. On a fait varier le pourcentage en émulsifiants (P80+GMS) de 3 à 9%. Seules les émulsions de 3 et 6% ont résisté à la centrifugation, mais malheureusement elles ont présenté un déphasage (A9%) ou un fort crémage (A6%) aux conditions extrêmes après stockage.

Afin de limiter les phénomènes de floculation et de coalescence qui sont favorisés par la rencontre des gouttelettes d'huile lors des mouvements Brownien dans les émulsions A6% et A9%, nous avons décidé d'ajouter à ces formules un gélifiant Carbomer pour épaissir et créer un réseau dans les émulsions (B6% et B9%). L'émulsion B9% présente un déphasage au bout

de deux mois à la condition de stockage à 50°C tandis que la formule B6% ne présente qu'une légère odeur de rance (normale en l'absence d'antioxydant) et de la condensation à l'intérieur du pot.

Noms INCI	A3%	A6%	A9%	B6%	B9%
Fraction volumique ϕ de la phase dispersée	0,18	0,21	0,24	0,21	0,24
aqua (eau)	82	79	76	78,7	75,7
isopropyl Palmitate	15	15	15	15	15
polysorbate 80	2,1	4,2	6	4,2	6
glyceryl stearate	0,9	1,8	3	1,8	3
Carbomer	0	0	0	0,3	0,3
total	100 %				
Réponses aux critères de stabilité					
résiste à la centrifugation	non	oui	oui	oui	oui
ne présente pas de déphasage	non	non	non	oui	non

Tableau III.1-1. Formules des différents essais et leurs critères de stabilité. (Le mode opératoire est celui décrit dans le chapitre précédent II.1.3).

A la vue de ses différents résultats la formulation B6% est la seule à répondre aux critères de stabilité recherchés et sera notre formulation de référence.

III.2 ÉTUDE DE LA STABILITE ET DE REPETABILITE PAR LA MICRORHEOLOGIE DE L'ÉMULSION DE REFERENCE

D'un point de vue macroscopique, le suivi de stabilité organoleptique a montré que l'émulsion B6% est macroscopiquement stable à température ambiante dans le noir pendant deux mois. Dans cette condition de stockage elle ne présente pas de phénomène de crémage ou de coalescence visible à l'œil nu.

Cette étude concerne dix échantillons préparés de manière semblables. Toutes les matières premières ont été pesées avec une balance de précision ($\Delta m = 0,0002$ g). L'eau, vu les quantités impliquées, a été pesée avec une balance de précision inférieure ($\Delta m = 0,02$ g). L'ajustement du pH a été fait avec de la soude à 10% fraîchement préparée. Tout d'abord, ces émulsions ont les mêmes propriétés organoleptiques et physico-chimiques ($6,3 < \text{pH} < 6,7$ et une conductivité $0,4 < \sigma < 0,6$ mS.cm⁻¹) à J₊₁.

Des mesures en rhéologie classique ont pu être réalisées sur quatre de ces émulsions. L'analyse des propriétés d'écoulement et viscoélastiques ont permis de valider l'homogénéité des mesures qui sont superposables. La Figure III.2-1 représente l'allure typique des données rhéologiques moyennées obtenues.

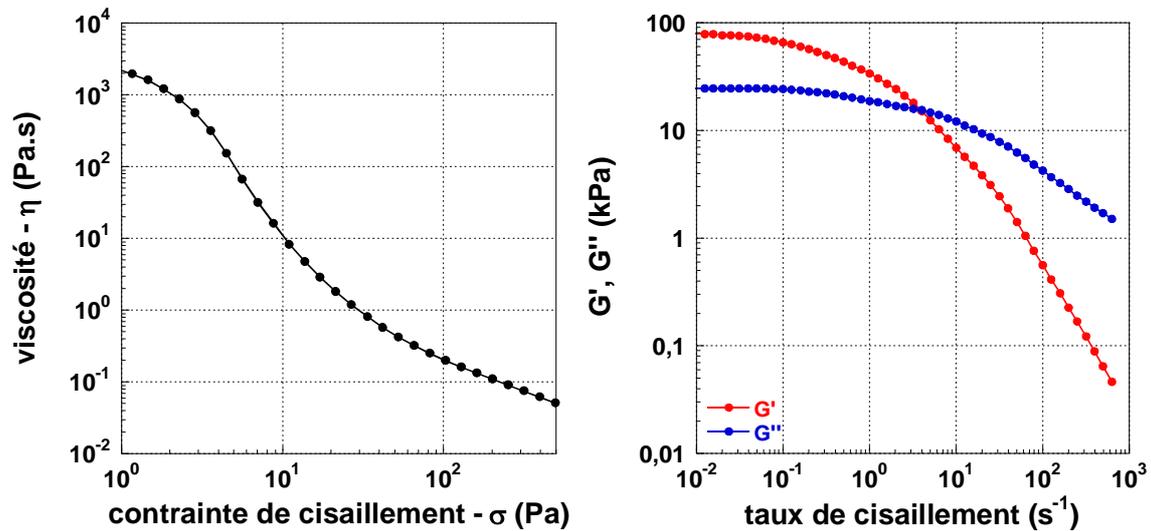


Figure III.2-1. Evolution de la viscosité apparente (à gauche) et des modules G' et G'' (à droite) en fonction de la contrainte de cisaillement. Les mesures ont été réalisées à 25°C à des contraintes comprises entre 1 et 1000 Pa.

Deux études complémentaires à l'échelle microscopique ont été menées sur cette émulsion de référence pour confirmer cette stabilité à l'échelle microscopique :

- Une première étude effectuée à J_{+1} (24 heures après la préparation) sur plusieurs échantillons afin de montrer la reproductibilité de la formulation.
- Un suivi continu sur une période de 60 jours afin d'étudier l'évolution des propriétés viscoélastiques à l'échelle microscopique de nos émulsions de référence dans le temps.

D'un point de vue microscopique, les dix émulsions sont quasi identiques. Comme le montre les images typiques observées par microscopie optique, elles ne sont pas mono disperses en taille de gouttelettes et peuvent parfois présenter des prémices de floculation.

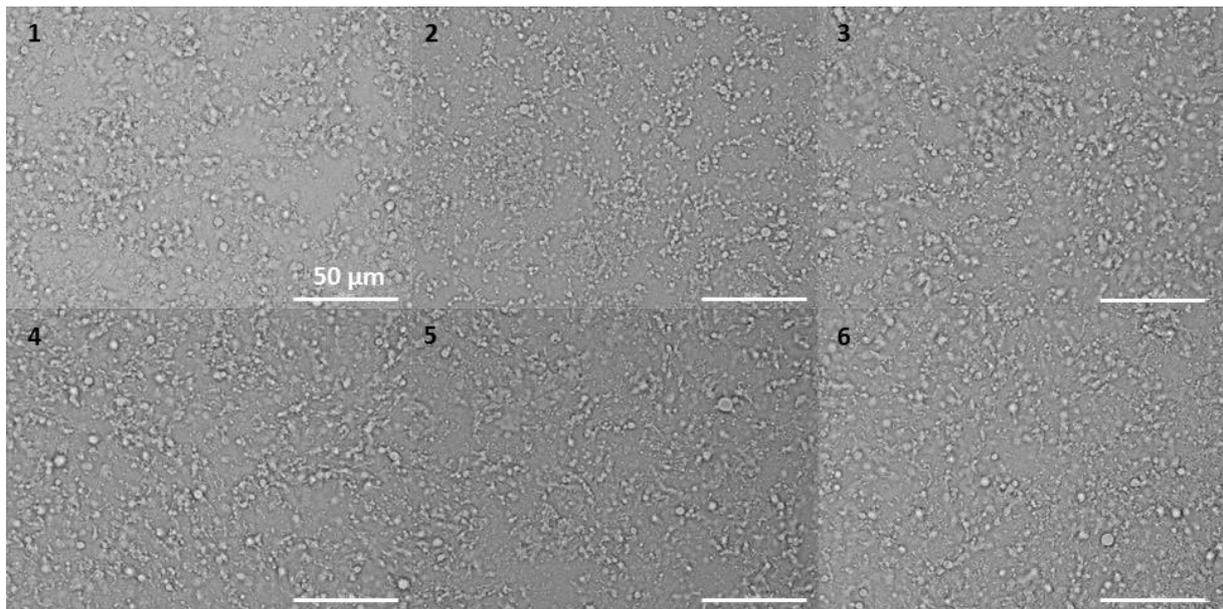


Figure III.2-2. Microscopies optiques de six émulsions de référence prise à J_{+1} (objectif $\times 63$).

L'ensemble des émulsions de référence a également été analysé par microrhéologie ultrasonore. La Figure III.2-3 synthétise les mesures des modules élastiques et visqueux obtenues pour chaque échantillon. La valeur affichée est la moyenne sur plus de 100 points de mesures réalisés pendant plus de deux heures à J_1 . Toutes les mesures ont été réalisées dans une enceinte thermostatée à 25°C. Durant cette période aucune dérive au-delà des 10% d'erreur de mesure n'a été détectée.

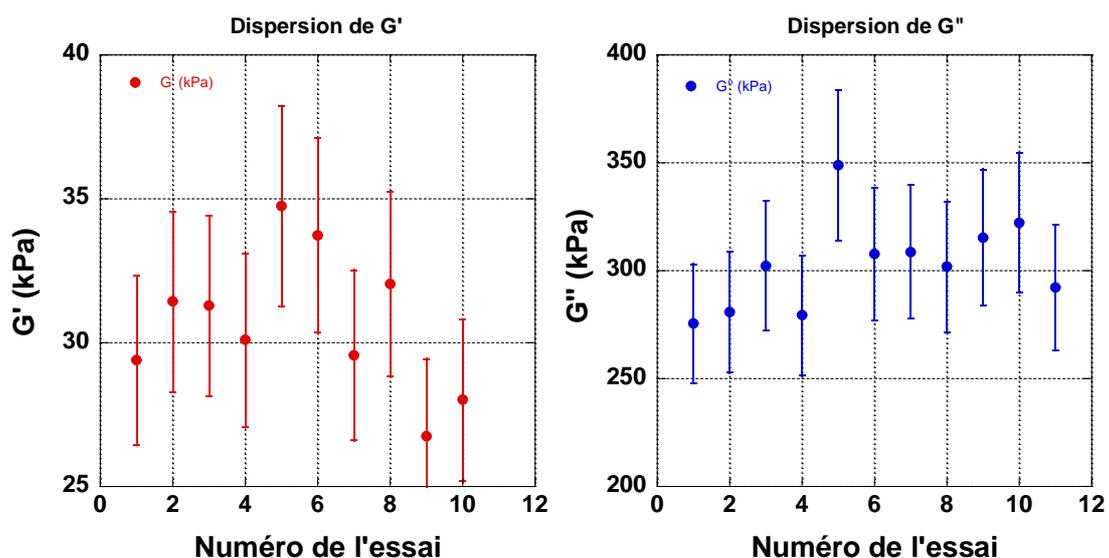


Figure III.2-3. Dispersion des modules élastiques et visqueux obtenue en microrhéologie pour les émulsions de références ; l'erreur de mesure pour cette technique est estimée à 10%.

Pour toutes ces émulsions on constate que d'un point de vue microscopique G' n'est pas négligeable ($G' \approx 30$ kPa) même s'il reste 10 fois inférieur à G'' . Les émulsions ne sont pas vues comme des fluides newtoniens à l'échelle microrhéologique. Ces mesures confirment que les effets répulsifs entre gouttelettes, responsables de la rigidité apparente, est détectable (G' non négligeable). Elles confirment également qu'à cette échelle le produit est perçu rhéologiquement comme fortement dilué (rapport 10 entre la viscosité et l'élasticité). Ce résultat est cohérent dans la mesure où la fraction volumique est de l'ordre de 0,2 pour cette formulation.

Si l'on tient compte de la variabilité de formulation les propriétés microrhéologiques restent stables à moins de 10% près. Le tableau ci-dessous montre les valeurs des moyennes et de l'écart-type (σ) pour les modules élastiques et visqueux.

	G' (kPa)	G'' (kPa)
Moyenne	30,7	303,2
σ	2,4	21,5

Tableau III.2-1. Valeurs moyennes des modules élastiques et visqueux.

La reproductibilité des mesures étant établie, nous avons effectué le suivi des modules élastiques et visqueux pour l'échantillon de référence sur une durée de 60 jours à deux températures. La première température de 25°C correspond à la température de stockage témoin utilisée pour le suivi de stabilité organoleptique. La seconde de 28°C correspond à la température de croissance de la bactérie *Pseudomonas fluorescens*.

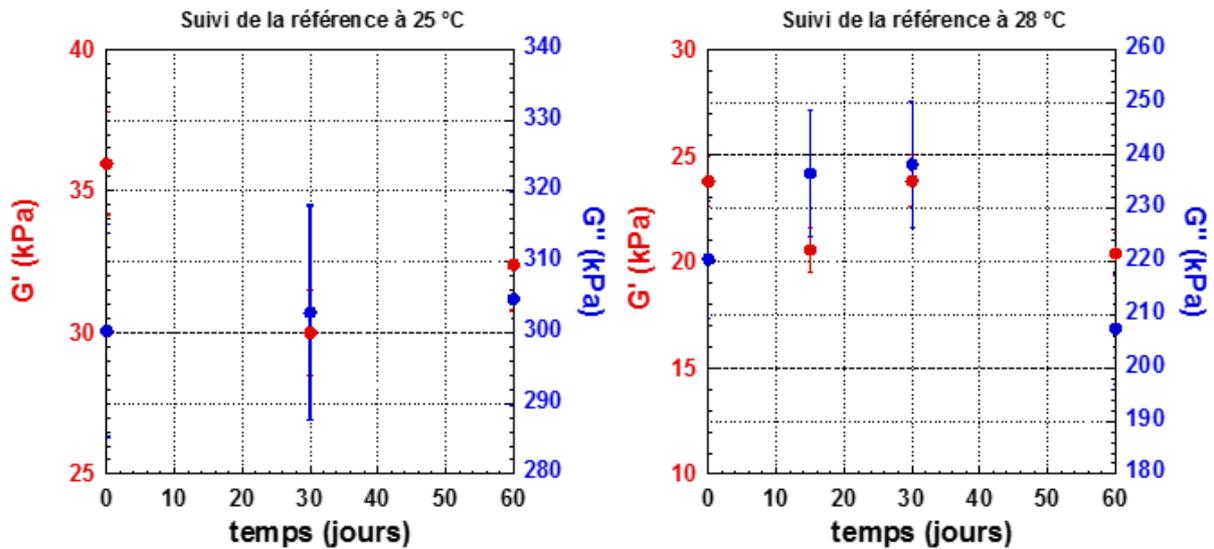


Figure III.2-4. Suivi des modules élastiques et visqueux mesurés à 25°C et 28°C pour des émulsions placées en stabilité de stockage à 25°C pendant 60 jours à 15 MHz.

Les paramètres viscoélastiques obtenus à l'échelle microscopique varient très peu, ce qui montre la stabilité de l'émulsion de référence au cours du temps sur une période de deux mois (Figure III.2-4). On peut dès lors suivre les effets de changements de formulation des émulsions sur les propriétés mécaniques à différentes échelles.

III.3 ÉTUDE DE LA STRUCTURATION DES EMULSIONS A DIFFERENTES ECHELLES

III.3.1 Changement de la structure des émulsions par modification de la phase dispersée

A partir de la référence, plusieurs émulsions ont été formulées de telle sorte à obtenir des tailles et des arrangements (organisation spatiale) des gouttelettes différents. Ces émulsions ont été obtenues en modifiant les pourcentages des matières premières constituantes de la phase dispersée. En effet pour les émulsions H/E, les modifications du pourcentage en huile d'une part et en émulsifiants d'autre part suffisent pour établir un lien entre les paramètres viscoélastiques et l'organisation structurale à différentes échelles. L'agitation lors de l'émulsification n'a pour objectif que de former des émulsions homogènes même si ponctuellement l'apparition de quelques flocculats de taille variables dans les émulsions obtenues est détectable. Les conditions de température, de temps et vitesse d'agitation pour « l'émulsification » sont donc maintenues constantes et identiques à celles

mentionnées au chapitre précédent (soit 80°C, 10 minutes d'agitation à 10000 rpm). Ainsi les formules retenues sont données dans le Tableau III.3-1 ci-après.

Noms commerciaux	Noms INCI	Variation de % (masse) d'IPP							Variation de % (masse) d'Emulsifiants			
Phase A												
Eau	<i>aqua</i>	93,7	83,7	73,7	63,7	53,7	43,7	35,5	84,7	81,7	78,7	75,7
Carbopol ETD2050	<i>carbomer</i>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Phase B												
Isopropyl Palmitate	<i>Isopropyl Palmitate</i>	0	10	20	30	40	50	60	15	15	15	15
Eumulgin SMO 20	<i>polysorbate 80</i>	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	0	2,1	4,2	6,3
Cutina GMS	<i>glyceryl stearate</i>	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0	0,9	1,8	2,7
TOTAL		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Emulsifiants = P80 + GMS		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	0	3,0	6,0	9,0

Tableau III.3-1. Liste des matières premières et de leurs pourcentages au sein des émulsions dont la concentration en IPP ou en émulsifiants (P80 + GMS) varie. Le rapport P80/GMS de 70/30 est constant. (Le mode opératoire est celui décrit dans le chapitre précédent II.1.3).

L'ajustement pour atteindre une formule sur 100% se fait sur la quantité d'eau. En ce qui concerne la variation de la quantité d'huile, deux essais extrêmes ont également été formulés même s'ils ne répondent pas au critère d'émulsions stables définis auparavant. Le premier contient 0% d'huile, et correspond donc à un mélange d'émulsifiants chauffé et dispersé dans une phase aqueuse gélifiée (aspect laiteux et liquide non homogène). Le second cas extrême quant à lui est un essai contenant 60% d'huile. Contrairement aux autres émulsions, elle déphase rapidement après agitation à l'Ultra Turrax; la dispersion des gouttelettes d'huiles résulte alors d'une gélification progressive du milieu sous agitation mécanique constante.

En ce qui concerne la variation du pourcentage en émulsifiant, le cas extrême est constitué par un échantillon ne contenant pas d'émulsifiant. Comme précédemment la formulation de l'émulsion résulte d'une gélification sous agitation qui permet d'emprisonner les gouttes dans le réseau formé. Il est important de noter que la variation de GMS et de P80 respectent toujours le même rapport pour toutes les formulations de cette étude.

Afin de pouvoir évaluer l'effet de la structure sur les propriétés rhéologiques à différents échelles (macroscopique et microscopique), la stabilité de ces formulations a été vérifiée d'un point de vue organoleptique. Le Tableau III.3-2, rend compte des observations macroscopiques effectuées au cours et le lendemain des formulations.

	composition	ϕ	Propriétés organoleptiques
Variation de % (masse) d'IPP	0%	0,05	Mélange opaque, blanc et liquide.
	10%	0,16	Les émulsions sont blanches et lisses. Quand la concentration en huile augmente, nous observons une augmentation de la brillance et un épaissement des formules.
	20%	0,26	
	30%	0,37	
	40%	0,47	Les émulsions possèdent un film huileux à leur surface; toute l'huile n'a pas été émulsionnée.
	50%	0,58	
	60%	0,68	Il n'y a pas formation d'émulsion. Il y a deux phases bien distinctes lorsque l'agitation est stoppée. Après gélification sous agitation le mélange semble homogène et semblable à une crème épaisse et légèrement jaune.
Variation de % (masse) d'Emulsifiants	0%	0,16	Il n'y a pas formation d'émulsion. Il y a deux phases bien distinctes lorsque l'agitation est stoppée. Après gélification sous agitation le mélange est laiteux et semble homogène.
	3%	0,18	Les émulsions sont lisses. Quand la concentration en émulsifiant augmente, les formules deviennent plus épaisses et légèrement plus jaunes.
	6%	0,21	
	9%	0,24	

Tableau III.3-2. Observations macroscopiques des émulsions de 0 à 60 % d'IPP et de 0 à 9% d'émulsifiants (P80 + GMS). Ces observations sont effectuées juste après la formulation ou 24 heures plus tard sur les émulsions pour lesquelles on a fait varier le pourcentage d'IPP ou d'émulsifiant. ϕ correspond à la fraction volumique estimée (avec le rapport : volume de la phase dispersée / volume de la phase dispersée + volume de la phase continue).

Macroscopiquement les variations en huile pour obtenir des émulsions de 10 à 30% d'IPP aboutissent à des émulsions classiques dont les aspects vont du lait très fluide à la texture crémeuse. Entre 40 et 60% d'huile (d'IPP), les textures finales ressemblent à des crèmes épaisses ou à du beurre. A partir de 40% un film huileux apparaît très rapidement après la formulation, vraisemblablement représentatif d'une coalescence naissante. Au-delà de 60 % en IPP la préparation déphase très rapidement après émulsification, seul le réseau de polymère permet de maintenir les gouttelettes dispersées. Pour les besoins de cette étude un suivi en stabilité pendant deux mois n'est pas nécessaire. La notion de stabilité ne relevant que d'une appréciation visuelle sur quelques jours suffit pour réaliser les mesures rhéologiques.

Les émulsions possédant 40 et 50% d'isopropyl palmitate sont donc considérées comme moins stables et justifie que l'analyse rhéologique soit faite peu de temps après émulsification.

Enfin, le mélange à 0% semble homogène à J_{+1} .

Lors de la variation en émulsifiants, les émulsions passent d'une texture lait à crème épaisse. Ces émulsions ont également été suivies en stabilité sur deux mois. A température ambiante les émulsions de 6 et 9% d'émulsifiants ne présentent pas de crémage. En revanche la formule à 3% présente des phénomènes de coalescence précoces (après quelques semaines).

III.3.2 Observation de la structure par microscopie optique

III.3.2.1 Effets de la variation du pourcentage en huile sur la structuration

La Figure III.3-1 représente les images obtenues pour les formulations ayant des pourcentages en isopropyl palmitate variant entre 0 et 60%. Les clichés en microscopie sont réalisés quelques jours (1 à 3) après les formulations afin de limiter au maximum leurs évolutions microscopiques dans les temps. Le cliché à 0% d'IPP montre la présence de petites gouttelettes, correspondant au mélange d'émulsifiants, dispersées dans la phase aqueuse.

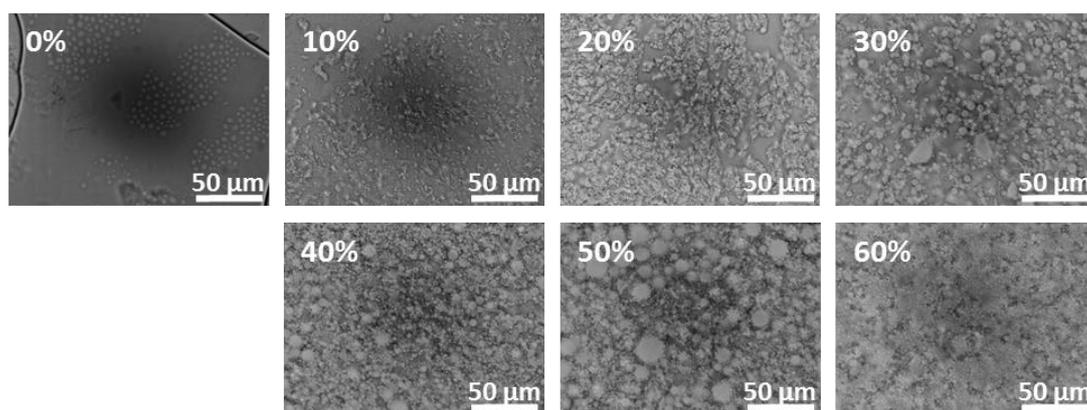


Figure III.3-1. Microscopie optique des émulsions (objectif $\times 63$) en fonction du taux d'IPP.

Entre 10 et 30% d'isopropyl palmitate, les clichés de microscopie optique montrent qu'une augmentation de la concentration en huile entraîne non seulement une augmentation du nombre de gouttelettes d'huile, mais également une apparition de leur polydispersité (taille de gouttes différentes) à 30%. Macroscopiquement cette évolution se traduit par un épaississement des émulsions.

Les images à 40 et 50% d'huile montrent des tailles de gouttelettes d'huile totalement différentes. Cette forte polydispersité peut s'expliquer par le fait que certaines de ces gouttes d'huile (les petites) sont émulsionnées et d'autres (les plus grosses) sont piégées dans le réseau tridimensionnel formé par le gel Carbopol. À 60% d'isopropyl palmitate, les gouttelettes sont petites et homogènes. Ces petites gouttes formées par agitation mécanique au cours de l'étape de gélification, sont très concentrées et s'empilent les unes sur les autres.

Pour mieux comprendre le lien entre la structure de ces émulsions et leurs propriétés rhéologiques à différentes échelles, des mesures de modules élastiques et visqueux en basse fréquence (rhéologie classique) et haute fréquence (rhéologie ultrasonore) sont réalisées.

III.3.2.2 Effets de la variation du pourcentage en émulsifiant sur la structuration

La Figure III.3-2 représente les clichés obtenus pour les formulations contenant de 0% à 9% d'émulsifiant. Pour les pourcentages de 3 à 9 %, les clichés ont été réalisés deux fois pour montrer la répétabilité des différentes expériences. Les microscopies sont réalisées quelques jours (1 à 3) après les formulations afin de limiter au maximum leurs évolutions microscopiques dans les temps.

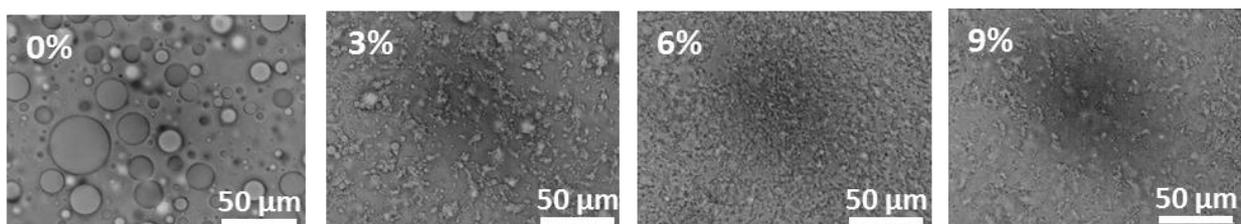


Figure III.3-2. Microscopie optique des émulsions possédant 0%, 3%, 6% et 9% d'émulsifiants (objectif $\times 63$).

À 0% en émulsifiant, le cliché microscopique montre la présence de très grosses gouttes d'huile dans l'eau. La grande taille des gouttes s'explique par l'absence d'émulsifiant, les gouttelettes ont été formées par agitation mécanique lors de l'étape de neutralisation du gel de Carbopol. Leur dispersion est donc due à la présence du réseau de gélifiant qui ralentit la coalescence.

L'émulsion ayant 3% d'émulsifiant, présente des gouttelettes de tailles différentes (polydispersité) formant des petits amas les uns avec les autres (floculation). Pour l'émulsion ayant 6% de tensioactifs, on observe une diminution de la taille des gouttelettes qui deviennent homogènes plus nombreuses et semblent totalement défloculées. À 9% d'émulsifiants, les gouttelettes sont moins nombreuses, monodisperses et défloculées. Cependant les phénomènes de crémages et de démixtion observés par le suivi macroscopique de l'émulsion possédant 9%, montrent que la petite taille des gouttelettes ne suffit pas à les stabiliser. Pour l'échantillon contenant 6% d'émulsifiant, l'absence de coalescence observable et une polydispersité limitée de la taille des gouttes dispersées par rapport aux autres formulations, peuvent expliquer sa plus grande stabilité. La quantité d'émulsifiants est suffisante pour former des gouttelettes de petite taille et homogènes. Les phénomènes de floculations présents pour les émulsions à 3%, et la réduction de la taille des gouttelettes pour celle à 9% sont directement liés à la nature et la quantité d'émulsifiant [145], [146].

	composition	ϕ	$d_{\min} - d_{\text{moy}} - d_{\max}(\mu\text{m})$
Variation de % (masse) d'IPP	0%	0,05	0
	10%	0,16	0,3 - 0,4- 0,5
	20%	0,26	0,2 - 1,4 -3,0
	30%	0,37	0,5 - 2,5-20
	40%	0,47	0,5 -3,6 - 10
	50%	0,58	0,7 - 3,7- 20
	60%	0,68	0,7 -1,5- 4,5
Variation de % (masse) d'émulsifiants	0%	0,16	1 - 39
	3%	0,18	0,4 - 1,1-10,4
	6%	0,21	0,4 - 0,6-0,7
	9%	0,24	0,1 - 0,4- 0,6

Tableau III.3-3. Valeurs statistiques des tailles de gouttelettes obtenues par analyse d'image à l'aide du logiciel ImageJ. ϕ correspond à la fraction volumique et $d_{\min} - d_{\text{moy}} - d_{\max}$ les diamètres minimum, moyen et maximum de la taille des gouttelettes.

En conclusion, le tableau ci-dessus résume les estimations des fractions volumiques calculées et des diamètres mesurés par traitement d'image avec le logiciel ImageJ.

III.3.3 Validation des propriétés rhéologiques macroscopique des émulsions

Une première partie des travaux a été consacrée à valider les profils rhéologiques des émulsions étudiées, en s'appuyant sur la littérature existante.

Les études rhéologiques basses fréquences des émulsions simples et multiples sont nombreuses dans la littérature. Par des expressions plus ou moins complexes, elles relient la viscosité effective η : à la fraction volumique des différentes phases, aux rayons des gouttelettes, et à la viscosité des différentes phases dont le tensioactif [50], [55].

Ces études montrent que l'impact du tensioactif sur la mesure de la viscosité est non négligeable, car celui-ci crée une couche de cohésion à la surface des gouttelettes. De plus, si l'épaisseur de cette couche est du même ordre que la taille des gouttelettes, le diamètre et la rigidité apparente apparaissent supérieurs au diamètre réel et à la rigidité de la goutte elle-même. Compte tenu de ce facteur, il est apparu possible de prouver que le modèle de suspension des sphères solides est alors en adéquation avec les calculs de viscosité des émulsions (dans le domaine de l'écoulement newtonien à faible vitesse de cisaillement) [147], [148].

III.3.3.1 Etude de l'impact de la concentration en huile IPP sur les propriétés rhéologiques macroscopiques

III.3.3.1.1 L'effet de la concentration en IPP sur la viscosité apparente

L'allure de l'évolution de la viscosité apparente η en fonction de la contrainte est représentée ci-après dans la Figure III.3-3. De ces résultats, on a pu déduire l'évolution de η en fonction de la fraction volumique des émulsions à différentes contraintes σ .

Dans la figure de gauche, pour des concentrations de gouttelettes plus importantes, l'accroissement d'effets élastiques rend l'écoulement non newtonien et fait apparaître une évolution typique de la viscosité mettant en évidence le caractère global rhéofluidifiant de ces émulsions. La transition observée s'explique par un changement de comportement

rhéologique des émulsions : L'écoulement de type newtonien (aux faibles contraintes) est remplacé par un comportement visco-plastique avec une diminution brutale de la viscosité apparente (quatre ordres de grandeur) dans une gamme étroite de contraintes. Le saut de la viscosité apparente à une certaine contrainte de cisaillement est le reflet de la rupture de la structure, et cette étreinte est comparable à une limite élastique. L'existence de cette dernière est d'autant plus flagrante que l'augmentation de la concentration en IPP est forte.

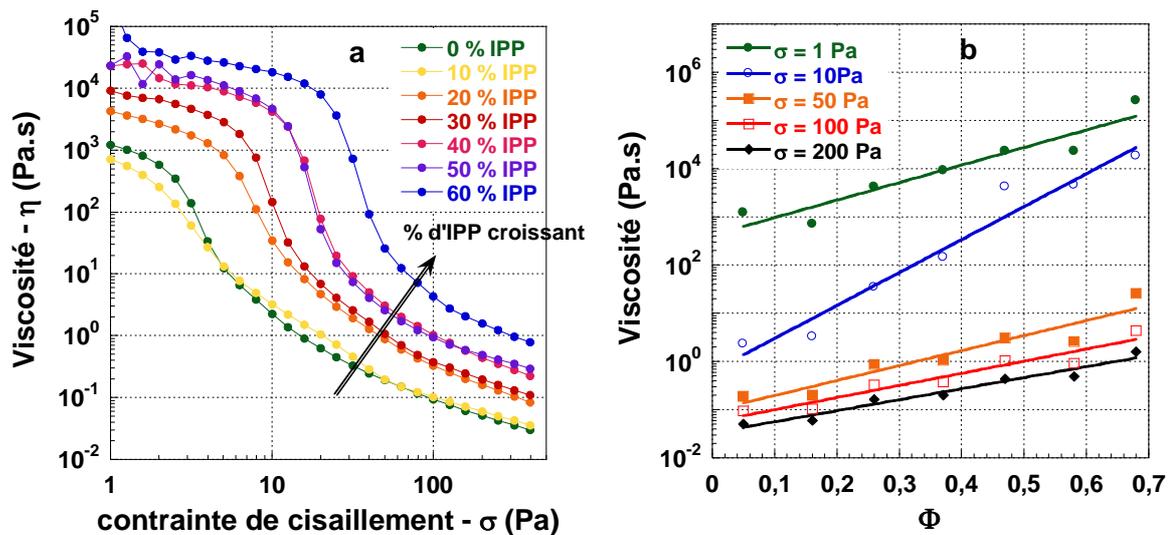


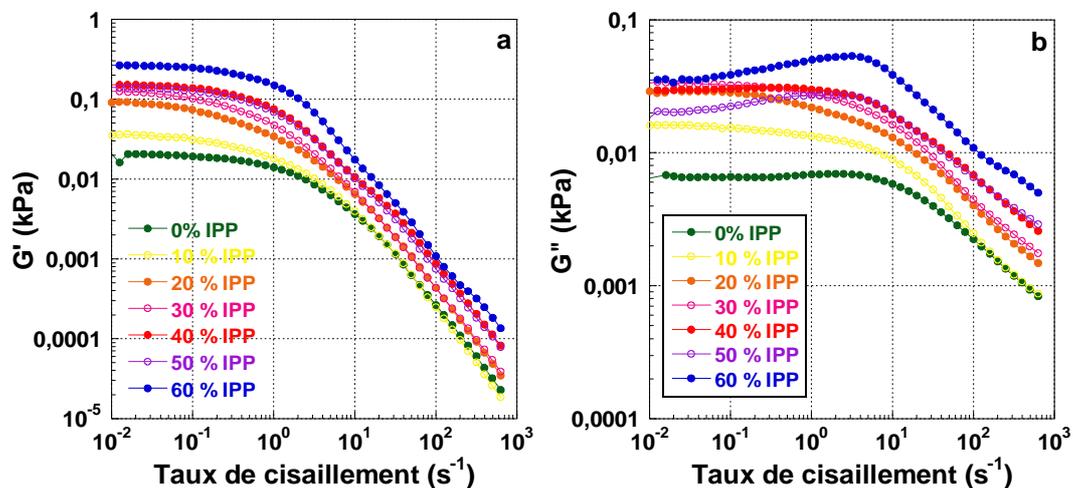
Figure III.3-3. Viscosité apparente en fonction de la contrainte (a) ou de la fraction volumique (b). Les mesures ont été réalisées à 25°C à des contraintes comprises entre 0,1 et 1000 Pa.

A droite, on retrouve une évolution de la viscosité effective qui suit une loi de puissance (représentation en échelle log sur la figure) en fonction de la fraction volumique ϕ (calculée à partir des volumes des deux phases). La viscosité apparente est liée elle-même à la viscosité de la phase continue et de la phase dispersée. Ainsi, l'augmentation de la concentration en IPP augmente l'incidence de la taille des gouttes sur l'écoulement effectif des émulsions. La taille des gouttelettes influence le rapport volume-surface : l'augmentation de leur diamètre entraîne ainsi un effet plus prononcé de l'écoulement interne des gouttelettes. En jouant sur l'amplitude de la contrainte imposée, on peut donc observer que dès 20% d'IPP cet effet surfacique se fait sentir soit pour $\phi > 0,25$ et se traduit par une croissance des courbes. Finalement, l'augmentation de la viscosité apparente avec la concentration est d'une part lié à l'influence des gouttelettes qui s'opposent à l'écoulement, mais d'autre part peut être corrélée à la phase aqueuse dont la concentration relative en

gélifiant augmente parallèlement à l'augmentation en huile (diminution de l'eau dans la formule totale).

III.3.3.1.2 Identification des effets viscoélastiques associés à l'augmentation de la concentration en IPP

Pour déterminer les modules G' et G'' à basse fréquence caractéristiques des différentes émulsions, on établit la dépendance de ces modules en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ (exprimée en s^{-1}). Les résultats en régime harmonique pour les différentes émulsions sont représentés sur la Figure III.3-4.



Pour de faibles déformations, la valeur de G' est supérieure à celle de G'' traduisant le caractère élastique dominant des émulsions. Ces expériences ont permis d'obtenir la limite de viscoélasticité et de déterminer les modules visqueux G'' et élastique G' qui seront exploités dans le cadre d'une étude multi-échelle et seront présentés les paragraphes suivants.

En revanche, à partir de ces courbes obtenues en oscillation d'autres paramètres pertinents pour la compréhension de la structure des émulsions peuvent être extraits. On retrouve bien une décroissance en fonction du taux de cisaillement caractéristique des fluides non newtoniens. Le comportement viscoélastique apparent est en effet

classiquement relié à la viscosité apparente par une loi de puissance (loi d'Ostwald de Waele). La spectroscopie à ondes diffuses (SOD) utilisant la mesure des déplacements quadratiques moyen des gouttelettes dans les émulsions mono-disperses a permis de confirmer cette dépendance en loi de puissance fractionnaire du module de cisaillement complexe des émulsions [141], [149]. Classiquement, la relation de Stokes-Einstein généralisée débouchant au modèle ressorts pistons présentés dans le chapitre 1 ne permet pas de prévoir des puissances autres qu'entières car ce modèle considère l'émulsion comme un continuum viscoélastique isotrope.

Pour tenir compte du changement de comportement viscoplastique, on utilise plus communément le modèle de Cross qui relie la viscosité avec le taux de cisaillement [150]. Selon l'équation ci-dessous :

$$\eta = \frac{\eta_{app}}{1 + (\tau \dot{\gamma})^\alpha} \quad (III.3-1)$$

Dans ce cas, $\tau = \frac{\eta_{app}}{G_{app}}$ est la constante de relaxation apparente à l'échelle d'investigation, η_{app} la viscosité apparente et G_{app} la rigidité apparente. L'exposant α est alors une valeur représentative de la structure rigide apparente de rigidité G_{app} (souvent inférieure à 1 pour la matière molle). Le circuit équivalent devient alors :

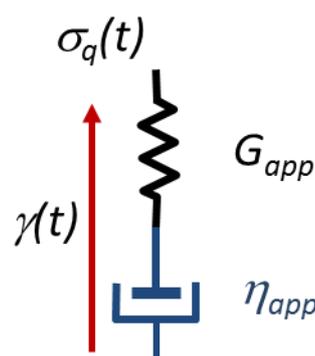


Figure III.3-5. Représentation mécanique apparente de l'émulsion considérée.

En échelle log-log on peut constater par une analyse de type Bode que l'allure de ce type d'équation est la même que celle observée dans la Figure III.3-4. La décroissance d'un facteur

10 lorsque le taux de cisaillement accroît d'un ordre de grandeur quand $\tau \dot{\gamma} \gg 1$, permet de déduire l'exposant.

En effet, si l'on considère l'émulsion comme un ensemble de contraintes – piston excité en régime sinusoïdal, on peut introduire la viscosité complexe à l'aide du module complexe de cisaillement. En s'appuyant sur les équations et du formalisme du chapitre 1, on obtient en notation complexe :

$$\eta^*(\omega) = \frac{\sigma(\omega)}{\dot{\gamma}(\omega)} = \frac{G^*(\omega)}{j\omega} = \frac{G'(\omega) + j G''(\omega)}{j\omega} = \frac{G''(\omega)}{\omega} - j \frac{G'(\omega)}{\omega} \quad (III.3-2)$$

Puisque $\dot{\gamma} = j\omega\gamma$ et puisque ω représente la vitesse de rotation de cisaillement (ici expérimentalement fixée à 2π rad/sec lors de la configuration du le rhéomètre), on déduit alors que l'équation (III.3-1) peut s'écrire sous la forme :

$$G^*(\dot{\gamma}(\omega)) = \frac{\omega \eta_{app}''}{(1 + (\dot{\gamma}(\omega) \tau)^\alpha)} + j \frac{\omega \eta_{app}' (\dot{\gamma}(\omega) \tau)^{\alpha/2}}{(1 + (\dot{\gamma}(\omega) \tau)^\alpha)} \quad (III.3-3)$$

On note d'ailleurs qu'en rhéologie, le taux de cisaillement étant comparable à la vitesse de rotation de cisaillement (au facteur de couplage prêt), la dépendance en fonction du taux de cisaillement est comparable à la dépendance en fréquence classiquement utilisée dans les modèles. En utilisant les échelles logarithmiques l'étude asymptotique de Bode permet de déduire la constante de temps apparente τ (points de coupure des deux asymptotes des courbes en 0 et à l'infini – pour $\tau \dot{\gamma} \gg 1$) et la puissance α (pente de l'asymptote) puisque :

$$\begin{aligned} \log G'(\dot{\gamma}(\omega)) &= \log \omega \eta_{app}'' - \log(1 + (\dot{\gamma}(\omega) \tau)^\alpha) \\ \log G''(\dot{\gamma}(\omega)) &= \log \omega \eta_{app}' + \frac{\alpha}{2} \log(\dot{\gamma}(\omega) \tau) - \log(1 + (\dot{\gamma}(\omega) \tau)^\alpha) \end{aligned} \quad (III.3-4)$$

En étudiant le graphe présenté dans la Figure III.3-4 (module élastique), la fréquence d'étude étant égale à 1 Hz, on déduit à partir de la pente à fort taux de cisaillement la valeur de la puissance. (Notons que cette pente est légèrement moindre pour le module visqueux présenté sur la Figure III.3-4, cela s'explique alors par le terme supplémentaire en $\alpha/2 \log(\dot{\gamma}(\omega) \tau)$).

A partir de ces courbes les trois paramètres peuvent donc être extraits pour chaque émulsion (coefficient de corrélation r^2 autour de 0,99).

- La rigidité et la viscosité apparentes dues aux interactions entre gouttelettes et fluide continu obtenus pour les faibles taux de cisaillement.
- Le temps de relaxation du système (noté τ) obtenu plus simplement à partir de l'intersection des asymptotes par les réponses de G' est caractéristique des relaxations des gouttelettes.
- α qui est représentatif de la structure et est généralement autour de 0,5 pour une émulsion simple huile-eau [151]. L'apport d'autres ingrédients et notamment des polymères peuvent faire fluctuer cette valeur entre 1/2 et 2/3 d'après les théories de Rouse ou de Zimm [152].

En pratique, comme mentionné précédemment la détermination de ces paramètres peut être réalisée par le tracé des asymptotes. Cependant, dans le cadre de ces travaux, une approximation mathématique de l'équation pour chaque courbes d'écoulements a été réalisée avec des coefficients de corrélation $r^2 = 0,99$. Les paramètres extraits de ses courbes sont présentés dans les figures ci-dessous.

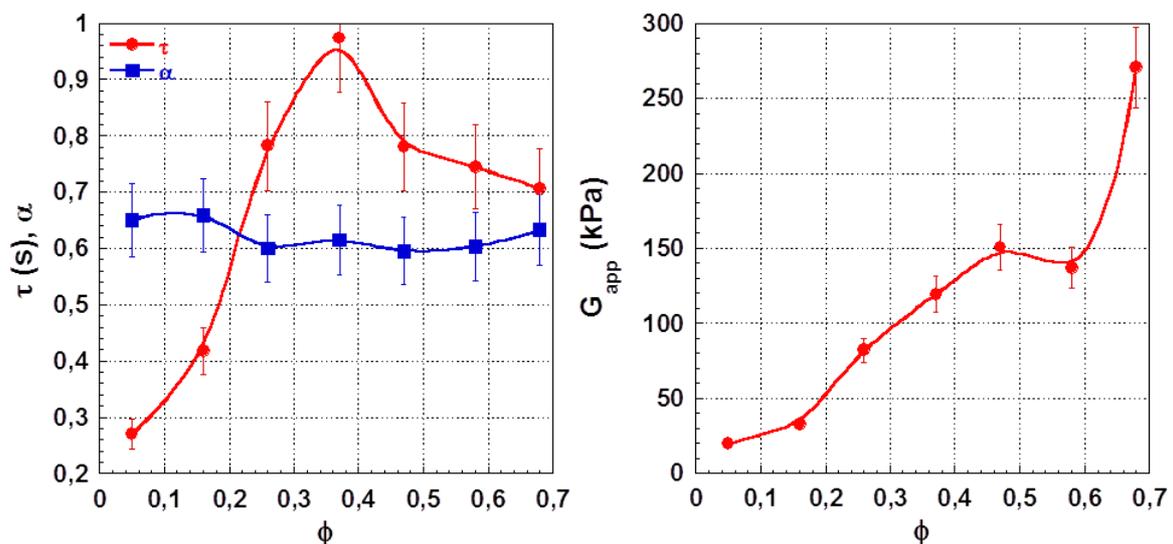


Figure III.3-6. Évolution des constantes de temps τ et exposant α et des rigidités apparentes G_{app} en fonction de la fraction volumique. Chaque point correspond à la mesure moyenne faite sur chaque émulsion pour les sept pourcentages d'huile (IPP) à 6% de (P80 + GMS) : 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%.

L'observation du temps de relaxation montre que deux régimes sont clairement identifiables en fonction de la fraction volumique. Le premier correspond au régime dilué à faiblement concentré, compris entre $\phi = 0$ et $\phi = 0,35$. Le régime faiblement concentré se limite à un temps de relaxation maximum (pour $\phi = 0,35$) pouvant correspondre à la limite de stabilité de l'émulsion. Le régime suivant correspond à des valeurs de ϕ supérieures à 0,35 correspondant à des émulsions concentrées. Au-delà de $\phi > 0,45$ on devine une légère inflexion correspondant à un régime fortement concentré qui ne permet pas l'obtention d'une émulsion stable.

Si l'on raisonne maintenant avec le pourcentage d'huile, l'évolution du temps de relaxation lors de la variation du pourcentage en IPP montre un comportement quadratique jusqu'à 30% d'huile (à corrélérer avec une augmentation de la taille ou du nombre de gouttelettes d'huile, donc de la surface des interfaces) suivi d'un infléchissement jusqu'à 30%. Au-delà de 30%, des phénomènes de coalescence apparaissent progressivement avec l'augmentation de la proportion d'IPP engendrant une décroissance de τ jusqu'à 50%. Ces variations sont analogues à celles observées pour l'évolution du module visqueux de cisaillement en rhéologie. De ce fait, pour le pourcentage fixé de tensioactifs (6%), le seuil de 30% en IPP apparaît comme une valeur critique dans l'arrangement de la microstructure de nos émulsions ; il est d'ailleurs intéressant de noter qu'une fraction volumique de 0,3 (soit légèrement inférieur à 30% de phase dispersée) est parfois considérée comme la limite entre des émulsions dites diluées et des émulsions dites concentrées.

La composante α étant comprise entre 0,6 et 0,7 confirme simplement la structure d'une émulsion huile dans eau contenant un réseau de polymère. Notons une légère diminution de cette valeur à partir de 30% d'huile.

Enfin, selon Mason [141] les émulsions diluées se comportent comme des liquides visqueux, tandis que les émulsions concentrées présentent une élasticité semblable à celle des solides. Ceci explique l'augmentation progressive de la rigidité apparente avec la fraction volumique. Le passage à un régime fortement concentrée est alors visible par la brusque augmentation de la rigidité pour $\phi = 0,6$. La structure concentrée de cette émulsion reste donc mesurable en rhéologie classique et ce en dépit du fait qu'elle soit uniquement stabilisée par le réseau de polymère.

III.3.3.2 Etude de l'impact de la quantité d'émulsifiants sur les propriétés rhéologiques macroscopiques

III.3.3.2.1 Effet des émulsifiants sur la viscosité apparente

Les expériences réalisées, sont les mêmes que celles faites pour l'étude de la variation en huile dans les émulsions. Tout d'abord une étude de la viscosité en fonction de la contrainte est réalisée (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

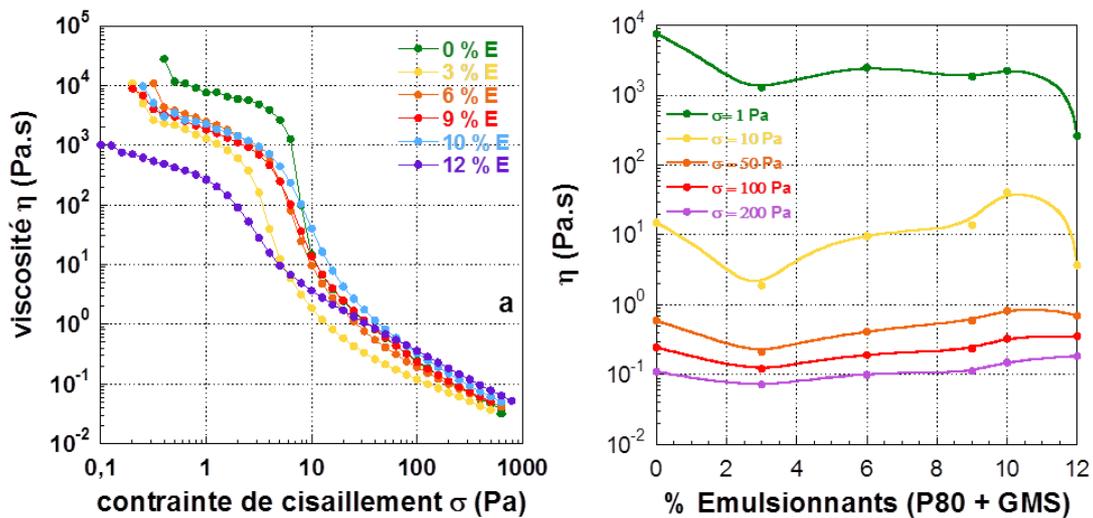


Figure III.3-7. Evolution de la viscosité en fonction de la contrainte (a) ou du pourcentage d'émulsionnants (b).

Les résultats montrent que toutes les émulsions possèdent un comportement rhéofluidifiant. Afin de bien définir le domaine de validité, le choix a été fait de tester quelques formulations d'émulsions possédant une concentration d'émulsionnant excessive (jusqu'à 12%). Pour ces fortes concentrations la résistance à la contrainte devient moins importante lorsque cette dernière augmente. On confirme par cette étude que les émulsions au-delà de 10% de P80 + GMS ne sont pas stables. En effet pour ces concentrations, les observations organoleptiques ont mis en exergue la présence de grumeaux de tensioactifs rendant alors ces émulsions non homogènes. Pour des pourcentages supérieurs à 9% les émulsions ne sont plus stables, la quantité d'émulsionnants devenant trop importante par rapport à celle de l'huile.

Pour de fortes contraintes, la viscosité apparente évolue très peu (légère augmentation) quand on augmente la concentration en émulsionnants dans les émulsions. On peut

expliquer ce résultat par le fait que les proportions entre huile et eau restent quasi identiques ; ainsi les faibles variations en tensioactifs n'influent que très légèrement sur la viscosité apparente des émulsions. En revanche pour de faibles contraintes (1 et 10 Pa), la viscosité apparente est plus sensible aux variations en émulsionnant. De plus, les émulsions extrêmes et instables contenant 0 et 12% d'émulsionnants semblent se distinguer des autres. A 0%, la viscosité apparente est plus élevée, ceci est dû au fait que la formule s'apparente à celle du gel Carbopol contenant des inclusions huileuse. Au contraire, à 12% d'émulsionnants la quantité importante de tensioactif induit de nombreuses interactions pouvant perturber la formation de ce réseau de Carbopol. Les émulsionnants utilisés sont non ioniques, toutefois il s'agit de molécules polaires qui peuvent être considérées comme des dipôles permanents susceptibles de participer à des interactions attractives du type Debye (dipôle permanent-dipôle induit). En effet, positionnés à l'interface entre l'huile et la phase aqueuse, l'apparition d'une asymétrie électrique de plus en plus prononcée peut être responsable des phénomènes d'attraction qui apparaissent entre les gouttelettes, et pouvant alors gêner la formation du réseau de polymère.

III.3.3.2 Identification des effets viscoélastiques associés à l'augmentation de la quantité d'émulsionnants

L'étude dynamique en fonction du taux de cisaillement permet de remonter aux paramètres de l'équation (I.2-2) à partir des évolutions du module élastique G' et G'' pour différentes concentrations d'émulsifiant (P80 + GMS). La détermination des modules G' et G'' à basse fréquence, caractéristiques des différentes émulsions, se fait donc expérimentalement comme précédemment. L'évolution des modules élastiques G' et visqueux G'' réalisée est représenté dans la Figure III.3-8.

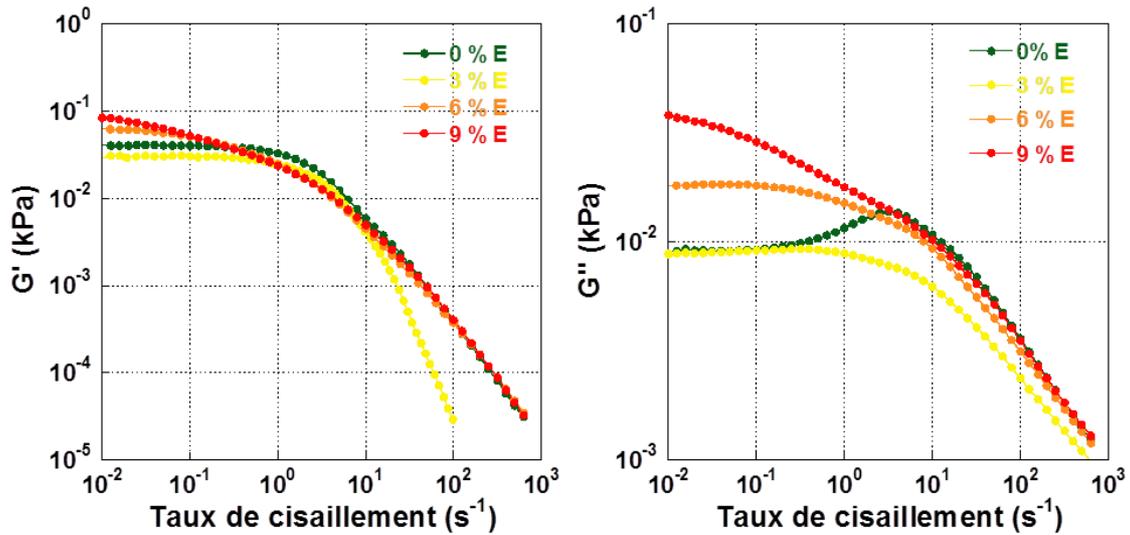


Figure III.3-8. Evolution des modules G' et G'' en fonction du taux de cisaillement pour différents pourcentages en émulsifiants.

Toutes les émulsions possèdent un comportement élastique prédominant. Les valeurs de G' et G'' seront exploitées dans au cours de l'étude multi-échelle.

En ce qui concerne, les paramètres de structuration macroscopiques ; les données extraites (coefficient de corrélation r^2 autour de 0,99) sont présentées en fonction des fractions volumiques dans la Figure III.3-9 ci-après.

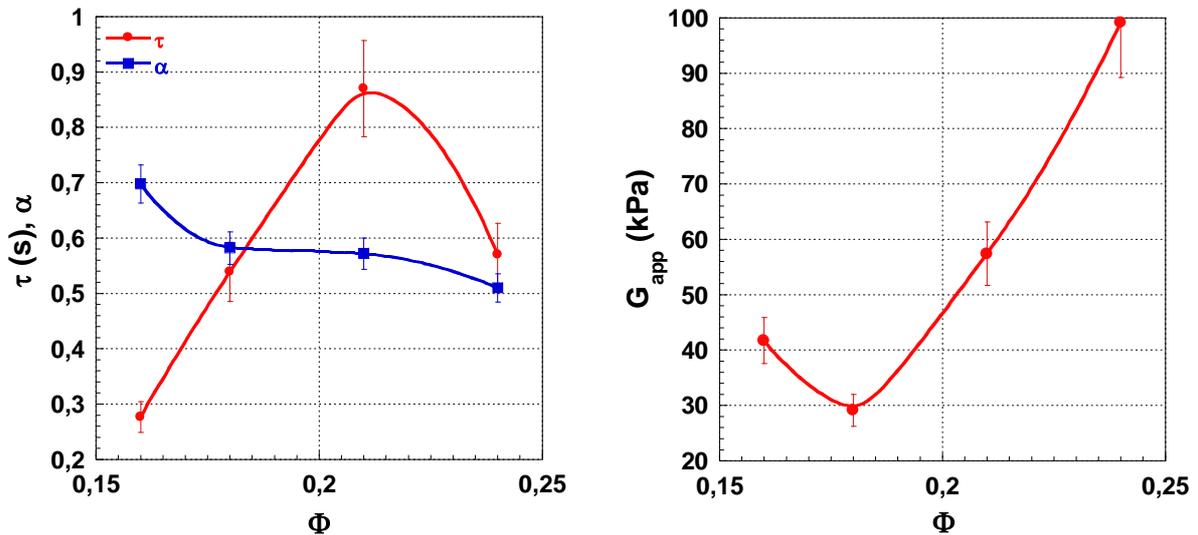


Figure III.3-9. Evolution constantes de temps τ et exposant α et des rigidités apparentes G_{app} et des en fonction de la fraction volumique Φ . Chaque point correspond à la mesure moyenne faite sur chaque émulsion pour les quatre pourcentages d'émulsifiants (P80 + GMS) à 15% d'IPP : 0%, 3%, 6%, 9%.

On note d'abord une légère décroissance du coefficient de puissance α . La fraction volumique n'évoluant que très peu, on peut supposer que cette décroissance est due au fait que les émulsifiants jouent bien un rôle de répulsif entre les gouttes, rigidifiant la structure apparente. Cet effet est d'ailleurs corrélé avec une augmentation du temps de relaxation quasi linéaire jusqu'à une concentration de 6% d'émulsifiant. Au-delà de, on note néanmoins un changement de régime tendant à montrer qu'il existe un optimum pour lequel la structure est la plus stable.

L'évolution de la rigidité apparente montre également deux régimes différents. Le mélange à 0% d'émulsionnant se distingue des autres de par sa structure gélifiée particulière. L'épaississement observé de manière organoleptique entre 3 et 9% d'émulsifiants, est confirmé par l'accroissement régulier de la rigidité apparente macroscopique. Cet effet est en revanche moyenné à l'échelle d'investigation qui peut introduire un biais de mesure.

III.3.4 Détermination des caractéristiques viscoélastiques multi-échelles en lien avec la structuration des émulsions

III.3.4.1 Effets de la concentration en huile

L'étude des propriétés viscoélastiques a donc été complétée par la mesure des modules élastiques G' et visqueux G'' à l'échelle microscopique. Pour accéder aux informations structurelles des différentes émulsions, des mesures en rhéologie haute fréquence (15 MHz) ont été effectuées selon les modes opératoires décrits dans le chapitre précédent. La Figure III.3-10 décrit l'évolution des modules viscoélastiques aux deux échelles (macroscopiques et microscopiques), soit aux fréquences 1 Hz et 15 MHz.

Conformément au comportement en loi de puissance, les ordres de grandeurs des modules élastiques et visqueux sont différents en microrhéologie et en rhéologie basse fréquence. On note que les variations de G' en fonction du pourcentage d'IPP sont tout à fait semblables dans les deux échelles d'investigation. À l'échelle microscopique et macroscopique, on observe que le module élastique G' croît de manière linéaire avec le pourcentage d'IPP. L'augmentation de l'élasticité G' est corrélée avec l'augmentation du nombre et de la taille de gouttelettes d'huile dans le milieu. Les propriétés élastiques des fluides sont proportionnelles au volume occupé par la phase dispersée comme le confirme

les images de microscopie optique et les études rhéologiques précédentes. Cette évolution linéaire est également liée à l'augmentation de la concentration relative en polymère dans la phase aqueuse ayant un effet sur sa rigidité microscopique.

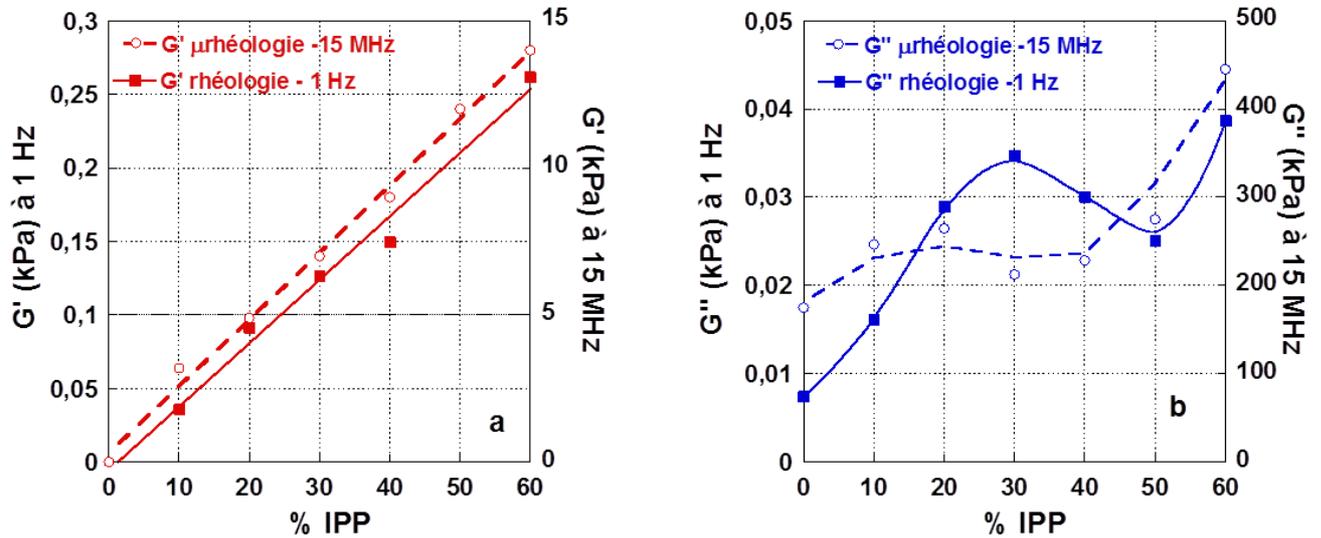


Figure III.3-10. Représentation du module élastique G' (a), du module visqueux G'' (b) aux échelles microscopique (O) et macroscopique (■) en fonction du %IPP.

On observe en revanche un comportement non linéaire du module visqueux G'' aux deux échelles. Ces comportements sont comparables mais au-delà d'un certain pourcentage en IPP, un changement de comportement rhéologique est observé. Ce changement est détecté plus précocement (pour des concentrations plus faibles) en microrhéologie. Ce phénomène s'explique par une sensibilité accrue en haute fréquence des perturbations à l'écoulement de la phase continue dues aux interactions avec la phase dispersée. Le comportement viscoplastique [50] lié aux fortes concentrations en IPP se fait alors sentir pour un taux de 50% d'IPP en microrhéologie et de 60% en rhéologie basse fréquence.

Comme mentionné précédemment, à partir d'une fraction volumique $\Phi=0,58$; les gouttelettes d'huiles sont plus concentrées. On approche en effet des émulsions classiquement très fortement concentrées. Les émulsions n'étant plus stable d'un point de vue cinétique, mais possédant une structuration compacte, on observe une augmentation considérable du module visqueux.

A l'échelle macroscopique, la rhéologie montre une augmentation quasi linéaire de la viscosité pour des pourcentages d'IPP allant de 10 à 30 % et une diminution de cette valeur

entre 30 et 50% en IPP. En effet, les images de microscopie optique montrent une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes jusqu'à 30%, valeur à partir de laquelle on observe un début de coalescence qui se poursuit au moins jusqu'à 50% ce qui justifie une diminution de G'' .

A l'échelle microscopique, le module visqueux G'' dépend davantage de la viscosité du fluide majoritaire. Conséquemment, les variations du module visqueux jusqu'à 30% en microrhéologie sont présentes mais plus faibles car le fluide majoritaire à petites échelle est proche de l'eau. Ce résultat est confirmé par les valeurs de viscosité apparente (En faisant l'approximation que ces émulsions de faible viscosité se comportent comme des fluides newtoniens, on a : $\eta = G''/\omega \approx 2 \text{ mPa.s}$) qui sont proches de la viscosité de l'eau. En effet, entre 10 et 30% les émulsions sont diluées, la fraction volumique en huile est très faible ; ainsi les valeurs de viscosité représentent celle de l'eau contenant quelques inclusions (goutte d'huile). À partir de 30% en huile, le comportement visqueux des gouttelettes est prédominant. Ainsi plus on augmente la concentration et la taille des gouttelettes d'huile plus le module visqueux augmente. En microrhéologie la variation de G'' est donc plus sensible aux propriétés d'écoulement du milieu continu compte tenu des interactions aux interfaces des gouttes.

III.3.4.2 Effet de la concentration en émulsifiants

La figure ci-après compare les résultats des modules élastiques G' et visqueux G'' obtenus pour les différentes concentrations en émulsifiants. Ici aussi, les ordres de grandeurs des modules élastiques et visqueux sont différents en microrhéologie et en rhéologie car l'échelle d'investigation n'est pas la même.

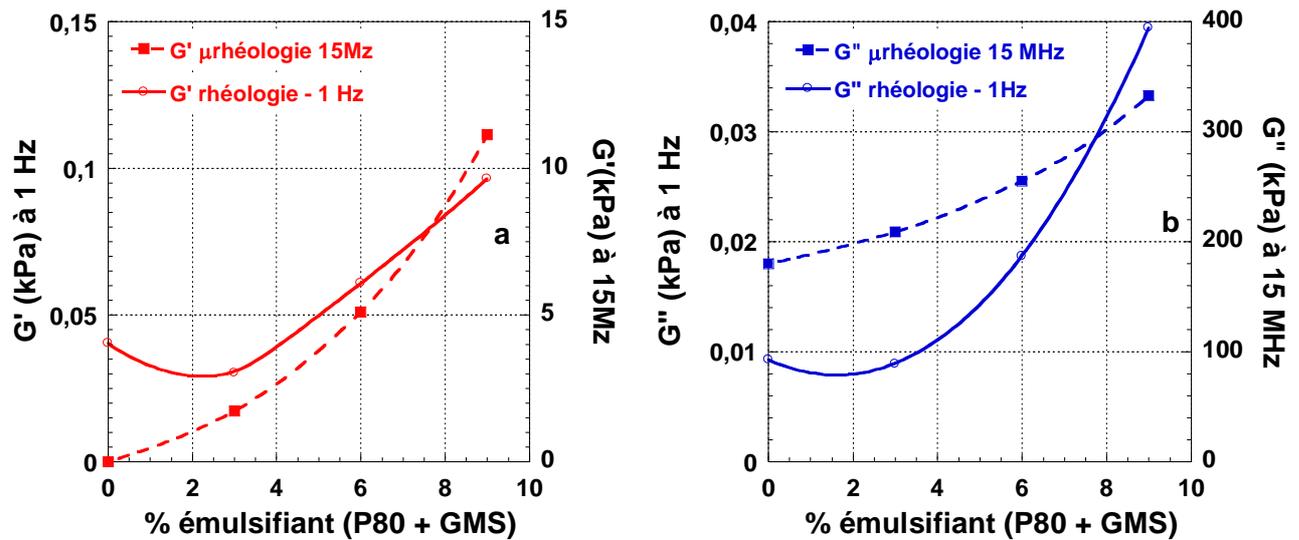


Figure III.3-11. Représentation du module élastique G' (a), du module visqueux G'' (b) aux échelles microscopique (O) et macroscopique (■) en fonction du pourcentage d'émulsifiants (P80 + GMS).

On observe une augmentation des propriétés viscoélastiques G' et G'' avec le pourcentage d'émulsifiants aux deux échelles. Si en basse fréquence toutes les émulsions possèdent un comportement élastique prédominant en hautes fréquences c'est l'aspect visqueux qui est prédominant compte tenu de l'échelle d'investigation étudiée.

L'augmentation de la quantité d'émulsifiant entraîne la diminution des phénomènes de floculation (en favorisant les répulsions entre gouttelettes) comme le montre les clichés de microscopie optique (Figure III.3-2). A 3% d'émulsifiants les gouttelettes présentent une polydispersité et flocculent (regroupement en amas). A 6% et 9% de tensioactifs, les gouttelettes paraissent plus monodisperses et défloculées. En effet, avec l'augmentation du pourcentage d'émulsifiants, la surface d'interaction entre les phases huileuse et aqueuse s'accroît et les gouttelettes sont de mieux en mieux dispersées. D'un point de vue mécanique, les gouttes d'huiles flocculées (3%) ne vont s'opposer que faiblement au mouvement de cisaillement induits par la contrainte appliquée. Quand ces gouttelettes sont défloculées (6 et 9 %), la surface de frottement lors des cisaillements induits par les mesures rhéologiques augmente, entraînant une augmentation des modules visqueux G'' et élastiques G' .

En microrhéologie, les évolutions des modules G' et G'' suivent une loi quadratique (coefficients de corrélation R^2 au minimum égaux à 0,999).

Partant de l'hypothèse posée précédemment, le module visqueux G'' obtenue à cette échelle dépend du fluide majoritaire. Dans notre cas, ce fluide est la phase continue aqueuse et gélifiée ; comme les variations en émulsifiant sont faibles, la fraction volumique de l'IPP varie peu. On en déduit donc que l'augmentation de la viscosité est vraisemblablement due à une meilleure dispersion des gouttelettes d'huile dans la phase aqueuse.

En ce qui concerne la croissance des modules élastiques, la croissance de G' selon une loi quadratique est dû à l'augmentation de surface de contact entre les deux phases. En effet, l'augmentation de l'élasticité pourrait être due à la modification de la rigidité de l'interface induite par l'augmentation des molécules tensioactives qui entourent les gouttelettes, et à leur individualisation progressive. Cette individualisation des gouttelettes entraîne donc l'augmentation des particules dispersée pouvant se déformer et s'opposer à l'écoulement de l'émulsion. Nous pouvons à partir de ces résultats poser une seconde hypothèse : à l'échelle microscopique le module élastique G' dépend de la phase dispersée, de sa composition et de son organisation dans l'espace. L'évolution quadratique du module élastique à l'échelle microscopique met finalement en évidence le lien entre l'élasticité et la floculation des gouttelettes. Leur agencement spatial induit une augmentation de la surface de frottement.

III.4 CONCLUSION

L'étude de la variation de la composition de la phase dispersée dans des émulsions simples, montre l'apport de la microrhéologie pour accéder aux propriétés mécaniques de ces fluides complexes à une échelle mésoscopique dans un objectif d'étude de stabilité. L'étude multi-échelles fonction de la fréquence ou du taux de cisaillement permet de surcroit de contrôler l'influence de la formulation sur la structuration et d'en déduire, incluant la dépendance en loi de puissance, les conditions optimales d'une émulsion dense mais stable en fonction des matières premières.

Dans un premier temps, une étude rhéologique à basse fréquence a permis de caractériser les propriétés macroscopiques des émulsions étudiées. De ces expériences nous avons pu extraire d'autres paramètres que sont le temps de relaxation τ , et la puissance α . Ces variables actuellement très peu étudiés dans l'industrie cosmétique représentent une première approche permettant d'identifier la structuration des émulsions.

Ayant validé les profils rhéologiques connus dans la littérature de nos émulsions, une approche microrhéologique a par la suite été mise en place afin de mieux comprendre les liens entre les différentes échelles. Les premiers liens établis entre les propriétés rhéologiques et les instabilités ont été confirmés et affinés par l'étude à l'échelle microscopique. En effet, les phénomènes d'instabilité tels que la floculation ou la coalescence ont un impact majeur sur les modules visqueux et élastiques à l'échelle microscopique. La détection de la coalescence est plus précoce tandis que l'état dispersé ou floculé des gouttelettes modifie la nature de l'évolution des paramètres viscoélastiques.

Ces résultats montrent que les paramètres viscoélastiques obtenus dépendent directement de la concentration des gouttelettes d'huiles, de leurs tailles, mais également de leurs organisations spatiales (de leurs interactions). Nous avons alors tirés de ces expériences deux hypothèses :

- le module visqueux G'' dépend du fluide prédominant et de l'arrangement spatiale de ses inclusions ;
- le module élastique G' est dépendant de la phase dispersée et de son organisation.

Ces résultats s'inscrivant dans une approche multi-échelle et multimodale, permettent une optimisation de la formulation. Elle doit aussi être pertinente pour suivre l'influence de l'incorporation de micro-organismes sur la structure mésoscopique des émulsions.

Chapitre IV UN DEBOUCHE PROMETTEUR : INFLUENCE DE LA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* SUR LA STRUCTURE D'EMULSIONS

Le travail présenté dans ce chapitre a consisté à évaluer l'impact de contaminations bactériennes sur l'arrangement structural interne d'émulsions et inversement. Pour se faire, le développement d'une bactérie modèle (*Pseudomonas fluorescens*) a été suivi, d'une part dans une émulsion définie comme référence et d'autre part dans une émulsion enrichie en gélifiant [99], [100], [117], [118], [153] (Carbopol). Les bactéries ont été introduites de manière quantitative et contrôlée. Leur viabilité et leur croissance ont été suivies par dénombrement selon des méthodes proches de celles utilisées au cours des challenges test. Parallèlement, le suivi des propriétés viscoélastiques par microrhéologie des émulsions contaminées a été réalisé pour accéder aux informations structurales à une échelle microscopique. L'échelle d'investigation choisie pour les analyses, présente l'avantage de remonter simultanément aux propriétés rhéologiques à l'échelle des gouttes de la phase dispersée dans une émulsion, et à celle des bactéries qui pourraient contaminer ce milieu complexe et s'y développer. Au préalable la recherche de formulations résistantes à la stérilisation par autoclave a été essentielle pour sélectionner les émulsions pour lesquelles une contamination forcée a été effectuée.

IV.1 TRAVAIL EN CONDITIONS STERILES : IMPACT DE L'AUTOCLAVE SUR LES EMULSIONS

Pour suivre le développement de bactéries dans des émulsions de façon contrôlée, il est nécessaire de s'assurer de l'absence initiale de micro-organismes dans ces matrices. Une étape de stérilisation des émulsions est à réaliser en amont de toute contamination. La méthode de stérilisation choisie est l'autoclave ; elle représente le moyen de stérilisation le plus courant en microbiologie.

L'autoclave permet une stérilisation à la vapeur saturante d'eau sous pression constante de 2 bars. Il s'agit donc d'un procédé imposant aux émulsions une pression supplémentaire associée à une température élevée menant à la destruction des micro-organismes.

Cependant le choix de cette méthode de stérilisation n'est pas à priori sans conséquence sur la structure des émulsions. En effet les températures et pressions inhabituelles appliquées aux émulsions peuvent perturber leurs structures en aboutissant parfois à une démixtion complète des systèmes. Il était donc important de vérifier l'impact de cette étape de stérilisation sur les émulsions avant leur inoculation avec des bactéries.

Le développement d'émulsions « résistantes » à l'autoclave et de structures internes suffisamment différentes a constitué une étape préalable à la contamination forcée et au suivi de croissance de bactéries. En premier lieu l'émulsion de référence a été testée, puis différentes orientations ont été envisagées afin d'optimiser la stabilisation des nouvelles formulations d'émulsions après autoclavage.

IV.1.1 Stérilisation par autoclave de l'émulsion de référence

L'émulsion de référence (15% d'huile, 6% d'émulsifiants et 0,3 % de gélifiant) est soumise à une stérilisation de 20 minutes par autoclave. La référence a été stérilisée le lendemain de sa formulation. Des clichés de microscopie optique ont été réalisés après retour à température ambiante de l'échantillon autoclavé. En parallèle, l'échantillon non autoclavé a été conservé à 25°C à l'obscurité avant d'être observé en microscopie optique.

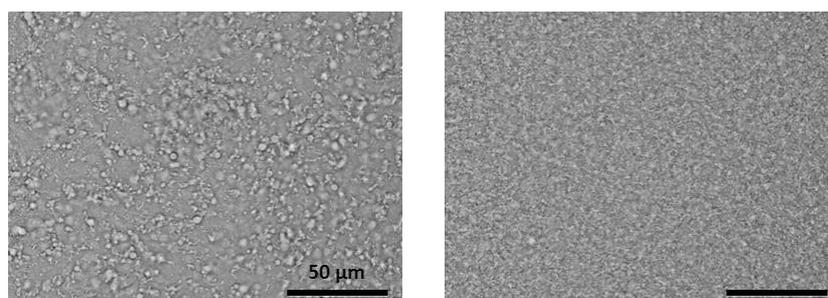


Figure IV.1-1. Images de microscopie optique (objectif $\times 63$) de l'émulsion de référence non autoclavée (à gauche) et autoclavée (à droite).

La comparaison des clichés de microscopie optique, des émulsions stérilisées et non stérilisées, montre une réduction de la taille des gouttelettes d'huile qui deviennent plus monodisperses (Figure IV.1-1. Images de microscopie optique (objectif $\times 63$) de l'émulsion de référence non autoclavée (à gauche) et autoclavée (à droite). Cela laisse supposer un effet

plutôt positif de la stérilisation par autoclave car l'émulsion a résisté à cette étape et n'a pas déphasé. De plus, les gouttelettes d'huile sont mieux séparées. En effet, l'émulsion contenant une quantité suffisante d'émulsifiants pour la stabiliser, l'association fortes température et pression aboutit à la formation d'une émulsion stable aussi bien macroscopiquement que microscopiquement.

Pour mieux évaluer l'impact de la pression sur l'émulsion de référence, une expérience de mise sous pression a été réalisée sur une série de cinq échantillons d'une même formulation. L'émulsion a été placée pendant 20 minutes à température ambiante dans un réacteur et soumise à des pressions constantes de 2, 4 et 6 bars et comparée à un échantillon à pression ambiante. La Figure IV.1-2 montre les résultats obtenus en microscopie optique. La comparaison des clichés obtenus pour différentes mises sous pression montre peu de différences. Globalement la taille des gouttelettes d'huile varie peu et une légère floculation de ces dernières est encore visible. Ces observations laissent supposer que la pression seule, dans la gamme appliquée, n'est pas suffisante pour modifier la structure de l'émulsion de référence contrairement à ce qu'il se passe dans l'autoclave.

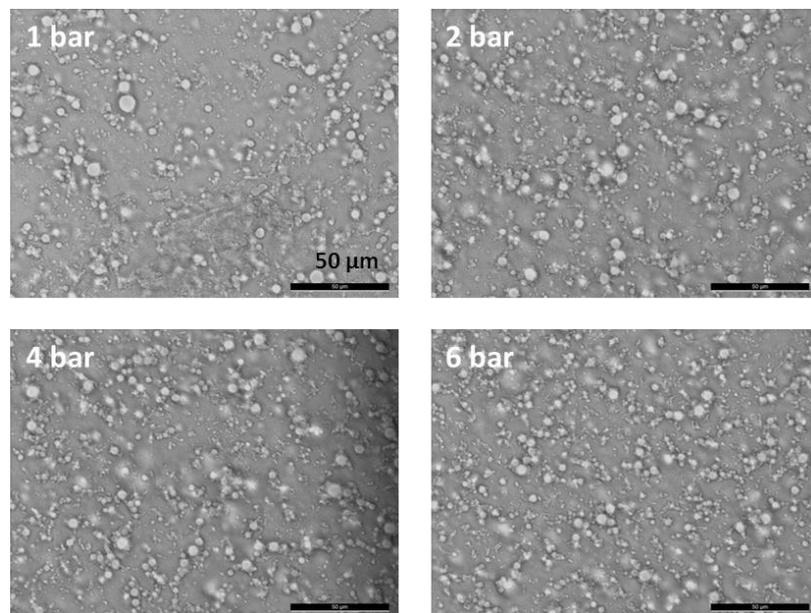


Figure IV.1-2. Images de microscopie optique (objectif $\times 63$) de l'émulsion de référence après 20 minutes à 1, 2, 4 et 6 bar et à température ambiante.

Les paramètres microrhéologiques de l'émulsion de référence avec et sans passage par l'autoclave ont été mesurés. Les résultats montrent que les modules élastique et visqueux

évoluent très légèrement en moyenne après stérilisation. De même, les paramètres microrhéologiques des essais sous pression ont été évalués. Les valeurs ont été répertoriées dans le Tableau IV.1-1. Ces résultats montrent qu'à température ambiante, les paramètres viscoélastiques ne varient pas de manière significative avec la pression.

Pression (bar)	Effet de l'autoclavage		Effet de la pression (25°C)			
	1 (25°C)	2 (121°C)	1	2	4	8
G' (kPa)	22,1	27,7	22,1	30,1	28,8	22,9
G'' (kPa)	303,0	269,1	303,0	274,8	299,9	294,0

Tableau IV.1-1. Modules viscoélastiques de l'émulsion de référence sous différentes conditions de pression et température.

Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'associer la pression et la température pour obtenir un effet sur la structure de l'émulsion de référence - émulsion simple H/E -, notamment la diminution et l'homogénéisation de la taille des gouttes d'huile. La stérilisation par autoclave modifie la répartition de ces gouttelettes d'huile dans la phase aqueuse et peu les paramètres microrhéologiques de l'émulsion. Cependant, pour détecter et suivre le développement de bactéries au sein d'une émulsion, l'essentiel est de s'assurer de la stabilité de l'émulsion et de connaître ses propriétés mécaniques juste avant la contamination bactérienne pour pouvoir en détecter les modifications éventuelles au cours du temps.

Par ailleurs ces observations permettent d'envisager l'autoclave comme une étape à part entière du processus de développement d'une émulsion dans l'objectif de formuler sans conservateurs. Ainsi, cette étape de stérilisation pourrait être utilisée comme une méthode permettant l'homogénéisation et la réduction de la taille des gouttelettes de manière similaire aux méthodes d'homogénéisation à haute pression (mais pour des pressions bien inférieures). Il serait aussi intéressant d'introduire l'usage de l'autoclave dans les procédés de formulation comme méthode comparable à la centrifugation permettant de discriminer les émulsions stables des autres. Ces orientations mériteraient toutefois une analyse plus approfondie, l'autoclavage reste tout de même très brutale et ne peut pas être appliquée à tous les systèmes eau-huile.

Enfin, il serait évidemment intéressant de poursuivre cette analyse des impacts de la stérilisation sur des émulsions et de pouvoir comparer une émulsion autoclavée à une émulsion non stérilisée sur la durée ; sans doute que leurs vieillissements respectifs (l'homogénéisation produite par le passage à l'autoclave) sont différents.

IV.1.2 Influence de l'autoclavage sur la stabilité de formules cosmétiques

Pour montrer l'influence de la structure d'une émulsion sur la croissance de bactéries, on a cherché à développer des émulsions ayant des structures très différentes, tout en étant résistante à l'autoclave. Pour ce faire différents points de la composition de l'émulsion de référence ont été modifiés : les concentrations des composants (huiles, gélifiants ou émulsifiants) et les types de matières premières (gélifiants de différentes natures).

IV.1.2.1 Modification du taux de gélifiant

Pour ajouter une contrainte stérique supplémentaire au sein de l'émulsion et ainsi espérer ralentir le développement de micro-organismes dans les émulsions, le réseau de polymères a été densifié en réalisant deux formulations avec des pourcentages en gélifiant plus élevés (CETD, à 0,5 et 1% ; pour l'émulsion de référence ce pourcentage est fixé à 0,3%). Les proportions des autres constituants restent inchangées et identiques à celles de l'émulsion de référence. La quantité d'eau est alors ajustée.

L'observation organoleptique de ces deux émulsions révèle une augmentation de la viscosité avec le pourcentage de gélifiant. Après autoclave, il n'y a pas de démixtion apparente et le réseau de polymère semble avoir repris sa structure initiale après refroidissement (les émulsions s'épaississent de nouveau). L'observation microscopique en revanche montre une diminution de la taille des gouttelettes et de la floculation après autoclave, comparable à ce qui est observé pour l'émulsion de référence (Figure IV.1-3). Le rapport eau/huile restant quasiment identique à celui de l'émulsion de référence, la présence du gélifiant en quantité croissante, ne semble pas avoir d'effet sur la réduction de la taille des gouttelettes.

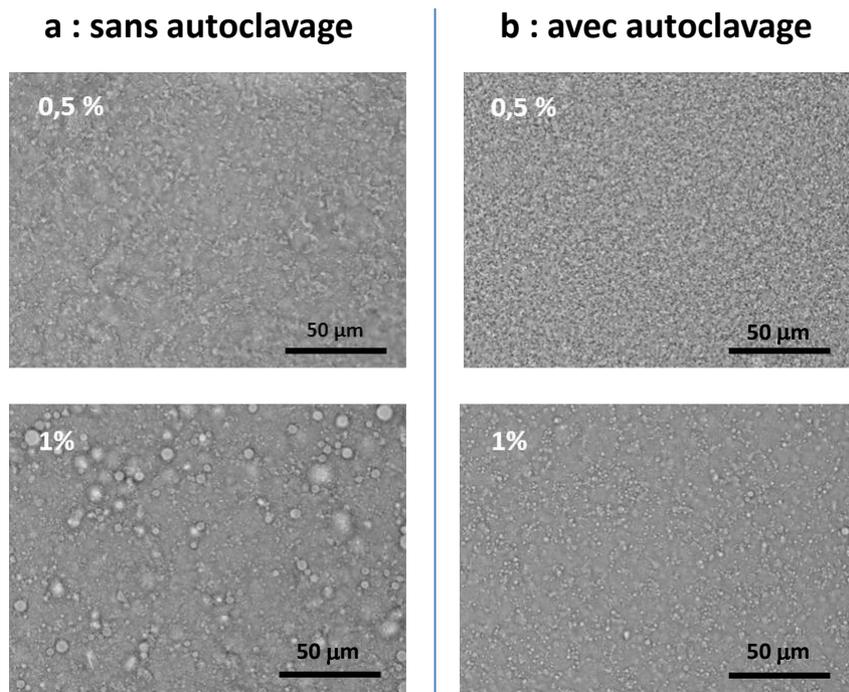


Figure IV.1-3. Images de microscopie optique (objectif $\times 63$) des émulsions contenant 0,5 et 1% de Carbopol ETD 2050. (a) avant et (b) après autoclave (20 minutes à 121°C, 2 bar).

Le tableau ci-dessous recense les valeurs des modules élastiques et visqueux obtenus pour les différents taux de Carbopol ETD2050 sans et avec autoclavage en rhéologie ultrasonore.

% Carbopol ETD2050	Sans autoclavage			Avec autoclavage		
	0,3	0,5	1,0	0,3	0,5	1,0
G' (kPa)	30,0	30,8	33,5	27,7	37,2	54,9
G'' (kPa)	303,0	277,7	272,2	269,1	257,7	263,9

Tableau IV.1-2. Modules viscoélastiques d'émulsions à pourcentage croissant en gélifiant sans et avec autoclavage.

Pour les deux séries d'expériences (sans et avec autoclavage), on observe une augmentation du module élastique G' et une légère diminution du module visqueux G'' avec l'augmentation du pourcentage de gélifiant. Le gélifiant joue un rôle sur la rigidité de l'émulsion ce qui explique le renforcement de l'élasticité des émulsions avec l'augmentation du taux de gélifiant. L'autoclavage, vu les conditions de température et de pression à laquelle les émulsions sont soumises, permet une meilleure dispersion du gélifiant dans l'émulsion et

ainsi d'obtenir un maillage plus régulier en rendant la structure plus élastique. L'augmentation du module élastique est également cohérente avec l'individualisation et la dispersion des gouttelettes induites par les conditions de l'autoclavage. Au sein de la série d'échantillons non autoclavés (et de même pour la série d'échantillons autoclavés), le module visqueux diminue légèrement avec le pourcentage de Carbopol ETD2050, ce qui montre le peu d'effet du gélifiant pour les pourcentages considérés (0,3 à 1%).

Les deux formulations (0,5 et 1% de Carbopol) sont donc également, comme la référence à 0,3%, résistantes à l'autoclave et pourraient être utilisées pour les tests de contamination forcée.

IV.1.2.2 Modification de la concentration en huile

Dans le but de créer un environnement moins favorable au développement de bactéries, une émulsion contenant un pourcentage plus important en huile a été formulée. Afin de modifier considérablement la structure de cette formulation par rapport à l'émulsion de référence, le pourcentage d'huile a été doublé (30%) ; les proportions des autres composants n'ont pas été modifiées, exceptées celle de l'eau. Plusieurs essais de formulation ont été tentés en faisant varier soit la nature du gélifiant Carbopol Ultrez 21 (CU21 ; 0,3%) en remplacement du Carbopol ETD 2050 (CU21 à un degré de réticulation plus élevé que le CETD), soit le taux de gélifiant (0,3 et 0,6%). Dans ce dernier cas, ayant constaté une démixtion rapide de l'émulsion (même avant sa stérilisation) on a également fait varier le taux d'émulsifiants pour arriver à une meilleure dispersion des gouttelettes d'huile dans la phase continue.

Les compositions des trois émulsions les plus représentatives des essais formulés (formules A, B et C) sont décrites dans le Tableau IV.1-3.

Malheureusement aucune formule ne résiste à l'autoclave (démixtion observée à l'œil nu). L'observation des clichés microscopiques (Figure IV.1-4) confirme la perte de stabilité des émulsions après passage à autoclave.

Noms commerciaux	Noms INCI	A	B	C
Eau	aqua	63,7	63,7	61,4
Carbopol ETD2050	carbomer	0,3	-	0,6
Carbopol Ultrez 21	Acrylate/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	-	0,3	-
Isopropyl Palmitate	Isopropyl Palmitate	30	30	30
Eumulgin SMO 20	polysorbate 80	4,2	4,2	5,6
Cutina GMS	glyceryl stearate	1,8	1,8	2,4
TOTAL		100	100	100
Emulsifiants = P80 + GMS		6,0	6,0	8,0
Observation après autoclave		Démixtion forte. Couche d'huile importante en surface		

Tableau IV.1-3. Composition des émulsions A, B et C.

La formule A présente une forte polydispersité des gouttes d'huile et des phénomènes de coalescence avant et après sa stérilisation par autoclave malgré le pourcentage d'émulsifiants plus élevé (6%) qui ne suffit pas à stabiliser les gouttelettes d'huile dans l'émulsion. La formule B, quant à elle, semble plus homogène en terme de distribution de taille de gouttelettes mais présente une floculation pour l'échantillon non autoclavé. En effet, malgré la quantité insuffisante d'émulsifiants, la présence d'un réseau de gélifiant plus dense (polymère Carbopol CU21) permet de stabiliser et de limiter la coalescence. En revanche, les clichés obtenus pour l'émulsion après autoclave laissent supposer que cette méthode de stérilisation a perturbé le réseau du gélifiant et donc permis la fusion des gouttelettes d'huile par coalescence avant que le réseau ne se soit reformé. Enfin, la formule C apparaît homogène et monodisperse avant et après autoclave, voire plus monodisperse après autoclave. Bien que les apports en gélifiant et émulsifiants aient été augmentés, la démixtion observée à l'œil nu, révèle un rejet de l'excédent d'huile après autoclave. Ainsi, le système émulsionnant P80 + GMS (même à 8%) et le gélifiant ne semblent pas permettre de stabiliser une quantité aussi importante d'huile. Aucune de ces trois formules n'a été retenue pour les tests microbiologiques menés ultérieurement.

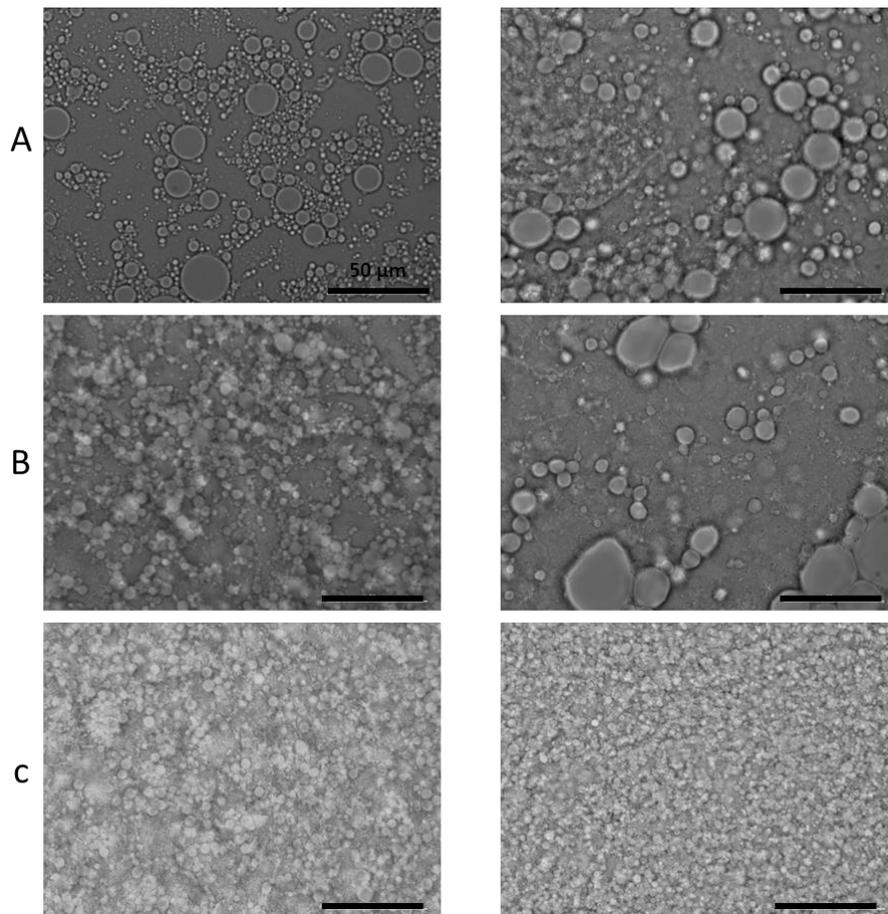


Figure IV.1-4. Images de microscopies optiques (objectif $\times 63$) des émulsions A, B et C, contenant 30 % d'huile avant (à gauche) et après (à droite) autoclave.

IV.1.2.3 Modification de la nature de l'émulsifiant

Les expériences précédentes ont montrés qu'en dépit d'un réseau de polymères plus important, le système émulsionnant (P80 + GMS) n'était pas suffisant pour stabiliser une émulsion contenant 30% d'isopropyl palmitate. Nous avons donc testé des formulations plus complexes, quitte à s'éloigner davantage de l'émulsion de référence, afin d'obtenir une émulsion de structure différente et résistante à l'autoclave.

Pour cela, deux essais réalisés avec le Pemulen (à 0,3 et 0,5 %) en remplacement du gélifiant CETD ont été réalisés. Le Pemulen est un polymère (carbomère) ayant des propriétés émulsionnantes qui devrait permettre une meilleure stabilisation des formulations (cf. Chapitre II). Or, les émulsions obtenues avec le Pemulen, en plus d'être extrêmement filantes et épaisses au toucher, n'ont pas résistées à l'autoclave : une démixtion est visible à l'œil nu.

Par la suite, une émulsion ayant un pourcentage d'huile légèrement plus faible (25%) et un système émulsionnant plus complexe a été formulée. Tout en maintenant le pourcentage total en émulsifiants à 6%, le tensioactif Brij a été introduit au système déjà existant (P80 + GMS). A noter que le rapport massique P80/GMS a par conséquent été modifié, passant de 7/3 à 2/3 (Tableau I.1-1-Tableau IV.1-4).

Noms commerciaux	Noms INCI	Fournisseurs	% (masse)
Phase A			
Eau	<i>water</i>	-	68,7
Carbopol ETD2050	<i>carbomer</i>	LUBRIZOL	0,3
phase B			
Isopropyl Palmitate	<i>isopropyl palmitate</i>	BASF	25
Brij S721	<i>Steareth 21</i>	CRODA	3
Eumulgin SMO 20	<i>polysorbate 80</i>	BASF	1,2
Cutina GMS	<i>glyceryl stearate</i>	BASF	1,8
TOTAL			100

Tableau IV.1-4. Composition de l'émulsion contenant 25% d'huile et 6% d'un système émulsionnant formé par trois émulsifiants (P80 + GMS + Brij).

L'émulsion obtenue est blanche et homogène et ne déphase pas après autoclave. La microscopie montre en revanche des phénomènes de coalescence témoignant d'une certaine instabilité (Figure IV.1-5).

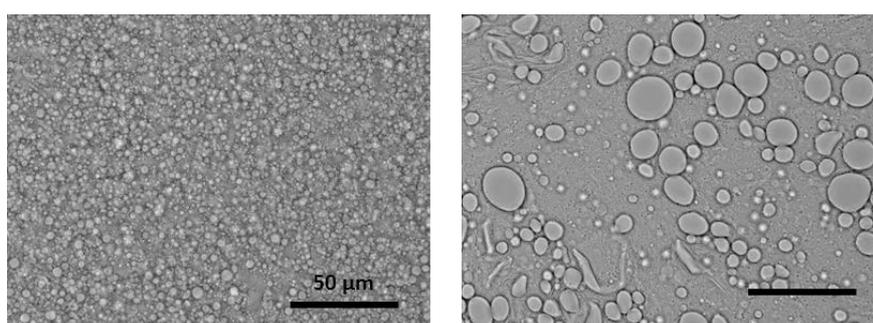


Figure IV.1-5. Images de microscopie optique (objectif $\times 63$) de l'émulsion contenant 25% d'huile et 6% d'un système émulsionnant (P80 + GMS + Brij) avant (à gauche) et après (à droite) autoclave.

De ces observations on peut supposer que le nouveau système d'émulsifiants utilisé (P80 + GMS + Brij) est suffisant pour éviter le rejet d'huile et donc la démixtion, mais pas assez efficace toutefois pour limiter la coalescence. Finalement, au vu des résultats obtenus,

la formule contenant l'émulsifiant du type Brij représente une candidate potentielle pour l'étude du développement bactérien.

L'obtention d'émulsions simples H/E à la fois plus concentrées en huile et résistantes à la stérilisation par autoclave soulève deux problèmes. D'une part la démixtion qui témoigne de l'instabilité des émulsions : les couches d'huile formées en surface ajoutent une contrainte supplémentaire pour le développement de bactéries, en empêchant par exemple l'entrée du dioxygène dans les émulsions. D'autre part la coalescence, visible uniquement à l'échelle microscopique, reflète également une certaine instabilité ou du moins ses prémices. Cependant, il s'avère que la présence de grosses gouttes d'huile issues de la coalescence au sein des émulsions pourrait représenter malgré tout un microenvironnement intéressant dans le cadre d'un suivi de développement bactérien en modifiant l'accès à l'eau ou en contraignant l'espace disponible pour les micro-organismes.

Les « bons » candidats pour le suivi microrhéologique de bactéries sont les émulsions qui ne présentent ni déphasage visible à l'œil nu, ni trop de coalescence après stérilisation par autoclave. Le choix s'est porté sur deux émulsions : la référence et une émulsion contenant 1% de gélifiant Carbopol qui présente une structure plus dense qui, à priori, devrait être plus contraignante pour que les bactéries puissent se développer.

IV.2 SUIVI DE CROISSANCE DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* DANS L'ÉMULSION DE REFERENCE PAR LA METHODE DE DENOMBREMENT

Pour évaluer l'influence réciproque de la contamination microbienne sur l'organisation structurale des émulsions, la souche bactérienne choisie a été *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluo 76A*) qui est facilement détectable et manipulable. De plus elle se rapproche d'une des souches utilisées dans le challenge test : *Pseudomonas aeruginosa*. La souche d'étude *P. fluo 76A*, a été fournie par le laboratoire LSM de l'université de Rouen pour un travail au sein d'une collaboration avec les Professeure Nicole Orange et Docteure Cécile Duclair-Poc.

Pour éviter toute contamination incontrôlée, la stérilisation de l'émulsion a été effectuée. Après s'être assuré que la stérilisation par autoclave n'avait qu'un faible impact sur la texture et la stabilité de la formulation de référence, nous avons également vérifié la

viabilité de la souche bactérienne *P. fluo 76A*, dans ce milieu complexe en respectant au mieux ses conditions optimales de croissance (28°C, sous agitation et aération).

Pour cela 50 µL de culture bactérienne liquide ont été inoculés à une concentration finale de 10^3 UFC.mL⁻¹ dans 5 g d'émulsion stérilisée (émulsion de référence ; des essais témoins sans bactérie ont également été préparés). De plus, on a fait le choix d'utiliser un contenant en verre différent pour chaque jour de culture afin d'éviter les contaminations liées aux manipulations d'ouverture et de fermeture des contenants. Ainsi, tous les pots sont inoculés le même jour, dans les mêmes conditions, et sont stockés à 28°C pendant 24, 48 et 72 heures sous agitation à 180 rpm, jusqu'au dénombrement. La courbe de croissance (Figure IV.2-1) est obtenue pour la moyenne de trois essais.

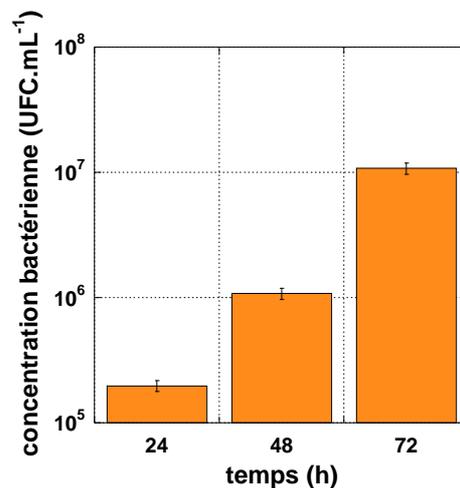


Figure IV.2-1. Profil de croissance de *P. fluo 76A* dans l'émulsion de référence (trois jours à 28°C).

Une augmentation du nombre de colonies au cours des 72 premières heures est observée. La bactérie *P. fluo 76A* est donc capable de survivre et de se multiplier dans l'émulsion de référence qui représente un milieu de culture propice.

Les bactéries étant viables sur trois jours à 28°C dans cette émulsion, un suivi sur 32 jours à 25°C a ensuite été réalisé (en sachant que la référence est stable plus de deux mois), afin de suivre la croissance de *P. fluo 76A* dans des conditions de stockage classique d'un produit cosmétique (température ambiante *i.e.* 25°C, sans agitation et obscurité avec un faible apport en dioxygène). Pour ce suivi, tous les pots ont été inoculés (10^3 UFC.mL⁻¹ de *P. fluo 76A* pour 5 g d'émulsion) le même jour, dans les mêmes conditions : un pot d'émulsion

par jour de dénombrement et autant de pots « témoin » inoculés avec 50 μL de milieu de culture ne contenant pas de bactérie. Les résultats des dénombrements présentés Figure IV.2-2 correspondent à la moyenne obtenue à partir de trois essais.

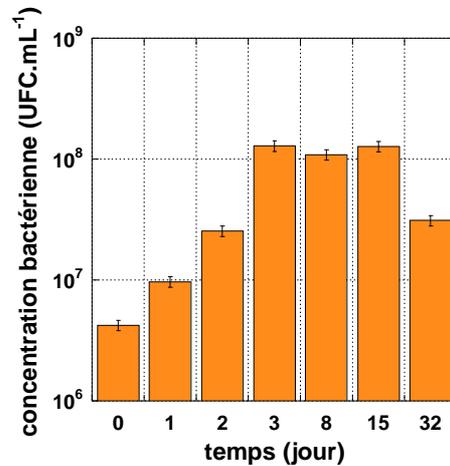


Figure IV.2-2. Profil de croissance de *P. fluo* 76A dans l'émulsion de référence (32 jours à 25°C).

Les émulsions témoins n'ont montré aucune contamination. Par ailleurs, la Figure IV.2-2 montre que dans l'émulsion de référence, la bactérie a une phase de croissance exponentielle d'une durée de trois jours. La phase stationnaire semble s'étaler entre le troisième et le quinzième jour. Un début de décroissance est visible à partir du quinzième jour dans ces conditions précises de culture.

Ces résultats ont été obtenus par dénombrement bactérien, qui est une manipulation efficace mais fastidieuse à réaliser. Pour tenter de contourner ces manipulations, des dosages de glucides totaux et de protéines couramment utilisés en biochimie ont été effectués en parallèle. Bien souvent la matrice émulsion a été le point limitant dans la réalisation de ces dosages. En effet tous les dosages reposant sur l'utilisation de colorants ont été écartés car ils s'adsorbent sur la matrice et ne sont plus disponibles pour la détection des molécules biologiques d'intérêt. A ce jour, nous n'avons réussi à adapter aucun dosage parmi ceux testés. D'autres pistes, notamment celles reposant sur l'action d'enzymes, seraient à envisager. En collaboration avec la société Galderma, la réalisation d'un suivi de croissance d'une souche de *Pseudomonas* par la méthode du BioLumix a été initiée (cf. Chapitre I). Cependant les difficultés économiques qu'a rencontrées cette société pendant l'année 2017 ne nous ont pas permis de continuer notre collaboration.

Dès lors on peut comprendre l'enjeu que présente la microrhéologie pour suivre la croissance de micro-organismes dans les milieux complexes que constituent les émulsions cosmétiques.

IV.3 ETUDE DE L'IMPACT DES MICRO-ORGANISMES SUR LA STRUCTURATION PAR UN SUIVI MICRORHEOLOGIQUE

Comme montré précédemment, l'émulsion de référence permet le développement de la souche bactérienne *P. fluo 76A*. Dès lors, une étude plus approfondie du développement de celle-ci au sein des deux émulsions choisies (émulsion de référence et émulsion contenant 1% de gélifiant) a été effectuée : Suivi de la croissance bactérienne par dénombrement en parallèle d'un suivi en microrhéologie.

IV.3.1 Suivi des propriétés viscoélastiques de l'émulsion de référence

Le suivi des propriétés rhéologiques des émulsions contaminées a été effectué de deux manières différentes. 1/ Soit un suivi par prélèvement à intervalle de temps régulier d'échantillons issus d'une même préparation. 2/ Soit un suivi continu en ligne sur un seul échantillon. Dans les deux cas les échantillons sont maintenus à 25°C. En microrhéologie (à 15 MHz), on effectue une première mesure sur 1 g d'eau (liquide newtonien qui permet de s'affranchir de l'effet de masse) puis sur 1 g d'émulsion à étudier.

Pour la première méthode, une quantité d'échantillon suffisamment importante est préparée pour que l'on puisse effectuer des prélèvements réguliers sur une période de trois jours environ, ce qui représente la fin de la croissance exponentielle des bactéries comme montré dans le paragraphe précédent. Cette méthode par prélèvement présente cependant des problèmes de reproductibilité :

- une fois l'émulsion préparée et contaminée (typiquement 200 mL), cette préparation est divisée en plusieurs pots de 5 g chacun, il y a une première incertitude sur le nombre de bactéries déposé dans chaque pot ;

- pour chaque pot, avant le dépôt de 1 g d'émulsion sur le quartz piézoélectrique celle-ci est mélangée ; cela n'est pas sans conséquence sur la structure du réseau de gélifiant de la phase continue qui est perturbé par cette étape d'homogénéisation ;
- pour un prélèvement donné, le gramme prélevé de chaque pot n'est pas forcément représentatif de l'ensemble des 5 g d'émulsion du pot, la répartition n'est pas homogène au sein de la préparation, et ce, malgré les conditions de mélange préalable à chaque prélèvement ;
- les prélèvements répétés sont source de contamination par d'autres espèces biologiques ; le mélange et le prélèvement modifie l'environnement local des bactéries remises en culture dans l'émulsion.

La seconde méthode consiste à suivre en continu une émulsion sur une période de trois jours. Dans un premier temps on a utilisé la cellule de mesure d'une capacité 1 g environ (quartz horizontal sur lequel on dépose l'émulsion à étudier et sur lequel on place un couvercle). La Figure IV.3-1 montre l'évolution des paramètres viscoélastiques d'une émulsion témoin et d'une émulsion contenant des *P. fluo* 76A.

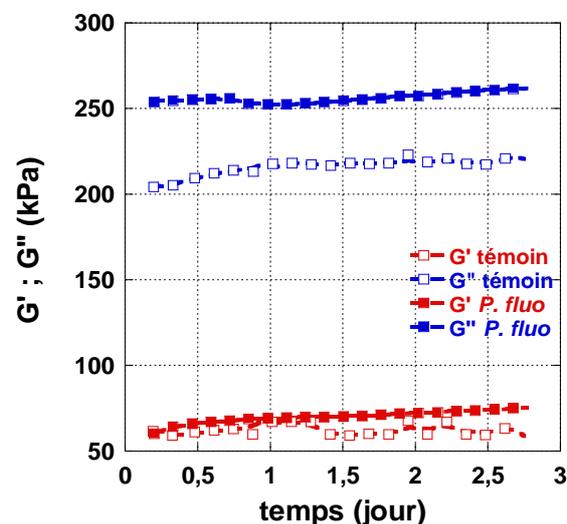


Figure IV.3-1. Suivi sur trois jours des modules visqueux et élastiques en microrhéologie d'une émulsion témoin (référence sans bactérie □) et une émulsion de référence inoculée avec *P. fluo* 76A (■) à 25°C.

En présence de bactéries, les modules visqueux et élastiques sont supérieurs à ceux obtenus pour l'émulsion témoin. Le module visqueux est sensible à la présence de bactéries

tandis que pour le module élastique les différences sont moins évidentes. En effet, les bactéries vont se placer préférentiellement dans la phase aqueuse qui constitue la phase continue. L'augmentation du nombre de bactéries entraîne alors une augmentation de la viscosité du milieu. En revanche, l'effet de la présence de bactéries semble être moins marqué pour le module élastique. L'évolution temporelle du module élastique est plus bruitée pour l'échantillon de l'émulsion témoin. Les mesures des émulsions inoculées et témoin ayant été lancées en parallèles dans deux étuves différentes, on peut supposer que ces oscillations sont dues aux cycles de refroidissement (ventilation) de l'étuve contenant l'émulsion témoin (afin de pallier ce problème un changement de modèle d'étuve a été réalisé pour le reste des expérimentations menées ultérieurement).

En outre, on observe une légère évolution du module élastique de l'émulsion contenant des bactéries. Afin de corrélérer cette évolution avec la croissance de *P. fluo 76A*, nous avons représenté l'évolution du module élastique de l'émulsion contaminée en fonction de la croissance bactérienne (Figure IV.3-2 b). Aussi, sur un même graphique les évolutions des modules élastiques G' des émulsions (avec et sans bactéries) et de la concentration en *P. fluo* en sont représentés en fonction du temps (Figure IV.3-2 a).

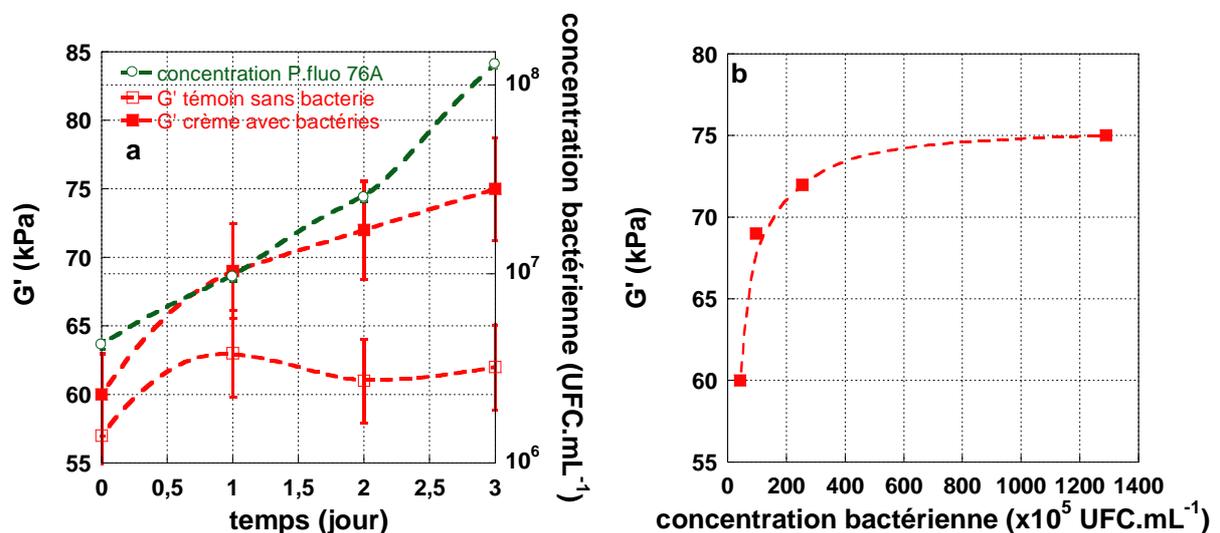


Figure IV.3-2. (a) Comparaison de l'évolution du module élastique G' (axe de gauche) pour une émulsion témoin (□) et une émulsion contenant des bactéries *P. fluo 76A* (■) pendant trois jours à 25°C avec la courbe de croissance bactérienne (O) (axe de droite). (b) Evolution du module élastique G' en fonction de la croissance bactérienne.

Le module élastique de l'émulsion contaminée croît (jusqu'à 75 kPa) avec la population bactérienne, alors que le module élastique de l'émulsion témoin reste constant (autour de 63 kPa). Les bactéries sont autant de particules étirables et déformables, lorsqu'elles sont soumises à une sollicitation. Ce fait peut alors expliquer cette augmentation du module élastique G' . Les bactéries peuvent se placer à l'interface de la phase continue (aqueuse) et la phase dispersée (huile). Elles peuvent aussi, bloquées par le gélifiant (phase continue), l'utiliser comme support pour la formation de microcolonies modifiant alors légèrement la rigidité de l'émulsion.

Ces premières expériences montrent que la microrhéologie est une technique suffisamment sensible pour suivre l'évolution de la croissance bactérienne dans les matériaux complexes comme les émulsions cosmétiques. Cependant le suivi de la croissance bactérienne au-delà de trois jours avec le dispositif expérimental mis en place ne semble pas le plus adapté, et ce pour les raisons suivantes :

- le montage expérimental ne permet pas d'éviter une évaporation de l'eau au-delà de quelques jours, même en couvrant l'échantillon et en saturant son atmosphère avec de l'eau, ce qui modifie considérablement le milieu étudié ;
- pour assurer leur croissance, les bactéries ont besoin d'un apport de nutriments, or le milieu s'appauvrit de jour en jour s'il n'est pas renouvelé et les conditions de croissance bactérienne sont donc modifiées par rapport à une évolution dans un milieu frais ;
- les bactéries en contact avec la surface du quartz sont moins alimentées en dioxygène comme elles pourraient l'être dans des conditions optimales de culture liquide, ce qui doit également influencer leur croissance ;
- du fait du faible volume et de la non-homogénéisation du milieu, la mesure n'est pas représentative de l'ensemble du pot initial d'où est issu l'échantillon. Les bactéries ne se répartissent pas ni ne croissent de façon homogène dans l'émulsion. Ce point est déduit de la grande variabilité que l'on retrouve d'une expérience à une autre.

Afin de pallier ces problèmes et de limiter la variabilité induite par l'inoculation et la déshydratation de l'émulsion, des suivis de croissance ont été réalisés en continu et en ligne sur une quinzaine de jours en adaptant la cellule de mesure contenant le capteur quartz et

l'échantillon d'émulsion. Le capteur à quartz a alors été entièrement immergé dans un volume conséquent d'émulsion contaminée et homogénéisée.

IV.3.2 Suivi des émulsions avec le capteur vertical

Les mesures microrhéologiques ont été réalisées à l'aide d'un capteur placé verticalement dans un volume plus important (40 mL) d'émulsion cosmétique. Pour augmenter la sensibilité de la mesure, les émulsions ont été contaminées avec une concentration plus importante en bactéries (cf. Chapitre II pour la mise en place de ce dispositif).

L'expérience a été réalisée sur 14 jours à 25°C à partir de la formulation de référence et d'une culture bactérienne permettant le suivi en parallèle d'un témoin (sans bactérie) et d'une émulsion contaminée (à la concentration en *P. fluo 76A* de 10^5 UFC.mL⁻¹ d'émulsion) contenant chacun un capteur vertical. En parallèle, des dénombrements sont effectués à J0 et J7 ou J8, J14 ou J15 (le lendemain de l'arrêt des manipulations) à la suite de petits prélèvements d'émulsion sur le dispositif mis en place pour les mesures en microrhéologie. Notons qu'avant chaque prélèvement le capteur vertical est retiré, le milieu homogénéisé et le capteur replacé.

La Figure IV.3-3 présente les résultats des dénombrements. Ces résultats correspondent à la moyenne de trois essais inoculés dans les mêmes conditions (même émulsion et même culture bactérienne). De plus, pour chaque essai, trois prélèvements ont été effectués dans des zones différentes du contenant. On a d'ailleurs constaté une disparité du dénombrement selon l'endroit où était réalisé le prélèvement, ce qui confirme l'idée que les bactéries dans l'émulsion ont une répartition très hétérogène malgré les mélanges effectués au préalable. De ces résultats, on suppose que la phase de croissance exponentielle se situe avant le 8^e jour. La phase stationnaire, quant à elle, semble être comprise entre les 8^e et 14^e jours. Le début de la phase de ralentissement commence à partir du 14^e jour.

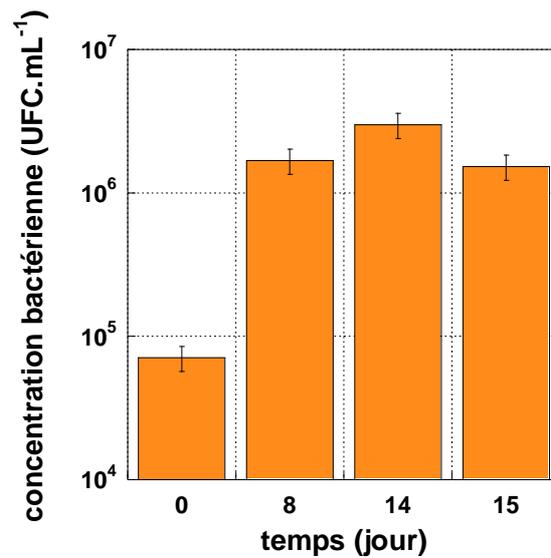


Figure IV.3-3. Profil de croissance de *P. fluo* 76A inoculées dans 40 mL d'émulsion de référence (10^5 UFC.mL⁻¹) à 25°C. Ces résultats sont la moyenne de trois prélèvements pour trois essais distincts.

Au sein de l'émulsion de référence préalablement autoclavée, les bactéries évoluent donc dans un milieu continu quadrillé par un réseau de Carbopol ETD 2050. Dans cette phase continue, les gouttelettes d'huile de petites tailles (environ 1 μ m) sont dispersées de manière homogène (Figure IV.1-1).

Concernant l'expérience témoin (sans bactérie), le suivi des modules élastique et visqueux mesurés en continu ne présente pas de changement significatif par rapport aux mesures de ces mêmes modules réalisées à intervalle de temps régulier (Figure III.2-4) et présentées lors de l'étude de la stabilité temporelle de l'échantillon de référence.

La Figure IV.3-4 montre l'évolution des modules élastiques et visqueux sur 14 jours à 25°C pour deux émulsions contenant des bactéries. Les essais 1 et 2, correspondent à deux lots différents de l'émulsion de référence formulés le même jour.

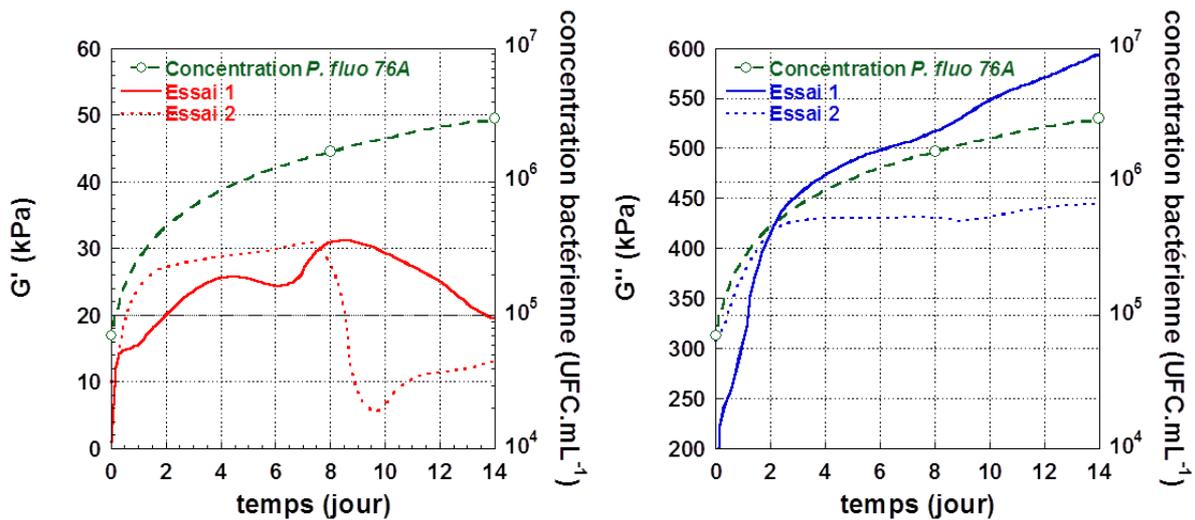


Figure IV.3-4. Evolution des modules élastiques et visqueux pour deux émulsions contaminées par *P. fluo 76 A* (essais 1 et 2) pendant 14 jours.

A J0, on constate des variations importantes des modules viscoélastiques. Ces variations sont le reflet de l'adaptation des échantillons à leur environnement (introduction des capteurs verticaux, équilibration en température, etc.). L'évolution du module élastique croît jusqu'au 8^e jour comme la concentration en *P. fluo 76A* estimée par dénombrement. Au-delà, alors que la concentration bactérienne augmente toujours, le module élastique diminue. L'évolution temporelle du module visqueux G'' suit globalement l'évolution de la croissance bactérienne pour les deux essais. Ces résultats confirment la sensibilité de la microrhéologie pour suivre la croissance bactérienne. Les différences observées entre la croissance bactérienne et les résultats microrhéologiques s'accroissent à partir du 8^e jour pour G' et dans une moindre mesure pour G'' .

L'augmentation du module élastique observée les 7 ou 8 premiers jours sont bien corrélés avec la croissance des bactéries. Ceci vient confirmer l'hypothèse précédemment formulée, à savoir que le module G' est fortement sensible à la phase dispersée. Les divisions cellulaires aboutissant à la croissance de nouvelles cellules bactériennes pourraient expliquer cette augmentation de l'élasticité à l'échelle microscopique. En effet les bactéries sont autant de particules dispersées qui peuvent s'opposer aux sollicitations des échantillons d'émulsion par cisaillement.

La décroissance inattendue du module élastique fait suite au prélèvement du 7^e ou 8^e jour et peut s'expliquer par le protocole expérimental suivi (extraction du capteur,

homogénéisation et réinsertion du capteur), ou par la présence de bactéries en grand nombre qui perturbent la structure de l'échantillon. En premier lieu l'ensemble des étapes de prélèvement perturbe le réseau de polymère Carbopol de l'émulsion, l'organisation des gouttelettes, implique la réoxygénation de l'émulsion et redistribue les bactéries dans l'échantillon. Ceci est particulièrement vrai pour l'étape d'homogénéisation au Vortex qui est très puissante. Les mesures effectuées à partir du 8^e jour correspondent alors à un « nouveau » milieu en contact du quartz. Les caractéristiques de ce milieu ne sont pas en continuité avec celles qu'elles auraient été si l'on n'avait pas effectué de prélèvement. Après la reprise des mesures, l'émulsion et la distribution de bactéries sont donc modifiées.

En second lieu, la décroissance du module élastique observée après le 7^e jour peut s'expliquer par les nouvelles interactions entre les bactéries et le milieu, notamment le polymère. La redistribution bactérienne peut affecter la réorganisation du réseau de gélifiant après homogénéisation. Le gélifiant peut également être une source nutritionnelle consommée par les bactéries (d'autant qu'aucun apport extérieur en nutriments n'est effectué durant l'expérience).

En ce qui concerne les évolutions du module visqueux, la méthode de prélèvement semble avoir de moindres répercussions sur celle-ci. La croissance de la viscosité peut s'expliquer par l'augmentation du nombre de cellules dans le milieu lors de la phase exponentielle de croissance, mais aussi par le relargage éventuel de leur contenu cellulaire, notamment pendant la phase stationnaire ou en début de la phase de déclin. Ce nombre de cellules croissant provoque à l'échelle du fluide majoritaire (phase continue de l'émulsion) l'augmentation de la viscosité.

La mesure du module élastique étant plus sensible aux conditions environnementales du milieu que celle du module visqueux, le protocole de prélèvement choisi pour le dénombrement ne semble pas approprié car l'homogénéisation du milieu perturbe fortement l'élasticité de l'émulsion. Les différences de comportement entre les deux essais sont le résultat d'une hétérogénéité intrinsèque des échantillons. Les populations bactériennes inoculées dans les deux émulsions évoluent dans des microenvironnements de nature différente. Ceci illustre bien l'adaptation des bactéries à leur environnement et que les paramètres microrhéologiques y sont sensibles.

IV.3.3 Suivi d'une émulsion ayant un réseau de gélifiant plus dense avec le capteur vertical

Dans cette autre expérience la croissance de *P. fluo 76A* dans une émulsion contenant 1% de polymère CETD a été suivie. Le réseau étant plus dense, dans cette émulsion, les bactéries évoluent dans un milieu continu plus structuré (réseau de Carbopol ETD 2050 plus conséquent). Dans la phase continue, des gouttelettes de petites tailles (1 μm) sont dispersées de manière homogène. L'émulsion stérilisée par autoclave auparavant, a la structuration à l'échelle microscopique représentée dans la Figure IV.1-3.

Les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe précédent (IV.3.2). Le suivi du développement bactérien a été réalisé par dénombrement à J_0 , J_{+7} et J_{+14} . Les résultats présentés sont des moyennes issues des dénombrements réalisés sur deux essais (Figure IV.3-5). Les évolutions au cours du temps des propriétés viscoélastiques de cette émulsion à 1% en gélifiant constitue le témoin sans bactérie. A noter qu'aucune croissance bactérienne n'a été détectée dans cette émulsion témoin. Pour les échantillons contaminés, les résultats de dénombrements montrent une forte croissance bactérienne jusqu'au 7^e jour au sein de cette émulsion. La présence d'un réseau de polymère plus important n'empêche pas le développement de *P. fluo 76A*. Au contraire le taux de croissance de *P. fluo 76A* apparaît un plus élevé entre J_0 et J_{+7} dans l'émulsion à 1% en gélifiant que dans l'émulsion de référence (0,3 % de Carbopol).

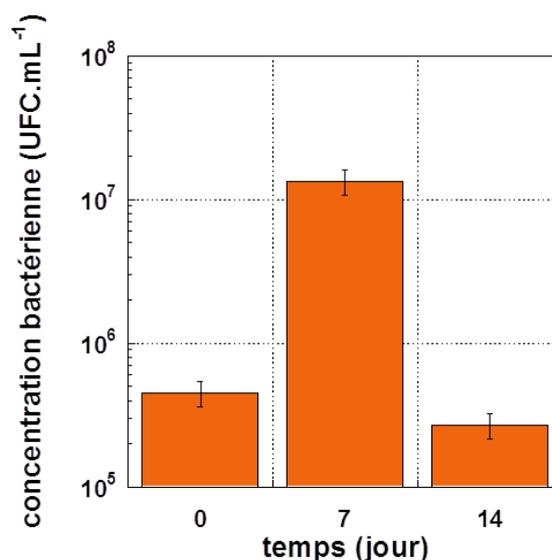


Figure IV.3-5. Profil de croissance de *P. fluo 76A* inoculée dans 40 mL (10^5 UFC.mL⁻¹) d'émulsion contenant 1% de Carbopol CETD.

Le déclin observé à partir du 7^e jour est en accord avec les études des micro-organismes dans les milieux complexes : le quadrillage formé par le gélifiant limite la mobilité des bactéries générant des contraintes stériques plus importantes et également l'accès aux nutriments.

Deux séries de mesure en microrhéologie ont été effectuées sur le témoin et sur deux émulsions contaminées. Pour la première émulsion, des prélèvements ont été réalisés à J_0 , J_{+7} et J_{+14} comme mentionné précédemment. Cependant, ayant observé les mêmes perturbations sur la mesure des paramètres viscoélastiques à cause de l'homogénéisation, on a donc décidé de modifier le procédé expérimental. En conséquence, pour la seconde émulsion étudiée le prélèvement au 7^e jour n'a pas été effectué dans l'objectif de ne pas perturber l'expérience à mi-parcours et d'étudier une même population bactérienne. On limite également les sources non contrôlées de contamination bactérienne. Les résultats présentés Figure IV.3-6, montrent l'évolution des modules élastiques G' et visqueux G'' au cours du temps pour la première émulsion (avec prélèvement au cours du suivi). Ces modules viscoélastiques des émulsions témoins sont plus élevés pour l'émulsion contenant 1% de gélifiant Carbopol que pour l'émulsion de référence contenant 0,3% de gélifiant. Par ailleurs, un saut lié à la réorganisation du milieu, après homogénéisation de l'émulsion et introduction du capteur vertical, est visible sur toutes les courbes au cours des premières 48 heures et après le prélèvement du 7^e jour. On peut expliquer ce résultat par le fait que le milieu étant plus riche en polymère, la réorganisation du milieu après une forte perturbation (Vortex) est plus longue que pour les échantillons de référence ne contenant que 0,3 % de Carbopol.

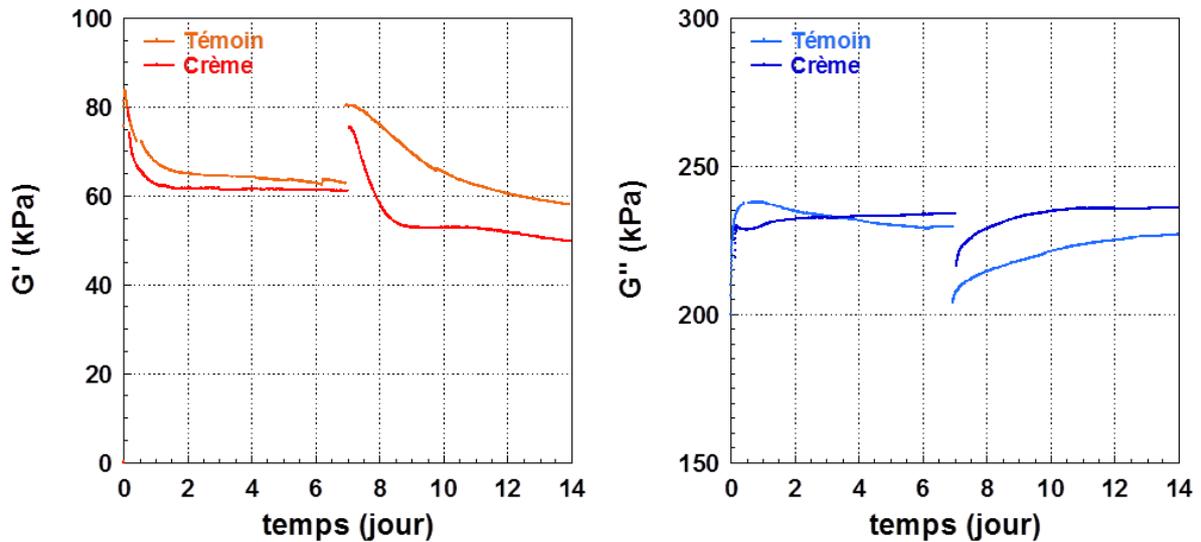


Figure IV.3-6. Evolution des modules élastiques et visqueux pour une émulsion témoin et une émulsion contenant 1% de gélifiant Carbopol et inoculée par *P. fluo 76A* (10^5 UFC.mL⁻¹). Le suivi est réalisé pendant 14 jours et 13 jours pour l'émulsion témoin (blanc).

Les modules viscoélastiques de l'émulsion contenant les bactéries sont inférieurs à ceux de l'émulsion témoin (sans bactérie). Ces résultats peuvent s'expliquer par la perturbation du réseau de polymère induite par la présence de bactéries. L'application du vortex modifie les interactions établies entre les gouttelettes et les mailles du polymère, ainsi une nouvelle structuration prend forme et doit s'articuler autour de regroupements de bactéries disséminées (microcolonies). Les interactions électrostatiques des chaînes de polymère peuvent alors être modifiées, conduisant ainsi à un réseau de gélifiant moins structuré et moins élastique à cette échelle d'investigation.

A partir du 7^e jour, le prélèvement effectué a fortement perturbé le réseau, il devient alors difficile de distinguer les évolutions des propriétés viscoélastiques liées à la croissance bactérienne de celles provoquées par la réorganisation du réseau. Dans l'objectif de s'affranchir de cette perturbation, une seconde expérience a été réalisée en continu sur 14 jours (i.e. sans faire de prélèvement au 7^e jour). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure IV.3-7.

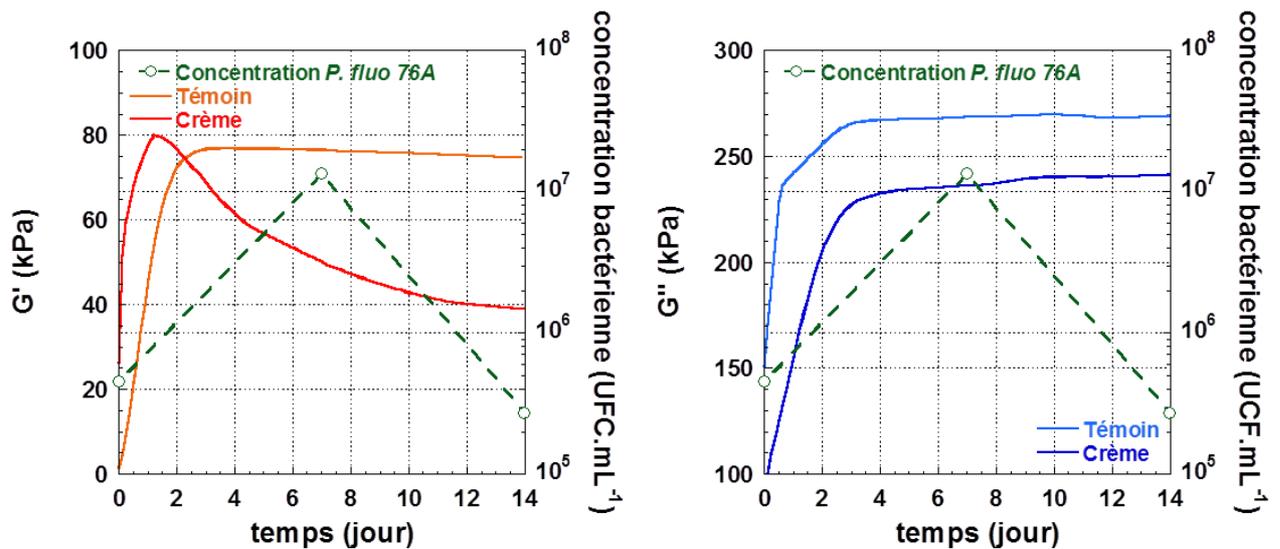


Figure IV.3-7. Evolution des modules élastiques et visqueux pour une émulsion témoin et une émulsion contenant 1% de gélifiant Carbopol et inoculées par *P. fluo 76A* (10^5 UFC.mL⁻¹). Le suivi est réalisé pendant 14 jours.

Les valeurs des modules viscoélastiques sont comparables à ceux obtenus pour le premier essai. Ces modules sont plus faibles pour l'émulsion contaminée que pour l'émulsion témoin. Ce résultat est en adéquation avec ceux obtenus pour la première expérience, et confirme la perturbation de la structure de l'émulsion par la présence très importante de bactéries.

En ce qui concerne l'émulsion témoin, on observe que les modules viscoélastiques restent constants après les 48 heures de réorganisation provoquée par l'homogénéisation.

En comparant les évolutions des propriétés viscoélastiques aux résultats des dénombrements, on constate que la diminution du module élastique G' va à l'encontre de la croissance bactérienne observée les 7 premiers jours par dénombrement. En revanche, entre le 7^e et le 14^e jour, ces deux paramètres diminuent de façon concomitante. Les évolutions opposées observées les 7 premiers jours peuvent s'expliquer par une proportion de gel trop important qui masquerait l'influence de la croissance bactérienne sur le module élastique. En revanche on peut supposer que la diminution globale de l'élasticité durant les 14 jours d'expérience est due à la présence de bactéries (viables ou non). En effet, comme mentionné précédemment ces bactéries peuvent gêner les interactions qui se seraient naturellement faites en leur absence et ainsi perturber l'organisation structurale de l'émulsion. De plus, les bactéries viables sont susceptibles d'altérer leur environnement proche en consommant le gélifiant par exemple.

En outre, l'évolution du module visqueux ne semble pas suivre celle de la croissance bactérienne. La légère augmentation de ce module peut s'expliquer par l'augmentation du nombre de bactéries (viables ou non) dans l'émulsion. En effet, au cours de la phase de décroissance une partie des bactéries meurent tandis que d'autres continuent à se multiplier. Ainsi, sur les 14 jours d'expériences le nombre de cellules bactériennes augmente dans l'émulsion. Ces cellules vont s'opposer à l'écoulement de la phase continue et donc augmenter la viscosité. A noter que cette croissance de la viscosité est moins forte que celle observée pour l'émulsion de référence, on peut également l'expliquer par la concentration élevée en gélifiant pouvant masquer en partie l'influence des bactéries sur l'évolution.

IV.4 CONCLUSION ET DISCUSSION

Ces résultats mettent en évidence la sensibilité de la microrhéologie d'une part à la présence bactérienne dans les émulsions et d'autre part à leur évolution au sein de ces émulsions. La confrontation des résultats obtenus avec cette technique et avec ceux obtenus par dénombrement ainsi que la bibliographie disponible permet de mettre en place des hypothèses plausibles quant au comportement des bactéries dans un milieu complexe que sont les émulsions.

Il est important de resituer le fait que ces résultats proviennent de mesures de viscoélasticité statistiques de la couche d'émulsion en contact avec le capteur piézoélectrique. Cela implique une observation d'un microenvironnement contenant des bactéries et des gouttelettes d'huile d'une surface d'environ 154 mm^2 . Ainsi, l'analyse à l'échelle microscopique entraîne une observation non homogène et non statistique de l'émulsion ; c'est la raison pour laquelle il avait été décidé de procéder à une homogénéisation par agitation. Cependant, le microenvironnement étant renouvelé à chaque agitation, cela se traduit indubitablement par une réorganisation du milieu et une modification des paramètres mécaniques. Cette agitation est inévitable le jour de la contamination car elle s'opère après inoculation des bactéries et lors prélèvement pour le dénombrement. Le mouvement de la structure lié à la création du vortex modifie le réseau tridimensionnel formé par le gélifiant mais également l'organisation spatiale des gouttelettes dispersées. Les interactions à l'échelle microscopique sont brusquement modifiées et la réorganisation des éléments à cette échelle est visible au travers de la mesure des

paramètres microrhéologiques. Les résultats montrent que cette réorganisation microscopique est longue et par conséquent parasite les interprétations concernant le lien entre la croissance des bactéries et l'évolution des paramètres viscoélastiques. Il est vrai que dans l'industrie cosmétique, il est usuel de laisser une émulsion « murir » pendant 24 heures avant de la caractériser dans l'intérêt de laisser l'émulsion s'organiser. Néanmoins, il est intéressant de réaliser que ces 24 heures de réorganisation de l'émulsion sont observables par microrhéologie ; cela confirme à nouveau la sensibilité de cette technique pour étudier la microstructure.

De plus, la perturbation du milieu à mi-parcours (au 7^e jour) possède ses avantages et ses inconvénients. D'une part elle a permis de mettre à nouveau en évidence la forte sensibilité du capteur vis-à-vis du microenvironnement et de l'organisation des émulsions, mais d'autre part elle implique un renouvellement en oxygène et la rediffusion des nutriments bénéfiques aux bactéries en culture. Cette modification organisationnelle est intéressante car elle pourrait provoquer un regain de la croissance bactérienne, mais elle ne nous permet pas d'étudier l'évolution d'une même population bactérienne dans un même environnement sur 14 jours d'affilés (hétérogénéité du milieu).

Ces différentes conclusions ont pour but de mettre en lumière les variabilités apportées par les conditions de mesures, afin de normaliser et d'optimiser au mieux les protocoles expérimentaux : réaliser des mesures en continue et en ligne sur une longue période (ici 14 jours) sans ouverture du pot avec capteur vertical unique centrée sont des premières pistes d'améliorations apportées lors de la dernière expérience. Aussi, des études avec des mesures de deux capteurs verticaux placés en parallèles permettraient néanmoins d'étudier deux microenvironnements différents au sein de la même émulsion mais nécessite un grand nombre de répétitions pour obtenir des résultats significatifs.

La première étude de caractérisation structurelle sur l'émulsion de référence, était importante afin de comprendre et d'appréhender les différents scénarii possibles en présence de bactéries. Par la suite, les premières hypothèses ont permis d'interpréter un peu plus aisément ce qui s'y déroulait dans les émulsions plus complexes. L'étude réalisée avec un réseau de gélifiant plus important a montré une diminution de la croissance bactérienne dans le microenvironnement étudié, mais la concentration élevée en polymère a diminué la sensibilité du capteur quant à l'influence de cette croissance sur les propriétés rhéologiques.

Une étude avec une émulsion plus concentrée en huile avait été envisagée, cependant il semblait plus judicieux de réaliser des manipulations supplémentaires sur l'émulsion de référence et celle contenant 1% de Carbopol afin de confirmer nos hypothèses dans le temps imparti.

En outre, ces premières expérimentations de suivis microrhéologiques de la croissance bactérienne dans les émulsions permettent de poser deux nouvelles hypothèses :

- le module élastique G' est sensible au nombre de bactéries et à l'organisation des microenvironnements (ceci est en accord avec la première hypothèse établie grâce aux expériences précédentes selon lesquelles G' est sensible à la phase dispersée) ; son évolution pourrait refléter la croissance bactérienne et également l'évolution des interactions modifiées dans le milieu ;
- le module visqueux G'' , quant à lui, est sensible à la présence ou non de bactéries en tant qu'éléments visqueux supplémentaires dans la phase majoritaire ; son évolution pourrait être représentative de l'augmentation globale de la masse bactérienne mais ne serait pas discriminante pour la détection des différentes phases d'une courbe de croissance classique.

Il reste néanmoins certaines caractérisations supplémentaires (microscopie optique, notamment, à J0, J7 et J14) à réaliser au cours de si longues expériences qui permettraient de confronter les résultats obtenus et de valider les théories proposées quant à l'organisation de la structure.

CONCLUSION GENERALE

La mise au point de nouvelles formulations contenant le moins d'additifs possible est un défi actuel pour l'industrie cosmétique. Parmi ces additifs qui provoquent la méfiance du consommateur, on trouve les conservateurs assimilés à des « produits chimiques » nocifs pour leur santé. Le domaine cosmétique étant un secteur fortement concurrentiel, les industriels ne peuvent être insensibles au fait que ces consommateurs souhaitent se rapprocher de plus en plus à des formulations dites « naturelles ». Néanmoins la présence des conservateurs assure la sécurité du consommateur puisqu'il permet de préserver l'innocuité microbiologique du produit. Le travail des laboratoires de recherche et développement consiste dès lors à trouver des solutions alternatives permettant à la fois de réduire l'utilisation des conservateurs tout en maintenant la performance des produits en termes de stabilité et d'efficacité. Les études récentes mettent en évidence que ce nouveau défi doit passer par une étape de compréhension de l'impact de la structure de ces produits sur leur stabilité et la prolifération de microorganismes en leur sein.

C'est dans ce contexte que mes travaux de thèse ont été effectués. L'enjeu original de ma recherche a consisté à établir une relation entre la formulation d'une émulsion type et ses propriétés structurales. L'objectif à long terme est de proposer un nouvel outil de caractérisation en vue d'optimiser simultanément la stabilité des émulsions et leur capacité intrinsèque à limiter la prolifération de micro-organismes sans l'emploi de conservateurs. Afin de mieux appréhender ce problème, des caractérisations ont été menées à différentes échelles et notamment le suivi des propriétés rhéologiques.

L'utilisation inédite de la microrhéologie pour la caractérisation d'émulsions cosmétiques, fait suite à différentes études menées par le laboratoire validant sa pertinence à la fois pour un suivi d'évolution structurale et pour un suivi de développement de microorganismes [127], [143], [154], [155]. Ainsi, l'un des objectifs de ce travail consistait à mettre en évidence l'intérêt de la microrhéologie en association avec d'autres techniques de caractérisations classiques (rhéologie, microscopie, observations organoleptiques, mesures physico-chimiques) d'une part pour l'étude et la caractérisation de la microstructure des émulsions cosmétiques simples H/E, et d'autre part pour le suivi et la détection de contamination bactérienne au sein même de ces émulsions. Finalement, les résultats

obtenus au cours de la thèse me permettent d'apporter des réponses d'un point de vue méthodologique à ces deux problématiques.

D'une part, ils permettent de corréler les modifications structurales, au niveau macroscopique et au niveau microscopique, à la composition et au procédé de formulation d'émulsions. L'étude de la variation de la composition de la phase dispersée dans des émulsions simples H/E montre la grande sensibilité de la microrhéologie pour accéder aux propriétés mécaniques de ces émulsions à une échelle microscopique. Il a été montré que les paramètres viscoélastiques obtenus dépendent directement de la concentration des gouttelettes d'huiles, de leurs tailles, mais également de leurs organisations spatiales et de leurs interactions. Par l'étude physico-chimique de ces supports simples H/E, on a cherché à maîtriser leurs évolutions en fonction de la composition et du procédé de fabrication, et par conséquent de l'évolution de la structure. L'utilisation de la microrhéologie permet d'extraire de nouvelles signatures viscoélastiques, à partir desquelles on peut ainsi prédire les phénomènes d'instabilité tels que la floculation ou la coalescence. Les résultats obtenus au cours de cette première étude ont permis d'établir deux hypothèses :

- le module visqueux G'' dépend du fluide prédominant. Dans le cas d'émulsions H/E diluées ce fluide prédominant représente la phase continue. Pour les émulsions H/E concentrées, il s'agit de la phase huileuse dispersée dont les propriétés rhéologiques dominent à l'échelle microscopique ;
- le module élastique G' est dépendant de la phase dispersée, et plus particulièrement du nombre, de la taille et de l'organisation des gouttelettes.

De surcroît ces deux paramètres microrhéologiques semblent être sensibles à l'arrangement spatial des inclusions dans la phase dispersée et par conséquent aux interactions faibles qui en sont la cause. Ces premiers résultats sont prometteurs quant à l'intérêt de cet outil pour comprendre la « microstructure » des émulsions. On vise ainsi à travers lui une approche multi-échelle et multimodale en vue de proposer un accompagnement d'optimisation des formulations. Pour compléter cette étude multi-échelle et affiner l'interprétation de ces nouvelles signatures rhéologiques, il serait néanmoins intéressant de réaliser une caractérisation des propriétés électriques des émulsions. En effet, l'utilisation de techniques connues telle que la mesure du potentiel zêta [5], [156] par exemple, apporterait un éclairage pertinent sur l'ensemble des interactions qui existent au

sein des émulsions en lien avec les différentes organisations spatiales et instabilités [42], [43].

Au cours de cette étude, l'extraction de paramètres peu étudiés en cosmétique (τ , α et G_{app}), issus des mesures rhéologiques basses fréquences a également été réalisée. Ces paramètres apportent des informations supplémentaires sur la structuration des émulsions étudiées et viennent confirmer les hypothèses formulées à partir des mesures en rhéologie basse fréquence. L'un de ces paramètres est le temps de relaxation τ , il est représentatif de la relaxation des gouttelettes de la phase dispersée. Les résultats obtenus montrent que l'étude de τ en fonction de la variation de la concentration de la phase dispersée met en évidence les concentrations en huile et en émulsifiants pour lesquelles un changement de régime et de structuration a lieu. Dans le cas des émulsions H/E étudiées, 6% d'émulsifiants semble correspondre à la concentration optimale pour stabiliser une émulsion contenant 15% d'huile (IPP). En revanche pour un taux d'émulsifiant fixé à 6% le changement de régime illustrant le passage d'une émulsion stable à une émulsion instable est visible à partir de 30% d'huile. Le facteur de puissance α , quant à lui, représente un paramètre qui dépend de la composition et qui permet de visualiser la structuration globale des fluides étudiés. L'étude de la dépendance en fréquence est également possible en microrhéologie (5 à 45 MHz). Des mesures réalisées dans le cadre d'autres travaux de thèse confirment que α dépend de la structure microscopique du matériau étudié [157].

Par ailleurs, la seconde partie de mes travaux permet également de corréler les modifications structurales avec la détection et le suivi de contaminations bactériennes au sein d'émulsions. Cette approche visait aussi à suivre l'influence de l'incorporation de micro-organismes sur la structure microscopique des émulsions. Ces premiers résultats ont mis en exergue la sensibilité des paramètres microrhéologiques vis-à-vis de la détection et du suivi du développement bactérien. A partir des hypothèses posées au cours de l'étude de la structuration des émulsions, deux nouvelles hypothèses ont pu alors être établies :

- le module visqueux G'' , dépend de la présence ou non de bactéries en tant qu'éléments visqueux supplémentaires dans la phase continue majoritaire. L'évolution de ce paramètre est représentative de l'augmentation globale de la masse bactérienne mais ne serait pas discriminante pour préciser la phase de la croissance bactérienne (par exemple phase stationnaire ou de déclin).

- le module élastique G' dépend à la fois du nombre de bactéries et à l'organisation des microenvironnements (environnement local des bactéries et interactions des bactéries avec celui-ci). L'étude de l'émulsion plus concentrée en gélifiant Carbopol, a notamment confirmé l'impact de la présence des bactéries sur les interactions entre le polymère et les autres éléments structurant l'émulsion. Ces modifications structurales sont plus visibles sur les mesures du module élastique G' que celles du module visqueux G'' .

Cependant la mise en relation entre la microstructure et la croissance des micro-organismes nécessite des expérimentations supplémentaires et un affinage du protocole expérimental. En effet, une caractérisation plus approfondie du microenvironnement au niveau du capteur par des techniques de microscopie plus performantes permettraient de tirer des conclusions beaucoup plus précises sur l'évolution des modules viscoélastiques à l'échelle microscopique. Aussi, la sensibilité du capteur vis-à-vis des modifications structurales limite l'analyse du suivi de la croissance bactérienne. Il serait intéressant de trouver un moyen permettant d'étudier une émulsion dont le milieu est à la fois stable (sans restructuration microscopique) et homogène sans agitation vortex. Une étude sur une durée courte de quelques jours (mais à des moments différents du cycle bactérien) associant dénombrements, observations microscopiques et suivi microrhéologique permettrait d'affiner les résultats. La microscopie électronique à balayage pourrait permettre de déterminer le type de croissance impliquée dans les émulsions (microcolonies) mais également les éléments de structures (polymères, huile) utilisés comme nutriments par ces bactéries. Finalement, l'établissement de la relation croissance bactérienne et structure interne d'une émulsion représente une ouverture sur une meilleure compréhension des interactions pour le développement d'émulsions microbiostatiques.

Ainsi, dans l'industrie cosmétique, l'étude des fluides complexes comme les émulsions, peut être améliorée, renforcée, par une approche multi-échelles. La microrhéologie apparaît être une méthode de mesure innovante et adaptée à l'échelle industrielle apportant une valeur ajoutée lors du développement de formulations cosmétiques stables. D'un point de vue sécuritaire, l'un des objectifs est de d'aider au développement d'émulsions contenant le moins de conservateurs possible. Cependant, l'utilisation de cette technique non destructive pour le dépistage précoce de micro-organismes par la détection d'instabilités (de

changements) structurales au sein des émulsions, pourrait aussi représenter une avancée majeure lors de la production à grande échelle et de la commercialisation des produits cosmétiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] "RÈGLEMENT (UE) N o 655/2013," 2013. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0655&from=FR>. [Accessed: 03-May-2018].
- [2] G. Chen and D. Tao, "An experimental study of stability of oil–water emulsion," *Fuel Process. Technol.*, vol. 86, no. 5, pp. 499–508, Feb. 2005.
- [3] I. Roland, G. Piel, L. Delattre, and B. Evrard, "Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design," *Int. J. Pharm.*, vol. 263, no. 1–2, pp. 85–94, Sep. 2003.
- [4] M. M. Robins, A. D. Watson, and P. J. Wilde, "Emulsions—creaming and rheology," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 7, no. 5–6, pp. 419–425, Nov. 2002.
- [5] A. Wiącek and E. Chibowski, "Zeta potential, effective diameter and multimodal size distribution in oil/water emulsion," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 159, no. 2–3, pp. 253–261, Dec. 1999.
- [6] C. J. van Oss, "Acid–base interfacial interactions in aqueous media," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 78, pp. 1–49, Oct. 1993.
- [7] E. J. W. (Evert J. W. Verwey and J. T. G. (Jan T. G. Overbeek, *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Dover Publications, 1999.
- [8] J. H. Adair, E. Suvaci, and J. Sindel, "Surface and Colloid Chemistry," in *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier, 2001, pp. 1–10.
- [9] S. Arditty, "Fabrication, stabilité et propriétés rhéologiques des émulsions stabilisées par des particules colloïdales," Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2004.
- [10] S. Sharma, P. Shukla, A. Misra, and P. R. Mishra, "Interfacial and colloidal properties of emulsified systems," in *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*, Elsevier, 2014, pp. 149–172.
- [11] Y. Mao and D. J. McClements, "Fabrication of functional micro-clusters by heteroaggregation of oppositely charged protein-coated lipid droplets," *Food Hydrocoll.*, vol. 27, no. 1, pp. 80–90, May 2012.
- [12] Y. Mao and D. J. McClements, "Modulation of bulk physicochemical properties of emulsions by hetero-aggregation of oppositely charged protein-coated lipid droplets," *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 5, pp. 1201–1209, Jul. 2011.
- [13] M. E. Leunissen, J. Zwanikken, R. van Roij, P. M. Chaikin, and A. van Blaaderen, "Ion partitioning at the oil–water interface as a source of tunable electrostatic effects in emulsions with colloids," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 48, p. 6405, Dec. 2007.
- [14] M. E. Leunissen, A. van Blaaderen, A. D. Hollingsworth, M. T. Sullivan, and P. M. Chaikin, "Electrostatics at the oil-water interface, stability, and order in emulsions and colloids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 8, pp. 2585–90, 2007.
- [15] B. Abismaïl, J. . Canselier, A. . Wilhelm, H. Delmas, and C. Gourdon, "Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 6, no. 1–2,

pp. 75–83, Mar. 1999.

- [16] S. M. Joscelyne and G. Trägårdh, “Membrane emulsification — a literature review,” *J. Memb. Sci.*, vol. 169, no. 1, pp. 107–117, Apr. 2000.
- [17] C. Qian and D. J. McClements, “Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 5, pp. 1000–1008, Jul. 2011.
- [18] M. POUX and J.-P. CANSELIER, “Procédés d’émulsification - Techniques et appareillage,” Editions T.I. | Techniques de l’Ingénieur, Jun. 2004.
- [19] K. Urban, G. Wagner, D. Schaffner, D. Röglin, and J. Ulrich, “Rotor-Stator and Disc Systems for Emulsification Processes,” *Chem. Eng. Technol.*, vol. 29, no. 1, pp. 24–31, Jan. 2006.
- [20] T. S. H. Leong, T. J. Wooster, S. E. Kentish, and M. Ashokkumar, “Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 16, no. 6, pp. 721–727, Aug. 2009.
- [21] M. Sivakumar, S. Y. Tang, and K. W. Tan, “Cavitation technology – A greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 21, no. 6, pp. 2069–2083, Nov. 2014.
- [22] J. Floury, J. Legrand, and A. Desrumaux, “Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 59, no. 6, pp. 1285–1294, Mar. 2004.
- [23] G. Kolb, K. Viardot, G. Wagner, and J. Ulrich, “Evaluation of a New High-Pressure Dispersion Unit (HPN) for Emulsification,” *Chem. Eng. Technol.*, vol. 24, no. 3, pp. 293–296, Mar. 2001.
- [24] P. Fernandez, V. André, J. Rieger, and A. Kühnle, “Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 251, no. 1–3, pp. 53–58, Dec. 2004.
- [25] T. Nakashima, M. Shimizu, and M. Kukizaki, “Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 45, no. 1, pp. 47–56, Dec. 2000.
- [26] S. M. Jafari, E. Assadpoor, Y. He, and B. Bhandari, “Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification,” *Food Hydrocoll.*, vol. 22, no. 7, pp. 1191–1202, Oct. 2008.
- [27] N. Jager-Lezer, J.-F. Tranchant, V. Alard, C. Vu, J.-L. Grossiord, and P. C. Tchoreloff, “Rheological analysis of highly concentrated w/o emulsions,” *Rheol. Acta*, vol. 37, no. 2, pp. 129–138, Apr. 1998.
- [28] K. . Lissant, “The geometry of high-internal-phase-ratio emulsions,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 22, no. 5, pp. 462–468, Nov. 1966.
- [29] S. P. Meeker, R. T. Bonnecaze, and M. Cloitre, “Slip and flow in pastes of soft particles: Direct observation and rheology,” *J. Rheol. (N. Y. N. Y.)*, vol. 48, no. 6, pp. 1295–1320, Nov. 2004.
- [30] E. Fredrick, P. Walstra, and K. Dewettinck, “Factors governing partial coalescence in

- oil-in-water emulsions," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 153, no. 1–2, pp. 30–42, Jan. 2010.
- [31] J. T. (John T. Davies, *Interfacial Phenomena 2e*. Elsevier Science, 1961.
- [32] R. C. Pasquali, C. Bregni, and M. P. Taurozzi, "New Values of the Required Hydrophilic-Lipophilic Balance for Oil in Water Emulsions of Solid Fatty Acids and Alcohols Obtained from Solubility Parameter and Dielectric Constant Values," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 30, no. 3, pp. 328–331, Feb. 2009.
- [33] T. Engels, T. Förster, and W. von Rybinski, "The influence of coemulsifier type on the stability of oil-in-water emulsions," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 99, no. 2–3, pp. 141–149, Jun. 1995.
- [34] C. Ballmann and B. W. Müller, "Stabilizing Effect of Cetostearyl Alcohol and Glycerylmonostearate as Co-emulsifiers on Hydrocarbon-free O/W Glyceride Creams," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 13, no. 5, pp. 433–445, Jan. 2008.
- [35] M. Destribats, M. Rouvet, C. Gehin-Delval, C. Schmitt, and B. P. Binks, "Emulsions stabilised by whey protein microgel particles: towards food-grade Pickering emulsions," *Soft Matter*, vol. 10, no. 36, pp. 6941–6954, Aug. 2014.
- [36] Y. S. Gu, L. Regnier, and D. J. McClements, "Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin- κ -carrageenan membranes," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 286, no. 2, pp. 551–558, Jun. 2005.
- [37] W. S. Jung *et al.*, "Relationship between liquid crystalline phase stability and ingredient composition in liquid crystal oil–water emulsion," *Liq. Cryst.*, vol. 43, no. 10, pp. 1495–1502, Aug. 2016.
- [38] J. Bing, Z. Qian-jie, Z. Zheng, C. Ming-hua, and Z. Wan-ping, "Preparation of liquid crystal emulsion and its application performance study," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 1, pp. 100–105, Jan. 2018.
- [39] W. Zhang and L. Liu, "Study on the Formation and Properties of Liquid Crystal Emulsion in Cosmetic," *J. Cosmet. Dermatological Sci. Appl.*, no. 3, pp. 139–144, 2013.
- [40] J.-C. Loudet and P. Poulin, "Liquid Crystal Emulsions," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 23, no. 1–3, pp. 143–154, Jan. 2002.
- [41] L. Medina-Torres, F. Calderas, G. Sanchez-Olivares, and D.-M. Nuñez-Ramirez, "Rheology of Sodium Polyacrylate as an Emulsifier Employed in Cosmetic Emulsions," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 53, no. 47, pp. 18346–18351, Nov. 2014.
- [42] E. Dickinson, "Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers," *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 6, pp. 1473–1482, Aug. 2009.
- [43] Y. Cao, E. Dickinson, and D. J. Wedlock, "Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide," *Food Hydrocoll.*, vol. 4, no. 3, pp. 185–195, Sep. 1990.
- [44] J. Bibette and F. Leal-Calderon, "Surfactant-stabilized emulsions," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 1, no. 6, pp. 746–751, Dec. 1996.
- [45] C. Anchisi, A. M. Maccioni, C. Sinico, and D. Valenti, "Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents," *Farm.*, vol. 56, no. 5–7, pp.

427–431, Jul. 2001.

- [46] P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, and S. Satya, "Preparation and characterization of Mentha × piperita oil emulsion for housefly (*Musca domestica* L.) control," *Ind. Crops Prod.*, vol. 44, pp. 611–617, Jan. 2013.
- [47] "RÈGLEMENT (CE) N o 1223/2009 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques," 2009. [Online]. Available: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:fr:PDF>. [Accessed: 24-Oct-2017].
- [48] P. Coussot and J.-L. Grossiord, *Comprendre la rhéologie : de la circulation du sang à la prise du béton*. EDP Sciences, 2002.
- [49] L. Gilbert, "Caractérisation physico-chimique et sensorielle d'ingrédients cosmétiques: une approche méthodologique," Université du Havre, 2014.
- [50] S. R. Derkach, "Rheology of emulsions," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 151, no. 1–2, pp. 1–23, Oct. 2009.
- [51] M. Lukic, I. Jaksic, V. Krstonosic, L. Dokic, and S. Savic, "Effect of Small Change in Oil Phase Composition on Rheological and Textural Properties of w/o Emulsion," *J. Texture Stud.*, vol. 44, no. 1, pp. 34–44, Feb. 2013.
- [52] L. Gilbert, C. Picard, G. Savary, and M. Grisel, "Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers: relationships between both data," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 421, pp. 150–163, Mar. 2013.
- [53] Y. Mao and D. J. McClements, "Modulation of emulsion rheology through electrostatic heteroaggregation of oppositely charged lipid droplets: Influence of particle size and emulsifier content," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 380, no. 1, pp. 60–66, Aug. 2012.
- [54] I. Terrisse, M. Seiller, A. Rabaron, J. I. Grossiord, A. Magnet, and C. Le HENFERRENBACH, "Rheology: how to characterize and to predict the evolution of W/O/W multiple emulsions," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 15, no. 2, pp. 53–62, Apr. 1993.
- [55] R. Pal, "Rheology of simple and multiple emulsions," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 41–60, Feb. 2011.
- [56] H. Masmoudi, P. Piccerelle, Y. Le Dréau, and J. Kister, "A Rheological Method to Evaluate the Physical Stability of Highly Viscous Pharmaceutical Oil-in-Water Emulsions," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 8, pp. 1937–1947, Jul. 2006.
- [57] J. W. and and D. J. McClements, "Influence of Ostwald Ripening on Rheology of Oil-in-Water Emulsions Containing Electrostatically Stabilized Droplets," 2000.
- [58] M. Korhonen, H. Niskanen, J. Kiesvaara, and J. Yliruusi, "Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements," *Int. J. Pharm.*, vol. 197, no. 1–2, pp. 143–151, Mar. 2000.
- [59] M. Korhonen, L. Hellen, J. Hirvonen, and J. Yliruusi, "Rheological properties of creams with four different surfactant combinations - effect of storage time and conditions," *Int. J. Pharm.*, vol. 221, no. 1–2, pp. 187–196, Jun. 2001.

- [60] P. Erni, P. Fischer, V. Herle, M. Haug, and E. J. Windhab, "Complex Interfaces and their Role in Protein-Stabilized Soft Materials," *ChemPhysChem*, vol. 9, no. 13, pp. 1833–1837, Sep. 2008.
- [61] J. Figarella, G. Leyral, and M. Terret, *Microbiologie générale et appliquée*. Ed. J. Lanore, 2004.
- [62] G. Leyral and E. Vierling, *Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires*. Doin, 2007.
- [63] K. S. . Rahman, J. Thahira-Rahman, P. Lakshmanaperumalsamy, and I. . Banat, "Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium," *Bioresour. Technol.*, vol. 85, no. 3, pp. 257–261, Dec. 2002.
- [64] M. Flores, M. Morillo, and M. L. Crespo, "Deterioration of raw materials and cosmetic products by preservative resistant microorganisms," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 40, no. 2–4, pp. 157–160, Jan. 1997.
- [65] C. Delarras, *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Editions Tec & Doc, 2007.
- [66] M. Gilbert, S. C. Gallagher, M. Eads, and M. F. Elmore, "Microbial Growth Patterns in a Total Parenteral Nutrition Formulation Containing Lipid Emulsion," *J. Parenter. Enter. Nutr.*, vol. 10, no. 5, pp. 494–497, Jan. 1986.
- [67] M. D. Lundov, L. Moesby, C. Zachariae, and J. D. Johansen, "Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy," *Contact Dermatitis*, vol. 60, no. 2, pp. 70–78, Feb. 2009.
- [68] C. G. Kumar and S. . Anand, "Significance of microbial biofilms in food industry: a review," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 42, no. 1–2, pp. 9–27, Jun. 1998.
- [69] X. Fernandez, F. Chemat, and T. Do, *Les huiles essentielles: Vertus et applications - Xavier Fernandez, Farid Chemat, Tien Do - Google Livres*, Vuibert. 2012.
- [70] X. Fernandez, Merck Florence, and A. Kerdudo, "Conservateurs pour cosmétiques - Généralités et conservateurs antimicrobiens," 2012.
- [71] A. Varvaresou *et al.*, "Self-preserving cosmetics," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 31, no. 3, pp. 163–175, Jun. 2009.
- [72] G. Papadakis, N. Skandalis, A. Dimopoulou, P. Glynos, and E. Gizeli, "Bacteria murmur: Application of an acoustic biosensor for plant pathogen detection," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, 2015.
- [73] S. Xu, "Electromechanical biosensors for pathogen detection," *Microchimica Acta*, vol. 178, no. 3–4. pp. 245–260, 2012.
- [74] N. V. Zaytseva, V. N. Goral, R. A. Montagna, and A. J. Baeumner, "Development of a microfluidic biosensor module for pathogen detection," *Lab Chip*, vol. 5, no. 8, p. 805, 2005.
- [75] M. R. Tomkins, J. Chow, Y. Lai, and A. Docoslis, "A coupled cantilever-microelectrode biosensor for enhanced pathogen detection," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 176, pp. 248–252, 2013.
- [76] D. C. Enigl and K. M. Sorrells, "Water Activity and Self-Preservatinf Formulas," in

Preservative-Free and Self-Preserving Cosmetics and Drugs: Principles and Practice, J. J. Kabara and D. S. Orth, Eds. 1996, pp. 45–73.

- [77] Cyrille Jean Loup Gerard Telinge, "FR2917290A1 - Compositions pour la protection de produits cosmetiques contre les pollutions micorbiennes - Google Patents."
- [78] J. J. Kabara and D. S. Orth, *Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs : principles and practices*. Marcel Dekker, 1997.
- [79] R. E. Glover, R. R. Smith, M. V. Jones, S. K. Jackson, and C. C. Rowlands, "An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 177, no. 1, pp. 57–62, Aug. 1999.
- [80] S. Papageorgiou, A. Varvaresou, E. Tsirivas, and C. Demetzos, "New alternatives to cosmetics preservation," *J. Cosmet. Sci.*, vol. 61, no. 2, p. 107, 2010.
- [81] M. R. W. Brown and R. M. E. Richards, "Effect of Polysorbate (Tween) 80 on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chemical inactivation," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 16, no. S1, p. 51T–55T, Dec. 1964.
- [82] C. M. Toutain-Kidd, S. C. Kadivar, C. T. Bramante, S. A. Bobin, and M. E. Zegans, "Polysorbate 80 Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Its Cleavage by the Secreted Lipase LipA," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 1, pp. 136–145, Jan. 2009.
- [83] D. Lopez and C. Lopez, "Cosmetic product sterilization," 2007.
- [84] P. Paquin, "Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides," *Int. Dairy J.*, vol. 9, no. 3–6, pp. 329–335, Mar. 1999.
- [85] M. Thiebaud, E. Dumay, L. Picart, J. P. Guiraud, and J. C. Cheftel, "High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation," *Int. Dairy J.*, vol. 13, no. 6, pp. 427–439, Jan. 2003.
- [86] E. Y. Wuytack, A. M. . Diels, and C. W. Michiels, "Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 77, no. 3, pp. 205–212, Aug. 2002.
- [87] F. H. Poliseli-Scopel, M. Hernández-Herrero, B. Guamis, and V. Ferragut, "Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 46, no. 1, pp. 42–48, Apr. 2012.
- [88] J. KOO, M. L. JAHNCKE, P. W. RENO, X. HU, and P. MALLIKARJUNAN, "Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Phosphate-Buffered Saline and in Inoculated Whole Oysters by High-Pressure Processing," *J. Food Prot.*, vol. 69, no. 3, pp. 596–601, Mar. 2006.
- [89] I. Khan, C. N. Tango, S. Miskeen, B. H. Lee, and D.-H. Oh, "Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review," *Food Control*, vol. 73, pp. 1426–1444, Mar. 2017.
- [90] Y. Briers *et al.*, "Analysis of outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa* and bactericidal activity of endolysins KZ144 and EL188 under high hydrostatic pressure," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 280, no. 1, pp. 113–119, Mar. 2008.

- [91] L. Leistner, "Basic aspects of food preservation by hurdle technology," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 55, no. 1–3, pp. 181–186, Apr. 2000.
- [92] B. Masschalck, R. Van Houdt, and C. W. Michiels, "High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 64, no. 3, pp. 325–332, Mar. 2001.
- [93] D. Nakimbugwe, B. Masschalck, G. Anim, and C. W. Michiels, "Inactivation of gram-negative bacteria in milk and banana juice by hen egg white and lambda lysozyme under high hydrostatic pressure," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 112, no. 1, pp. 19–25, Oct. 2006.
- [94] D. Nakimbugwe, B. Masschalck, D. Deckers, L. Callewaert, A. Aertsen, and C. W. Michiels, "Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 259, no. 1, pp. 41–46, Jun. 2006.
- [95] B. Masschalck, R. Van Houdt, E. G. Van Haver, and C. W. Michiels, "Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 1, pp. 339–44, Jan. 2001.
- [96] M. Jumaa and B. W. Müller, "Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process," *Int. J. Pharm.*, vol. 183, no. 2, pp. 175–184, Jun. 1999.
- [97] G. Chansiri, R. T. Lyons, M. V. Patel, and S. L. Hem, "Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization," *J. Pharm. Sci.*, vol. 88, no. 4, pp. 454–458, Apr. 1999.
- [98] Y. Huang, B. Chapman, M. Wilson, and A. D. Hocking, "Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 133, no. 1–2, pp. 179–185, Jul. 2009.
- [99] M. Antwi, A. H. Geeraerd, K. M. Vereecken, R. Jenné, K. Bernaerts, and J. F. Van Impe, "Influence of a gel microstructure as modified by gelatin concentration on *Listeria innocua* growth," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 7, no. 1–2, pp. 124–131, Jun. 2006.
- [100] A. J. Mitchell and J. W. T. Wimpenny, "The effects of agar concentration on the growth and morphology of submerged colonies of motile and non-motile bacteria," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 83, no. 1, pp. 76–84, Jun. 1997.
- [101] R. . Meldrum, T. . Brocklehurst, D. . Wilson, and P. D. . Wilson, "The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10°C," *Food Microbiol.*, vol. 20, no. 1, pp. 97–103, Feb. 2003.
- [102] A. E. Kapetanakou, A. Ampavi, S. Yanniotis, E. H. Drosinos, and P. N. Skandamis, "Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in vitro and evaluation in food matrices of different viscosity," *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 4, pp. 727–735, Jun. 2011.

- [103] M. M. Robins and P. D. G. Wilson, "Food structure and microbial growth," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 5, no. 9, pp. 289–293, Sep. 1994.
- [104] Z. Aspidou, T. Moschakis, C. G. Biliaderis, and K. P. Koutsoumanis, "Effect of the substrate's microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*," *Food Res. Int.*, vol. 64, pp. 683–691, Oct. 2014.
- [105] T. F. Brocklehurst, P. D. G. Wilson, and P. D. G. Wilson, "The role of lipids in controlling microbial growth," *Grasas y Aceites*, vol. 51, no. 1–2, pp. 66–73, Apr. 2000.
- [106] T. F. Brocklehurst, M. L. Parker, P. A. Gunning, H. P. Coleman, and M. M. Robins, "Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 78, no. 6, pp. 609–615, Jun. 1995.
- [107] M. L. Parker, T. F. Brocklehurst, P. A. Gunning, H. P. Coleman, and M. M. Robins, "Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: I-Methods for investigating the form of growth," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 78, no. 6, pp. 601–608, Jun. 1995.
- [108] P. D. . Wilson *et al.*, "Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 73, no. 2–3, pp. 275–289, Mar. 2002.
- [109] M. L. Parker, P. A. Gunning, A. C. Macedo, F. X. Malcata, and T. F. Brocklehurst, "The microstructure and distribution of micro-organisms within mature Serra cheese," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 84, no. 4, pp. 523–530, May 1998.
- [110] P. Prachaiyo and L. A. Mclandsborough, "Oil-in-Water Emulsion as a Model System to Study the Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in a Heterogeneous Food System," *J. Food Sci.*, vol. 68, no. 3, pp. 1018–1024, Apr. 2003.
- [111] Z. Saldaña *et al.*, "Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli," *Environ. Microbiol.*, vol. 11, no. 4, pp. 992–1006, Apr. 2009.
- [112] M. M. Barnhart and M. R. Chapman, "Curli Biogenesis and Function," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 60, no. 1, pp. 131–147, Oct. 2006.
- [113] K. L. Mittal and P. Kumar, *Handbook of microemulsion science and technology*. Marcel Dekker, 1999.
- [114] Wright D. Craig, "Antimicrobial oil-in-water emulsions," 1994.
- [115] I. s. i. Al-Adham, N. d. Al-Hmoud, E. Khalil, M. Kierans, and P. j. Collier, "Microemulsions are highly effective anti-biofilm agents," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 97–100, Feb. 2003.
- [116] I. S. I. Al-Adham, E. Khalil, N. D. Al-Hmoud, M. Kierans, and P. J. Collier, "Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 89, no. 1, pp. 32–39, 2000.
- [117] N. Terjung, M. Löffler, M. Gibis, J. Hinrichs, and J. Weiss, "Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials," *Food Funct.*, vol. 3, no. 3, pp. 290–301, 2012.

- [118] U. Buranasuksombat, Y. J. Kwon, M. Turner, and B. Bhandari, "Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 20, no. 3, pp. 793–800, 2011.
- [119] M. C. García, P. Cox, L. Trujillo-Cayado, J. Muñoz, and M. C. Alfaro, "Rheology, microstructural characterization and physical stability of W/ α -PINENE/W emulsions formulated with copolymers," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 536, pp. 125–132, Jan. 2018.
- [120] I. Masalova, R. Foudazi, and A. Y. Malkin, "The rheology of highly concentrated emulsions stabilized with different surfactants," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 375, no. 1–3, pp. 76–86, Feb. 2011.
- [121] R. Foudazi, S. Qavi, I. Masalova, and A. Y. Malkin, "Physical chemistry of highly concentrated emulsions," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 220, pp. 78–91, Jun. 2015.
- [122] B. K. Sharu, G. P. Simon, W. Cheng, J. Zank, and A. R. Bhattacharyya, "Development of microstructure and evolution of rheological characteristics of a highly concentrated emulsion during emulsification," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 532, pp. 342–350, Nov. 2017.
- [123] H. Katepalli, V. T. John, A. Tripathi, and A. Bose, "Microstructure and rheology of particle stabilized emulsions: Effects of particle shape and inter-particle interactions," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 485, pp. 11–17, Jan. 2017.
- [124] T. E. Theys *et al.*, "Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of Salmonella Typhimurium," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 128, no. 1, pp. 67–77, Nov. 2008.
- [125] M. P. Castro, A. M. Rojas, C. A. Campos, and L. N. Gerschenson, "Effect of preservatives, tween 20, oil content and emulsion structure on the survival of Lactobacillus fructivorans in model salad dressings," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 42, no. 8, pp. 1428–1434, Oct. 2009.
- [126] T. E. Theys, A. H. Geeraerd, F. Devlieghere, and J. F. Van Impe, "On the selection of relevant environmental factors to predict microbial dynamics in solidified media," *Food Microbiol.*, vol. 27, no. 2, pp. 220–228, Apr. 2010.
- [127] P. Didier *et al.*, "Rheological monitoring of tau protein polymerisation with acoustic waves sensor," *Electron. Lett.*, vol. 53, no. 5, pp. 298–300, Mar. 2017.
- [128] C. Ould-Ehsein *et al.*, "Ultrasonic monitoring of yoghurt formation by using AT-cut quartz: Lighting of casein micelles interactions process during the acidification," *Ultrasonics*, vol. 44, pp. 875–879, 2006.
- [129] O. Chidi and I. V. Adebayo, "Determination of Critical Micelle Concentration and Thermodynamic Evaluations of Micellization of GMS," 2018.
- [130] F. Puisieux, M. Seiller, and Association Français des Enseignants de Pharmacie Galénique, *Galenica. 5, 1, 5, 1.* Paris: Technique et Documentation Lavoisier, 1983.
- [131] F. Puisieux and M. Seiller, *Galenica. 5, 1, 5, 1.* Paris: Technique et Documentation Lavoisier, 1983.
- [132] K. I. Segall and H. D. Goff, "Determination of protein surface concentration for emulsions containing a partially crystalline dispersed phase," *Food Hydrocoll.*, vol. 13,

no. 4, pp. 291–297, Jul. 1999.

- [133] C. Berton, C. Genot, and M.-H. Ropers, “Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 354, no. 2, pp. 739–748, Feb. 2011.
- [134] C. Anchisi, A. M. Maccioni, C. Sinico, and D. Valenti, “Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents,” *Farm.*, vol. 56, no. 5–7, pp. 427–431, Jul. 2001.
- [135] B. Latreille and P. Paquin, “Evaluation of Emulsion Stability by Centrifugation with Conductivity Measurements,” *J. Food Sci.*, vol. 55, no. 6, pp. 1666–1668, Nov. 1990.
- [136] T. G. Mezger, *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. Vincentz Network, 2006.
- [137] B. Jett, K. Hatter, M. Huyckes, and M. Gilmore, “Benchmark s Simplified Agar Plate Method for Quantifying Viable Bacteria,” *Biotechniques*, vol. 23, pp. 648–650, 1996.
- [138] Y. Singh *et al.*, “Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 252, pp. 28–49, Apr. 2017.
- [139] V. K. Rai, N. Mishra, K. S. Yadav, and N. P. Yadav, “Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications,” *J. Control. Release*, vol. 270, pp. 203–225, Jan. 2018.
- [140] A. Araiza-Calahorra, M. Akhtar, and A. Sarkar, “Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 71, pp. 155–169, Jan. 2018.
- [141] T. G. Mason, “New fundamental concepts in emulsion rheology,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 4, no. 3, pp. 231–238, Jun. 1999.
- [142] T. G. Mason, J. N. Wilking, K. Meleson, C. B. Chang, and S. M. Graves, “Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, no. 41, pp. R635–R666, Oct. 2006.
- [143] C. Ould Ehssein *et al.*, “Kinetic study of silica gels by a new rheological ultrasonic investigation,” *Ultrasonics*, vol. 44, Supple, pp. e881–e885, Dec. 2006.
- [144] S. Akbari, A. Hamid Nour, S. Shima Jamari, and F. Fayaz, “RHEOLOGY AND STABILITY MECHANISM OF WATER-IN-CRUDE OIL EMULSIONS STABILIZED BY SPAN 83,” vol. 11, no. 4, 2016.
- [145] R. Chanamai and D. J. McClements, “Creaming Stability of Flocculated Monodisperse Oil-in-Water Emulsions,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 225, no. 1, pp. 214–218, May 2000.
- [146] R. Chanamai, G. Horn, and D. J. McClements, “Influence of Oil Polarity on Droplet Growth in Oil-in-Water Emulsions Stabilized by a Weakly Adsorbing Biopolymer or a Nonionic Surfactant,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 247, no. 1, pp. 167–176, Mar. 2002.
- [147] H. A. Stone and L. G. Leal, “The effects of surfactants on drop deformation and breakup,” *J. Fluid Mech.*, vol. 220, no. 1, p. 161, Nov. 1990.
- [148] X. LI and C. POZRIKIDIS, “The effect of surfactants on drop deformation and on the

- rheology of dilute emulsions in Stokes flow," *J. Fluid Mech.*, vol. 341, p. S0022112097005508, Jun. 1997.
- [149] T. Moschakis, "Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 18, no. 4, pp. 311–323, Aug. 2013.
- [150] R. P. Chhabra, "Non-Newtonian Fluids: An Introduction," in *Rheology of Complex Fluids*, New York, NY: Springer New York, 2010, pp. 3–34.
- [151] M.-S. Kwak, H.-J. Ahn, and K.-W. Song, "Rheological investigation of body cream and body lotion in actual application conditions," *Korea-Australia Rheol. J.*, vol. 27, no. 3, pp. 241–251, Aug. 2015.
- [152] P. E. Rouse, "A Theory of the Linear Viscoelastic Properties of Dilute Solutions of Coiling Polymers," *J. Chem. Phys.*, vol. 21, no. 7, pp. 1272–1280, Jul. 1953.
- [153] H. Abbasnezhad, M. R. Gray, and J. M. Foght, "Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium, *Pseudomonas fluorescens* LP6a, to an oil–water interface," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 62, no. 1, pp. 36–41, Mar. 2008.
- [154] C. Ould-Ehssein *et al.*, "Ultrasonic monitoring of yoghurt formation by using AT-cut quartz: Lighting of casein micelles interactions process during the acidification," *Ultrasonics*, vol. 44, no. SUPPL., 2006.
- [155] C. Ould Ehssein *et al.*, "Viscoelastic study of the yoghurt formation with TSM resonator," in *Anglo-French Phys. Acoust. Conference (AFPAC), Le Havre, janvier, 2005*, p. 6.
- [156] J. I. Acedo-Carrillo, A. Rosas-Durazo, R. Herrera-Urbina, M. Rinaudo, F. M. Goycoolea, and M. A. Valdez, "Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum," *Carbohydr. Polym.*, vol. 65, no. 3, pp. 327–336, 2006.
- [157] V. Gauthier, D. Desplan, and S. Serfaty, "Multi-frequency ultrasonic shear waves rheology for soft materials monitoring in cosmetics," in *IEEE COMET 2017 symposium*, 2017.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE I.1-1. POTENTIELS D'INTERACTION DLVO : (A) POUR DEUX PARTICULES EN INTERACTIONS ET (B) POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS SALINES (R : RAYON DE LA GOUTTE ET R : DISTANCE ENTRE LES GOUTTES) [9].	16
FIGURE I.1-2. FORMATION D'UNE EMULSION MIXTE CONTENANT DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES DONT LA SURFACE EST DIFFEREMMENT CHARGÉE SUITE A L'ADSORPTION DE LACTOFERRINE (LF), CHARGÉE POSITIVEMENT, ET DE B-LACTOGLOBULINE (BLG), CHARGÉE NEGATIVEMENT, A PH 6.	17
FIGURE I.1-3. IMAGES DE MICROSCOPIE OPTIQUE ($\times 200$) D'EMULSIONS SIMPLES H/E OBTENUES PAR TROIS METHODES DIFFERENTES D'EMULSIFICATION ET APRES DEUX SEMAINES DE STOCKAGE. A : AGITATION MAGNETIQUE ; B : HOMOGENEISEUR ; C : ULTRASONNS [21].	20
FIGURE I.1-4. COMPARAISON DE DEUX EMULSIONS SIMPLES H/E PREPAREES A PARTIR DE KEROSENE, D'EAU ET DE DODECYL SULFATE DE SODIUM (SDS), EMULSIFIEES PAR MEMBRANE (A GAUCHE) OU PAR UN HOMOGENEISEUR CLASSIQUE (A DROITE). SUR CES IMAGES DE MICROSCOPIE OPTIQUE LA BARRE D'ECHELLE INDIQUE $10 \mu\text{M}$ [25].	22
FIGURE I.1-5. EN HAUT, IMAGES DE MICROSCOPIE OPTIQUE D'UNE EMULSION SIMPLE H/E [26] ET PHOTOMICROGRAPHIE D'UNE EMULSION MULTIPLE E/H/E [27]. EN BAS, SCHEMAS REPRESENTANT DES EMULSIONS SIMPLES H/E ET E/H ET UNE EMULSION MULTIPLE E/H/E.	23
FIGURE I.1-6. IMAGE DE MICROSCOPIE A FLUORESCENCE CONFOCALE D'UNE EMULSION SIMPLE H/E TRES CONCENTREE ($\phi = 0,77$) [29].	24
FIGURE I.1-7. SCHEMAS DES DIFFERENTS PROCESSUS REVERSIBLES CONDUISANT A LA DEMIXTION D'UNE EMULSION COSMETIQUE SIMPLE H/E : CREMAGE (EN HAUT) ET FLOCCULATION (EN BAS) [30].	26
FIGURE I.1-9. PROPRIETES DES TENSIOACTIFS EN FONCTION DE LEUR NOMBRE HLB.	28
FIGURE I.2-1. REPRESENTATIONS D'UN MATERIAU AU REPOS ET SOUMIS A DES MOUVEMENTS DE CISAILLEMENT.	35
FIGURE I.2-2. MODELE DE MAXWELL GENERALISE.	37
FIGURE I.2-3. COURBES D'ECOULEMENTS POUR DES FLUIDES NEWTONIEN (1), RHEOFLUIDIFIANT (2), VISCOPLASTIQUE (3) ET RHEOEPAISSISSANT (4).	39
FIGURE I.2-4. ÉVOLUTION DES VISCOSITES APPARENTES EN FONCTION DE LA VITESSE DE CISAILLEMENT POUR DES EMULSIONS MIXTES, CONTENANT DES GOUTTELETTES DE TAILLES ET DE CHARGES DIFFERENTES, PREPAREES EN MELANGEANT DEUX EMULSIONS CONTENANT DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES RESPECTIVEMENT ENROBEES DE LACTOFERRINE (LF) ET DE B-LACTOGLOBULINE (BL) A PH 6. L : GROSSES GOUTTELETTES ; S : PETITES GOUTTELETTES ; + : GOUTTELETTES CATIONIQUES ; - : GOUTTELETTES ANIONIQUES [52].	40
FIGURE I.3-1. PROFIL DE CROISSANCE BACTERIENNE EN MILIEU LIQUIDE NON RENOUVELE (LOGARITHME DU NOMBRE DE BACTERIES N EST PORTE EN FONCTION DU TEMPS). PHASE DE LATENCE (I), PHASE D'ACCELERATION (II), PHASE D'ACCELERATION (III), PHASE DE RALENTISSEMENT (IV), PHASE STATIONNAIRE (V) ET PHASE DE DECLIN (VI) [61].	44
FIGURE I.3-2. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROCESSUS DE FORMATION D'UN BIOFILM [78] : 1. LES BACTERIES ISOLEES EVOLUENT LIBREMENT DANS UN MILIEU LIQUIDE (FORMES PLANCTONIQUES) ; 2. ELLES SE FIXENT SUR UNE SURFACE (ADHESION REVERSIBLE) ET S'ORGANISENT EN AMAS ; 3. ELLES S'ANCRENT DE FAÇON IRREVERSIBLE SUR LA SURFACE VIA DES APPENDICES CELLULAIRES ET LES EXOPOLYMERES QU'ELLES SECRETENT ; 4. LE BIOFILM ACQUIERT UNE STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE ET INSTAURENT AU SEIN DES MICROENVIRONNEMENTS (MATURATION) ; 5. UN CERTAIN NOMBRE DE CELLULES BACTERIENNES RETOURNENT A L'ETAT PLANCTONIQUE ET POURRONT FORMER UN NOUVEAU BIOFILM.	47
FIGURE I.3-3. FLACONS UTILISES POUR LA DETECTION DU CO_2 AVEC LE SYSTEME BIOLUMIX (A GAUCHE) ET BACT/ALERT 3D (A DROITE). SOURCES : WWW.MYBIOLUMIX.COM ET WWW.BIOMERIEUX.FR/DIAGNOSTIC-CLINIQUE/BACTALERTR-3D-SYSTEME-DE-DETECTION-MICROBIENNE .	50
FIGURE I.3-4. IMAGES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION MONTRANT LES MORPHOLOGIES DE COLONIES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA APRES 24 H PASSEES DANS UN GEL D'AGAR : A 0,5% (MORPHOLOGIE SPHERIQUE, A GAUCHE) ; A 1% (MORPHOLOGIE CONVEXE, A DROITE) [99]. LES COLONIES CONVEXES ONT UNE DENSITE PLUS ELEVEE EN CELLULES BACTERIENNES.	55
FIGURE I.3-5. SCHEMA (A GAUCHE) ET IMAGE MICROGRAPHIE OPTIQUE (A DROITE) MONTRANT LA CROISSANCE D'UNE POPULATION MICROBIENNE MIXTE (BACTERIES LACTIQUES, COLIFORMES ET STAPHYLOCOQUES) DANS UN ECHANTILLON DE FROMAGE [107], [108]. LE FROMAGE, CONSIDERE COMME UN FLUIDE COMPLEXE, EST REALISE A PARTIR DE LAIT SE TROUVE ETRE UNE EMULSION.	56
FIGURE I.3-6. IMAGES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DE COLONIES DE E. COLI O157 H7 EN PHASE STATIONNAIRE CULTIVEES : DANS UN MILIEU DE CULTURE MINIMUM COMPLETE PAR 0,4% DE GLUCOSE (A GAUCHE) ET DANS UNE EMULSION A 40% A HEXADECANE COMPLETEE PAR 0,4% DE GLUCOSE (A DROITE) [109]. DANS CETTE SECONDE EMULSION, LES COLONIES SONT RECOUVERTES DE CURLI.	57
FIGURE II.1-1. STRUCTURE DU MOTIF ACIDE ACRYLIQUE.	63

FIGURE II.1-2. STRUCTURE DES MONOMERES D'ACRYLATE ET D'ALKYL ACRYLATE (R' : GROUPES ALKYL A LONGUES CHAINES).	63
FIGURE II.1-3. EFFET DU PH SUR LA VISCOSITE A 25°C POUR DIFFERENTS CARBOPOL DISPERSÉS DANS L'EAU (0,5%). LA NEUTRALISATION A ÉTÉ RÉALISÉE AVEC DE LA SOUDE A 18% ET LES MESURES DE VISCOSITE AVEC UN VISCOSIMÈTRE BROOKFIELD RVT. SOURCE : FICHE TECHNIQUE DU CARBOPOL ULTREZ 21 DATANT DU 6 NOVEMBRE 2002, LUBRIZOL.	64
FIGURE II.1-4. STRUCTURE DE L'IPP (DENSITÉ A 20°C DE 0,852 G.CM ³ ET HLB REQUIS = 11,5).	64
FIGURE II.1-5. STRUCTURE DU P80 (EN HAUT) ET DU GMS (EN BAS).	65
FIGURE II.1-6. STRUCTURE DU STEARETH-21 (N = 21).	66
FIGURE II.2-1. SCHEMA DES DIFFÉRENTES GEOMETRIES DES RHEOMETRES : (A) PLAN-PAN (H LA HAUTEUR DE L'ENTREFER, R LE RAYON DU DISQUE) ; (B) CONE-PLAN (A L'ANGLE ENTRE LE CONE ET LE PLAN HORIZONTAL, θ L'ANGLE ENTRE LE CONE ET L'AXE VERTICAL, R LE RAYON DU DISQUE) ; (C) COUETTE (R_i LE RAYON DU CYLINDRE INTERNE, R_e LE RAYON DU CYLINDRE EXTERNE, H LA HAUTEUR DU CYLINDRE INTERNE). Ω ET C SONT RESPECTIVEMENT LA VITESSE DE ROTATION EN RAD.S ⁻¹ ET LE COUPLE TRANSMIS EN N.M.	72
FIGURE II.2-2. PROPAGATION D'UNE ONDE DE CISAILLEMENT A TRAVERS UN FLUIDE COMPLEXE DE TYPE EMULSION. LES ROND JAUNES REPRESENTENT LES GOUTTELETTES D'HUILE DISPERSÉES DANS UNE PHASE AQUEUSE EN BLEU. POUR PLUS DE CLARTE, LE SCHEMA N'EST PAS A L'ECHELLE.	74
FIGURE II.2-3. SCHEMA DE LA CHAINE DE MESURE COMPLETE POUR LE SUIVI MICRORHEOLOGIQUE DE FLUIDE COMPLEXES.	75
FIGURE II.2-4. LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES DE MESURES UTILISÉES POUR LES MESURES MICRORHEOLOGIQUES D'EMULSIONS. A GAUCHE QUARTZ SUR CELLULE Q-SENS. A DROITE QUARTZ MONTE SUR SUPPORT PLACE VERTICALEMENT.	76
FIGURE II.3-1. METHODE DE CONTAMINATION FORCEE DES EMULSIONS PAR P. FLUO 76A : 5 x 10 μ L DE CULTURE BACTERIENNE SONT REPARTIS DANS 5 G D'EMULSION, LES VOLUMES DE CULTURES BACTERIENNES SONT PRELEVÉS ET DEPOSÉS A LA MICROPIPETTE.	79
FIGURE II.3-2. DISPOSITIF POUR LA CONTAMINATION FORCEE D'EMULSION ET LE DE SUIVI DE CROISSANCE BACTERIENNE PAR MICRORHEOLOGIE.	80
FIGURE II.3-3. DILUTIONS EN CASCADE ET ÉTALEMENT SUR BOITES DE PETRI.	81
FIGURE III.1-1. COMPORTEMENT SCHEMATIQUE STRUCTUREL ET RHEOLOGIQUE DES EMULSIONS EN FONCTION DE LA FRACTION ENTRE PHASES	84
FIGURE III.2-1. ÉVOLUTION DE LA VISCOSITE APPARENTE (A GAUCHE) ET DES MODULES G' ET G'' (A DROITE) EN FONCTION DE LA CONTRAINTE DE CISAILLEMENT. LES MESURES ONT ÉTÉ RÉALISÉES A 25°C A DES CONTRAINTES COMPRISÉES ENTRE 1 ET 1000 PA.	88
FIGURE III.2-2. MICROSCOPIES OPTIQUES DE SIX EMULSIONS DE REFERENCE PRISE A J_{+1} (OBJECTIF x 63).	89
FIGURE III.2-3. DISPERSION DES MODULES ELASTIQUES ET VISQUEUX OBTENUE EN MICRORHEOLOGIE POUR LES EMULSIONS DE REFERENCES ; L'ERREUR DE MESURE POUR CETTE TECHNIQUE EST ESTIMÉE A 10%.	89
FIGURE III.2-4. SUIVI DES MODULES ELASTIQUES ET VISQUEUX MESURÉS A 25°C ET 28°C POUR DES EMULSIONS PLACÉES EN STABILITÉ DE STOCKAGE A 25°C PENDANT 60 JOURS A 15 MHZ.	91
FIGURE III.3-1. MICROSCOPIE OPTIQUE DES EMULSIONS (OBJECTIF x 63) EN FONCTION DU TAUX D'IPP.	94
FIGURE III.3-2. MICROSCOPIE OPTIQUE DES EMULSIONS POSSEDANT 0%, 3%, 6% ET 9% D'EMULSIFIANTS (OBJECTIF x 63).	95
FIGURE III.3-3. VISCOSITE APPARENTE EN FONCTION DE LA CONTRAINTE (A) OU DE LA FRACTION VOLUMIQUE (B). LES MESURES ONT ÉTÉ RÉALISÉES A 25°C A DES CONTRAINTES COMPRISÉES ENTRE 0,1 ET 1000 PA.	98
FIGURE III.3-4. ÉVOLUTION DES MODULES G' (A) ET G'' (B) EN FONCTION DU TAUX DE CISAILLEMENT POUR DIFFÉRENTS POURCENTAGE EN IPP.	99
FIGURE III.3-5. REPRESENTATION MECANIQUE APPARENTE DE L'EMULSION CONSIDÉRÉE.	100
FIGURE III.3-6. ÉVOLUTION DES CONSTANTES DE TEMPS τ ET EXPOSANT α ET DES RIGIDITES APPARENTES G_{APP} EN FONCTION DE LA FRACTION VOLUMIQUE. CHAQUE POINT CORRESPOND A LA MESURE MOYENNE FAITE SUR CHAQUE EMULSION POUR LES SEPT POURCENTAGES D'HUILE (IPP) A 6% DE (P80 + GMS) : 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%.	102
FIGURE III.3-7. ÉVOLUTION DE LA VISCOSITE EN FONCTION DE LA CONTRAINTE (A) OU DU POURCENTAGE D'EMULSIONNANTS (B).	104
FIGURE III.3-8. ÉVOLUTION DES MODULES G' ET G'' EN FONCTION DU TAUX DE CISAILLEMENT POUR DIFFÉRENTS POURCENTAGES EN EMULSIFIANTS.	106
FIGURE III.3-9. ÉVOLUTION CONSTANTES DE TEMPS τ ET EXPOSANT α ET DES RIGIDITES APPARENTES G_{APP} ET DES EN FONCTION DE LA FRACTION VOLUMIQUE Φ . CHAQUE POINT CORRESPOND A LA MESURE MOYENNE FAITE SUR CHAQUE EMULSION POUR LES QUATRE POURCENTAGES D'EMULSIFIANTS (P80 + GMS) A 15% D'IPP : 0%, 3%, 6%, 9%.	106
FIGURE III.3-10. REPRESENTATION DU MODULE ELASTIQUE G' (A), DU MODULE VISQUEUX G'' (B) AUX ECHELLES MICROSCOPIQUE (O) ET MACROSCOPIQUE (■) EN FONCTION DU %IPP.	108
FIGURE IV.1-1. IMAGES DE MICROSCOPIE OTIQUE (OBJECTIF x 63) DE L'EMULSION DE REFERENCE NON AUTOCLAVÉE (A GAUCHE) ET AUTOCLAVÉE (A DROITE).	114
FIGURE IV.1-2. IMAGES DE MICROSCOPIE OPTIQUE (OBJECTIF x 63) DE L'EMULSION DE REFERENCE APRES 20 MINUTES A 1, 2, 4 ET 6 BAR ET A TEMPERATURE AMBIANTE.	115

FIGURE IV.1-3. IMAGES DE MICROSCOPIE OPTIQUE (OBJECTIF $\times 63$) DES EMULSIONS CONTENANT 0,5 ET 1% DE CARBOPOL ETD 2050. (A) AVANT ET (B) APRES AUTOCLAVE (20 MINUTES A 121°C, 2 BAR).	118
FIGURE IV.1-4. IMAGES DE MICROSCOPIES OPTIQUES (OBJECTIF $\times 63$) DES EMULSIONS A, B ET C, CONTENANT 30 % D'HUILE AVANT (A GAUCHE) ET APRES (A DROITE) AUTOCLAVE.	121
FIGURE IV.1-5. IMAGES DE MICROSCOPIE OPTIQUE (OBJECTIF $\times 63$) DE L'EMULSION CONTENANT 25% D'HUILE ET 6% D'UN SYSTEME EMULSIONNANT (P80 + GMS + BRIJ) AVANT (A GAUCHE) ET APRES (A DROITE) AUTOCLAVE.	122
FIGURE IV.2-1. PROFIL DE CROISSANCE DE P. FLUO 76A DANS L'EMULSION DE REFERENCE (TROIS JOURS A 28°C).	124
FIGURE IV.2-2. PROFIL DE CROISSANCE DE P. FLUO 76A DANS L'EMULSION (32 JOURS A 25°C).	125
FIGURE IV.3-1. SUIVI SUR TROIS JOURS DES MODULES VISQUEUX ET ELASTIQUES EN MICRORHEOLOGIE D'UNE EMULSION TEMOIN (\square) ET UNE EMULSION AVEC P. FLUO 76A (\blacksquare) A 25°C.	127
FIGURE IV.3-2. (A) COMPARAISON DE L'EVOLUTION DU MODULE ELASTIQUE G' (AXE DE GAUCHE) POUR UNE EMULSION TEMOIN (\square) ET UNE EMULSION CONTENANT DES BACTERIES P. FLUO 76A (\blacksquare) PENDANT TROIS JOURS A 25°C AVEC LA COURBE DE CROISSANCE BACTERIENNE (O) (AXE DE DROITE). (B) EVOLUTION DU MODULE ELASTIQUE G' EN FONCTION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE.	128
FIGURE IV.3-3. PROFIL DE CROISSANCE DE P. FLUO 76A INOCULEES DANS 40 ML D'EMULSION DE REFERENCE (10^5 UFC.ML ⁻¹) A 25°C. CES RESULTATS SONT LA MOYENNE DE TROIS PRELEVEMENTS POUR TROIS ESSAIS DISTINCTS.	131
FIGURE IV.3-4. EVOLUTION DES MODULES ELASTIQUES ET VISQUEUX POUR DEUX EMULSIONS CONTAMINEES PAR P. FLUO 76A (ESSAIS 1 ET 2) PENDANT 14 JOURS.	132
FIGURE IV.3-5. PROFIL DE CROISSANCE DE P. FLUO 76A INOCULEE DANS 40 ML (10^5 UFC.ML ⁻¹) D'EMULSION CONTENANT 1% DE CARBOPOL CETD.	134
FIGURE IV.3-6. EVOLUTION DES MODULES ELASTIQUES ET VISQUEUX POUR UNE EMULSION TEMOIN ET UNE EMULSION CONTENANT 1% DE GELIFIANT CARBOPOL ET INOCULEES PAR P. FLUO 76A (10^5 UFC.ML ⁻¹). LE SUIVI EST REALISE PENDANT 14 JOURS ET 13 JOURS POUR L'EMULSION TEMOIN (BLANC).	136
FIGURE IV.3-7. EVOLUTION DES MODULES ELASTIQUES ET VISQUEUX POUR UNE EMULSION TEMOIN ET UNE EMULSION CONTENANT 1% DE GELIFIANT CARBOPOL ET INOCULEES PAR P. FLUO 76A (10^5 UFC.ML ⁻¹). LE SUIVI EST REALISE PENDANT 14 JOURS ET 13 JOURS POUR L'EMULSION TEMOIN (BLANC).	137
TABLEAU I.1-1. COMPARAISON DE DIFFERENTS PROCEDES D'EMULSIFICATION [26].	22
TABLEAU I.3-1. ACTIVITE DE L'EAU MINIMALE POUR LES MICRO-ORGANISMES UTILISES OU RECHERCHES LORS DES TESTS COSMETIQUES.	45
TABLEAU II.1-1. LISTE DES MATIERES PREMIERES ET LEURS POURCENTAGES AU SEIN DE L'EMULSION DE REFERENCE.	67
TABLEAU II.1-2. CONDITIONS DE STOCKAGE POUR LE SUIVI DU VIEILLISSEMENT ACCELERE (* UNIQUEMENT POUR LA FORMULE DE REFERENCE).	69
TABLEAU II.1-3. CONDITIONS DE CENTRIFUGATIONS POUR DIFFERENTES ETUDES SUR LES EMULSIONS.	69
TABLEAU III.1-1. FORMULES DES DIFFERENTS ESSAIS ET LEURS CRITERES DE STABILITE.	87
TABLEAU III.2-1. VALEURS MOYENNE DES MODULES ELASTIQUES ET VISQUEUX.	90
TABLEAU III.3-1. LISTE DES MATIERES PREMIERES ET DE LEURS POURCENTAGES AU SEIN DES EMULSIONS DONT LA CONCENTRATION EN IPP OU EN EMULSIFIANTS (P80 + GMS) VARIENT. LE RAPPORT P80/GMS DE 70/30 EST CONSTANT.	92
TABLEAU III.3-2. OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES DES EMULSIONS DE 0 A 60 % D'IPP ET DE 0 A 9% D'EMULSIFIANTS (P80 + GMS). CES OBSERVATIONS SONT EFFECTUEES JUSTE APRES LA FORMULATION OU 24 HEURES PLUS TARD SUR LES EMULSIONS POUR LESQUELLES ON A FAIT VARIER LE POURCENTAGE D'IPP OU D'EMULSIFIANT. ϕ CORRESPOND A LA FRACTION VOLUMIQUE ESTIMEE (AVEC LE RAPPORT : VOLUME DE LA PHASE DISPERSEE / VOLUME DE LA PHASE DISPERSEE + VOLUME DE LA PHASE CONTINUE).	93
TABLEAU III.3-3. VALEURS STATISTIQUES DES TAILLES DE GOUTTELETTES OBTENUES PAR ANALYSE D'IMAGE A L'AIDE DU LOGICIEL IMAGEJ. ϕ CORRESPOND A LA FRACTION VOLUMIQUE ET D_{MIN} - D_{MOY} - D_{MAX} LES DIAMETRES MINIMUM, MOYEN ET MAXIMUM DE LA TAILLE DES GOUTTELETTES.	96
TABLEAU IV.1-1. MODULES VISCOELASTIQUES DE L'EMULSION DE REFERENCE SOUS DIFFERENTES CONDITIONS DE PRESSION ET TEMPERATURE.	116
TABLEAU IV.1-2. MODULES VISCOELASTIQUES D'EMULSIONS A POURCENTAGE CROISSANT EN GELIFIANT SANS ET AVEC AUTOCLAVAGE.	118
TABLEAU IV.1-4. COMPOSITION DE L'EMULSION CONTENANT 25% D'HUILE ET 6% D'UN SYSTEME EMULSIONNANT FORME PAR TROIS EMULSIFIANTS (P80 + GMS + BRIJ).	122

COMMUNICATIONS

Publications

Desplan D., Michiel M., Lemarquand A., Serfaty S., Le Huérou J-Y., Griesmar P. High frequency rheology monitoring for emulsion stability characterization, IEEE Xplore (COMET 2017)

Gauthier V., Desplan D., Serfaty S., Michiel M., Caplain E., Le Huérou J-Y. Multi-frequency ultrasonic shear waves rheology for soft materials monitoring in cosmetics, IEEE Xplore (COMET 2017)

Desplan D., Michiel M., Serfaty S., Le Huérou J-Y., Griesmar P. *Multi-scale characterization of structure and stability of O/W emulsions: a new approach including ultrasonic rheology* , (soumis)

Communications orales

Desplan D., Barhoumi N., Michiel M., Duclairoir-Poc C., Orange N., Griesmar P. Caractérisations mécaniques et électriques des produits cosmétiques : stabilité et contaminations biologiques. *GDR 3711 Cosm'actifs*, Orléans, 26-27 Septembre 2016.

Desplan D., Michiel M., Lemarquand A., Serfaty S., Griesmar P., Le Huérou J-Y. High frequency rheology monitoring for emulsion stability characterization. *COMET 2017*, Cergy, 6-7 Juin 2017.

Desplan D., Michiel M., Lemarquand A., Serfaty S., Le Huérou J-Y., Griesmar P. Caractérisations mécaniques et électriques des produits cosmétiques: stabilité et contaminations biologiques. *Journée de l'école doctorale Science et ingénierie*, Cergy-Pontoise, 29 juin 2017.

Communications par affiches

Desplan D., Barhoumi N., Michiel M., Duclairoir-Poc C., Orange N., Griesmar P. Study of cosmetics stability through high frequency rheology measurements: characterization of physical instabilities and bacterial contamination. *Cosm'innov2016*, Orléans, 24-25 Mai 2016.

Assad A., Desplan D., Michiel M., Serfaty S., Peno-Mazzarino L., Lati E., Griesmar P. Incorporation de différentes nanoparticules dans des émulsions cosmétiques : propriétés rhéologiques et effets sur la peau. *Inauguration de la PMFI Cosmetomique*, Neuville-sur-Oise, 21 Septembre 2016.

Communications vulgarisées

Desplan D. Caractérisations mécaniques et électriques des produits cosmétiques : stabilité et contaminations biologiques. *Ma thèse en 180 secondes*. 1^{er} prix, finale régionale de la COMUE Paris-Seine, Cergy, 25 Avril 2017. 2^{ème} prix, finale nationale, Paris, 14 Juin 2017. Participation à la finale internationale Liège (Belgique) le 28 septembre 2017.

Lien vidéo : <https://www.youtube.com/watch?v=NgxHDI6R9X0&t>

Desplan D. La congélation d'émulsion : crème (très) fraîche. Travaux de vulgarisation réalisé à partir de la recherche de :

- Sylvain Deville (CNRS) Laboratoire de Synthèse et Fonctionnalisation des Céramiques (LSFC - CNRS / Saint-Gobain)
- Cécile Monteux (CNRS) Laboratoire des Sciences et Ingénierie de la Matière Molle (SIMM - CNRS / Sorbonne Universités / ESPCI / Paris)

En collaboration avec Léa Bello (CNRS image) dans le cadre de la chaine *Zeste de science du CNRS*. Le 8 Juin 2018.

Article support : Five-dimensional imaging of freezing emulsions with solute effects, Dmytro Dedovets, Cécile Monteux, Sylvain Deville, Science, Vol. 360, Issue 6386, 20 Apr 2018 pp. 303-306. DOI: 10.1126/science.aar4503

Lien vidéo : <https://www.youtube.com/watch?v=SvjqBzxzNYs&t>

MISSIONS D'ENSEIGNEMENT

J'ai réalisé 64 heures (HETD) par an au cours de mes trois années de thèse, au sein du département Génie Biologique de l'IUT de Cergy-Pontoise. Ce service comprenait :

- des heures de travaux dirigés (TD) de chimie et de biochimie en 1^{re} et 2^{nde} années : essentiellement de la remise à niveau en chimie organique ;
- des heures de travaux pratiques (TP) de chimie et de biochimie en 1^{er} et 2^{nde} années : séparation et identification des pigments végétaux, chromatographie sur couche mince de sucres, dosage spectrophotométrique par la méthode de l'ortho-toluidine, identification et dosage d'un colorant alimentaire par spectroscopie visible, dosage du saccharose par spectroscopie infrarouge, dosage de l'histidine, cinétique de décoloration du bleu de bromophénol, synthèse d'un arôme alimentaire, dismutation de l'eau oxygénée, séparation et purification des constituants d'un mélange organique, dosage spectrophotométrique du phosphore dans le sol ;
- le suivi de projets tuteurés (PT) des 1^{re} année : recherches bibliographiques sur différents thèmes scientifique, « la biodégradation bactérienne du pétrole », « l'empoisonnement au monoxyde de carbone », « la chute du cheveu » et « l'utilisation industrielle de coproduits et sous-produits » ;
- la mise au point d'un TP « cosmétique » en 2^{nde} année, option Génie de l'Environnement, ce TP intègre la formulation d'émulsions et une réflexion sur l'impact des produits cosmétiques des matières premières aux produits finis en tant que déchets.

CARACTERISATION RHEOLOGIQUE MULTI-ECHELLE DES EMULSIONS COSMETIQUES POUR LEUR STABILITE ET LEUR CONSERVATION

Depuis plus de 20 ans, de nombreuses méthodes et techniques non invasives ont été développées en vue de mesurer le plus objectivement possible, les propriétés (physico-chimiques, sensorielles, etc.) des produits cosmétiques. Ces méthodes visent à évaluer leurs innocuité et efficacité, et deviennent d'autant plus perfectionnées que les processus d'élaborations de ces produits deviennent complexes et innovants. Au cours de ces travaux de thèse, une étude multi-échelle, de l'évolution structurale d'émulsions cosmétiques, simples H/E, représentatives des émulsions mises sur le marché a été menée, afin de prédire leur stabilité tant texturale que microbiologique.

Grâce à une technique non destructive ultrasonore permettant d'accéder aux propriétés microrhéologiques (propriétés viscoélastiques observées lors d'une sollicitation harmonique de cisaillement à quelques MHz), en association avec différentes techniques classiques de caractérisation (microscopie optique, rhéologie basse fréquence, etc.), il a été possible de corréliser les paramètres microrhéologiques obtenus à des modèles physiques reliant structuration interne et stabilité dans les émulsions considérées. Les résultats ont montrés que les données microrhéologiques sont sensibles aux variations de compositions (concentration) et d'organisations microscopiques des gouttelettes au sein des émulsions (floculation, coalescence, etc.). Ensuite, le suivi du développement de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* dans des émulsions ayant des structures internes différentes, a montré d'une part la sensibilité de la microrhéologie vis-à-vis de la présence de bactéries dans le milieu, et d'autre part, l'impact de la structure et de l'organisation des gouttelettes grasses sur le développement de ces bactéries.

Finalement, la microrhéologie apparait être une méthode de mesure innovante et adaptée à l'échelle industrielle apportant une valeur ajoutée lors du développement de formulations cosmétiques. D'un point de vue sécuritaire, le dépistage précoce de contaminations biologiques par la détection d'instabilités (de changements) structurales au sein des émulsions, pourrait représenter une avancée majeure lors des phases de production et de commercialisation des produits cosmétiques.

Mots clés : émulsion H/E, rhéologie, microrhéologie, microstructure, stabilité, croissance bactérienne, *Pseudomonas fluorescens*

MULTI-SCALE RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF COSMETIC EMULSIONS FOR STABILITY AND CONSERVATION

In the last 20 years, many non-invasive methods and techniques have been developed in order to measure the properties (physicochemical, sensory, etc.) of cosmetic products. These methods are designed to evaluate their safety and efficiency, and become even more sophisticated as the processes of these products become complex and innovative. During this thesis works, a multi-scale study of the structural evolution of cosmetic emulsions was conducted in order to predict their textural and microbiological stability.

Thanks to an ultrasonic non-destructive technique allowing access to microrheological properties (viscoelastic properties obtained by a harmonic shear mode at a few MHz), in association with different classical characterization techniques (optical microscopy, low frequency rheology, etc.), it was possible to correlate the microrheological parameters obtained with the internal structure and stability in the emulsions considered. The results showed that microrheological data are sensitive to variations in composition (concentration) and microscopic organization of droplets within emulsions (flocculation, coalescence, etc.). Then, the monitoring of the *Pseudomonas fluorescens* bacteria growth in emulsions with different internal structures showed on the one hand the sensitivity of microrheology to the presence of bacteria in the cream, and on the other hand, the impact of the structure and organization of droplets on the development of these bacteria.

Finally, microrheology appears to be an innovative and suitable measurement method to an industrial scale, providing added value to the development of cosmetic formulations. From a safety perspective, the early detection of biological contaminations by the detection of structural instabilities (changes) within emulsions could represent a major advance during the production and commercialization phases of cosmetics.

Key words: O/W emulsions, rheology, microrheology, microstructure, stability, bacterial growth, *Pseudomonas fluorescens*